# Universidad de Huelva

**Departamento de Química "Profesor José Carlos Vílchez Martín"**

## Estudio metalómico/metabolómico comparativo del ratón de laboratorio *Mus musculus* y del ratón de vida libre *Mus spretus* para evaluar el estrés ambiental de ecosistemas terrestres

**Memoria para optar al grado de doctor**
**presentada por:**

**Miguel Ángel García Sevillano**

Fecha de lectura: 2 de febrero de 2016

Bajo la dirección de los doctores:

José Luis Gómez Ariza

Tamara García Barrera

**Huelva, 2016**

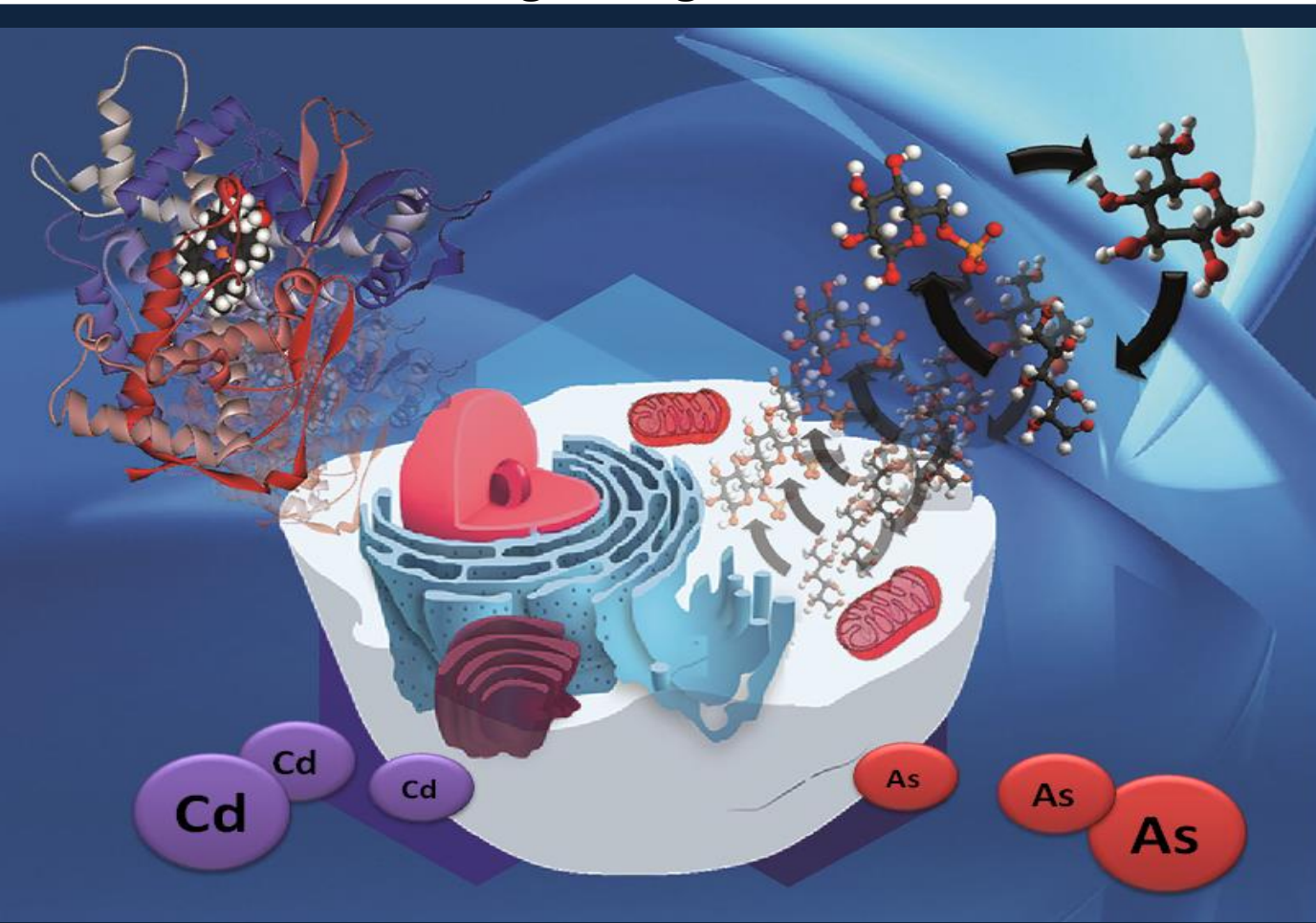
CC BY NC ND

TESIS DOCTORAL

dqcm
Departamento de Química
y Ciencia de los Materiales
Profesor José Carlos Vilchez Martín

# Estudio Metalómico/Metabolómico Comparativo del Ratón de Laboratorio *Mus musculus* y del Ratón de Vida Libre *Mus spretus* para Evaluar el Estrés Ambiental de Ecosistemas Terrestres

*Miguel Ángel García Sevillano, 2016*




Universidad de Huelva

# UNIVERSIDAD DE HUELVA

## DEPARTAMENTO DE QUÍMICA Y CIENCIA DE LOS MATERIALES

*"Prof. José Carlos Vílchez Martín"*

# Estudio Metalómico/Metabolómico Comparativo del Ratón de Laboratorio *Mus musculus* y del Ratón de Vida Libre *Mus spretus* para Evaluar el Estrés Ambiental de Ecosistemas Terrestres

## PROGRAMA DE DOCTORADO:

CIENCIA Y TECNOLOGÍA QUÍMICA

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR POR:
Miguel Ángel García Sevillano
BAJO LA DIRECCIÓN DE LOS DIRECTORES:
José Luis Gómez Ariza y Tamara García Barrera
Huelva, 2016

# Estudio Metalómico/Metabolómico Comparativo del Ratón de Laboratorio *Mus musculus* y del Ratón de Vida Libre *Mus spretus* para Evaluar el Estrés Ambiental de Ecosistemas Terrestres

Directores:


*Fdo.: José Luis Gómez Ariza*
CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD

*Fdo.: Tamara García Barrera*
PROFESORA TITULAR DE UNIVERSIDAD

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA Y CIENCIAS DE LOS MATERIALES
«Profesor José Carlos Vílchez Martín»
Universidad de Huelva


Trabajo presentado para aspirar al grado de Doctor por el Licenciado:


*Fdo.: Miguel Ángel García Sevillano*
LICENCIADO EN QUÍMICA

**D. JOSÉ LUIS GÓMEZ ARIZA,** Catedrático de Universidad y director del Departamento de Química y Ciencia de los Materiales "Profesor José Carlos Vílchez Martín" de la Universidad de Huelva

HACE CONSTAR QUE:

El presente trabajo de investigación, titulado *"Estudio Metalómico/Metabolómico Comparativo del Ratón de Laboratorio Mus musculus y del Ratón de Vida Libre Mus spretus para Evaluar el Estrés Ambiental de Ecosistemas Terrestres"*, realizado por D. Miguel Ángel García Sevillano, bajo la dirección del Prof. José Luis Gómez Ariza y la Prof. Tamara García Barrera, reúne los requisitos necesarios para ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en el Departamento de Química y Ciencia de los Materiales "Prof. J. C. Vílchez Martín" de la Universidad de Huelva.

Huelva, 16 de Noviembre de 2015

Fdo. José Luis Gómez Ariza
DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA Y CIENCIA DE LOS MATERIALES

# AGRADECIMIENTOS

*Quiero expresar mi agradecimiento a mis Directores de Tesis, José Luis Gómez Ariza y Tamara García Barrera, por abrirme las puertas de su grupo de investigación "Análisis Medioambiental y Bioanálisis" y darme la oportunidad de llevar cabo el trabajo de investigación de la presente Tesis, consejos y ayuda en la planificación y desarrollo de los diferentes experimentos. En especial, me gustaría remarcar en estas líneas todo el apoyo, el haber llevado mi trabajo a todo aquel congreso al cual ha sido invitado o participado y por haberme contagiado su ilusión y constancia por la investigación a José Luís, aparte de por su amistad, GRACIAS.*

*Este trabajo tampoco hubiese podido llevarse a cabo sin la ayuda, conocimientos, sugerencias y los buenos consejos de Francisco Navarro, Nieves Abril, Carmen Pueyo y Juan López Barea, gracias por haber sido pilares fundamentales en la parte biológica y bioquímica de la presente Tesis, siempre os estaré agradecido compañeros.*

*Agradezco al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte de España por la concesión de una beca de Formación de Profesorado Universitario, ya que sin este medio de financiación no hubiera sido posible la realización de esta Tesis Doctoral.*

*También quisiera agradecer al Dr. Andreas Prange por brindarme la oportunidad de pertenecer y colaborar con su grupo de investigación donde he podido desarrollar mis conocimientos científicos, por su atención y hospitalidad. A todos mis compañeros del Institute for Coastal Research (Helmholtz-Zentrum Geesthacht), en especial a Juan, Adriana, Daniel, Jördis, Florian, Anika, Chirstiane, Doris, Burkard, y Stephan por todo el apoyo, atención y ayuda que me habéis brindado desde el primer día que llegué, haciéndome sentir como si yo fuera uno más de vosotros y como si estuviera en España.*

*Agradezco también al grupo de investigación del Profesor Alfredo Sanz Medel de la Universidad de Oviedo por su asesoramiento y ayuda en el desarrollo de los estudios basados en la dilución isotópica, en especial a María Luisa Fernández, Raquel González, Sonia Fernández y Yoana Nuevo.*

*Como no podría ser de otra forma, quiero dar las gracias a todos mis compañeros del laboratorio que estuvieron y a los que están, ya que de cada uno de vosotros he aprendido algo que me ha hecho mejorar y superarme, a Pablo, Verónica, Jessica, Macarena, Rocío Jara, Manolo, José Manuel, Fernando, Rocío Castilla, Raúl, Amanda, Gema, Belén, Ana Arias y Antonio, con los he compartido tantas horas durante estos años. Y también a los compañeros vecinos, a Marta, Encarni, Mercedes, Zaida, Paloma, Cristina y Eli, con los que no sólo he compartido trabajo, sino también muchos buenos momentos.*

*Muchas gracias también a todos aquellos que empezasteis siendo mis profesores durante la Licenciatura en Química y habéis acabado siendo mis compañeros en el Departamento de Química y Ciencias de los Materiales, a Carlos Vílchez, Mari Ángeles, Ana Sayago, Rafael Beltrán, Emilio Morales, Inma Giráldez, Daniel Sánchez Rodas, Javier Vigara, Rosa León, Inés Garbayo, Pedro Pérez, María de Mar Díaz, Tomás Rodríguez y Mari Carmen Nicasio, todos y cada uno de vosotros me habéis enseñado algo, no sólo conocimientos, también vuestros valiosos consejos y sugerencias han ofrecido una aportación en mi desarrollo como investigador siempre enriquecedora y gratificante.*

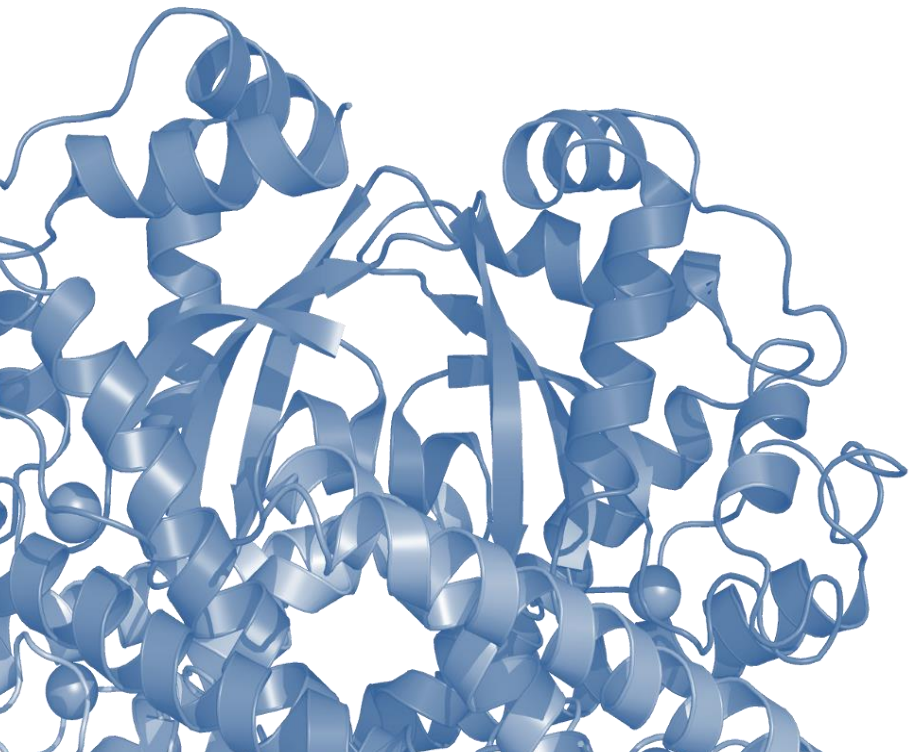
*También quiero expresar mi más sincera gratitud a todos mis amigos por ofrecerme esa verdadera amistad de tantos años, por ser un apoyo indispensable animándome a seguir adelante y por interesaros siempre por mis ratones, aunque llegara a convertirse en mi monotema, a Abraham, Rafa, Gorin, Dani, Iván, Christopher, Manuel, David, Carlos, Moisés, Luis, Jony, Salvi, Rubén, Vale, José Carlos, Joni Gandía, y por supuesto a las niñas, Rocío, María Aurora, Marta, María, Ana, Silvia, Mire, Noe, Tamara, Helen, Elia, Vane, vuestro interés siempre ha servido para animarme.*

*Por último y más importante, esta tesis no hubiera sido posible sin el apoyo de las personas más importantes de mi vida, mi familia. A mis padres y hermano, gracias por guiarme en todos mis caminos, por esforzaros tanto para que pudiera estar hoy escribiendo estos agradecimientos, por todo el sacrificio que habéis hecho para que yo pudiera estudiar y sobre todo por los valores de la vida tan importantes que me habéis inculcado, ese espíritu de trabajo, esfuerzo y sacrificio, así como el respecto a los demás. A mis tíos y primos que siempre han creído en mí, por el apoyo incondicional, palabras de ánimo y consejos que he recibido durante el desarrollo de esta Tesis. Especialmente a mi tía Antoñita, mi tío Manolo y mis primas Mónica y Vanesa, y por*

*supuesto a mi Triana, verdaderamente vosotros habéis vivido como nadie el desarrollo de esta tesis. Nunca podré agradeceros (aunque sé que no lo esperáis) el hacerme sentir como otro más de vuestra familia, por vuestra preocupación por mí en los momentos más difíciles, vuestro aliento, tolerar mis momentos de enfado y nerviosismo, por la comprensión y paciencia que me habéis mostrado en todo momento, con todo esto habéis conseguido que nunca me haya sentido solo y os estaré eternamente agradecido.*

*GRACIAS A TODOS DE CORAZÓN…*

*A mis padres y hermano*



*"Lo que tenemos que aprender lo aprendemos haciendo"*

*Aristóteles*



















# ÍNDICE

# ÍNDICE


1. RESUMEN/SUMMARY

2. INTRODUCCIÓN/INTRODUCTION

2.1. La toxicidad de los elementos en los ecosistemas terrestres 11
- 2.1.1. Toxicidad de los elementos 12
- 2.1.2. Papel biológico del selenio en mamíferos 16
- 2.1.3. Interacciones biológicas entre elementos 20
- 2.1.3. Biomarcadores de estrés ambiental 26
- 2.1.4. Estrés oxidativo asociado a la exposición a metales 30

2.2. Tecnologías *–ómicas* 37
- 2.2.1. Cascada de las *–ómicas* 37
- 2.2.2. Genómica funcional 42
- 2.2.3. Metalómica 45
- 2.2.4. Metabolómica 50

2.3. El uso de la espectrometría de masas elemental y molecular en las tecnologías *–ómicas* 53
- 2.3.1. Espectrometría de masas elemental 57
- 2.3.2. Espectrometría de masas molecular 69
- 2.3.3. Técnicas analíticas para la búsqueda de biomarcadores en especiación química y metalómica 88
- 2.3.4. Técnicas analíticas para la búsqueda de biomarcadores en metabolómica 103

2.4. El empleo de la dilución isotópica en estudios metalómicos 120
- 2.4.1. Necesidad e importancia de la dilución isotópica en estudios metalómicos 128
- 2.4.2. La técnica de deconvolución de patrones isotópicos 133
- 2.4.3. Metodologías analíticas basadas en la dilución isotópica 138

2.5. Problemática Ambiental: La Reserva Natural de Doñana 143
- 2.5.1. Situación ambiental del Parque Nacional de Doñana 147
- 2.5.2. El ratón de vida libre *Mus spretus* y el ratón de laboratorio *Mus musculus* como organismo modelo 151

3. OBJETIVOS/OBJECTIVES 159

4. EXPERIMENTAL

- 4.1. Instrumentación analítica 169
- 4.2. Reactivos y disoluciones 177
- 4.3. Experimentos de exposición a *Mus musculus* 185
- 4.4. Muestreo del ratón de vida libre *Mus spretus* en el Parque Nacional

de Doñana y alrededores 194
4.5. Manipulación de los animales de experimentación 199
4.6. Manipulación de los animales de experimentación 200

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN/RESULTS AND DISCUSSION

5.1. CAPÍTULO 1: Desarrollo de metodologías metalómicas y metabolómicas innovadoras en muestras biológicas basadas en la espectrometría de masas 287

5.2. CAPÍTULO 2: Combinación de metodologías *–ómicas* para el estudio de la toxicidad de arsénico, mercurio y cadmio en *Mus musculus* 353

5.3. CAPÍTULO 3: Estudios de interacciones entre elementos mediante el uso de tecnologías *-ómicas* 417

5.4. CAPÍTULO 4: El uso de tecnologías *–ómicas* para evaluar la contaminación causada por metales en el Parque Nacional de Doñana usando el ratón de vida libre *Mus spretus* como bioindicador 467

6. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS 575

7. REFERENCIAS/REFERENCES 593

8. OTRAS PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL 630

# ÍNDICE DE ABREVIATURAS

PCBs Compuestos bifenilos policlorados
PAHs Hidrocarburos aromáticos policíclicos
AAS Espectroscopia de absorción atómica
ICP-MS Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente
DPASV Voltamperometría anódica de pulso diferencial
XRF Fluorescencia de Rayos X
ICP-OES Espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente
ICP-AES Espectrometria de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente
PIXE Emisión de rayos X inducida por partículas
GC-ECD Cromatografía gaseosa con detector de captura electrónica
GC-FID Cromatografía gaseosa con detector de ionización de llamas
2-DE Electroforesis Bidimensional
HPLC Cromatografía líquida de alta resolución
CE Electroforesis capilar
GC Cromatografía de gases
INAA Análisis instrumental por activación con neutrones
ESI Fuente de ionización por electrospray
MALDI Fuente de ionización-desorción láser asistida por matriz
Q-TOF Cuadrupolo-tiempo de vuelo
QqQ Triple cuadrupolo
IT Trampa iónica
Q-Trap Cuadrupolo-trampa de iones
QqQ-TOF Triple cuadrupolo tiempo de vuelo
MAA Procedimientos analíticos multidimensionales
SEC Cromatografía de exclusión de tamaño
RPC Cromatografía en fase reversa
IEC Cromatografía de intercambio iónico
HILIC Cromatografía de interacción hidrofílica
IMAC Cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados
AEC Cromatografía de intercambio aniónico
Q Analizador de masas cuadrupolo
TOF Analizador de masas tiempo de vuelo
SF Analizador de masas de sector magnético
MC Analizador de masas multicolector
GE Electroforesis en gel

LA Ablación láser
FTIRC Resonancia de ion ciclotrón con transformada de Fourier
MS Espectrometría de masas
nHPLC Nano cromatografía líquida de alta resolución
IEF Isoelectroenfoque
BN Blue Native
SDS Dodecilsulfato sódico
PAGE Electroforesis en geles de poliacrilamida
SDS-PAGE Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
XRF-SR Fluorescencia de rayos X inducida por radiación de sincrotón
XAS Espectrometría de absorción de rayos X
CYP Citocromo P450
NADPH Nicotín Adenín Dinucleótido (fosfato) reducido
UDP Uridín Difosfato
Ah Hidrocarburo de Aril
GSTs Glutatión-S-transferasas
GSH Glutatión reducido
PAPSO Fosfoadenosín fosfosulfato
EROs Especies reactivas de oxígeno
LOOH Lipohidroperóxidos
SOD Superoxido dismutasa
CAT Catalasa
GSHPx Glutatión peroxidasa
MTs Metalotioneinas
isoMT Isoformas de MT
PND Parque Nacional de Doñana
NE Noreste
RMN Resonancia magnética nuclear
CZE Electroforesis Capilar de Zona
AFC Cromatografía de Afinidad
UV/Vis Ultravioleta/Visible
nESI Nanoelectrospray
CID Disociación inducida por colisión
Cps Cuentas por segundo
LDP El Lucio del Palacio
ROC Arroyo La Rocina
PAR El Partido
AJO El Ajolí
MAT El Matochal
TCEP Hidrocloruro de tris-(2-carboxietil) fosfina

# ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Fuentes naturales y antropogénicas de compuestos de metales tóxicos/metaloides en el medio ambiente.
**Figura 2.** Representación conceptual de cómo la exposición crónica de los mamíferos a xenobióticos (fármacos/metales tóxicos) pueden afectar negativamente a la síntesis de metaloproteínas (Gómez-Ariza *y col.*, 2011).
**Figura 3.** Vía metabólica y tráfico de especies de selenio entre la sangre y el hígado en mamíferos.
**Figura 4.** Representación esquemática de las diferentes etapas de la biomonitorización.
**Figura 5.** Acción conjunta de los sistemas antioxidantes enzimáticos.
**Figura 6.** Representación esquemática de la cascada de las "*-ómicas*".
**Figura 7.** Esquema simplificado de una célula animal y las tecnologías *-ómicas.*
**Figura 8.** Aumento de la masa y complejidad molecular en metalómica en comparación con la especiación química convencional.
**Figura 9.** Componentes básicos de un espectrómetro de masas.
**Figura 10.** Visión general de las diferentes técnicas de análisis elemental.
**Figura 11.** Representación esquemática de un equipo de ICP-MS.
**Figura 12.** Analizadores más comunes usados en ICP-MS.
**Figura 13.** Analizador de cuadrupolo (Q).
**Figura 14.** Representación esquemática de la medida de $^{80}Se$ en modo reacción mediante ICP-QMS y ICP-QqQ-MS.
**Figura 15.** Analizador de tiempo de vuelo (TOF).
**Figura 16.** Analizador de sector magnético (SF).
**Figura 17.** Detector electromultiplicador (EM).
**Figura 18.** Esquema simplificado de una fuente de ionización electrónica (EI).
**Figura 19.** Esquema simplificado de una fuente de ionización electrospray (ESI).
**Figura 20.** Esquema simplificado de la fuente de ionización química a presión atmosférica (APCI) (A) y fotoionización química a presión atmosférica (APPI) (B).
**Figura 21.** Aplicabilidad (en función del peso y polaridad de los analitos) de las distintas fuentes API.
**Figura 22.** Esquema simplificado de una fuente de ionización nano electrospray (nESI).
**Figura 23.** Esquema simplificado de una fuente de ionización/desorción asistida por matriz (MALDI).
**Figura 24.** Analizadores más comunes usados en espectrometría de masas molecular.
**Figura 25.** Analizador de trampa de iones (IT).
**Figura 26.** Espectrómetro de masas híbrido triple cuadrupolo-tiempo de vuelo (QqQ-TOF).
**Figura 27.** *Workflow* metalómico basado en el uso de la cromatografía líquida.

**Figura 28.** *Workflow* metalómico basado en el uso de la electroforesis en gel de poliacrilamida y detección mediante LA-ICP-MS.
**Figura 29.** *Workflow* para la obtención de bioimágenes de secciones de tejidos mediante LA-ICP-MS.
**Figura 30**. Acoplamiento de técnicas analíticas para el estudio de metalobiomoléculas.
**Figura 31.** *Workflow* metabolómico para análisis no dirigido o "*non-target*".
**Figura 32.** Esquema que recoge las etapas más importantes del tratamiento de datos en metabolómica (preprocesado, pretratamiento y análisis de datos provenientes de plataformas DIMS, GC-MS, LC-MS y CE-MS).
**Figura 33.** Ilustración del principio de análisis por dilución isotópica para un elemento que contiene dos isótopos.
**Figura 34.** Ilustración del principio de análisis por dilución isotópica para el selenio analizado mediante ICP-ORS-MS.
**Figura 35.** Representación de un experimento básico por dilución isotópica explicado con átomos azules (muestra a analizar) y átomos naranjas (patrón isotópicamente enriquecido).
**Figura 36.** Señales transitorias obtenidos para dos relaciones isotópicas de m/z diferentes cuando se aplica (a) modo especies inespecífico mediante ICP-ORS-MS y (b) modo especies específico mediante ICP-ORS-MS.
**Figura 37.** Diagrama esquemático instrumental empleado con el fin de llevar a cabo el análisis por dilución isotópica en modo especies inespecífica mediante HPLC-ICP-MS.
**Figura 38.** Ilustración del principio de análisis por deconvolución de patrones isotópicos para un elemento que contiene tres isótopos.
**Figura 39.** Situación geográfica del Parque Nacional de Doñana.
**Figura 40.** Especies en peligro de extinción en el Parque Nacional de Doñana.
**Figura 41.** Diversidad de ecosistemas del Parque Nacional de Doñana.
**Figura 42.** Rotura del muro de contención de la balsa minera de Aznalcóllar.
**Figura 43.** Ratón de vida libre *Mus spretus* y ratón de laboratorio *Mus musculus*.
**Figura 44.** Homogenizador *pellet mixer* (VWR International).
**Figura 45.** Equipos de ICP-MS empleados en la presente Tesis Doctoral.
**Figura 46.** Cromatógrafos líquidos empleados en la presente Tesis Doctoral.
**Figura 47.** Espectrómetros de masas empleados en los estudios metabolómicos en la presente Tesis Doctoral.
**Figura 48.** Espectrómetros de masas MALDI-TOF/TOF-MS modelo AB SCIEX 4800 usado en la secuenciación de proteínas en la presente Tesis Doctoral.
**Figura 49.** Ratones *Mus musculus* en jaulas metabólicas durante los experimentos de exposición.
**Figura 50.** Ratones *Mus musculus* sometidos a exposición vía subcutánea (izquierda) y vía oral (derecha).
**Figura 51**. Experimento de exposición a arsénico en ratones de laboratorio *Mus musculus.*
**Figura 52**. Experimento de exposición a mercurio en ratones de laboratorio *Mus musculus.*
**Figura 53**. Experimento de exposición a cadmio en ratones de laboratorio *Mus musculus*
**Figura 54**. Experimento de exposición a arsénico/cadmio en ratones de laboratorio *Mus musculus.*
**Figura 55**. Experimento de exposición a cadmio/$^{77}$selenio en ratones de laboratorio *Mus musculus.*

**Figura 56**. Experimento de exposición a mercurio/selenio en ratones de laboratorio *Mus musculus.*
**Figura 57.** Áreas de muestreo del Parque Nacional de Doñana y alrededores.
**Figura 58.** Trampa Sherman.
**Figura 59.** Esquema simplificado del procedimiento de preparación de muestra para la determinación de Se endógeno y exógeno en plasma de ratón por IPD-ICP-ORS-qMS.
**Figura 60.** Kit comercial empleado en el aislamiento de mitocondrias de células hepáticas suministrado por Thermo Scientific.
**Figura 61.** Cromatograma de UV (azul) y conductividad (rojo) obtenido durante el desalado de las facciones de SEC usando las columnas HiTrap Desalting (GE Healthcare).
**Figura 62.** Procedimiento de desalado mediante ultrafiltración empleando filtros de centrífuga AMICON ULTRA.
**Figura 63.** Calibración de las columnas empleadas para llevar a cabo la especiación de arsénico en extractos citosólicos de órganos de ratón. A) Cromatograma obtenido con la columna PRP-X100 (iAsIII, iAsV, $DMA^{V}$ y $MMA^{V}$); B) Cromatograma obtenido con la columna Supelcosil SCX ($iAs^{III}$, $iAs^{V}$, AsB, $DMA^{V}$, $MMA^{V}$, TMAO, y TMA).
**Figura 64.** Calibración de la columna empleada para llevar a cabo la especiación de arsénico en extractos citosólicos de hígado de ratón. Cromatograma obtenido con la columna PRP-X100 (AsB, iAsIII, iAsV, DMAV y MMAV).
**Figura 65.** Diagrama esquemático 2D/SEC-AF-HPLC-SUID-ICP-ORS-qMS para la especiación de proteínas que contiene selenio y selenometabolitos en muestras de suero o plasma.
**Figura 66.** (A) Cromatograma típico de $^{80}Se$ obtenido de suero humano usando 2D/SE-AF-HPLC-SUID-ICP-ORS-qMS mostrando la interferencia de $^{79}Br^{1}H^{+}$ (m/z 80) a 9 minutos. (B) Monitorización de los isótopos $^{79}Br$ y $^{81}Br$. (C) Monitorización de 77Se y 78Se, mostrando la ausencia de la interferencia $Br^{+}$.
**Figura 67.** (A) Flujo másico obtenido mediante el uso de la relación isotópica $^{80}Se/^{74}Se$; B) Flujo másico obtenido mediante el uso de la relación isotópica $^{78}Se/^{74}Se$.
**Figura 68.** Diagrama esquemático 3D/SEC-AF-AEC-HPLC-SUID-ICP-ORS-qMS para la especiación de proteínas que contiene selenio y selenometabolitos inorgánicos en muestras de suero o plasma.
**Figura 69.** (A) Cromatograma de flujo másico típico de Se obtenido de suero humano fortificados con selenito y selenato usando 3D/SEC-AF-AEC-HPLC-SUID-ICP-ORS-qMS. (B) Cromatograma de flujo másico típico de Se obtenido de suero humano fortificado con pequeñas cantidades de selenito usando 3D/SEC-AF-AEC-HPLC-SUID-ICP-ORS-qMS
**Figura 70.** Diagrama esquemático de 2D/SEC-UV-AEC-SUID-ICP-MS-ORS para llevar a cabo la especiación de Cu, Zn-SOD en extractos citosólicos y mitocondriales de células hepáticas de ratón.
**Figura 71.** Cromatograma de SEC para Cu mediante 1D-SEC-UV-ICP-ORS-qMS de: A) Cu, Zn-SOD estándar; B) el extracto citosólico de células hepáticas; C) extracto mitocondrial de células hepáticas.
**Figura 72.** Cromatograma de 2D/SEC-AEC para Cu mediante 2D-SEC-UV-AEC-ICP-ORS-qMS de: A) extracto citosólico de células hepáticas; C) extracto mitocondrial de células hepáticas.
**Figura 73.** Fotografía de la fuente nano-electrospray empleada en la presente Tesis Doctoral (izquierda); Imagen del capilar próximo al orificio de entrada al espectrofotómetro de masas (derecha).

**Figura 74.** Esquema de la reacción de marcaje con los reactivos *CyDye* y características de cada uno de los fluoróforos. Los fluoróforos *CyDye* de la técnica DIGE presentan un grupo éster reactivo que se une covalentemente a los residuos lisina de las proteínas a través de un enlace amida. Gracias a la diferencia entre sus longitudes de onda de absorción y emisión, es posible obtener el patrón proteico característico de cada muestra marcada con un marcador distinto, aun estando combinadas en un mismo gel de electroforesis.
**Figura 75.** Diagrama esquemático de la metodología DIGE.
**Figura 76.** Espectros de masas obtenidos mediante DIMS de; A) extracto polar mediante adquisición positiva, B) extracto lipofílico mediante adquisición positiva, C) extracto polar mediante adquisición negativa y D) extracto lipofílico mediante adquisición negativa.
**Figura 77.** Cromatograma típico de plasma de ratón obtenido mediante GC-MS.

# ÍNDICE DE TABLAS

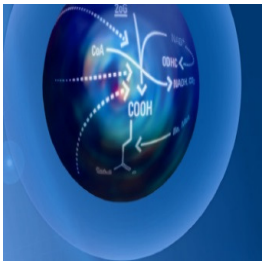
**Tabla 1**. Selenoproteínas identificadas en humanos (Gramadzinska y col., 1996; Lu y col., 2009; Moghadaszadeh *y col., 2006;* Reeves *y col., 2009).*
**Tabla 2.** Biomarcadores moleculares de oxidación de ADN, lípidos y proteínas (Ziech *y col.*, 2010).
**Tabla 3.** Bases de datos más utilizadas en la identificación de metabolitos en muestras biológicas.
**Tabla 4.** Columnas de cromatografía líquida empleadas en el desarrollo experimental de la presente Tesis Doctoral.
**Tabla 5.** Coordenadas UTM de las zonas de muestreo estudiadas y número de ratones *Mus spretus* machos capturados en éstas en cada periodo de muestreo.
**Tabla 6.** Condiciones operacionales optimizadas para ICP-MS Agilent 7500ce.
**Tabla 7.** Condiciones operacionales optimizadas para ICP-MS Thermo Scientific XSeries2.
**Tabla 8.** Condiciones operacionales optimizadas para el análisis de Se total mediante IDA-ICP-ORS-qMS.
**Tabla 9.** Resultados de Se obtenidos para el CRM BCR-637 mediante IDA-ICP-ORS-qMS.
**Tabla 10.** Condiciones operacionales optimizadas para el análisis de Se total endógeno y exógeno mediante IPD-ICP-ORS-qMS.
**Tabla 11.** Resultados de Se obtenidos para el CRM BCR-637 fortificado con $^{77}$Se mediante IPD-ICP-ORS-qMS.
**Tabla 12.** Condiciones cromatográficas para SEC en función de la columna cromatográfica empleada y tiempo de retención de cada una de las metaloproteínas empleadas en la calibración.
**Tabla 13.** Condiciones operacionales optimizadas para ICP-MS Agilent 7500ce.
**Tabla 14.** Condiciones cromatográficas para IEC en función de la columna cromatográfica empleada.
**Tabla 15.** Condiciones operacionales optimizadas para ICP-MS Agilent 7500ce.
**Tabla 16.** Condiciones cromatográficas para IEC en función de la columna cromatográfica empleada.
**Tabla 17.** Condiciones operacionales optimizadas para ICP-MS Agilent 7500ce.
**Tabla 18.** Condiciones cromatográficas y operacionales optimizadas para llevas a cabo la especiación de arsénico mediante AEC-ICP-ORS-qMS.

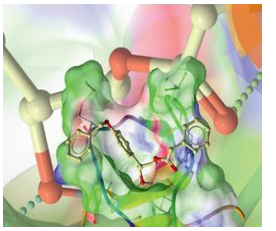
**Tabla 19.** Concentración de metabolitos de arsénico en el CRM TORT-2, recuperaciones obtenidas para hígado de ratón y límites de detección de cada especie.
**Tabla 20.** Cuantificación de las especies de selenio en CRMs de suero y plasma humano.
**Tabla 21.** Condiciones operacionales optimizadas para el análisis de especies de selenio en suero o plasma mediante 3D/SEC-AF-SUID-ICP-ORS-qMS.
**Tabla 22.** Cuantificación de las especies de selenio en suero humano de voluntarios.
**Tabla 23.** Condiciones operacionales optimizadas para el análisis de especies de selenio en suero o plasma mediante 2D/SEC-AF-IPD-ICP-ORS-qMS.
**Tabla 24.** Cuantificación de las especies de selenio en CRMs de suero humano mediante 2D/SEC-AF-IPD-ICP-ORS-qMS.
**Tabla 25.** Condiciones operacionales y cromatográficas para el acoplamiento 2D/SEC-UV-AEC-SUID-ICP-ORS-qMS.
**Tabla 26.** Cuantificación de Cu,Zn-SOD extractos citosólico y mitocondrial de células hepáticas de ratón mediante 2D/SEC-UV-AEC-SUID-ICP-ORS-qMS.
**Tabla 27.** Condiciones operacionales DI-ESI-QqQ-TOF-MS para el estudio metabolómico.

# RESUMEN

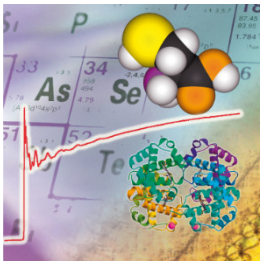
Summary

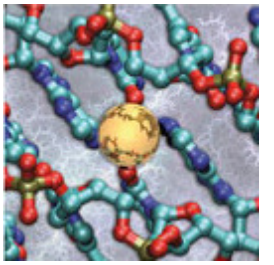


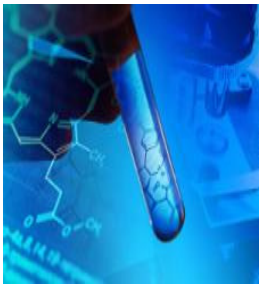








# 1. RESUMEN

La diagnosis del estrés ambiental, precisa la combinación de ensayos químicos de los contaminantes en el medio, con el conocimiento de la respuesta biológica a dichos contaminantes. Esta respuesta puede evaluarse mediante experiencias de exposición, que integren los procesos de sinergismo/antagonismo entre contaminantes y la interacción con sustancias de los ecosistemas. Durante todo el período de la presente Tesis Doctoral, se ha utilizado el ratón de vida libre *Mus spretus* como bioindicador de la contaminación terrestre ocasionada por metales tóxicos en un entorno ecológico de referencia como es el Parque Nacional de Doñana. Estos estudios se han centrado en el uso de las tecnologías *ómicas* en este bioindicador en la zona de referencia amenazada por la contaminación de metales tóxicos. Los estudios realizados han permitido profundizar en el conocimiento relacionado con el tráfico de metales, interacciones entre ellos y homeostasis en estos organismos de vida libre. El Parque Nacional de Doñana, a pesar de haber sido declarado como Reserva de la Biosfera, especialmente para aves migratorias, se ve amenazado por diversas actividades naturales y antropogénicas que se desarrollan en su entorno, como actividades agrícolas, mineras e industriales.

Para este propósito, se han desarrollado y aplicado metodologías metalómicas que han permitido el estudio de la contaminación metálica presente en la zona de estudio centradas en el uso de un detector de plasma acoplado inductivamente-espectrometría de masas (ICP-MS). Además, se han aplicado metodologías metabolómicas basadas en la infusión directa a un espectrómetro de masas de alta resolución (DI-ESI-QTOF-MS) y la cromatografía de gases con detector de masas (GC-MS), seguido del análisis discriminante de los resultados (PLS-DA), para

comparar la respuesta biológica de *Mus spretus* procedentes de diferentes áreas del Parque Nacional de Doñana y sus alrededores.

Por otro lado, se han desarrollado estudios paralelos de la Tesis para la evaluación de los efectos toxicológicos de metales como As, Cd, Hg en el ratón de laboratorio *Mus musculus* sometido a experimentos de exposición controlados. Además, se ha desarrollado un enfoque metalómico basado en el uso de la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) acoplada a ICP-MS, con objeto de conocer mejor los cambios funcionales de las metalobiomoléculas, los procesos de desintoxicación y la regulación de los metales en los ratones (*Mus musculus*) bajo estas experiencias de exposición que pueden ser comparadas con procesos análogos que se produzcan en el medio ambiente. En este sentido, se han llevado a cabo experimentos de exposición para conocer las posibles interacciones biológicas en *Mus musculus*, por un lado para evaluar el efecto protector del selenio frente a la toxicidad del mercurio y el cadmio, y por otro el estudio de efectos antagónicos o sinérgicos cuando el arsénico y el cadmio son administrados simultáneamente.

Estos estudios han sido complementados con técnicas innovadoras basadas en el uso de la dilución isotópica (IDA) para cuantificar el selenio y el cobre asociado a las proteínas citosólicas y las presentes en el torrente sanguíneo, utilizando un sistema ICP-MS como detector multielemental. Esta metodología ha sido desarrollada y validada por cromatografía multidimensional basada en 2D/SEC-AF-HPLC-SUID-ICP-ORS-MS, 3D/SEC-AF-AEC-HPLC-SUID-ICP-ORS-MS para la cuantificación absoluta de especies de selenio y 2D/SEC-AEC-HPLC-SUID-ICP-ORS-MS para la especiación de metaloproteínas que contienen Cu. Además, se ha

utilizado un procedimiento de deconvolución isotópica (IPD) para estudiar el transporte y destino final del $^{77}$Se (selenito) en ratones *Mus musculus* sometidos a la exposición a cadmio y el efecto de este elemento tóxico en las selenoproteínas del plasma.

Los estudios medioambientales dirigidos a identificar respuestas biológicas de contaminantes ambientales encuentran serias dificultades en su aplicación, ya que deben enfrentarse a la complejidad de los ecosistemas, en los que coexisten numerosos xenobióticos que afectan a los organismos, pero que además interaccionan entre sí y se comportan de forma diferente ante los diversos filtros biológicos, y como consecuencia de ello, resulta difícil establecer claramente las relaciones causa-efecto por la multiplicidad de posibles respuestas. Este tipo de estudio es muy necesario, pues integran todas las variables presentes en un determinado ecosistema y su interacción con los organismos estudiados. Por ello, para establecer de forma segura los mecanismos de acción de los contaminantes hay que recurrir a estudios de exposición en el laboratorio que permitan un control adecuado de todas las variables relacionadas con dichos compuestos. Por último las conclusiones que resulten pueden extrapolarse y validarse en animales de vida libre en campañas adecuadas de muestreo en el campo. Todos estos aspectos considerados en relación al estudio de la contaminación y sus efectos, constituyen la finalidad de esta Tesis Doctoral, sobre la que se apoyan los objetivos que se proponen más adelante.

Diagnosis of environmental stress requires the combination of chemical analysis of contaminants with biological responses. This response can be estimated by biological exposure experiments, which integrate synergism/antagonism process among contaminants and interactions with other compounds in the ecosystems. Throughout the period of this PhD thesis, we used the free-living mouse *Mus spretus* as bioindicator of terrestrial pollution caused by toxic metals in an ecological environment like Doñana National Park. These studies have focused on the use of *omics* technologies in this bioindicator in the reference area threatened by pollution from toxic metals. Studies have deepened in the knowledge related to the trafficking of metals, including interactions and homeostasis in these free-living organisms. Doñana National Park, despite having been declared a Biosphere Reserve, especially for the presence of migratory birds, is threatened by various natural and anthropogenic activities taking place in the surroundings, such as industrial, mining and agricultural activities.

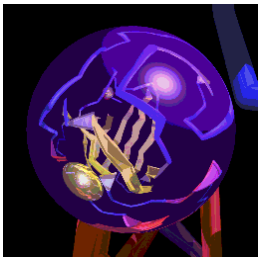
For this purpose, we have developed and applied metallomic methodologies in order to study metal contamination in this area, which have been centered in the use of a detector inductively-coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Furthermore, the application of metabolomic methodologies based on direct infusion into a high resolution mass spectrometer (DI-ESI-QTOF-MS) and gas chromatography with mass detector (GC-MS), followed by discriminant analysis of the results (PLS-DA) has been used to compare the biological response of *Mus spretus* from different areas of the Doñana National Park and surrounding areas.

On the other hand, parallel studies have been developed throughout this thesis based on the evaluation of the toxicological effects of metals, such as As, Cd, Hg on the laboratory

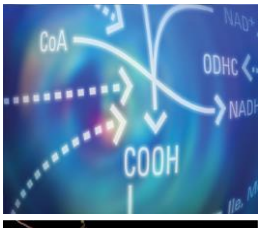
mouse *Mus musculus* under controlled exposure experiments. Furthermore, we have developed a metallomic approach based on the use of size exclusion chromatography (SEC) coupled to ICP-MS, in order to get a better understanding of functional changes suffered by metallo-biomolecules, the detoxification processes and regulation of metals in mice (*Mus musculus*) under these exposure experiences that can be compared to similar situations occurring in the environment. In this sense, we have conducted experiments exposure to undertake the study of the potential biological interactions *Mus musculus*, firstly to evaluate the protective effect of selenium against the toxicity of mercury and cadmium, and on the other side to deep insight into the antagonistic or synergistic effects when arsenic and cadmium are administered simultaneously.

Furthermore, these studies have been complemented with innovative techniques based on the use of isotope dilution (IDA) to quantify selenium and copper associated with the cytosolic proteins and other molecules in the blood stream, using an ICP-MS system and multielement detector. This methodology has been developed and validated by multidimensional chromatography methods based on 2D/SEC-AF-HPLC-SUID-ORS-ICP-MS, 3D/SEC-AF-AEC-HPLC-SUID-ORS-ICP-MS for absolute quantification selenium species and 2D/SEC-AEC-HPLC-SUID-ORS-ICP-MS for speciation of metalloproteins containing Cu. In addition, an isotopic pattern deconvolution method has been used to study the transport and fate of $^{77}Se$ (selenite) in mice under cadmium exposure and the effect of this toxic element in plasma selenoproteins.

In summary, environmental studies aimed at identifying biological responses to environmental pollutants present serious difficulties in their application, as they must deal with the complexity of ecosystems in which many xenobiotics affecting organisms coexist, but also interact with each other and they behave differently to the various biological filters. As a result, it is difficult to pinpoint the cause-effect by the multiplicity of possible answers. Despite these drawbacks, this type of study is very necessary as integrate all variables in a particular ecosystem and its interaction with the organisms studied. Therefore, to establish secure mechanisms of action of contaminants exposure studies in the laboratory are mandatory to allow adequate control of all the variables related to these compounds. Finally the conclusions obtained can be extrapolated and validated in free-living animals in suitable sampling campaigns in the field. All these aspects considered in relation to the study of pollution and its effects, are the purpose of this thesis, to which the objectives proposed below are supported.











# INTRODUCCIÓN

Introduction

# 2. INTRODUCCIÓN

## 2.1. LA TOXICIDAD DE LOS ELEMENTOS EN LOS ECOSISTEMAS TERRESTRES

La contaminación es un fenómeno global de nuestro tiempo que alcanza las tres esferas del medio físico (geosfera, hidrosfera y atmósfera). Tanto el medio natural como el urbano reciben el impacto de un número cada vez mayor de xenobióticos y sustancias contaminantes, debiendo considerarse que a los ya muy numerosos contaminantes "convencionales" (p.ej. metales, hidrocarburos y plaguicidas), se le suman hoy día una gran variedad de especies metálicas, numerosos contaminantes emergentes, entre los que se encuentran los fármacos de uso genérico (analgésicos, antinflamatorios, antibióticos), los disruptores endocrinos (PCBs, PBDEs, bisfenol A, alquilfenoles, tributilestaño) y, más recientemente, las nanopartículas.

Más concretamente, la contaminación metálica es una gran amenaza para los ecosistemas terrestres. Las grandes catástrofes, vertidos accidentales y la exposición prolongada a contaminantes causan efectos dañinos y en ocasiones irreversibles en los seres vivos. De hecho, muchas enfermedades están ligadas a contaminantes de naturaleza metálica. Las actividades antropogénicas provocan estrés en los ecosistemas, liberan contaminantes, afectan la supervivencia de los organismos y perturban la estructura y función de los ecosistemas naturales. Los compuestos liberados al medio ambiente, ya sea en ecosistemas acuáticos o terrestres, rara vez permanecen en el sitio donde fueron emitidos. Algunos pueden degradarse

químicamente o por la acción de los microorganismos, pero otros muchos pueden persistir en el suelo o el agua, como es el caso de los metales pesados.

### 2.1.1. Toxicidad de los elementos

La elevada toxicidad de los metales pesados radica en su elevada persistencia en el medio natural, su notable acumulación en los organismos vivos, en la formación de moléculas químicas más complejas y en su capacidad de reacción y/o función (Moalla *y col.*, 1998; Purves *y col.*, 1985; Forstner *y col.*, 1981). Sus efectos tóxicos no se detectan fácilmente a corto plazo, sin embargo a largo plazo estos efectos pueden llegar a ser irreversibles.

Entre los contaminantes potencialmente más tóxicos para el medio ambiente se encuentran los metales pesados como cadmio (Cd), cobre (Cu), cromo (Cr), mercurio (Hg), manganeso (Mn), níquel (Ni), plomo (Pb) y metaloides como arsénico (As). Dichos elementos forman parte de los ciclos biogeoquímicos que determinan su presencia y concentración en los distintos componentes de los ecosistemas (agua, aire, suelo y biota). Las actividades humanas o de origen antropogénico como la minería, los procesos industriales, la agricultura, el transporte y los vertidos accidentales, alteran estos ciclos y modifican la concentración y posterior distribución al resto de compartimentos ambientales. Además, estos contaminantes pueden entrar en los entornos naturales a través de los ríos, y de ahí se distribuyen por todos los compartimentos de los ecosistemas, poniendo a éstos en peligro así como a todos los organismos que los habitan. Por otro lado, la presencia de estos metales en los ecosistemas también puede ser de origen natural,

como consecuencia de las actividades volcánicas, meteorización química y las ventilaciones oceánicas (Figura 1).

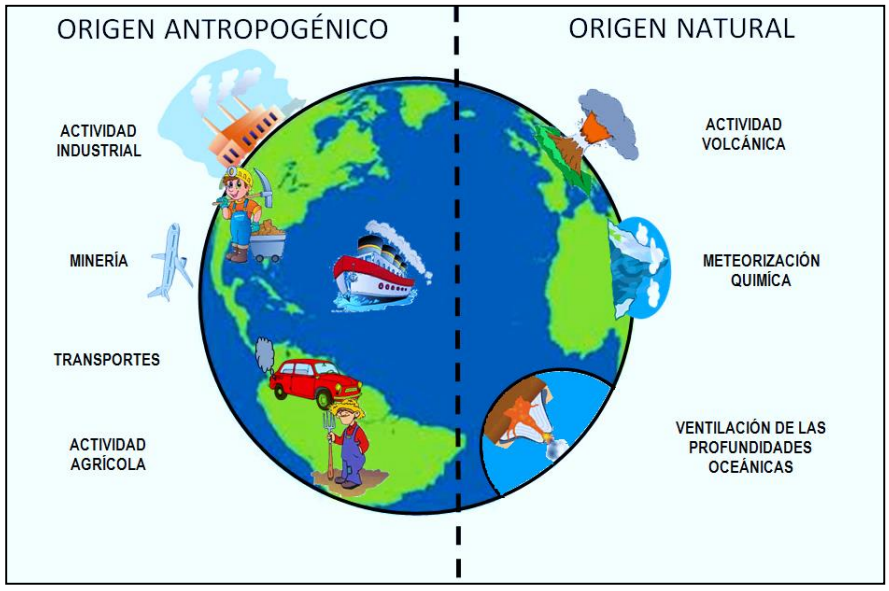



**Figura 1.** Fuentes naturales y antropogénicas de compuestos de metales tóxicos/metaloides en el medio ambiente.

La forma de monitorizar la presencia de estos contaminantes en los sistemas ambientales se basa en el uso de procedimientos de análisis convencionales que permiten diagnosticar su presencia en aguas, sedimentos, suelos y aire, pero sobre todo en los seres vivos, habiéndose establecido que es fundamental conocer la respuesta de éstos como medida eficaz de las consecuencias de la contaminación (Bonilla-Valverde *y col.*, 2004). De ahí que se hayan propuesto numerosos biomarcadores que evalúan la incidencia de los contaminantes en una gran variedad de animales modelo (bioindicadores), en ecosistemas terrestres o acuáticos (Romero-Ruiz *y col.*, 2003; Bonilla-Valverde *y col.*, 2004; Vioque-Fernández *y col.*, 2007; Rodríguez-Ortega *y col.*, 2009). No obstante, los inconvenientes asociados al uso de biomarcadores, especialmente

el hecho de presentar cierto sesgo en la información que proporcionan, han impulsado la introducción de las metodologías *-ómicas* en estudios medioambientales (González-Fernández *y col.*, 2008; Gómez-Ariza *y col.*, 2008).

Hay que considerar que en la célula y los sistemas vivos en general, los contaminantes metálicos pueden comprometer seriamente su ciclo homeostático, lo que desencadena una serie de mecanismos compensatorios que se reflejan en el cambio de expresión genética a nivel transcripcional (transcriptómica) (Ruiz-Laguna *y col.*, 2006), en la sobrexpresión o inhibición de proteínas transduccionales o post-transduccionales (proteómica) (Romero-Ruiz *y col.*, 2006; Montes-Nieto *y col.*, 2007), y en las modificaciones que experimentan los metabolitos implicados en los distintos ciclos celulares controlados por proteínas con actividad enzimática (metabolómica) (Bundy *y col.*, 2009). Por otro lado, un gran número de proteínas y metabolitos precisan de un metal para su correcto funcionamiento por lo que los cambios de expresión que experimenten inducidos por metales y contaminantes (metalómica) (Mounicou *y col.*, 2009; García-Sevillano *y col.*, 2012a,b; 2013c-f; González-Fernández *y col.*, 2011) pueden también utilizarse en el estudio de la contaminación ambiental. Habiéndose propuesto recientemente la integración de *-ómicas* para tener una visión global de los procesos que se producen en el medio ambiente entre contaminantes y animales de vida libre (García-Sevillano *y col.*, 2014b).

No obstante, para una correcta evaluación de la respuesta de los sistemas vivos a la contaminación conviene el uso de bioindicadores medioambientales de complejidad biológica creciente (p.ej. crustáceos, moluscos, roedores), debiendo incluirse siempre un mamífero que integre los diversos filtros biológicos (Maret, 2010) que están presentes en el hombre y que

regulan el tráfico de contaminantes y su interacción con biomoléculas vitales y/o la síntesis de metaloproteínas (Gómez-Ariza *y col.*, 2011) (p. ej. Absorción en el tracto digestivo ↔ transporte por el torrente sanguíneo ↔ paso de las paredes celulares en los órganos ↔ incorporación y transporte en el citosol de células y orgánulos ↔ Síntesis de metaloproteínas), como puede verse en la Figura 2.

Por tanto, los metales son difíciles de eliminar del medio, puesto que los propios organismos los incorporan a sus tejidos pasando de estos a sus depredadores, en los que se acaban manifestando. La toxicidad de estos metales pesados es proporcional a la facilidad de ser absorbidos por los seres vivos, es decir, se encuentra estrechamente relacionado con la forma química en la que se encuentren; un metal disuelto en forma iónica puede absorberse más fácilmente que en forma elemental, y si ésta se halla reducida finamente aumentan las posibilidades de su oxidación y retención por los diversos órganos.

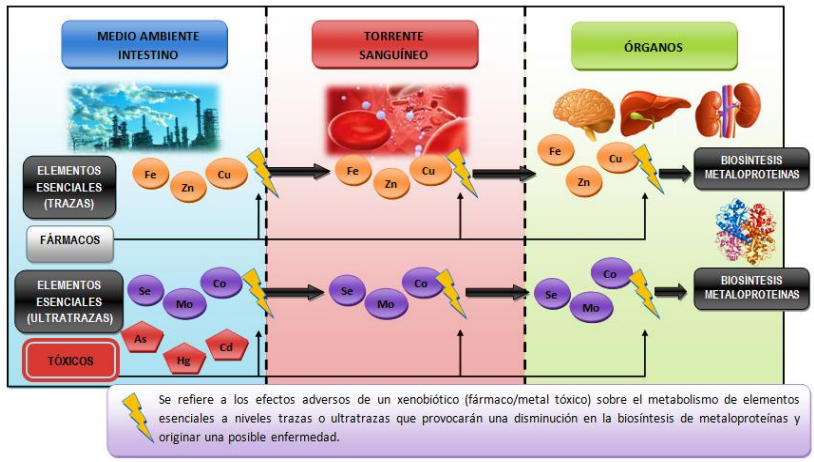



**Figura 2.** Representación conceptual de cómo la exposición crónica de los mamíferos a xenobióticos (fármacos/metales tóxicos) pueden afectar negativamente a la síntesis de metaloproteínas (Gómez-Ariza *y col.*, 2011).

A nivel celular los metales pesados generan especies reactivas del oxígeno (EROs) que promueven estrés oxidativo y daño de biomoléculas, alterando el estado de algunas proteínas e induciendo enzimas antioxidantes (Sies, 1986; López-Barea, 1995; Ruiz-Laguna *y col.*, 2006; Ruiz-Laguna *y col.*, 2001). Todo esto hace necesario realizar seguimientos periódico de diferentes contaminantes en los ecosistemas, con objeto de evaluar su calidad medioambiental, ya que los datos obtenidos nos permiten relacionar una sustancia tóxica con los posibles problemas medioambientales que generan.

### 2.1.2. El papel biológico del selenio en los mamíferos

Es bien conocido que el selenio (Se) es un elemento esencial para los mamíferos. El selenio es un metaloide que puede estar presente en formas inorgánicas (oxoaniones selenito y selenato), así como en formas orgánicas (selenoaminoácidos, como la selenocisteína (SeCys) y selenometionina (SeMet), principalmente). Por otro lado, este elemento está presente en varias proteínas (selenoproteínas), que presentan importantes funciones biológicas (Ursini *y col.*, 1999; Yoneda *y col.*, 1997), pero el mecanismo exacto utilizado por el Se para desempeñar su papel esencial en la salud humana aún no se conoce con exactitud. Sin embargo, se ha comprobado que la mayoría de las funciones biológicas atribuidas al Se están mediadas por selenoproteínas (Yoneda y col., 1997) como las glutatión peroxidasas (GPx) y la selenoproteína P (SelP), que contienen selenocisteína (SeCys) específicamente incorporadas como grupos activos, y la selenoalbúmina (SeAlb), que no es considerada como selenoproteína al no contener SeCys sino selenometionina (SeMet) (Mostert, 2000; Thomson, 1998).

El aminoácido SeCys no proviene de la dieta, pero se sintetiza en la reacción de fosfoserina cargada para transferir ARN [Ser] Sec (O-fosfoseriltRNA [Ser] Sec) con monoselenofosfato (donante de selenio), que da lugar a selenocisteil-tRNA [Ser] Sec, para unirse posteriormente de forma específica a la cadena polipeptídica (Glass *y col.*, 2008). Hasta ahora, los investigadores han identificado 25 selenoproteínas en los seres humanos (Kryukov *y col.*, 2003). Sin embargo, la función exacta de muchas de estas proteínas no se ha determinado todavía (Moghadaszadeh *y col.*, 2006). La Tabla 1 presenta una descripción de todas las selenoproteínas identificadas en humanos y sus funciones.

La especie más abundantes de selenio en la sangre es la SeP, y su concentración es un buen indicador del estado de Se en los seres humanos (Mostert, 2000; Thomson, 1998), mientras que la actividad de la glutatión peroxidasa extracelular (GPx-3) en el suero humano es un marcador complementario del nivel de selenio en varios estudios clínicos (Navarro-Alarcón *y col.*, 1998; Navarro-Alarcón *y col.*, 1999; Navarro-Alarcón *y col.*, 2002; Zaracha *y col.*, 2001). Ambas selenoproteínas están relacionadas entre sí, ya que el selenio se une a la albúmina para ser transportada al hígado donde participa en la síntesis de más SelP que, a su vez, se libera en el torrente sanguíneo (Suzuki *y col.*, 2002) (Figura 3). Aunque la actividad antioxidante de la SelP purificada ha sido demostrada, así como la reducción de hidroperóxidos de fosfolípidos de manera similar a la GPx-3, sus mecanismos de acción biológicos aún no están suficientemente clarificados (Saito *y col.*, 1999).

**Tabla 1.** Selenoproteínas identificadas en humanos *(*Gramadzinska *y col., 1996;* Lu *y col., 2009;* Moghadaszadeh *y col., 2006;* Reeves *y col., 2009)*.

| ***Selenoproteína*** | ***Función biológica*** |
|---|---|
| ***Glutatión Peroxidasas (GPx)*** | |
| ***GPx citosólica (GPx-1)*** | Reducción de $H_2O_2$ e hidroperóxidos orgánicos |
| ***GPx gastrointestinal (GPx-2)*** | |
| ***GPx plasma (GPx-3)*** | |
| ***Tiorredoxina reductasas (TrxR1, TrxR2, TrxR3)*** | Reducción de la tiorredoxina que participan en procesos biológicos tales como la replicación del ADN, la regulación de la actividad del factor de transcripción, y la apoptosis. Además, la reducción de varios otros sustratos, por ejemplo selenito, lípidos peróxidos, vitamina C y glutatión peroxidasa |
| ***Iodotironina deiodinasas (DIO1, DIO2, DIO3)*** | Síntesis de la hormona tiroidea T3 activa (DIO1 y DIO2) y su inactivación (DIO3) |
| ***Selenofosfato sintetasa 2 (SPS2)*** | Biosíntesis de monoselenofosfato, que es un donante de selenio requerido para la formación de selenocisteína durante la síntesis de selenoproteína |
| ***Selenoproteína M (SeM) y Selenoproteína 15 (Sep15)*** | Posiblemente implicados en el plegamiento de proteínas en el retículo endoplasmático |
| ***Selenoproteína N (SeN)*** | Puede ser necesaria para la formación de músculo temprano; mutaciones en el gen SelN ligados a trastornos musculares |
| ***Selenoproteína P (SeP)*** | Es la selenoproteína más abundante en el plasma sanguíneo, que presumiblemente funciona como un antioxidante y es responsable del transporte de Se de hígado a otros tejidos |
| ***Selenoproteína R (SeR, MsrB1)*** | Reducción de los residuos de metionina oxidados (sulfóxidos de metionina) en proteínas |
| ***Selenoproteína S (SeS)*** | Puede desempeñar un papel antioxidante; posiblemente implicado en la eliminación de las proteínas mal plegadas desde el retículo endoplasmático al citosol para la degradación |
| ***Selenoproteína W (SeW)*** | Puede desempeñar un papel antioxidante; se encuentra principalmente en el músculo y el cerebro |
| ***Sel H, Sel I, Sel K, Sel O, Sel T, Sel V*** | Mal definida o función desconocida |

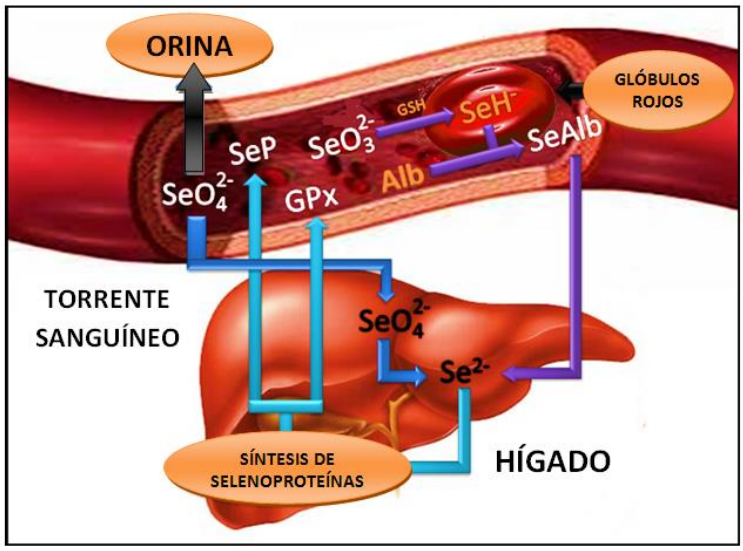



**Figura 3.** Vía metabólica y tráfico de especies de selenio entre la sangre y el hígado en mamíferos.

Por otro lado, el selenio puede jugar un papel significativo sobre los efectos nocivos de determinados metales tóxicos, como por ejemplo el cadmio (Cd) o el mercurio (Hg), y metaloides tales como arsénico (As). La toxicidad inducida por estos elementos se asocia a menudo con la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) (Valko *y col.*, 2005). En este sentido, mediante selenoproteínas con actividad antioxidante, como la glutatión peroxidasa (GPx) y la tiorredoxina reductasa (TrxR), se neutralizan las EROs y por lo tanto es posible prevenir los componentes celulares del estrés oxidativo (Valko *y col.*, 2006).

Una baja ingesta de selenio en la dieta se ha asociado con síntomas múltiples causados por deficiencia de selenio, tales como las cardiomiopatías endémicas, fibrosis cística, enfermedad de Kashin-becks, esclerosis múltiple, artritis reumática, hemólisis y distrofia muscular (Stranges *y col.*, 2006). Además, el metabolismo del tiroides también se ve afectado por el nivel del selenio,

ya que las de-yodinasas son selenoproteínas (Sánchez, 2009). Asimismo, el selenio parece tener un efecto protector en las diversas etapas de la carcinogénesis incluyendo las etapas tempranas y tardías de la progresión del cáncer. Los diferentes mecanismos de acción contra el cáncer en relación a la ingesta de selenio no se entienden completamente; sin embargo, varios mecanismos se han propuesto: protección antioxidante, el aumento de la desintoxicación carcinógeno, una vigilancia inmune mejorada, la modulación de la proliferación celular (ciclo celular y la apoptosis), la inhibición de la invasión de células tumorales y la inhibición de la angiogénesis. Las investigaciones han demostrado la eficacia de los compuestos de selenio como agentes quimiopreventivos *in vivo* y su correlación con su capacidad para alterar la regulación del ciclo celular, estimular la apoptosis y para inhibir la migración de células tumorales y la invasión *in vitro* (Zeng *y col.*, 2008). Por último, efectos beneficiosos sobre la fertilidad han sido demostrados (Hansen *y col.*, 1996).

### 2.1.3. Interacciones biológicas entre elementos

En la actualidad, existe una cantidad significativa de información sobre la respuesta biológica e implicaciones toxicológicas de los elementos, así como los métodos analíticos de especiación química para llevar a cabo su análisis. Sin embargo, la mayoría de estos métodos han sido desarrollados de forma individual para especies de un sólo elemento, sin considerar que determinadas especies químicas de diferentes elementos pueden interaccionar entre sí de forma antagónica o sinérgica, a través de mecanismos de cooperación o disponibilidad (Hill *y col.*, 1970; García-Barrera *y col.*, 2012). Un buen ejemplo es el efecto antagónico del selenio (Se) frente a la toxicidad del mercurio (Hg), que fue estudiado por primera vez en el año 1967, en un experimento

con ratas expuestas a cloruro de mercurio y selenito (Parizek *y col.*, 1967). Debido a que los seres vivos están expuestos a un medio ambiente complejo en el que diferentes elementos y sus especies pueden estar presentes, sus interacciones complican su estudio, y hacen necesario el desarrollo de nuevos métodos analíticos de especiación simultánea así como de sus efectos toxicológicos. En resumen, el metabolismo de los elementos traza no debe considerarse de forma aislada.

Las interacciones más estudiadas hasta la actualidad están relacionadas con los elementos tóxicos arsénico, cadmio, mercurio, y el elemento esencial selenio. Sin embargo, determinados estudios han puesto de manifiesto interacciones importantes entre otros elementos (García-Barrera *y col.*, 2012). A continuación se comentan las interacciones más citadas en la bibliografía.

- **Interacción arsénico/selenio (As/Se)**

La exposición a arsénico se relaciona con una elevada producción de radicales libres y un aumento del estrés oxidativo, el cual puede ser reducido por la acción de las selenoproteínas (Shi *y col.*, 2004). Aunque, el efecto antagónico entre estos dos elementos también se ha demostrado en otros estudios. La primera evidencia científica del antagonismo arsénico-selenio fue publicada en el año 1938, cuando en un experimento con ratas se observó que determinadas dosis de arsenito inhibían los efectos tóxicos del selenito (Moxon, 1938). Se demostró que el arsenito y arsenato actúan de forma similar en la prevención de los efectos tóxicos del selenio en ratas expuestas a selenito sódico y selenocisteína (SeCys) (Zhang *y col.*, 1999). Según la bibliografía, determinados compuestos orgánicos de arsénico también protegen contra la

selenosis, al menos parcialmente, como por ejemplo drogas antisifilíticas, neoarsenamina, sulfarsenamina, ácido arsanílico y ácido 3-nitro-4-hidroxifenilarsónico (Moxon *y col.*, 1947; Hendrick *y col.*, 1953). Otros estudios han demostrado que el arsenito previene la aparición de cataratas causada por selenio en ratas (Shearer *y col.*, 1983), y que determinadas especies de arsénico inducen la remisión de enfermedades como la leucemia (Shen *y col.*, 1997), y el cáncer (Perkins *y col.*, 2000; Zhang *y col.*, 1999; Ogra *y col.*, 2000; Park *y col.*, 2000).

Por el contrario, más recientemente se han demostrado numerosos efectos beneficiosos del Se frente a la toxicidad provocada por varios arsenicales. De esta manera, la exposición al arsénico se ha asociado con una mayor producción de radicales libres (EROs) y un aumento del estrés oxidativo que puede ser reducido por selenoproteínas (Shi *y col.*, 2004). Algunos autores concluyen que el aumento de la ingesta dietética de selenio en los seres humanos puede reducir el riesgo de lesiones cutáneas relacionadas con el arsénico (Chen *y col.*, 2007; Spallholz *y col.*, 2004; Verret *y col.*, 2005), pero la ingesta diaria recomendada de selenio puede no ser adecuada en presencia de agentes de estrés fisiológicos, como la exposición crónica al arsénico en el agua potable (Chen *y col.*, 2007). En un estudio reciente con células de riñón humano, se observó que la selenometionina (SeMet) reduce significativamente el efecto citotóxico del arsénico inorgánico, mientras que el selenio inorgánico no lo hizo. Además, la presencia de SeMet con $As^{III}$ provoca una mejora en proteínas fosforiladas, aunque todavía no se puede concluir que estos resultados son parte de un mecanismo molecular para la reducción de la citotoxicidad causada por el As (Alp *y col.*, 2011).

- **Interacción mercurio/selenio (Hg/Se)**

La toxicidad del mercurio, especialmente de sus formal alquiladas, ha sido muy estudiada (Palenzuela *y col.*, 2004; Horvat *y col.*, 2003). Las especies organomercuriales no se metabolizan bien, y debido a su elevado carácter lipofílico se bioacumulan y biomagnifican en la cadena trófica, afectando de esta forma a la salud humana (Río *y col.*, 2003). El metilmercurio ($MeHg^+$) tiene un elevado factor de bioacumulación (Li *y col.*, 2005), y su origen puede ser natural o antropogénico (Gómez-Ariza *y col.*, 2005). En este sentido, es considerado uno de los contaminantes ambientales más peligrosos para la salud humana (Cabañero *y col.*, 2007).

El antagonismo entre selenio y mercurio se observó por primera vez en 1967, en un experimento con ratas expuestas a cloruro de mercurio y selenito (Parizek *y col.*, 1967). En general, se ha demostrado que la administración simultánea de selenito inhibe los efectos tóxicos provocados por el mercurio inorgánico especialmente los relacionados con el sistema nervioso (Ralston *y col.*, 2010; Choi *y col.*, 2008; Glaser *y col.*, 2010; Farina *y col.*, 2011; Yin *y col.*, 2011) y enfermedades cardiovasculares (Yoshizawa *y col.*, 2002). Además, existen numerosos estudios que ponen de manifiesto el efecto protector de las especies de selenio frente a la toxicidad del metilmercurio ($MeHg^+$), especialmente la selenometionina (SeMet).

La relación molar entre mercurio y selenio (Hg/Se) en ensayos de exposición cuando ambos elementos son administrados simultáneamente es muy importante, en este sentido, se ha descrito que en organismos expuestos a un exceso molar de mercurio respecto a selenio se produce una fuerte inducción de metalotioneínas (MTs) (Sormo *y col.*, 2011). El efecto antagónico del selenio sobre el mercurio en mamíferos se debe posiblemente a la unión de moléculas de

glutatión (GSH) a un núcleo de Se y Hg, que posteriormente interacciona con la selenoproteína P (SelP) (Gailer *y col.*, 2000; García-Sevillano *y col.*, 2014a). El mercurio en forma iónica puede interaccionar con la cisteína y selenocisteína a través de los grupos tioles (-SH) y selenoles (-SeH), es por ello por lo que puede incorporarse a proteínas, grupos prostéticos de enzimas y péptidos. También puede interaccionar con seleniuros ($Se^{2-}$) e hidruro de selenio y puede formar complejos conjuntamente con GSH para unirse finalmente a la selenoproteína P (García-Sevillano *y col.*, 2014a; Falnoga *y col.*, 2004).

Según Fang *y col*. (Fang *y col.*, 1974) el selenio puede afectar la unión carbono-mercurio en compuestos organomercuriales. Otras hipótesis sobre los mecanismos de interacción son: (i) mediante un mecanismo de competencia por los mismos receptores, el selenio produce una redistribución del mercurio desde órganos más sensibles (riñón, sistema nervioso central) a otros menos sensibles (músculo); (ii) formación de complejos inertes como la tiemanita (Das *y col.*, 2002) o Se-Hg-S (Gailer *y col*., 2000) y, (iii) prevención del daño oxidativo causado por el $MeHg^{+}$ mediante su transformación en especies menos tóxicas (Hoffman *y col.*, 1998). En este sentido, se ha propuesto que el selenio puede estar implicado en la desmetilación del $MeHg^{+}$ en el hígado (Yang *y col.*, 2008).

- **Interacción cadmio/selenio (Cd/Se)**

El cadmio se ha convertido en uno de los contaminantes ambientales más importantes en el mundo como resultado de su amplia aplicación en los procesos industriales. El cadmio se acumula principalmente en el hígado y el riñón y ambos órganos son objetivos críticos para la toxicidad aguda de cadmio (Goyer *y col.*, 2001; Nordberg, 2009; Jihen *y col.*, 2010). Varias

investigaciones indican que la toxicidad del Cd implica el agotamiento de glutatión reducido (GSH), la inhibición de las enzimas antioxidantes, inhibición del metabolismo de la energía y estrés oxidativo (Zhai *y col.*, 2013; García-Sevillano *y col.*, 2014f), además de aumentar la peroxidación lipídica y la oxidación del ADN. Por otro lado, los procesos inflamatorios, la apoptosis y la necrosis celular también se han relacionado con mecanismos relacionados con el daño hepático inducido por Cd (Jurczuk *y col.*, 2003; Jurczuk *y col.*, 2004; Koyu *y col.*, 2006; Rana, 2008; Murugavel *y col.*, 2007; Jihen *y col.*, 2010; Brzoska *y col.*, 2013; Asara *y col.*, 2013).

A pesar de que el selenio, mercurio y arsénico son los elementos más estudiados en relación con los efectos antagónicos y sinérgicos entre ellos, se han descrito otras interacciones importantes (García-Barrera *y col.*, 2012). Por ejemplo, el selenio y el cinc pueden inhibir los efectos tóxicos del cadmio en ratas (Se/Cd, Zn/Cd) (Messaoudi *y col.*, 2009). Además de Se y Zn, otros elementos también antagonizan las toxicidad del Cd, como por ejemplo Ca y P (Ca/Cd, P/Cd) (Sonne-Hansen *y col.*, 2002). Asimismo se ha estudiado el efecto protector del Mn sobre el Cd (Martin *y col.*, 2006).

En este sentido, el selenio protege frente a la toxicidad del Cd formando complejos Cd-Se insolubles, disminuyendo la concentración de radicales libres (Nehru *y col.*, 1997; Pappas *y col.*, 2011) e incrementando las actividades de enzimas antioxidantes (El-Maraghy *y col.*, 2001; Stadtman, 1991). Muchas selenoproteínas son peroxidasas y oxidoreductasas que protegen del estrés oxidativo causado por este metal tóxico (Chen *y col.*, 2003; Stadtman, 1991; Steinbrenner *y col.*, 2009). Varios estudios realizados en animales han revelado los efectos protectores de Se contra el estrés oxidativo inducido por Cd en diversos órganos como testículo, hígado y riñón. En

estos estudios (Newairy *y col.*, 2007), las ratas sólo expuestas a cloruro de cadmio ($CdCl_2$) exhibieron un aumento del nivel de MDA, disminución de contenido de GSH y disminución de la actividad de selenoenzimas antioxidantes en el hígado. Sin embargo, todos estos efectos negativos se inhibieron notablemente en los animales tratados con selenito de sodio ($Na_2SeO_3$) durante la exposición $CdCl_2$ (Newairy *y col.*, 2007). En un experimento similar (El-Sharaky *y col.*, 2007), el $Na_2SeO_3$ disminuyó la generación de estrés oxidativo inducido por $CdCl_2$ en el riñón de ratas. La influencia de selenito de sodio sobre la retención de Cd en ratas lactantes fue evaluado por Lazarus *y col*, comprobando que las ratas a $CdCl_2$ y $Na_2SeO_3$ mostraban una reducción de los niveles de Cd en la sangre, cerebro, hígado y riñón en comparación con ratas que recibieron únicamente exposición a $CdCl_2$ (Lazarus *y col.*, 2009). Pocos investigadores han estudiado los efectos del Se sobre la toxicidad de Cd en cultivos celulares. Por medio del ensayo de micronúcleos, se demostró que la pre-exposición a selenito de sodio ($Na_2SeO_3$) protegía a células V79 de la genotoxicidad inducida por cloruro de cadmio (Hurná *y col.*, 1997). Otro estudio semejante demostró que el $Na_2SeO_3$ aumentaba la viabilidad y reducía el contenido de MDA en hepatocitos de ratón tratados con $CdCl_2$ (Wang *y col.*, 2006).

### 2.1.4. Biomarcadores de estrés ambiental

El impacto de los contaminantes en los ecosistemas se evalúa por diferentes metodologías: i) **valoración físico-química**, que establezca los umbrales de concentración para algunas sustancias tóxicas o indicadoras de calidad y ii) **análisis de parámetros biológicos** (biomarcadores) cuya alteración respecto a las condiciones naturales indica una perturbación del ecosistema, ya sea por la presencia de metales o algún otro xenobiótico. En este sentido, la

biomonitorización es una solución más integral que nos informa de la presencia y efectos de diversos factores ambientales, como la contaminación por metales pesados (Livingstone *y col.*, 1989). Los efectos biológicos de un vertido en un ecosistema pueden persistir un mayor periodo de tiempo antes de que los parámetros físico-químicos hayan vuelto a la normalidad, especialmente cuando estos vertidos son de naturaleza metálica donde estos ecosistemas requieren un mayor tiempo para recuperarse. En cambio, los análisis químicos tienen limitaciones, es necesario conocer previamente los contaminantes buscados, tienen una sensibilidad limitada (a veces superior a las concentraciones que afectan los organismos), posibles interferencias, y no informan sobre los efectos biológicos sobre los organismos que habitan en los ecosistemas afectados (López-Barea *y col.*, 1995).

Los biomarcadores son parámetros cuya alteración indica la exposición de los bioindicadores a contaminantes, sus efectos biológicos o los riesgos para los ecosistemas, en ocasiones irreversibles. Los biomarcadores funcionan a distintos niveles: molecular, celular, histológico, organismo, población, comunidad o ecosistema. Los biomarcadores de nivel molecular, celular o histológico responden rápidamente al estrés, tienen gran significado toxicológico y sirven como alertas tempranas ante los efectos ambientales de los contaminantes, ya que se manifiestan antes que los ecosistemas sufran daños irreversibles. Aquellos a nivel de población, comunidad o ecosistema tienen mayor relevancia toxicológica, pero su respuesta es más tardía (Livingstone *y col.*, 1993; Peakall, 1994; López-Barea *y col.*, 1995; Timbrell, 2001). Un biomarcador debe ser específico para un compuesto o tipo de compuestos, detectable en pequeñas cantidades de muestras, medible por técnicas relativamente económicas, sencillas y

reproducibles, asociado a una exposición anterior y predictivo para un estado de alteración reversible (Grandjean *y col.*, 1994).

Atendiendo a su significado los biomarcadores se clasifican en tres tipos (Livingstone *y col.*, 1993; Walker *y col.*, 1997; Timbrell, 2001):

- Biomarcadores de **exposición** que indican la presencia de contaminantes, metabolitos derivados de su biotransformación o productos de su reacción con biomoléculas en fluidos biológicos o tejidos.
- Biomarcadores de **efecto** que son aquellos que muestran cambios bioquímicos tras la exposición a algún xenobiótico. Incluyen alteraciones bioquímicas, fisiológicas o de otro tipo en de los tejidos o fluidos corporales de un organismo.
- Biomarcadores de **predicción de riesgos o susceptibilidad** que predicen la posibilidad de una alteración grave a nivel de población, comunidad o ecosistema. Se refieren a las aptitudes inherentes o adquiridas específicamente por ciertos organismos a la exposición a xenobióticos.

La estacionalidad de los procesos fisiológicos (reproducción, desarrollo, etc.) y factores ambientales (nutrientes, temperatura, etc.) condicionan sus respuestas (Sheehan *y col.*, 1999). Para minimizarlo y facilitar la interpretación de los datos, los programas de biomonitorización deben realizarse en distintas épocas del año y/o usar organismos control o referencia en cada estación e incluir numerosas etapas (Figura 4). La biomonitorización tiene como objetivos:

i) Vigilar a largo plazo zonas afectadas o libres de contaminación (zonas control).

ii) Evaluar riesgos en zonas de vertido frecuente.

iii) Implantar medidas reguladoras y estándares ambientales.

iv) Comprobar la efectividad de las medidas correctoras tras los diferentes episodios de contaminación.

No obstante, el uso de estos biomarcadores convencionales exige un profundo conocimiento de sus mecanismos de toxicidad y sólo abordan procesos conocidos, generalmente muy bien establecidos, pero ignoran otros muchos cambios que puedan experimentar los seres vivos, como las modificaciones en la expresión de los genes, transcritos, proteínas/metaloproteínas y/o metabolitos. Por ello, en las últimas décadas están adquiriendo una gran importancia el uso de técnicas de análisis masivo (las *-ómicas*) que constituyen una alternativa prometedora para la diagnosis de problemas medioambientales (García-Sevillano *y col.*, 2014b).

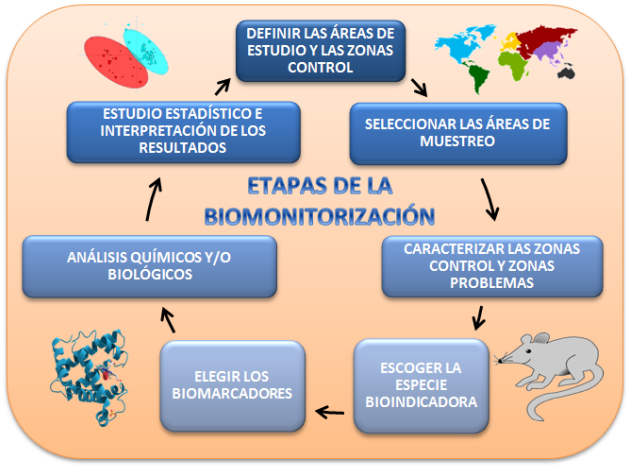



**Figura 4.** Representación esquemática de las diferentes etapas de la biomonitorización.

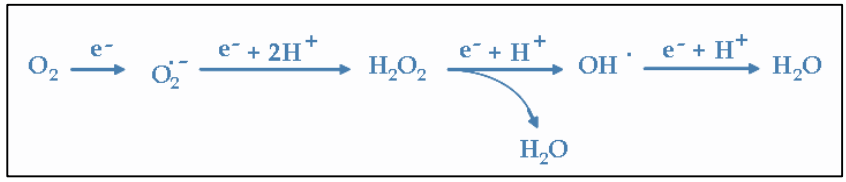
En este sentido, la presencia de metales tóxicos, como As, Cd y Hg en los tejidos de los organismos puede bloquear los grupos funcionales de las proteínas, desplazar y/o sustituir metales esenciales, inducir cambios conformacionales en estas y desnaturalizar o inactivar enzimas, además de provocar estrés oxidativo en los organismos. Por tanto, es necesario conocer la función, asimilación, transporte y almacenamiento de los metales y metaloides en los organismos para su correcto funcionamiento, y para ello es imprescindible estudiar no sólo los procesos bioquímicos que se desarrollan dentro de una célula, mediante el conocimiento de su genoma o transcriptoma (genómica o transcriptómica) y las proteínas que se expresan a partir del mismo, proteoma (proteómica), sino también por la distribución de los metales y metaloides y sus especies químicas en los diferentes compartimentos celulares, el metaloma (metalómica), así como la alteración de las diversas rutas metabólicas, metaboloma (metabolómica) (García-Sevillano *y col.*, 2014b; 2015d).

### 2.1.5. Estrés oxidativo asociado a la exposición a metales

El estrés oxidativo es causado por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno (EROs) y la capacidad de un sistema biológico de detoxificar rápidamente los compuestos reactivos intermedios y reparar el daño resultante. Todas las formas de vida mantienen un entorno reductor dentro de sus células, el cual es preservado por las enzimas que mantienen el estado reducido a través de un constante aporte de energía metabólica. Los Desbalances en este estado normal redox (homeostasis redox) pueden causar efectos tóxicos a través de la producción de peróxidos y radicales libres que dañan a todos los componentes de la célula, incluyendo las proteínas, los lípidos y el ADN (Kruk, 1998). En ocasiones las defensas

celulares frente a las EROs no son lo suficientemente eficaces y se producen situaciones de estrés oxidativo (Winston *y col.*, 1991).

En la mayoría de las células aerobias más del 95% del oxígeno consumido por ellas es reducido a agua por el mediante la respiración mitocondrial, en cuya etapa final 4 electrones y 4 protones son transferidos casi simultáneamente a una molécula de oxígeno para formar agua ($O_2 + 4H^+ + 4\ e^- \rightarrow 2\ H_2O$). Sin embargo, pequeñas cantidades de oxígeno (aproximadamente el 5%) pueden ser metabolizadas por otras vías, en las cuales se produce la reducción univalente o monovalente del oxígeno por etapas, atendiendo a las siguientes reacciones:




Como se puede observar, durante la reducción del oxígeno se generan especies químicas intermedias altamente reactivas e inestables, que en la mayoría de los casos suelen tener un electrón desapareado (radicales libres). Estas especies son conocidas como EROs y cabe destacar:

- Muchas reacciones producen el *radical anión superóxido* ($\mathbf{O_2^{\cdot-}}$): *i)* oxidación de moléculas endógenas y metales, *ii)* actividad de oxidasas y deshidrogenasas (NADPH-P450 reductasa, NADH oxidasa, xantina oxidasa) y cadenas de transporte electrónico, *iii)* metabolismo de algunos xenobióticos y metales de transición, *iv)* ciclado redox (Sies, 1986; Winston *y col.*, 1991; Kruk, 1998).

- El *peróxido de hidrógeno* ($H_2O_2$) se forma por dismutación espontánea o enzimática (superóxido dismutasa) del $O_2^{\cdot -}$, o por reducción dielectrónica directa del $O_2$, catalizada por la ácido graso oxidasa, aminoácido oxidasas, etc. (Kruk, 1998), según la siguiente reacción:

$$2O_2^{\cdot -} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

- La especie más reactiva es el *radical hidroxilo* ($OH^{\cdot}$), formado a partir de $O_2^{\cdot -}$ y $H_2O_2$ en la reacción de Fenton (Kruk, 1998) catalizada por iones metálicos:

$$M^{n+} + H_2O_2 \longrightarrow M^{(n+1)} + OH^{\cdot} + OH^-$$

$$M^{(n+1)} + O_2^{\cdot -} \longrightarrow M^{n+} + O_2$$

$$H_2O_2 + O_2^{\cdot -} \longrightarrow O_2 + OH^{\cdot} + OH^-$$

Las EROs causan daños oxidativos en las biomoléculas (Winston *y col.*, 1991; Kruk, 1998) (Tabla 2). Las proteínas sufren roturas de los anillos en los residuos de histidina (His) y triptófano (Trp), o del enlace peptídico a nivel de las prolinas (Pro), formación de puentes disulfuro o disulfuros mixtos en los residuos de cisteínas (Cys) que puede conducir a la inactivación temporal de enzimas (Rodríguez-Ariza *y col.*, 1999). Las proteínas absorben ~70% de las EROs, lo que provoca cambios covalentes en las cadenas laterales de sus aminoácidos, aumentando la complejidad del proteoma.

Aunque la mayoría de los aminoácidos en las proteínas son sensibles a la oxidación, esta sensibilidad se incrementa en el grupo tiol de las cisteínas (Davies, 2005; Hansen *y col.*, 2009; Winterbourn, 2008), sufriendo modificaciones redox (formación de puentes disulfuros, -S-S-) que son críticos en la estructura y regulación de las proteínas, la catálisis enzimática, y el mantenimiento del potencial redox y de los procesos de señalización celular (Eaton, 2006; Winterbourn, 2008).

La oxidación de proteínas se produce durante el metabolismo normal o tras su exposición a estrés oxidativo, como el provocado por los contaminantes. Además, la formación de disulfuros mixtos entre proteínas y glutatión reducido (GSH) altera el estado redox intracelular entre las formas reducida y oxidada del glutatión (GSSG). Las EROs provocan numerosos daños en el DNA, rotura de cadenas, alteración de bases, aberraciones cromosómicas e intercambios entre cromátidas hermanas, que pueden provocar mutaciones (Sies, 1986; López-Barea *y col.*, 1998). La formación de 8-oxodG, mediado por OH·, se utiliza como biomarcador de contaminación y estrés oxidativo (Alhama *y col.*, 1998; Rodríguez-Ariza *y col.*, 1999). El radical hidroxilo también ataca los ácidos grasos poliinsaturados, integrantes de los fosfolípidos de las membranas, en una reacción conocida como peroxidación lipídica (Winston *y col.*, 1991; Brown *y col.*, 1996).

Por otro lado, los sistemas antioxidativos eliminan EROs para evitar daños en los organismos (Sies, 1986; Winston, 1991; Kruk, 1998). Puesto que muchos contaminantes ambientales incrementan la producción de EROs, estos sistemas tienen gran importancia en la defensa de los organismos contra la contaminación ambiental.

**Tabla 2.** Biomarcadores moleculares de oxidación de ADN, lípidos y proteínas (Ziech *y col.*, 2010).

| *Patología* | *Alteración/biomarcador molecular* |
|---|---|
| **Oxidación del ADN** | 8-oxo-2'deoxiguanosina (8-oxo-dG) |
| | 8-oxo-2'deoxiadenosina (8-oxo-dA) |
| | 4,6-diamino-5-formamidopirimidina (FapyAde) |
| | 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina (FapyGua) |
| | Aductos PAH-AND |
| | Clusters ADN oxidado |
| **Peroxidación lipídica** | Malondialdehído (MDA) |
| | 4-Hidroxinonenal (HNE) |
| | Hidroxipropanodeoxiguanosines (OH-PdGs) |
| | Aductos exocíclicos eteno ADN |
| | Isoprostanos |
| **Oxidación de proteínas** | Bitirosine cross-links |
| | Grupos carbonilos |
| | Escisiones oxidativas |
| | Radicales aminoácidos (p. ej. Pro, His, Arg, Lys, Cys) |

En este sentido, el sistema de defensa antioxidativo incluye:

i) Antioxidantes enzimáticos: enzimas que catalizan reacciones en las que se utilizan las EROs como substratos, transformándolas en productos más estables con menor poder oxidante (catalasa (CAT), superóxido dismutasas (SOD) y glutatión peroxidasas (GPx)).

ii) Antioxidantes no enzimáticos: moléculas de origen no proteico que son capaces de neutralizar las EROs; ya sea por su carácter reductor, por su capacidad de

enmascarar a metales que intervienen en su formación, o por actuar como cofactores de antioxidantes enzimáticos. Entre ellos destacan: el ácido ascórbico (vitamina C), alfa-tocoferol (vitamina E), glutatión reducido (GSH), carotenoides, flavonoides, taurina y ácido úrico, entre otros (Valko *y col.*, 2007).

iii) Sistemas auxiliares (glucosa-6-P deshidrogenasa (G6PDH), glutatión reductasa (GR)) que regeneran poder reductor, NADPH y GSH, que se consume durante detoxificación de las EROs (Kruk, 1998).

Las enzimas antioxidantes de mayor importancia son:

- Las ***superóxido dismutasas*** catalizan la dismutación del radical anión superóxido, en la reacción:

$$2O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

En eucariotas, se distinguen las isoenzimas Cu/Zn-SOD, citosólicas que se inhiben por la acción del cianuro, y Mn-SOD, de la matriz mitocrondrial no inhibible por cianuro (Pedrajas y col., 1998). La SOD es inducible por contaminantes y alto nivel de $O_2$ (López-Barea *y col.*, 1995).

- La ***catalasa*** es una hemoproteína localizada principalmente en los peroxisomas (Kruk, 1998). Dismuta el $H_2O_2$, según la reacción:

$$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$$

La cual actúa, fundamentalmente, cuando la concentración de $H_2O_2$ es baja.

- La ***glutatión peroxidasa*** es una enzima citosólica dependiente de Se que cataliza la reducción de peróxidos orgánicos y $H_2O_2$, usando GSH como donador de electrones:

$$H_2O_2 + 2GSH \longrightarrow GSSG + 2H_2O$$

$$RCOOH + 2GSH \longrightarrow ROH + GSSG + H_2O$$

Estas enzimas antioxidantes actúan conjuntamente como se muestra en la Figura 5. En la que puede observarse cómo el glutatión oxidado (GSSG) se regenera por acción de la NADPH catalizada por la enzima glutatión reductasa (GR) (López-Barea *y col*., 1995).

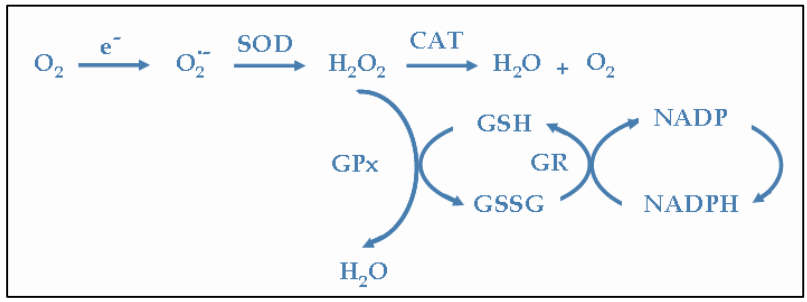



**Figura 5.** Acción conjunta de los sistemas antioxidantes enzimáticos.

En este sentido, algunas de las causas más comunes que pueden inducir unos niveles de EROs elevados en el organismo y, por tanto, pueden provocar estrés oxidativo, son los niveles elevados de metales tóxicos que pueden encontrarse en ecosistemas terrestres cercanos a áreas de alta actividad industrial, agrícola y/o minera. Muchos de estos metales con propiedades redox actúan como catalizadores de las reacciones por las que el $O_2$ se transforma en alguna de las EROs previamente comentadas.

## 2.2. Tecnologías –*ómicas*

Los metales juegan un papel importante en el desarrollo y función de los organismos vivos ya que el comportamiento de muchos genes, transcritos, proteínas, metaloproteínas y metabolitos depende críticamente de su interacción con los metales/metaloides presentes en la célula, tales como el As, Cd, Cu, Hg, Mn, Ni, Pb, Se y Zn. Afortunadamente, las tecnologías analíticas modernas están proporcionando nuevas herramientas instrumentales para investigar la distribución y los mecanismos de toxicidad de estos elementos, y generar una comprensión más completa de las interacciones entre los metales y metaloides con las células. La importancia de vigilar los efectos de los elementos en los organismos vivos ha aumentado como consecuencia de los cambios naturales y las actividades antropogénicas que han llevado a un aumento de los niveles de metales tóxicos y contaminantes en general en los ecosistemas terrestres y acuáticos. En este sentido, los organismos de vida libre se han utilizado en la evaluación de la contaminación ambiental, ya que pueden reflejar el impacto de los contaminantes sobre el metabolismo celular y la homeostasis global usando diferentes biomoléculas relacionadas con el estrés ambiental (biomarcadores), tales como genes (Baos *y col.*, 2006; Ruiz-Laguna *y col.*, 2006) transcritos (Ruiz-Laguna *y col.*, 2005), metaloproteínas (García-Sevillano *y col.*, 2012a), enzimas redox y proteínas (Montes-Nieto *y col.*, 2007), así como los metabolitos (García-Sevillano *y col.*, 2013d; 2015e).

### 2.2.1. Cascada de las –*ómicas*

Los progresos realizados en la secuenciación genética de organismos (Fleischmann *y col.*, 1995), y en particular, los desarrollos metodológicos que han permitido la secuenciación del genoma humano en el año 2000 (Lander *y col.*, 2001; Craig-Venter *y col.*, 2001), así como los

amplios avances durante la última década en el conocimiento de los genes y el genoma (genómica) han provocado la aparición de numerosas *–ómicas*, todas ellas relacionadas con el estudio de la totalidad de algún tipo concreto de biomolécula (genes, transcritos, proteínas/metaloproteínas, metabolitos, etc) de un organismo, de gran utilidad para el estudio de las respuestas biológicas de los organismos frente a la exposición controlada de diferentes tipos de xenobióticos, entre los que destacan los metales tóxicos. De esta forma se pueden conocer y descifrar los mecanismos de acción de estos contaminantes y su toxicidad (García-Sevillano *y col.*, 2013b; 2014d-e; 2015c-e). En este sentido, la genómica se ocupa del análisis del genoma completo para entender la función de genes individuales. La mayoría de la genómica funcional se basa en el análisis de la expresión génica (transcriptómica) y el análisis integral de proteínas/metaloproteínas (proteómica/metalómica) (González-Fernández *y col.*, 2008). Más recientemente, la metabolómica (basada en el estudio completo de los metabolitos involucrados en diferentes procesos metabólicos de los organismos) se ha convertido en un campo emergente en bioanálisis y puede considerarse como el punto final de la denominada cascada de las "*ómicas*" (Figura 6). Además, en los estudios basados en la exposición a metales y/o metaloides, el estudio del ionoma (ionómica) involucra la medida cuantitativa y simultánea de la composición elemental de los organismos vivos y los cambios que tienen lugar como respuesta a estímulos fisiológicos.

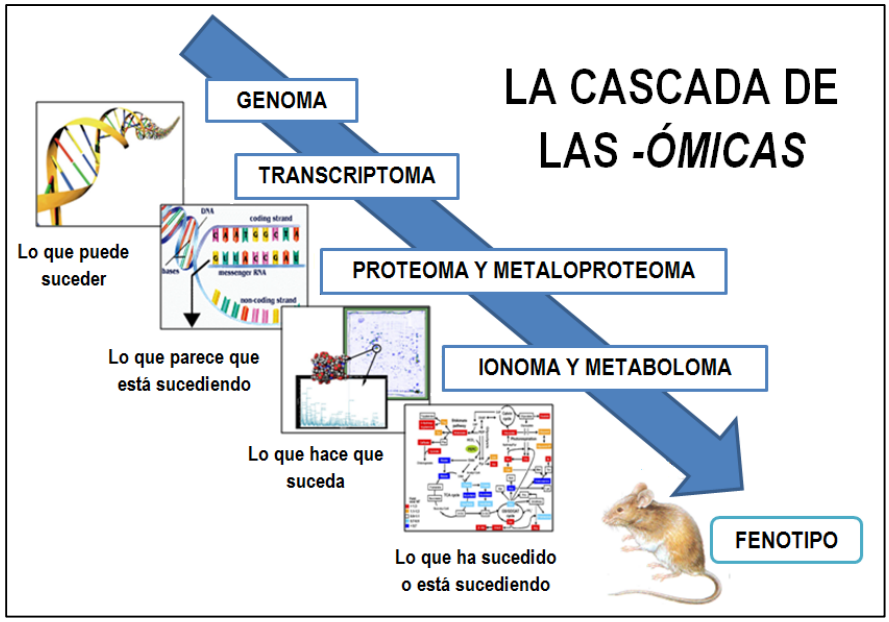



**Figura 6.** Representación esquemática de la cascada de las "-*ómicas*".

Así, mientras que la genómica o la proteómica indican la probabilidad de que ocurra un proceso biológico, la metabolómica e ionómica proporcionan información sobre lo que realmente está sucediendo, y por lo tanto, es la disciplina que mejor puede caracterizar los fenotipos de los seres vivos. Esto se debe a que en el análisis metabolómico intervienen no solamente la expresión de los genes sino también los factores externos (la alimentación, el estrés medioambiental, etc.). Como el metaboloma viene determinado por el proteoma, éste del transcriptoma y éste a su vez del genoma, representa un nivel de organización más sensible que éstos para comprender el resultado de un comportamiento biológico complejo. Bajo este punto de vista, los perfiles metabolómicos e ionómicos de la expresión génica implican factores externos (exposición a metales, contaminantes ambientales, la dieta y otros) que nos permiten entender fácilmente las consecuencias de los mecanismos biológicos complejos en el interior del organismo y en particular en el interior de las células (Figura 7). Por lo tanto, la monitorización de problemas

ambientales requiere la integración de diferentes enfoques para resumir las múltiples variables y factores que contribuyen al comportamiento del ecosistema. La influencia de la contaminación, especialmente la contaminación por metales pesados, en base a la respuesta biológica de los organismos de vida libre se ha utilizado para evaluar el impacto real de los xenobióticos en el medio ambiente. Por esta razón, algunas especies no protegidas, como los cangrejos (Sánchez-López *y col.*, 2004; Vioque-Fernández *y col.*, 2007; Vioque-Fernández *y col.*, 2009), peces (Rico *y col.*, 1986), moluscos (Romero-Ruiz *y col*., 2008) y ratones (Ruiz-Laguna *y col.*, 2006; García-Sevillano *y col.*, 2012a-b; 2013d; 2014b; Bonilla-Valverde *y col.*, 2004) se han utilizado para estudios ambientales, así como el uso de la respuesta biológica basada en efectos genotóxicos (Baos *y col.*, 2006), el análisis de biomarcadores típicos de estrés oxidativo (Bonilla-Valverde *y col.*, 2004) y otras pruebas (Mateo *y col.*, 2006).

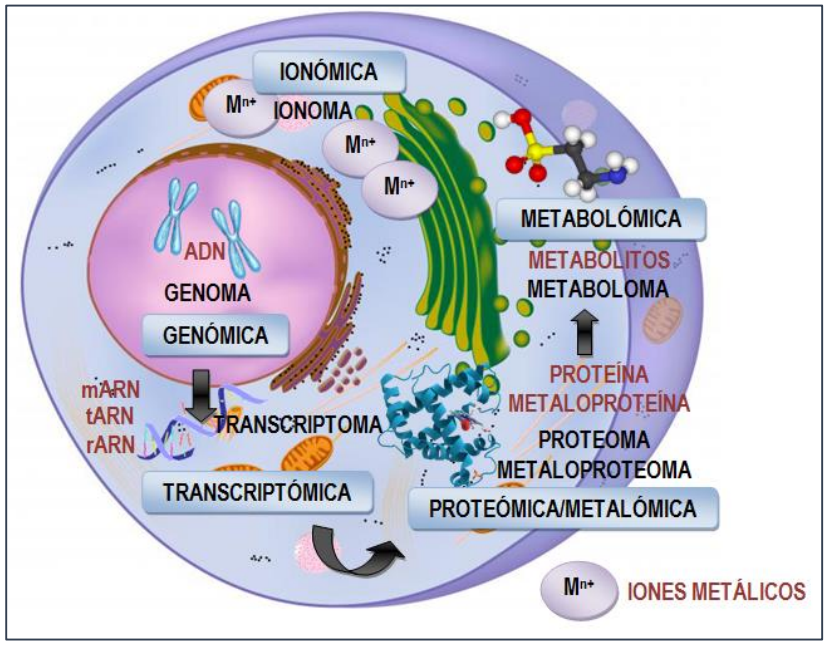



**Figura 7.** Esquema simplificado de una célula animal y las tecnologías *-ómicas.*

Actualmente, se han propuesto enfoques basados en las tecnologías *-ómicas* como la proteómica (Montes-Nieto *y col.*, 2007; Vioque-Fernández *y col.*, 2009; Romero-Ruiz *y col.*, 2008) y transcriptómica (Ruiz-Laguna *y col.*, 2006; Ruiz-Laguna *y col.*, 2005; Abril *y col.*, 2014) para monitorizar la contaminación ambiental de los ecosistemas terrestres. Para este propósito, se han considerado también estudios basados en la metalómica y metabolómica (García-Sevillano *y col.*, 2012a; 2013e; González-Fernández *y col.*, 2013). En la actualidad estos enfoques se utilizan para descifrar la respuesta biológica a la contaminación (García-Sevillano *y col.*, 2013d; 2014b).

En resumen, debido a la complejidad de los sistemas ambientales, una evaluación completa de los efectos de los contaminantes sobre los organismos vivos requiere el uso de herramientas multidisciplinarias que permiten resumir las múltiples variables y factores que contribuyen al comportamiento del ecosistema. La medida de la actividad enzimática y/o la cuantificación de biomarcadores convencionales como las enzimas implicadas en reacciones de desintoxicación, por ejemplo los citocromos P450 y glutatión-S-transferasa, enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (CAT) o glutatión reductasa (GR), así como antioxidantes no enzimáticos como el malondialdehído (MDA), glutatión reducido (GSH), o vitaminas C y D, que se generan en el organismo como consecuencia de los daños de biomoléculas originados por los metales y metaloides, se ha convertido en una buena alternativa ampliamente utilizada para este propósito. Sin embargo, este enfoque tiene limitaciones ya que requiere un conocimiento previo y profundo de los mecanismos de toxicidad de los compuestos presentes en los ecosistemas y sólo se consideran un corto número de biomoléculas, subestimando otras que pueden ser críticas o se desconoce su relación con la contaminación metálica. En este sentido, las tecnologías *-ómicas* ofrecen una alternativa valiosa

en este campo, ya que proporcionan información masiva sobre biomoléculas en células y organismos bajo los efectos de los metales tóxicos, o contaminantes en general. Sin embargo, sólo es posible una evaluación global de los cambios que los contaminantes inducen en las células mediante la integración de *-ómicas*, ya que las transcripciones inducidas por contaminantes (transcriptómica) codifican proteínas con los perfiles de expresión alterados, que experimentan modificaciones post-transduccionales (proteómica). Además, muchas proteínas relacionadas con cuestiones ambientales están ligadas a metales y la mayoría están relacionados con una enzima de estrés oxidativo (metalómica), y con ello con las modificaciones que se originan en las diferentes rutas metabólicas (metabolómica). Por lo tanto, la complejidad de la vigilancia ambiental de la toxicidad causada por metales requiere el uso integrado de tecnologías *-ómicas* múltiples para lograr obtener una información integral en el estudio de las cuestiones ambientales y el diagnóstico de las posibles amenazas causadas por la contaminación (García-Sevillano *y col*., 2014b).

### 2.2.2. Genómica funcional (transcriptómica/proteómica)

La genómica ambiental estudia factores subyacentes, a nivel genético, que contribuyen a la variabilidad en las respuestas toxicológicas de los organismos. Debido a la diversidad de respuestas, la genómica ambiental ha de integrar la biología molecular, fisiología, toxicología, ecología, biología de sistemas, la epidemiología y la genética de poblaciones en un estudio de investigación interdisciplinario. Esta información básica será de utilidad en la identificación de biomarcadores apropiados para la estimación del riesgo, y potencialmente, para el desarrollo de

estrategias efectivas para la protección del medio ambiente, la salud global y el desarrollo sostenible. En la era post-genómica, la aplicación de los enfoques genómicos funcionales tales como la transcriptómica o la proteómica, ofrece una evaluación integral de las respuestas biológicas a la exposición de la contaminación, que permiten la identificación de nuevas biomoléculas que pueden ser utilizadas como biomarcadores en la biomonitorización ambiental (Ruiz-Laguna *y col.*, 2006; Montes-Nieto *y col.*, 2007; Montes-Nieto *y col.*, 2010).

Por tanto, las respuestas genéticas a condiciones de estrés medioambiental son reguladas, generalmente, a nivel transcripcional. La transcriptómica cuantifica los niveles de casi todas las transcripciones expresadas bajo determinadas condiciones fisiológicas o ambientales. Para este propósito, las tecnologías de microarrays se han desarrollado como una plataforma propicia para generar perfiles de transcripción de todo el genoma, por tanto, proporcionan una visión genérica sobre la respuesta de los organismos a los factores de estrés ambiental y la posibilidad de identificar nuevos biomarcadores ecotoxicológicos. Esta metodología constituye una enorme contribución a la ecotoxicología (Watanabe *y col.*, 2008), pero también lleva implícitos una serie de dificultades y carencias. Un tema crítico en la cuantificación de la transcripción es la sensibilidad que impone el uso posterior de metodologías más robustas, principalmente QRT-PCRT (reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa cuantitativa). Además, los cambios detectados por microarrays han de ser confirmados, al menos parcialmente, por QRT-PCR. La alta homología en la secuencia genética entre el ratón de laboratorio, *Mus musculus* y el ratón de vida libre *Mus spretus* (Ruiz-Laguna *y col.*, 2006; Mahler *y col.*, 2008) ha promovido el uso de microarrays de ADN comerciales para *Mus musculus* en estudios de campo con *Mus spretus* (Abril *y col.*, 2014).

Por otro lado, los niveles de expresión de proteínas son el equilibrio entre la transcripción, la traducción y la degradación de proteínas en células, incluyendo las diferentes etapas de la maduración de transcripciones y proteínas y la modificación que experimentan (genómica funcional). La proteómica es el análisis global de estas proteínas y proporcionan una información adicional y complementaria al enfoque transcriptómico. Como metodología *-ómica*, la proteómica proporciona una evaluación amplia e integral de los mecanismos tóxicos y defensivos provocados por los contaminantes sin necesidad de ningún conocimiento previo de su mecanismo de toxicidad. Estas aproximaciones proteómicas nos permiten identificar las proteínas que se alteran de manera significativa en un organismo después de exposición a la contaminación, que pueden ayudar a revelar el mecanismo de toxicidad.

Además, estas proteínas, una vez caracterizadas, se pueden utilizar como nuevos biomarcadores en la monitorización biológica tanto de ecosistemas terrestres como acuáticos. La falta de datos con respecto a las secuencias de proteínas de organismos modelo con interés ambiental es un inconveniente que se soluciona utilizando organismos modelo secuenciado genéticamente, homólogos a bioindicadores de vida libre, como es el caso del uso del ratón clásico de laboratorio *Mus musculus* y el ratón de vida libre *Mus spretus*.

La proteómica es una ciencia relativamente reciente. Para su despegue definitivo, ha sido necesaria la consolidación definitiva de la espectrometría de masas (MS) como técnica aplicada al análisis de moléculas biológicas y el crecimiento exponencial en el número de entradas correspondientes a genes y/o proteínas en las bases de datos. Esto, combinado con el empleo de potentes métodos de fraccionamiento y separación de péptidos y proteínas como la 2D-

PAGE (electroforesis de poliacrilamida de dos dimensiones) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), ha permitido consolidar la proteómica, desde mediados de los años 90 del siglo pasado, como ciencia para el análisis masivo de proteínas (Weiss *y col.*, 2009). En este sentido, se está utilizando un nuevo enfoque basado en MS para la cuantificación relativa de proteínas, derivatizando los grupos amino primarios de las proteínas intactas y utilizando una etiqueta isobárica para la cuantificación relativa y absoluta (iTRAQ®) (Zieske, 2006). El método ITRAQ se basa en el etiquetado covalente de la N-terminal de la cadena lateral y aminas de péptidos a partir de las digestiones de proteínas con etiquetas de diferente masa. Actualmente hay dos reactivos que se utilizan con frecuencia: 4-plex y 8-plex, que permiten etiquetar todos los péptidos de diferentes muestras/tratamientos. Estas muestras son separadas por cromatografía líquida y analizadas por espectrometría de masas en tándem (MS/MS). A continuación, se lleva a cabo una búsqueda en la base de datos, utilizando los datos de fragmentación para identificar los péptidos marcados y por lo tanto las proteínas correspondientes. La fragmentación proporciona información sobre los iones de baja masa molecular que se pueden utilizar para cuantificar relativamente los péptidos y las proteínas de las que se originaron.

### 2.2.3. Especiación química y metalómica

Según la IUPAC, un análisis de especies químicas es la identificación y/o medida de las cantidades de una o más especies individuales en una muestra. Las especies químicas son las formas específicas de un elemento definidas por su composición isotópica, electrónica o estado de oxidación y/o complejo o estructura molecular (Templeton *y col.*, 2000). En la actualidad, la

especiación química ha sido y es un tema de interés generalizado que deriva de la implicación de las especies químicas elementales en el medio ambiente, la salud y los alimentos.

Los estudios de especiación se han ido desarrollando durante los últimos 20 años, pudiendo encontrarse métodos establecidos para análisis de rutina en el medio ambiente, los alimentos y la salud de numerosas especies químicas. La mayoría de los procedimientos de especiación están relacionados con el estado de oxidación de los elementos o el análisis de compuestos organometálicos antropogénicos y los productos de su degradación medioambiental como es el caso del metilmercurio y mercurio inorgánico o bien las numerosas especies de arsénico que en ocasiones podemos encontrar en diversas muestras biológicas. Estas especies químicas individuales tienen un comportamiento diferencial en relación con su toxicidad, movilidad y biodisponibilidad. Un claro ejemplo es el Hg, ya que en su forma orgánica metilmercurio, presenta una mayor toxicidad, siendo un compuesto neurotóxico capaz de acumularse en los organismos (bioacumulación), lo que hace que se vaya multiplicando su presencia a lo largo de las cadenas alimentarias (biomagnificación) (Clarkson *y col.*, 2007). En el caso del arsénico se presenta la situación inversa, la toxicidad de los iones simples (As (III) y As (V)) disminuye, hasta su desaparición, cuando el elemento se incorpora en una molécula orgánica más compleja y de menor toxicidad, como son las especies metiladas de este elemento (p. ej. ácidos metil arsónico [$MA^V$] y dimetil arsínico [$DMA^V$]) (García-Sevillano *y col*., 2012b). El uso de técnicas de separación eficientes como la cromatografía de gases (GC), la electroforesis capilar (CE) o la cromatografía líquida (LC) acoplada a detectores atómicos incrementa la selectividad del método y ayuda a distinguir entre especies similares del mismo o diferentes elementos y facilita su cuantificación (Lobinski *y col.*, 1998).

La especiación química puede decirse que ha sido el origen de la metalómica. El término "metaloma" fue definido por Williams quien se refirió a él como la distribución de los elementos, concentración de equilibrio de iones metálicos libres, en los componentes celulares, célula u organismo (Williams, 2001). El significado del término metaloma que propone se extiende a elementos metálicos y a las especies metálicas presentes en un sistema biológico, definido en cuanto a su identidad y/o cantidad (Lobinski *y col.*, 2010; Spuznar, 2004; Koppenaal *y col.*, 2007). Por todo ello, podemos definir la metalómica como el estudio cualitativo/cuantitativo del metaloma o conjunto de especies de metales o metaloides en una célula o tejido (Spuznar, 2004).

En los estudios metalómicos, la complejidad de las moléculas se incrementa notablemente. Así, mientras que en especiación se estudian, con frecuencia, especies organometálicas simples, en metalómica se estudia una gran variedad de ligandos que pueden coordinarse con elementos trazas. Entre estos ligandos pueden citarse ligandos orgánicos pequeños (por ejemplo citrato, tartrato, oxalato, aminoácidos y oligopéptidos), moléculas macrocíclicas (por ejemplo, porfirinas) o macromoléculas (por ejemplo, polipéptidos, proteínas, fragmentos de restricción de ADN, polisacáridos), como se muestra en la Figura 8, y lo que es más importante, se trata generalmente de especies desconocidas, para las que no se dispone de patrones o calibrantes que permitan su identificación y cuantificación, lo cual diferencia los procedimientos metalómicos de la especiación química convencional (Gómez-Ariza *y col.*, 2004).

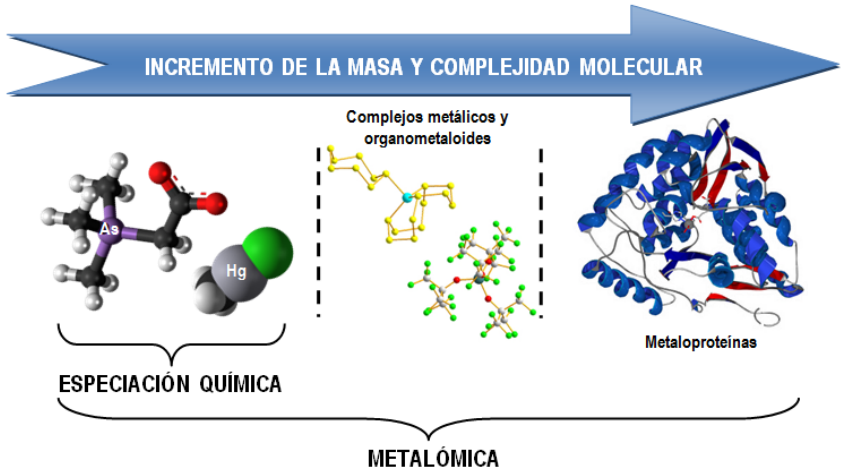



**Figura 8.** Aumento de la masa y complejidad molecular en metalómica en comparación con la especiación química convencional.

La importancia de los metales en el mundo de las proteínas, y en general de la célula y de los seres vivos es fundamental. No obstante hay que tener en cuenta que aproximadamente un tercio de todas las proteínas precisan de la presencia de metales o metaloides como cofactores para desarrollar su función (por ej., Cu, Zn, Fe, Mn) (Tainer *y col.*, 1991) y que los metales influyen en más del 50% de las proteínas (Mounicou *y col.*, 2009). Estos metales influyen en las propiedades catalíticas o estructurales de las proteínas y su presencia en las moléculas está determinada, generalmente por el genoma. Pero las proteínas tienen también otras funciones dinámicas en el control de la homeostasis de los metales y en determinadas funciones en las que el metal se une transitoriamente a la molécula. Como ejemplo puede citarse al cinc, que actúa como cofactor en seis clases de enzimas y en proteínas de regulación celular (Coleman *y col.*, 1998; Berg *y col.*, 1996). Varias familias de proteínas de membrana transportan Zn (II) a través de las membranas hasta el interior de las células (Palmiter *y col.*, 1995), pero la química

intracelular y los mecanismos por los que el Zn (II) es detectado, almacenado, o incorporado como cofactor en las células no se conoce aun suficientemente. Además, se ha demostrado que la concentración total de cinc en las células permanece constante, lo que muestra la existencia de un preciso mecanismo de control de este elemento que pone de manifiesto la necesidad de identificar metaloproteínas y otras moléculas en estrecha interacción con los iones metálicos (Outten *y col.*, 2001).

Por otro lado, la presencia de metales tóxicos, como As, Cd y Hg en los tejidos de los organismos puede bloquear los grupos funcionales de las proteínas, desplazar y/o sustituir metales, inducir cambios conformacionales en estas y desnaturalizar o inactivar enzimas, además de provocar estrés oxidativo en los organismos (Hall, 2000; Rahman, 2007; Matés *y col.*, 2002). En este sentido, los iones metálicos con carácter electrofílico pueden participar en la expresión de las metaloproteínas, como ocurre con las metalotioneínas (Jara-Biedma *y col.*, 2013), las metalochaperonas conducen a los iones metálicos en el interior de la célula para lograr que realicen su función biológica~~,~~ mediante la unión a otras biomoléculas a las que deben unirse (Rosen, 2006; Rosenzweig, 2002), y las proteínas transportadoras extracelulares, como la albúmina y la transferrina ~~que~~ son fundamentales en el transporte global de los metales, tales como Cu, Zn y Fe y juegan un papel fundamental en procesos homeostáticos (Mounicou *y col.*, 2009).

Las metodologías para el análisis bioinorgánico en el campo de la especiación química y la metalómica han podido evolucionar notoriamente en los últimos años gracias al desarrollo de los nuevos instrumentos de espectrometría de masas y su acoplamiento a técnicas separativas

de gran resolución, aplicables tanto a la caracterización elemental como a la molecular de las especies químicas (Spuznar, 2005; Hu *y col.*, 2013). Mediante esta combinación de técnicas de detección ha sido posible solucionar los principales problemas que se presentan en estos análisis: niveles trazas o ultratrazas para la mayoría de estas especies en las diferentes matrices biológicas, elevada complejidad de dichas matrices, transformación de especies durante el tratamiento y manipulación de las muestras para el análisis, posible ruptura de los complejos metal-biomolécula, etc. Se requieren además métodos de preparación de muestra altamente eficaces, pero poco agresivos, junto a etapas de separación muy bien diseñadas para llevar a cabo la purificación y preconcentración de las especies de interés, evitando que se produzca la ruptura de los complejos que forman los metales o metaloides con las estructuras orgánicas.

### 2.2.4. Metabolómica

La metabolómica, el análisis global del metaboloma, constituye una herramienta para la diagnosis de cambios importantes a nivel celular y biológico relacionados con el medio ambiente, los alimentos y la salud. Uno de los atractivos más importantes de esta disciplina es la posibilidad de llevar a cabo análisis cuantitativos no invasivos en tejidos y fluidos biológicos. El metaboloma es el conjunto de compuestos de baja masa molecular (típicamente <1000Da) presentes en los sistemas biológicos (Bowen *y col.*, 2010). La metabolómica es el análisis del metaboloma en determinadas condiciones endógenas (fisiológica) o exógenas (exposición). La **metabolómica** se refiere al estudio y medida de la totalidad de los metabolitos en una célula (Fiehn, 2002), mientras que la **metabonómica** describe "la medición cuantitativa de la respuesta metabólica dinámica multiparamétrica de los sistemas vivos sometidos a estímulos fisiopatológicos o modificación

genética" (Nicholson *y col.*, 1999). Estas dos disciplinas han sido definidas por Nicholson como un complemento necesario para la metabolómica: la química analítica y la quimiometría (Nicholson *y col.*, 1999). Los enfoques metabolómicos se han desarrollado en muchas áreas de la investigación bioanalítica, incluyendo la toxicología (Wei *y col.*, 2009), debido a la posibilidad de detectar la respuesta metabólica a la exposición química con el propósito de encontrar biomarcadores sobre el estado fisiológico real de los organismos vivos. Por esta razón, la metabolómica juega un papel clave para entender los resultados de los procesos biológicos complejos, tales como experimentos de exposición a elementos tóxicos (García-Sevillano *y col.*, 2014b; 2015e).

Las estrategias más utilizadas en metabolómica son (Kaderbhai *y col.*, 2003; Allen *y col.*, 2004; Kellet *y col.*, 2005):

- *Análisis de uno o varios metabolitos —target analysis—*, orientado a aquellos metabolitos vinculados a perturbaciones bióticas o abióticas que alteren sistemas biológicos, por ejemplo enzimáticos.
- *Perfil metabólico —metabolic profiling—*, relacionado con un grupo de metabolitos (e.g. vitaminas hidro o liposolubles) o los asociado con una determinada ruta metabólica.
- *Metabolómica —metabolomics—*, el análisis exhaustivo del metaboloma completo (estimación de todos los metabolitos) en unas condiciones experimentales determinadas.

- *Huella dactilar metabólica —metabolic fingerprinting—*, que permite clasificar muestras en relación a su procedencia, su relevancia u origen biológico, utilizando una tecnología adecuada, es decir, rápida, pero que no da necesariamente información selectiva.
- *Huella pedicular metabólica —metabolic footprinting—*, estudio de los metabolitos del fluido extracelular, también conocido como exometaboloma o secretoma.

La búsqueda e identificación de moléculas alteradas o biomarcadores requiere el uso de técnicas analíticas que presenten un amplio rango de aplicabilidad, además de una muy elevada selectividad, especificidad y sensibilidad. Las principales técnicas analíticas que se emplean para los estudios metabolómicos se basan en la resonancia magnética (NMR) nuclear y espectrometría de masas (MS). La resonancia magnética tiene carácter no destructivo y permite la reutilización de la muestra para otros análisis, además la preparación de la muestra es muy simple, por lo que es una técnica fácilmente reproducible. Sin embargo, la espectrometría de masas presenta ciertas ventajas frente a la RMN, como su mayor sensibilidad y la posibilidad de aplicarse a muestras complejas en la que los distintos analitos se encuentren en un amplio rango de concentraciones. Además, MS es también una técnica importante para la identificación molecular de metabolitos desconocidos, especialmente a través del uso de experimentos en tándem MSMS para llevar a cabo la identificación de las estructuras de los diferentes metabolitos (Dunn, 2008; Griffin *y col.*, 2006; Lin *y col.*, 2010; García-Sevillano *y col.*, 2015b). La huella metabólica de extractos de fluidos o tejidos biológicos obtenidos mediante espectrometría de masas (MS) o resonancia magnética nuclear (RMN) contienen de cientos a miles señales relacionadas con contribuciones genéticas y ambientales.

Por otro lado, la metabolómica ambiental es un procedimiento emergente para estudiar los perfiles metabólicos de los sistemas biológicos expuestos a estrés medioambiental y poder caracterizar las interacciones de los xenobióticos con los organismos vivos (Bundy *y col.*, 2009; Lin *y col.*, 2006). Cuando se emplea de forma integrada con otras -*ómicas*, como genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica permite evaluar el impacto bioquímico de los xenobióticos y los aspectos toxicológicos que lo acompañan (Lin *y col.*, 2006), como ya se mencionó anteriormente. Los procedimientos metabolómicos pueden aplicarse a organismos de vida libre o en experiencias de exposición, para comprobar que contaminantes pueden causar un efecto crónico o conocer su modo de acción (MOA) de un tóxico a nivel metabólico como parte de la evaluación del riesgo ambiental.

## 2.3. El uso de la espectrometría de masas elemental y molecular en las tecnologías –*ómicas*

La espectrometría de masas (MS) es una poderosa técnica analítica que durante los últimos años ha experimentado un desarrollo tecnológico importante, ~~y~~ permite la identificación de compuestos sin patrones, la cuantificación de los mismos y la determinación de la estructura y propiedades químicas de moléculas provenientes de distinta naturaleza, orgánica, inorgánica o biológica. Mediante el uso de esta técnica se puede conseguir gran cantidad de información medioambiental a partir de medidas de isótopos, de ahí que su aplicación en este campo sea cada vez mayor en los últimos años. La espectrometría de masas es actualmente el detector más potente en las técnicas -*ómicas*, ya que el espectrómetro de masas es capaz de detectar bajas concentraciones de analito, niveles trazas y ultratrazas de biomoléculas, suministrando

información tanto cualitativa como cuantitativa sobre compuestos de elevado interés medioambiental. Actualmente la espectrometría de masas se utiliza para estudiar la secuencia de aminoácidos en proteínas, de ácidos nucleicos en ADN y la identificación de metabolitos (espectrometría de masas molecular), por otro lado los espectrómetros de masas son usados para análisis cualitativos y cuantitativos de elementos en base a la detección de sus diferentes isótopos (espectrometría de masas elemental).

Las características de la espectrometría de masas como técnica analítica, posibilita la determinación de la relación masa/carga (m/z) de un ion en una mezcla y en consecuencia su masa molecular (p.ej. de un péptido o una proteína). La formación de iones de la muestra en fase gaseosa es un prerrequisito esencial del espectrómetro de masas en el proceso de verificación de masas moleculares o análisis. Aunque los primeros espectrómetros de masas requerían que la muestra estuviera en forma gaseosa, los nuevos desarrollos instrumentales han permitido incluir muestras en soluciones líquidas o en una matriz sólida. Dependiendo del tipo de entrada y técnica de ionización usada, la muestra puede ya estar en forma de iones en solución, o puede ser ionizada en conjunto con su volatilización por otros métodos en la fuente de iones. Producir iones en fase gaseosa es fácil para compuestos volátiles de baja masa molecular. Sin embargo, para compuestos de baja volatilidad y alta masa molecular, como son péptidos y proteínas, la producción de iones en fase gaseosa no es fácil, siendo necesario el uso de fuentes de ionización específicas, que serán detalladas posteriormente.

El estudio de un analito como un ion en fase gaseosa tiene dos características fundamentales. La primera es que proporciona el control preciso del movimiento de los iones, el

cual es proporcional a la relación m/z del ion, lo que permite la medida de la masa del analito. La segunda característica es que el uso de iones en fase gaseosa incrementa la sensibilidad del espectrómetro de masas. El movimiento preciso de iones en campos electromagnéticos permite, además, una mayor contención y enfoque.

Esta técnica se utiliza ampliamente en bioanálisis debido a las siguientes características:

- Elevada sensibilidad
- Capacidad de identificación, desde átomos a moléculas muy complejas
- Posibilidad de análisis cualitativo y cuantitativo
- Aplicación universal y altamente específica
- Posibilidad de información isotópica
- Rapidez (espectros en décimas de segundos)

Los espectrómetros de masas tienen siete componentes comunes: sistema de introducción de muestra, fuente de iones, analizador de masas, detector, sistema de vacío, sistema de control y sistema de tratamiento de datos (Figura 9). El sistema de introducción de muestra, junto con la fuente de iones y el tipo de analizador de masas definen el tipo de espectrómetro y las capacidades del sistema.

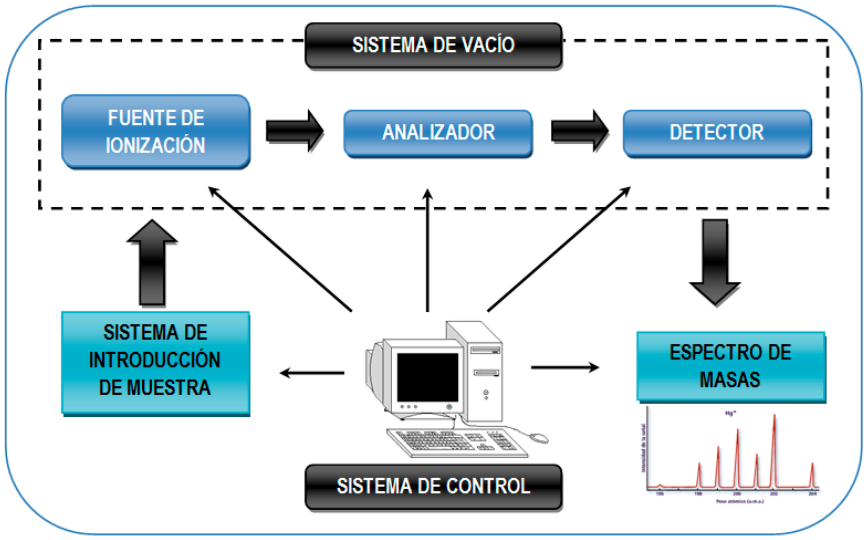



**Figura 9.** Componentes básicos de un espectrómetro de masas.

Las metodología para el análisis bioinorgánico y bioorgánico en el campo de las *-ómicas* han evolucionado de forma notoria en los últimos años gracias al desarrollo de nuevos instrumentos de espectrometría de masas y su acoplamiento a técnicas separativas de cada vez mayor resolución, lo que permite su aplicación tanto a la caracterización elemental como molecular de las especies que se incorporan y/o se forman en el medio biológico (Szpunar, 2005; Hu *y col.*, 2013). Los campos de aplicación son muy amplios, desde estudios astronómicos del sistema solar, geofísica y geoquímica, hasta análisis químicos en investigaciones de química, toxicología, ciencias ambientales, y en forma creciente en ciencias biológicas y biomédicas. Sin embargo su aplicación en estudios metalómicos y metabolómicos es relativamente reciente.

### 2.3.1. Espectrometría de masas elemental

La aparición de la técnica de espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) en 1980 supuso una revolución dentro del análisis elemental inorgánico. Su desarrollo estuvo potenciado por la necesidad de combinar la capacidad multielemental y el amplio rango lineal de la espectroscopia de emisión óptica con fuente de acoplamiento inductivo (ICP-OES), con la posibilidad de alcanzar límites de detección excepcionalmente bajos con objeto de superar la espectroscopia de absorción atómica con atomización electrotérmica (ETAAS). La figura 10 muestra una visión general de las diferentes técnicas de análisis elemental.

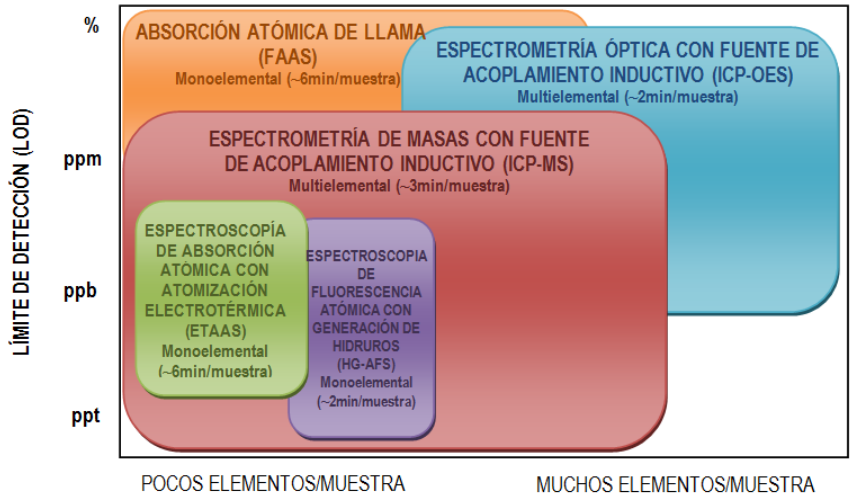



**Figura 10.** Visión general de las diferentes técnicas de análisis elemental.

El ICP-MS se ha convertido en la actualidad en una poderosa herramienta para el análisis elemental por sus excelentes características analíticas, como son: rapidez en el análisis, elevada

especificidad elemental e isotópica, capacidad de análisis multielemental (se pueden analizar el 90% de los elementos de la tabla periódica simultáneamente, aportando información cuantitativa tanto de metales o metaloides unidos a biomoléculas, como de otros no-metales de gran importancia biológica (azufre o fósforo)), su elevada sensibilidad, buena precisión (2-4%), amplios rangos de linealidad (hasta 9 órdenes de magnitud), capacidad multielemental y multiisotópica, lo cual permite la medida de relaciones isotópicas y, con ello, la aplicación de técnicas de análisis por dilución isotópica (IDA) (Sanz-Medel, 2010). No obstante, se debe prestar especial atención a las interferencias que pueden afectar a las medidas mediante el uso de ICP-MS. Estas interferencias pueden ser de matriz o espectrales y podrían considerarse como el principal inconveniente del uso de esta técnica, como se comentará posteriormente.

Generalmente, la técnica más ampliamente utilizada de ICP-MS presenta un cuadrupolo (Q) como analizador, en dicha técnica la muestra líquida, se transforma en un aerosol en un sistema de nebulización neumática. Este aerosol es transportado por un flujo de gas (argón) al interior de un plasma de este mismo gas noble, generado en una antorcha de cuarzo mediante la aplicación de radiofrecuencias. Dicho plasma alcanza temperaturas entre 8.000 y 10.000 K, que permite la desolvatación de la muestra, su vaporización, atomización e ionización, formándose principalmente iones monoatómicos y monopositivos (aunque también pueden formarse iones con dobles cargas). Seguidamente, los iones formados pasan a través de una interfase de extracción, formada por dos conos metálicos (de níquel o platino) que se encuentra a vacío moderado (~1-2 torr), hasta un sistema de lentes electrostáticas (zona de alto vacío) que enfoca el haz de iones procedentes de la interfase de extracción hacia una celda de colisión/reacción para eliminar las posibles interferencias de matriz o espectrales que conlleva el uso de esta

técnica. El haz de iones procedente de la celda es conducido al analizador cuadrupolar, que separa los iones en función de su relación m/z, hasta ser registrados por un detector (Figura 11).

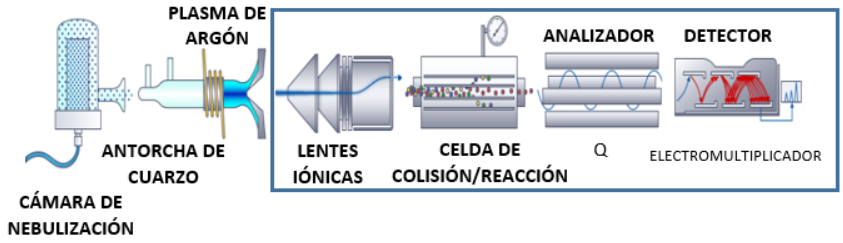



**Figura 11.** Representación esquemática de un equipo de ICP-MS.

Como ya se ha comentado previamente, se debe prestar especial atención a las interferencias en el sistema ICP-MS. Pudiendo destacarse como más importantes:

- **Interferencias de efecto matriz**, causadas principalmente por la baja tolerancia de los equipos de ICP-MS a las partículas de sólidos disueltos, que generan una deriva en la señal obtenida. Este tipo de interferencias puede minimizarse, en muchos casos, mediante la dilución de la muestra y/o la adición de uno o varios patrones internos. El empleo de estos patrones internos es común en ICP-MS, dichos patrones internos deben tener un comportamiento similar al analito, es decir, una masa y un potencial de ionización similar y ayudan a compensar los efectos causados por la matriz.

- **Interferencias espectrales**, que pueden subdividirse en cuatro tipos: solapamientos isobáricos, iones poliatómicos, iones oxidados refractarios e iones con doble carga. Un solapamiento isobárico existe cuando dos elementos tienen isótopos de igual masa. Por

ejemplo: $^{114}Sn$ con $^{114}Cd$. En general, las dos masas pueden diferir ligeramente, pero no pueden ser resultas por el analizador cuadrupolar usado normalmente en los equipos ICP-MS. Estas interferencias se pueden evitar de varias formas, como el uso de otros isótopos de nuestro analito de interés que estén libres de interferencias o el empleo de ecuaciones de corrección de interferencias. Desde un punto de vista práctico, las interferencias poliatómicas son más graves que los solapamientos isobáricos. Los iones resultan de una combinación de vida corta de dos o más especies atómicas con el Ar del plasma, como $ArO^+$, Ar, H y O que son las especies dominantes en el plasma, las cuales pueden combinarse entre sí o con elementos de la matriz, especialmente con los elementos presentes en los disolventes o ácidos usados durante la preparación de la muestra (N, S y Cl). Un gran número de iones poliatómicos pueden originarse, sobre todo a masas superiores a 82. Para agua desionizada, los picos poliatómicos principales se encuentran a m/z 56 ($ArO^+$), 42 ($ArH_2^+$) y 80 ($Ar_2^+$). Por ejemplo, la interferencia de $^{40}Ar^{40}Ar^+$ con $^{80}Se$. Estas interferencias puede evitarse mediante el uso de analizadores de mayor resolución o bien mediante el empleo de una celda de colisión/reacción capaz de destruir o minimizar el efecto de dichas interferencias. Las interferencias causadas por óxidos refractarios se presentan como resultado de la disociación incompleta de la matriz de la muestra. El origen de estos iones provoca una interferencia de M unidades de 16 MO, 32 $MO_2$ o 48 $MO_3$. Por último, en ICP-MS, la mayoría de los iones son productos de iones con carga única, aunque algunas especies tienen carga múltiple. La formación de iones con carga doble en el plasma está controlada por la segunda energía de ionización del elemento y las condiciones de equilibrio del plasma. Aquellos

elementos con una segunda energía de ionización más baja que la primera del Ar alcanzará un grado significativo de formación de carga 2+. El cuadrupolo separa las especies en función de su masa/carga, así pues un ion doblemente cargado tendrá M/2. Por ejemplo, la interferencia de $^{136}Ba^{2+}$ con $^{68}Zn^{+}$.

Con el objetivo de minimizar o eliminar estas interferencias, en los últimos años se ha conseguido un importante desarrollo en nuevos analizadores de mayor resolución que el cuadrupolo, como se muestran en la figura 12.

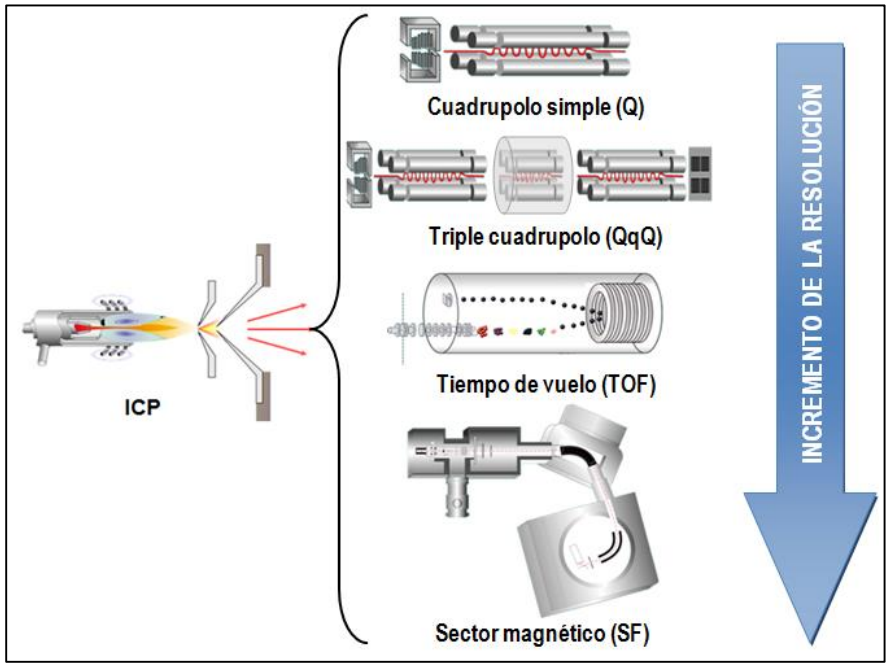



**Figura 12.** Analizadores más comunes usados en ICP-MS.

El analizador de masas de cuadrupolo es probablemente el analizador más utilizado, ya que además de poseer propiedades analíticas muy elevadas, especialmente sensibilidad, que

combina con la facilidad de su uso. Este tipo de analizador está compuesto por cuatro barras orientadas paralelamente e interconectadas entre sí en grupos de dos en dos (Figura 13). Al sistema se aplica de forma combinada voltajes de radiofrecuencia (RF) y corriente continua (DC), esta combinación instrumental permite producir campos hiperbólicos. Los iones se extraen de la fuente de iones y son acelerados (5-15 V) dentro del espacio central formado por el cuadrupolo a lo largo del eje longitudinal hacia el detector. Sólo los iones de una determinada relación m/z llegarán al detector para una proporción dada de tensiones siguiendo una trayectoria estable, mientras que aquellos iones que no se aproximen a esa relación m/z tendrán trayectorias inestables y chocarán con las varillas (Figura 13). Este analizador ofrece alta reproducibilidad, pero tiene una resolución limitada (que sólo alcanza relaciones m/z nominales). Es muy utilizado en el modo SIM (*Selected Ion Monitoring*) en el que solo filtra los iones los iones de unas relaciones m/z concretas. De esta forma se obtienen espectros de masas muy simples (con muy pocos iones) pero son muy sensibles, siendo muy utilizados para llevar a cabo análisis cuantitativos.

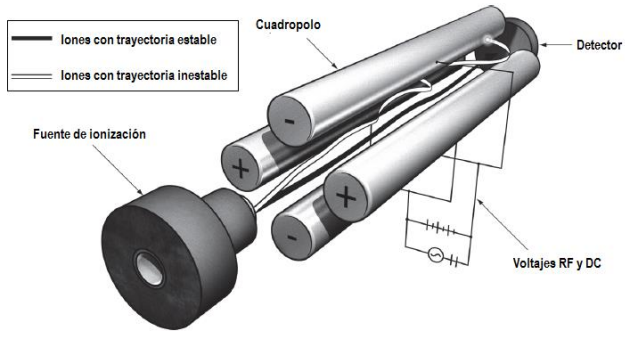



**Figura 13.** Analizador de cuadrupolo (Q).

Los equipos de ICP-MS que contienen como analizador un cuadrupolo, suelen incorporar en la parte frontal del cuadrupolo una celda de colisión/reacción como ya se mencionó anteriormente. El objetivo fundamental de esta celda es reducir o eliminar en gran medida las interferencias espectrales o de efecto matriz que provienen del plasma de Ar usando dos tipos de estrategias:

- **Proceso de reacción**- gas reactivo ($H_2$, $CH_4$, $NH_3$, $He/H_2$, $O_2$) en la celda.

  – El mecanismo principal de eliminación del interferente es una reacción.

  – El ion poliatómico interferente es más reactivo que el analito con el gas reactivo elegido, permitiendo la eliminación preferente del interferente.

  – En algunas ocasiones menos frecuentes el analito es más reactivo y se transforma en una nueva especie con relación m/z diferente.

- **Proceso de colisión**- gas inerte (He) en la celda.

  – La eliminación del interferente se produce mediante dos mecanismos no reactivos, Disociación inducida por colisiones (CID) y Discriminación de energías cinéticas (KED)- sin conversión de especies. Pudiendo aplicarse a numerosos interferentes poliatómicos sin crear nuevos interferentes.

Sin embargo, el sistema de triple cuadrupolo (QqQ) ha transformado recientemente el panorama de los sistemas ICP-MS. Mediante el análisis MS/MS, el sistema ICP-QqQ-MS libera todo el potencial de la celda de reacción para eliminar las interferencias espectrales, por lo que ofrece un nivel superior de exactitud y resultados más coherentes, en particular en matrices de muestras complejas. El ICP-QqQ incorpora un cuadrupolo adicional al analizador de masas ($Q_1$) en la parte frontal de la celda de colisión/reacción y un analizador cuadrupolo ($Q_2$). Esta

configuración se denomina MS/MS o tándem MS. El $Q_1$ funciona como filtro de masa y permite que entren en la celda únicamente los elementos con la masa del analito de interés, descartando a todos aquellos con distinta masa. Al eliminar de la celda a todos los iones de plasma y matriz de la muestra no objetivos, mejora la sensibilidad y la eficacia en la eliminación de interferencias en el modo de colisión (usando gas de celda He) en comparación con el sistema ICP-QMS convencional. La mayor ventaja de MS/MS es, sin embargo, la mejora insuperable de rendimiento en el modo de reacción.

Para el análisis de ultratrazas, el modo de reacción puede proporcionar una mejor eliminación de interferencias que el modo de colisión. Sin embargo, los gases de reacción también reaccionan con la matriz de muestra y otros analitos, originando así nuevas interferencias. Las celdas de reacción usadas en el ICP-QMS pueden eliminar algunos iones no objetivo, no obstante, estos dispositivos no pueden eliminar todos los iones que se solapan, y por ello el modo de reacción sólo resultaría eficaz con matrices sencillas y conocidas. Por el contrario, MS/MS permite la utilización de la potencia del modo de reacción en todo tipo de muestras puesto que $Q_1$ sólo permite la entrada en la celda de masas del analito objetivo. Todos los demás iones derivados de la matriz u originados en el plasma son rechazados y los iones producto formados en celda permanecen constantes con matrices de muestras muy diferentes, lo que permite un análisis preciso independientemente del tipo de muestra, tal y como se muestra en la figura 14. Para la medida de Se usando ICP-QMS convencional y $O_2$ como gas de reacción, el Se reacciona y se aleja de las interferencias ($Ar^{2+}$, $Gd^{2+}$ y $Dy^{2+}$) a m/z 80. $^{80}Se^{+}$ se transforma en la celda en $^{80}Se^{16}O^{+}$ y se mide a m/z 96. Sin embargo, a m/z 96 se solapa con Zr, Mo y Ru, lo que se obtienen son datos incorrectos de Se. Sin embargo, cuando usamos ICP-QqQ-MS, el $Q_1$ sólo permite el

paso de iones a la celda a m/z 80, los iones restantes son rechazados. $^{80}Se^{+}$ se transforma en $^{80}Se^{16}O^{+}$ en la celda con $O_2$ y posteriormente $Q_2$ mide $SeO^{+}$ a m/z 96. Zr, Mo y Ru no pueden interferir en este caso porque son eliminados en $Q_1$.

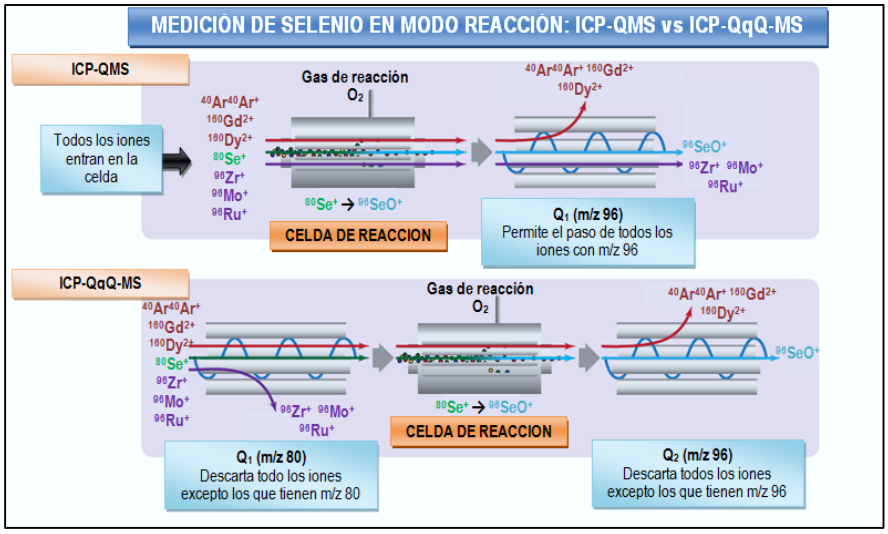



**Figura 14.** Representación esquemática de la medida de $^{80}Se$ en modo reacción mediante ICP-QMS y ICP-QqQ-MS.

Por otro lado, el principio de operación del analizador de tiempo de vuelo (TOF) se basa en la medida del tiempo requerido por un ion para viajar desde la fuente de iones hasta el detector localizado a 1-2 m de la fuente. Todos los iones reciben la misma energía cinética durante la aceleración instantánea (3000 eV), pero debido a que tienen diferentes valores de m/z, se separan en grupos de acuerdo a su velocidad hasta el detector. Los iones chocan secuencialmente en el detector en forma de un incremento de m/z. Los iones de baja m/z llegan al detector antes que aquellos con m/z alta debido a que aquellos con una relación m/z mayor tendrán una velocidad menor (Figura 15). Los iones que parten de la fuente de iones en un espectrómetro de masas TOF no tienen los mismos tiempos de partida ni exactamente la misma energía cinética, por lo

que se incorpora un reflectrón a estos equipos para compensar estas diferencias. Un reflectrón es un componente de óptica electrónica con el que los iones del TOF se reflejan invirtiendo su vuelo. Un campo de reflección linear permite a los iones con mayores energías cinéticas penetrar más profundamente dentro del reflectron en comparación con iones de energías cinéticas menores. Los iones que profundicen más en el reflectron tardarán más en llegar al detector. Si un paquete de iones de una m/z dada contiene iones con diferentes energías cinéticas, el reflectrón disminuirá la dispersión de los tiempos de vuelo de los iones, mejorando la resolución.

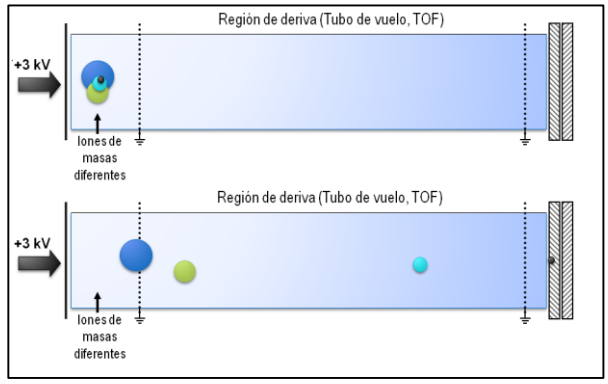



**Figura 15.** Analizador de tiempo de vuelo (TOF).

Y por último cabe destacar, por su mayor resolución, el analizador de sector magnético (SF), estos analizadores utilizan un imán permanente o un electroimán para hacer que el haz de iones de la fuente se mueva en una trayectoria circular de 180, 90 o 60 grados. La Figura 16 muestra un instrumento de sector de 90 grados en el que los iones son acelerados a través de la rendija A hacia el tubo analizador metálico, que se mantiene a una presión interna de alrededor de $10^{-7}$ torr. Se puede llevar a cabo un barrido de los iones de diferente masa a través de la rendija de salida variando la fuerza del campo del imán, barridos magnéticos, o el potencial de

aceleración entre las rendijas A y B, barridos eléctricos. Los iones que pasan a través de la rendija de salida se recogen en un electrodo colector y dan lugar a una corriente de iones que es amplificada y registrada.

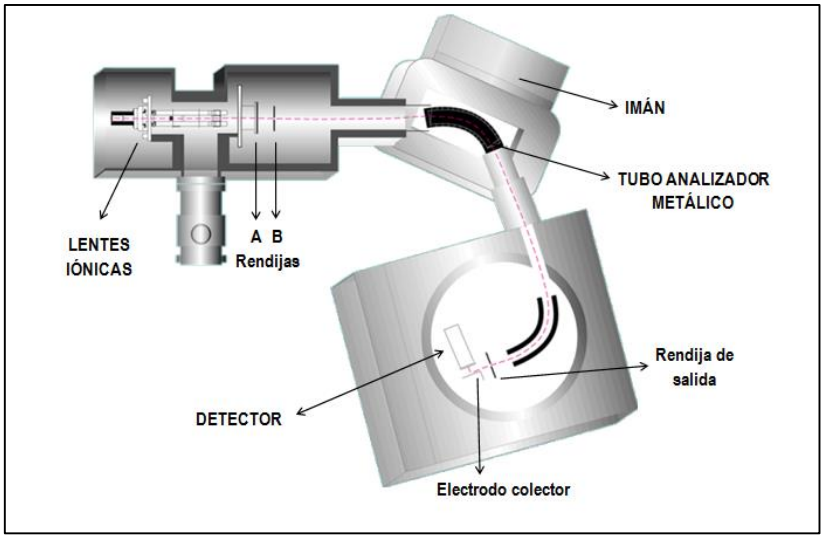



**Figura 16.** Analizador de sector magnético (SF).

Entre los detectores utilizados en espectrometría de masas elemental cabe destacar el detector electromultiplicador (EM). En la Figura 17 se muestra el esquema de un multiplicador electrónico. Un ion positivo procedente del analizador y registrado en el dinodo de conversión provoca la emisión de varias partículas secundarias, las cuales a su vez pueden dar lugar a iones positivos así como a partículas neutras. Cuando iones positivos impactan en el dinodo de conversión de alto voltaje negativo, las partículas secundarias de interés serán iones negativos y electrones. Esas partículas secundarias son aceleradas en el dinodo continuo e impactan al cátodo con energía suficiente para desalojar electrones en la medida en que chocan con las paredes internas curvilíneas.

Los electrones pasan posteriormente a un multiplicador electrónico e impactan nuevamente las paredes causando la emisión de más y más electrones en la medida en que se desplazan hacia el potencial situado al final de las paredes. De esa forma se crea una cascada de electrones que finalmente origina una corriente medible al final del multiplicador electrónico. La potencia de amplificación es el producto del factor de conversión (número de partículas secundarias emitidas por el dinodo de conversión) y el factor de multiplicación del multiplicador electrónico de dinodos en serie. Este valor puede resultar del orden de $10^7$, lo que los hace altamente sensibles aunque su tiempo de vida sea limitado.

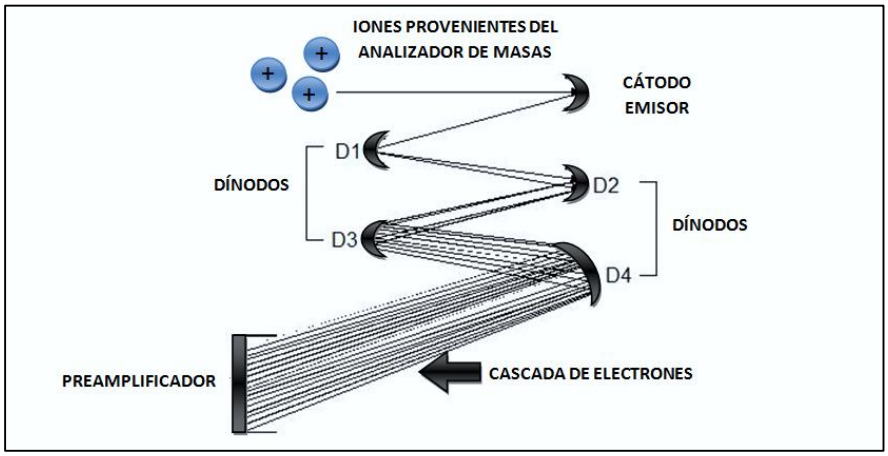



**Figura 17.** Detector electromultiplicador (EM).

Otro de los inconvenientes que presenta el sistema ICP-MS está en su incapacidad para caracterizar las estructuras orgánicas de las metalobiomoléculas, ya que en el plasma dichas moléculas se destruyen. Por lo que es imprescindible el uso de la espectrometría de masas molecular, combinada con diferentes técnicas de ionización suaves tales como la ionización por

electrospray (ESI) o la desorción/ionización láser asistida por la matriz (MALDI), entre otras (Ruiz-Encinar *y col.*, 2003).

### 2.3.2. La espectrometría de masas molecular

A pesar de las numerosas ventajas del ICP-MS como detector elemental, que han sido resaltadas en el apartado anterior, este sistema instrumental destruye cualquier información sobre la estructura orgánica de las biomoléculas, por ello para llevar a cabo estudios proteómicos, metalómicos y metabolómicos, se requiere el uso combinado de sistemas de detección complementarios, como la espectrometría de masas molecular, que permite obtener información sobre la estructura y composición química de biomoléculas, como proteínas, metaloproteínas y metabolitos (Bettmer, 2005; Sanz-Medel *y col.*, 2003; García-Sevillano *y col.*, 2012a; 2014b).

La ionización en espectrometría de masas molecular se realiza con una amplia variedad de métodos, aunque ninguno de ellos es universal. La ionización de un analito es una etapa crucial en el análisis de cualquier compuesto orgánico por MS y lo corrobora el hecho de que los trabajos relacionados con las dos metodologías más frecuentes para la obtención de iones en muestras complejas (MALDI y ESI) hayan sido merecedores de dos premios Nobel. El desarrollo de ESI dio lugar a que John Fenn obtuviera el premio Nobel en Química en 2002 compartido con Koichi Tanaka por el desarrollo del sistema de desorción MALDI.

La elección del tipo de ionización viene determinada por la naturaleza de la muestra, la masa molecular de los analitos de interés y la clase de información que se desea obtener, como se comentará a continuación. El aspecto de los espectros de masas obtenidos para diferentes

especies moleculares depende en gran medida del sistema de ionización utilizado (Cañas *y col.*, 2006). El fundamento de los sistemas de ionización o fuentes de ionización difiere según se trate de **ionización en fase gaseosa**, en la que se volatiliza la muestra para su posterior ionización, e **ionización por desorción**, en la que la muestras se transforma directamente en iones gaseosos. La primera fuente está indicada para compuestos térmicamente estables, con pesos moleculares menores de $10^3$ Da. La segunda es aplicable a muestras no volátiles y térmicamente inestables. En este caso pueden estudiarse moléculas con pesos moleculares mayores de $10^5$ Da.

En el análisis de proteínas, metaloproteínas y metabolitos caben destacar las siguientes fuentes de ionización:

- **Impacto electrónico (EI)**

Se trata de una técnica de ionización en fase gas, que es sin duda la más utilizada para la ionización de los analitos tras su separación por cromatografía de gases. La fuente de EI consta de una cámara con filamentos de W (wolframio) que emiten electrones. Los analitos son bombardeados por un flujo de electrones de alta energía que provoca su ionización y fragmentación (Figura 18). El grado de fragmentación viene dado por la naturaleza del analito, la energía aplicada al haz de electrones y la temperatura de la fuente. Para una determinada energía, temperatura de la fuente y analitos, los patrones de fragmentación se mantienen constantes independientemente del instrumento utilizado, de forma que es posible identificar cada compuesto por comparación con bibliotecas de espectros, en la que se pueden consultar los patrones de fragmentación de numerosas sustancias. Además de permitir obtener información estructural, esta fuente permite llevar a cabo la cuantificación de los analitos de interés, mediante

la monitorización del ion molecular o cualquier otro fragmento que ofrezca una sensibilidad adecuada para tal fin. Estas ventajas hacen que la fuente EI haya sido ampliamente utilizada para la identificación y cuantificación de metabolitos en fluidos y tejidos biológicos en numerosos estudios metabolómicos (Turner *y col.*, 2011).

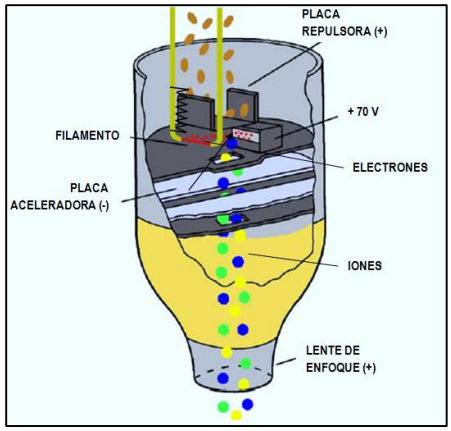



**Figura 18.** Esquema simplificado de una fuente de ionización electrónica (EI).

- **Electrospray o electronebulización (ESI)**

En la ionización por electrospray (ESI), la muestra disuelta en un disolvente adecuado pasa a través de un capilar metálico, en cuya punta se aplica un potencial de 3 a 4 kV y una presión de 1 atmósfera. Se produce un aerosol de finas gotas (<10 µm de diámetro) de elevada carga. La evaporación del disolvente hace que aumente la densidad de carga, produciéndose la desorción en fase gaseosa (Figura 19A). Estas microgotas se evaporan muy rápidamente hasta que el número de cargas en su superficie aumenta para provocar la explosión de las gotas por repulsión culombiana, produciéndose la pérdida progresiva del disolvente hasta que se forma el ion desnudo de la molécula que penetra en el espectrómetro (Figura 19B). No obstante, para

favorecer la desolvatación, los analitos ionizados son posteriormente desolvatados en la interfase del espectrómetro de masas, haciéndolos pasar a través de un capilar calentado o mediante el uso de una corriente de nitrógeno de alta temperatura, según el tipo de la fuente ESI (Whitehouse *y col.*, 1985), aunque por lo general, la nebulización se facilita mediante la introducción de un flujo de nitrógeno, que permite la introducción de flujos mayores de líquido (Bruñís *y col.*, 1987).

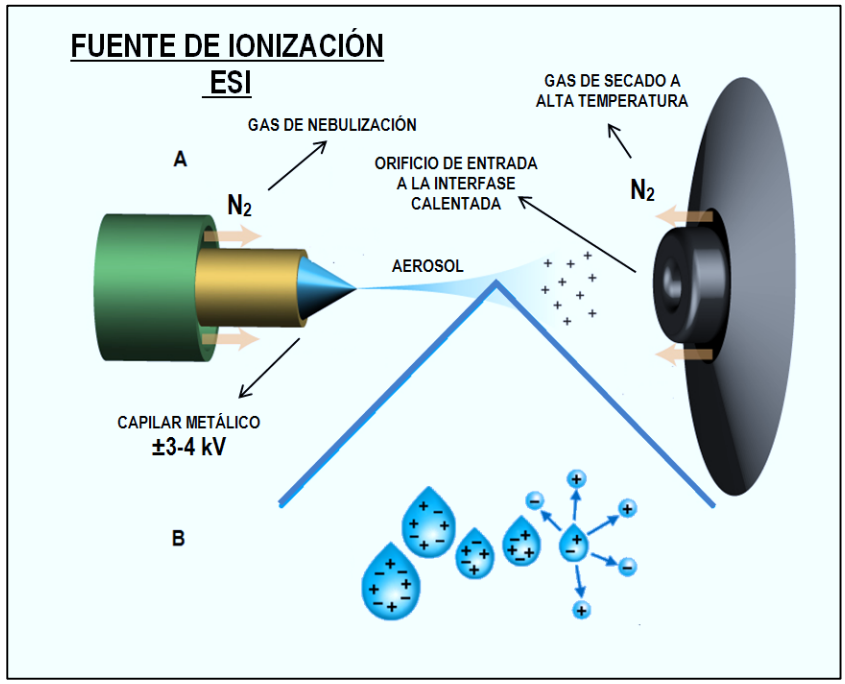



**Figura 19.** Esquema simplificado de una fuente de ionización electrospray (ESI).

El análisis por ESI puede realizarse mediante ionización positiva o negativa. Se selecciona la polaridad de los iones que se desea analizar mediante el voltaje del capilar. Permite la obtención del ion molecular, y si se desea provocar una fragmentación, se aumenta el voltaje del capilar. Mediante el uso de esta fuente de ionización suave se puede preservar los complejos

metal-proteínas, de esta manera el acoplamiento ESI con MS permite identificar isoformas de proteínas y estequiometria de complejos metálicos (Kaltashov *y col.*, 2006).

En ESI se suelen emplear disoluciones hidroorgánicas (MeCN-$H_2O$ y MeOH-$H_2O$) de tensión superficial y fuerza iónica moderadas, conteniendo tampones o aditivos preferentemente volátiles que aseguren la ionización de los analitos en modo positivo (ácido trifluoroacético (TFA), ácido fórmico, ácido acético, entre otros) o negativo (trietilamina, hidrogenocarbonato amónico, y otros) (Niessen, 1999). A medida que disminuye la volatilidad de la fase móvil disminuye la señal y la relación señal/ruido obtenida y, si además la disolución tiene una elevada fuerza iónica, se puede producir la obstrucción del orificio de entrada o la contaminación del espectrómetro de masas.

Otra de las ventajas de la ESI es que los iones, en función de su masa molecular y estructura, pueden adquirir múltiples cargas. Este proceso tiene una gran importancia en estudios de macromoléculas (como es el caso de proteínas y metaloproteínas), ya que estas pueden ser sucesivamente protonadas y por lo tanto variar sustancialmente su relación m/z hasta que se adapten al rango de mayor exactitud del analizador utilizado. Los espectros de múltiples picos de las proteínas son muy útiles para la determinación de la masa molecular en un instrumento de baja resolución. Los péptidos trípticos por lo general se convierten en doblemente o triplemente cargados, generando patrones de información útiles para búsquedas en bases de datos, siendo susceptibles para la secuenciación *de novo* (en el caso de especies que no se encuentren secuenciadas). En muchos casos, se pueden determinar masas moleculares de macromoléculas con una precisión de ± 0,005% (Cañas *y col.*, 2006).

Existen en la actualidad otras alternativas para los procesos de ionización a presión atmosférica (API), entre las que cabe destacar la fotoionización a presión atmosférica (APPI) y la ionización química a presión atmosférica (APCI). En el caso de la APCI (Figura 20A), la principal diferencia con la ESI es la presencia de un gas que ayuda a la ionización (la cual se produce en estado gaseoso). Por otro lado, la fuente APPI (Figura 20B) emplea una fuente de radiación ultravioleta que produce la ionización de los analitos. Además, normalmente se añade un reactivo dopante, que es el encargado de absorber la energía fotónica para luego transferirla a los analitos que se ionizan.

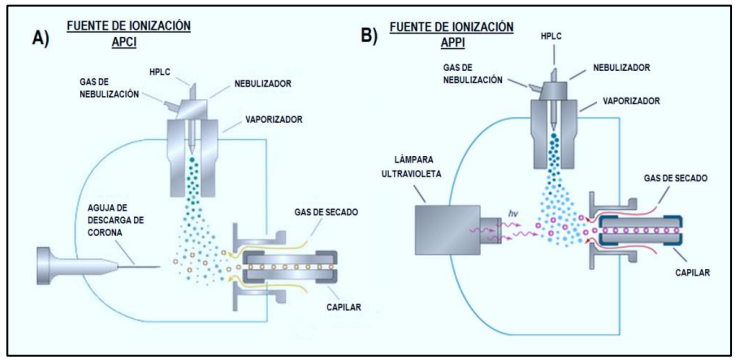



**Figura 20.** Esquema simplificado de la fuente de ionización química a presión atmosférica (APCI) (A) y fotoionización química a presión atmosférica (APPI) (B).

Una de las características a destacar entre las distintas técnicas de API en espectrometría de masas molecular es su complementariedad ya que, mientras que la ESI se aplica principalmente a compuestos de elevada polaridad, para la ionización de compuestos poco polares los mejores resultados se obtienen con la fuente APCI y la APPI (Figura 21). Sin embargo, la fuente ESI abarca un mayor rango de masas y metabolitos en función de su polaridad, por lo que será usada como fuente de ionización en esta Tesis doctoral en los estudios metabolómicos con el objetivo de obtener la mayor información metabólica posible. Además, es importante tener

en cuenta que la mayoría de los metabolitos presentes en fluidos y tejidos biológicos son polares al ser transportados a los diversos órganos por el torrente sanguíneo.

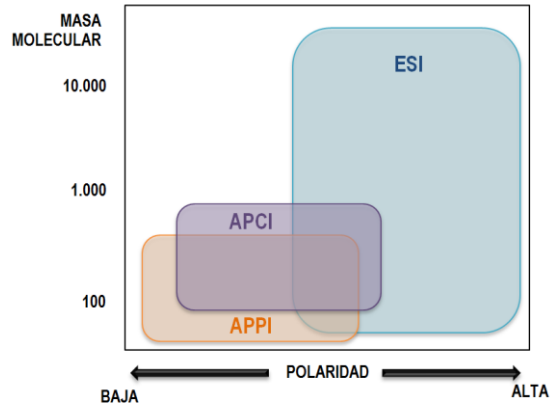



**Figura 21.** Aplicabilidad (en función del peso y polaridad de los analitos) de las distintas fuentes API.

- **Nano-electrospray (nESI)**

Con el empleo de la fuente nano-electrospray (nESI), desarrollada por Wilm y Mann en 1995 (Wilm *y col.,* 1996a), se consigue una dramática mejora de la sensibilidad y una mayor eficiencia en la ionización en el número de iones sometidos al análisis de masas en comparación con la fuente ESI convencional. Además, el voltaje aplicado para que se produzca la ionización de la muestra es mucho más bajo, entre 500 y 1000 V y no es necesario un sistema de bombeo externo para mantener un flujo constante.

El diámetro del capilar de nebulización, normalmente de vidrio recubiertos por una capa de grafito, puede ser reducido varias micras, incluso a <1µm y flujos que pueden llegar a ser tan pequeño como 10 nl/min (Figura 22) (Wilm *y col.,* 1996a-b). Esto hace que sea el sistema más

sensible para llevar a cabo el análisis de proteínas y metaloproteínas en muestras biológicas ya que permite llevar a cabo análisis de muestras de las que se dispone de poco volumen o en las cuales los analitos se encuentran en una concentración muy baja.

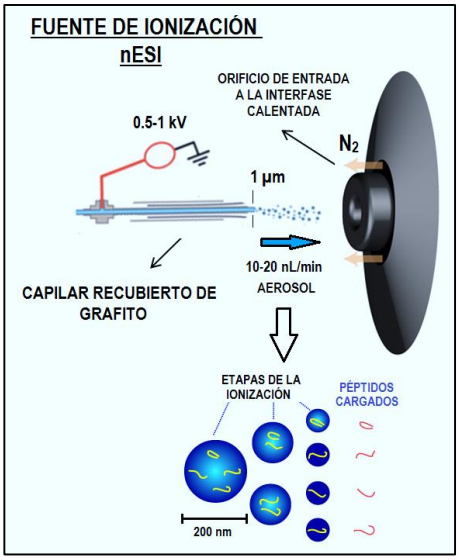



**Figura 22.** Esquema simplificado de una fuente de ionización nano electrospray (nESI).

En su forma estática el nanospray permite infusionar 1-2 µl de la muestra pueden durar horas, facilitando la adquisición de docenas de espectros durante varios minutos (Whitehouse *y col.*, 1985). Dinámicamente, el acoplamiento de estas fuentes nESI a un nano-HPLC y el uso de columnas de <100 µm de diámetro permite la secuenciación de proteínas mediante la separación cromatográfica o electroforéticas de los péptidos de dichas proteínas tras la digestión enzimática de éstas (Davis *y col.*, 1995).

En nESI se generan gotas de tamaño inferior a 200 nm, entre 100 y 1000 veces más pequeñas que las producidas en una fuente ESI normal. Además, el pequeño tamaño del spray

formado en n-ESI permite la introducción de una fracción mayor de los iones hacia el interior del espectrómetro de masas. Otra de las ventajas más destacada es la mayor tolerancia a la composición y el pH de las matrices analizadas y la posibilidad de nebulizar soluciones que contengan hasta 0.1M de sales. Además, la fuente n-ESI presenta algunas ventajas respecto a otras fuentes de ionización como la ausencia de contaminación cruzada, escasas posibilidades de pérdida de muestra, y la capacidad de escoger y cambiar el disolvente a voluntad, aún durante el análisis (Herbert *y col.*, 2000).

- **Ionización/desorción asistida por matriz (MALDI)**

La fuente MALDI, junto con la fuente ESI o nESI, es otra de las técnicas de ionización suave más utilizadas para llevar a cabo la identificación de proteínas/metaloproteínas. Este proceso de ionización se basa en la utilización de una matriz capaz de absorber radiación ultravioleta (UV). La matriz y la muestra (por ejemplo, una mezcla de péptidos) se mezclan en un disolvente apropiado con un exceso molar de unas 10.000 veces la matriz, inductora de la ionización, y se deposita sobre una placa de muestreo que normalmente permite la medida de decenas a cientos de muestras. Antes de llevar a cabo la ionización, se deja que el disolvente se evapore y se obtienen cocristalizados de moléculas de analito incrustados en cristales de la matriz (Hillenkamp *y col.*, 1991). Esta preparación es sometida a pulsos cortos de radiación láser en una celda de vacío lo que provoca que la absorción de energía por parte de la matriz se convierta en energía de excitación y en transferencia de $H^+$ a la muestra (ionización) dando lugar, normalmente, a especies monocargadas. El área irradiada, de unas pocas micras, se calienta

dando lugar a la desorción de los iones de fase sólida a fase gaseosa (Figura 23) (Hillenkamp *y col.*, 1991).

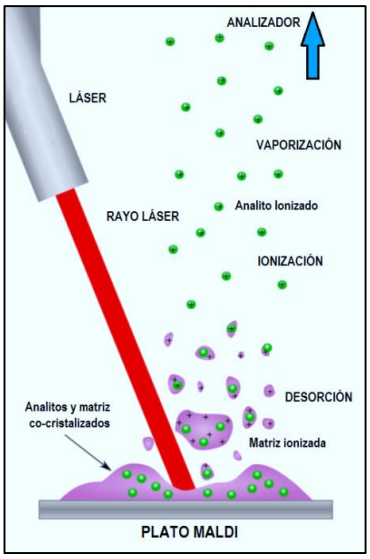



**Figura 23.** Esquema simplificado de una fuente de ionización/desorción asistida por matriz (MALDI).

Por lo tanto, la matriz utilizada en el sistema MALDI, juega un papel muy importante en el proceso de ionización de la muestra y tiene dos misiones, la primera es absorber el fotón de energía procedente del haz láser, la segunda actuar como un disolvente del analito reduciendo las fuerzas intermoleculares y disminuyendo la agregación de moléculas de analito al mínimo. Los iones generados mediante MALDI son mayoritariamente moléculas protonadas con una sola carga, también es posible que se formen iones oligoméricos protonados con doble carga. Además, se forman aductos de las moléculas de la muestra con $Na^+$ y $K^+$, especialmente en muestras de origen biológico. También se pueden formar iones con carga negativa.

El proceso MALDI es competitivo ya que la ionización de un analito puede inhibirse drásticamente por la presencia de otros (Hillenkamp *y col.*, 1991). Así, en mezclas de péptidos

trípticos, los péptidos que contienen arginina se ionizan preferentemente debido a la fuerte basicidad en fase gaseosa de este aminoácido (Krause *y col.*, 1999). Por el contrario, los fosfopéptidos, debido a las propiedades ácidas del grupo fosfato, se ionizan pobremente con MALDI (Annan *y col.*, 1996). Los ácidos sinapínico y α-ciano-4-hidroxicinámico son, respectivamente, las matrices más utilizadas para el análisis de péptidos y proteínas, aunque el ácido 2,5-dihidroxibenzoico se utiliza con frecuencia para llevar a cabo mapeo peptídico (Billeci *y col.*, 1993). Para mejorar la ionización de los fosfopéptidos se recomienda el uso de determinados aditivos (Asara *y col.*, 1999), o para mejorar el proceso de MALDI en general (Gusev *y col.*, 1996). Varios detergentes neutros, como el octil-beta-glucósido (Van Montfort *y col.*, 2002; Gharahdaghi *y col.*, 1996), son altamente compatibles con la ionización de péptidos y pueden mejorarla, mientras que los detergentes cargados como SDS (Yu *y col.*, 2003) tienen un efecto perjudicial. En cualquier caso, MALDI tiene la ventaja sobre ESI de la mayor tolerancia hacia los contaminantes de la muestra como tampones y sales, cuando estos están presentes en bajas concentraciones. Los espectros en la presencia de agentes caotrópicos, como la urea, se puede usar incluso a concentraciones 2M. Aunque los láseres UV de nitrógeno son los más utilizados, los láseres infrarrojos han demostrado su utilidad para la desorción e ionización de los péptidos de membranas después de Blot (Eckerskorn *y col.*, 1997).

Esta fuente de ionización suele asociarse a un analizador de tiempo de vuelo (TOF) o a un analizador TOF/TOF que proporciona un mejor enfoque de los iones y, por tanto, mayor resolución y precisión. En el primer TOF los iones son acelerados a bajo voltaje, favoreciendo una fragmentación metaestable. Posteriormente se selecciona un determinado ion y sus fragmentos, que son acelerados a un potencial mayor y separados en el segundo TOF.

Además, es importante destacar la reciente introducción de esta técnica en los estudios metabolómicos. Hasta ahora, MALDI-TOF-MS había sido considerada como una técnica conveniente para estudiar proteínas/metaloproteínas (Aebersold *y col.*, 2003), oligosacáridos (Harvey, 1999) y macromoléculas sintéticas (Montaudo *y col.*, 2006). Sin embargo, el análisis de moléculas pequeñas (<500 Da) no podía realizarse con las matrices tradicionales como el ácido α-ciano-4-hydroxycinnmaic ácido y el ácido 2,5-dihidroxi-benzóico (DHB), debido a la fuerte ruido de fondo relacionados con la matriz generada en la región de masas bajas, interfiriendo por lo tanto con el análisis de los metabolitos. Sin embargo, se han desarrollado numerosos métodos para evitar este problema, como la desorción/ionización en sílice porosa (Wei *y col.*, 1999) y con materiales de sílice (Finkel *y col.*, 2005; Go *y col.*, 2005), sustancias de aluminio porosas (Nayak *y col.*, 2007) y nanopartículas de óxido de zinc (Watanabe *y col.*, 2008). Por otro lado, el grafeno se ha utilizado como matriz para compuestos de baja masa molecular, incluyendo compuestos polares y compuestos no polares en modo de ionización positivo (Dong *y col.*, 2010). En modo de ionización negativo, se han utilizado los copos de grafeno como matriz y desprotonan especies monoméricas con reducción significativa de las interferencias provocas por el efecto matriz para el análisis de péptidos, aminoácidos, ácidos grasos, nucleósidos y nucleótidos (Lu *y col.*, 2011).

Además de las diferentes fuentes de ionización utilizadas con más frecuencia en espectrometría de masas molecular, los espectrómetros de masas pueden tener uno o más analizadores, dependiendo de la finalidad para la que son utilizados. En este caso, los instrumentos formados por dos o más analizadores de masas acoplados entre sí son conocidos como espectrómetros de masas en tándem obteniéndose con ellos una serie de ventajas que se

comentan a continuación. En la figura 24 pueden observarse los analizadores más comunes en espectrometría de masas.

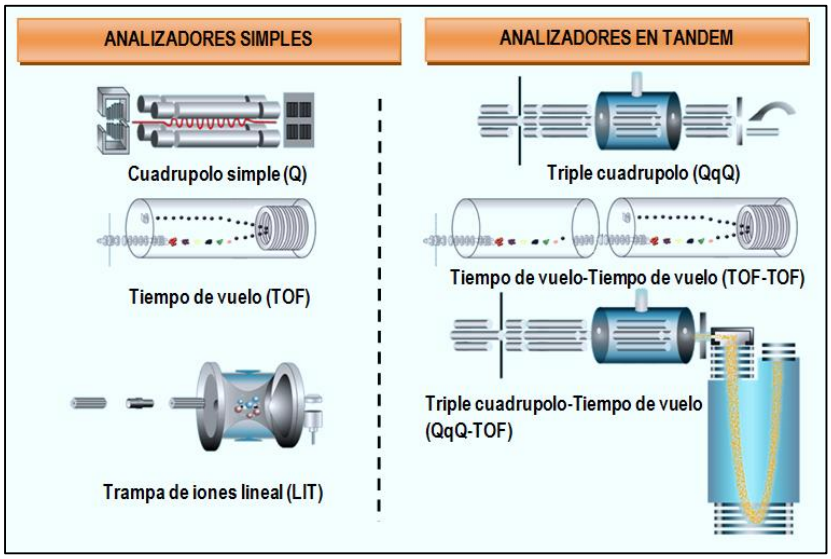



**Figura 24.** Analizadores más comunes usados en espectrometría de masas molecular.

Entre los analizadores simples, el cuadrupolo y el tiempo de vuelo son los más utilizados, como se ha comentado previamente, ya que también se emplean en espectrometría de masas elemental. Por otro lado, el analizador de trampa de iones (IT) emplea principios similares al analizador cuadrupolo que se mencionó anteriormente, utilizando un campo eléctrico para la separación de los iones en función de sus relaciones m/z. El analizador de trampa de iones (Figura 25) está formado por tres electrodos de superficie hiperbólica: un electrodo que constituye un anillo central (electrodo anular) y dos electrodos colectores. La separación de los iones se produce almacenándolos el espacio central y manipulando su movimiento en el tiempo, en lugar de hacerlo en el espacio. El campo se crea aplicando un sistema de radiofrecuencias al anillo central. Los iones del analito procedentes de la fuente de ionización penetran a través de una rejilla en el

electrodo colector y según su m/z y el campo aplicado, circulan en una órbita estable o se desestabilizan pasando al detector.

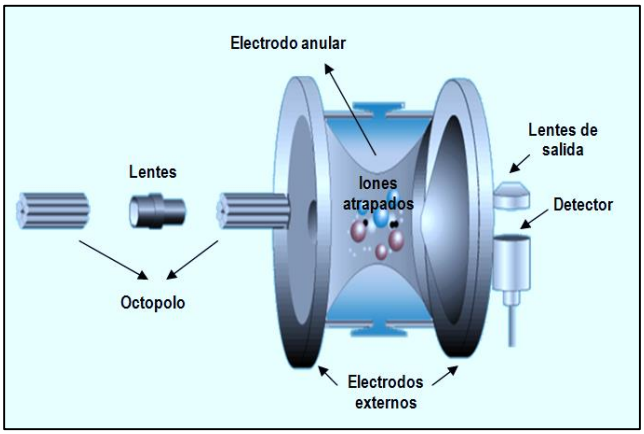



**Figura 25.** Analizador de trampa de iones (IT).

Este tipo de analizador tiene la particularidad de que los iones permanecen atrapados en él durante el tiempo necesario para realizar las operaciones habituales en MS, es decir, análisis por barrido completo (*full scan*), selección del ion precursor, fragmentación y análisis de iones producto. Además, el proceso de selección de iones, la fragmentación y su análisis se puede repetir varias veces en un proceso $MS^n$. En los instrumentos de captura, los electrodos de los analizadores y los voltajes de RF están diseñados para inducir trayectorias estables y cercanas a los iones, que pueden permanecer atrapados desde fracciones de segundo a horas (Guan *y col.*, 1995).

La resolución es inversamente proporcional a la velocidad de exploración. Generalmente, las exploraciones completas de iones se llevan a cabo a baja resolución y alta velocidad de exploración, lo que permite la compatibilidad con separaciones por cromatografía de

gases (GC), pero al mismo tiempo mantener un régimen de alto rendimiento para el análisis de masas. Sin embargo, una resolución media, necesaria para la asignación de carga de los iones, precisa de velocidades de escaneo menores cuando se considera sólo un corto rango de relaciones m/z (por ejemplo, 10 Da) (Canas *y col.*,2006).

Los analizadores de IT se caracterizan por tener una elevada sensibilidad y obtener una rápida adquisición de datos, sin embargo, los analizadores IT tienen una resolución limitada y una capacidad relativamente baja de atrapar iones, lo que ha conducido al desarrollo del analizador de trampa de iones lineal (LIT) con elevada capacidad de atrapamiento de iones que ha mejorado el rango dinámico y la sensibilidad de esa técnica. El LIT ha desplazado al cuadrupolo clásico. Actualmente los instrumentos LIT, disponen de elementos que les permiten mejorar la resolución.

Los esquemas de los espectrómetros de masas en tándem más utilizados en espectrometría de masas molecular se muestran en la Figura 24. En primer lugar, la disposición de tres cuadrupolos en tándem presenta una serie de posibilidades muy interesantes y esto hace que haya sido ampliamente utilizado (Hunt *y col.*, 1982). El QqQ acoplado a una fuente ESI fue el instrumento más utilizado durante la década de 1990 para llevar a cabo la fragmentación de péptidos. También fueron muy usados con la fuente nESI para identificar proteínas por fragmentación de péptidos, incluyendo la secuenciación *de novo* (Wilm *y col.*, 1996b). El QqQ en el caso de la espectrometría de masas molecular sigue una estrategia diferente a la comentada previamente en el apartado de espectrometría de masas elemental, a pesar de tener una configuración instrumental muy similar. La metodología utilizada en este caso consiste en el aislamiento de masa inicial de un ion con una determinada relación m/z, configurando

adecuadamente las tensiones en el primer cuadrupolo, seguido por su fragmentación en el segundo cuadrupolo, y el escaneo de las masas de los fragmentos en el tercer cuadrupolo. El segundo cuadrupolo emplea una RF y un gas de colisión (normalmente argón o nitrógeno) a una presión de alrededor de $10^{-5}$ torr. Los iones que salen del primer cuadrupolo colisionan con las moléculas de gas y se disocian en fragmentos de este ion precursor. Estos fragmentos se separan en el tercer cuadrupolo (barrido de iones hijos).

Por otro lado, en los espectrómetros de masas en tándem TOF/TOF se utilizan dos analizadores de masas de tiempo de vuelo en serie. El uso de estos analizadores en serie proporciona un mejor enfoque de los iones y, por tanto, mayor resolución y precisión másica. En el primer TOF los iones son acelerados a bajo voltaje, favoreciendo la fragmentación metaestable. Posteriormente se selecciona un determinado ion y sus iones fragmento, que son acelerados a un potencial mayor y separados en el segundo TOF. Este analizador es ampliamente utilizado en la caracterización de proteínas cuando se utiliza la fuente de ionización MALDI. Para adquirir un espectro completo de iones presentes en la muestra, el primer analizador TOF actúa como filtro de masas y el segundo como analizador. Cuando se opera en un modo tándem (MS/MS), la energía del láser se aumenta considerablemente por encima del umbral MALDI. El primer TOF aísla los iones precursores y el segundo TOF-MS (que incluye el acelerador, tubo de vuelo, reflectrón de iones, y el detector de iones) analiza de los fragmentos de estos iones precursores.

Por último, la combinación de distintos analizadores, sistema híbrido, ofrece una serie de ventajas respecto a los analizadores simples. Este es el caso del sistema triple cuadrupolo–tiempo de vuelo (QqQ-TOF), empleado en esta Tesis Doctoral, que proporciona una elevada

sensibilidad y resolución (ca. 20 000), lo cual lo hace idóneo para la obtención de perfiles proteómicos, metalómicos y metabolómicos. Además, este sistema permite la identificación de especies mediante experimentos MS/MS, en el que los cuadrupolos $Q_1$ y $Q_3$ actúan como filtros de masas, $Q_2$ como celda de colisión y el TOF como analizador de masas (Figura 26).

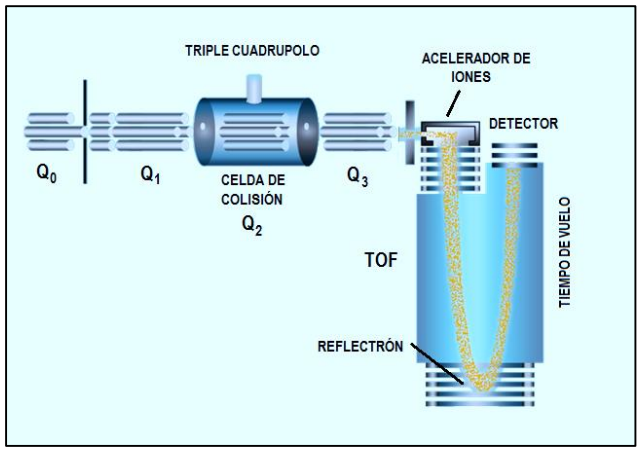



**Figura 26.** Espectrómetro de masas híbrido triple cuadrupolo-tiempo de vuelo (QqQ-TOF).

Otros analizadores moleculares de mayor resolución pero menos usados en bioanálisis, principalmente por su elevado coste, son el analizador de resonancia iónica en ciclotrón con transformada de Fourier (FTICR) y el orbitrap. FTICR fue desarrollado por Melvin B. Comisarow y Alan G. Marshall en la Universidad de Columbia Británica. El primer artículo apareció en *Chemical Physics Letters* en 1974 (Comisarow *y col.*, 1974). Es un analizador que dispone de una celda de trampa de iones como elemento principal, estas celdas están diseñadas aprovechando el fenómeno de resonancia iónica en ciclotrón. El desarrollo y comercialización de los espectrómetros de resonancia iónica en ciclotrón con transformada de Fourier, con una fuente de ionización externa, normalmente ESI o MALDI, representa un hito importante en cuanto a su poder de resolución y a la exactitud de masas, y por lo tanto juega un papel fundamental en la

identificación precisa y exacta de biomoléculas de matrices complejas como fluidos y tejidos biológicos.

En la resonancia iónica en ciclotrón (ICR) los iones se encuentran atrapados en una celda compuesta de cuatro electrodos situados en un campo magnético fuerte (Marshall *y col.*, 1998). Una vez atrapados, los iones oscilan con una frecuencia (frecuencia de ciclotrón) inversamente relacionada con su relación m/z. A su vez, las frecuencias de ciclotrón están directamente relacionadas con la intensidad del campo magnético. Los iones atrapados pueden ser excitados por una RF eléctrica con una frecuencia en resonancia con sus frecuencias de ciclotrón. Aunque la relación de oscilación de los iones aumente, su frecuencia es mantenida. La detección no destructiva es posible debido a una imagen actual, creada en el detector, que tiene la misma frecuencia que la frecuencia de ciclotrón para el ion. Las frecuencias se pueden medir con gran precisión. Como se puede aumentar la frecuencia de ciclotrón con la fuerza del campo magnético, Se consigue una mayor resolución y precisión en la medida de la masa trabajando bajo campos magnéticos más altos.

Cuando los iones con diferentes relaciones m/z son medidos de forma simultánea, es necesario el uso métodos basados en la transformada de Fourier (FT). El FTICR es en la actualidad el espectrómetro de masas capaz de proporcionar la mejor resolución de masas (se han publicado valores $>10^6$ (Gorshkov *y col.*, 1998), lo que permite estudios metalómicos y proteómicos con proteínas intactas no digeridas por ninguna enzima previamente (Lee *y col.*, 2002).

Por otro lado, se pueden obtener medidas por debajo de µg/L. Por lo que la elevada resolución de este analizador, no sólo permite una mayor calidad de los datos, sino que proporciona un mayor número de picos, por lo que se pueden obtener más señales que con otros analizadores de menor poder de resolución y sensibilidad.

Recientemente, cabe destacar la aparición de un nuevo tipo de analizador que basado en un nuevo principio físico: la separación de los iones en un campo eléctrico oscilante. Este instrumento, presenta unas prestaciones similares a un espectrómetro FTICR, en términos de resolución y exactitud de la masa, pero sin necesidad de incorporar un imán superconductor de elevado coste. El orbitrap es un espectrómetro de masas desarrollado por Roman A. Zubarev y Alexander Makarov (Zubarev *y col.*, 2013). El equipo puede considerarse como una modificación de una trampa de iones desarrollada por Kingdon en la década de 1920 (Kingdon *y col.*, 1923). Cuenta con un electrodo exterior con forma de barril y un electrodo interior coaxial con forma de huso que forma un campo electrostático con distribución potencial cuadro-logarítmica. En un orbitrap, los iones son inyectados tangencialmente en un campo eléctrico entre los electrodos y quedan atrapados porque su atracción electrostática hacia el electrodo interior es contrarrestada por la fuerza centrífuga. Así los iones dan vueltas alrededor del electrodo central. Adicionalmente los iones también se mueven hacia delante y hacia detrás a través del eje del electrodo central. Así, los iones con una específica relación m/z se mueven en anillos que oscilan alrededor del huso central, la frecuencia de estas oscilaciones armónicas es independiente de la velocidad del ion y es inversamente proporcional a la raíz cuadrada de su relación m/z. Estos analizadores presentan una elevada precisión de masa (1-2 ppm), un alto poder de resolución

(valores>200.000) y un alto margen dinámico (alrededor de 5000) (Hu *y col.*, 2005; Makarov *y col.*, 2006).

### 2.3.3. Técnicas analíticas para la búsqueda de biomarcadores en especiación química y metalómica

Los enfoques basados en la especiación química convencional se centran en metalobiomoléculas de bajo peso molecular de origen antropogénico o que se forman en los organismos vivos como consecuencia del metabolismo de un metal o metaloide, en algunos casos como mecanismo de defensa contra elementos tóxicos. Como ya se comentó anteriormente, un punto importante a tener en cuenta es que en estudios de especiación química las metalobiomoléculas tienen estructura conocida y baja masa molecular, y puede adquirirse comercialmente o sintetizarse con facilidad (p. ej. arsenobetaína, selenito, metilmercurio, etc). Sin embargo, los iones metálicos endógenos y exógenos o especies metálicas en sistemas biológicos establecen una perspectiva diferente, ya que son por lo general especies desconocidas y presentan una gran variabilidad en el tamaño y el tipo de unión entre el metal y la biomolécula, no estando, por lo general, disponibles comercialmente. Como consecuencia, mientras que las metodologías para especiación química convencional se basan en sistemas de dos dimensiones en el que se consigue la discriminación entre especie con un dispositivo de separación, como la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), electroforesis capilar (CE) o cromatografía de gases (GC), acoplada a un detector atómico sensible como la fluorescencia atómica (AFS) o un ICP-MS para detectar el metal presente en la biomoléculas. En metalómica es necesaria una

tercera dimensión instrumental (espectrometría de masa molecular) porque las moléculas desconocidas deben ser adecuadamente identificadas y caracterizadas.

Otro factor importante a tener en cuenta en los estudios de especiación química y metalómica, es conocer la concentración del metal implicado, ya que numerosos elementos trazas endógenos en sistemas biológicos está por debajo o en el rango sub-ng $g^{-1}$, y a su vez distribuido entre varias especies. Este hecho, junto con la complejidad de la matriz, hace que los límites de detección constituyan un importante reto analítico en este campo. Sin embargo, el principal problema en el análisis de metaloespecies es la identificación mediante espectrometría de masas molecular que precisa una gran pureza en la muestra, lo que implica unas exhaustivas y complejas etapas de purificación. La mayoría de las metaloespecies de interés, especialmente, aquellas con niveles trazas o ultratrazas, no están todavía descubiertas y/o caracterizadas, sobre todo en matrices biológicas. En ocasiones, la baja estabilidad del complejo hace que la tarea analítica sea aún más exigente ya que la preparación de la muestra puede liberar el metal unido a la biomolécula o bien la desnaturalización de las metaloproteínas durante los procedimientos de extracción.

En este sentido, el tratamiento de la muestra es un requisito clave a fin de preservar la integridad de las metaloespecies durante todo el proceso analítico. La preparación de la muestra podría entenderse como cualquier manipulación que modifica la matriz de la muestra con el fin de hacerla más adecuada para el análisis (Mesko *y col.*, 2011). Para este propósito, los procedimientos de extracción convencionales y avanzados proporcionan una amplia gama de opciones de acuerdo con los tipos de muestras.

Centrando nuestra atención en matrices biológicas (fluidos y tejidos), los procedimientos de preparación de muestras convencionales implican varios pasos, siendo el aislamiento de los analitos de interés de una matriz compleja el punto crucial. Los principales problemas surgen de la posibilidad de pérdidas de analitos de interés o la posible contaminación durante la manipulación de la muestra, el largo tiempo requerido en ocasiones que puede provocar biotransformaciones de dichas especies y el gran volumen de consumo de disolvente o extractante necesario y que conlleva a que en numerosos casos no se alcance el límite de detección de las técnicas empleadas.

En general, la preparación de muestras convencional para el análisis de metaloespecies en matrices biológicas requiere:

i) la disrupción celular o lisis, o la degradación parcial de la matriz de la muestra para su posterior extracción de los analitos mediante tratamientos mecánicos en presencia de nitrógeno líquido (García-Sevillano *y col.*, 2012a).

ii) la extracción y solubilización de los analitos asistida por diferentes reactivos, principalmente una disolución tampón con soluciones de fuerza iónica adecuados para asegurar la estabilidad de las metaloespecies de interés presentes en la muestra (Cañas *y col.*, 2007), por ejemplo, Tampón Tris y acetato de amonio, siendo estos los más adecuados para su posterior análisis por ESI-MS debido a su mayor volatilidad (García-Sevillano *y col.*, 2012a).

iii) reducción de enlaces disulfuro para evitar la formación de puentes disulfuro entre proteínas (Cañas *y col.*, 2007). Para este propósito, se han utilizado agentes reductores tales como ditiotreitol (DTT), ditioeritritol (DTE), glutatión reducido (GSH) y β-mercaptoetanol. Sin embargo, estos reactivos tienen propiedades quelantes y están siendo reemplazados por otros, tales como tributilfosfina (TBP) y tris-carboxietilfosfina (TCEP) con propiedades reductoras suaves y sin propiedades quelantes (García-Sevillano *y col.*, 2012a).

iv) inhibición de las proteasas para conservar la integridad de la estructura de las metaloproteínas, para este propósito se utilizan inhibidores de proteasas sin propiedades quelantes, tales como fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), sustituyendo los clásicas mezclas de inhibidores de proteasas, generalmente con un cierto contenido en EDTA que originaba "artefactos" en los resultados como consecuencia de su poder complejante (García-Sevillano *y col.*, 2012a).

Opcionalmente, para metaloproteínas de membranas celulares se han utilizado detergentes, tales como dodecilsulfato de sodio (SDS) o 3-[(3-Colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS), ya que estos reactivos alteran las membranas celulares, rompiendo las interacciones proteína-lípido y, en consecuencia, provocando la solubilización de las metaloproteínas, así como la prevención de interacciones hidrofóbicas (Szpunar *y col.*, 2003).

Por otro lado, una buena alternativa en la preparación de muestras para la especiación de metaloespecies de baja masa molecular, es el uso de la cromatografía de exclusión de tamaño

(SEC), la precipitación de proteínas o la ultrafiltración con membranas de corte de 10 kDa. Esta operación es muy importante para reducir al mínimo el número de pasos en un procedimiento de purificación, evitando en lo posible la posible pérdida de muestra. Jayasinghe *y col.* (Jayasingue *y col.*, 2011) propuso la precipitación de proteínas a partir de una mezcla de proteína cruda, y el enriquecimiento posterior de las proteínas de interés bajo condiciones no desnaturalizantes, para este propósito se seleccionó el sulfato de amonio como agente precipitante. Otros autores han propuesto el uso de mezclas de ácido tricloroacético (TCA)/acetona o cloroformo/metanol, aunque en este caso se provocaba la desnaturalización de ciertas metaloproteínas. Por otro lado, la ultrafiltración mediante filtros de membrana también permite la separación de compuestos de acuerdo con la masa molecular. Este enfoque es adecuado para la separación de sales y otros analitos de baja masa molecular de especies de alta masa molecular. Para ello, se utiliza una presión diferencial a través de una membrana semipermeable para conducir materiales permeables. La fuerza de la centrífuga crea la presión diferencial necesaria que provoca el proceso de separación. Los analitos con mayor masa molecular son retenidos por la membrana y los de menor masa la atraviesan. La ultrafiltración ofrece una forma rápida para realizar estas separaciones con la mínima desnaturalización de proteínas en comparación con los métodos de precipitación (Nuevo-Ordoñez *y col.*, 2010).

Otro aspecto a tener en cuenta son las posibles interferencias que se presentan en el análisis de las metaloespecies en muestras biológicas mediante los acoplamientos CROMATOGRAFIA-ICP-MS como hidrocarburos, polisacáridos, lípidos, aminoácidos y proteínas, lo que da lugar a cromatogramas de elevada complejidad. Además, otros constituyentes de la matriz también pueden eluir conjuntamente con los analitos de interés interfiriendo en los tiempos

de retención y forma de los diferentes picos cromatográficos, afectando así su separación e identificación. Esto es particularmente importante cuando se recogen las fracciones seleccionadas para la identificación de las especies por espectrometría de masa molecular. Por esta razón, suele ser necesaria una etapa de limpieza (*Clean up*) de las muestras biológicas, o de matrices complejas en general antes de su estudio. Para este propósito, suele utilizarse la liofilización, centrifugación, ultrafiltración, filtración en gel, extracción en fase sólida (SPE) y cromatografía en columna. Para las muestras biológicas, los métodos más comunes empleados antes del análisis son el uso de cartuchos $C_{18}$ o resinas de intercambio iónico. Por último, una estrategia previa a la identificación de proteínas es el uso de puntas ZipTip utilizadas para la preconcentración y purificación de péptidos, proteínas y oligonucleótidos tras la digestión con tripsina en un tampón con alta concentración de sales, necesario para asegurar la estabilidad y función de la enzima. El relleno de estas puntas de 10 µL suele ser de $C_{18}$ o $C_4$ que permite eliminar las sales y preconcentrar péptidos y proteínas antes de la identificación por espectrometría de masas molecular (García-Sevillano *y col.*, 2012a; 2014c).

Las separaciones analíticas en especiación química y metalómica requieren el uso de técnicas híbridas, en especial aquellas basadas en el acoplamiento de una técnica de separación como la cromatografía líquida (HPLC), electroforesis capilar (CE) o cromatografía de gases (GC), acopladas a ICP-MS. Por lo tanto, el uso de ICP-MS en este campo constituye una herramienta muy valiosa ya que proporciona una gran sensibilidad, selectividad y precisión facilitando el análisis de metalobiomoléculas a muy baja concentración en matrices biológicas complejas, como fluidos y tejidos biológicos, y además permite la detección simultánea de múltiples heteroátomos, como ya se comentó anteriormente. Por estas razones, el ICP-MS ha remplazado prácticamente

a otras técnicas como ICP-OES, AFS y el análisis instrumental por activación con neutrones (INAA), que se han usado anteriormente para la determinación multielemental de elementos trazas en multitud de estudios de especiación química y metalómicos.

El empleo de metodologías analíticas basadas en el uso de la cromatografía líquida son las más ampliamente usadas en este campo. Para este propósito, se han utilizado varios modos de separación con objeto de discriminar las especies, llevándose a cabo la separación en escala preparativa, analítica, capilar o nano-escala, y por lo general con dos o tres sistemas cromatográficos ortogonales que se combinan para aumentar la resolución en la separación de las metalobiomoléculas, tales como la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), fase reversa (RP), cromatografía de intercambio iónico (IEC), cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC) y cromatografía de afinidad (AF). Sin embargo, como se ha comentado antes, es la combinación de estas técnicas de separación junto con la detección por espectrometría de masas elemental y molecular lo que constituye el nuevo paradigma de este tipo de estudios.

En este sentido, la cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) ha sido ampliamente aplicada como primera dimensión cromatografía mediante el trazado de las metaloespecies cuando es acoplada a ICP-MS como detector, seguido por una etapa de purificación por otra modalidad de cromatografía líquida complementaria. El interés por evitar la desnaturalización metal-ligando y lograr así una buena recuperación hace que la SEC sea una técnica de uso frecuente. Uno de los inconvenientes que conlleva el uso de la de este tipo de cromatografía es que la resolución que se alcanza es por lo general pobre. Incluso cuando está presente en el pico una única especie de un elemento dado, ésta puede coeluir con otras sustancias presentes en la

matriz de la muestra. De esta manera, la coincidencia del tiempo de elución de un compuesto con el de su patrón en una separación SEC no se puede considerar como una prueba definitiva en su identificación debido al pequeño número de platos teóricos de estos sistemas cromatográficos. Por lo tanto, después de la separación SEC generalmente se aplican otras técnicas cromatográficas que utilizan mecanismos de separación diferentes que contribuyen a la mejor identificación de las diversas metalobiomoléculas. La aplicación de estos procedimientos multidimensionales son aplicados, generalmente termina con la caracterización de los compuestos aislados por espectrometría de masas molecular en tándem y el uso de bases de datos, tras la digestión enzimática de la metaloproteína purificada. Estos esquemas multidimensionales son necesarios no sólo para mejorar la resolución en la separación de metaloproteínas sino también para eliminar los componentes de la matriz que pueden influir en la ionización por ESI o MALDI, y por lo tanto en su identificación. Al procedimiento de trabajo descrito es lo que hoy en día se conoce como *workflow* metalómico basado en el uso de la cromatografía líquida (Figura 27).

La combinación de la SEC con la cromatografía de intercambio aniónico (AEC) e intercambio catiónico (CEC), se ha aplicado ampliamente para la especiación de metales unidos a metaloproteínas en tejidos de humanos (Prange *y col.*, 2001) y ratas (Polec *y col.*, 2000; Polec *y col.*, 2002), así como para la especiación de selenio en leche materna (Michalke *y col.*, 1997), ajo (McSheehy *y col.*, 2000) y levadura (McSheehy *y col.*, 2001a). Incluso se ha aplicado una tercera dimensión cromatográfica para garantizar la pureza del analito antes de llegar al detector, como ejemplo puede citarse el acoplamiento SEC-AEC-CEC para el aislamiento de especies de

arsénico en algas (McSheehy *y col.*, 2001b) y ostras (McSheehy *y col.*, 2001c), así como especies de selenio en extractos acuosos de levadura selenizada (McSheehy *y col.*, 2002).

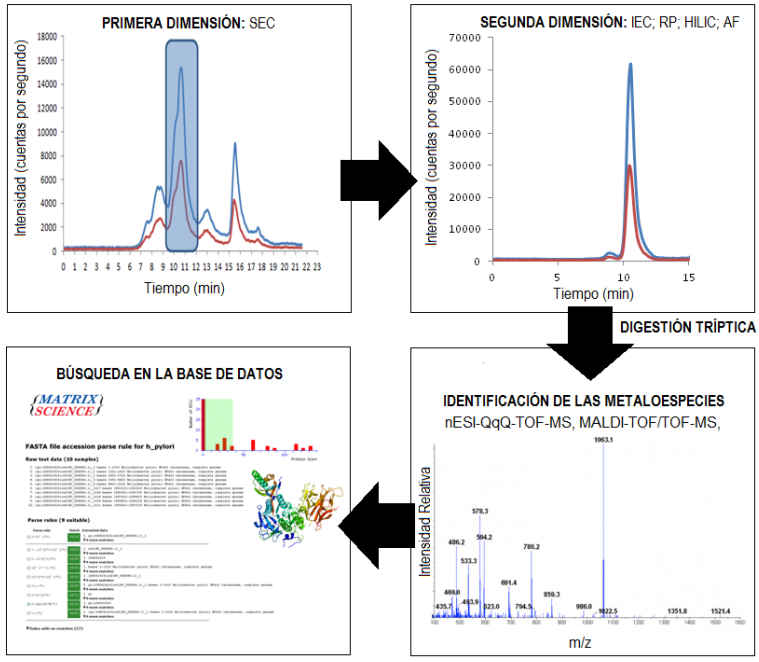



**Figura 27.** *Workflow* metalómico basado en el uso de la cromatografía líquida.

En general, la cromatografía RP puede producir desnaturalización de metaloproteínas no resistentes a disolventes orgánicos que pueden dar lugar a su precipitación y problemas adicionales cuando se acopla a ICP-MS, y durante la separación cromatográfica. El uso de altas concentraciones de disolventes orgánicos, necesario para llevar a cabo la elución cromatográfica, puede afectar negativamente a la estabilidad del plasma y el gradiente de elución puede inducir cambios la sensibilidad de ICP-MS, por lo que la cuantificación se hace más compleja. Para superar este problema, se calcula un factor de respuesta teniendo en cuenta el gradiente de la fase orgánica (Pröfrock *y col.*, 2009). Por otro lado, el uso de micro y nano-flujo nebulizadores con

tasas de flujo fue de 200 nL $min^{-1}$ a 4 µl $min^{-1}$ permite fases móviles con alto contenido orgánico (Szpunar, 2005). Otra alternativa para superar los problemas asociados con las altas concentraciones de disolventes orgánicos en el plasma es la introducción de oxígeno que evita la obstrucción de los conos de muestreo y skimmer por la deposición de carbono, y el uso de conos de Pt inertes en lugar de los convencionales de Ni.

En este sentido, las técnicas electroforéticas también juegan un papel importante en los estudios metalómicos. Por un lado, la electroforesis en gel (GE) (nativa y desnaturalizante) en una o dos dimensiones es una herramienta poderosa ya que llega a proporcionar una mejor resolución que las técnicas cromatográficas. En este sentido, la electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE) es el método de separación más común para este propósito. En este caso, la estructura secundaria de proteínas se desnaturaliza mediante el empleo de SDS, y en consecuencia, su aplicación se limita a los elementos traza unidos covalentemente a las proteínas, como es el caso de las selenoproteínas, que no pierden el elemento durante el análisis. Para evitar este problema, pueden aplicarse condiciones no desnaturalizantes (BN-PAGE).

En segundo lugar, la electroforesis capilar (CE) es hoy en día otra poderosa herramienta de separación para el análisis de metaloespecies en muestras biológicas. Esta técnica ofrece numerosas ventajas para el análisis de metalobiomoléculas, como bajos requerimientos en la cantidad de muestra (en el rango de nanolitros), tiempos cortos de análisis, alta resolución y ausencia de fase estacionaria, lo que permite el análisis de complejos metálicos lábiles, sin temor a la pérdida del metal durante la separación cromatográfica. Otro factor a tener en CE es su flujo electroosmótico que permite la detección simultánea de analitos cargados positiva y

negativamente así como moléculas neutras. CE se puede acoplar a una amplia gama de detectores como UV /Vis (Liu *y col.*, 1994; Richards *y col.*, 1993) o ICP-MS (Lavorante *y col.*, 2003). La CE se utiliza principalmente para la separación de moléculas de bajo peso molecular como las metalotioneínas (Prange *y col.*, 2002; Polec *y col.*, 2001), aunque también ha sido aplicada al estudio de otras metaloproteínas de mayor masa molecular (Michalke *y col.*, 2007). No obstante, esta técnica es usada para el estudio de una amplia gama de analitos debido a que en el apartado genérico de CE están involucradas una familia de técnicas como: electroforesis capilar en zona (separación en relación con la m/z de los analitos); electroforesis capilar en gel (separación por peso molecular); isoelectroenfoque capilar (separación por punto isoeléctrico); cromatografía electrocinética micelar (separación en función del coeficiente de partición de los analitos entre las micelas y el solvente), entre otras (Singh, 2011).

Recientemente, las técnicas de imagen basadas en la espectrometría de masas (*Mass Spectrometry Imaging*, MSI) son herramientas analíticas que permiten conocer la distribución espacial de los analitos de interés en muestras sólidas (Becker *y col.*, 2011). Estas técnicas tienen un gran interés en investigación bioanálitica ya que la caracterización e identificación de los distintos componentes bioquímicos, así como el estudio de su distribución en los distintos órganos y células es clave en este campo. Para el estudio de biomoléculas pueden destacarse las técnicas MALDI-MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry) y DESI-MS (Desorption Electrospray Ionization Imaging Mass Spectrometry), principalmente empleadas en proteómica. De más reciente desarrollo es la ablación láser acoplada a espectrometría de masas atómica, principalmente con plasma de acoplamiento inductivo (LA-ICP-MS), la cual es idónea para el "mapeado" de elementos traza en muestras biológicas (Becker *y col.*, 2007; Becker *y col.*,

2008a). En este sentido, el desarrollo de técnicas analíticas que permitan la caracterización, cuantificación y localización espacial de los distintos metales o metalo-biomoléculas es de gran importancia (Matusch *y col.*, 2012; Becker *y col.*, 2003).

La ablación láser con ICP-MS permite el análisis espacial de elementos metálicos en muestras sólidas, sin necesidad de un pretratamiento de disolución, aplicable en distintos campos como estudios de bioacumulación y biodisponibilidad, análisis medioambiental o estudios de toxicidad. Sin embargo, a pesar del elevado potencial de la técnica, los problemas asociados a la falta de calibrantes para llevar a cabo análisis cuantitativo, así como la necesidad del manejo de técnicas avanzadas de tratamiento de muestras biológicas sólidas, hacen imprescindible una gran especialización.

Esto hace que LA-ICP-MS sea una excelente alternativa para la detección elemental después de la separación de proteínas mediante GE. Sin embargo, esta técnica requiere también un paso adicional basado en la espectrometría de masas molecular para la identificación de las metaloproteínas purificadas mediante el uso de esta técnica de separación en los diferentes spots de proteínas del gel, normalmente usando MALDI como fuente de ionización (Becker *y col.*, 2008b). Esta técnica se basa en la irradiación con láser de la superficie del gel que está dentro del espacio electroforético, pasando de una mancha a otra. Los analitos sometidos a ablación son arrastrados hacia el ICP por un flujo continuo de argón, y posteriormente los iones son analizados por espectrometría de masas. Como resultado, se obtiene un electroferograma en el que la cantidad de un elemento dado es función de su posición en el gel. La detección por LA-ICP-MS es una técnica potencialmente rápida y bastante robusta ya que no está involucrada ninguna otra

reacción o etapa de derivatización y la señal es, en teoría, directamente proporcional a la cantidad del elemento en el gel, lo que permite a su vez su cuantificación (Figura 28) (Ma *y col.*, 2004; Ballihaut *y col.*, 2007).

Por otro lado, la técnica LA-ICP-MS se emplea actualmente como una técnica de espectrometría de masas elemental sensible para la obtención de imágenes (*bioimaging*) de los metales y no metales en secciones delgadas de tejidos obtenidas mediante microtomo, especialmente para la determinación de concentraciones de elementos a nivel de trazas y ultratrazas en regiones concretas y estudiar así la distribución y/o acumulación de estos elementos en un órgano concreto (Figura 29) (Becker, 2010).

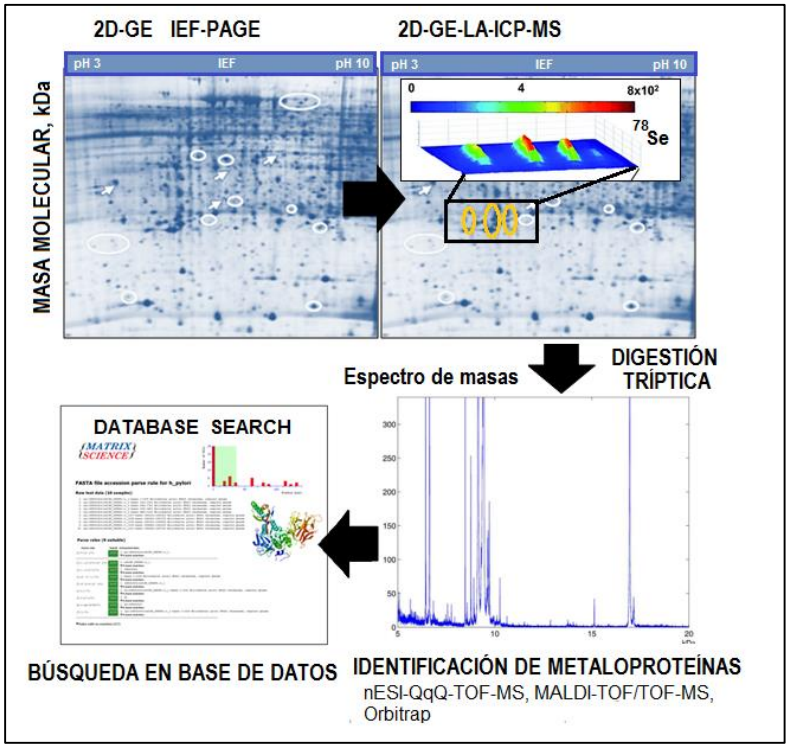



**Figura 28.** *Workflow* metalómico basado en el uso de la electroforesis en gel de poliacrilamida y detección mediante LA-ICP-MS.

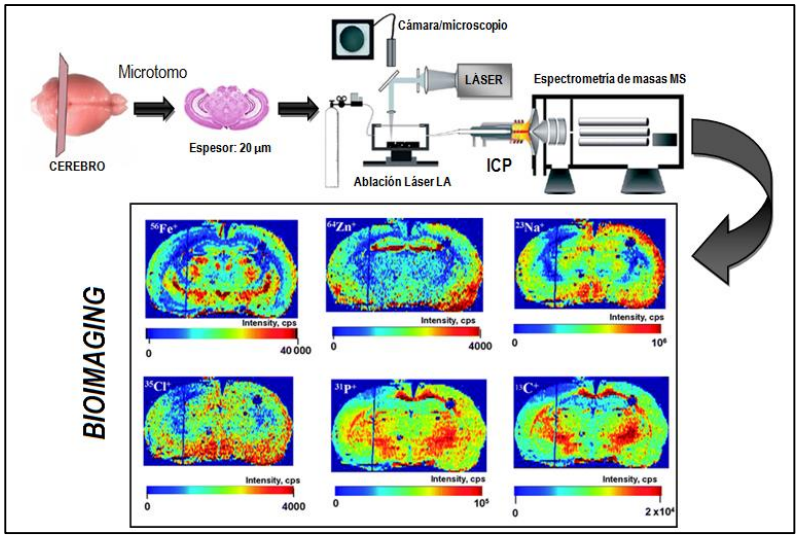



**Figura 29.** *Workflow* para la obtención de bioimágenes de secciones de tejidos mediante LA-ICP-MS.

En resumen, existen tres estrategias fundamentales para el desarrollo y aplicación de técnicas metalómicas y metaloproteómicas como muestra la figura 30. La primera estrategia es el uso de la espectrometría de masas, asociada a plataformas de análisis que integran técnicas de separación como la cromatografía de líquidos (HPLC) o electroforesis capilar (CE) fundamentalmente, combinada con un detector elemental y un detector molecular, los cuales representan una herramienta idónea para el conocimiento de todas las especies formadas en el metabolismo celular. Estos procedimientos analíticos multidimensionales (MAA) que combinan dos sistemas de detección complementarios, elementales y moleculares, aportan resultados que permiten la caracterización estructural y funcional de las metaloespecies. Los procedimientos analíticos clásicos proteómicos y metabolómicos, no tienen en cuenta la presencia de heteroelementos metálicos unidos a proteínas y metabolitos, lo que establece claras diferencias con los procedimientos metalómicos, siendo estos generalmente más complejos para garantizar

la integridad de la unión del metal con la molécula. La falta de patrones comerciales en este campo fue el inconveniente que dio origen a protocolos de separación/aislamiento basados en el uso consecutivo de dos o más técnicas, con mecanismos de separación ortogonales y del uso creciente de técnicas de detección molecular y estructural tales como ESI-MS o MALDI-TOF-MS para completar la caracterización de las especies detectadas por técnicas cromatográficas o electroforéticas. Las aplicaciones integradas de estas técnicas proporcionan una gran perspectiva de futuro para investigar en mayor profundidad la función de los metalomas asociados a la salud humana y el medio ambiente.

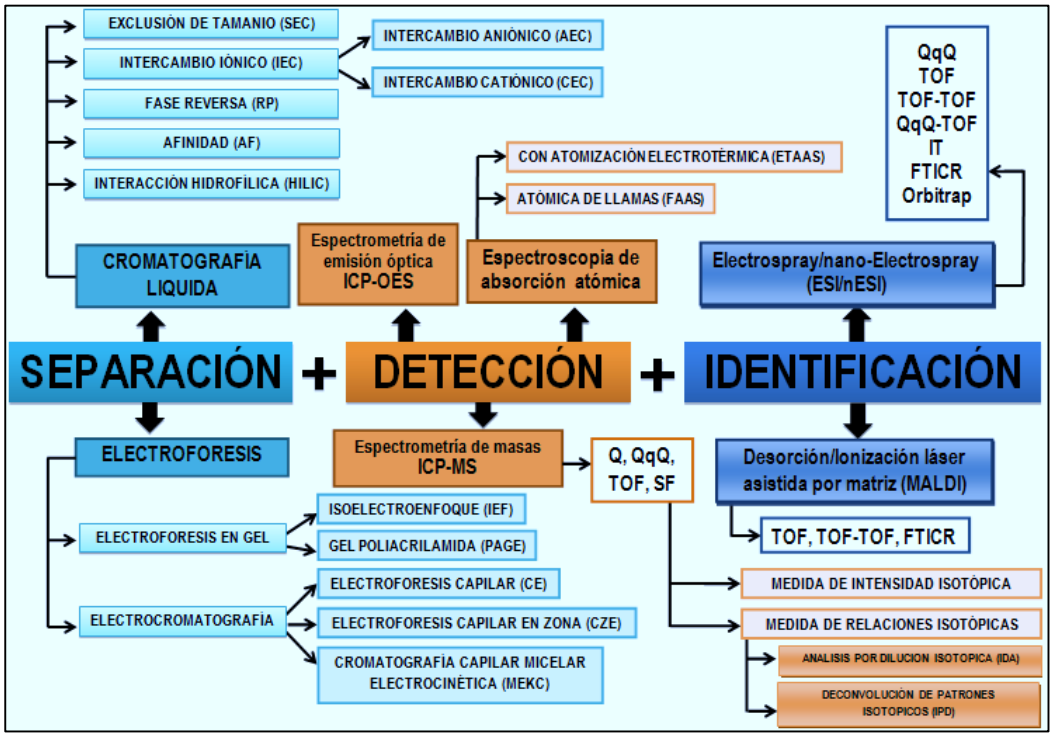



**Figura 30**. Acoplamiento de técnicas analíticas para el estudio de metalobiomoléculas.

### 2.3.4. Técnicas analíticas para la búsqueda de biomarcadores en metabolómica

El primer paso en la aplicación de la metabolómica con el fin de obtener biomarcadores bajo unas condiciones de exposición a un xenobiótico, condiciones ambientales o como consecuencia de una enfermedad es planificar el número de metabolitos a medir en el fluido o tejido biológico. En última instancia, el número y la composición química de los metabolitos estudiados es un atributo que define a cualquier experimento metabolómico y que da forma al diseño experimental con respecto a la preparación de muestras y la elección de la instrumentación, que como ya se comentó anteriormente, se basan en el uso de RMN o MS como detectores fundamentales, distinguiéndose dos tipos de enfoques: análisis dirigidos o "*target*" y análisis no dirigidos o "*non-target*". El enfoque dirigido se basa en una hipótesis establecida previamente, y se refiere a un método en el que se mide y cuantifica un conjunto pequeño y bien definido de metabolitos conocidos (Griffiths *y col.*, 2010), o rutas metabólicas generales (Han *y col.*, 2013). Este tipo de análisis se viene desarrollando desde hace décadas, incluso mucho antes de que se acuñara el término metabolómica. Un gran número de métodos están disponibles para numerosos metabolitos como azúcares (Han *y col.*, 2013), aminoácidos (Yuan *y col.*, 2012), esteroides (Galuska *y col.*, 2013) o ácidos grasos (Bruins *y col.*, 2013), entre otros. El beneficio de tales métodos dirigidos es que se requieren un mínimo esfuerzo y recursos para perfilar estos metabolitos específicos sobre un gran número de muestras. Por otro lado, los análisis no dirigidos son globales en su alcance y tienen el objetivo de medir simultáneamente la mayor cantidad posible de metabolitos a partir de muestras biológicas sin ninguna discriminación, excepto las inherentes a la preparación de las muestras, procesos de separación, la técnica empleada para

la ionización en caso de usar MS, así como la sensibilidad del detector empleado. Sin embargo, en contraste con el enfoque dirigido, el principal cuello de la botella de un enfoque no dirigido es la identificación de los metabolitos sobre la base de los picos de MS y/o RMN de conjuntos de datos extremadamente complejos (Patti *y col.*, 2012). A pesar de este desafío, este enfoque tiene el potencial de permitir identificar metabolitos no reconocidos previamente en el metabolismo de los diferentes organismos, como ratones, en condiciones experimentales controladas o ambientales aparentemente conocidas. En este sentido, la mayor parte del trabajo metodológico y los estudios presentados en esta Tesis se centrará en un enfoque metabolómico no dirigido.

La RMN se caracteriza por ser una técnica de elevada reproducibilidad, análisis rápido, robusto y cuantificación de compuestos. Además, no requiere una minuciosa preparación de la muestra, y las bases de datos globales están disponibles, lo que facilita la identificación de los metabolitos (Wishart, 2011). La limitación inherente de la RMN, sin embargo, es su baja sensibilidad, lo que dificulta la detección de metabolitos importantes presentes en bajas concentraciones. En contraste, la espectrometría de masas de ionización por electrospray acoplado a cromatografía líquida (LC/ESI-MS), es la combinación de análisis más comúnmente utilizada en la metabolómica "*non-target*" usando principalmente como analizador QqQ-TOF de alta resolución, ya que proporciona una mayor sensibilidad y especificidad molecular (Want *y col.*, 2010). Sin embargo, la falta de patrones y de metabolitos en las bases de datos dificulta la identificación rápida y fiable de un gran número de ellos. Sin embargo, los principios físico-químicas distintivos entre RMN y MS hacen estas dos tecnologías complementarias y pueden potencialmente expandir la cobertura metabólica en los estudios metabolómicos no dirigidos. Por ejemplo, metabolitos como la glucosa o el ácido láctico, que no se ionizan fácilmente por ESI o

no son retenidos utilizando separaciones por cromatografía líquida, respectivamente, se pueden detectar mediante el uso de RMN, o bien mediante el uso de otras técnicas alternativas como la GC-MS en sustitución a la RMN, como se verá en la presente Tesis Doctoral. Dicha complementariedad permite recopilar más información sobre los niveles de metabolitos perturbados, lo que lo que hace posible considerar más alternativas sobre los procesos bioquímicos fundamentales implicados en el fenotipo subyacente.

Frente a la genómica y la proteómica que tratan combinaciones de 4 bases y 20 aminoácidos, respectivamente, la metabolómica debe hacer frente a la gran complejidad química y física de los metabolitos, que engloban compuestos muy polares y otros muy hidrófobos con masas muy diversas de 50 a 1000 Da. Además, algunos de ellos están presentes en bajas concentraciones, del orden del picomol, como hormonas y neurotransmisores, y otros en concentraciones mili-molares tales como la glucosa o algunos aminoácidos en la gran mayoría de las matrices biológicas. Dada esta heterogeneidad, no existe un método de preparación de muestra ni una técnica analítica universal que permita la detección de todos los metabolitos presentes en una determinada muestra biológica. Por lo tanto, con el fin de obtener resultados fiables de los estudios metabolómicos no dirigidos, deben considerarse numerosos factores, entre los que se consideran la preparación de muestra, metodologías y herramientas de análisis de muestras apropiadas, análisis de datos, y por último y no por ello menos importante, la interpretación biológica de los resultados (Figura 31). Por lo tanto, un esquema de trabajo o "*workflow*" bien definido caracteriza la metabolómica no dirigida o "*non-target"*.

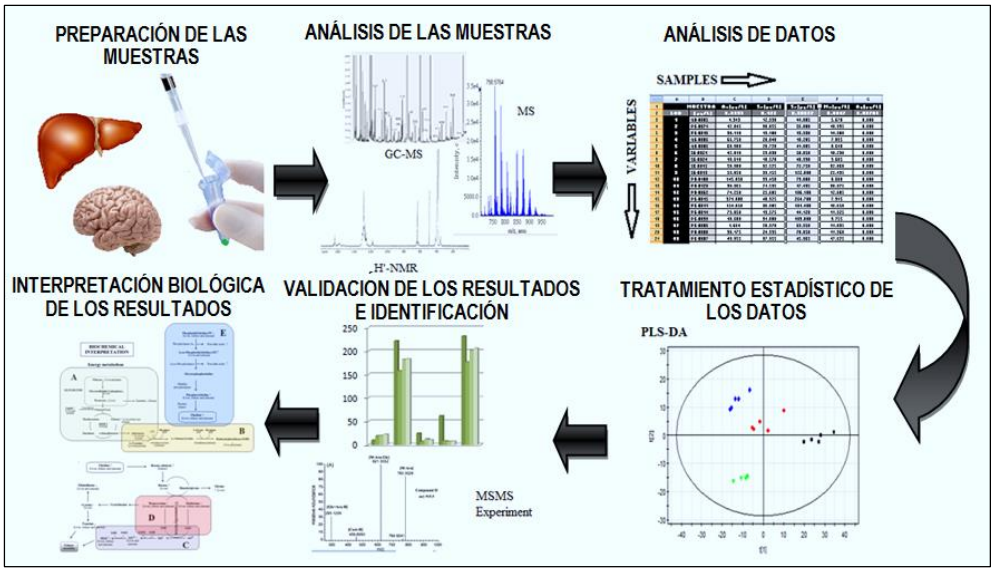



**Figura 31.** *Workflow* metabolómico para análisis no dirigido o "*non-target*".

En primer lugar, el número de muestras en un estudio metabolómico para el descubrimiento de biomarcadores debe ser suficientemente elevado como para corregir los errores asociados a la variabilidad biológica y/o condiciones experimentales y obtener así datos estadísticamente válidos. Por otro lado, hay que tener en cuenta que durante la recolección de las muestras, éstas pueden estar influenciadas por reacciones bioquímicas mediadas por enzimas y la posible degradación debido a la desfavorable condición ambiental (altas temperaturas) o la contaminación bacteriana. Para reducir o evitar estos cambios antes del análisis metabolómico, es frecuente llevar a cabo la congelación rápida en nitrógeno líquido de la muestra o tratamientos previos, como bactericidas y trampas frías que se utilizan con frecuencia para las recolecciones de orina, para provocar el bloqueo de la actividad enzimática o metabolismo ("*metabolism quenching*"), de esta forma la muestra refleja la cantidad real de metabolitos en el momento del muestreo. Para este fin, suele emplearse también azida sódica que evita el crecimiento de

bacterias contenidas en la orina, ya que podrían producir sus propios metabolitos dando lugar a alteraciones en los perfiles metabólicos de la muestra (Ganti *y col.*, 2011).

Por otro lado, un paso crucial en metabolómica es conseguir una extracción de los metabolitos de la muestra adecuada para recuperar la mayor cantidad posible de los metabolitos presentes en fluidos o tejidos biológicos, incluyendo suero, plasma, tejido homogeneizado, saliva, orina, ~~o~~ *pellets* celulares, etc. Por este motivo, la preparación de la muestra es un factor clave en el éxito de cualquier procedimiento analítico, ya que afectará al contenido final de los metabolitos en la muestra purificada, y por consiguiente, a la interpretación biológica de los resultados obtenidos en el estudio (Putri *y col.*, 2013). Lo ideal es que la extracción de metabolitos provoque de manera eficiente la liberación de los metabolitos de la muestra, eliminación de posibles interferentes afecten al análisis (por ejemplo, proteínas y sales) haciendo que el extracto sea compatible con la técnica analítica (Yanes *y col.*, 2011). A modo de ejemplo, para las muestras de orina, las interferencias causadas por su elevado contenido de sales inorgánicas durante su análisis por LC-MS puede ser eliminadas por dilución o extracción en fase sólida. En el caso de análisis no dirigidos estos procedimientos de preparación de muestras deben: (a) extraer el mayor número de metabolitos, (b) ser no selectivos y no excluir moléculas en base a sus propiedades física o químicas, y (c) no ser destructivos ni provocar la transformación de unos metabolitos en otros como consecuencia, por ejemplo, del uso de reactivos oxidantes. La mayor parte de las estrategias desarrolladas en literatura se basan en el uso de extracciones secuenciales bajo ciertas condiciones para la recuperación selectiva de diferentes familias o clases de metabolitos, como los lípidos (Watson, 2006), o metabolitos solubles en agua (Sun *y col.*, 2007), en relación con ciertos biomarcadores potenciales en el rango de masas entre 50 y 1000 m/z. En particular,

en estudios de *fingerprinting* el tratamiento al que se somete la muestra debe ser lo más simple posible para evitar pérdidas y aumentar la reproducibilidad.

Las muestras para la metabolómica basada en RMN se pueden analizar sin extracción de metabolitos, siempre que el volumen activo de la sonda de RMN contenga el volumen necesario de muestra, típicamente unos 500 μL de extracto para tubos de RMN de 5 mm. Sin embargo, la baja resolución intrínseca de RMN dificulta en gran medida la precisión y cuantificación de un gran número de metabolitos (Vinaixa *y col.*, 2011; Verwaest *y col.*, 2011). En este contexto, la extracción de los metabolitos puede reducir señales anchas en el espectro resultante de la alta superposición de los desplazamientos químicos para los metabolitos y macromoléculas (por ejemplo, proteínas) y generar resonancias RMN más estrechas y mejor resueltas que permiten la cuantificación fiable de los metabolitos en las muestras (Vinaixa *y col.*, 2010).

En MS, en el procesado de fluidos biológicos o extractos de tejidos la etapa más importante es la eliminación de macromoléculas, tales como ADN y proteínas fundamentalmente, las cuales se encuentran presentes en dichas muestras, y pueden influir en la reproducibilidad de los resultados, así como en el buen funcionamiento del sistema instrumental (separaciones cromatográficas, fuentes de ionización, etc). El procedimiento habitual para eliminar las proteínas consiste en la adición de un disolvente orgánico, normalmente acetonitrilo, metanol, acetona o etanol, provocando su precipitación, y posterior centrifugación (Bruce *y col.*, 2009) o bien mediante ultrafiltración (Tiziani *y col.*, 2008; Rosenling *y col.*, 2011). La adición de disolventes orgánicos no solo provoca la precipitación de las proteínas, sino que también rompe los posibles enlaces entre las proteínas y los metabolitos asociados a las mismas, hecho que no se consigue

al aplicar la ultrafiltración como método de preparación de la muestra (Vuckovic, 2012). En este sentido, estos mismos disolventes orgánicos se utilizan para la homogeneización de la muestra y solubilización de metabolitos (Yanes *y col.*, 2011; Vuckovic, 2012). La solubilidad de un metabolito depende fundamentalmente del disolvente orgánico empleado para tal fin, la temperatura y el pH utilizado. Los disolventes polares (por ejemplo metanol, acetonitrilo, metanol-agua o etanol) son muy usados en experimentos metabolómicos. Por otro lado, los disolventes no polares, como cloroformo o hexano pueden ser utilizados para extraer los componentes lipofílicos. En la mayoría de los casos, hay que tener en cuenta que las matrices biológicas contienen metabolitos solubles en agua y grandes cantidades de moléculas lipídicas. Por lo tanto, además de la eliminación estricta de proteínas, deben llevarse a cabo métodos de extracción basados en extracciones secuenciales con disolventes de diferentes polaridades. Además, el fraccionamiento subcelular de muestras de células de los diferentes tejidos antes de la extracción con disolventes orgánicos puede llevarse a cabo para identificar la distribución y las posibles perturbaciones en las diferentes rutas metabólicas dentro de orgánulos o compartimentos intracelulares específicos como las mitocondrias y el citosol.

La sensibilidad de la detección de los metabolitos es también un aspecto importante, que hay que tener en cuenta en la preparación de la muestra, sobre todo cuando se usa MS como sistema de detección. En este sentido, la concentración de metabolitos en las muestras y la eficiencia de ionización en MS son dos factores principales que determinan la sensibilidad de la detección de metabolitos en el análisis tanto por MS como RMN. Los metabolitos de baja abundancia en las muestras se pueden concentrar por condensación, extracción con disolvente, extracción en fase sólida (SPE) o preconcentración mediante el empleo de liofilizadores

convencionales o "*speed-vac*". Sin embargo, para muchos metabolitos, las limitaciones que se presentan en su análisis por MS no derivan de su mayor o menor concentración en la muestras, sino de la eficacia de la ionización, que en ciertos metabolitos suele ser insuficiente al usar la fuente ESI, o por problemas de volatilización al analizarse por GC. Para eliminar estos problemas puede llevarse a cabo un proceso de derivatización química que mejora el análisis por GC-MS mejorándose los procesos de separación, la detección y sensibilidad de análisis de los metabolitos, aunque la derivatización se está también usando extensamente en los últimos años en análisis por LC-HPLC (Halket *y col.*, 2005). En general, las reacciones de derivatización se diseñan basándose en los grupos funcionales, tales como amino, carboxilo, carbonilo, y restos hidroxilo en los metabolitos. El aumento de la hidrofobicidad y capacidad de carga son dos efectos primordiales cuando usamos derivatización química (Santa, 2011). Por ejemplo, los aminoácidos se derivatizan mediante cloruro de dansilo (Jia *y col.*, 2011). La detección de ácidos orgánicos se ha mejorado significativamente mediante la esterificación del grupo carboxilo con aminas, hidrazinas, o el alcohol, mientras que la detección de aldehídos y cetonas se mejora por la formación de bases de Schiff en reacciones de derivatización (Xu *y col.*, 2011; Gao *y col.*, 2005), o bien por la adición de amonio para la formación de aductos con triglicéridos y que aumentan la sensibilidad en el análisis por ESI-MS (McAnoy *y col.*, 2005).

No existe una plataforma analítica universal para su uso en metabolómica, que permita el estudio de todos los metabolitos contenidos en una determinada muestra biológica. Aunque los avances técnicos en la instrumentación así como el acoplamiento de técnicas analíticas están aportando una información metabolómica cada vez más completa, esta situación sigue siendo un

gran reto desde el punto de vista analítico. Por este motivo, buena parte de las nuevas tendencias en metabolómica están dirigidos tanto hacia el desarrollo instrumental como al metodológico.

Prestaremos una mayor atención en las metodologías y herramientas analíticas empleadas en metabolómica basadas en la MS, objeto de la presente Tesis Doctoral. En este sentido, en el análisis de muestras biológicas normalmente precisa una etapa previa de separación de estos componentes metabólicos basada en la cromatografía de gases (GC), cromatografía líquida (LC) o electroforesis capilar (CE) para evitar interferencias isobáricas tradicionales que afectan a la infusión directa de los extractos en el espectrómetro de masas (DIMS). Sin embargo, un número de estudios han propuesto el uso de DIMS sin ninguna separación previa usando analizadores de masas de alta resolución, tales como sistemas híbridos de triple cuadrupolo-tiempo de vuelo (TOF-QqQ) (Sun *y col.*, 2007; García-Sevillano *y col.*, 2013b-d; 2014a,d; 2015a) o Orbitrap (Favretto *y col.*, 2012), entre otros, debido a la elevada complejidad del metaboloma de las diferentes muestras biológicas. En este sentido, DIMS presenta varias ventajas en metabolómica, tales como la capacidad de cribado de alto rendimiento, análisis rápido y una cobertura más amplia en análisis no dirigidos (*non-target*) en comparación a los análisis metabolómicos con previa etapa de separación mediante acoplamientos cromatográficos y electroforéticos, ya que no existe exclusión de los compuestos asociados a la etapa de separación y presenta una mayor sensibilidad al no diluir los metabolitos de interés con la fase móvil necesaria para la elución cromatográfica. Por estas razones, la DIMS se ha propuesto como método de diagnóstico rápido para evaluar los efectos toxicológicos de los metales, mientras LC-MS, GC-MS o CE-MS permiten el análisis exhaustivo de biomarcadores (Lin *y col.*, 2010). En este sentido, la DIMS podría desarrollarse como un enfoque metabolómico rápido y eficaz para evaluar las

posibles alteraciones en los ciclos metabólicos causados por los metales tóxicos (Lin *y col.*, 2010), y por otro, el sistema GC-MS para medir metabolitos primarios de vital importancia biológica, tales como aminoácidos, ácidos orgánicos o hidratos de carbono, implicados en las vías esenciales en el metabolismo de los organismos (glucólisis, ciclo de Kreb's). Este workflow puede constituir una buena alternativa en toxicología. En particular, en el descubrimiento de biomarcadores potenciales.

Entre todas las posibles técnicas de separación previas a la detección por MS destaca la cromatografía líquida por su robustez y reproducibilidad (Wilson *y col.*, 2005), que posee, además, un amplio rango de aplicabilidad ya que existen distintos tipos de modos de separación, determinados por la fase estacionaria empleada. De esta forma es posible el estudio de compuestos de muy diversas características. Entre las variantes más empleadas se encuentra la cromatografía líquida de fase reversa (RP) para compuestos poco polares, la de fase normal (NP) para analitos polares, la de intercambio iónico (IEC) cuando los metabolitos poseen cargas, y de desarrollo más reciente, la cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC) que permite la separación de compuestos de elevada polaridad (Kind *y col.*, 2007). Además, la fase móvil juega un papel crítico en la separación cromatográfica y también facilita la ionización de los metabolitos en el sistema de MS. Además de la elección de disolventes apropiados (tales como acetonitrilo, metanol y agua) y los gradientes de disolvente basado en las propiedades químicas de las muestras, la adición de aditivos para suprimir las señales no deseadas o mejorar selectivamente las señales de interés puede aumentar en gran medida la capacidad de detectar y la sensibilidad para cuantificar compuestos particulares en una mezcla. Los dos tipos más comunes de aditivos son los ácidos y bases (ácido fórmico, acetato de amonio, etc.) para alterar el pH y compuestos

tales como tributilamina y trietilamina para formar pares iónicos. A su vez, además de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se pueden encontrar sistemas de ultra alta resolución (UPLC), de gran utilidad ya que mejoran considerablemente la resolución (tamaño de partícula <2 μm) y sensibilidad de los sistemas cromatográficos convencionales basados en el uso de HPLC (Yin *y col.*, 2006).

Por otro lado, el acoplamiento GC-MS se emplea ampliamente en metabolómica debido a su gran capacidad de separación, robustez instrumental y repetitividad de los espectros de masas, lo cual permite la cuantificación de los metabolitos (Zhang *y col*., 2012). Una de las consecuencias de esta robustez y repetitividad es la creación de librerías de tiempos de retención y espectros de masas (obtenidos normalmente empleando la interfase de impacto electrónico entre el cromatógrafo de gases y el espectrómetro de masas). En la actualidad esta técnica se emplea de manera muy frecuente en la búsqueda de biomarcadores en metabolómica (Yip *y col.*, 2013; García Sevillano *y col.*, 2015e). Como es bien sabido, un requisito que ha de cumplir un analito para ser susceptible de ser analizado por GC es que sea volátil y térmicamente estable. Sin embargo, la volatilidad se fuerza, en la mayor parte de casos, mediante derivatización química antes del análisis, y en el caso de estudios metabolómicos no dirigidos mediante el empleo de varios de estos derivatizantes con el fin de obtener la mayor información metabólica posible mediante la derivatización de la mayoría de los grupos funcionales de los metabolitos. Aunque es importante resaltar que esta etapa aumenta el tiempo de preparación de muestra y la complejidad de la misma, a la vez que añade una mayor incertidumbre al procedimiento experimental.

Por último, se ha demostrado que el empleo de CE-MS en metabolómica es una potente herramienta analítica complementaria a LC-MS y GC-MS, ya que permite el análisis de los analitos iónicos o de mayor polaridad que son difíciles de analizar mediante las otras técnicas. El acoplamiento de un detector tan selectivo como la MS a una técnica analítica tan versátil y que proporciona eficacias tan elevadas como la CE da como resultado una potente herramienta de análisis en metabolómica (Ramautar *y col.*, 2006). Los modos de CE más adecuados para su acoplamiento con MS son CZE y CEC ya que son los que emplean un tampón de separación más compatible (electrolitos volátiles) con la posterior detección mediante MS. Ya que los metabolitos de mayor importancia en los sistemas biológicos son polares e iónicos esta técnica de separación constituye una buena alternativa para su análisis. Además, a diferencia de GC y LC, que se basan en la distinta interacción de los analitos con la fase estacionaria, la CE separa los compuestos atendiendo a su relación m/z. Este hecho afianza la importancia del sistema CE-MS como una herramienta complementaria a los acoplamientos entre técnicas cromatográficas y la MS permitiendo numerosas aplicaciones en estudios metabolómicos (Soga *y col.*, 2003; Ramautar *y col.*, 2006; Barbas *y col.*, 2011).

Sin embargo, dada la complejidad del metaboloma de cualquier muestra biológica, el análisis metabolómico suele llevarse a cabo mediante varias plataformas analíticas. La combinación de la información procedente de distintas técnicas analíticas se traduce en la ampliación del conocimiento del metaboloma de los organismos en estudio y en el aumento de la probabilidad de éxito en la detección de potenciales biomarcadores entre muestras diferentes. Un ejemplo de la obtención de información complementaria procedente de DIMS y GC-MS se muestra en algunos de los artículos desarrollados en la presente Tesis.

Una vez analizadas las muestras, el procesamiento de datos y posterior análisis estadístico en metabolómica requiere la aplicación de dos disciplinas: la quimiometría y la bioinformática. La quimiometría puede ser definida como el conjunto de herramientas matemáticas y estadísticas para su aplicación en química (Lavine *y col.*, 2004) y por otro lado la bioinformática abarca el almacenamiento, obtención, análisis e interpretación de la información generada en un contexto biológico (Bains, 1996). A diferencia del procesamiento de datos en los estudios metabolómicos dirigidos que han sido ampliamente desarrollados, el procesamiento de datos constituye aun un reto para estudios metabolómicos no dirigidos, ya que en estos estudios, como ya se ha mencionado con anterioridad, se desconoce a priori la composición cualitativa y cuantitativa de la muestra a nivel metabólico, y, por tanto, cada una de las etapas del análisis metabolómico ha de ser optimizada, incluyendo el procesado y análisis estadístico de los datos. En este sentido, los datos procedentes del análisis ya sea por MS o RMN se caracterizan por ser altamente complejos y de gran volumen por lo que su procesamiento ha de realizarse con herramientas bioinformáticas especializadas (Mehrotra *y col.*, 2006). Para este propósito, los datos se deben transformar o convertir en formatos compatibles con las herramientas bioinformáticas que se vayan a aplicar posteriormente. El tratamiento de la gran cantidad de datos tan complejos obtenidos en este tipo de experimentos comprende generalmente una etapa inicial de preprocesado de la información (tratamiento del ruido, corrección de la línea base, normalización, alineamiento entre cromatogramas o electroferogramas, etc), y otra posterior de análisis estadístico de los resultados (Figura 32).

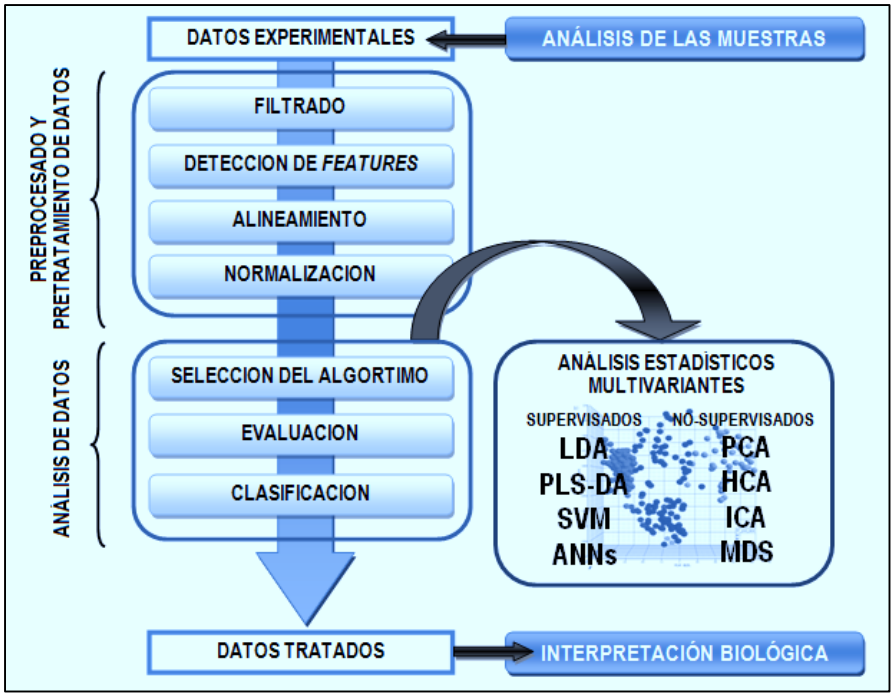



**Figura 32.** Esquema que recoge las etapas más importantes del tratamiento de datos en metabolómica (preprocesado, pretratamiento y análisis de datos provenientes de plataformas DIMS, GC-MS, LC-MS y CE-MS).

De forma general, las etapas principales que se llevan a cabo son: la detección de las especies iónicas (también llamados "*features*"), eliminación de las señales que no proceden de la muestra, alineamiento del tiempo de migración/retención y anotación de los picos detectados. Cuando se estudian huellas metabólicas mediante acoplamientos de LC-MS, GC-MS o CE-MS, el alineamiento entre cromatogramas o en su caso de electroferogramas es una etapa necesaria, dado que las variaciones en los tiempos de retención son una limitación en el empleo de las técnicas de separación, y pueden conducir a errores. Con este fin, se han utilizado diversos algoritmos multivariantes de alineamiento para el preprocesado de señales cromatográficas (De Vos *y col*., 2007; Smith *y col*., 2006). La elevada complejidad del metaboloma de muestras

biológicas hace imposible la posibilidad de su análisis de viso. En este sentido, los métodos de análisis estadístico multivariante resultan extremadamente útiles, al presentar la capacidad de reducir la dimensionalidad de los datos sin riesgo a perder información (Listgarten *y col.*, 2005; Van der Berg *y col.*, 2006).

Una de las herramientas más empleadas en quimiometría son las técnicas de reconocimiento de pautas (*pattern recognition*), cuyo objetivo es el determinar pautas (o patrones) de comportamiento de las muestras utilizando los datos analíticos obtenidos, extrayendo la mayor cantidad posible de información de dicha matriz de datos (Scholz *y col.*, 2005). Los métodos de reconocimiento de pautas no supervisadas forman grupos de muestras sin tener información *a priori* de su procedencia y clasificación. Por lo tanto, tienen como objetivo encontrar los grupos existentes en los datos a partir de agrupamiento de muestras similares. Entre estos métodos destacan por su mayor uso en estudios metabolómicos el análisis de componentes principales (PCA), el análisis de agrupaciones jerárquico (HCA) el análisis de clusters. Con la utilización de estos métodos no supervisados es posible la detección de muestras atípicas, muy diferentes al resto, también llamadas "*outliers*". La eliminación de dichos *outliers* corresponde al punto de partida de todo análisis estadístico. La detección de estas muestras atípicas es fundamental y previa a la aplicación de un análisis supervisado. Una vez que se dispone del total de muestras válidas (sin *outliers*) y los metabolitos apropiados (con baja desviación dentro de su grupo de clasificación), se puede proceder a la aplicación de técnicas estadísticas de clasificación supervisadas. Por otro lado, los métodos de reconocimiento de pautas supervisadas pretenden clasificar muestras. En este tipo de métodos la pertenencia de las muestras a un grupo o clase es conocida y se construye un modelo de clasificación y una vez hecho esto, se utiliza para predecir

a qué clase pertenecen otras muestras. Los métodos más comunes de reconocimiento de pautas supervisadas son el análisis discriminante (PLS-DA), el modelado blando independiente de analogía de clases (SIMCA), entre otros (Masuom *y col.*, 2006; Idborg *y col.*, 2005).

Tras el análisis estadístico, las señales metabólicas estadísticamente significativas, empleadas para la clasificación de los grupos (y por lo tanto, potenciales biomarcadores) se identifican para intentar asociar la variación observada en dichas moléculas con una explicación biológica coherente. Para ello, normalmente se llevan a cabo procesos de identificación tentativa. La identificación de los metabolitos de interés comienza con una búsqueda en bases de datos de metabolitos, algunas de las más empleadas se destacan en la tabla 3. Para RMN, la identificación no es tan tediosa como en el caso de MS ya que se disponen de bases de datos comerciales así como una amplia bibliografía con numerosas reseñas de distintos metabolitos. Así pues, en RMN una vez obtenidos los puntos espectrales que difieren entre las distintas condiciones, se procede a asignar a qué metabolitos pertenecen dichas señales para su posterior identificación. Para MS, en dichas bases de datos se coteja la masa obtenida a partir del valor de m/z proporcionado por el espectrómetro de masas y las masas teóricas de los metabolitos contenidos en dichas bases de datos. Es importante remarcar que cuanto mayor sea la exactitud del valor m/z proporcionado por el espectrómetro de masas utilizado para un determinado metabolito, mayor será la probabilidad de obtener una correcta identificación, de ahí la necesidad de utilizar espectrómetros de masas de alta resolución que proporcionan valores de m/z con errores de unas pocas partes por millón (ppm) e incluso inferiores.

Esta comparación de valores de m/z se completa con la comparación de los perfiles isotópicos experimentales y teóricos. Los perfiles isotópicos resultan de gran utilidad debido a que los átomos que forman las moléculas poseen isótopos naturales minoritarios, lo cual queda reflejado en el espectro de masas. Además las bases de datos están incorporando los patrones de fragmentación MS/MS para su comparación con los obtenidos experimentalmente. A modo de confirmación de la identificación tentativa de los metabolitos obtenida mediante el empleo de las bases de datos, se pueden emplear la inyección y análisis de patrones de aquellos metabolitos que estén disponibles comercialmente y que lógicamente deberán ser analizados en idénticas condiciones a las empleadas con las muestras del estudio metabolómico.

Por último, una vez obtenida la identificación tentativa de los metabolitos de interés (biomarcadores), es muy interesante vincular su alteración (debida por ejemplo a la exposición a un xenobiótico) con las rutas metabólicas en las que participan dichos metabolitos. Con la información obtenida, se pueden formular hipótesis del posibles perturbaciones o alteraciones observadas entre muestras profundizando en los procesos bioquímicos, lo cual puede dar lugar a hipótesis o trabajos futuros dirigidos a la determinación y cuantificación de metabolitos de especial interés en dichas rutas metabólicas, o biomarcadores de una determinada enfermedad, proceso o alteración metabólica.

**Tabla 3.** Bases de datos más utilizadas en la identificación de metabolitos en muestras biológicas.

| *Base de datos* | *Información destacada* |
|---|---|
| **HMDB** | Es una base de datos que contiene información detallada sobre los metabolitos del cuerpo humano. A través de ella se puede obtener información química, clínica y bioquímica del compuesto seleccionado, de forma directa o por medio de enlaces con otras bases de datos (KEGG, PubChem, MetaCyc, ChEBI, PDB, Swiss-Prot, y GenBank). (www.hmdb.ca). |
| **METLIN** | Es una base de datos enfocada a la espectrometría de masas de metabolitos. Está diseñada por el Centro Scripps para la Espectrometría de Masas. Contiene más de 75000 estructuras. Ofrece información sobre fórmula molecular y estructura de los metabolitos (espectros de masas y espectros de fragmentación), además del enlace a otras bases de datos (KEGG, HMDB, PubChem, LipidMaps). (metlin.scripps.edu/). |
| **MassBank** | Es una base de datos focalizada en el espectro de masas de alta resolución de metabolitos. Se pueden buscar los datos obtenidos de relaciones m/z así como obtener el espectro de la sustancia elegida. Entre las bases de datos a las que se puede acceder a través de ella, se encuentran KEGG, KNapSAcK y LipidBank. (www.massbank.jp) |

## 2.4. El empleo de la dilución isotópica en estudios metalómicos

La gran mayoría de los elementos químicos existentes en la naturaleza están constituidos por una mezcla de varios isótopos, que difieren entre sí sólo en el número de neutrones del núcleo. La masa atómica que normalmente utilizamos para cada elemento es una media ponderada de las masas de todos los isótopos de un elemento teniendo en cuenta la

abundancia natural que poseen. La mayor parte de los elementos de la tabla periódica poseen más de un isótopo estable y pueden ser determinados mediante dilución isotópica. Como consecuencia de esto, hoy en día podemos hacer uso de esta propiedad para llevar a cabo la cuantificación absoluta de sustancias química en base a alguno de sus elementos que la conforman como se explicará a continuación.

El análisis por dilución isotópica *("isotopic dilution analysis (IDA)"*) es una técnica analítica bien conocida basada en la medición de las relaciones isotópicas de algún elemento en muestras donde su composición isotópica natural ha sido alterada por la adición de una cantidad conocida de un elemento cuya abundancia isotópica natural se ha alterado. Desde su aparición, el uso del IDA para las determinaciones elementales está bien documentado en la literatura, lo que ha dado lugar a un gran número de revisiones y libros sobre esta temática (Rodríguez-González *y col.*, 2005; Heumann, 1992; De Bievre, 1994; Fasset *y col.*, 1989; Heumann, 1998). Para este propósito, la espectrometría de masa de ionización térmica (TIMS) se ha aplicado tradicionalmente para llevar a cabo la cuantificación elemental mediante IDA, pero recientemente, esta técnica está siendo sustituida por ICP-MS (Rodríguez-González *y col.*, 2005).

En su forma más sencilla, como ya se ha comentado, el análisis por dilución isotópica se basa en la adición de cantidades conocidas de sustancias isotópicamente enriquecidas a la muestra de interés (con abundancia isotópica natural) antes de ser analizada, modificando de esta forma su abundancia isotópica natural (Figura 33). Por tanto, desde un punto de vista analítico, un isótopo cuya abundancia isotópica haya sido modificada artificialmente

("enriquecida") constituye un patrón interno ideal para la medida por espectrometría de masas del elemento considerado.

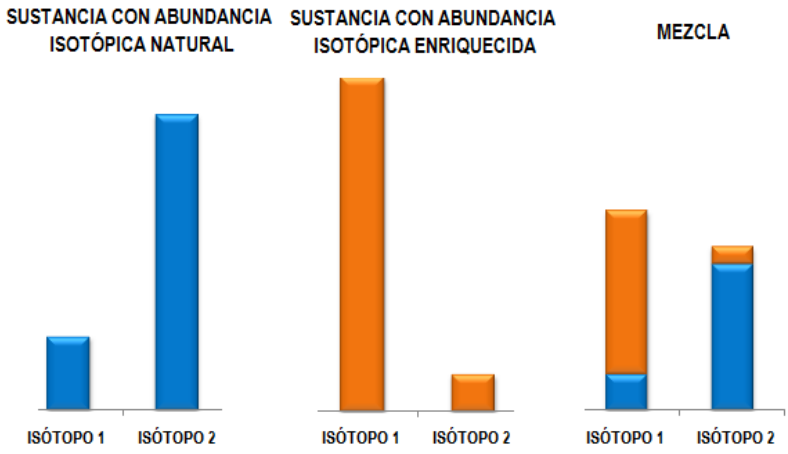



**Figura 33.** Ilustración del principio de análisis por dilución isotópica para un elemento que contiene dos isótopos.

Como se puede observar, el isótopo 2 es el más abundante en la muestra que queremos analizar (con abundancia isotópica natural) mientras que el "*spike*" está enriquecido isotópicamente en el isótopo 1. Es evidente que la abundancia de los dos isótopos y, por lo tanto, la relación isotópica en la mezcla será intermedia entre los de la muestra y el "*spike*" y que dependerá tanto de la cantidad añadida y de la cantidad inicial del elemento en la muestra. Esas relaciones se pueden expresar matemáticamente utilizando una ecuación simple para la dilución de isótopos. A modo de ejemplo, en el caso del selenio, que presenta seis isótopos naturales (74, 76, 77, 78, 80, 82), usando ICP-ORS-MS como sistema de detección se puede observar cómo se modifica la abundancia isotópica de éste al ser adicionada una cantidad equivalente de un patrón enriquecido en $^{77}$Se (Figura 34).

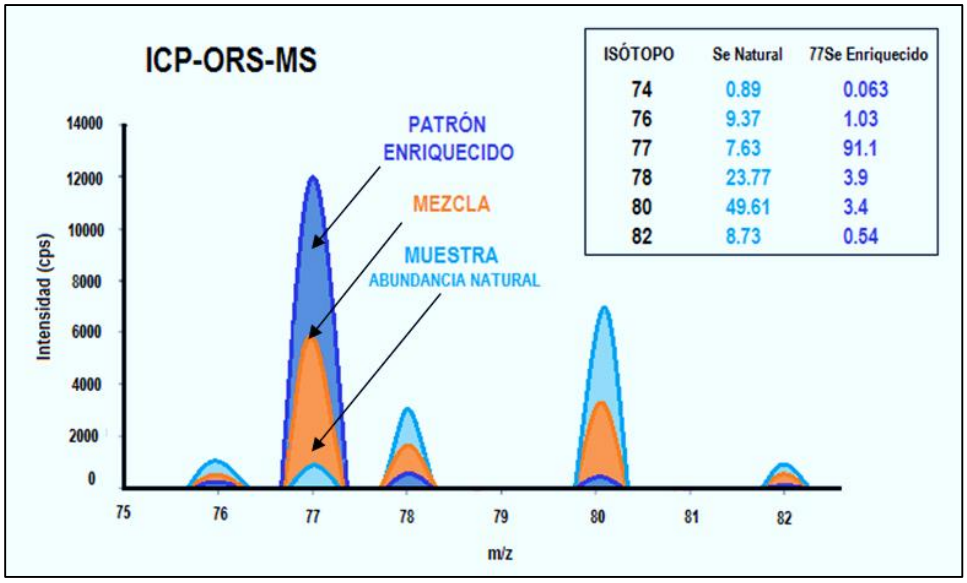



**Figura 34.** Ilustración del principio de análisis por dilución isotópica para el selenio analizado mediante ICP-ORS-MS.

Teniendo en cuenta lo anterior, el concepto de relación isotópica se puede ilustrar mediante la Figura 35 donde se representa el proceso de cuantificación del número de átomos azules que hay presentes. En un caso real, donde normalmente el número de átomos es muy elevado, pretendemos evitar tener que "contarlos directamente", en este caso podemos añadir un número conocido de átomos naranjas a la muestra. Tras una mezcla homogénea de ambos tipos de átomos extraeríamos de la muestra una cantidad representativa de átomos azules y naranjas que cueste menos esfuerzo contar que el número inicial de átomos azules. Por lo tanto, si se conoce el número de átomos naranjas (en nuestro caso 40), una vez analizada la relación entre el número de átomos azules y naranjas en la alícuota (A/N), se obtiene directamente el número total de átomos azules en la muestra inicial mediante una simple ecuación de relaciones isotópicas (Figura 35). Una característica importante de este método de cuantificación es que cualquier alícuota de la mezcla posee la misma relación A/N por lo que cualquier pérdida de la muestra

(durante su tratamiento o análisis), una vez mezclada, no afectaría al resultado final. Además esta relación A/N no depende del tamaño de la alícuota tomada aunque por efectos estadísticos un número superior de átomos da una mejor precisión y exactitud en la determinación.

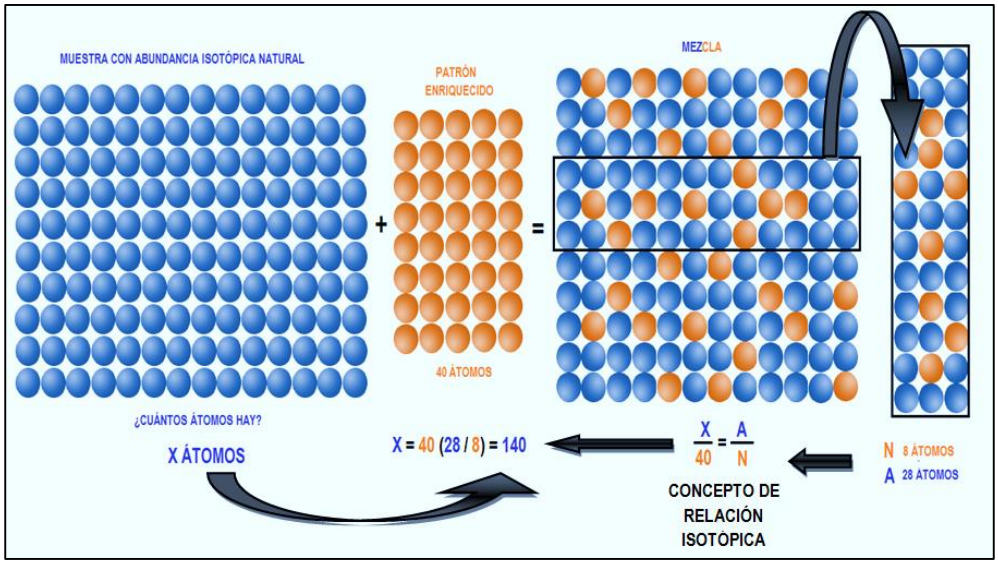



**Figura 35.** Representación de un experimento básico por dilución isotópica explicado con átomos azules (muestra a analizar) y átomos naranjas (patrón isotópicamente enriquecido).

La ecuación que permite determinar la concentración original del elemento en una muestra a partir de la medida de la relación isotópica en la mezcla se encuentra bien establecida, tras un elaborado desarrollo matemático (Rodríguez-González *y col.*, 2005; Heumann, 1992; De Bievre, 1994; Fasset *y col.*, 1989; Heumann, 1998), y depende del número de moles de un elemento poli-isotópico presente en la muestra, como del número de moles del mismo elemento en el patrón enriquecido o "*spike*", además de otras relaciones a tener en cuenta y que se comentan a continuación:

$$C_s = C_{sp} \frac{m_{sp}}{m_s} \frac{M_n}{M_{sp}} \frac{A_{sp}}{A_n} \frac{R_m - R_{sp}}{1 - R_m R_n}$$

Donde:

- $C_s$ es la concentración del elemento en la muestra.
- $C_{sp}$ es la concentración del elemento enriquecido o "*spike*".
- $m_s$ y $m_{sp}$ son las masas de muestra y "*spike*", respectivamente.
- $M_n$ y $M_{sp}$ son las masas atómicas del elemento en la muestra y en el "*spike*".
- $A_{sp}$ es la relación de abundancia de la mezcla en el "*spike*".
- $A_n$ es la relación de abundancia natural de la mezcla.
- $R_{sp}$ es la relación de la mezcla en el "*spike*".
- $R_m$ es la relación entre los isótopos 1 y 2 en la mezcla. (El "*spike*" debe tener al menos dos isótopos estables). Llamamos isotopo 1 e isotopo 2 a dos isótopos del "*spike*" que cumplen dichas características, siendo el isótopo 2 el minoritario).
- $R_n$ es la relación natural de los isótopos.

Los parámetros anteriores son todos conocidos a excepción de $R_m$ que puede determinarse experimentalmente mediante ICP-ORS-MS midiendo la abundancia de los isótopos 1 y 2 en la mezcla muestra/"*spike*", es decir, la concentración del elemento en la muestra $C_s$ se determina con la simple medida de $R_m$ mediante espectrometría de masas.

En resumen, es posible conocer la concentración de un elemento en la muestra mediante la medida del cambio provocado en una relación isotópica concreta del elemento estudiado, ya que las abundancias isotópicas de la mezcla y, por tanto, las relaciones isotópicas, serán intermedias entre las de la muestra y el "*spike*", y dependerán tanto de la cantidad de "*spike*" adicionado como de la cantidad original del elemento en la muestra.

Para este propósito, la técnica ICP-MS se utiliza actualmente dada su elevada sensibilidad, ya que la mayoría de las especies se encuentran en concentraciones muy pequeñas evitando de esta forma la posible pérdida de información y sobre todo por su carácter multi-isotópico, necesario para poder llevar a cabo la cuantificación mediante el empleo de esta técnica. Por lo tanto, con el fin de aplicar el análisis de dilución isotópica en especiación química y metalómica, como ya se mencionó, una separación previa de la especies es requerida antes de ser detectada por ICP-MS como detector específico.

Al contrario que en otras técnicas de cuantificación, como adición estándar o calibración externa, mediante IDA no existe ningún parámetro relativo a la sensibilidad instrumental. Por tanto, la primera ventaja del análisis por dilución isotópica es que cualquier variación de sensibilidad debida a inestabilidades instrumentales como la deriva de la señal del plasma o los efectos de matriz no tendrá ninguna influencia en el valor final de la concentración del elemento de interés en la muestra. Por otro lado, los posibles errores en la medida de la concentración dependen fundamentalmente de la incertidumbre de la medida de la relación isotópica $R_m$. Los pesos atómicos de la muestra y del trazador se conocen y la cantidad de muestra y patrón isotópicamente enriquecido también son conocidos. Las abundancias isotópicas naturales de los

analitos son conocidas y coinciden con las tabuladas por la IUPAC, y por otra parte, las abundancias isotópicas del patrón enriquecido o "*spike*" se pueden determinar previamente o ser conocidas de antemano si se usa uno previamente certificado. Otra de las ventajas más relevante del análisis por IDA para análisis elemental es que, una vez alcanzado el equilibrio isotópico entre la muestra y el trazador, cualquier pérdida de sustancia de la mezcla no va a tener ninguna influencia en el resultado final, ya que como se indicó anteriormente cualquier alícuota de la muestra diluida isotópicamente contendrá la misma relación $R_m$ y por tanto, no habrá necesidad de conocer los factores de dilución o preconcentración. Por último, cabe resaltar que como la medida de $R_m$ proporciona directamente la concentración inicial del elemento en la muestra no es necesario recurrir a la calibración externa ni a métodos de adiciones estándar por lo que en IDA se consigue un ahorro considerable en el tiempo de análisis respecto a los métodos analíticos convencionales de cuantificación.

Sin embargo, para que todas estas afirmaciones sean veraces se han de cumplir algunos requisitos. En primer lugar, se tiene que tener en cuenta que cualquier pérdida de sustancia (ya sea de muestra o de trazador) antes de que se produzca el equilibrio isotópico será una fuente de error importante. Además, una vez que se haya alcanzado el equilibrio isotópico, el isótopo enriquecido añadido a la muestra deberá comportarse de una manera idéntica respecto al elemento natural a lo largo de todo el proceso analítico. Por otra parte, la medida de las intensidades de los isótopos 1 y 2 realizada por el espectrómetro de masas debe estar libre de interferencias espectrales y los factores que afectan a la exactitud de la medida de las relaciones isotópicas (como la discriminación de masas o el tiempo muerto del detector) deben estar controlados como se verá en el experimental de la presente Tesis. Finalmente, también se han

de controlar exhaustivamente los valores del blanco ya que cualquier tipo de contaminación que afecte a la muestra isotópicamente diluida conducirá a valores erróneos de $R_m$. Es importante tener en cuenta que en el caso de que cualquiera de estos requisitos no se cumpla, la relación isotópica medida no proporcionará un valor exacto de la concentración inicial del analito de interés en la muestra.

### 2.4.1. Necesidad e importancia de la dilución isotópica en estudios de especiación química y metalómica

En los últimos años hemos visto numerosas aplicaciones metodologías mediante IDA en campos novedosos. Algunos de estos nuevos campos son la especiación química y metalómica donde el objetivo es la cuantificación de especies químicas individuales en las que un elemento se distribuye en un material biológico dado, tal como un tejido o fluido biológico (Goenaga-Infante *y col.*, 2003; Castillo-Busto *y col.*, 2006). La selección de una técnica de separación adecuada es de suma importancia y dependerá de la naturaleza de las especies que se determinen y muestra a analizar, siendo las técnicas más utilizadas las cromatográficas tales como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o cromatografía de gases (GC) y otras técnicas de separación tales como electroforesis capilar (CE), que como ya se mencionó en apartados anteriores son ampliamente usadas en este tipo de estudios. El acoplamiento de estas técnicas de separación a ICP-MS ha sido en los últimos años una de las herramientas más poderosas para la especiación elemental y metalómica. Aunque la CE requiere interfases y sistemas de nebulización más sofisticadas para poder ser acoplado a ICP-MS, los acoplamientos HPLC o GC son especialmente fáciles, ya que los flujos de líquidos o gases, respectivamente, pueden ser introducidos

directamente en la antorcha ICP con una ligera perturbación del plasma y sin ninguna división o proceso de dilución previo. Además, dependiendo de cuándo y de la forma química en la que isótopo enriquecido (*spike*) es añadido a la muestra, la aplicación de IDA en especiación química y metalómica se puede realizar bajo dos modos diferentes (Heumann, 1990), que serán comentados a continuación.

- **Modo de especies inespecíficas.**

En el modo de especies inespecífica, la adición del patrón isotópicamente enriquecido o "*spike*" se lleva a cabo después de la separación completa de las especies de la muestra, lo que se conoce como "*spiking post-column*". En este modo, el patrón isotópicamente enriquecido o "spike" puede existir en una forma química diferente a la de las especies que se determinen, ya que los únicos requisitos previos que deben cumplirse son la ausencia de pérdida de analitos antes de la mezcla completa entre las especies de analito con abundancia isotópica natural y el "spike" antes del proceso de ionización, con el fin de medir con precisión la relación isotópica correspondiente. Este modo es especialmente útil cuando la estructura y la composición de las especies analizadas no son exactamente conocidas o cuando los correspondientes compuestos marcados isotópicamente no están comercialmente disponibles o no pueden ser sintetizados. Pero en este caso, cualquier pérdida de muestra antes de la separación cromatográfica no será corregida. Sin embargo, es la única alternativa para la cuantificación cuando no se dispone de un estándar para las especies de analito, como ocurre normalmente en metalómica. Además, este modo de "*spiking*" sólo se puede aplicar cuando la eficiencia de ionización del elemento es independiente de la forma química. Por lo tanto, sólo el ICP-MS se ha utilizado hasta ahora para

la dilución de isótopos post-columna ya que la eficiencia de ionización en esta fuente de iones se pueden considerar independiente de la forma química del elemento (Schwarz *y col.*, 2002) (Figura 36A). No obstante, es importante destacar que se han obtenido diferencias en la respuesta de las diferentes especies de un mismo elemento al utilizar nebulizadores ultrasónicos con desolvatación por membrana o con matrices altamente complejas (Heumann, 2004). En estas circunstancias, se podrían obtener resultados erróneos mediante IDA.

- **Modo de especies específicas**

Por el contrario, el modo de especies específicas requiere el uso de una solución de "*spike*" que contiene la especie o las especies a analizar en una forma isotópicamente enriquecida, como en la técnica de dilución de isótopos clásica para compuestos orgánicos. Por lo tanto, en contraste con el modo de especies no específicas, la composición y estructura de las especies de interés deben ser conocidas con exactitud, ya sea con el fin de sintetizar las especies correspondientes enriquecidas o adquirir la solución "*spike*" adecuada si está disponible comercialmente. En este modo, se añade la disolución de "*spike*" a la muestra al principio del procedimiento analítico, y una vez que se consigue el equilibrio completo entre las especies enriquecidas añadidas y las de origen natural en la muestra, presentando en este modo todas las ventajas tradicionales del análisis por IDA discutidas anteriormente (Figura 36B). Por otra parte, cuando se analizan varias especies de un mismo elemento, cada compuesto puede ser enriquecido en un isótopo diferente del elemento de interés lo que abre el camino a nuevas formas de cuantificación y la corrección de las reacciones de interconversión de especies durante el procedimiento de análisis.

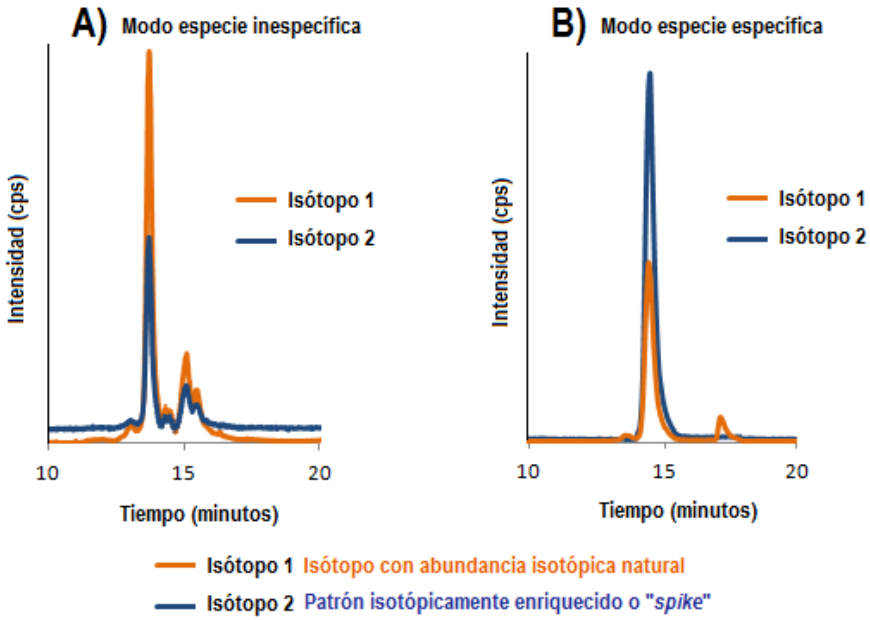



**Figura 36.** Señales transitorias obtenidos para dos relaciones isotópicas de m/z diferentes cuando se aplica (a) modo especies inespecífico mediante ICP-ORS-MS y (b) modo especies específico mediante ICP-ORS-MS.

En la presente Tesis Doctoral se hará uso del modo de cuantificación por dilución isotópica especies inespecíficas ("*species-unspecific isotopic dilution*", SUID) para la cuantificación absoluta de selenoproteínas y proteínas que contienen selenio y metaloproteínas que contienen cobre, al no disponerse de patrones comerciales para llevar a cabo su cuantificación, por lo que se profundizará más a continuación en este modo de IDA.

El modo SUID es el principalmente utilizado en el campo de especiación química y metalómica. La adición del patrón enriquecido isotópicamente se realiza tras la separación, normalmente cromatográfica, de las especies endógenas de la muestra (adición en línea o post-columna). En este caso el "*spike*" se puede añadir en una forma química distinta a las formas

químicas presentes en la muestra ya que los únicos requisitos que se han de cumplir son: i) que no haya pérdidas de sustancia antes de la adición del trazador y ii) que el trazador y las especies a analizar (previamente separadas) se mezclen completamente antes del proceso de ionización, permitiendo, de esta manera, una medida exacta de las relaciones isotópicas.

En 1994, Rottmann y Heumann describen la primera aplicación de análisis por dilución isotópica-especies inespecífica (Rottmann y Heumann *y col.*, 1994a-b). En este trabajo pionero, se desarrolló un enfoque basado en la técnica de dilución isotópica en línea junto con HPLC-ICP-MS y se aplicó para la determinación de complejos metálicos con sustancias húmicas en agua de río.

La figura 37 muestra un diagrama esquemático de la configuración instrumental como la que fue empleada por Rottman y Heumann. La adición continua de la solución de "*spike*" que contiene los isótopos enriquecidos se lleva a cabo mediante una bomba peristáltica de tal manera que se mezcla completamente y continuamente a través de una pieza en T con el efluente que eluye de la columna cromatográfica para llevar a cabo la cuantificación de las especies que se quieren determinar. En resumen, la base de esta técnica de IDA en línea se basa en el trazado del flujo másico en función del tiempo de retención. El flujo másico se calcula mediante la medición de la relación isotópica correspondiente a lo largo de toda la serie cromatográfica y tras un desarrollo matemático, mediante el empleo de hojas de cálculo, en la que se hace uso de la ecuación clásica del análisis por IDA en cada punto del cromatograma. Considerando que no hay discriminación de las especies durante el proceso de ionización, se puede obtener un perfil de flujo másico. En este sentido, con el fin de obtener la concentración de las diferentes especies de

interés en la muestra, los diferentes picos detectados tienen que ser integrados y normalizados para el volumen de inyección. Cabe destacar que el flujo de masa creado por la solución de "*spike*" post-columna debe ser calibrado mediante análisis de dilución de isótopos inversa antes de calcular el flujo de masa de la muestra en función del tiempo, como será detallado en el experimental de esta Tesis.

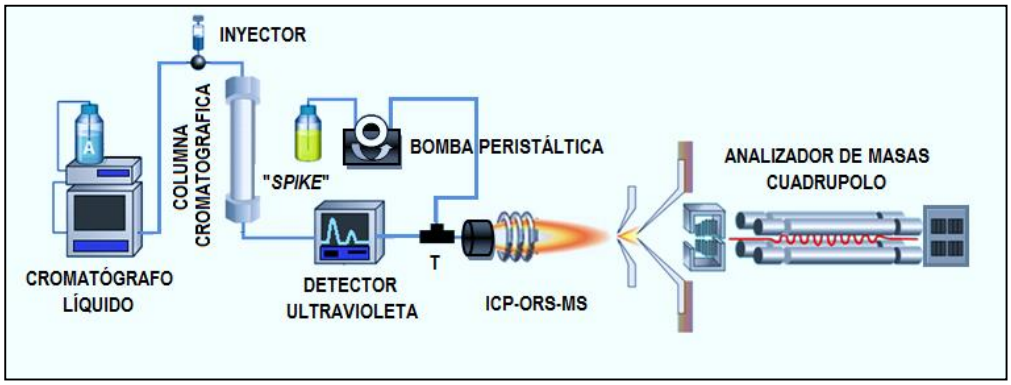



**Figura 37.** Diagrama esquemático instrumental empleado con el fin de llevar a cabo el análisis por dilución isotópica en modo especies inespecífica mediante HPLC-ICP-MS.

### 2.4.2. La técnica de deconvolución de patrones isotópicos

Se han propuesto numerosos métodos para investigar y evaluar las necesidades de minerales en los organismos vivos, incluidos los estudios de balance de masa e isótopos minerales. Los estudios de balance de masas, a partir de mediciones simultáneas de la ingesta y la excreción (urinaria y fecal) del elemento suministrado, proporcionan una información importante acerca de las recomendaciones dietéticas minerales. Sin embargo, estos estudios no proporcionan información sobre la absorción real, cinética o interacciones de los suplementos. Otra de las modalidades de IDA, matemáticamente más compleja, es el empleo de dos patrones

enriquecidos isotópicamente en lugar de uno como hemos visto anteriormente, en el que uno actúa como trazador isotópico y el segundo como "*spike*" para llevar a cabo la cuantificación (González-Iglesias *y col.*, 2009). Por lo que en este caso, a diferencia de los análisis por IDA convencional, es necesario que el elemento usado contenga al menos tres isótopos estables o de larga vida media (Figura 38). Para llevar a cabo este análisis cuantitativo por IDA se emplea una herramienta matemática denominada deconvolución de perfiles isotópicos ("*Isotope Pattern Deconvolution*, IPD"), que permite estimar la contribución individual de estos patrones enriquecidos isotópicamente (de igual m/z) a un determinado perfil isotópico obtenido mediante espectrometría de masas. El perfil isotópico obtenido se considera como una combinación lineal de los patrones isotópicos de las diferentes especies isobáricas y la combinación de cada uno de ellos se calcula mediante regresión lineal multivariable.

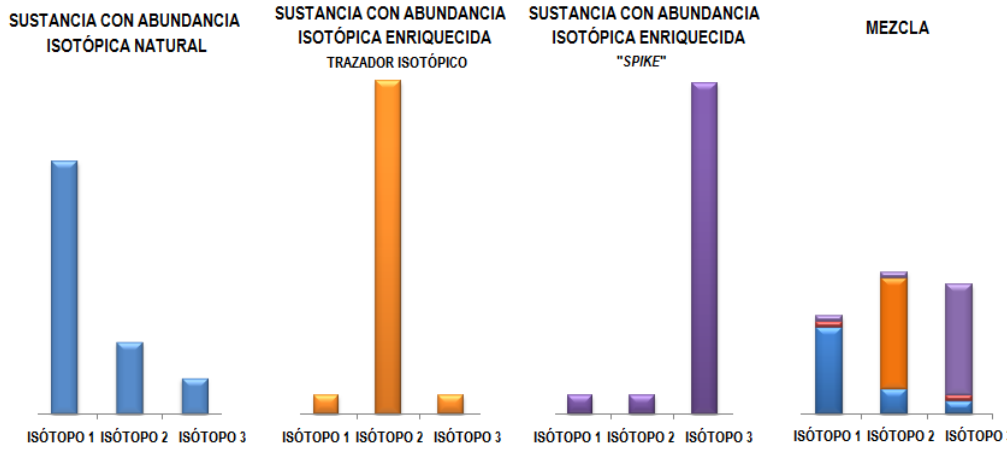



**Figura 38.** Ilustración del principio de análisis por deconvolución de patrones isotópicos para un elemento que contiene tres isótopos.

Esta propuesta matemática ha sido aplicada previamente a la caracterización de los espectros de masas de los fragmentos moleculares con elementos poli-isotópicos, para la medida precisa de relaciones isotópicas en la elucidación de las vías de fragmentación de clusters moleculares (Andrade *y col.*, 2008), para la eliminación de interferencias de masas (Meija *y col.*, 2006) y para estudios de interconversión de especies (Meija *y col.*, 2005). Más recientemente, ha resultado ser una herramienta muy útil en estudios clínicos, pero sobre todo en estudios nutricionales y metabólicos, como se verá a continuación.

El uso de isótopos estables como trazadores metabólicos enriquecidos isotópicamente usando como detector ICP-MS se ha extendido ampliamente en los últimos años como ya se ha comentado (Sturup *y col.*, 2008). En este sentido, el metabolismo mineral en los seres humanos y los animales también puede ser investigado más profundamente utilizando como trazadores radioisótopos. Los isótopos radioactivos comenzaron a ser muy populares en la década de 1940 para estudiar la absorción de minerales y el metabolismo, pero este enfoque ha disminuido en popularidad en los últimos años debido al riesgo que presenta la radiactividad para los organismos (Abrams, 1999; Patterson *y col.*, 2001). Por el contrario, el uso de trazadores de isótopos estables para estudiar el metabolismo mineral y problemas nutricionales importantes se ha expandido rápidamente en las últimas dos décadas, en particular en estudios de nutrición humana (Abrams, 2003). Los isótopos estables tienen una serie de ventajas sobre los radioisótopos incluyendo: (i) no se produce exposición a la radiación; (ii) hay elementos que carecen de un radioisótopo que se puede utilizar satisfactoriamente como un trazador; (iii) existe la posibilidad de utilizar múltiples isótopos estables de un elemento dado; (iv) se pueden administrar simultáneamente o secuencialmente múltiples isótopos de varios elementos diferentes para investigar los efectos

sinérgicos o de desintoxicación de un elemento dado en las funciones biológicas de los demás; y (v) la aplicación ICP-MS ha permitido una detección sencilla y la determinación de tales isótopos estables (González-Iglesias *y col.*, 2007).

Los experimentos de exposición a organismos modelo basados en el empleo de isótopos enriquecidos estables es una buena alternativa para evaluar el metabolismo de los diferentes elementos o sustancias químicas bajo condiciones experimentales controladas. Con el fin de entender la toxicología y las vías metabólicas de sustancias tóxicas y esenciales, se han desarrollado numerosas estrategias analíticas para obtener información cualitativa y cuantitativa sobre los elementos, especies de elementos, sus interacciones, transformaciones y funciones en los sistemas biológicos.

Por lo tanto, el uso de los isótopos estables en relación al ICP-MS es hoy en día un enfoque más útil en el campo de los estudios nutricionales, ya también puede proporcionar datos cuantitativos sobre los elementos esenciales o tóxicos endógenos y exógenos y su metabolismo (Rodríguez-Cea *y col.*, 2006; Rodríguez-González *y col.*, 2005). Para este propósito, se ha aplicado recientemente la IPD en ratas expuestas a butilestaño marcado isotópicamente para estudiar su metabolismo utilizando GC-ICP-MS (Meija *y col.*, 2005). Por otro lado, en un trabajo realizado por González-Iglesias *y col.*, los autores aplican IPD para explorar la posibilidad de utilizar dos isótopos estables enriquecidos, uno como trazador metabólico y el otro como "*spike*" para la cuantificación, para diferenciar entre selenio endógeno y selenio suplementado o exógeno en la orina de ratas y suero mediante ICP-MS. En este estudio, las ratas lactantes fueron alimentadas con leche de fórmula suplementada con Se en la forma de $^{77}SeO_2^{-3}$ y las

determinaciones de selenio se llevaron a cabo con $^{74}$Se como "*spike*" de cuantificación. Un enfoque matemático, basado en el uso de los tres patrones isotópicos de selenio (naturales, $^{77}$Se y $^{74}$Se) permite la transformación de las abundancias de los isótopos medidos y con esto, las concentraciones precisas de selenio con abundancia natural (endógeno) y el $^{77}$Se administrado (exógeno) presente en las muestras (González-Iglesias *y col.*, 2007). Con el mismo fin, recientemente se ha empleado esta técnica por estos mismos autores usando en este caso una suplementación de $^{57}$Fe (González-Iglesias *y col*., 2012). Al igual que en el caso de IDA, esta técnica puede ser aplicada a estudios de especiación química mediante acoplamientos cromatográficos usando ICP-MS como detector, empleando un patrón enriquecido isotópicamente o "*spike*" post-columna para llevar a cabo la cuantificación.

En resumen, el uso de isótopos estables en conexión con IPD ha demostrado ser una nueva y poderosa estrategia para estudiar cuantitativamente la absorción y/o la biodisponibilidad de especies en estudios metabólicos y nutricionales. Además, la cuantificación exacta de especies endógenas y exógenas (suplementadas) mediante el uso de esta técnica ha demostrado ser más útil para estudiar la cinética de metabolismo y puede ser exportable a una amplia variedad de elementos esenciales y tóxicos que contienen varios isótopos estables. Por otro lado, muchas aplicaciones fructíferas de IPD en el futuro se pueden prever en los estudios cinéticos cuantitativos de la captación e incorporación de los metales o semimetales en biomoléculas como proteínas y metaloproteínas, como se verá en los resultados de la presente Tesis Doctoral.

### 2.4.3. Metodologías analíticas basadas en el análisis por dilución isotópica

En 1994, Rottmann y Heumann describen por primera vez el desarrollo de una innovadora técnica de dilución isotópica en línea mediante el acoplamiento de un sistema de HPLC (exclusión de tamaño) a un ICP-MS y su aplicación a la cuantificación de cobre y las interacciones de molibdeno o complejos con sustancias disueltas orgánicas (como ácidos húmicos) en el agua del río después de su separación por su masa molecular relativa (Rottmann y Heumann, 1994a-b; Heumann y Rottmann, 1994). Otras aplicaciones de este mismo grupo de investigación estudian los complejos de níquel y plomo con materiales orgánicos disueltos en muestras de diferentes sistemas acuáticos, así como los complejos de hierro mediante el uso de ICP-MS de alta resolución (Rottmann y Heumann, 1994b). Diferentes muestras como aguas subterráneas, aguas residuales y aguas de infiltración, así como una muestra conteniendo ácidos fúlvicos fueron también analizados utilizando esta técnica para la determinación simultánea de los complejos de los metales pesados comentados anteriormente más Ag, Cd, Tl, U , W, Zn y Zr usando una disolución multielemental de patrones enriquecidos isotópicamente (Volg y Heumann, 1997).

Como ya se ha comentado, ciertas formas de Se en la dieta pueden presentar varias ventajas para mejorar la salud humana y regular el riesgo de enfermedades, como el cáncer. Se han propuesto en la bibliografía varios métodos cromatográficos para la separación de selenoproteínas en plasma o suero, para evaluar el estado de Se en humanos. Estos métodos se basan en cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) (Palacios *y col.*, 2006), cromatografía de

intercambio aniónico (AEC) (Hinojosa-Reyes *y col.*, 2003) y cromatografía de afinidad (AFC) (Hinojosa-Reyes *y col*., 2003). La SEC no proporciona resultados cuantitativos precisos sobre el contenido de selenoproteínas ya que la resolución cromatográfica es baja y provoca la superposición entre picos de las proteínas que contienen selenio con alta abundancia (Palacios *y col.*, 2006). Por otro lado, la AEC proporciona una buena recuperación de los analitos aunque la resolución cromatográfica tampoco es aceptable (Hinojosa-Reyes *y col.*, 2003). Por último, cuando se utiliza la AFC, la glutatión peroxidasa extracelular (eGPx) se retiene débilmente y coeluye con otro componentes de la matriz, que causan dificultades para la cuantificación exacta de las diferentes especies de selenio, como cloruros y bromuros y especies de selenio de baja masa molecular (Hinojosa-Reyes *y col.*, 2003). En este sentido, se debe considerar la alta concentración de cloruros y bromuros en fluidos biológicos, tales como plasma y suero (~3,5 g $L^{-1}$ y ~3,5 mg $L^{-1}$, respectivamente) (Jitaru *y col.*, 2010), que coeluyen con la eGPx y Se-metabolitos si se utilizan los procedimientos citados, como se indicó anteriormente. Para evitar este inconveniente la AEC ha sido recientemente acoplada en línea a la AFC para el análisis de proteínas que contienen Se y de esta forma reducir las interferencias espectrales causadas por cloruros y bromuros, utilizando el sistema ICP-ORS-qMS como detector (Jitaru *y col.*, 2008). La aproximación metodológica anterior para la cuantificación de proteínas de selenio y de las especies de selenio inorgánicas en suero humano se ha mejorado en la presente Tesis Doctoral mediante el uso de la dilución isotópica, SUID-ICP-ORS-qMS, y el acoplamiento en línea de las unidades cromatográficas citadas: 2D/SEC-AF-HPLC y 3D/SEC-AF-AEC-HPLC, que incorporan un segundo componente cromatográfico de exclusión de tamaño. Usando esta disposición cromatográfica, la interferencia espectral producida por bromuro y cloruro se eliminan y el tiempo

de ejecución cromatográfica total es inferior a 35 min. De esta forma se ha puesto a punto, por primera vez, un método de especiación fiable para el análisis de eGPx, SEP, SeAlb y compuestos inorgánicos de selenio (García-Sevillano y *col.*, 2013a; 2014g).

Por otro lado, Díaz Huerta *y col.* (Díaz-Huerta *y col.*, 2003) llevaron a cabo el análisis cuantitativo de especies de selenio en muestras de levadura y harina de trigo después de una hidrólisis enzimática con proteasa y lipasa. La cuantificación de especies conocidas y desconocidas presentes en las muestras fue posible mediante el uso de SUID en combinación con la cromatografía de intercambio aniónico haciendo uso de las mismas condiciones instrumentales publicadas por Hinojosa Reyes y col. (Hinojosa-Reyes *y col*., 2003). Los resultados mostraron que el selenometabolito principal en ambas matrices era selenometionina con un 59% y 68% del contenido total de Se en la harina de trigo y levadura, respectivamente.

En este sentido, se ha optimizado la especiación cuantitativa de los elementos unidos a metalotioneínas (MTs) por electroforesis capilar (CE)-ICP-MS aplicando SUID para llevar a cabo la cuantificación (Schaumlffel *y col.*, 2002). Usando esta disposición instrumental, tras la separación electroforética, el flujo se mezcló mediante el uso de una interfase casera con una disolución que contenía los elemento enriquecidos de interés, en este caso $^{34}S$, $^{65}Cu$, $^{68}Zn$ y $^{116}Cd$, antes de la entrada al nebulizador del ICP-MS. De esta forma, el equilibrio entre los elementos isotópicamente enriquecidos y las muestras se logra fácilmente y la detección específica del metal en las diferentes isoformas de MTs de hígado de conejo permite su cuantificación. Sin embargo, en una publicación adicional (Wang y Prange, 2002), se demostró que el uso de capilares de superficie modificada ofrece mejoras en la separación de las isoformas de MTs. En este trabajo,

se separaron hasta nueve complejos MTs en una preparación comercial de hígado de conejo mediante el uso de un polímero aniónico, y se caracterizaron las fórmulas estequiométricas de cada metal-MTs. Adicionalmente, Polec-Pawlak *y col.*, aplica esta metodología para la determinación de la estequiometría de complejos metálicos de MTs inducidas en el hígado de ratas expuestas subcutáneamente a $Cd^{2+}$. En este trabajo, se obtuvo, además el peso molecular del complejo mediante el uso de la espectrometría de masas con electrospray (ESI-MS) (Polec-Pawlak *y col.,* 2002b). En este sentido, otros autores han comparado tres instrumentos ICP-MS diferentes para estudiar la unión del Cd al estándar MT-1 de hígado de conejo (Ferrarelo *y col*., 2002). En este trabajo, se empleó el acoplamiento SUID-RP-ICP-MS para estudiar los resultados de análisis de especies con tres espectrómetros ICP-MS diferentes (tiempo de vuelo, doble enfoque y cuadrupolo). En todos los casos, el uso de SUID fue capaz de corregir los efectos de la matriz y deriva de la señal, lo que permite la determinación precisa de la concentración total de MT y la distribución real de sub-isoformas unidas a Cd. Los resultados mostraron que aunque los tres instrumentos proporcionan mediciones cuantitativas precisas de Cd total y de Cd-MTs, el contenido de metanol de la fase móvil (utilizado como modificador orgánico) afecta la cuantificación por doble enfoque y cuadrupolar. El instrumento TOF mostró una menor deriva de la señal y pérdida de sensibilidad. Por lo tanto, con este sistema se logró una mejor precisión en la relación isotópica y límites de detección más bajos en comparación con los otros dos espectrómetros de masas.

Del mismo modo, Goenaga-Infante *y col.* (Goenaga-Infante *y col.*, 2003) aplicaron la SUID con el fin de llevar a cabo la especiación cuantitativa de Cu, Zn y Cd en extractos citosólicos de riñón de carpas y extractos citosólicos hepáticos de anguilas. En este caso, la SEC fue elegida

como técnica de separación, acoplada a un ICP-TOFMS. Se obtuvieron diferencias cuantitativas y cualitativas significativas entre las carpas control y expuestas a Cd para Cu, Zn y Cd unidos a MTs. Además, las anguilas fueron seleccionadas como "organismos centinelas" con el fin de evaluar la contaminación ambiental en tres ambientes acuáticos diferentes de Bélgica. Los resultados demuestran que la inducción de MT hepática en anguila era útil como un marcador biológico de la exposición a metales pesados. Sin embargo, el uso de SEC carece de la selectividad para distinguir entre las distintas isoformas de MTs, y por lo tanto, es necesaria una segunda dimensión cromatográfica adicional de purificación. En este sentido, Rodríguez-Cea y colaboradores (Rodríguez-Cea *y col*., 2006) llevaron a cabo la separación de las posibles isoformas de MTs por SEC, seguida de cromatografía de intercambio iónico. Este sistema de separación de dos dimensiones (2D/SEC-AEC) permitió la cuantificación de cada isoforma de MTs. La metodología propuesta se aplicó también al análisis de extractos de anguilas salvajes procedentes de un río contaminado en Asturias, pero se encontraron niveles relativamente bajos de Cd en todos los individuos.

En este mismo sentido, Sariego-Muñíz (Sariego-Muñíz *y col*., 2001) desarrolló la primera aplicación de la SUID a la especiación elemental en suero humano. La separación de proteínas se logró mediante el uso de AEC y el contenido de metal en las diferentes fracciones se llevó a cabo mediante el bombeo de manera continua de una disolución con los trazadores enriquecidos isotópicamente $^{57}Fe$, $^{65}Cu$ y $^{67}Zn$ tras la salida de la columna cromatográfica. Se empleó un ICP-MS de doble enfoque para la separación adecuada de las interferencias poliatómicas en el suero, con lo que se lograba una medida de los diferentes isótopos de los elementos de interés. Se separaron tres grupos principales de proteínas (inmunoglobulinas, albúmina y transferrina) en las

muestras de suero procedentes de pacientes en hemodiálisis y de voluntarios sanos. Se encontraron importantes diferencias cuantitativas y cualitativas entre los datos de especiación de Fe. En los voluntarios sanos se encontró que el Fe se eluye unido a la transferrina y a la albúmina, mientras que en los pacientes urémicos, el pico Fe-albúmina desapareció. Aunque no se aclararon las causas de las diferencias observadas, se demostró que los estudios cuantitativos de especiación por medio de SUID podrían emplearse como una herramienta adecuada con fines de diagnóstico.

## 2.5. PROBLEMÁTICA AMBIENTAL: LA RESERVA NATURAL DE DOÑANA.

La Reserva Natural de Doñana es un espacio protegido de 108.086 ha, situada al suroeste de España, al Norte del Estuario del Guadalquivir, comprendido entre las provincias de Huelva, Sevilla y Cádiz (Figura 39). El interés de la región de Doñana deriva de su visión como un complejo ecológico, donde las relaciones entre fauna, flora y aspectos físicos del ecosistema adquieren espectacular magnificencia, alcanzando la categoría de monumento natural (García-Novo *y col.*, 1977).




**Figura 39.** Situación geográfica del Parque Nacional de Doñana.

En reconocimiento a su importancia cultural, turística, científica y paisajística, e intentando abarcar los diferentes ambientes naturales que la componen, para su mejor preservación, se crea el Decreto 2412/1969 de 16 de octubre de 1969, que convierte este enclave natural en el Parque Nacional de Doñana (PND). Éste ocupa una extensión de 54.252 ha, uno de los humedales más importantes de Europa, integrado en el Convenio de Ramsar para la protección de los humedales, reconocido por la UNESCO primero como Reserva de la Biosfera (1994) y luego como Patrimonio de la Humanidad. Además, unas 20.000 ha forman la Zona de Protección del PND. En 1989, se crea el Parque Natural de Doñana, estrechamente unido al Parque Nacional, con el que comparte ecosistemas, y que cubre una extensa región natural de gran valor ecológico de 53.835 ha, duplicándose doblemente su extensión.

Con la creación del Parque Nacional de Doñana, la zona cobra un especial interés como eslabón en una cadena de hábitats necesarios para el mantenimiento de gran número de aves migratorias. En este sentido, debido a su privilegiada situación geográfica entre dos continentes y su proximidad al lugar de encuentro del Atlántico y del Mediterráneo, el Estrecho de Gibraltar, en Doñana se pueden observar más de 300 especies diferentes de aves al año, al ser lugar de paso, cría e invernada para miles de ellas tanto acuáticas como terrestres, europeas y africanas. Aquí descasan aves acuáticas de toda Europa Occidental, localizándose infinidad de especies en las marismas y alrededores procedentes de África y Europa. El Parque acoge diferentes instituciones científicas, las cuales velan por un desarrollo adecuado de las comarcas limítrofes y la conservación de algunas especies en situación crítica que habitan en él, por todo ello se le considera se considera la mayor reserva ecológica de Europa. En las últimas décadas, se ha convertido en un centro de peregrinación de científicos de todo el mundo que aprecian además otros valores como su geomorfología, paisaje y vegetación (García-Novo *y col.*, 1977). El PND se encuentra situado sobre el acuífero Almonte-Marismas, del río Tinto al Guadalquivir. El drenaje natural del acuífero se produce a través del río Guadiamar, los arroyos de La Rocina y El Partido, y las propias marismas. Sobre el acuífero se asienta una población de 185.000 habitantes distribuidos en 22 núcleos urbanos (Porras-Martín *y col.*, 1985).

El Parque Nacional de Doñana es un santuario de vida salvaje con más de 800 especies de plantas y al menos 458 especies de vertebrados. Entre los vertebrados destacan las aves, 361 especies, de gran interés por su situación de amenaza ecológica, entre ellas están la malvasía, la cerceta pardilla, el calamón o la gaviota picofina. Hay además 29 especies de mamíferos, como el lince ibérico, el gamo, el ciervo, el meloncillo, la nutria, la jineta y el conejo; 19 especies de

reptiles, 12 de anfibios, 30 especies de peces de estuario y 7 especies de peces de agua dulce (Grimalt *y col.*, 1999). El gran número de especies de aves constituye, probablemente, la mayor riqueza del Parque Nacional y le confiere una alta relevancia internacional.

Por todo ello, Doñana es una de las reservas naturales de mayor extensión en Europa y uno de los enclaves ecológicos más importantes a nivel mundial donde sobreviven muchas especies en peligro de extinción, entre las que caben resaltar el lince ibérico (*Lynx pardinus*), el águila imperial (*Aquila adalberti*) y la cigüeña negra (*Ciconia nigra*) , entre otras (Figura 40).




**Figura 40.** Especies en peligro de extinción en el Parque Nacional de Doñana.

El PND alberga esta gran variedad biológica por la diversidad de sus ecosistemas: las dunas móviles, los cotos o arenas estabilizadas (bosque sobre dunas fósiles) y la marisma (Figura

41). Además, integra la Vera considerada una zona de transición entre los cotos y la marisma (Grimalt *y col.*, 1999; *Fabricio y col.*, 2005).




**Figura 41.** Diversidad de ecosistemas del Parque Nacional de Doñana.

### 2.5.1. Situación ambiental del Parque Nacional de Doñana.

Las amenazas al PND son principalmente de origen antropogénico. Las actividades agrícolas son un motor importante en la economía de la zona afectando a este entorno natural de tres formas distintas: extracción de agua subterránea para regadíos, uso de agua superficial para arrozales y contaminación por fertilizantes y plaguicidas. En el entorno del PND se explotan varios cultivos, al noreste 35.000 ha de marisma se dedican al cultivo de arroz y en las arenas

estabilizadas del noroeste, 4.000 ha, al de fresa. Junto a la Rocina y el Partido se iniciaron cultivos de "nueva agricultura". En El Partido se han encontrado cantidades importantes de nutrientes para el cultivo (amonio, nitritos, nitratos y fosfatos, entre otros) y metales tóxicos en niveles que pueden deberse al uso de fertilizantes (Tovar-Sánchez *y col.*, 2006), además de altos niveles de plaguicidas (Vioque-Fernández *y col.*, 2007). Por otro lado, las prácticas agropecuarias son muy extendidas en la zona, dado el gran número de cabezas de ganado y hectáreas de regadío, probablemente sean el origen de la gran abundancia de compuestos nitrogenados presentes en las aguas subterráneas (Porras-Martín *y col.*, 1985).

También destacan otras posibles causas de contaminación, numerosas almazaras, industrias de procesado de uva y vegetales e industrias cárnicas y lácteas. Los efluentes de estas industrias amenazan al Partido (Arambarri *y col.*, 1996), y el curso bajo del Guadiamar (Alonso *y col.*, 2004). Además, las aguas residuales de numerosos municipios se vertían sobre el acuífero sin depurar, afectando al Guadiamar y al Partido aunque ya se han construido varias estaciones depuradoras de aguas residuales (Arambarri *y col.*, 1996). Otra fuente potencial de contaminación está a 45 Km al noroeste del PND, a orillas de los ríos Odiel y Tinto, la zona industrial de Huelva. Los Polos Industriales de Huelva cuentan, entre otras, con numerosas industrias de transformación minera, un complejo petroquímico, una central térmica y una fábrica de celulosa, cuyos contaminantes pueden alcanzar Doñana por las corrientes marinas o arrastrados por el aire (Albaiges *y col.*, 1987).

A estas fuentes de contaminación se le une la explotación, desde 1979, de las minas de pirita de Aznalcóllar, cuyos subproductos se almacenaban en una balsa de estériles, que tras

lluvias intensas, liberaba metales móviles al río Guadiamar arrastrándolos hacia el PND (Arambarri *y col.*, 1996). En Abril de 1998 se produjo la rotura del muro de cierre de la balsa de residuos mineros de Aznalcóllar (Figura 42).



**Figura 42.** Rotura del muro de contención de la balsa minera de Aznalcóllar.

Este accidente supuso la liberación de residuos mineros fluidificados y la incorporación de aproximadamente 2 $Hm^3$ de lodos tóxicos y 4 $Hm^3$ de aguas ácidas al cauce del río Guadiamar (Bonilla-Valverde *y col*., 2004; Grimalt *y col.*, 1999). La composición química del lodo vertido a la cuenca fue la siguiente: Hierro (34-37%), Azufre (35-40%), Zinc (0,8%), Plomo (0,8%), Arsénico (0,5%), Cobre (0,2%), Antimonio (0,05%), Cobalto (0,006%), Talio (0,005%), Bismuto (0,005%), Cadmio (0,003%), Plata (0,003%), Mercurio (0,002%) y Selenio (0,001%). Mientras que las aguas ácidas contenían fundamentalmente pirita, $FeS_2$, Pb, Au, Zn, Cu y As (Grimalt *y col.*, 1999). El vertido afectó alrededor de 67 Km de cauce lineal y 500 m de anchura media en ambos márgenes, desde la mina hasta el lugar conocido como Entremuros, en el límite del Parque Nacional de Doñana. La superficie contaminada fue de 4.286 ha pertenecientes a terrenos de nueve municipios de la provincia de Sevilla. En un primer momento se retiraron 37 toneladas de peces muertos, 40 toneladas de anfibios, 20 de aves y 8 de mamíferos (Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, 2000). Obviamente, tanto la flora como la fauna fue completamente arrasada debido, por un lado, a la elevada contaminación química del agua, ya mencionada, a lo que había que añadir valores de oxígeno disuelto mayores a 1 g/l y de pH altamente ácidos, y por otro a la acción mecánica de la riada (Grimalt *y col*., 1999). Las labores de extracción de lodo del canal principal y de la cuenca de inundación afectaron también a las características geomorfológicas, hidrológicas y geoquímicas del sistema fluvial. De este modo, la fauna y flora colonizadora del río se encontró con un hábitat profundamente alterado y una elevada carga contaminante residual.

Con el fin de controlar y remediar la contaminación generada por el vertido minero, la Consejería de Medio Ambiente puso en marcha un plan de acción denominado La Estrategia del

Corredor Verde del Guadiamar en el que, entre otros objetivos, se pretendía estudiar la fauna acuática del río Guadiamar por ser una de las más afectadas por el accidente.

Por tanto, el área de Doñana es un espacio complejo, donde coexisten algunos de los más preciados valores medioambientales con el desarrollo económico y social de las poblaciones circundantes. En un estudio reciente para la valoración medioambiental de los efectos de los Planes de Desarrollo Regional de la Unión Europea en el Parque Nacional de Doñana, la mayoría de los impactos fueron positivos aunque, un 32,2 % fueron negativos (Oñate *y col*., 2003) El seguimiento de las alteraciones que se puedan producir en los delicados ecosistemas de Doñana por las distintas actividades antropogénicas, es algo esencial para el desarrollo sostenible de la zona.

### 2.5.2. El ratón de vida libre *Mus spretus* como bioindicador de la contaminación ambiental y el ratón de laboratorio *Mus musculus* como organismo modelo.

Mediante estudios previos de monitorización se ha demostrado la capacidad que tienen los pequeños mamíferos, concretamente los ratones de vida libre, para acumular una amplia gama de contaminantes que están presentes en los ecosistemas (Talmage *y col*., 1991). De esta manera, se ha encontrado una relación directa entre la exposición a metales pesados (Ieradi *y col.*, 1991; Tull-Singleton *y col.*, 1994), pesticidas (McBee *y col.*, 1988), radiactividad (Cristaldi *y col.*, 1990) y daño genético provocado en estos roedores que viven en libertad.

Varias especies de roedores tales como *Mus spretus*, *Crucidura russula* y *Apodemus sylvaticus* son las más comunes en el PND (Cagnin *y col.*, 1998), sin embargo la especie *Mus spretus* fue elegida como bioindicador para monitorizar el Parque Nacional de Doñana por tratarse de un organismo no protegido que habita regiones pantanosas, su estrategia reproductiva de tipo r, y su alta densidad poblacional, que determina una amplia distribución geográfica (Camacho *y col.*, 1989). La primera aproximación al uso de *Mus spretus* como bioindicador en Doñana se realizó en la década de los 90 para evaluar el efecto de la contaminación producida por el Polo Industrial de Huelva (Ieradi y col., 1996 y 1998). Los resultados de este estudio mostraron la existencia de anomalías genéticas en los ejemplares expuestos a los contaminantes producidos por el polo industrial. Los autores destacan la aparición de un incremento significativo de hematíes micronucleados tanto en sangre periférica como en médula ósea, así como un aumento significativo de espermatozoides anómalos.

Basándose en estos resultados, los ratones morunos han sido utilizados en este estudio como organismos bioindicadores de la contaminación producida por la rotura de la balsa y la acción de los lixiviados con elevadas concentraciones de metales pesados y arsénico de la mina de Aznalcollar sobre el entorno de Doñana, así como el efecto de los pesticidas en determinadas zonas con elevada actividad agrícola (Ruíz-Laguna *y col*., 2001; Bonilla-Valverde *y col*., 2004; Montes-Nieto y *col.*, 2007). Con estos estudios se demostró que este bioindicador acumula un amplio espectro de agentes contaminantes presentes en el ecosistema en el que habita. Estos y otros resultados han establecido el uso del *Mus spretus* como un organismo modelo muy útil para la evaluación de la calidad medioambiental de los ecosistemas.

El ratón de vida libre *Mus spretus* es un múrido de pequeño tamaño, con hocico redondeado, ojos y orejas pequeños. Los adultos presentan una coloración dorsal gris castaño, con una franja cefalocaudal más oscura. Poseen vientre blanco grisáceo, con una nítida línea de separación lateral entre ambas regiones corporales. Esta especie puede localizarse en ambientes rurales de la Región Mediterránea Occidental, ocupando la parte mediterránea de la Península Ibérica, costa mediterránea de Francia y Norte de África. Ocupa ambientes típicamente subhúmedos y semiáridos. Su escaso requerimiento hídrico le permite ocupar ambientes inaccesibles para otras especies de roedores (Palomo *y col*., 2007). Muestra preferencia por los espacios abiertos, áreas de matorral mediterráneo, ambientes rocosos con vegetación herbácea y cultivos de secano. Este pequeño animal se alimenta de plantas, semillas e insectos (Moreno, 1998) y es una especie clave de la cadena alimenticia de Doñana, ya que forma parte del régimen alimentario de numerosas especies de depredadores como son las aves rapaces diurnas y nocturnas, mamíferos carnívoros y ofidios (Kufner, 1986). De esta manera se transfieren los contaminantes a una multitud de especies. El ciclo reproductor del *Mus spretus* es estacional. El período de reposo sexual es invernal y se sitúa entre noviembre y febrero, fechas que se recomiendan para su muestreo y así no afectar a las poblaciones futuras, mientras que la actividad reproductora se desarrolla durante el resto del año y suele presentar dos fases de máxima intensidad. Vive en grupos familiares, con un número de integrantes y un tamaño territorial variable y relacionado con la calidad del hábitat. Es una especie nocturna, con picos de actividad tras el ocaso y antes del alba, aunque en invierno también es diurna.

Sin embargo, uno de los inconvenientes que presenta el uso de *Mus spretus* son los elevados costes, sobre todo cuando se quiere adquirir en cepas genéticamente puras y sin

contaminación. Además esta especie aún no ha sido secuenciada genéticamente, lo que representa un problema a la hora de su uso como bioindicador de la contaminación ambiental. En su lugar, se utiliza como organismo modelo el ratón de laboratorio *Mus musculus*, que ha sido secuenciado y presenta una elevada homología genética con el ratón de vida libre *Mus spretus* (Ruiz-Laguna *y col.*, 2005 y 2006). Las variaciones fenotípicas (edad, sexo y condiciones de vida) y genéticas en el ratón de laboratorio son menores comparadas con el ratón de vida libre. Aunque se considera al *Mus spretus* como la especie aborigen de ratón mejor caracterizada, la cual fue separada de la subespecie de ratón doméstico *Mus musculus* hace un millón de años. El grupo de la Profesora Carmen Pueyo (Universidad de Córdoba) ha demostrado que las secuencias genéticas de ambas especies siguen siendo muy parecidas (Montes-Nieto *y col.*, 2007). Esto facilita los estudios *-ómicos* de *Mus spretus* utilizando las bases de datos de *Mus musculus* con el fin de controlar la acción de los contaminantes en los ecosistemas terrestres (Montes-Nieto *y col.*, 2007).

Los ratones de laboratorio *Mus musculus* pertenecen a una misma cepa pura o endogámica. Los individuos de una misma cepa llevan los mismos genes, por lo cual se facilita la comparación de los efectos de los diferentes tratamientos experimentales (fármacos, metales tóxicos, etc.), sin que se produzca confusiones debido a las diferencias genéticas. La cepa más utilizada ha sido la BALB/c (ratón albino), aunque existen otras disponibles (ej.C57BL/6), especialmente desde el desarrollo de técnicas de manipulación de genes que han provisto una gran cantidad de cepas con modificaciones genéticas particulares (Meraz-Ríos *y col.*, 2001). La figura 43 muestra la fotografía del ratón de vida libre *Mus spretus* y del ratón de laboratorio *Mus musculus*.




**Figura 43.** Ratón de vida libre *Mus spretus* y ratón de laboratorio *Mus musculus*.

Los ratones *Mus musculus* han sido los animales de experimentación por excelencia para elucidar diversos procesos biológicos como la patogénesis del cáncer, el determinismo genético, la biología del desarrollo o el funcionamiento del sistema inmune, entre otros. Muchos investigadores consideran al ratón como un modelo animal casi perfecto porque, además de su talla pequeña, su corto tiempo generacional, su fácil mantenimiento y su gran rendimiento reproductivo a lo largo de todo el año, tiene varias características que, cuando se las consideran en conjunto, lo hacen un modelo único para la experimentación en biología, bioquímica, toxicología, biomedicina y genética experimental.

Entre esas características cabe resaltar:

I. Son mamíferos euterios, por tanto poseen un genoma muy similar al de los seres humanos.

II. Tienen un sistema inmune similar al de los seres humanos.

III. Las hembras producen un gran número de óvulos, los cuales al ser fecundados son muy resistentes.

IV. Soportan bien la consanguinidad, por lo que es posible obtener (por medio de cruces repetidos entre individuos emparentados) líneas de individuos genéticamente idénticos.

V. Es una especie inusual en el sentido de que es posible criar híbridos viables y fértiles acoplando las líneas de laboratorio con varias especies derivadas de animales salvajes.

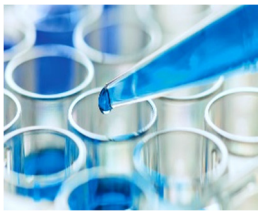
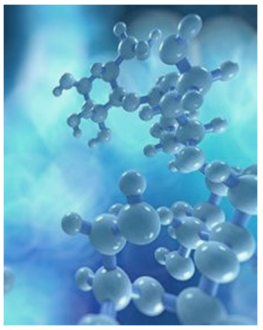
VI. Se ha conseguido el desarrollo de técnicas de mutagénesis dirigida que producen alteraciones heredables del genoma que no son posibles lograr, por el momento, en ninguna otra especie de laboratorio.

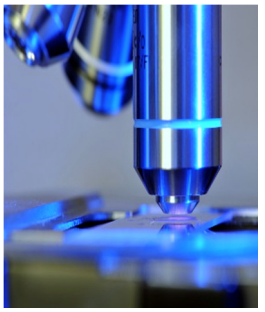
En este sentido, el grupo de investigación de los profesores López Barea y Gómez Ariza, ha llevado a cabo múltiples trabajos para evaluar el estado de contaminación del Parque Nacional de Doñana al suroeste de España, midiendo biomarcadores bioquímicos, biométricos y citogenéticos en ratones de vida libre, *Mus spretus* (García-Sevillano *y col*., 2014b).

# OBJETIVOS

Objectives






# 3. OBJETIVOS

Como se ha puesto de manifiesto en la introducción de la presente Tesis Doctoral, los estudios medioambientales dirigidos a identificar respuestas biológicas causadas por metales tóxicos presentan serias dificultades en su aplicación, ya que deben enfrentarse a la complejidad de los ecosistemas, en los que coexisten numerosos xenobióticos que afectan a los organismos, pero que además interaccionan entre si y se comportan de forma diferente ante los diversos filtros biológicos. Debido a ello, resulta difícil establecer claramente las relaciones causa-efecto por la multiplicidad de posibles respuestas. A pesar de estos inconvenientes, este tipo de estudio es muy necesario, pues integran todas las variables presentes en un determinado ecosistema y su interacción con los organismos estudiados. Por ello, para establecer de forma segura los mecanismos de acción de los contaminantes metálicos hay que recurrir a estudios de exposición en el laboratorio que permitan un control adecuado de todas las variables relacionadas con dichos compuestos. Asimismo, el efecto compensatorio frente a la toxicidad de determinados elementos debe también considerarse en este tipo de ensayos. Por último, las conclusiones que resulten pueden extrapolarse y validarse en animales de vida libre en campañas adecuadas de muestreo en el campo. Todos estos aspectos considerados en relación al estudio de la contaminación y sus efectos, constituyen la finalidad de la presente Tesis, sobre la que se apoyan los objetivos que se proponen a continuación.

El objetivo general del estudio que se aborda en la presente Tesis se centra en la evaluación y seguimiento de la contaminación ambiental del Parque Nacional de Doñana y

alrededores mediante el desarrollo de metodologías analíticas innovadoras basadas en el empleo de la espectrometría de masas elemental y molecular, para el estudio de biomarcadores relacionados con el estrés ambiental, especialmente metaloproteínas y metabolitos, usando como bioindicador el ratón de vida libre *Mus spretus*, ampliamente distribuido en el área de estudio. El desarrollo de dicho objetivo general engloba:

I. Desarrollo de estrategias analíticas innovadoras para el aislamiento y purificación de las fracciones correspondientes a los extractos citosólicos y mitocondriales, además de fluidos biológicos como suero y plasma de los animales en estudio y humanos. Se utilizará para ello procedimientos cromatográficos ortogonales en línea mediante la aplicación complementaria de la cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) junto a la cromatografía de intercambio aniónico (AEC), y a la cromatografía de afinidad (AF), usando en todos los casos la ICP-MS como sistema de detección, usando acoplamientos bidimensionales y tridimensionales que eviten el empleo de etapas intermedias de desalinización, preconcentración o limpieza y que sean altamente sensibles, exactos y precisos basados en la cuantificación absoluta mediante el uso del análisis por dilución isotópica (IDA), dada la ausencia de patrones de calibración comerciales de metaloproteínas de ratón.

II. Estudio de la respuesta biológica del organismo modelo *Mus musculus* sometido a experiencias de exposición a diferentes metales tóxicos (As, Hg y Cd) en condiciones de laboratorio controladas, con objeto de identificar posibles cambios de expresión de proteínas/metaloproteínas como consecuencia de la exposición a

estos contaminantes, así como la perturbación de las diferentes rutas metabólicas y alteraciones en los niveles de los transcritos. Para ello, se integrarán metodologías de análisis masivo, *-ómicas*, basadas fundamentalmente en el uso de la espectrometría de masas elemental y molecular, tras separaciones cromatográficas y electroforéticas.

III. Estudio de las interacciones As/Cd, Cd/$^{77}$Se y Hg/Se en el ratón de laboratorio *Mus musculus*, considerando los cambios en el perfil metalómico y metabolómico que se originen bajo la acción de ambos elementos mediante condiciones experimentales controladas, con objeto de identificar posibles cambios de expresión de metalobiomoléculas, distribución y mecanismos de detoxificación, así como las posibles sinergias o antagonismos entre ambos, con el objetivo de caracterizar posibles perturbaciones en las diferentes rutas metabólicas. Por otro lado, se evaluará el efecto protector del Se en dichas rutas alteradas bajo los efectos tóxicos del Cd y el Hg mediante el empleo de metodologías *–ómicas* cuando este elemento se suministra a diferentes niveles de concentración.

IV. Seguimiento y evaluación de la contaminación ambiental en 5 zonas del Parque Nacional de Doñana y alrededores, considerando 4 zonas del entorno del Parque- La Rocina (ROC), El Partido (PAR), El Ajolí (AJO) y El Matochal (MAT), con diferentes niveles de contaminación por su proximidad a zonas de actividad agrícola, minera e industrial, y una zona situada en el interior del Parque, Lucio del Palacio (LDP) considerada como control no contaminado. Para ello se llevará a cabo el

estudio de metalobiomoléculas y metabolitos en diferentes órganos y plasma del bioindicador, *Mus spretus*, procedente de las 5 zonas mencionadas, utilizando fundamentalmente la combinación de metodologías metalómicas y metabolómicas.

V. Integración de metodologías –*ómicas* para el estudio comparativo de la respuesta biológica de *Mus musculus* y *Mus spretus* bajo la acción de contaminantes metálicos. Para este propósito se van a comparar los resultados obtenidos en los experimentos de exposición de *Mus musculus* con aquellos obtenidos para *Mus spretus* en las zonas de estudio, con objeto de validar la respuesta biológica de estos organismos de vida libre a la contaminación ambiental, teniendo en cuenta la homología genética existente entre ambas especies. Estos estudios comparativos nos pueden ayudar a comprender mejor los complejos mecanismos moleculares, como el control de la homeostasis y el tráfico de metales entre órganos, que tiene lugar en los organismos que habitan zonas naturales amenazadas por la contaminación ambiental causada por metales tóxicos.

The introduction of this Doctoral Thesis highlighted the interest of using the biological response caused by heavy metals in environmental studies, which have to deal with the complexity of ecosystems that coexist with many xenobiotics affecting organisms. In addition, the occurrence of interactions between metals has to be considered the existence of biological filters associated to the existence of membranes. As a result, it is difficult to pinpoint the cause-effect by the multiplicity of possible responses. Despite these drawbacks, this type of study is very necessary as integrate all variables in a particular ecosystem and its interaction with the organisms studied. Therefore, to establish secure mechanisms of action of contaminant metals exposure studies in the laboratory have to be accomplished to allow adequate control of all the variables related to these compounds. Also, the compensatory effect against the toxicity of certain elements should also be considered in this type of studies. Finally, the conclusions can be extrapolated and validated on free-living animals in suitable sampling campaigns in the field. All these aspects considered in relation to the study of pollution and its effects, are the purpose of this thesis, to which the objectives proposed below are supported.

The overall objective of the study is to focuse on the evaluation and monitoring of environmental pollution in Doñana National Park and surrounding area through the development of complementary elemental and molecular mass spectrometry for study of biomarkers related to environmental stress, especially metalloproteins and metabolites, using as bioindicator the free-living mice *Mus spretus*, widely distributed in the study area. The development of this general objective includes:

I. Development of innovative analytical strategies for the isolation and purification of cytosolic and mitochondrial fractions extracts, as well as serum and plasma of animals and humans. For this purpose It is used on line orthogonal chromatographic procedures, such as chromatography size exclusion (SEC) and anion exchange chromatography (AEC), or affinity chromatography (AF), using in all cases the ICP-MS as detection system, using two- and three-dimensional couplings to avoid the use of intermediate stages of desalination, preconcentration of analytes or cleaning. In addition, approaches based on absolute quantification using the isotope dilution analysis highly sensitive, accurate and precise (IDA) given the absence of commercial calibration standards of metalloproteins in mouse.

II. Study of the biological response of the model organism Mus musculus under exposure experiments to different toxic metals (As, Hg and Cd) in controlled laboratory conditions, in order to identify possible changes in protein expression, metalloproteins, as well as disturbance of the different metabolic pathways and alterations in the levels of transcripts. For this purpose, methods of massive analysis, the -omics, based on the use of elemental and molecular mass spectrometry, after chromatographic and electrophoretic separations, are integrated.

III. Study of As/Cd, Cd/77Se and Hg/Se interactions in the laboratory mouse *Mus musculus*, considering the changes in the metalómico and metabolomic profile arising under the action of both elements by controlled experimental conditions

in order to identify possible changes in metalobiomoléculas expression, distribution and detoxification mechanisms and possible synergies or antagonisms between them, in order to characterize possible disturbances in the different metabolic pathways. On the other hand, the protective effect of Se on these routes affected by the toxic effects of Cd and Hg was measured, using -*omic* methodologies, when this element is supplied to different concentration levels.

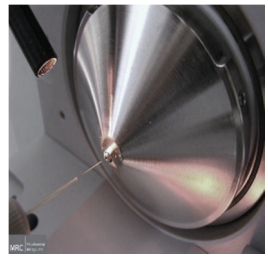
IV. Monitoring and evaluation of environmental pollution in 5 zones of the Doñana National Park, considering 4 areas of the park: La Rocina (ROC), El Partido (PAR), El Ajolí (AJO) and El Matochal (MAT) with different levels of pollution due to its proximity to areas of agricultural, mining and industrial activity, and El Lucio del Palacio (LDP) inside the Park, considered as non-contaminated control. For this purpose, metallo-biomolecules and metabolites are studied in different organs and plasma of the biomarker, Mus spretus, from the 5 areas mentioned, mainly using the combination of metalomic and metabolomic methodologies.

V. Integration of methodologies for the comparative study of the biological response of *Mus musculus* and *Mus spretus* under the action of metal contaminants. For this purpose comparison between results from experiments exposure in Mus musculus with those obtained from *Mus spretus* are performed in the areas of study in order to validate the biological response of these free-living organisms to environmental pollution, taking into account the genetic homology between the two species. These comparative studies can help us

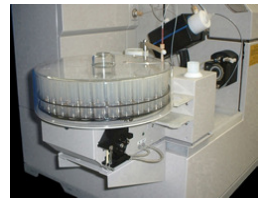
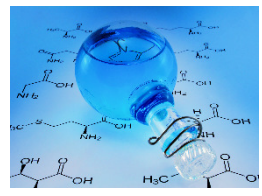
better understand the complex molecular mechanisms, such as control of homeostasis and metal trafficking between organs, which occurs in organisms inhabiting natural areas threatened by environmental pollution caused by toxic metals.

# EXPERIMENTAL

Experimental







# 4. EXPERIMENTAL

## 4.1. INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA

En esta sección se describirá la instrumentación de carácter general utilizada en el desarrollo de la presente Tesis Doctoral.

### 4.1.1. Instrumentación analítica empleada en la preparación de muestras

La preparación de extractos citosólicos a partir de los diferentes órganos de ratón se ha llevado a cabo mediante homogenización criogénica con un criohomogenizador modelo SPEX SamplePrep Freezer/ Mill 6770 (Metuchen, Nueva Jersey, EE.UU.). Para llevar a cabo la extracción de proteínas citosólicas, los órganos criohomogenizados se someten a una segunda homogenización con un homogenizador teflón-vidrio. Posteriormente, los extractos citosólicos se ultracentrifugan mediante el uso de una ultracentrífuga Beckman L9-90K de Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA) provista de un rotor Beckman 70.1 Ti (Beckman Coulter) y tubos de policarbonato de 10 ml (Beckman Coulter). Por otro lado, para llevar a cabo la extracción de metabolitos de tejidos celulares y fluidos biológicos se utiliza un homogenizador *pellet mixer* (VWR International) (Figura 44).

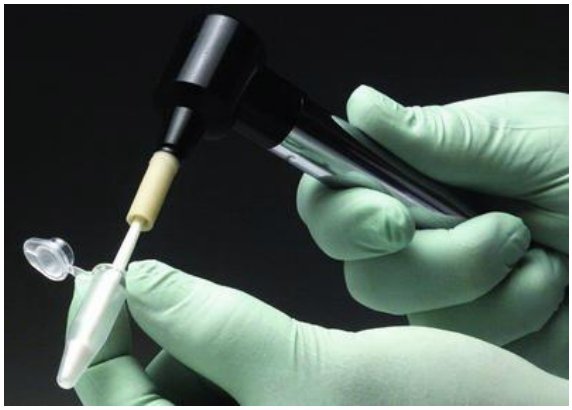


**Figura 44.** Homogenizador *pellet mixer* (VWR International).

La preparación de suelos y sedimentos para ser mineralizados mediante digestión ácida asistida por microondas se ha llevado a cabo mediante trituración de los mismos en mortero de ágata seguido por tamizado con malla de 2 mm y 0.63 µm.

Para la extracción de las especies de arsénico de las muestras de hígado de ratón se hizo uso de una sonda de ultrasonidos modelo Sonoplus HD UW 2200 (Bandelin Electronic, Berlín, Germany) equipada con una punta MS72. La potencia usada fue de 550 W durante 2 min.

La determinación de metales totales en extractos citosólicos de tejidos, fluidos biológicos, suelos y sedimentos se lleva a cabo mediante mineralización de las muestras en reactores cerrados de teflón modelo MARS Xpress, utilizando un horno de microondas modelo MARS5 (CEM corporation, Mattews, Carolina del Norte, Estados Unidos). El extracto resultante de las muestras de suelos y sedimentos se filtra a través de filtros Iso-Disc de politetrafluoroetileno (PTFE) de 25 mm de diámetro y 0,45 µm de tamaño de poro (Sigma Aldrich), antes de su análisis mediante ICP-ORS-qMS. En el caso de filtrar extractos citosólicos para ser analizados por LC-

ICP-ORS-qMS se emplean filtros de igual tamaño de poro, pero en este caso de polifluoruro de vinilideno (PVDF), químicamente inertes y de baja absorción protéica.

Las fracciones de extractos citosólicos aisladas mediante SEC se liofilizan con un equipo VirTis Bechtop (SP Scientific, Gardiner, Nueva York, Estados Unidos) a -50 ºC y 70 torr de presión. Las medidas de pH en todas las disoluciones se lleva a cabo con un pH metro modelo Crison micropH 2000 (Crison Instruments, S.A. Barcelona, España).

### 4.1.2. Instrumentación analítica empleada en el análisis de las muestras

La técnica analítica más utilizada en los análisis de trazas de metales es la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), habiéndose utilizado dos equipos: (a) Agilent 7500ce (Agilent Technologies, Tokio, Japón), y (b) XSERIES2 (ThermoFisher Scientific, Bremen, Alemania) (Figura 45). La técnica ofrece numerosas ventajas como son su sencillez, rapidez, especificidad y extremada sensibilidad en la determinación de elementos traza y ultratraza (límites de detección en el rango de 0,001- 0,1 ng $L^{-1}$ para la mayoría de los elementos), además de su capacidad multielemental y multiisotópica, y su amplio rango dinámico de cuantificación (6-8 órdenes de magnitud).

Por estas razones, el ICP-MS ha remplazado prácticamente a otras técnicas como la espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES), la fluorescencia de rayos-X (XRF) y el análisis de activación de neutrón instrumental (INAA), usados tradicionalmente para la determinación multielemental de elementos trazas.




**Figura 45.** Equipos de ICP-MS empleados en la presente Tesis Doctoral.

La cromatografía de exclusión de tamaño a escala analítica e intercambio iónico de las metalobiomoléculas en los diferentes extractos citosólicos y fluidos biológicos se ha llevado a cabo mediante el acoplamiento de un cromatógrafo líquido HPLC, equipado de un detector ultravioleta, modelo Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) (Figura 46) al ICP-MS, utilizando un tubo de PEEK (0,17 i.d) de 20 centímetros de longitud conectado directamente a la entrada del nebulizador. Las columnas cromatográficas empleadas en la presente tesis doctoral se resumen en tabla 4. En el caso de la cromatografía de exclusión de tamaño a escala preparativa se hizo uso se utilizó un cromatógrafo líquido de baja presión (AKTA-Prime system, Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) (Figura 46). El sistema AKTA-Prime, está equipado con un colector de fracciones, válvula de inyección (con un bucle de 500 µL) y detector ultravioleta visible (242 nm).



HPLC 1100 Series Agilent Technologies



AKTA-Prime system, Amersham Biosciences

**Figura 46.** Cromatógrafos líquidos empleados en la presente Tesis Doctoral.



QSTAR XL, Applied Biosystems



Trace GC ULTRA con trampa de iones ITQ900, Thermo Fisher Scientific

**Figura 47.** Espectrómetros de masas empleados en los estudios metabolómicos en la presente Tesis Doctoral.

**Tabla 4.** Columnas de cromatografía líquida empleadas en el desarrollo experimental de la presente Tesis Doctoral.

| Modo de separación | Columna |
|---|---|
| Exclusión de tamaño | Superdex™-75 (10 x 300 mm, 13 µm) |
| Exclusión de tamaño | Superdex™-200 (10 x 300 mm, 13 µm) |
| Exclusión de tamaño | Superdex™-Peptide (10 x 300 mm, 13 µm) |
| Exclusión de tamaño | HiTrap Desalting (5 mL), GE Healthcare, Uppsala, Suecia. |
| Exclusión de tamaño | Hiload 26/60 Superdex75-Prep (600 x 26 mm x 34 µm), Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia. |
| Exclusión de tamaño | Hiload 26/60 Superdex 30 Prep (600 x 26 mm x 34 µm), Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia. |
| Afinidad | Heparin-Sepharose (1 mL), GE Healthcare, Uppsala, Suecia. |
| Afinidad | Blue-Sepharose (1 mL), GE Healthcare, Uppsala, Suecia. |
| Intercambio aniónico | Hamilton PRP-X100 (25 cm x 4.6 mm x 10 µm), Hamilton, Reno, NV. |
| Intercambio aniónico | Protein-PAK DEAE 5PW (7.5 mm x 75 mm x 10 µm), Waters, Milford, MA, Estados Unidos. |
| Intercambio aniónico | Protein-PAK DEAE 5PW (21.5 mm x 150 mm x 10 µm) Semi-prep column, Waters, Milford, MA, Estados Unidos. |
| Intercambio catiónico | Supelcosil LC-SCX (250 mm x 4.6 mm x 5 µm), Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania. |

Los experimentos metabolómicos se llevaron a cabo mediante infusión directa de la muestra en un espectrómetro de masas de alta resolución usando una fuente de electrospray (DI-ESI (+/-)-QqQ-TOF-MS) modelo QSTAR XL (Applied Biosystems) (Figura 47). Los parámetros del sistema híbrido QqQ-TOF fueron optimizados para obtener la mayor sensibilidad posible con la fragmentación mínima de iones moleculares, tanto en modo positivo y negativo. El empleo del sistema híbrido QqQ-TOF nos permite, además de obtener resultados con elevada resolución y exactitud de masas, llevar a cabo la identificación estructural de los metabolitos mediante MS/MS. Para ello, los metabolitos precursores (preseleccionados en el primer cuadrupolo) son fragmentados en la cámara de colisión (en nuestro caso el Q2) empleando un gas de colisión (nitrógeno) y una diferencia de potencial (energía de colisión, CE). Los fragmentos generados

llegan al TOF, donde son detectados, obteniéndose así un espectro de masas característico del metabolito estudiado para las condiciones experimentales empleadas denominado perfil de fragmentación. El conocimiento de la masa exacta del analito junto a su perfil de fragmentación puede permitirnos llevar cabo la identificación de la estructura, para lo cual es de gran ayuda el empleo de bases de datos de metabolitos de acceso libre, disponibles en la red, como ya se comentó en la introducción de la presente Tesis Doctoral. Por otro lado, estos estudios han sido combinados con el estudio metabolómico mediante GC-MS lo cual ha servido como validación de los efectos toxicológicos obtenidos mediante DIMS, en plasma/suero, glóbulos rojos (RBCs) y mitocondrias de células hepáticas mediante el empleo de un cromatógrafo de gases con detector de masas (GC-MS) modelo Trace GC ULTRA acoplado a un espectrómetro con trampa de iones ITQ900, ambos de Thermo Fisher Scientific (Figura 47). La columna capilar utilizada fue la VF-5MS 30m x 0,25 mm de diámetro interno (Varian).

La ultrafiltración de los extractos se llevó a cabo mediante el empleo de filtros de membrana para centrifugas Ultracentrifugal fliters (3.000 y 30.000 Da de membrana de celulosa) suministrado por Millipore (Billerica, MA, Estados Unidos). Además, los extractos procedentes de las digestiones enzimáticas o trípticas fueron preconcentradas y desaladas mediante el empleo de puntas de micropipeta Zip-tips C18 suministradas por Millipore (Billerica, MA, Estados Unidos).

La medida de las actividades enzimáticas de enzimas REDOX se ha llevado a cabo mediante el empleo de un espectrofotómetro con agitación y temperatura constante modelo DU-800 (Beckmann, Estados Unidos). Por otro lado, la determinación del contenido de proteínas en las fracciones citosólicas de los ratones *Mus* musculus y *Mus spretus* se ha llevado a cabo

mediante el método de Bradford usando un espectrómetro UV/Vis modelo Thermo Spectronic Helios γ (Thermo Scientific, Barcelona).

La integridad de los ARN se determinó por electroforesis microcapilar usando un el Bioanalizador Agilent 2100, y la concentración de los ARN se llevó a cabo usando el sistema Hellma Traycell (Hella Analytics).

Los estudios proteómicos basados en separaciones electroforéticas bidimensionales usando como primera dimensión isoeletroenfoque (IEF) y como segunda dimensión una separación electroforética en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). La primera dimensión (IEF) se desarrolló en un aparto Protean IEF (Bio-Rad) y la segunda haciendo uso del equipo Protean Plus Dodeca Cell (Bio-Rad). Los geles finalmente fueron digitalizados mediante el uso del escáner modelo Typhoon (GE Healthcare, Uppsala, Suecia). Por último, las proteínas alteradas se identificaron mediante MALDI-TOF/TOF-MS modelo AB SCIEX 4800 tras digestión tríptica de los diferentes spots (AB SCIEX, Framingham, Estados Unidos) (Figura 48). Por otro lado, las medidas de peroxidación lipídica en hígado se llevaron a cabo mediante un espectrómetro de fluorescencia modelo LS 50B (Perkin Elmer).



MALDI-TOF/TOF-MS modelo AB SCIEX 4800

**Figura 48.** Espectrómetros de masas MALDI-TOF/TOF-MS modelo AB SCIEX 4800 usado en la secuenciación de proteínas en la presente Tesis Doctoral.

Finalmente, los estudios histopatológicos de hígado se llevaron a cabo mediante un microtomo modelo Leica Leitz 1512 (Leitz, Wetzlar, Alemania), examinándose las secciones obtenidas a escala microscópica una vez tañidas con un microscopio modelo Nikon Eclipse E400 (Ámsterdam, Holanda).

## 4.2. Reactivos y disoluciones

### 4.2.1. Reactivos y disoluciones para la preparación de muestras

Todas las disoluciones acuosas se prepararon en agua ultrapura (18,2 MΩ) obtenida mediante un sistema Milli-Q Gradient de Millipore (Watford, Reino Unido).

El ácido nítrico, ácido clorhídrico, ácido fluorhídrico, ácido sulfúrico y peróxido de hidrógeno (grado analítico ultratrazas) empleado para la limpieza del material de vidrio y plástico, usado para la estabilización de las disoluciones metálicas o bien para la realización de las digestiones ácidas en microondas fue suministrado por Fisher Scientific (Leicestershire, Reino Unido). Por otro lado, el ácido fosfórico fue suministrado por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).

Para la determinación de metales totales en extractos citosólicos, fluidos biológicos, suelos y sedimentos, se utilizó una disolución primaria multipatrón-2A que contenía todos los elementos de interés (10 mg/mL en 2% $HNO_3$, Agilent Technologies, California, Estados Unidos), a partir de la cual se prepararon las disoluciones para las curvas de calibrado. Además, se utilizó una disolución de rodio (Rh) de 1000 (mg/mL en 2% de $HNO_3$, Agilent Technologies, California, Estados Unidos) como disolución primaria para preparar las disoluciones de trabajo de estándar interno. Para reducir o prevenir el efecto memoria de mercurio en las determinaciones por ICP-MS, se utilizó una disolución de 200 mg/mL de oro en 10% de HCl (SPEX Certiprep, Metucheb, Nueva Jersey, Estados Unidos).

Para la preparación de extractos citosólicos de tejidos y fluidos biológicos, el acetato de amonio (grado ultrapuro), el fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), L-Glutatión reducido (GSH), benzonasa (grado ultrapuro), hidrocloruro de tris-(2-carboxietil) fosfina (TCEP) (grado BioUltra, >98%) fueron adquiridos a Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). El Tris-HCl, ácido etilendiaminotetracético (EDTA), glutatión reducido (GSH) para la preparación de extractos

citosólicos para separaciones electroforéticas fueron suministrados también por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).

Para la extracción de metabolitos de tejidos y fluidos biológicos para los estudios metabolómicos por DIMS y GC-MS se emplearon disolventes orgánicos de la mayor calidad disponible. El metanol, acetonitrilo y amoniaco fueron suministrados por Fisher (Ottawa, Ontario, Canadá), de calidad óptima para LC-MS. El cloroformo, etanol y ácido fórmico (grado analítico) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). El acetato de amonio empleado para la formación de aductos de amonio (-$NH_4$) para el análisis por DIMS fue suministrado por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania), de grado ultrapuro. Y por último, el diclorometano fue suministrado por Merck (Darmstadt, Alemania).

### 4.2.2. Reactivos empleados en las experiencias de exposición.

Los experimentos de exposición se llevaron a cabo usando cloruro de cadmio (II), cloruro de mercurio (II), óxido de arsénico (III), selenito todos suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania) (pureza > 99%).

### 4.2.3. Reactivos y disoluciones para el análisis de las muestras

El acetato amónico (grado ultrapuro) para la preparación de la fase móvil en SEC y AEC, amoniaco (Suprapur grade) y ácido clorhídrico para ajustar el pH de las disoluciones, fueron suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania). Para preparar la fase móvil utilizada en la

especiación de arsénico, se utilizó dihidrógenofosfato de amonio, el cual fue suministrado por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). El metanol usado en la preparación de la fase móvil de AEC fue suministrado por Fisher (Ottawa, Ontario, Canadá), de calidad óptima para LC-MS.

Las fases móviles para SEC y AEC se prepararon diariamente y se filtraron a vacío mediante filtros de membrana de nitrato de celulosa (tamaño de poro de 0,45 µm) (Sartorius, Epson, Reino Unido) antes de su uso.

Las columnas de exclusión de tamaño se calibraron con los siguientes patrones de masa molecular conocida: Azul de dextrano (2200 kDa), Ferritina (440 KDa, pureza 95%), albumina de suero bovina (BSA) (67 KDa, pureza ≥ 96 %), superóxido dismutasa (SOD) (32KDa, pureza 70%), metalotioneina I (7 KDa , pureza ≥ 95 %), Vitamina B12 (1,35 KDa, pureza >96 %), L-glutatión reducido (307 Da, pureza 98 %) y arsenobetaína (179 Da, pureza ≥98 %). Todos fueron suministrados por Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania) excepto la metalotioneina I, que fue suministrada por Enzo Life Sciences (Madrid, España).

Los patrones de arsenito (AsIII) y arsenato (AsV) sódico, ácido monometilarsonio (MMA), dimetilarsínico (DMA) y arsenobetaina (AsB), que se usaron en la calibración de la columna de AEC para la determinación de arsenocompuestos, fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania), a excepción de las especies metiladas que fueron adquiridas de Supelco (Bellefonte, Estados Unidos). Además, el tetrametilarsonio y óxido de trimetilarsina fueron donadas por la Dra. Vélez (Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos, IATA-CSIC, Valencia, España). Por otro lado, los patrones de selenio, selenio y selenato de sodio fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).

La sintonización del ICP-MS 7500 ce se realizó con una disolución de Li, Y, Tl y Ce al 2% (v/v) en $HNO_3$ suministrada por Agilent Technologies (California, Estados Unidos), empleando una concentración de 1 µg /L. Los gases utilizados (argón, helio e hidrógeno) fueron de la más alta calidad comercial posible, siendo suministrados por Air Liquide España, S.A (Madrid, España). En el caso del ICP-MS XSeries2 de Thermo Scientific la optimización diaria se llevó a cabo empleando una disolución de Li, Co, Y, U y Ce al 2% (v/v) en $HNO_3$ suministrada por Thermo Scientific (Bremen, Alemania).

Para la determinación de proteínas en los extractos citosólicos se usó el reactivo Bradford proporcionado por Bio-Rad (Múnich, Alemania) e hidróxido sódico suministrado por Merck (Darmstadt, Alemania).

El bromuro de sodio utilizado como corrector de interferencias en ICP-MS para el análisis de selenio fue adquirido de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).

Para la identificación de las metaloproteínas por espectrometría de masas nESI-QqQ-TOF-MS y MALDI-TOF/TOF-MS, las digestiones enzimáticas o trípticas se llevaron a cabo empleando tripsina EC 3.4.21.4 TPCK adquirida de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). El bicarbonato de sodio, urea, yodoacetamida (IAA) y ditioteitrol (DTT) fueron suministrados por BioRad (Madrid, España). La matriz ácido α-ciano-4-hidroxicinamico para las identificaciones por MALDI y el ácido trifluoroacético (TFA) fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).

Los agentes derivatizantes cloruro de metoxilamina y N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MTSFA) con 1% (v/v) de trimetilclorosilano (TMCS) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania), disueltos en piridina (Sigma-Aldrich). Por otro lado, los patrones para GC-MS: Ala, Val, Ilu, Pro, Gly, Ser, Thr, Glu, Phe, fructosa, galactosa, glucosa, Tyr, Trp, urea, Asp, Glu, colesterol, y ácidos úrico y láctico fueron todos suministrados por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).

Todos los reactivos empleados en las determinaciones de las actividades enzimáticas fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).

Para las separaciones por electroforesis, las tiras de isoelectroenfoque, como primera dimensión electroforética de pH 4-7 y 24 cm de longitud, así como la disolución de rehidratación DeStreack rehydration solution que contiene un 2% (v/v) de IPG Buffer pH 4-7 fueron adquiridos a GE Healthcare (Uppsala, Suecia). La disolución de tinción Sypro Ruby y los reactivos CHAPS y DTT fueron suministrados por BioRad (Madrid, España). Por otro lado, los fluoróforos Cy2, Cy3 y Cy5 empleados en DIGE (CyDye™DIGE fluor minimal) fueron adquiridos a GE Healthcare (Uppsala, Suecia). Por último, la sucrosa, cloruro de potasio, DTT, leupeptina y P2714 Inhibidor de proteasas fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).

Para el análisis por dilución isotópica se utilizaron los siguientes patrones enriquecidos:

- Patrón de Cu enriquecido en el isótopo m/z 65 (99.78%) proporcionado por “Cambridge Isotope Laboratories” (Andover, MA, Estados Unidos) en forma de

polvo elemental, disuelto en 500 mg de ácido nítrico y posteriormente diluido con agua ultrapura hasta 5 g.

- Patrón enriquecido $^{74}Se$ (98,84 % de abundancia en el isótopo $^{74}Se$), proporcionado por "Cambridge Isotope Laboratories" (Andover, MA, Estados Unidos) en forma de polvo elemental y disuelto en 500 mg de ácido nítrico y posteriormente diluido con agua ultrapura hasta 5 g.

- Patrón enriquecido en $^{77}Se$ (94,75 % 77Se), proporcionado por "Cambridge Isotope Laboratories" (Andover, MA, Estados Unidos) en forma de polvo elemental y disuelto en 500 mg de ácido nítrico y posteriormente diluido con agua ultrapura hasta 5 g.

La concentración exacta de estas disoluciones se determinaron mediante dilución isotópica inversa, empleando los patrones de Cu y Se con abundancias isotópicas naturales (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania).

Por último, para la determinación de la peroxidación lipídica en hígado de ratón, se utilizaron wolframato de sodio, hidroxitolueno butilado, ácido tiobarbitúrico y malondialdehído (MDA) que fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).

### 4.2.4. Materiales certificados de referencia (CRM)

Las validaciones de las metodologías analíticas para la especiación de arsénico fueron realizadas mediante el empleo del material certificado de referencia de hepatopáncreas de langosta **TORT-2** (National Research Council Canada).

Para los estudios basados en la cuantificación de las especies de selenio en el torrente sanguíneo, se utilizó el material certificado de referencia **BCR-637** procedente del "Institute for Reference Materials and Measurements" (IRMM, Geel, Bélgica). Además, se han certificado dos nuevos materiales certificados de referencia, como son los CRMs liofilizados **Plasma Clinchek** (Plasma control Level II) y **Suero Clinchek** (Serum control Level I) suministrados por RECIPE Chemicals (Munich, Alemania).

### 4.2.5. Kits comerciales

A lo largo de la presente Tesis Doctoral se han empleado los siguientes kits comerciales:

- Para el aislamiento de mitocondrias de las células hepáticas se he empleado el "Mitochondria Isolation Kit for Tissue" de Thermo Scientific (Rockford, Estados Unidos).
- 2D-Clean up kit (GE Healthcare, Uppsala, Suecia), para eliminar el exceso de yodoacetamida.

- Para la determinación de la concentración de proteínas se hizo uso del kit 2D-Quant kit (GE Healthcare, Uppsala, Suecia).

- Para la limpieza de las muestras en estudios transcriptómicos se hizo uso del kit RNeasy Mini Kit (Qiagen).

## 4.3. Experimentos de exposición a *Mus musculus*

En los diferentes experimentos de exposición se utilizaron ratones machos de 7 semanas y de 20 a 28 gramos de peso de la especie modelo *Mus musculus*, variedad BALB/cByJ, suministrados por Charles River (Barcelona, España). Estos ratones se mantuvieron en jaulas metabólicas acondicionadas durante todo el experimento (Figura 49) sometiéndolos a ciclos de luz/oscuridad cada 12/24 horas. Se les administró una dieta estándar suministrada por Harlan Laboratories Inc. IN 46250 de baja concentración en metales (Indianápolis, Estados Unidos) y agua "*ad libitum"* a lo largo de todo el experimento y durante cinco días antes del comienzo de la experiencia de exposición, para lograr su aclimatación. Se utilizó pienso con la siguiente composición: 11,9% (w/w) agua, 16.1% (w/w) proteínas, 3,1% (w/w) aceites, 60% (w/w) de extracto libre de nitrógeno (incluyendo almidón, azúcares, fibras, etc.) y 5,1% (w/w) de minerales.



**Figura 49.** Ratones *Mus musculus* en jaulas metabólicas durante los experimentos de exposición.

La concentración de cada elemento en el pienso fue la siguiente (los límites recomendados para cada uno de estos elementos se indican entre paréntesis): 70 mg/ kg Mn (40-100 mg kg-1), 17 mg /kg Cu (10–35 mg /kg), 200 µg /kg Pb (<1500 µg /kg), 21 µg/kg Hg (< 100 µg /kg), 70 µg/ kg As (<1000 µg /kg), 51 µg/ kg Cd (< 250 µg /kg), 160 µg /kg Se (<600 µg /kg).

Para los estudios de exposición por vía subcutánea se emplearon jeringas de insulina 1 mL con aguja de 0,33 mm. x 12 mm (Figura 50). Por otro lado, en los estudios de exposición por vía oral, se empleó una cánula gástrica para roedores (Figura 50).




**Figura 50.** Ratones *Mus musculus* sometidos a exposición vía subcutánea (izquierda) y vía oral (derecha).

### 4.3.1. Experimento de exposición a As

Se utilizaron 20 ratones *Mus musculus*, que se sometieron a exposición a arsénico mediante administración oral (100 µL) de una dosis de 3 mg de As (en la forma de $As_2O_3$) por kg de peso corporal y por día durante un periodo de 7 días. Se consideraron tres subgrupos de 5 ratones cada uno (A, B y C), separados y sacrificados los días 2, 4 y 7 desde el inicio del experimento, respectivamente. En el grupo control se utilizaron 5 ratones a los que se les administró oralmente 100 µL de suero fisiológico que contenía un 0,9 % de NaCl al día durante los 7 días del experimento. La figura 51 muestra el esquema del experimento de exposición para esta experiencia.

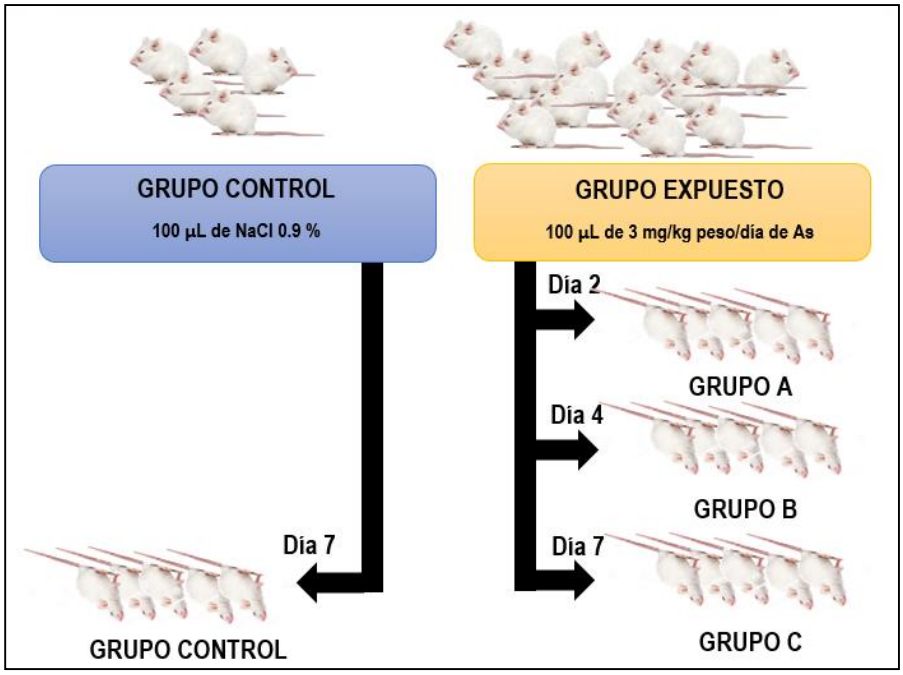



**Figura 51**. Experimento de exposición a arsénico en ratones de laboratorio *Mus musculus*.

### 4.3.2. Experimento de exposición a Hg

Se utilizaron 20 ratones *Mus musculus* divididos en dos grupos: (a) grupo de exposición formado por 15 ratones expuestos a mercurio mediante inyecciones subcutáneas (100 µL) empleando una dosis de 0.1 mg de Hg (en la forma $HgCl_2$) por kg de peso corporal por día, durante un período de 14 días. Se consideraron tres subgrupos de 5 ratones cada uno (A, B y C), separados y sacrificados los días 2, 7 y 14 desde el inicio del experimento, respectivamente. Para el grupo control se utilizaron 5 ratones a los que se les inyectó subcutáneamente 100 µL de suero fisiológico al día, conteniendo 0,9 % de NaCl durante los 14 días del experimento. La figura 52 muestra el esquema del experimento de exposición.

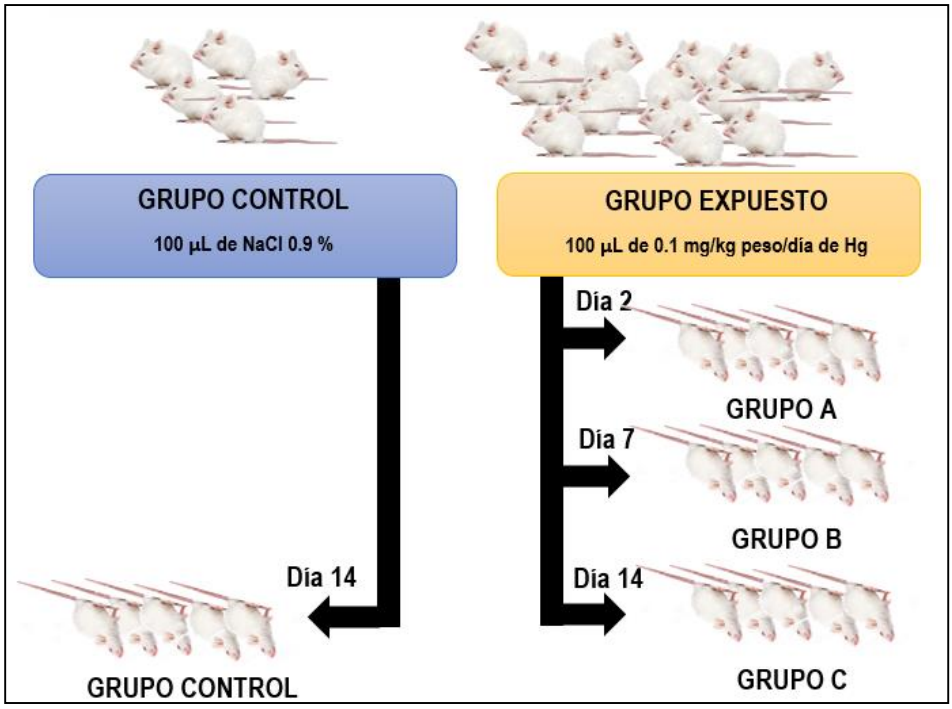



**Figura 52**. Experimento de exposición a mercurio en ratones de laboratorio *Mus musculus.*

### 4.3.3. Experimento de exposición a Cd

Se utilizaron un total de 32 ratones *Mus musculus*, que se dividieron en dos grupos: grupo de exposición y grupo control. Dieciséis ratones fueron expuestos a cadmio mediante inyección subcutánea (100 µL) utilizando dosis de 0,1 mg/Kg/día de cadmio, en forma de $CdCl_2$, durante un total de 10 días. Los ratones expuestos se distribuyeron en dos subgrupos de 8 ratones cada uno, separados de la colonia y sacrificados los días 6 y 10 del inicio del experimento. Por otro lado, se tomaron 16 ratones como grupo control a los que se les inyectó subcutáneamente

100 µL de suero fisiológico al día conteniendo un 0,9 % de NaCl durante los 10 días del experimento. La figura 53 muestra el esquema del experimento de exposición.

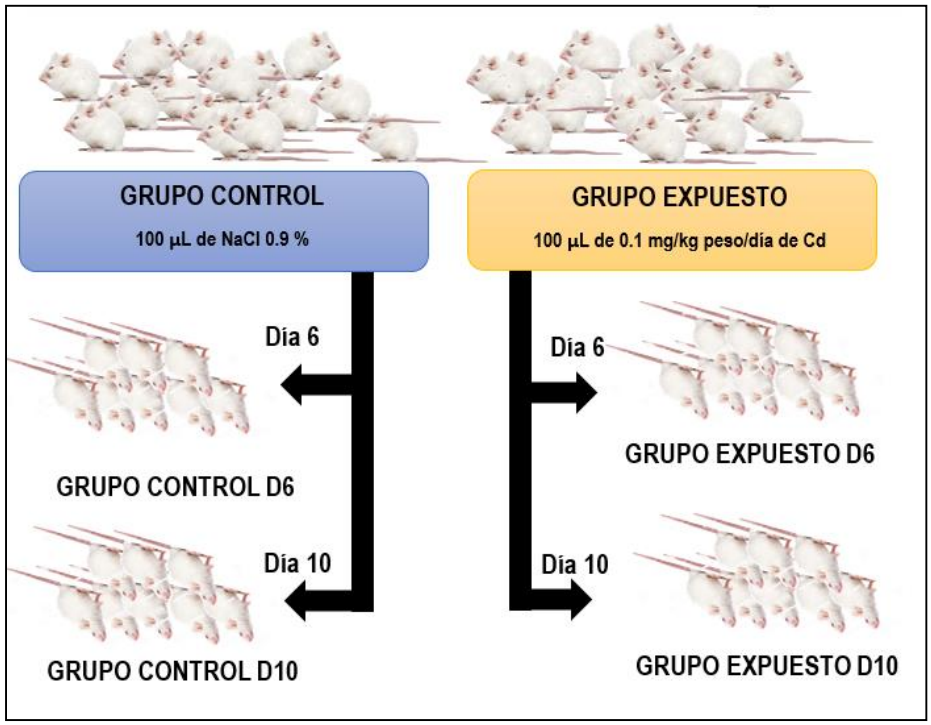



**Figura 53**. Experimento de exposición a cadmio en ratones de laboratorio *Mus musculus.*

### 4.3.4. Experimento de exposición a As/Cd

Se utilizaron un total de 64 ratones *Mus musculus*, que se dividieron en cuatro grupos (16 individuos por caja metabólica): Grupo control, Grupo expuesto a arsénico (Grupo As), Grupo expuesto a cadmio (Grupo Cd) y Grupo expuesto a ambos tóxicos de forma simultánea (Grupo As/Cd). Dieciséis ratones fueron expuestos a arsénico oralmente usando 100 µL de una dosis de 3 mg/kg peso/día en la forma de $As_2O_3$ (Grupo As), otros 16 ratones fueron expuestos oralmente a una dosis de 0,1 mg/Kg/día de cadmio, en la forma de $CdCl_2$, durante un total de 12 días (Grupo

Cd) y por último, un tercer grupo de ratones expuestos a ambos elementos en dosis individuales, dejando una hora entre la ingesta de sendas dosis (Grupo As/Cd). Los ratones expuestos se distribuyeron en dos subgrupos de 8 ratones cada uno de ellos, separados de la colonia y sacrificados los días 6 y 12 del inicio del experimento. Por otro lado, se tomaron 16 ratones como grupo control a los que se les inyectó oralmente 100 µL al día de suero fisiológico que contenía un 0,9 % de NaCl durante los 12 días del experimento. La figura 54 muestra el esquema del experimento de exposición.

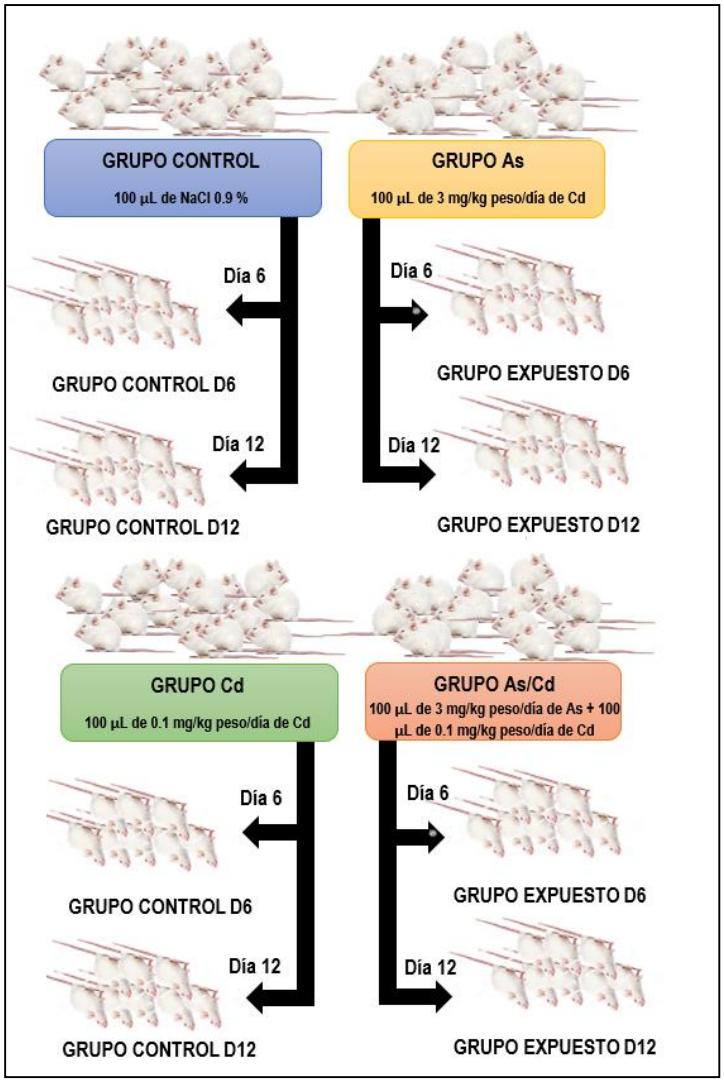



**Figura 54**. Experimento de exposición a arsénico/cadmio en ratones de laboratorio *Mus musculus.*

### 4.3.5. Experimento de exposición a Cd/$^{77}$Se

Un total de 60 ratones *Mus musculus*, se dividieron en cuatro grupos (15 individuos por caja metabólica): Grupo A expuesto a la administración oral de 0.15 mg $^{77}$Se/kg de peso/día

durante 15 días (en la forma de $SeO_3^{2-}$); Grupo B expuesto a la administración oral de 0.50 mg $^{77}Se$/kg de peso/día durante 15 días (en la forma de $SeO_3^{2-}$); Grupo C y Grupo D ambos expuestos a la administración oral de 0.15 mg $^{77}Se$/kg y 0.50 mg $^{77}Se$/kg de peso/día durante 15 días (en la forma de $SeO_3^{2-}$), respectivamente, además de ser inyectados con una dosis de 0.1 mg de Cd/kg peso/día vía subcutánea simultáneamente. Se sacrificaron tres individuos de cada grupo los días 1, 2, 5, 10 y 15 desde el inicio de la experiencia de exposición. La figura 55 muestra el esquema del experimento de exposición.

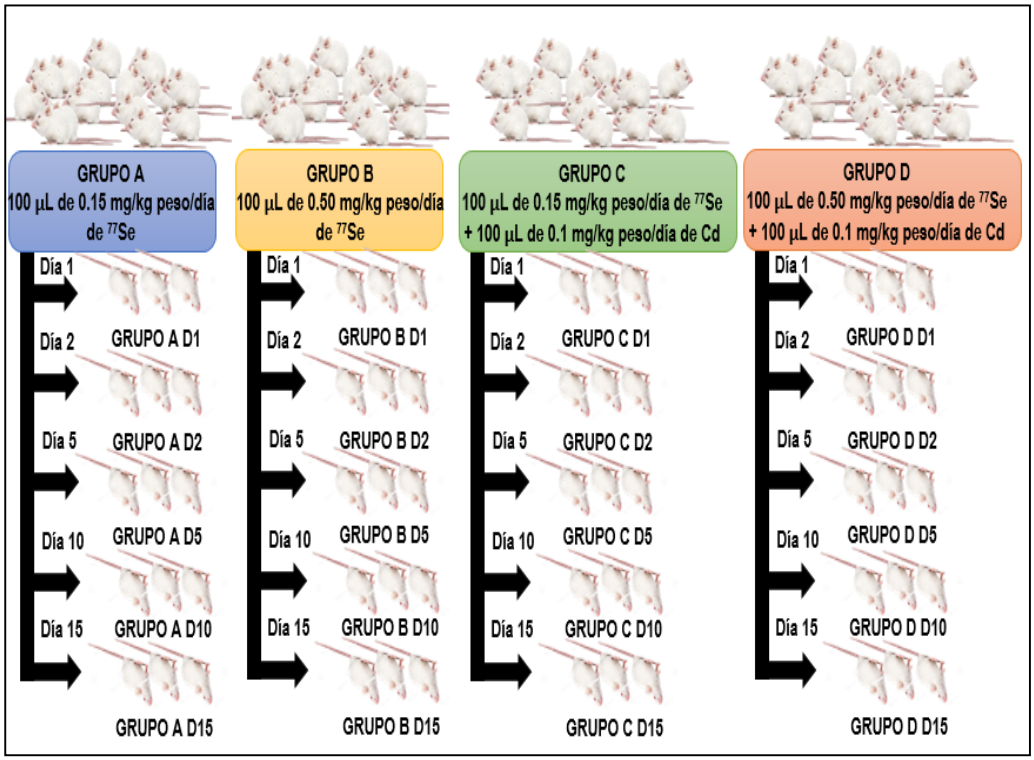



**Figura 55**. Experimento de exposición a cadmio/$^{77}$selenio en ratones de laboratorio *Mus musculus.*

### 4.3.6. Experimento de exposición a Hg/Se

Se utilizaron un total de 24 ratones *Mus musculus*, que se dividieron en cuatro grupos (6 individuos por caja metabólica): Grupo control expuesto a la administración oral y subcutánea de 100 μL de suero fisiológico que contenía un 0.9 % de NaCl durante 10 días; Grupo B expuesto a la administración subcutánea de 0.20 mg Hg/kg de peso/día durante 10 días (en la forma de $HgCl_2$), de esta forma no se excedía la $LD_{50}$ a lo largo de todo el periodo de exposición ($LD_{50}$=3 mg/kg de peso/día); Grupo C y Grupo D ambos expuestos a una dosis vía subcutánea de 0.20 mg Hg/kg de peso/día suplementados con una dosis oral de Se (en la forma de $SeO_4^{2-}$) de 0.15 mg Se/kg y 0.50 mg Se/kg de peso/día durante 15 días, respectivamente, siendo 0.15 mg Se/kg de peso/día la dosis recomendable de Se en la dieta y 0.50 mg Se/kg de peso/día una dosis alrededor de 3 veces mayor que la dosis recomendada. De cada grupo fueron sacrificados los seis individuos al final de la experiencia de exposición, es decir, a los 10 días. La figura 56 muestra el esquema del experimento de exposición.

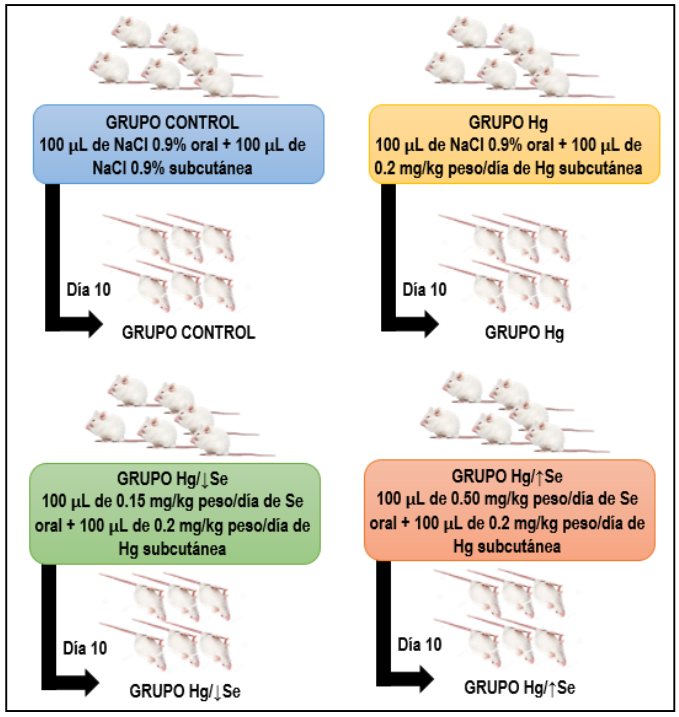



**Figura 56**. Experimento de exposición a mercurio/selenio en ratones de laboratorio *Mus musculus.*

## 4.4. Muestreo del ratón de vida libre *Mus spretus* en el Parque Nacional de Doñana y alrededores

En un amplio número de trabajos desarrollados por los grupos de investigación de los profesores Dr. Juan López-Barea y Dr. José Luis Gómez Ariza, el ratón de vida libre *Mus spretus* ha sido capturado durante diferentes periodos de tiempo desde 2002 en numerosas áreas de muestreo del Parque Nacional de Doñana y sus alrededores, una zona declarada como Reserva de la Biosfera, como se remarcó en el apartado de introducción, y otras áreas cercanas al Área Industrial de Huelva, en la que la contaminación difiere dependiendo de la zona.

Para el desarrollo del trabajo experimental de la presente Tesis Doctoral el muestreo de los ratones silvestres (*Mus spretus*) se realizó en dos períodos de tiempo distintos:

- El primer periodo abarcó desde noviembre a diciembre de 2009 en cinco áreas del Parque Nacional de Doñana, al suroeste de España (Figura 57). El Lucio del Palacio (LDP) (punto verde), se encuentra en el corazón de la Reserva Biológica de Doñana, y se considera zona no contaminada, alejada de la actividad minera, agrícola e industrial; La Rocina (ROC) (punto amarillo), situada en el curso alto del arroyo de la Rocina, al noroeste de Doñana. Esta zona se considera contaminada ya que está rodeada por áreas agrícolas (campos de fresa, cítricos y viñedos), que aportan metales y plaguicidas a este curso de agua. Además, esta zona está afectada por la contaminación difusa de las actividades petroquímicas y químicas del Polo Industrial de Huelva y por las aguas ácidas y metales que provienen de las actividades metalúrgicas de las minas de Rio Tinto, al noroeste de la provincia de Huelva. El Partido (PAR) (punto lila) y El Ajolí (AJO) (punto naranja) situados en el curso alto y bajo del arroyo El Partido, respectivamente. Estas zonas están rodeadas de campos de cítricos y viñedos. Por último, El Matochal (MAT) (punto azul), situado próximo al Río Guadiamar, está afectado por campos de arroz, y refleja las consecuencias del vertido tóxico sobre el río Guadiamar, originado por la ruptura de la balsa de residuos de la mina de Aznalcollar en 1998, como se destacó en el apartado de introducción.

- El segundo periodo de muestreo se sitúa entre los meses de septiembre y diciembre de 2011, considerando estas mismas 5 áreas en el entorno del Parque Nacional de Doñana.

De manera más específica, la tabla 5 muestra las coordenadas UTM de cada zona de muestreo y el número de ratones machos capturados en cada período.

**Tabla 5.** Coordenadas UTM de las zonas de muestreo estudiadas y número de ratones *Mus spretus* machos capturados en éstas en cada periodo de muestreo.

| Área de muestreo | Coordenadas UTM | | Número de ratones capturados (Noviembre-Diciembre 2009) | Número de ratones capturados (Septiembre-Diciembre 2011) |
|---|---|---|---|---|
| | X | Y | | |
| LDP | 193800 | 4099515 | 18 | 11 |
| ROC | 178653 | 4119937 | 14 | 9 |
| PAR | 192352 | 4124977 | 11 | 12 |
| AJO | 208681 | 4102207 | 16 | 9 |
| MAT | 191173 | 4124977 | 12 | 8 |




**Figura 57.** Áreas de muestreo del Parque Nacional de Doñana y alrededores.

La captura de los ratones se llevó a cabo con trampas de animal vivo Sherman (Figura 58), usando como cebo crema de avellana untada sobre pan. Las trampas se colocaban a última hora de la tarde y se recogían por la mañana. Para evitar la muerte por hipotermia de los ratones a primera hora de la mañana, se introdujo en las trampas algodón hidrófobo. Al recoger las trampas se seleccionaban los ratones y se liberaban otras especies capturadas como musarañas, ratas o incluso ratones silvestres de la especie *Apodemus sylvaticus*. Las trampas con los animales capturados se transportaban al laboratorio para determinar el sexo, peso y dimensiones de la cola y el tronco antes de llevar a cabo su sacrificio.



**Figura 58.** Trampa Sherman.

Por otra parte, se muestrearon sedimentos y suelos en los cinco puntos de muestreo ya mencionados. La toma de muestra se realizó en tres puntos distintos de cada área de muestreo. Se tomaron los 20 cm superiores en cada punto, excepto en los suelos arenosos, en los que se recogieron sólo los 4 cm superiores con materia orgánica. Las muestras se secaron al aire y se almacenaron en recipientes de polipropileno hasta su análisis multielemental por ICP-MS.

## 4.5. Manipulación de los animales de experimentación

Tanto los ratones *Mus spretus* capturados en el Parque Nacional y su entorno como los ratones *Mus musculus* sometidos a las experiencias de exposición se anestesiaron por inhalación individual de isoflurano IsoVet® (Braun VetCare S.A., Barcelona, España). Una vez anestesiados eran inmovilizados en placas de cera con la ayuda de agujas, para ser sacrificados por extracción sanguínea mediante punción cardiaca. Posteriormente se diseccionaron utilizando un escarpelo de cerámica, y los diferentes órganos se lavaron en placas de vidrio con suero fisiológico para

eliminar los restos de sangre y otros fluidos biológicos antes de ser congelados en nitrógeno líquido, y finalmente se almacenaron a -80 ºC hasta el momento del análisis. De forma individual se extrajeron el hígado, cerebro y riñones de cada animal. Los animales fueron manipulados de acuerdo con las normas establecidas por la Comunidad Europea. La investigación se llevó a cabo después de la aprobación por el Comité Ético de la Universidad de Huelva.

Como ya se ha comentado, la sangre se obtuvo por punción cardíaca, en viales Eppendorf de 2 mL que contenían 5 µL de ANTICLOT (diluido previamente en un factor 1:10 con suero fisiológico) como anticoagulante para la obtención del plasma (sobrenadante), tras 30 min en agitación y posterior centrifugación a 12.000 rpm. Por el contrario, la obtención de suero se realizó sin la adición de anticoagulante, también por centrifugación a 12.000 rpm una vez incubadas las muestras durante 30 minutos a 4ºC en la oscuridad.

## 4.6. Procedimientos analíticos

### 4.6.1. Procedimientos analíticos para la preparación de muestras

#### 4.6.1.1. Mineralización de las muestras para su análisis multielemental mediante ICP-ORS-MS

Para la determinación del contenido total de metales en los tejidos previamente pulverizados, los extractos de órganos y fluidos biológicos de ratón, se pesaron exactamente 250 mg y 100 mg de cada uno de ellos, respectivamente, en reactores de teflón MiniExpress de 5 mL del microondas MARS5 (CEM). Posteriormente se añadieron 800 µL de una mezcla de ácido

nítrico y peróxido de hidrógeno (4:1 v/v). Tras 10 minutos de predigestión en recipiente abierto, se llevó a cabo el ataque en horno microondas. La muestra se mineraliza a una potencia de 400 W con una rampa de temperatura desde temperatura ambiente a 160 ºC durante 15 min, manteniendo esta última temperatura durante 40 min. A continuación, los extractos mineralizados se diluyen con agua ultrapura hasta una cantidad apropiada dependiendo de la sensibilidad que requiera el análisis. Estas disoluciones se filtran con filtros hidrófilos de PVDF 0,45 µm antes de su análisis mediante ICP-ORS-MS. El análisis se lleva a cabo mediante adición de rodio (Rh) como patrón interno en una concentración de 1 µg/ml en 50 mg antes de ser digeridas las muestras en el microondas. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

En el caso de las muestras de suelos y sedimentos, éstas se secan al aire y se tamizan con un tamiz de luz de malla de 2 mm. Las muestras tamizadas se trituran en mortero de ágata y se tamizan por segunda vez con un tamiz de luz de malla de 0,63 µm. Una vez bien secas, se pesan 250 mg de cada muestra tamizada en reactores de teflón Express (CEM), para llevar a cabo su mineralización ~~para~~ y determinar su contenido en metales mediante ICP-ORS-MS, y se añaden 5 mL de ácido nítrico, 2 mL de ácido fluorhídrico y 1 mL de ácido clorhídrico, antes de ser introducidos en el horno microondas. La mineralización se llevó a cabo usando una potencia de 800 W y una rampa de temperatura desde temperatura ambiente hasta 180ºC en 10 minutos, manteniéndose a esta temperatura durante 50 minutos. Después de la digestión se añadieron 6 mL de ácido bórico para neutralizar el exceso de ácido fluorhídrico. Posteriormente, las muestras mineralizadas se enrasan a 25 g mediante adición de agua ultrapura, y se filtran con filtros hidrófilos PVDF 0,45 µm antes de su análisis mediante ICP-MS.

#### 4.6.1.2. Preparación de las muestras para la determinación de selenio total mediante IDA-ICP-ORS-qMS

Para llevar a cabo la preparación de las muestras de suero de ratón y materiales certificados de referencia para la cuantificación absoluta de Se en estas matrices mediante IDA-ICP-ORS-qMS, se pesan 200 mg de muestra directamente en los reactores de 5 mL de PTFE MiniXpress (CEM Matthews, Carolina del Norte, EE.UU.), se añade una cantidad apropiada de patrón enriquecido isotópicamente, en este caso $^{74}Se$, y 800 mg de una mezcla que contiene peróxido de hidrógeno y ácido nítrico (4:1 v/v). Tras 10 min de predigestión en los vasos abiertos, se someten a digestión ácida asistida por microondas. La mineralización se realizó a 400 W en rampa desde la temperatura ambiente a 160ºC durante 15 min ~~y~~ manteniendo durante 40 min a esta última temperatura. Después de eso, las digestiones fueron diluidas hasta 10 g con agua ultrapura y la concentración total de selenio se determinó por análisis de dilución isotópica (IDA)-ICP-ORS-qMS. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

#### 4.6.1.3. Preparación de las muestras para la determinación de Se endógeno y exógeno mediante IPD-ICP-ORS-qMS

Para llevar a cabo la preparación de las muestras~~, plasma~~ y materiales de referencia certificados (CRMs), para la cuantificación absoluta de la cantidad de Se endógeno (Se con abundancia isotópica natural) y exógeno ($^{77}Se$ enriquecido suministrado) presente en estas matrices, mediante deconvolución de patrones isotópicos (IPD)-ICP-ORS-qMS, se pesaron 100 mg de muestra directamente en viales de vidrio de 10 mL con tapón de silicona. A continuación

se añaden una cantidad apropiada de patrón enriquecido isotópicamente, en este caso $^{74}Se$, y 800 mg de una mezcla $HNO_3$ y $H_2O_2$ (4:1, v/v). Las muestras se incubaron durante 8 horas a 80ºC y después se diluyeron con agua ultrapura hasta 5 g (Figura 59). Por último, los materiales de referencia certificados digeridos y las muestras se filtraron utilizando 0,45 micras filtros de jeringa de PTFE antes del análisis por IPD-ICP-ORS-qMS.

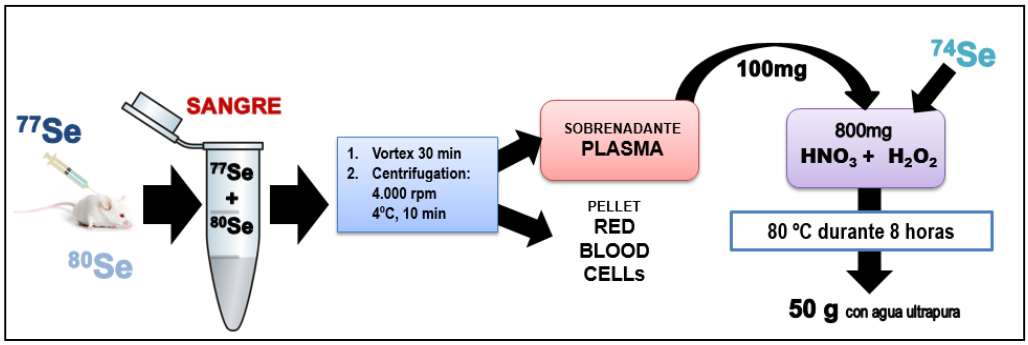



**Figura 59.** Esquema simplificado del procedimiento de preparación de muestra para la determinación de Se endógeno y exógeno en plasma de ratón por IPD-ICP-ORS-qMS.

#### 4.6.1.4. Preparación de extractos citosólicos para estudios metalómicos

Para llevar a cabo la preparación de extractos citosólicos de los diferentes órganos de ratón de la especie *Mus musculus* o *Mus spretus*, se pulverizan los órganos con un criohomogeneizador (SPEX SamplePrep (Freezer/Mills 6770) durante 1 minuto a velocidad de 15 pulsos por segundo. Seguidamente, se realizó un pool de órganos con individuos del mismo grupo, de al menos 2 individuos, dependiendo del experimento de exposición. A continuación, se procedió a la extracción de la especies citosólicas, usando un homogenizador de vidrio/teflón durante 2 minutos con ayuda de un motor rotatorio. Para ello, se añadieron 3 ml/g de una

disolución extractante que contenía 20 mM buffer de acetato de amonio pH 7,2; 1 mM de TCEP y 1 mM de PMSF. A continuación, los extractos se centrifugaron a 120.000 g durante 1 h a 4 ºC. Los sobrenadantes obtenidos se almacenaron en atmósfera de nitrógeno para evitar la oxidación a -80 º C hasta su análisis y se filtraron con filtros de 0,45 µm de PVDF (poli fluoruro de vinilideno), de baja absorción protéica, para evitar la sobrecarga y la obturación de la columna cromatográfica.

#### 4.6.1.5. Preparación de las muestras para especiación de arsénico mediante AEC-ICP-ORS-qMS

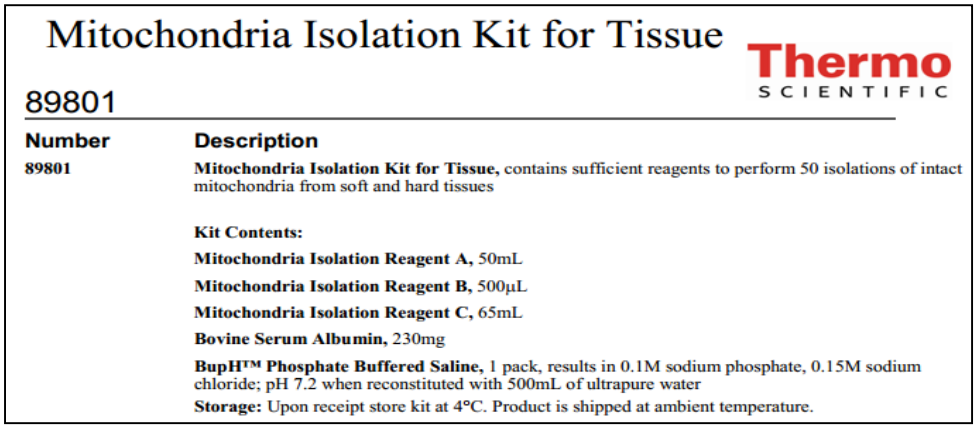
Los arsenicales de los tejidos pulverizados se extrajeron con una mezcla de metanol/agua (2:1, v/v) mediante la adición de 500 µL a 100 mg de tejido en un tubo Eppendorf seguido de agitación vigorosa con ayuda de un vórtex durante 5 minutos. A continuación, las células se rompieron utilizando una sonda ultrasonido (20 s a 4 ºC), seguido por una centrifugación a 4.000 rpm durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se recogió y se transfirió cuidadosamente a otro tubo Eppendorf. El sedimento se homogeneizó de nuevo usando un homogenizador *pellet mixer* (durante 2 min) con otros 500µL de metanol/agua (2:1, v/v), siendo finalmente centrifugado empleando las mismas condiciones descritas anteriormente. Ambos sobrenadantes se combinaron, se llevaron a sequedad bajo una corriente de nitrógeno y se almacenaron a -80ºC hasta su análisis.

Por último, el extracto se reconstituyó en 100 µL de fase móvil, se agitó vigorosamente y se centrifugó de nuevo (4.000 rpm, a 4 ° C durante 10 minutos). El sobrenadante se recolectó para el análisis, una vez filtrado a través de poli-Iso-Disc PVDF (10 mm de diámetro, 0,2 micras

de tamaño de poro) para evitar la sobrecarga de la columna u obstrucción. Los materiales de referencia certificados fueron tratados por este mismo procedimiento.

#### 4.6.1.6. Preparación de extractos citosólicos y mitocondriales de células hepáticas de *Mus musculus* para su estudio metalómico y metabolómico

La preparación de extractos citosólicos y mitocondriales se llevó a cabo siguiendo las instrucciones de un kit comercial específico para este propósito, el aislamiento de mitocondrias. El kit fue suministrado por Thermo Scientific (Rockford, Estados Unidos) para tejidos blandos, como es el caso del hígado de ratón, con algunas modificaciones (Figura 60).



Mitochondria Isolation Kit for Tissue

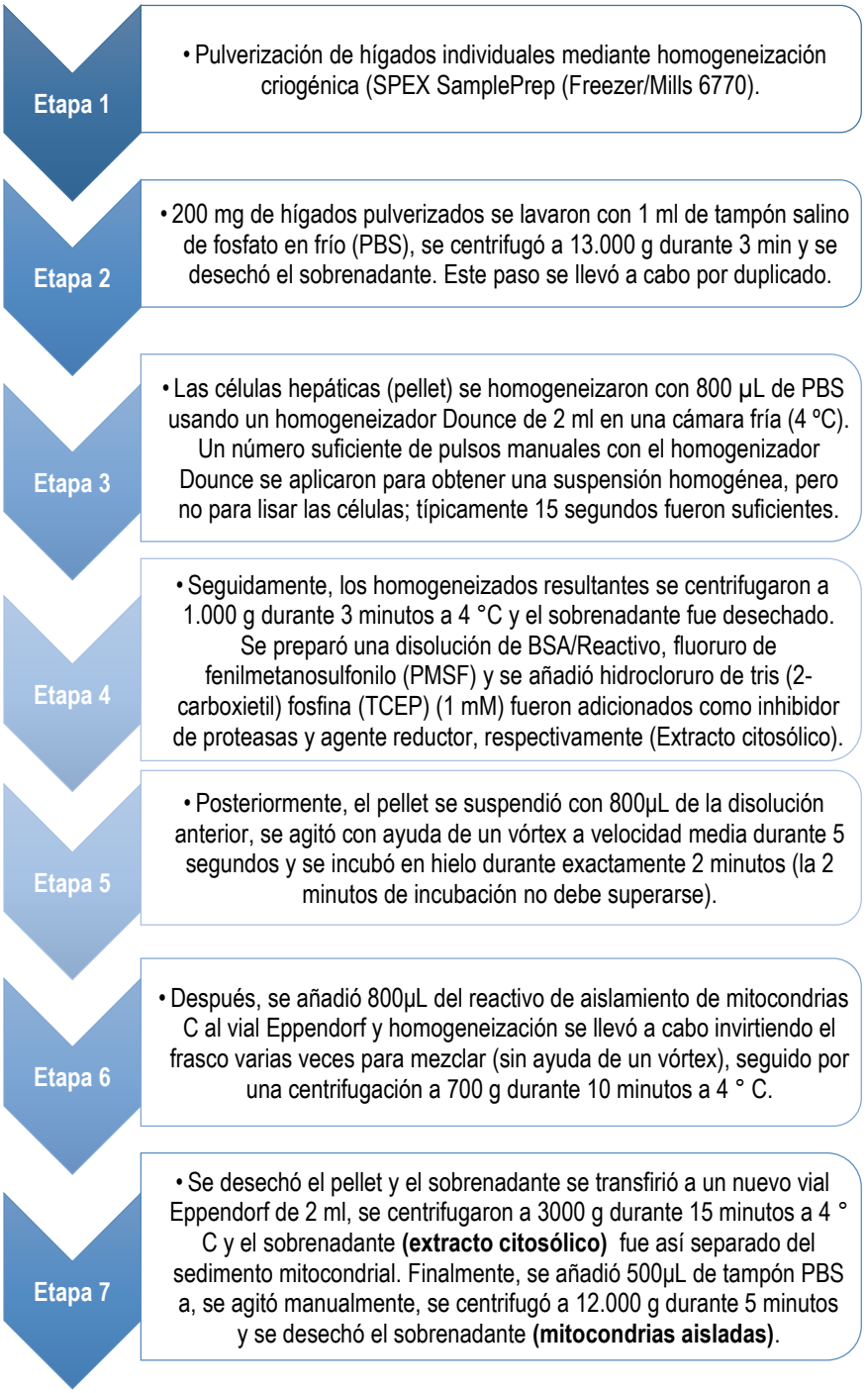
Thermo SCIENTIFIC

89801

| Number | Description |
|---|---|
| 89801 | **Mitochondria Isolation Kit for Tissue,** contains sufficient reagents to perform 50 isolations of intact mitochondria from soft and hard tissues |
| | **Kit Contents:** |
| | **Mitochondria Isolation Reagent A,** 50mL |
| | **Mitochondria Isolation Reagent B,** 500µL |
| | **Mitochondria Isolation Reagent C,** 65mL |
| | **Bovine Serum Albumin,** 230mg |
| | **BupH™ Phosphate Buffered Saline,** 1 pack, results in 0.1M sodium phosphate, 0.15M sodium chloride; pH 7.2 when reconstituted with 500mL of ultrapure water |
| | **Storage:** Upon receipt store kit at 4ºC. Product is shipped at ambient temperature. |

**Figura 60.** Kit comercial empleado en el aislamiento de mitocondrias de células hepáticas suministrado por Thermo Scientific.

Básicamente, el procedimiento experimental a seguir se resume en una serie de etapas que se detallan a continuación:


Etapa 1
• Pulverización de hígados individuales mediante homogeneización criogénica (SPEX SamplePrep (Freezer/Mills 6770).
Etapa 2
• 200 mg de hígados pulverizados se lavaron con 1 ml de tampón salino de fosfato en frío (PBS), se centrifugó a 13.000 g durante 3 min y se desechó el sobrenadante. Este paso se llevó a cabo por duplicado.
Etapa 3
• Las células hepáticas (pellet) se homogeneizaron con 800 µL de PBS usando un homogeneizador Dounce de 2 ml en una cámara fría (4 ºC). Un número suficiente de pulsos manuales con el homogenizador Dounce se aplicaron para obtener una suspensión homogénea, pero no para lisar las células; típicamente 15 segundos fueron suficientes.
Etapa 4
• Seguidamente, los homogeneizados resultantes se centrifugaron a 1.000 g durante 3 minutos a 4 °C y el sobrenadante fue desechado. Se preparó una disolución de BSA/Reactivo, fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF) y se añadió hidrocloruro de tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP) (1 mM) fueron adicionados como inhibidor de proteasas y agente reductor, respectivamente (Extracto citosólico).
Etapa 5
• Posteriormente, el pellet se suspendió con 800µL de la disolución anterior, se agitó con ayuda de un vórtex a velocidad media durante 5 segundos y se incubó en hielo durante exactamente 2 minutos (la 2 minutos de incubación no debe superarse).
Etapa 6
• Después, se añadió 800µL del reactivo de aislamiento de mitocondrias C al vial Eppendorf y homogeneización se llevó a cabo invirtiendo el frasco varias veces para mezclar (sin ayuda de un vórtex), seguido por una centrifugación a 700 g durante 10 minutos a 4 ° C.
Etapa 7
• Se desechó el pellet y el sobrenadante se transfirió a un nuevo vial Eppendorf de 2 ml, se centrifugaron a 3000 g durante 15 minutos a 4 ° C y el sobrenadante (extracto citosólico) fue así separado del sedimento mitocondrial. Finalmente, se añadió 500µL de tampón PBS a, se agitó manualmente, se centrifugó a 12.000 g durante 5 minutos y se desechó el sobrenadante (mitocondrias aisladas).

Para la obtención del extracto mitocondrial de las células hepáticas para estudios metalómicos, la lisis celular se llevó a cabo empleando tres procedimientos diferentes: i) mediante el uso de una sonda de ultrasonidos; ii) empleando ciclos de congelación/descongelación en nitrógeno líquido; y por último, mediante lisis osmótica con medio de sacarosa. Los mejores resultados se obtuvieron con lisis osmótica utilizando 0,25 M de sacarosa y ayuda de un *pellet mixer* para llevar a cabo la homogenización (extracto mitocondrial).

Por otro lado, la lisis mitocondrial para llevar a cabo estudios metabolómicos se llevó a cabo por la adición de 200 µl de una mezcla 2:1 metanol/acetonitrilo y tras su homogenización con ayuda de un pellet mixer durante 2 minutos, este extracto fue centrifugado a 12.000 rpm y 4 ºC, dividiendo el sobrenadante en dos alícuotas de 100 µL, una de ella para los estudios metabolómicos mediante DIMS y la otra para los estudios metabolómicos usando GC-MS.

Para llevar a cabo la adquisición en modo positivo (ESI+) mediante DI-ESI-QqQ-TOF-MS, se añadieron 0,1 % de Ácido fórmico y 20 mM de acetato de amonio a los extractos con el fin de facilitar la formación de aductos para su detección por espectrometría de masas molecular.

#### 4.6.1.7. Aislamiento de glóbulos rojos (RBCs) y obtención de suero sanguíneo para su estudio metabolómico

Para llevar a cabo estudios metabolómicos en suero sanguíneo y glóbulos rojos (RBCs), las muestras de sangre se extrajeron por punción cardiaca en tubos de 2 ml BD Vacutainer SST II con separador de gel y sistema de vacío Avance, preenfriados en un refrigerador. Una vez extraídas, las muestras de sangre se enfriaron a 4 ºC y se protegieron de la luz durante 60 min

para permitir la retracción del coágulo y obtener el por centrifugación (4.000 g durante 30 min). Las células sanguíneas (pellet) se lavaron por triplicado con solución de PBS. En este proceso hay que tener en cuenta las siguientes recomendaciones:

- Invertir el tubo suavemente 6 veces inmediatamente después de la extracción.
- Tiempo mínimo antes de la centrifugación: 30 min. después de la extracción.
- Tiempo máximo antes de la centrifugación: 2 h. después de la extracción.
- Fuerza y tiempo de centrifugación: 1300 a 2000 g; 10 min. a 18-22°C (condiciones estándar)
- No centrifugar el tubo de nuevo una vez formada la barrera de gel.

#### 3.6.1.8. Preparación de extractos de glóbulos rojos (RBCs) para su estudio metabolómico

Para el análisis por DIMS de las muestras de RBCs, se añadieron 300 µL de agua ultrapura a 100 mg de células, se enfrió con hielo y se agitó durante 5 min usando un *pellet mixer* a 4 ºC, lo que provocó la lisis celular. A continuación, las muestras se congelaron durante 10 s en $N_2$ líquido y se descongelaron a 4 ºC (3 repeticiones). Seguidamente, se añadieron 400 µL de una mezcla (2:1) de etanol/cloroformo con el fin de precipitar la hemoglobina. Después de agitar durante 5 min, el extracto se centrifugó (10.000 g, 4 ºC, 60 min), recogiendo el sobrenadante y transfiriéndolo a un nuevo tubo Eppendorf de 2 mL. Finalmente, los sobrenadantes resultantes se llevaron a sequedad bajo corriente de $N_2$ y se almacenaron a -80 ºC hasta su análisis.

Los extractos de RBCs se reconstituyeron a 200 µL de una mezcla 2:1 de metanol/agua y se dividieron en dos partes alícuotas antes del análisis ESI-MS. Para la adquisición de las muestras mediante ionización positiva, se añadieron al extracto ácido fórmico al 0,1% (v/v) y 50 mM de acetato de amonio. En el caso de la ionización negativa se analizó el extracto intacto.

#### 3.6.1.9. Preparación de extractos de suero o plasma para su estudio metabolómico

Para llevar a cabo el estudio metabolómico en suero y plasma sanguíneo de ratón, se tomaron 100 µL de estos fluidos biológicos y se precipitaron las proteínas por adición de 400 µL de una mezcla de metanol/acetonitrilo (2:1, v/v) en un tubo Eppendorf seguido de una agitación vigorosa con ayuda de un vórtex durante 5 min, y de su centrifugación durante 10 min a 4.000 g y 4 °C. El sobrenadante se recogió cuidadosamente evitando coger las proteínas precipitadas, se transfirió a otro tubo Eppendorf y el sobrenadante resultante se llevó a sequedad bajo corriente de $N_2$ para el almacenamiento a -80ºC hasta su análisis (extracto polar). Para extraer los metabolitos lipofílicos, el pellet se homogeneizó de nuevo, con 200 µL de una mezcla de cloroformo/metanol (2:1, v/v), utilizando un *pellet mixer* (durante 2 min), y se centrifugó durante 10 min a 10.000 g y 4 °C. El sobrenadante resultante se llevó a sequedad bajo corriente de $N_2$ y se almacenó a -80ºC para su análisis. Los extractos polares se reconstituyeron con 100 µL de una mezcla de metanol/acetonitrilo (2:1, v/v) y los extractos lipofílicos se reconstituyeron con 100 µL de una mezcla de cloroformo/metanol (2:1, v/v) antes del análisis por DIMS.

Para la adquisición de las muestras mediante ionización positiva (ESI+), se añadió ácido fórmico al 0,1% al extracto polar. Por otro lado, los lípidos neutros no se ionizan fácilmente por

ESI, y para favorecer la ionización, se añadió 50 mM de acetato de amonio a los extractos lipofílicos. En el caso de la ionización negativa, no se empleó ningún aditivo.

#### 3.6.1.10. Preparación de extractos de tejidos para su estudio metabolómico

La preparación de las muestras de tejidos (hígado, cerebro y riñón) para su posterior análisis metabolómico basado en DIMS se llevó a cabo también en dos pasos:

i. Los metabolitos polares se extrajeron mediante la adición de 200 μL de una mezcla de metanol/acetonitrilo (2:1, v/v) a 50 mg de tejido pulverizado en un tubo Eppendorf seguido de una agitación vigorosa con ayuda de un vórtex durante 5 min. A continuación, las células se rompieron usando un homogenizador *pellet mixer* (durante 2 min) a 4ºC, y posteriormente el extracto resultante se centrifugó durante 10 min a 4.000 g y 4 °C. El sobrenadante se recogió y se transfirió cuidadosamente a otro tubo Eppendorf. El pellet resultante se homogeneizó de nuevo como anteriormente, usando en este caso 100 μL de la misma mezcla con idea de recuperar una mayor cantidad de metabolitos que hayan podido ser arrastrados al fondo durante la centrifugación. Este extracto se homogenizó de nuevo usando las mismas condiciones y se centrifugó como se describió anteriormente, transfiriendo el sobrenadante al mismo tubo Eppendorf anterior y el pellet obtenido se conservó para su posterior tratamiento. Ambos sobrenadantes se combinaron y se almacenan a -80ºC para el análisis.

ii. Los metabolitos lipofílicos se extrajeron del pellet restante con 200 μL de una mezcla de cloroformo/metanol (2:1, v/v), utilizando un *pellet mixer* y las mismas condiciones descritas anteriormente. Finalmente, el sobrenadante resultante se almacenó a -80ºC hasta el momento de su análisis.

Para la adquisición de las muestras mediante ionización positiva (ESI+), se añadió ácido fórmico al 0,1% al extracto polar. Por otro lado, se añadió 30 mM de acetato de amonio a los extractos lipofílicos. En el caso de la ionización negativa, no se empleó ningún aditivo.

#### 3.6.1.11. Preparación de las muestras para su estudio metabolómico mediante GC-MS

La preparación de las muestras para llevar a cabo el estudio metabolómico mediante su análisis por GC-MS se realizó con mucha precaución para asegurar la fiabilidad de los análisis metabolómicos.

El suero o plasma se descongeló a 4ºC y en agitación con ayuda de un vórtex. Para la extracción de metabolitos a partir de suero o plasma, 100 μL de estos fluidos biológicos se mezclaron con 400 μL de una mezcla de metanol/etanol (1:1, v/v) en un tubo Eppendorf y se agitó durante 5 min a temperatura ambiente con ayuda de un vórtex, seguido de centrifugación a 4.000 g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a otro tubo Eppendorf y se llevó a sequedad bajo una corriente de nitrógeno. Los metabolitos presentes en el torrente sanguíneo no son volátiles, por lo que un paso previo al análisis por GC-MS de derivatización es obligatorio. Para este fin, todas las muestras se derivatizaron con 50 μL de una disolución de hidrocloruro de

metoxilamina (20 mg $mL^{-1}$ en piridina) a 70ºC durante 40 min para la protección de grupos carbonilo por metoximación, seguido de una incubación con 50 μL de N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA) con 1% (w / v) de trimetilclorosilano (TMCS) a 50ºC durante 40 min para la derivatización de aminas primarias y grupos hidroxilos primarios y secundarios. Además, el TMCS es necesario en la derivatización de amidas, aminas secundarias impedidas y grupos hidroxilos, con el fin de derivatizar todos los metabolitos posibles y con ello obtener una mayor cantidad de información metabólica. Finalmente, las muestras derivatizadas fueron agitadas vigorosamente con ayuda de un vórtex durante 2 min, y finalmente centrifugadas a 4.000 g durante 5 min y el sobrenadante recolectado para su análisis por GC-MS en un inserto de vidrio para viales de cromatografía de gases.

En el caso del análisis por GC-MS de los extractos mitocondriales de células hepáticas, se llevaron a sequedad 100 μL de dicho extracto (procedimiento detallado en el apartado 3.6.1.6.) y fueron posteriormente derivatizados siguiendo el mismo procedimiento descrito previamente suero o plasma.

#### 3.6.1.12. Preparación de extractos citosólicos para estudios proteómicos

La preparación de los extractos citosólicos para estudios electroforéticos empleando la electroforesis diferencial en gel (DIGE), se prepararon diferentes mezclas de tejidos pulverizados de individuos pertenecientes a un mismo subgrupo. En este caso, se pesaron 100 mg de muestra y se añadieron 300 μL de tampón de extracción (Tris-HCl 20 mM, pH 7.6, que contiene 0,5 M de sacarosa, 0,15 M de KCl, 20 mM de DTT, 1 mM PMSF, 6 M leupeptina y un inhibidor de proteasas

P2714 de Sigma-Aldrich). Seguidamente, los extractos fueron homogenizados con homogenizador vidrio/teflón durante 2 min a 4 ºC. Posteriormente, los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación (14.000 g, 10 min, 4ºC) y los sobrenadantes fueron tratados con benzonasa (500 U / mL) y se ultracentrifugó (105.000 g, 60 min). Estos extractos se precipitaron mediante el uso de un kit-2D Clean (GE-Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante, y por último se resuspendió en urea 8 M que contenía además 30 mM de Tris-HCl y 4% w/v CHAPS, ajustando finalmente el pH a 8,5. La concentración de proteínas en estos extractos se determinó utilizando el kit 2D-Quant (GE Healthcare).

Por otro lado, para la preparación de las muestras de suero para estudios de proteómica redox (o grupos tioles oxidados) mediante electroforesis en gel, se homogeneizaron 100 µL de muestra en 300 µL de 40 mM HEPES, a pH 7.4, que contenía 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1mM PMSF, 6 µM leupetina, un inhibidor de proteasas (Sigma Protease Inhibitor P2714) y 200 mM 2-iodoacetamida (IAA) para bloquear los tioles reducidos nativos. Después de la incubación de los extractos durante 15 min a temperatura ambiente, los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 14.000 g (15 min, 4ºC) y el sobrenadante se ultracentrifugó (100.000 g, 60 min, a 4ºC). El extracto citosólico resultante se mezcló con CHAPS (1%, w/v) y se incubó a 37ºC durante 30 min. El exceso de IAA se eliminó mediante el uso de un kit de 2D-Clean-up (GE-Healthcare) y las proteínas se resuspendieron en 100 µL de tampón 40 mM de HEPES que contenía 50 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1mM de PMSF a pH 7.4, 1% w/v de CHAPS y 1 mM de tributilfosfina para reducir los tioles oxidados. 5-yodoacetamidofluoresceína (5-IAF, disuelto en DMSO) se añadió a una concentración final de 200 mM y el extracto se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 min. El exceso de 5-FAI y las sales se eliminaron con el kit-2D

Clean (GE-Healthcare). Finalmente, las proteínas se resuspendieron en 50 µL de Tris-HCl 2 M a pH 6.8, 30% de glicerol y 70 mM β-mercaptoetanol.

### 3.6.2. Procedimientos analíticos para el análisis multielemental de las muestras

#### 3.6.2.1. Determinación multielemental en muestras biológicas y ambientales mediante ICP-ORS-qMS

La cuantificación de los contenidos multielementales en las diferentes matrices biológicas empleadas (órganos, fluidos biológicos y extractos citosólicos) se llevó a cabo mediante ICP-ORS-qMS, una vez mineralizadas tras digestión ácida asistida por microondas. La cuantificación se llevó a cabo en todos los casos por calibración interna, empleando como estándar interno rodio (Rh) a una concentración de 1 µg $L^{-1}$ en todas las muestras, patrones de calibración y controles de calidad empleados.

Para este propósito se empleó un nebulizador Micromist (GlasExpansion, Suiza). La optimización de los diferentes parámetros del ICP-MS: posición de la antorcha, caudal del gas de nebulización, potencia de radiofrecuencia y voltaje de las lentes iónicas se realizó diariamente con una disolución de 1 µg $L^{-1}$ de Li, Y, Ce y Tl, al 2% en $HNO_3$. Tras la optimización de los parámetros se comprueba la exactitud de las masas, la resolución espectral y los porcentajes de óxidos e iones doblemente cargados, así como su sensibilidad y reproducibilidad. A su vez se optimizan los flujos de gas de colisión/ reacción en función de la complejidad de la matriz.

En la presente Tesis Doctoral para la determinación multielemental mediante ICP-ORS-MS se han empleado dos equipos de casas comerciales diferentes, el ICP-MS Agilent 7500ce y el ICP-MS Thermo Scientific XSeries2. Las condiciones operacionales óptimas para el análisis del contenido total de metales en estas matrices biológicas mediante el uso del ICP-MS 7500ce se resumen en la tabla 6. Por otro lado, las condiciones operacionales cuando el ICP-MS XSeries2 es usado se recogen en la tabla 7.

Por otro lado, las digestiones ácidas de suelos y sedimentos fueron analizadas por triplicado empleando las condiciones operacionales que se recogen en la tabla 6.

**Tabla 6.** Condiciones operacionales optimizadas para ICP-MS Agilent 7500ce.

| ***Condiciones ICP-MS Agilent 7500ce*** | |
|---|---|
| Potencia | 1500 W |
| Flujo de gas de plasma | 15.0 L $min^{-1}$ |
| Flujo de gas auxiliar | 1.0 L $min^{-1}$ |
| Flujo de carrier gas | 0.9 L $min^{-1}$ |
| Profundidad de muestreo | 8 mm |
| Conos | Ni |
| Flujo de He | 3.9 mL $min^{-1}$ |
| Flujo de $H_2$ | 3.5 mL $min^{-1}$ |
| $Q_{oct}$ | -18 V |
| $Q_p$ | -16 V |
| Tiempo de integración | 0.3 segundos por isótopo |
| Isótopos monitorizados | Usando He como gas de colisión: $^{53}Cr$, $^{55}Mn$, $^{63}Cu$, $^{65}Cu$, $^{64}Zn$, $^{66}Zn$, $^{75}As$, $^{57}Fe$, $^{103}Rh$, $^{114}Cd$. |
| | Usando $H_2$ como gas de reacción: $^{56}Fe$, $^{80}Se$. |

**Tabla 7.** Condiciones operacionales optimizadas para ICP-MS Thermo Scientific XSeries2.

| *Condiciones ICP-MS Thermo Scientific XSeries2* | |
|---|---|
| Potencia | 1300 W |
| Flujo de gas de plasma | 13.0 L $min^{-1}$ |
| Flujo de gas auxiliar | 1.0 L $min^{-1}$ |
| Flujo de carrier gas | 1.0 L $min^{-1}$ |
| Profundidad de muestreo | 8 mm |
| Conos | Xs interfase de Ni |
| Flujo de He | 4.0 mL $min^{-1}$ |
| $Q_{oct}$ | -19 V |
| $Q_p$ | -17 V |
| Focus | -9 V |
| Tiempo de integración | 0.3 segundos por isótopo |
| Isótopos monitorizados | Usando He como gas de colisión: $^{75}As$, $^{77}ArCl^+$ |

### 3.6.2.2. Determinación de selenio total mediante IDA-ICP-ORS-qMS

La cuantificación absoluta del contenido de Se en suero mediante IDA-ICP-ORS-qMS fue validada utilizando un CRM de suero humano (BCR-637) certificado para el contenido total de Se (Set 81 ± 7 ng $mL^{-1}$). Además, como control de calidad, este material fue fortificado con 50 ng $mL^{-1}$ de selenio inorgánico para evaluar la recuperación y la precisión del método propuesto. Una vez que las muestras fueron mineralizadas mediante digestión ácida asistida por microondas, los digeridos fueron analizados usando las condiciones operacionales que se recogen en la tabla 8. Los resultados obtenidos para el material de CRM empleado se muestran en la tabla 9. Las muestras de suero o plasma de ratón se analizaron siguiendo el mismo procedimiento descrito.

**Tabla 8.** Condiciones operacionales optimizadas para el análisis de Se total mediante IDA-ICP-ORS-qMS.

| *Condiciones ICP-MS Agilent 7500ce* | |
|---|---|
| Potencia | 1500 W |
| Flujo de gas de plasma | 15.0 L $min^{-1}$ |
| Flujo de gas auxiliar | 1.0 L $min^{-1}$ |
| Flujo de carrier gas | 0.95 L $min^{-1}$ |
| Profundidad de muestreo | 7 mm |
| Conos | Ni |
| Flujo de $H_2$ | 4.0 mL $min^{-1}$ |
| $Q_{oct}$ | -18 V |
| $Q_p$ | -16 V |
| Tiempo de integración | 1 segundo por isótopo |
| Puntos por pico | 3 |
| Réplicas | 5 |
| Tiempo muerto detector | 47 ns |
| Isótopos monitorizados | $^{74}Se$, $^{76}Se$, $^{77}Se$, $^{78}Se$, $^{80}Se$, $^{82}Se$, $^{79}Br$, $^{81}Br$ y $^{83}Kr$ |

**Tabla 9.** Resultados de Se obtenidos para el CRM BCR-637 mediante IDA-ICP-ORS-qMS.

| | Suero humano BCR-637 (ng $g^{-1}$± SD) | SD (n=5) | Suero humano BCR-637 Fortificado con 50 ng $g^{-1}$ de Se (ng $g^{-1}$± SD) | SD (n=5) |
|---|---|---|---|---|
| Se TOTAL | 82 | ± 1 | 131 | ± 1 |
| Valor certificado (ng.mL-1) | 81 | ± 7 | ----- | ----- |

### 3.6.2.3. Determinación de selenio endógeno y exógeno total mediante IPD-ICP-ORS-qMS

Para la determinación de la relación isotópica del selenio endógeno y exógeno, se prepararon disoluciones acuosas individuales enriquecidas en $^{77}Se$, $^{74}Se$, $^{80}Se$ en concentraciones de 100 ng $g^{-1}$ para obtener la máxima señal para estas masas. Se utilizó una

disolución de 5% (w/w) de $HNO_3$ para corregir el nivel de fondo o "*background*" causado por las interferencias poliatómicas originadas en el plasma. Además, se realizaron las correcciones necesarias para compensar la formación de $SeH^+$ (masas 76, 82 y 83) y $BrH^+$ (masas 79 y 81) utilizando ecuaciones matemáticas. Por otro lado, se calculó la cantidad necesaria de *spike* o fortificación como se ha descrito previamente por García Alonso y colaboradores e (García-Alonso y col., 1997) Hinojosa-Reyes y colaboradores (Hinojosa-Reyes *y col*., 2003)

Para llevar a cabo la cuantificación absoluta del contenido de Se endógeno y exógeno en suero mediante IPD-ICP-ORS-qMS, se validó la metodología utilizando un CRM de suero humano (BCR-637) certificado para el contenido total de Se (Set 81 ± 7 ng $mL^{-1}$), o Se endógeno (de abundancia isotópica natural). Además, al no existir materiales de referencia certificados para este tipo de análisis, el citado CRM BCR-637 de suero humano fue fortificado con 50 ng $mL^{-1}$ de $^{77}$selenio inorgánico (de abundancia isotópica enriquecida en el isótopo 77) para evaluar la recuperación y la precisión del método propuesto. Una vez que las muestras fueron mineralizadas mediante digestión ácida por incubación a 80 ºC durante 8 h, los digeridos fueron analizados usando las condiciones operacionales que se recogen en la tabla 10. Los resultados obtenidos en la validación del material de referencia BCR-637 fortificado utilizado se muestran en la tabla 11. Las muestras de suero o plasma de ratón se analizaron siguiendo el mismo procedimiento descrito.

**Tabla 10.** Condiciones operacionales optimizadas para el análisis de Se total endógeno y exógeno mediante IPD-ICP-ORS-qMS.

| *Condiciones ICP-MS Agilent 7500ce* | |
|---|---|
| Potencia | 1500 W |
| Flujo de gas de plasma | 15.0 L $min^{-1}$ |
| Flujo de gas auxiliar | 1.0 L $min^{-1}$ |
| Flujo de carrier gas | 0.95 L $min^{-1}$ |
| Profundidad de muestreo | 7 mm |
| Conos | Ni |
| Flujo de $H_2$ | 4.0 mL $min^{-1}$ |
| $Q_{oct}$ | -18 V |
| $Q_p$ | -16 V |
| Tiempo de integración | 4 segundo por isótopo |
| Puntos por pico | 3 |
| Réplicas | 5 |
| Tiempo muerto detector | 47 ns |
| Isótopos monitorizados | $^{74}Se$, $^{76}Se$, $^{77}Se$, $^{78}Se$, $^{80}Se$, $^{82}Se$, $^{79}Br$, $^{81}Br$ y $^{83}Kr$ |

**Tabla 11.** Resultados de Se obtenidos para el CRM BCR-637 fortificado con $^{77}Se$ mediante IPD-ICP-ORS-qMS.

| | Suero humano BCR-637 (ng $g^{-1}$± SD) | SD (n=5) | Suero humano BCR-637 Fortificado con 50 ng $g^{-1}$ de $^{77}Se$ (ng $g^{-1}$± SD) | SD (n=5) |
|---|---|---|---|---|
| Se TOTAL endógeno | 82 | ± 1 | 79 | ± 2 |
| Se TOTAL exógeno | < LOD | | 52 | ± 1 |
| Valor certificado (ng.$mL^{-1}$) | 81 | ± 7 | ----- | ----- |

### 3.6.2.4. Especiación de metaloproteínas de extractos citosólicos o fluidos biológicos mediante SEC-ICP-ORS-qMS (Primera dimensión)

En la mayoría de los estudios metalómicos basados en el uso de la cromatografía líquida, se ha utilizado la cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) como primera dimensión

cromatografía mediante el trazado de las metaloespecies cuando es acoplada a ICP-MS como detector. En este campo, el interés por evitar la desnaturalización metal-ligando y lograr así una buena recuperación hace que la SEC sea una técnica de uso habitual. Uno de los inconvenientes que conlleva este procedimiento, como ya se mencionó en el apartado de introducción de la presente Tesis Doctoral, es que la resolución de los picos es por lo general pobre, de varios minutos de anchura. Incluso cuando está presente en el pico una única especie de un elemento dado, ésta puede coeluir con otras sustancias presentes en la matriz de la muestra que contenga este mismo elemento en su estructura. De esta manera, la coincidencia del tiempo de elución de un compuesto con el de su patrón en una separación SEC no se puede considerar como una prueba definitiva en su identificación debido al pequeño número de platos teóricos de estos sistemas cromatográficos, problema que se agrava por la baja presión a la que normalmente operan estos sistemas. No obstante, el uso de SEC como primera dimensión cromatográfica en estudios metalómicos nos genera una información cualitativa de gran utilidad para tener una primera aproximación sobre la alteración que se origina sobre una determinada biomolécula en la exposición de un organismo vivo a un determinado metal. No obstante, es necesario una segunda separación o purificación cromatográfica de dicha fracción, por cromatografía de fase reversa o de intercambio iónico para alcanzar la resolución necesaria.

Durante el desarrollo experimental de la presente Tesis Doctoral se han utilizado varias columnas SEC, tanto a escala analítica como a escala preparativa. En la tabla 12 se resumen las condiciones cromatográficas empleadas en cada una de las columnas utilizadas. Por otro lado, la calibración de las columnas se llevó a cabo mediante la preparación de una mezcla de metaloproteínas de diferentes masas moleculares en función del rango de separación eficaz de

cada una de ellas. Los tiempos de retención de cada una de estas metaloproteínas se recogen también en la tabla 12.

En primer lugar, tanto las disoluciones de calibración como los extractos citosólicos, así como los fluidos biológicos se filtraron con filtros Iso-Disc PVDF (diámetro 25mm, 0,2 µm tamaño poro) para evitar la sobrecarga y el atasco de la columna. La detección molecular y elemental de las biomoléculas presentes se llevó a cabo mediante detectores UV (254 nm) e ICP-MS, respectivamente. El acoplamiento en línea SEC-UV-ICP-MS se realizó conectando la salida del detector UV a la entrada del nebulizador del ICP-MS mediante 30 cm de tubo PEEK (0.17 mm i.d., color verde). Para este acoplamiento instrumental a escala analítica se empleó un nebulizador Microflow de PFA (ESI, Omaha, Estados Unidos), para SEC en escala preparativa se utilizó el nebulizador Miramist (Burgener, Ontario, Canadá) que permite la nebulización de flujo mayores a 1 mL $min^{-1}$. Las condiciones operacionales optimizadas para la detección por ICP-ORS-qMS se resumen en la tabla 13.

**Tabla 12.** Condiciones cromatográficas para SEC en función de la columna cromatográfica empleada y tiempo de retención de cada una de las metaloproteínas empleadas en la calibración.

| **ESCALA ANALÍTICA** | |
|---|---|
| **Columna** | Superdex™-Peptide (300 x 10mm x13µm) |
| **Rango de resolución** | < 10 kDa |
| **Fase móvil** | Acetato de amonio 20 mmol $L^{-1}$ (pH 7.4) |
| **Flujo** | 0.7 mL $min^{-1}$ |
| **Volumen de inyección** | 20 µL |
| **Tiempo de retención de los calibrantes** | BSA 10.5 min; MT1 14.5 min; $VitB_{12}$ 18.5 min; GSH 101.7 min y AsB 25.9 min |
| **Columna** | Superdex™-75 (300 x 10mm x13µm) |
| **Rango de resolución** | 3 – 100 kDa |
| **Fase móvil** | Acetato de amonio 20 mmol $L^{-1}$ (pH 7.4) |
| **Flujo** | 0.7 mL $min^{-1}$ |
| **Volumen de inyección** | 20 µL |
| **Tiempo de retención de los calibrantes** | Ferritina 11.5 min; BSA 13.7 min; SOD 16.3 min; mioglobina 18.9 min; MT1 21.0 min y AsB 26.1 min |
| **Columna** | Superdex™-200 (300 x 10mm x13µm) |
| **Rango de resolución** | 10 – 700 kDa |
| **Fase móvil** | Acetato de amonio 20 mmol $L^{-1}$ (pH 7.4) |
| **Flujo** | 0.6 mL $min^{-1}$ |
| **Volumen de inyección** | 20 µL |
| **Tiempo de retención de los calibrantes** | Azul de dextrano: 11.9 min; ferritina 14.2 min; BSA 19.3 min; SOD 22.4 min, mioglobina 25.5 min y $VitB_{12}$ 26.7 min |
| **ESCALA PREPARATIVA** | |
| **Columna** | Hiload 26/60 Superdex 30 Prep |
| **Rango de resolución** | < 10 kDa |
| **Fase móvil** | Acetato de amonio 20 mmol $L^{-1}$ (pH 7.4) |
| **Flujo** | 2.0 mL $min^{-1}$ |
| **Volumen de inyección** | 500 µL |
| **Tiempo de retención de los calibrantes** | BSA 45.0 min; MT1 64.8 min; $VitB_{12}$ 85.2 min; GSH 101.7 min y AsB 109.0 min |
| **Columna** | Hiload 26/60 Superdex 75 Prep |
| **Rango de resolución** | 3 – 10 kDa |
| **Fase móvil** | Acetato de amonio 20 mmol $L^{-1}$ (pH 7.4) |
| **Flujo** | 2.0 mL $min^{-1}$ |
| **Volumen de inyección** | 500 µL |
| **Tiempo de retención de los calibrantes** | Ferritina 45.0 min; BSA 53.1 min; SOD 70.2 min; mioglobina 85.1 min; MT1 90.3 min y $VitB_{12}$ 110.0 min |

**Tabla 13.** Condiciones operacionales optimizadas para ICP-MS Agilent 7500ce.

| ***Condiciones ICP-MS Agilent 7500ce*** | |
|---|---|
| Potencia | 1500 W |
| Flujo de gas de plasma | 15.0 L $min^{-1}$ |
| Flujo de gas auxiliar | 1.0 L $min^{-1}$ |
| Flujo de carrier gas | 0.9 L $min^{-1}$ |
| Profundidad de muestreo | 8 mm |
| Conos | Ni |
| Flujo de He | 3.9 mL $min^{-1}$ |
| Flujo de $H_2$ | 3.5 mL $min^{-1}$ |
| $Q_{oct}$ | -18 V |
| $Q_p$ | -16 V |
| Tiempo de integración | 0.3 segundos por isótopo |
| Isótopos monitorizados | Usando He como gas de colisión: $^{53}Cr$, $^{55}Mn$, $^{63}Cu$, $^{65}Cu$, $^{64}Zn$, $^{66}Zn$, $^{75}As$, $^{57}Fe$, $^{103}Rh$, $^{114}Cd$. |
| | Usando $H_2$ como gas de reacción: $^{56}Fe$, $^{80}Se$. |

Para las columnas de SEC a escala analítica se utilizó el cromatógrafo líquido Agilent HP 1100 series equipado con un módulo de detección UV. Sin embargo, para las columnas de SEC a escala preparativa se utilizó un cromatógrafo de baja presión AKTA-Prime system (con detección UV a 254 nm y detector de conductividad) (Amersham), equipado con un bucle de inyección de 500 µL, para aislar las fracciones de interés, ya que estas columnas preparativas presentan la misma fase estacionaria que las utilizadas a escala analítica. Estas fracciones fueron recolectadas y se eliminó el contenido salino de las mismas (desalting) utilizando columnas de 5 mL HiTrap Desalting (GE Healthcare), para finalmente ser liofilizadas, lo que permite su preconcentración para su posterior purificación mediante el empleo de una segunda dimensión cromatográfica. Para desalinizar las fracciones citosólicas aisladas por SEC se utilizó como fase móvil agua ultrapura a pH 8.0, ajustado con $NH_4OH$ diluido. El fundamento de estas columnas

*"desalting"* es también una separación en función de la masa molecular, lo que permite discriminar sales de proteínas o metaloproteínas, las cuales se detectan mediante su absorción de la radiación UV (254 nm) (proteínas) o por conductividad (sales inorgánicas) (Figura 61). En este sentido, las fracciones detectadas mediante UV (línea azul) son recogidas a la salida del detector del cromatógrafo líquido de baja presión, para desechar la fracción de elevada conductividad por la presencia de sales. En la operación de liofilización que sigue se reduce el volumen de estas fracciones ricas en proteínas hasta unos 3 mL.

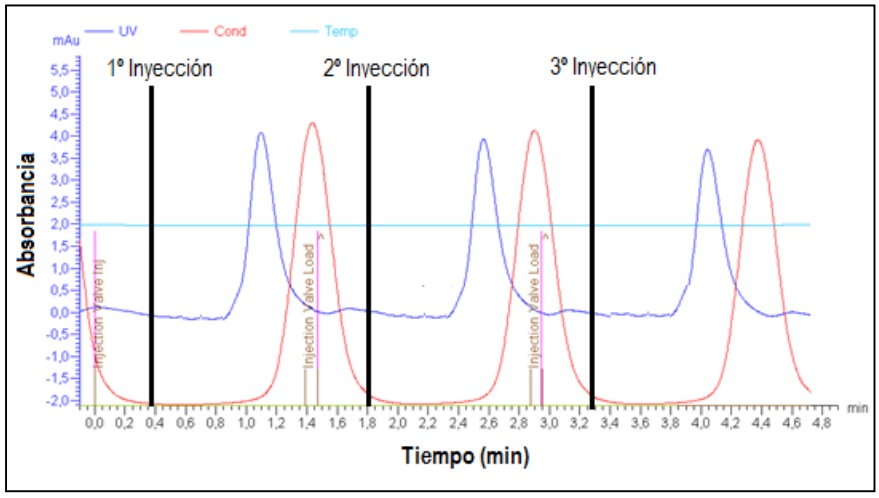



**Figura 61.** Cromatograma de UV (azul) y conductividad (rojo) obtenido durante el desalado de las facciones de SEC usando las columnas HiTrap Desalting (GE Healthcare).

En este sentido, cuando las fracciones fueron aisladas en columnas SEC a escala analítica (menor volumen de fracción), se eliminó las sales y se preconcentraron utilizando filtros de centrifuga con membranas de corte de 3.000 Da, AMICON Ultra-15 (Millipore), que permiten la desalinización casi completa de la fracción mediante varios ciclos de ultrafiltración por centrifugación a 5.000 g, 45 min y 4 ºC, quedando la fracción proteica concentrada en el filtro que

se diluye de nuevo hasta el volumen inicial con agua ultrapura, desechando la fase móvil salina que atraviesa el filtro de corte durante el proceso de centrifugación (Figura 62). Este procedimiento se llevó a cabo por triplicado, almacenando el extracto proteico concentrado a -80 ºC hasta el momento de su purificación por una segunda dimensión cromatográfica.

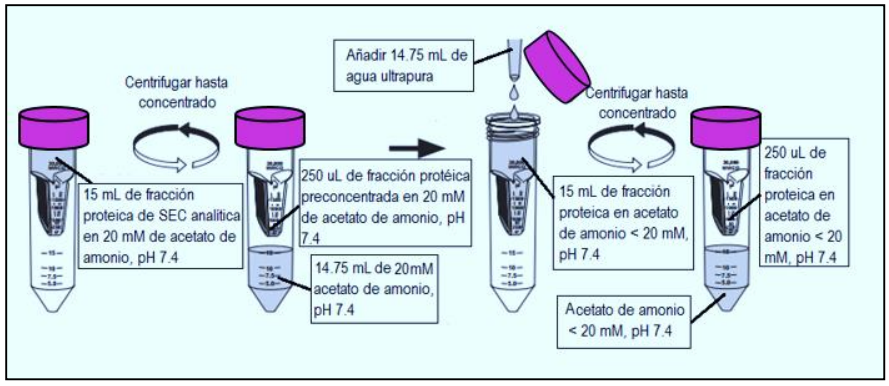



**Figura 62.** Procedimiento de desalado mediante ultrafiltración empleando filtros de centrífuga AMICON ULTRA.

### 3.6.2.5. Purificación de metaloproteínas mediante AEC-ICP-ORS-qMS (segunda dimensión)

Las fracciones de interés aisladas mediante SEC a escala preparativa y desalinizadas con ayuda de las columnas Hitrap Desalting o bien mediante ultrafiltración a escala analítica mediante filtros AMICON, fueron sometidas a una segunda dimensión cromatográfica mediante intercambio iónico (IEC), con mayor poder de resolución. La cromatografía de fase reversa (RP) también ha sido utilizada como segunda dimensión cromatográfica por numerosos autores, sin embargo, la cromatografía RP puede producir desnaturalización de metaloproteínas no resistentes a disolventes orgánicos que pueden dar lugar a su precipitación y problemas

adicionales cuando se acopla el ICP-MS a la columna cromatográfica. Además, el uso de altas concentraciones de disolventes orgánicos, necesario para llevar a cabo la elución cromatográfica, puede afectar negativamente a la estabilidad del plasma y el gradiente de elución puede inducir cambios la sensibilidad de ICP-MS, por lo que la cuantificación se hace más compleja en el caso de emplear dilución isotópica. Además, la IEC permite utilizar de forma combinada el punto isoeléctrico de las metaloproteínas y el pH de la fase móvil para favorecer su interacción electrostática con la fase estacionaria. Por todo esto, IEC suele ser más empleada como segunda dimensión cromatográfica en lugar de RP, siendo esta última de mayor utilidad en la purificación de metaloproteínas de baja masa molecular (más estables), como por ejemplo las metalotioneínas (MTs).

En la presente Tesis Doctoral, la purificación de los extractos aislados por SEC, desalinizados y preconcentrados se purificaron mediante romatografía de intercambio iónico, utilizando tanto la modalidad de intercambio aniónico como catiónico, en función del extracto a purificar. Las condiciones cromatográficas empleadas en cada una de las columnas de intercambio iónico utilizadas en el desarrollo experimental de esta Tesis Doctoral se resumen en la tabla 14.

En primer lugar, las fracciones proteicas desalinizadas y preconcentradas se filtraron con filtros Iso-Disc PVDF (diámetro 25mm, 0,2 µm tamaño poro) para evitar la sobrecarga y el atasco de la columna. La detección molecular y elemental de las biomoléculas presentes se llevó a cabo mediante detectores UV (254 nm) e ICP-MS, respectivamente. El acoplamiento en línea IEC-UV-ICP-MS se realizó conectando la salida del detector UV a la entrada del nebulizador del ICP-MS

mediante 30 cm de tubo PEEK (0.05 mm i.d., color rojo) de menor diámetro interno que en el acoplamiento SEC-ICP-ORS-qMS con el fin de alcanzar una mayor presión y por lo tanto mayor poder de resolución. Para este acoplamiento instrumental a escala analítica se empleó un nebulizador Microflow de PFA (ESI, Omaha, Estados Unidos), en contraste con la separación SEC en escala preparativa en la que se empleó el nebulizador Miramist (Burgener, Ontario, Canadá) que permite la nebulización de flujo mayores a 1 mL $min^{-1}$, como ya se comentó previamente. Las condiciones operacionales optimizadas para la detección por ICP-ORS-qMS se resumen en la tabla 15.

**Tabla 14.** Condiciones cromatográficas para IEC en función de la columna cromatográfica empleada.

| **ESCALA ANALÍTICA** | |
|---|---|
| **Columna** | Protein-Pak DEAE 5PW 7.5 x 75 mm, 10 µm |
| **Rango de resolución** | Intercambio aniónico |
| **Fase móvil** | 0-12 min 100% 2 mM acetato de amonio, 12-28 min 100% 200 mM acetato de amonio, 28-30 min 100% 200 mM acetato de amonio |
| **Flujo** | 1.5 mL $min^{-1}$ |
| **Volumen de inyección** | 50 µL |
| **Columna** | Hamilton PRP X-100 (250 x 4.6 mm x 5$\mu$m) |
| **Rango de resolución** | Intercambio aniónico |
| **Fase móvil** | Dihidrógeno fosfato de amonio 30 mM (pH 6) |
| **Flujo** | 1 mL $min^{-1}$ |
| **Volumen de inyección** | 20 µL |
| **Columna** | Supelcosil SCX (250 x 4.6 mm x 5 $\mu$m) |
| **Rango de resolución** | Intercambio catiónico |
| **Fase móvil** | Piridina 20 mM (pH 2.5) |
| **Flujo** | 1.2 mL $min^{-1}$ |
| **Volumen de inyección** | 20 µL |
| **ESCALA PREPARATIVA** | |
| **Columna** | Protein-Pak DEAE 5PW Semi-prep (21.5x150mm) |
| **Modalidad** | Intercambio aniónico |
| **Fase móvil** | Gradiente de 2mM (fase móvil A) a 200 mM (fase móvil B) de acetato de amonio pH 7.4 (0-10min, 90% A; 10-20 min, 75% A; 20-50 min, 50% A; 50-75 min, 100% A). |
| **Flujo** | 5.0 mL $min^{-1}$ |
| **Volumen de inyección** | 500 µL |

**Tabla 15.** Condiciones operacionales optimizadas para ICP-MS Agilent 7500ce.

| *Condiciones ICP-MS Agilent 7500ce* | |
|---|---|
| Potencia | 1500 W |
| Flujo de gas plasmógeno | 15.0 L $min^{-1}$ |
| Flujo de gas auxiliar | 1.0 L $min^{-1}$ |
| Flujo de gas portador | 0.9 L $min^{-1}$ |
| Profundidad de muestreo | 8 mm |
| Conos | Ni |
| Flujo de He | 3.9 mL $min^{-1}$ |
| Flujo de $H_2$ | 3.5 mL $min^{-1}$ |
| $Q_{oct}$ | -18 V |
| $Q_p$ | -16 V |
| Tiempo de integración | 0.3 segundos por isótopo |
| Isótopos monitorizados | Usando He como gas de colisión: $^{53}Cr$, $^{55}Mn$, $^{63}Cu$, $^{65}Cu$, $^{64}Zn$, $^{66}Zn$, $^{75}As$, $^{57}Fe$, $^{103}Rh$, $^{114}Cd$. |
| | Usando $H_2$ como gas de reacción: $^{56}Fe$, $^{80}Se$. |

### 3.6.2.6. Especiación de arsénico en extractos citosólicos o fluidos biológicos de ratón

En la presente Tesis Doctoral la especiación de arsénico en extractos citosólicos de tejido de ratón fue desarrollada empleando dos metodologías diferentes:

- **MÉTODO 1:**

Para llevar a cabo la especiación de arsénico en extractos citosólicos de diferentes órganos de ratón se utilizó un enfoque metalómico basado en el uso de sistemas cromatográficos ortogonales acoplados a ICP-ORS-qMS para caracterizar la respuesta biológica de los ratones de vida libre *Mus spretus* expuestos a contaminación ambiental causada por arsénico en diferentes áreas del Parque Nacional de Doñana (suroeste de España). La presencia relativa de

las formas orgánicas e inorgánicas de arsénico fue estudiada en extractos citosólicos de órganos con alta actividad metabólica: riñones, hígado y cerebro.

Para este propósito, una vez preparado los extractos citosólicos de los diferentes órganos estudiados, los extractos se filtraron a través de filtros de PVDF (difluoruro de vinilideno, de 25 mm de diámetro, 0,2 micras de tamaño de poro) para evitar la sobrecarga de la columna o la obstrucción de la misma, para su posterior ultrafiltración mediante filtros de centrífuga AMICON 30K (Millipore) por centrifugación a 10000 g a 4 ºC durante 30 min, ya que el rango de separación eficaz de la columna de SEC empleada es menor a 10 kDa, evitando de esta forma el solapamiento de picos por la intensidad de las metaloproteínas que aparecerían en el volumen muerto de esta columna cromatográfica. Las condiciones cromatográficas y desarrollo experimental para las columnas de SEC Superdex™-Peptide (escala analítica) y Hiload Superdex 30 Prep (escala preparativa) (Tabla 12).

Una vez recolectadas las fracciones que contenían los diferentes arsenicales, se eliminó su salinidad mediante el uso de columnas HiTrap Desalting y preconcentradas por liofilización, antes de ser analizadas por IEC-ICP-ORS-qMS, en modo aniónico y catiónico, siguiendo las condiciones cromatográficas descritas en la Tabla 16. Las condiciones operacionales optimizadas para la detección por ICP-ORS-qMS se resumen en la tabla 17. La calibración de ambas columnas se muestra en la Figura 63.

**Tabla 16.** Condiciones cromatográficas para IEC en función de la columna cromatográfica empleada.

| ESCALA ANALÍTICA | |
|---|---|
| **Columna** | Hamilton PRP X-100 (250 x 4.6 mm x 5$\mu$m) |
| **Rango de resolución** | Intercambio aniónico |
| **Fase móvil** | Dihidrógeno fosfato de amonio 30 mM (pH 6) |
| **Flujo** | 1 mL $min^{-1}$ |
| **Volumen de inyección** | 20 µL |
| **Columna** | Supelcosil SCX (250 x 4.6 mm x 5 $\mu$m) |
| **Rango de resolución** | Intercambio catiónico |
| **Fase móvil** | Piridina 20 mM (pH 2.5) |
| **Flujo** | 1.2 mL $min^{-1}$ |
| **Volumen de inyección** | 20 µL |

**Tabla 17.** Condiciones operacionales optimizadas para ICP-MS Agilent 7500ce.

| ***Condiciones ICP-MS Agilent 7500ce*** | |
|---|---|
| Potencia | 1500 W |
| Flujo de gas de plasma | 15.0 L $min^{-1}$ |
| Flujo de gas auxiliar | 1.0 L $min^{-1}$ |
| Flujo de carrier gas | 0.9 L $min^{-1}$ |
| Profundidad de muestreo | 8 mm |
| Conos | Ni |
| Flujo de He | 3.9 mL $min^{-1}$ |
| $Q_{oct}$ | -18 V |
| $Q_p$ | -16 V |
| Tiempo de integración | 0.3 segundos por isótopo |
| Isótopos monitorizados | $^{75}As$ |

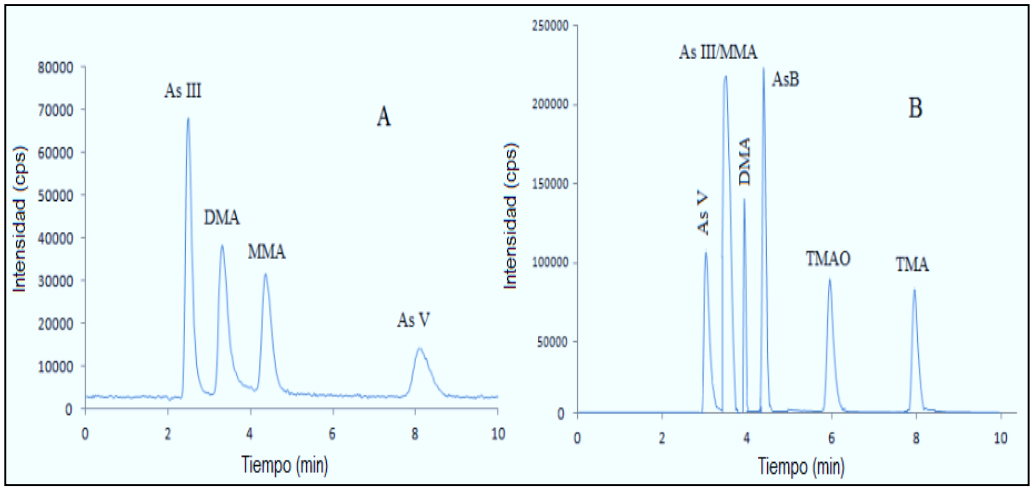



**Figura 63.** Calibración de las columnas empleadas para llevar a cabo la especiación de arsénico en extractos citosólicos de órganos de ratón. A) Cromatograma obtenido con la columna PRP-X100 (iAsIII, iAsV, $DMA^V$ y $MMA^V$); B) Cromatograma obtenido con la columna Supelcosil SCX ($iAs^{III}$, $iAs^V$, AsB, $DMA^V$, $MMA^V$, TMAO, y TMA).

- **MÉTODO 2:**

Más recientemente, se ha empleado otro método de especiación de arsénico en extractos citosólicos hepáticos de ratón a partir del extracto preparado que consiste en el uso del acoplamiento AEC-ICP-ORS-qMS, en el que se emplearon las condiciones cromatográficas y operacionales descritas en la Tabla 18, haciendo uso como detector del sistema ICP-ORS-qMS de Thermo Scientific XSeries2. La validación de la metodología para la especiación de arsénico en tejido hepático de ratón, utilizando sonda de ultrasonido, se llevó a cabo con un material certificado de hepatopáncreas de langosta, TORT-2, que certifica la concentración total de arsénico, aunque otros autores han publicado valores de especiación de arsénico para este material (Wahlen *y col*., 2004). Además, se llevaron a cabo estudios de recuperación en los tejidos de ratones por fortificación con 50 mg $L^{-1}$ de $DMA^V$, $MA^V$, $iAs^V$ y $iAs^{III}$ a 0,2 mg de una muestra

combinada (cinco muestras) de hígado. Las concentraciones, los límites de detección y la recuperación de especies de arsénico se muestran en la Tabla 19. La calibración de la columna mediante el uso de las condiciones cromatográficas que se recogen en la Tabla 18 se muestra en la Figura 64.

**Tabla 18.** Condiciones cromatográficas y operacionales optimizadas para llevas a cabo la especiación de arsénico mediante AEC-ICP-ORS-qMS.

| *Condiciones AEC* | |
|---|---|
| **Columna** | Hamilton PRP X-100 (250 x 4.6 mm x 5$\mu$m) |
| **Rango de resolución** | Intercambio aniónico |
| **Fase móvil** | 35 mM de hidrogenocarbonato de amonio (pH 9.5), 5% Metanol (v/v) |
| **Flujo** | 1.5 mL $min^{-1}$ |
| **Temperatura de columna** | 40 ºC |
| **Volumen de inyección** | 20 µL |
| ***Condiciones ICP-MS Thermo Scientific XSeries2*** | |
| **Potencia** | 1300 W |
| **Flujo de gas de plasma** | 13.0 L $min^{-1}$ |
| **Flujo de gas auxiliar** | 1.0 L $min^{-1}$ |
| **Flujo de carrier gas** | 1.0 L $min^{-1}$ |
| **Conos** | Interfase de Ni Xs |
| **Flujo de He** | 4.0 mL $min^{-1}$ |
| **$Q_{oct}$** | -19 V |
| **$Q_p$** | -17 V |
| **Focus** | -9 V |
| **Tiempo de integración** | 0.1 segundos por isótopo |
| **Isótopos monitorizados** | $^{75}As$, $^{77}ArCl^+$ |

**Tabla 19.** Concentración de metabolitos de arsénico en el CRM TORT-2, recuperaciones obtenidas para hígado de ratón y límites de detección de cada especie.

| | | AB (µg $g^{-1}$ As ) | $MA^V$ (µg $g^{-1}$ As ) | $DMA^V$ (µg $g^{-1}$ As ) | $iAs^{III}$ (µg $g^{-1}$ As ) | $iAs^V$ (µg $g^{-1}$ As ) | Suma Especies de As (µg $g^{-1}$ As ) | TOTAL As (µg $g^{-1}$ As ) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Media ± Desviación estándar (SD) | | | | | | |
| CRM | **TORT-2** | 13.57 ±1.54 | 0.087 ±0.04 | 0.91 ±0.16 | <LOD | <LOD | 14.56 | 19.4 ±1.3 |
| | **REFERENCE VALUE** | 14.25 ±1.08 | 0.093 ±0.07 | 0.84 ±0.12 | <LOD | <LOD | 15.18 | 21.6 ±1.8 |
| Recuperaciones (%) | | ----- | 91 % | 103 % | 87 % | --- | ---- | 99 % |
| LOD (ng $g^{-1}$) | | 0.67 | 0.91 | 0.88 | 0.99 | 1.17 | | 0.012 |

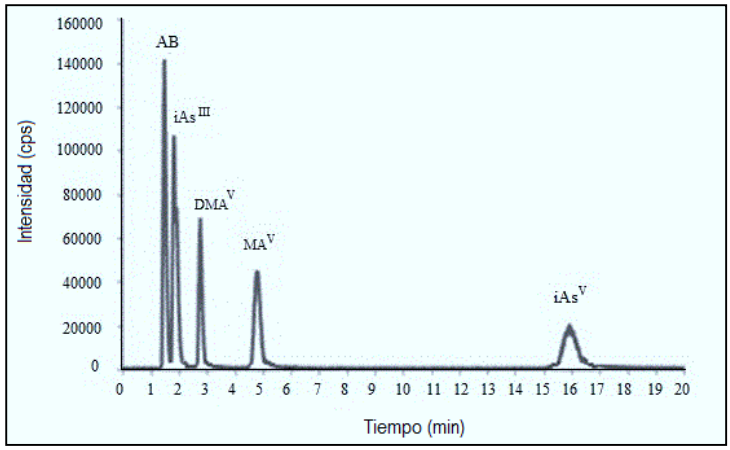



**Figura 64.** Calibración de la columna empleada para llevar a cabo la especiación de arsénico en extractos citosólicos de hígado de ratón. Cromatograma obtenido con la columna PRP-X100 (AsB, $iAs^{III}$, $iAs^V$, $DMA^V$ y $MA^V$).

### 3.6.2.7. Especiación de selenoproteínas y selenometabolitos mediante 2D/SEC-AF-SUID-ICP-ORS-qMS

Para llevar a cabo la especiación de selenoproteínas y selenometabolitos en suero o plasma de mamífero, la separación de los analitos se realizó por acoplamiento de dos columnas

de 5 mL HiTrap® Desalting (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) conectadas en serie a dos columnas de afinidad, una columna de heparina-Sepharose de 1 mL (HEP-HP) (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) y una columna de 1 mL de Blue-Sepharose (BLUE-HP) (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) interconectadas por una válvula de seis vías (Figura 65). La columna HiTrap® Desalting utiliza el principio de la cromatografía de exclusión de tamaño permitiendo eliminar los componentes de baja masa molecular (MW <1000Da) y moléculas de alta masa molecular, tales como ADN, proteínas o péptidos (MW> 5000 Da), la combinación de las dos columnas aumenta la resolución de la separación cromatográfica. Por otro lado, la columna HEP-HP es capaz de retener selectivamente SeP mientras que la columna de BLUE-HP ha sido descrita previamente para la retención de ambas proteínas, SeP y SeAlb. Debido a ello, se coloca la columna BLUE-HP tras la HEP-HP (Jitaru *y col*., 2010; Deagen *y col*., 1993).

El acoplamiento 2D/SEC-AF-HPLC-SUID-ICP-ORS-qMS se llevó a cabo mediante la conexión de la salida de la unidad cromatográfica con una pieza en forma de T y ésta con la entrada del nebulizador Micromist del ICP-MS por medio de un tubo de PEEK de 30 cm (0,6 mm de diámetro interno, color verde). El análisis por dilución isotópica (IDA) se realizó mediante la introducción directa de $^{74}Se$ a través del conector T en el ICP-ORS-qMS en concentración de aproximadamente 4 $ng \cdot g^{-1}$. La especiación de selenio en suero o plasma de ratón o humano por 2D/SE-AF-HPLC-SUID-ICP-ORS-MS se llevó a cabo utilizando las condiciones operacionales y cromatográficas que se resumen en la Tabla 19.

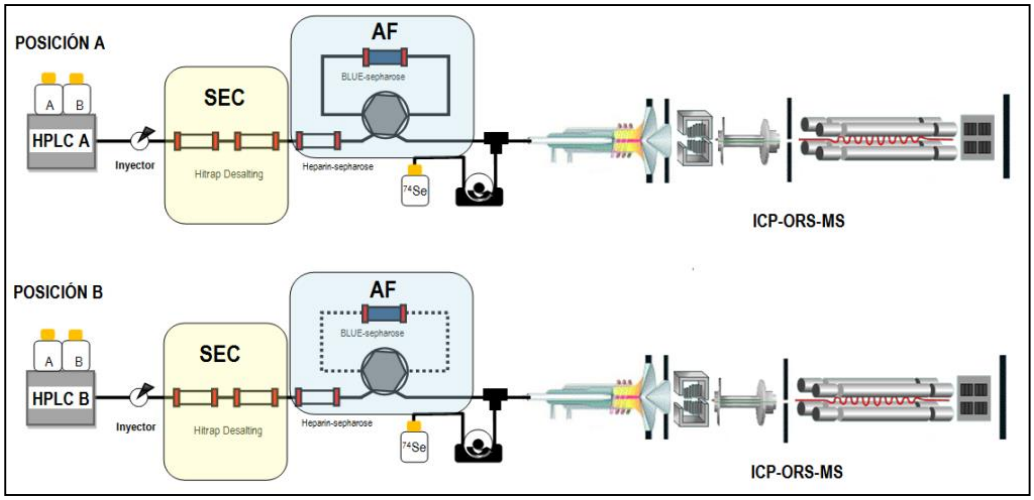



**Figura 65.** Diagrama esquemático 2D/SEC-AF-HPLC-SUID-ICP-ORS-qMS para la especiación de proteínas que contiene selenio y selenometabolitos en muestras de suero o plasma.

El acetato de amonio se utilizó como fase móvil con un gradiente de 0,05 mol $L^{-1}$ (pH 7,4) a 1,5 mol $L^{-1}$ (pH 7,4), a una velocidad de flujo de 1,3 mL $min^{-1}$, con un volumen de inyección de 100 µL. Las muestras de plasma y suero se inyectaron en el sistema utilizando una fase móvil A a través de éste (posición A, Figura 65). Entonces, las proteínas que contienen selenio (eGPx, SeAlb y SEP) se separan por SEC de las especies de selenio de baja masa molecular y de las interferencias originadas por la presencia de bromuro y cloruro en estas matrices. De este modo, la SeP queda retenida en la columna HEP-HP y la SeAlb en la BLUE-HP. Dado que la eGPx, los selenometabolitos y las interferencias ocasionadas por Br + Cl no son retenidas en columnas de afinidad, eluyen en tres picos bien definidos (Figura 66). A continuación, la fase móvil B se bombeó a través del sistema para la elución de la SeP (posición B, Figura 65). Finalmente, la válvula se conecta de nuevo a la posición inicial para la elución de SeAlb (posición A, Figura 65). Por último,

la fase móvil A se pasó de nuevo a través del sistema durante 10 minutos para conseguir el equilibrado del mismo antes de la siguiente inyección.

**Tabla 19.** Condiciones operacionales optimizadas para el análisis de especies de selenio en suero o plasma mediante 2D/SEC-AF-SUID-ICP-ORS-qMS.

| ***Condiciones HPLC*** | |
|---|---|
| Volumen de inyección | 100 µL |
| Flujo | 1.3 mL $min^{-1}$ |
| Fase móvil A | 0,05 M de acetate de amonio, pH 7,4 |
| Fase móvil B | 1,5 M de acetate de amonio, pH 7.4 |
| Gradiente | 0-7 min 100% A, 6-18 min 100% B, 18-20 min 100% A |
| Posición válvula 6-vías | 1-10 min Posición A; 10-17 min Posición B; 17-20 Posición A |
| ***Condiciones ICP-MS Agilent 7500ce*** | |
| Potencia | 1500 W |
| Flujo de gas de plasma | 15.0 L $min^{-1}$ |
| Flujo de gas auxiliar | 1.0 L $min^{-1}$ |
| Flujo de carrier gas | 0.95 L $min^{-1}$ |
| Profundidad de muestreo | 7 mm |
| Conos | Ni |
| Flujo de $H_2$ | 4.0 mL $min^{-1}$ |
| $Q_{oct}$ | -18 V |
| $Q_p$ | -16 V |
| Tiempo de integración | 0.3 segundo por isótopo |
| Puntos por pico | 1 |
| Réplicas | 1 |
| Tiempo muerto detector | 47 ns |
| Isótopos monitorizados | $^{74}Se$, $^{76}Se$, $^{77}Se$, $^{78}Se$, $^{80}Se$, $^{82}Se$, $^{79}Br$, $^{81}Br$ y $^{83}Kr$ |

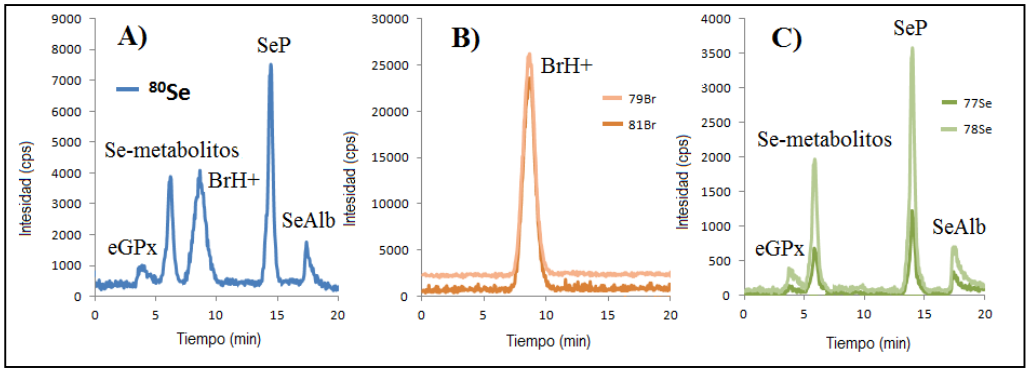



**Figura 66.** (A) Cromatograma típico de $^{80}Se$ obtenido de suero humano usando 2D/SE-AF-HPLC-SUID-ICP-ORS-qMS mostrando la interferencia de $^{79}Br^{1}H^{+}$ (m/z 80) a 9 minutos. (B) Monitorización de los isótopos $^{79}Br$ y $^{81}Br$. (C) Monitorización de $^{77}Se$ y $^{78}Se$, mostrando la ausencia de la interferencia $Br^{+}$.

Durante la separación cromatográfica, los isótopos $^{74}Se$, $^{77}Se$, $^{78}Se$, $^{80}Se$, $^{82}Se$, $^{79}Br$ y $^{83}Kr$ ($^{82}Se^{1}H^{+}$) se monitorizaron simultáneamente por ICP-ORS-qMS para asegurar la ausencia de interferencias isobáricas de Br. El uso de dos pequeñas columnas cromatográficas SEC dispuestas en serie (HiTrap Desalting) permite una buena resolución en la separación de eGPx y los selenometabolitos, con tiempos de retención alrededor de 4 y 6 min, respectivamente, mientras que la interferencia espectral causada por Br presente en plasma aparece en un pico a 9 min (Figura 66A). Esta hipótesis se confirma en la Figura 66A y 66B, mediante la monitorización de $^{80}Se$ ($^{79}Br^{1}H^{+}$), $^{79}Br$ y $^{81}Br$, apareciendo un pico a 9 min, que puede estar relacionado con Br, que desaparece cuando se monitorizan los-isótopos $^{77}Se$ y $^{78}Se$ (Figura 66C). Por otro lado, la interferencia causada por Cl en la señal de $^{77}Se$, debido a la especie poliatómica $^{37}Cl^{40}Ar^{+}$, se elimina mediante el uso de hidrógeno en la celda de reacción. Este hecho se confirmó con la abundancia isotópica natural de $^{80}Se$ y $^{77}Se$ (49,6% y 7,63%, respectivamente), la cual estaba de

acuerdo con la intensidad de los picos en el cromatograma correspondiente, y no se observa ningún pico de $^{77}Se$ y $^{78}Se$ a 9 min (Figura 66C).

La cuantificación de las proteínas que contienen selenio y selenometabolitos en los diferentes picos cromatográficos se llevó a cabo mediante análisis de dilución isotópica de especies inespecíficas post-columna (SUID) como fue descrita por Sariego-Muñíz y colaboradores (Sariego-Muñíz *y col.,* 2001). Después de la conversión de la intensidad de los diferentes isótopos monitorizados de selenio e interferencias poliatómicas a cromatograma de flujo de masa para la cuantificación de las especies de selenio en muestras de plasma y suero, usando ecuaciones de corrección de interferencias, el pico alrededor de 9 minutos ($BrH^+$) no está presente cuando $^{78}Se$ se utiliza para la cuantificación de las especies de selenio (Figura 67B). Sin embargo, este pico no se elimina completamente cuando el $^{80}Se$ se utiliza para este propósito (Figura 67A). De tal forma que si el isótopo $^{80}Se$ se utiliza para llevar a cabo la cuantificación por IDA, la interferencia de bromo no se elimina por las ecuaciones de interferencia, y la cuantificación de las especies de selenio será imprecisa. El presente método permite el uso de ambos isótopos, aunque la relación $^{78}Se/^{74}Se$ se utiliza en experimentos adicionales.

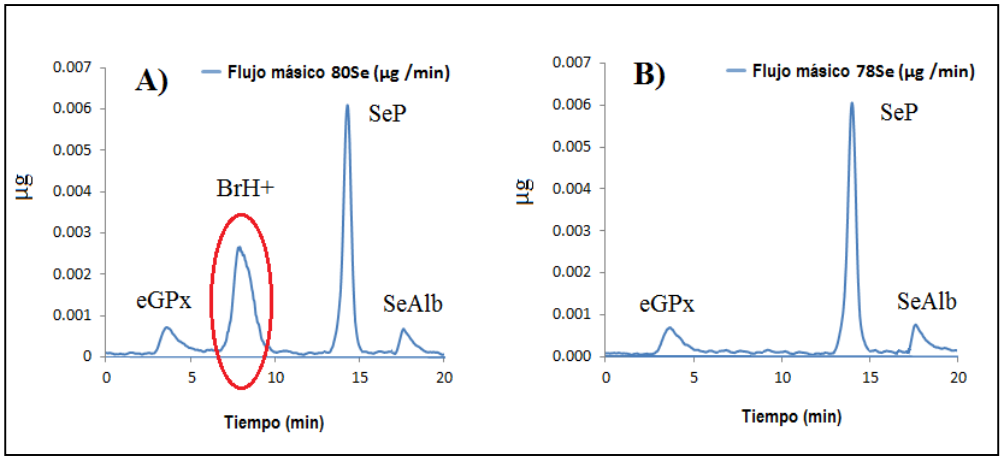



**Figura 67.** (A) Flujo másico obtenido mediante el uso de la relación isotópica $^{80}Se/^{74}Se$; B) Flujo másico obtenido mediante el uso de la relación isotópica $^{78}Se/^{74}Se$.

Con el fin de verificar la ausencia de otras especies de selenio, la fracción eGPx separada por 2D/SEC-AF-HPLC-SUID-ICP-MS-ORS fue analizada por AEC-HPLC-ICP-MS-ORS utilizando las mismas condiciones operativas descritas en el apartado 3.6.2.5. Por otro lado, el método de especiación propuesto ha sido validado utilizando un CRM de suero humano (BCR-637) certificado para el contenido total de Se ($Se_{Total}$ = 81 ± 7 ng $mL^{-1}$). Este material fue fortificado con 50 ng $g^{-1}$ de selenio inorgánico (selenato de sodio) para evaluar la recuperación y la precisión del método. La concentración de diferentes especies de selenio en el BCR-637 obtenidas con este método ha sido comparada con los resultados previos para este mismo material de referencia publicados por Jitaru *y col.* utilizando AE-SPE antes de AF-HPLC-ICP-MS (Jitaru *y col*., 2010).

Los resultados recogidos en la Tabla 4 muestran una buena concordancia entre las concentraciones de las especies de selenio (eGPx, SEP y SeAlb) certificadas en el material de referencia y las obtenidas por Jitaru y colaboradores (Jitaru *y col.*, 2010). Sin embargo, los selenoaminoácidos (selenometionina (SEMET) y selenocisteina (SeCys)) no se conservan por

AEC y eluyen en el volumen muerto después la eGPx. Este inconveniente se supera con el uso de una unidad doble de SEC anterior a la agrupación de columnas de AFs debido a la ausencia de interacciones de las especies de selenio con la fase estacionaria de la SEC.

Los resultados recogidos en la Tabla 20 muestran una buena concordancia entre las concentraciones de las especies de selenio (como suma de eGPx, SeP y SeAlb) en la hoja de certificación del CRM y los publicados por la aplicación del método propuesto por Jitaru y colaboradores (Jitaru *y col*., 2010), en comparación con el método 2D/SEC-AF-HPLC-SUID-ICP-ORS-qMS que se propone en el presente trabajo. Sin embargo, los selenoaminoácidos (selenometionina (SeMet) y selenocisteína (SeCys)) no son retenidos por AE-SPE y eluye en el volumen muerto junto con la eGPx.

Además, se presentan aquí por primera vez los niveles indicativos de proteínas que contienen selenio y selenio inorgánico en un material de referencia de suero y plasma humano, con el nivel de certificación para selenio total. Los resultados se muestran en la Tabla 20.

**Tabla 20.** Cuantificación de las especies de selenio en CRMs de suero y plasma humano.

| Especies de selenio | Suero humano BCR-637[a] (AE-SPE/AF) (ng $g^{-1}$± SD) | Suero humano BCR-637 (SEC-AF) (ng $g^{-1}$± SD) | Suero humano fortificado BCR-637 50 ng $g^{-1}$ de Se (SEC-AF) (ng $g^{-1}$± SD) | Suero humano ClinChek, Level II (SEC-AF-AEC) (ng $g^{-1}$± SD) | Plasma humano ClinChek, Level I (SEC-AF-AEC) (ng $g^{-1}$± SD) |
|---|---|---|---|---|---|
| **eGPx** | 15 ± 4 | 11 ± 1 | 11 ± 1 | 16 ± 1 | 14 ± 2 |
| **SeP** | 60 ± 7 | 52 ± 2 | 53 ± 1 | 57 ± 1 | 69 ± 1 |
| **SeAlb** | 13 ± 4 | 17 ± 2 | 18 ± 2 | 11 ± 2 | 9 ± 2 |
| **Se metabolitos** | ----- | <LOD | 51 ± 2 | ----- | ----- |
| **Suma especies** | 79 ± 3 | 80 ± 2 | 133 ± 2 | 84 ± 1 | 92 ± 2 |
| **TOTAL Se[b]** | ----- | 82 ± 1 | 131 ± 1 | 83 ± 2 | 94 ± 3 |
| **Valor certificado (ng.$mL^{-1}$)** | 81 ± 7 | 81 ± 7 | ----- | 81 ± 16 | 97 ± 29 |

[a] Valores publicados por Jitaru *y col.*, 2010 para BCR-637 usando diferentes métodos.
[b] Cuantificación de selenio total por IDA-ICP-ORS-MS.

### 3.6.2.8. Especiación de selenoproteínas y selenometabolitos mediante 3D/SEC-AF-AEC-SUID-ICP-ORS-qMS

Por otro lado, el fraccionamiento de las proteínas que contienen selenio y las especies inorgánicas de selenio se llevó a cabo mediante el empleo de un sistema cromatográfico en serie basado en el uso de tres dispositivos cromatográficos (3D/SEC-AF-AEC), utilizando la disposición esquemática que se muestra en la Figura 68. Empleando este sistema analítico, la separación de los analitos de interés se realizó en un primer paso con la disposición cromatográfica de dos dimensiones (2D/SEC-AF-SUID-ICP-ORS-qMS, Figura 65), seguido de una válvula de 8-vías para compensar el gradiente de presión entre las bombas de alta y baja presión utilizadas en este método (Figura 68). A diferencia del método bidimensional, cuando la fracción que contiene

especies de selenio bajo peso molecular llena el loop de 3 mL, se cambia la posición de la válvula

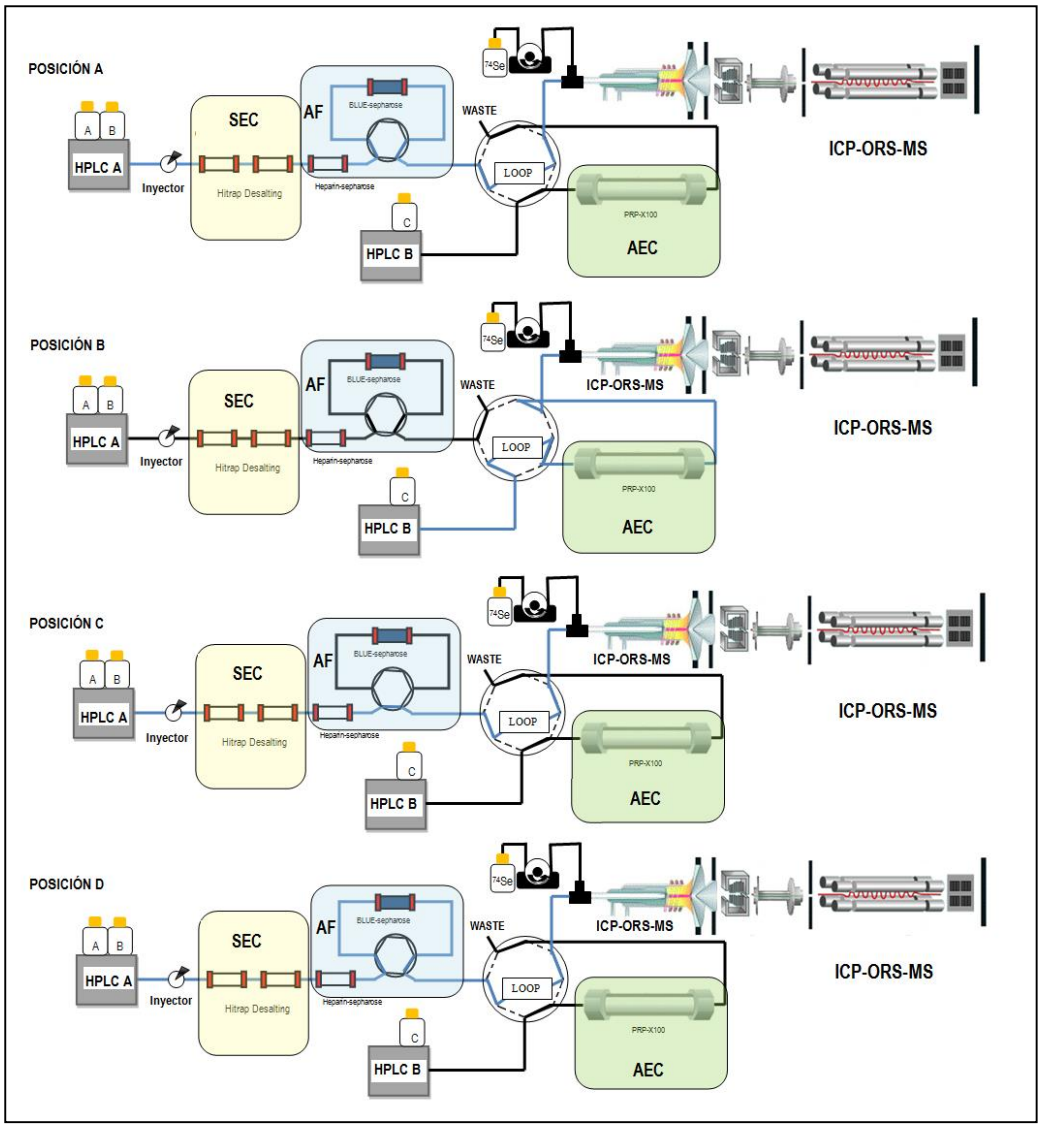



**Figura 68.** Diagrama esquemático 3D/SEC-AF-AEC-HPLC-SUID-ICP-ORS-qMS para la especiación de proteínas que contiene selenio y selenometabolitos inorgánicos en muestras de suero o plasma.

de 8-puertos y estas especies de selenio son impulsadas por la bomba B (de mayor presión) a través de la columna de intercambio aniónico hasta el ICP-ORS-qMS. La especiación de selenio en suero humano por 3D/SEC-AF-AEC-SUID-ICP-ORS-qMS se llevó a cabo utilizando las condiciones operacionales y cromatográficas que se resumen en las Tabla 21. Para la especiación de los selenometabolitos inorgánicos de interés, selenito y selenato, se empleó una columna Hamilton PRP-X100 y eluyeron en este orden, lo que refleja la fuerte interacción electrostática de estas especies con la fase estacionaria. Para optimizar la separación, se comprobó el efecto del pH de la fase móvil en el rango de 5-10 (probando intervalos de 0,5), flujos entre 1,3 a 1,7 mL $min^{-1}$ y concentración de fosfato en el rango de 40-120 mM. Las condiciones óptimas para a separación fueron pH 8, 100 mM de fosfato y 1,3 mL/min de flujo.

Con el objetivo de especiar la fracción de selenio de baja masa molecular contenida en la fracción entre 5,5 a 7,5 minutos (Figura 66), se añadió una nueva dimensión a la metodología bidimensional anteriormente descrita, basada en la separación de las especies de selenio inorgánicos mediante el uso de cromatografía de intercambio aniónico (AEC) y una válvula de 8-vías, como se ha descrito anteriormente (Figura 68). Para una separación efectiva de las especies de selenio incluyendo eGPx, SeP, SeAlb, selenito y selenato en suero humano, las muestras fueron fortificadas con 25 ng $g^{-1}$ de selenito y selenato, obteniendo unas recuperaciones de 89 y 92 %, respectivamente. Además, usando este acoplamiento tridimensional la interferencia de bromuro se desecha una vez que el bucle de 3 mL colocado en la válvula 8-vías se carga con la fracción de especies de selenio de baja masa molecular.

**Tabla 21.** Condiciones operacionales optimizadas para el análisis de especies de selenio en suero o plasma mediante 3D/SEC-AF-SUID-ICP-ORS-qMS.

| ***Condiciones HPLC*** | |
|---|---|
| Volumen de inyección | 100 µL |
| Flujo Bomba A | 1.3 mL $min^{-1}$ |
| Flujo Bomba B | 1.3 mL $min^{-1}$ |
| Fase móvil A | 0,05 M de acetate de amonio, pH 7,4 |
| Fase móvil B | 1,5 M de acetate de amonio, pH 7.4 |
| Fase móvil C | 0,1 M de fosfato de sodio, pH 8.0 |
| Gradiente HPLC A | 0-15 min 100% A, 15-30 min 100% B, 30-35 min 100% A |
| Isocrático HPLC B | 0-35 min 100% de C |
| Posición válvula 6-vías | 1-10 min Posición A; 10-26 min Posición B; 26-35 Posición A |
| Posición válvula de 8-vías | 0-6.5 min Posición C; 6.5-17 min Posición D; 17-35 min Posición C |
| ***Condiciones ICP-MS Agilent 7500ce*** | |
| Potencia | 1500 W |
| Flujo de gas de plasma | 15.0 L $min^{-1}$ |
| Flujo de gas auxiliar | 1.0 L $min^{-1}$ |
| Flujo de carrier gas | 0.95 L $min^{-1}$ |
| Profundidad de muestreo | 7 mm |
| Conos | Ni |
| Flujo de $H_2$ | 4.0 mL $min^{-1}$ |
| $Q_{oct}$ | -18 V |
| $Q_p$ | -16 V |
| Tiempo de integración | 0.3 segundo por isótopo |
| Puntos por pico | 1 |
| Réplicas | 1 |
| Tiempo muerto detector | 47 ns |
| Isótopos monitorizados | $^{74}Se$, $^{76}Se$, $^{77}Se$, $^{78}Se$, $^{80}Se$, $^{82}Se$, $^{79}Br$, $^{81}Br$ y $^{83}Kr$ |
| Tiempo muerto del detector | 47 ns |

En la Figura 69A se muestra un cromatograma de flujo másico típico de suero humano fortificado con selenito y selenato usando 3D/SEC-AF-AEC-HPLC-SUID-ICP-ORS-qMS. Además, en la Fig. 69B, se muestra un cromatograma típico de suero humano que contiene una pequeña cantidad de selenito.

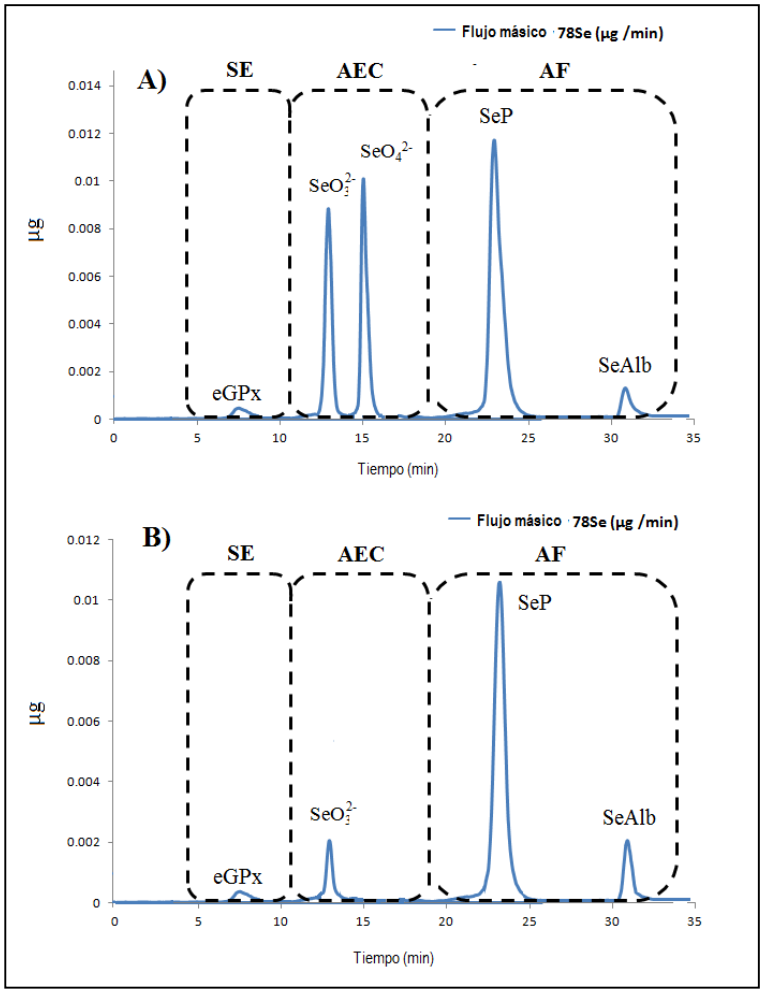



**Figura 69.** (A) Cromatograma de flujo másico típico de Se obtenido de suero humano fortificados con selenito y selenato usando 3D/SEC-AF-AEC-HPLC-SUID-ICP-ORS-qMS. (B) Cromatograma de flujo másico típico de Se obtenido de suero humano fortificado con pequeñas cantidades de selenito usando 3D/SEC-AF-AEC-HPLC-SUID-ICP-ORS-qMS

La cuantificación de las proteínas que contienen selenio y las especies inorgánicas de selenio en los diferentes picos cromatográficos se llevó a cabo mediante análisis de dilución isotópica post-columna especies-inespecífica (SUID) como en el caso del acoplamiento bidimensional. Brevemente, la intensidad de los diferentes isótopos de selenio y las interferencias poliatómicas se convirtieron en cromatograma de flujo másico para la cuantificación de las especies de selenio en muestras de plasma y suero. La corrección de tiempo muerto se llevó a cabo usando el procedimiento descrito por Vanhaecke *y col.* (Vanhaecke *y col.,* 1998), siendo 47 ns en este estudio. Los tratamientos matemáticos basados en el empleo de ecuaciones de corrección de interferencias se aplicaron para corregir las interferencias poliatómicas causadas por $BrH^+$ y $SeH^+$. Además, se aplicaron correcciones de *massbias* mediante el cociente de intensidades de los isótopos $^{78}Se/^{74}Se$ y $^{80}Se/^{74}Se$ calculada (modo exponencial) como fue descrita anteriormente por Ruiz-Encinar y colaboradores (Ruiz-Encinar *y col*., 2001). Finalmente, la ecuación de IDA en línea se aplicó a cada punto del cromatograma, obteniendo de esta forma el cromatograma de flujo másico, viniendo determinada la cantidad de selenio en cada pico cromatográfico por el área del pico. Para este propósito fue empleado el paquete estadístico Origin 8.5.1. software (Microcal Software Inc., Northampton, MA, Estados Unidos).

La Tabla 22 muestra la desviación estándar relativa (RSD, %) calculada para inyecciones sucesivas de 2 repeticiones de cada muestras de suero humano y los límites de detección (LD, ng $g^{-1}$) calculados para 5 inyecciones sucesivas del blanco analítico de reactivos (3 x estándar desviación del blanco).

**Tabla 22.** Cuantificación de las especies de selenio en suero humano de voluntarios.

| Especies de selenio | Media (ng g-1 como Se) | Desviación estándar relativa (RSD, %) | Límite de detección (LOD, ng $g^{-1}$ de Se) |
|---|---|---|---|
| eGPx | 9 | 21 | 0,2 |
| SeP | 51 | 12 | 0,7 |
| SeAlb | 14 | 9 | 0,9 |
| $SeO_3^{2-}$ | 3 | 2 | 1,1 |
| $SeO_4^{2-}$ | <LOD | ----- | 1,3 |
| Suma de especies de Se | 87 | 17 | ----- |
| Se TOTAL[a] | 89 | 5 | 0,09 |

[a] Cuantificación de selenio total por IDA-ICP-ORS-MS.

### 3.6.2.9. Especiación de selenoproteínas y selenometabolitos endógenos y exógenos mediante 2D/SEC-AF-IPD-ICP-ORS-qMS

Para llevar a cabo la cuantificación de selenoproteínas y selenometabolitos endógenos y exógenos en plasma de ratón, se empleó la disposición cromatográfica bidimensional que fue descrita anteriormente. La validación de esta metodología se llevó a cabo mediante el empleo del CRM de suero humano BCR-637. Este CRM fue fortificado con 50 ng $g^{-1}$ de $^{77}$selenito. Tras la separación cromatográfica, la cuantificación de los picos cromatográficos de selenio fue llevada por IDA usando una disolución post-columna de $^{74}$Se enriquecido para la cuantificación de las diferentes especies de selenio endógenas y exógenas en plasma de ratón expuesto a $^{77}$Se y el CRM de suero humano. Finalmente, la técnica de IPD fue aplicada a cada punto del cromatograma para la obtención de los cromatogramas de flujo másico para las especies de

selenio endógenas y exógenas, como fue descrito por González-Iglesias *y col.* (González-Iglesias *y col.*, 2009). Las condiciones cromatográficas y operacionales optimizadas se muestran en la Tabla 23. Además, en la Tabla 24 se muestran los resultados obtenidos para la validación de este procedimiento experimental.

**Tabla 24.** Cuantificación de las especies de selenio en CRMs de suero humano mediante 2D/SEC-AF-IPD-ICP-ORS-qMS.

| Especies de selenio | Suero humano BCR-637[a] (AE-SPE/AF) (ng $g^{-1}$± SD) Se ENDÓGENO | Suero humano BCR-637 (SEC-AF) (ng $g^{-1}$± SD) Se ENDÓGENO | Suero humano fortificado BCR-637 50 ng $g^{-1}$ de $^{77}$Se (SEC-AF) (ng $g^{-1}$± SD) Se-EXÓGENO |
|---|---|---|---|
| **eGPx** | 15 ± 4 | 12 ± 2 | <LOD |
| **SeP** | 60 ± 7 | 53 ± 2 | <LOD |
| **SeAlb** | 13 ± 4 | 14 ± 3 | <LOD |
| **$^{77}$Selenito** | ----- | <LOD | 51 ± 3 |
| **Suma especies** | 79 ± 3 | 79 ± 2 | 51 ± 3 |
| **TOTAL Se[b]** | ----- | 82 ± 1 | 52 ± 1 |
| **Valor certificado (ng.$mL^{-1}$)** | 81 ± 7 | 81 ± 7 | ----- |

[a] Valores publicados por Jitaru *y col*., 2010 para BCR-637 usando diferentes métodos.
[b] Cuantificación de selenio total por IDA-ICP-ORS-MS.

**Tabla 23.** Condiciones operacionales optimizadas para el análisis de especies de selenio en suero o plasma mediante 2D/SEC-AF-IPD-ICP-ORS-qMS.

| ***Condiciones HPLC*** | |
|---|---|
| Volumen de inyección | 100 µL |
| Flujo | 1.3 mL $min^{-1}$ |
| Fase móvil A | 0,05 M de acetate de amonio, pH 7,4 |
| Fase móvil B | 1,5 M de acetate de amonio, pH 7.4 |
| Gradiente | 0-7 min 100% A, 6-18 min 100% B, 18-20 min 100% A |
| Posición válvula 6-vías | 1-10 min Posición A; 10-17 min Posición B; 17-20 Posición A |
| ***Condiciones ICP-MS Agilent 7500ce*** | |
| Potencia | 1500 W |
| Flujo de gas de plasma | 15.0 L $min^{-1}$ |
| Flujo de gas auxiliar | 1.0 L $min^{-1}$ |
| Flujo de carrier gas | 1.0 L $min^{-1}$ |
| Profundidad de muestreo | 7 mm |
| Conos | Ni |
| Flujo de $H_2$ | 4.0 mL $min^{-1}$ |
| $Q_{oct}$ | -18 V |
| $Q_p$ | -16 V |
| Tiempo de integración | 0.3 segundo por isótopo |
| Puntos por pico | 1 |
| Réplicas | 1 |
| Tiempo muerto detector | 47 ns |
| Isótopos monitorizados | $^{74}Se$, $^{76}Se$, $^{77}Se$, $^{78}Se$, $^{80}Se$, $^{82}Se$, $^{79}Br$, $^{81}Br$ y $^{83}Kr$ |

### 3.6.2.10. Cuantificación absoluta de la enzima Cu,Zn-SOD mediante 2D/SEC-AEC-SUID-ICP-ORS-qMS

Los extractos citosólicos y mitocondriales de células hepáticas, se filtraron a través de filtros de jeringa de difluoruro de vinilideno (PVDF) (25 mm de diámetro, 0,2 micras de tamaño de poro) para evitar la sobrecarga de las columnas o la obstrucción de las mismas. La separación de los analitos se realizó con una columna de exclusión por tamaño analítica vidrio Superdex™-75

(10 x 300 mm; 13 micras) (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) con un límite de exclusión de 100 kDa (intervalo de separación efectiva de 3 a 70 kDa). Como fase móvil se utilizó acetato de amonio 20 mM (pH 7,4), con un flujo de 1,0 ml $min^{-1}$ y un volumen de inyección de 100 μL.

Tras la separación de las fracciones que contienen Cu mediante SEC, la fracción comprendida entre 9,5-12,5 min fue recogida en un *loop* de 3 mL conectado a una válvula de 8-vías (Figura 70, Posición A). En este momento, se cambia la posición de la válvula de 8-vías para inyectar el contenido del *loop* a la columna de AEC (Figura 70, Posición B). El uso de una conmutación de columnas o "*column switching*" con una válvula de 8-vías es necesario para compensar la diferencia de presión de las dos cromatógrafos líquidos. Cuando la posición de la válvula 8-vías se cambia desde la posición A a la B, la fracción que contiene el pico de 32 kDa trazado por Cu (al tiempo de retención 9,5 a 12,5 min, ver Figura 71A) que ha sido retenida en el *loop* de 3 mL es impulsado por el HPLC B a través de la columna de AEC con detección por ICP-ORS-qMS. De esta manera, esta fracción de 32 kDa se purifica en línea y se resuelve en esta segunda dimensión cromatográfica. Los efectos del pH de la fase móvil se probaron en el rango de 7-9 (a intervalos de 0,5), los flujos entre 1,0-2,0 mL $min^{-1}$ y, con el fin de obtener mejor eficiencia de resolución, se probaron también diferentes gradientes de elucción. La separación de Cu,Zn-SOD por 2D/SEC-UV-AEC-SUID-ICP-ORS-qMS en la fracción citosólica y mitocondrial se llevó a cabo usando las condiciones operacionales y cromatográficas que se resumen en la Tabla 25.

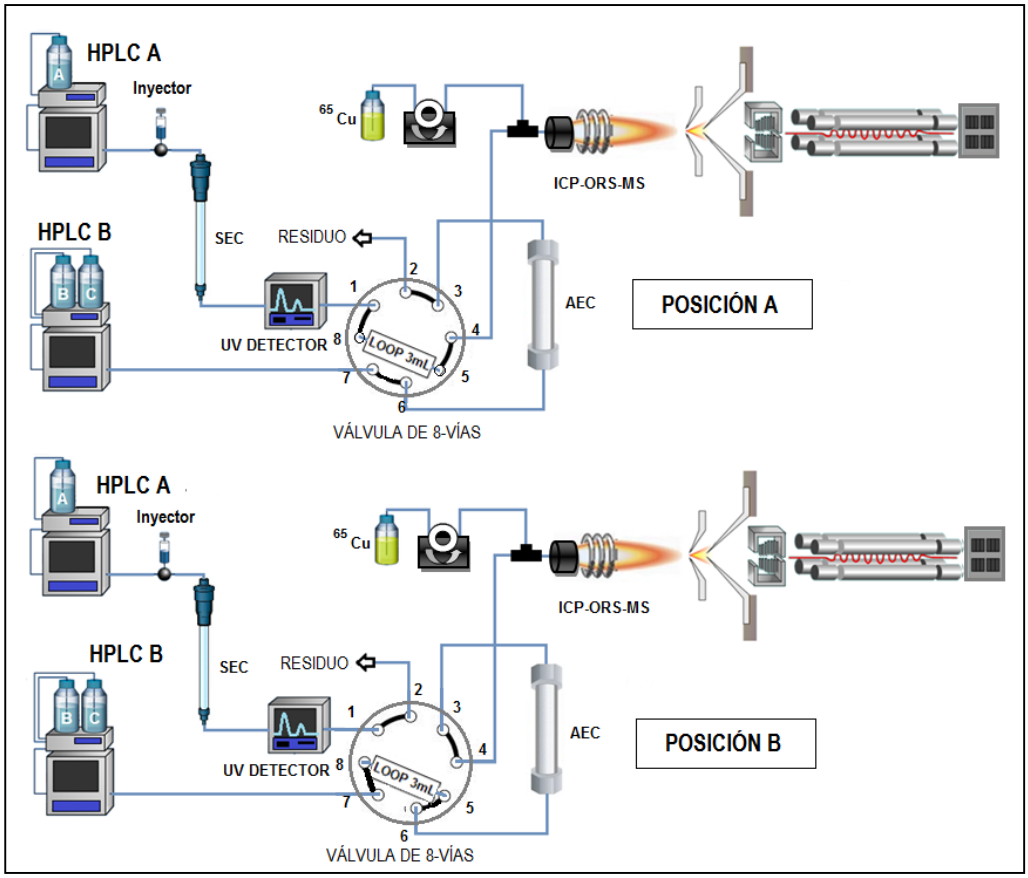



**Figura 70.** Diagrama esquemático de 2D/SEC-UV-AEC-SUID-ICP-MS-ORS para llevar a cabo la especiación de Cu, Zn-SOD en extractos citosólicos y mitocondriales de células hepáticas de ratón.

El balance de masas para Cu se evaluó mediante la medida de la concentración de un estándar de Cu,Zn-SOD utilizando los acoplamientos 1D/SEC-UV-SUID-ICP-ORS-qMS y 2D/SEC-UV-AEC-SUID-ICP-ORS-qMS, proporcionando resultados cuantitativos en el intervalo de 98 ± 6% (n = 5).

El cobre fue seleccionado para llevar a cabo la cuantificación de esta enzima, llevando a cabo experimentos de recuperación debido a la labilidad Zn en la molécula como han publicado

previamente otros autores (Suzuki *y col.*, 1993; Koruda *y col.*, 1995; Wang y col., 2007). En este estudio se han monitorizado varios isótopos de ambos elementos, en el caso del Zn como información cualitativa, ya que la enzima Cu,Zn-SOD contiene ambos elementos.

La cuantificación de las proteínas que contiene cobre en los diferentes picos cromatográficos se llevó a cabo por análisis por dilución isotópica post-columna (SUID) como fue descrito por Nuevo-Ordóñez y colaboradores (Nuevo Ordóñez *y col*., 2010). Brevemente, la intensidad de los diferentes isótopos de Cu e interferencias poliatómicas se convirtieron en cromatograma de flujo másico para la cuantificación de especies de cobre en extractos citosólicos y mitocondriales de células hepáticas de ratón mediante el uso de hojas de cálculos. Para este propósito, la ecuación básica de la dilución isotópica en línea se aplicó a cada punto del cromatograma y la cantidad de cobre en cada pico se calculó utilizando el software de Origen 8.5.1 (Microcal Software Inc., Northampton, MA, Estados Unidos).

**Tabla 25.** Condiciones operacionales y cromatográficas para el acoplamiento 2D/SEC-UV-AEC-SUID-ICP-ORS-qMS.

| ***Condiciones HPLC A*** | |
|---|---|
| **Columna** | Superdex™-75 (300 x 10mm x13µm) |
| **Rango de resolución** | 3 – 100 kDa |
| **Fase móvil A** | Acetato de amonio 2 mmol $L^{-1}$ (pH 7.4) |
| **Flujo** | 1.0 mL $min^{-1}$ |
| **Volumen de inyección** | 100 µL |
| **Longitud de onda UV** | 254 nm |
| ***Condiciones HPLC B*** | |
| **Columna** | Protein-Pak DEAE 5PW 7.5 x 75 mm, 10 µm |
| **Modalidad** | Intercambio aniónico |
| **Fase móvil B** | Acetato de amonio 2 mmol $L^{-1}$ (pH 7.4) |
| **Fase móvil C** | Acetato de amonio 200 mmol $L^{-1}$ (pH 7.4) |
| **Gradiente** | 0-12 min 100% 2 mM acetato de amonio, 12-28 min 100% 200 mM acetato de amonio, 28-30 min 100% 200 mM acetato de amonio |
| **Flujo** | 1.5 mL $min^{-1}$ |
| **Loop** | 3.0 mL |
| **Posición válvula 8-vías** | 1-9.5 min Posición A; 9.5-30 min Posición B |
| ***Condiciones ICP-MS Agilent 7500ce*** | |
| Potencia | 1500 W |
| Flujo de gas de plasma | 15.0 L $min^{-1}$ |
| Flujo de gas auxiliar | 1.0 L $min^{-1}$ |
| Flujo de carrier gas | 0.95 L $min^{-1}$ |
| Profundidad de muestreo | 7 mm |
| Conos | Ni |
| Flujo de $H_2$ | 4.0 mL $min^{-1}$ |
| $Q_{oct}$ | -18 V |
| $Q_p$ | -16 V |
| Tiempo de integración | 0.3 segundo por isótopo |
| Puntos por pico | 1 |
| Réplicas | 1 |
| Tiempo muerto detector | 47 ns |
| Isótopos monitorizados | $^{63}Cu$, $^{65}Cu$, $^{64}Zn$ y $^{66}Zn$ |

Para optimizar las condiciones de separación por 2D/SEC-UV-AEC-ICP-ORS-qMS, se empleó un estándar comercial de Cu,Zn-SOD de hígado bovino. En primer lugar, se aplicó el sistema 1D/SEC-UV-ICP-ORS-qMS al estándar de Cu,Zn-SOD, así como a las fracciones citosólica y mitocondrial de células hepáticas (Figura 71). Durante la separación cromatográfica, los isótopos $^{63}Cu$, $^{65}Cu$, $^{64}Zn$ y $^{66}Zn$ fueron monitorizados simultáneamente en línea mediante ICP-ORS-qMS. El uso de la columna cromatográfica de SEC para el estándar de Cu,Zn-SOD muestra un pico a aproximadamente 10 min correspondiente a la fracción de 32 kDa (Figura 71A).

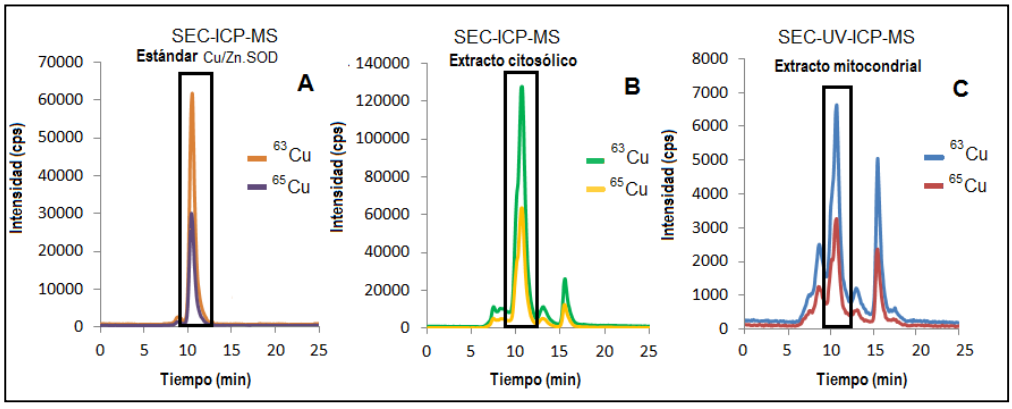



**Figura 71.** Cromatograma de SEC para Cu mediante 1D-SEC-UV-ICP-ORS-qMS de: A) Cu, Zn-SOD estándar; B) el extracto citosólico de células hepáticas; C) extracto mitocondrial de células hepáticas.

Con el fin de obtener una mejor resolución de la fracción de 32 kDa, ésta se purificó usando como segunda dimensión cromatográfica en línea una columna de AEC. Para este propósito, la fracción Cu,Zn-SOD se recogió en un loop de 3 mL conectado a una válvula de 8-vías, en posición B). Además, la válvula de 8-vías compensa el gradiente de presión entre los HPLC A y B, de baja y alta presión, respectivamente. Los resultados obtenidos para la Cu,Zn-

SOD purificada a partir de extractos citosólicos y mitocondriales de células hepáticas de ratón se muestran en la Figura 72.

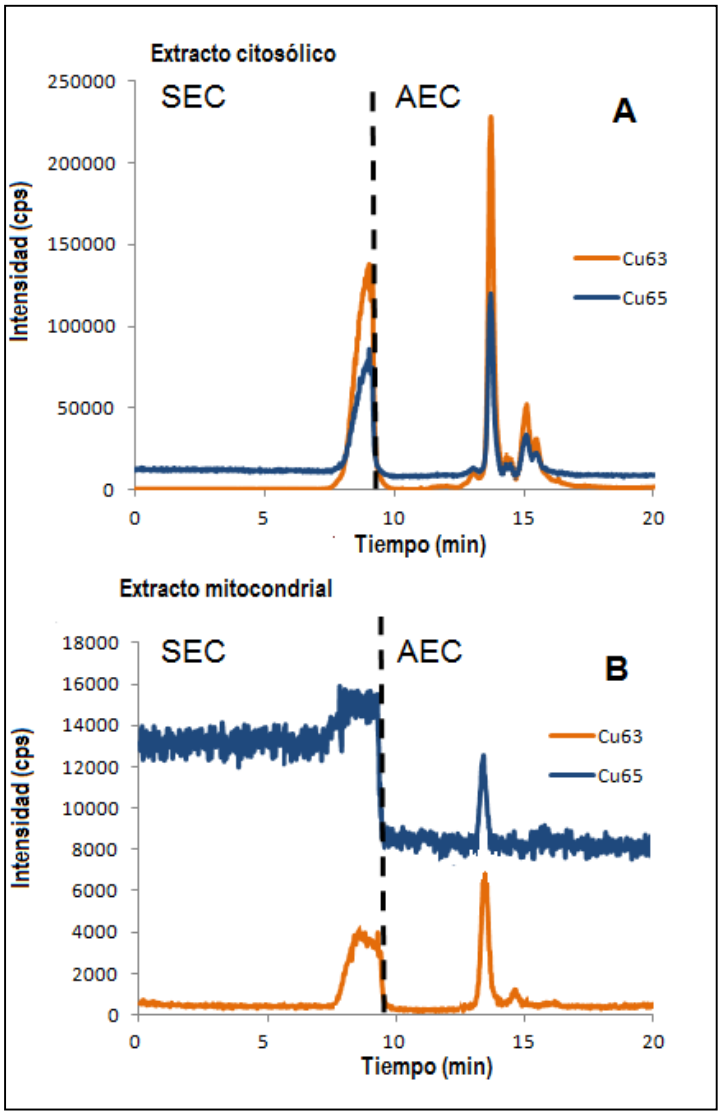



**Figura 72.** Cromatograma de 2D/SEC-AEC para Cu mediante 2D-SEC-UV-AEC-ICP-ORS-qMS de: A) extracto citosólico de células hepáticas; C) extracto mitocondrial de células hepáticas.

La tabla 26 muestra el rendimiento analítico del método descrito. La exactitud de la desviación estándar relativa (RSD, %) se calculó tras inyecciones sucesivas de 5 repeticiones de extractos citosólicos y mitocondriales de un grupo de los ocho hígados control de ratones y el límite de detección (LOD, ng $g^{-1}$) fue evaluado por 5 inyecciones sucesivas del blanco analítico (3 x desviación estándar del blanco). La desviación estándar relativa es menor para la cuantificación de Cu,Zn-SOD de células hepáticas citosólicas que los de la fracción mitocondrial, probablemente debido a la menor concentración de la proteína en las mitocondrias. Además, es notable que el balance de masa de los niveles estándar de Cu-Zn-SOD por 1D-SEC está de acuerdo con la concentración obtenida por 2D/SEC-UV-AEC-SUID-ICP-ORS-MS (Tabla 25).

**Tabla 26.** Cuantificación de Cu,Zn-SOD extractos citosólico y mitocondrial de células hepáticas de ratón mediante 2D/SEC-UV-AEC-SUID-ICP-ORS-qMS.

| Células hepáticas de ratón *Mus musculus* | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Extracto (n=5) | Cu,Zn-SOD Media (ng $g^{-1}$ como Cu) | Cu,Zn-SOD Media (µg g-1 como SOD) | Desviación estándar relativa (RSD, %) | Límite de detección (LOD, ng $g^{-1}$ de Cu) |
| Citosólico | 1212 | 306.4 | 3 | 0.21 |
| Mitocondrial | 98.34 | 24.86 | 5 | 0.21 |

### 3.6.2.11. Identificación de proteínas mediante nESI-QqQ-TOF-MS tras purificación cromatográfica

Las fracciones de mayor interés tras la purificación de fracciones citosólicas aisladas de SEC mediante una segunda dimensión cromatográfica usando AEC, son recolectadas, preconcentradas y desaladas haciendo uso en este caso de filtros de centrífuga AMICON Ultra-15 (Millipore), al igual que cuando las fracciones eran recolectadas de SEC a escala analítica,

pero usando en este caso membranas de corte de 10 kDa, en lugar de 3.000 Da. Resumidamente, la desalinización casi completa de la fracción recolectada de AEC se llevó a cabo mediante varios ciclos de ultrafiltración por centrifugación a 4.000 g, 30 min y 4 ºC, quedando la fracción proteica concentrada en el filtro y diluyendo de nuevo hasta el volumen inicial con agua ultrapura, desechando la fase móvil salina que atraviesa el filtro de corte durante el proceso de centrifugación. Este procedimiento se llevó a cabo por triplicado, siendo el extracto proteico concentrado, liofilizado y almacenado a -80 ºC hasta el momento de su digestión tríptica.

El primer paso para secuenciar una proteína supone su digestión enzimática para producir péptidos, más fáciles de estudiar mediante espectrometría de masas. La enzima más empleada es la tripsina, que rompe los enlaces peptídicos tras los aminoácidos arginina y lisina, la cual presenta ciertas ventajas:

- Se producen péptidos de tamaño adecuado para su posterior análisis (10-15 aminoácidos) ya que son solubles y fácilmente ionizables.
- No hay autodigestión.
- Sin actividad quimiotríptica, o rotura por otras posiciones distintas a las deseadas (depende de la calidad del reactivo).

Para realizar la digestión tríptica de un extracto proteico éste debe añadirse a una disolución tamponada de bicarbonato amónico a pH 8 con urea (agente caotrópico que desnaturaliza las proteínas). Luego se lleva a cabo la incubación con DTT (reductor que rompe los puentes disulfuro) y posteriormente con iodoacetamida (bloqueador de los grupos tioles). Por

último se realiza la digestión con tripsina (relación entre tripsina y proteína debe ser de 1:25), la cual puede ser mediante incubación durante 12 horas a 37 ºC.

Para este propósito, la fracción purificada, desalada y preconcentrada se volvió a disolver en 100 µL de urea 6 M y bicarbonato de amonio 50 mM (pH 8,3). Una alícuota de 50 µL de esta solución se separó y se añadió 5 µL de DTT 180 mM para reducir los enlaces disulfuro en las proteínas. Tras incubar a 37 ºC durante 30 min, 5 µL de 400 mM yodoacetamida (IAA) se añadió a la mezcla de reacción y se dejó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 min. Finalmente, la muestra se disolvió en 290 µL de agua para reducir la concentración de urea a 2 M, para favorecer la actividad de la tripsina. Después, se añadieron 50 µL (0,1 g $L^{-1}$) de tripsina y la mezcla se incubó a 37 ºC durante toda la noche (12 h aproximadamente). Finalmente, la reacción se detuvo por adición de 10 µL de ácido acético (glacial) (García-Sevillano *y col.*, 2012a). Después de la digestión con tripsina, los péptidos se desalaron, preconcentraron y se purificaron usando puntas de ZipTips C18 (Millipore, Massachusetts, EE.UU.). A continuación se detallan los pasos a seguir en el uso de las puntas ZipTips C18 para llevar a cabo la purificación de péptidos:

1. Acondicionamiento: 5 veces con 10 µL de metanol (o metanol/agua 70%, acetonitrilo/agua 70%).

2. Equilibrado: 5 veces con 10 µL de TFA 0.1%.

3. Retención de los péptidos: 10 veces 10 µL de la muestra acidificada con TFA al 0.1% (formador de pares iónicos para que se produzca la adsorción sobre la fase reversa).

4. Limpieza: 3 veces con 10 μL de TFA 0.1%.

5. Elución de los péptidos: metanol (o acetonitrilo) al 70% con ácido fórmico al 0.1%. El volumen deberá escogerse de acuerdo a si se desea realizar o no preconcentración (no debe ser inferior a 5 μL).

El analizador de masas TOF fue calibrado inmediatamente antes del análisis utilizando la renina como estándar de calibración. La adquisición de datos mediante nESI-QqQ-TOF-MS se realizó en modo positivo y los espectros de MS de los péptidos fueron adquiridos en el intervalo 400-1600 m/z. Los valores de voltaje de *ion-spray* de la fuente nESI (Figura 73), voltaje del multiplicador de electrones, gas de cortina y potencial declustering se establecieron en: 1100 V, 2200 V, 20 psi y 90 V. Los datos se realizaron mediante el uso de software Analyst QS (Applied Biosystems). Después de registrar los espectros de MS, se seleccionaron los iones doblemente cargados de los péptidos de mayor intensidad y fueron sometidos a experimentos de MS/MS empleando una energía de colisión de 45 V. Estos experimentos MS/MS fueron adquiridos y registrados en la base de datos (NCBI) usando el motor de búsqueda MASCOT.

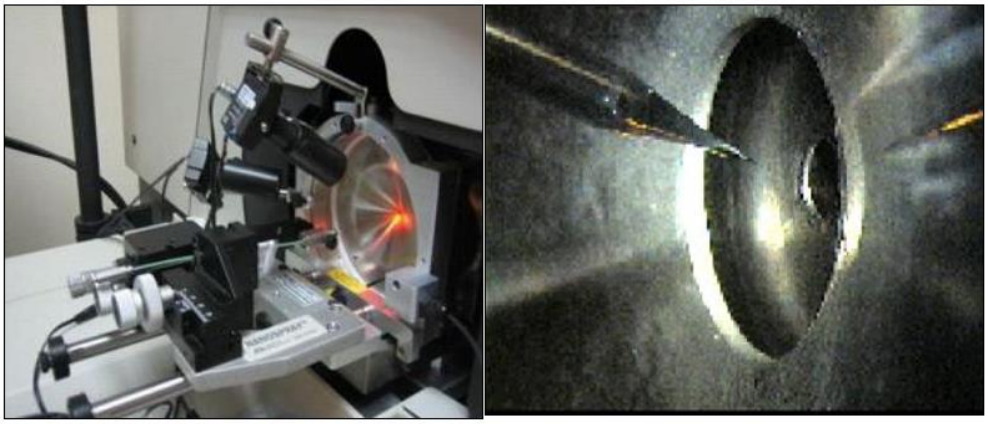


**Figura 73.** Fotografía de la fuente nano-electrospray empleada en la presente Tesis Doctoral (izquierda); Imagen del capilar próximo al orificio de entrada al espectrofotómetro de masas (derecha).

#### 3.6.2.12. Electroforesis en gel 1D/SDS-PAGE para el estudio de grupos tioles proteicos oxidados

Además del uso de técnicas cromatográficas para llevar a cabo la purificación de metaloproteínas, en el caso del estudio de proteínas (estudios proteómicos) se empleó una técnica de separación de mayor resolución dado el alto número de estas biomoléculas en fluidos y tejidos biológicos.

Para la separación por SDS–PAGE, 20 µg de proteínas marcadas con IAF se cargaron en 7 cm Any kD™ Mini-PROTEAN® TGX™ Gel, de 10 pocillos, 30 µl (BioRad ref. 456-9033) y separadas en oscuridad a 20 °C aplicando 80 V (Mini Protean tetra-Cell (Bio-Rad). Tras la completa separación de las proteínas los geles se escanearon para medir su fluorescencia usando un escáner Bio-Rad Molecular Imager FX (*Fluorescein aplication*), empleando una

longitud de onda de excitación de 488 nm y una longitud de onda de emisión/detección de 530 nm, posteriormente se tiñeron con *Coomassie Brilliant Blue* R-250 (BioRad) y se escanearon nuevamente a 595 nm (*Comassie Blue aplication*) para obtener los niveles de proteína total.

#### 3.6.2.13. Electroforesis DIGE

La metodología analítica actual más común para abordar la proteómica es la separación de una mezcla compleja de proteínas mediante la electroforesis bidimensional, seguida de su identificación usando la espectrometría de masas. Para estos casos, la electroforesis bidimensional (2-DE) se muestra como una herramienta útil que permite la separación de varios cientos de proteínas diferentes en un solo gel. Generalmente, en la primera dimensión o focalización isoeléctrica (IEF), las proteínas son separadas en un gradiente de pH, según su punto isoeléctrico, en la dirección horizontal. Después de eso, las proteínas son separadas en función de su masa molecular en la dirección vertical. El gel que contiene las proteínas puede ser teñido mediante diferentes técnicas, normalmente mediante *Coomassie Brillant Blue* o tinción con plata y la imagen resultante puede ser adquirida mediante un densitómetro.

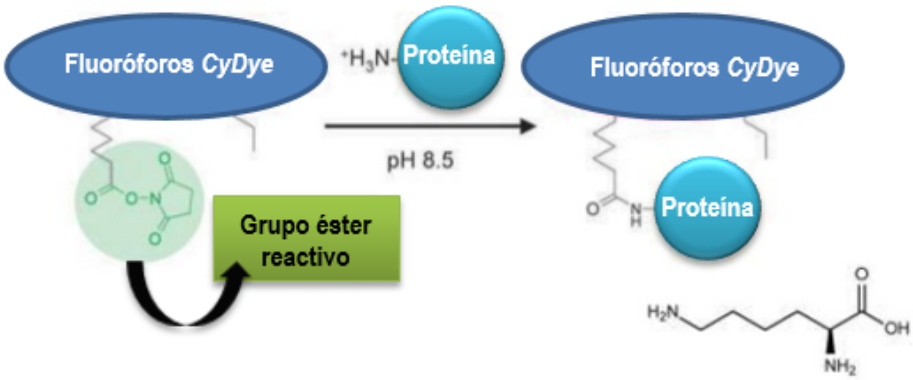
Más recientemente, el desarrollo de marcadores fluorescentes ha mejorado de manera dramática la cuantificación de proteínas en geles 2-DE (Patton, 2002; Patton y Beechem, 2002), incrementándose tanto el rango dinámico de la cuantificación, como la reproducibilidad de las tinciones. Las proteínas se marcan con la señal fluorescente antes o después de la electroforesis y se detectan tras ser excitadas mediante el uso de luz ultravioleta o láser. La tinción de SYPRO Ruby es un método para la tinción de las proteínas una vez han sido separadas mediante 2-DE, mientras que los fluoróforos *CyDye* se usan para marcar las proteínas antes de su separación

electroforética. SYPRO Ruby utiliza un reactivo sintético formado por complejos orgánicos de metales tipo rutenio que se une a los residuos de aminoácidos básicos de las proteínas (Berggren *y col*., 1999).

Los fluoróforos derivados de la cianina *CyDye* se utilizan en el método conocido como electroforesis diferencial en gel (DIGE, *Difference gel electrophoresis*) (Tonge *y co*l., 2001; Unlu *y col.*, 1997). En esta técnica se pueden utilizar hasta 3 fluoróforos derivados de la cianina distintos (denominados Cy2, Cy3 y Cy5), que portan un grupo éster reactivo con el que se unen covalentemente al grupo ε-amino de los residuos lisina de las proteínas. En la Figura 74 se muestra esquemáticamente la reacción de marcaje de los fluoróforos *CyDye* y se describen las características que presentan cada uno de ellos.

Las proteínas son marcadas antes de la separación electroforética y se pueden analizar hasta tres muestras distintas a la vez, por incubación de cada una de ellas con un fluoróforo distinto. Una de estas muestras suele ser un estándar interno constituido por cantidades equimolares de todas las muestras incluidas en el experimento que, marcada con uno de los fluoróforos, puede proporcionar un patrón con el que comparar la intensidad del marcaje de las proteínas presentes en las distintas muestras. Tras el marcaje, dos muestras y el estándar interno son combinadas y sometidas a una electroforesis bidimensional simultánea en la que comparten el mismo gel, ya que, gracias a las distintas longitudes de onda de excitación y emisión que presentan los marcadores, se puede adquirir un mapa proteico bidimensional único para cada una de las muestras marcadas (Unlu *y col.*, 1997). Para esto se hace uso de un scanner de fluorescencia con el que se lleva a cabo tanto la excitación de cada fluoróforo como la captura de

la imagen resultante tras la emisión de la fluorescencia inducida. El protocolo seguido en la técnica de marcaje DIGE está esquemáticamente resumido en la Figura 75.




| Fluoróforos | Color de la fluorescencia | Longitud de onda de máxima absorción (nm) | Longitud de onda de máxima fluorescencia (nm) |
|---|---|---|---|
| Cy2 | Verde | 491 | 509 |
| Cy3 | Naranja | 553 | 569 |
| Cy5 | Rojo | 645 | 664 |

**Figura 74.** Esquema de la reacción de marcaje con los reactivos *CyDye* y características de cada uno de los fluoróforos. Los fluoróforos *CyDye* de la técnica DIGE presentan un grupo éster reactivo que se une covalentemente a los residuos lisina de las proteínas a través de un enlace amida. Gracias a la diferencia entre sus longitudes de onda de absorción y emisión, es posible obtener el patrón proteico característico de cada muestra marcada con un marcador distinto, aun estando combinadas en un mismo gel de electroforesis.

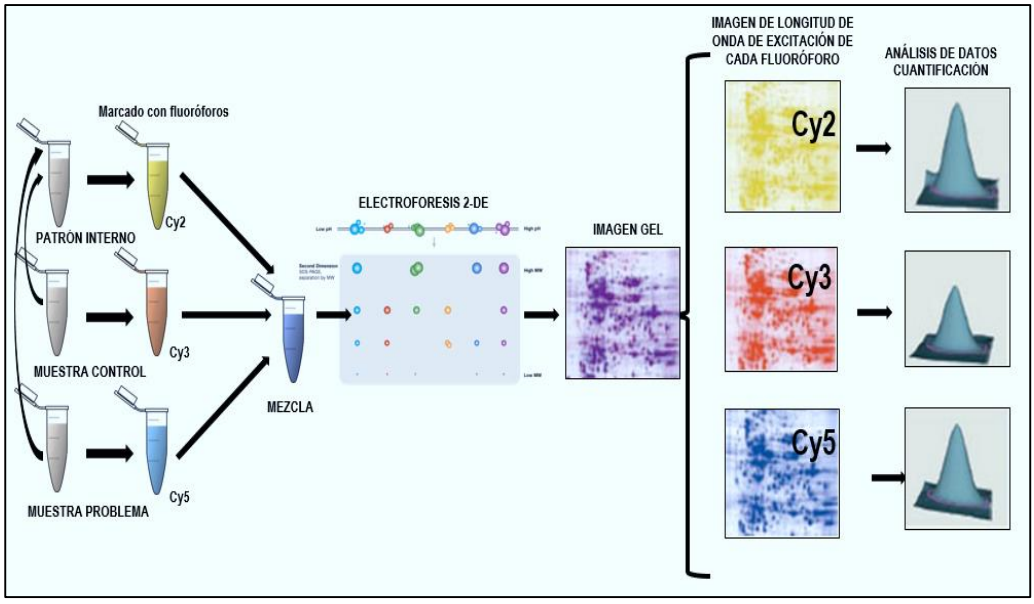



**Figura 75.** Diagrama esquemático de la metodología DIGE.

Esta técnica permite la detección de diferencias cuantitativas en la expresión proteica de distintas muestras en un solo gel, lo que, a la vez que mejora la reproducibilidad de los resultados y reduce el consumo de tiempo y de reactivos. La sensibilidad de los marcadores *CyDye* es similar a la alcanzada mediante la tinción de plata y *Coomassie*, pero el rango dinámico es mucho más amplio. La principal desventaja tiene que ver con la necesidad de llevar a cabo un marcaje mínimo de las proteínas (tan solo entre el 1% y el 3% de las mismas), requerido con el fin de mantenerlas solubles durante su separación electroforética. El marcaje provoca una ligera desviación en la masa molecular de las proteínas marcadas respecto a las no marcadas, resultando en una diferencia en la migración electroforética de ambas (Tonge *y col.*, 2001). Este fenómeno supone un inconveniente a la hora de extraer del gel la proteína detectada y su posterior análisis por MS para llevar a cabo su cuantificación, porque representa una cantidad minoritaria de la misma en la muestra y, la mayoría de las veces, insuficiente para una identificación satisfactoria. Por este

motivo, los geles de proteínas marcadas con fluoróforos *CyDye* normalmente son teñidos a posteriori mediante otro método de tinción que permita detectar tanto las proteínas marcadas como las no marcadas y así poderlas extraer del gel para su posterior análisis por MS (Gharbi *y col.*, 2002). Otro inconveniente lo supone el alto coste de los marcadores, del equipo necesario para la detección y del paquete informático asociado con el que se realiza el análisis de imagen.

En esta Tesis, tras su extracción siguiendo los pasos descritos en el, las muestras se limpiaron con el 2D Clean-up Kit (Amersham), según las indicaciones del fabricante. Brevemente, este proceso consta de los siguientes pasos:

1. Añadir mezcla de precipitación y de co-precipitación a 1-100 µl de muestra; incubar 15 min en hielo.

2. Centrifugar 5 min a 12.000 g y eliminar el sobrenadante; lavar el precipitado con 40 µL de co-precipitante.

3. Resuspender el precipitado en agua destilada (25 µL).

4. Añadir 1 ml de tampón de lavado (-20 ºC) y 5 µl de aditivo de lavado; incubar >30 min.

5. Centrifugar 5 min a 12.000 g y eliminar el sobrenadante; dejar secar el precipitado. Este se resuspendió en Lisis Buffer (urea 8M, Tris 30mM, CHAPS 4%) y se ajustó el pH a 8.5 (NaOH pH 10). Posteriormente se determinó la concentración de proteína mediante 2D-Quant Kit (GE Healthcare).

Seguidamente, 50 µg de cada una de las muestras se marcaron con 400 pmol de Cy3 o Cy5 (GE Healthcare) y el estándar interno, con cantidades iguales de cada una de las muestras, con Cy2. Tras 30 minutos a 4 ºC la reacción de marcaje se paró con 1 µL de lisina 10mM. El volumen total se ajustó a 50 µL, mezclando (1:1) con la disolución amortiguadora de rehidratación de isoelectroenfoque (IEF) (8 M urea, 4% w / v CHAPS, DTT 130 mM, 2% w / v tampón IPG pH 3-10) y se incubó durante 30 min para obtener la desnaturalización completa de las proteínas. Todas las etapas se llevaron a cabo a 4ºC.

Para llevar a cabo la primera dimensión electroforética mediante isoelectroenfoque, las tiras de gradiente de pH inmovilizado (IPG) (pH 7.4, 24 cm) (GE Healthcare) fueron rehidratadas durante la noche a 20ºC con 390 µL de solución de rehidratación *DeStreack* (GE Healthcare) que contiene 2% w/v de tampón IPG pH 4-7. Seguidamente, las proteínas desnaturalizadas se cargaron en las tiras de IPG a aproximadamente 1 cm del cátodo. Después de 6 h de rehidratación activa (50 V), IEF se llevó a cabo (20 ° C, 50 µA/tira) en un aparato de Protean IEF (Bio-Rad) a 500, 1000, 2000, 4000, 6000 y 8000 V (cada 90 min) y 8000 V (hasta alcanzar 57 000 Vh). Tras la primera etapa de separación, las tiras se sumergieron durante 20 min en una disolución de equilibrado (50 mM Tris-HCl, pH 8,8, 6 M urea, 30% w/v de glicerol, 2% w/v de SDS, y trazas de azul de bromofenol) que contenía 65 mM de DTT, y posteriormente durante otros 20 minutos en la disolución de equilibrado pero que contenía en este caso 350 mM de yodoacetamida, para bloquear los grupos tioles de las cisteínas libres de las proteínas y mejorar la separación. Para la segunda dimensión, las tiras IPG se cargaron en la parte superior de un gel al 12.5% w/v SDS-PAGE y las proteínas fueron en este caso separadas en función a su masa molecular a 20 °C en el equipo BioRad Protean Plus Dodeca Cell a 2,5 W por gel (10 min) y 3 W por gel (approx.12 h).

La digitalización y análisis de imágenes se realizó con el escáner Typhoon TRIO (GE Healthcare) Usando el modo Ettan DIGE Imager. Tamaño 100 μm, +3mm *focal plane*. El análisis de la imágenes obtenidas se hizo con el software DeCyder v6.5. Las imágenes se cargaron y se agruparon según la muestra y el gel a la que pertenecieran cada una, se aplicó el módulo DIA (*Differential In-gel Analysis*) co-detecta y cuantifica la intensidad de cada mancha en cada imagen usando como referencia las del patrón interno para normalizarlas. En un segundo paso de análisis, BVA (*Biological Variation Analysis*) se calculan las diferencias de expresión entre los distintos grupos.

Cada conjunto de tres imágenes de un solo gel se procesó usando primero el módulo de análisis diferencial en gel (*Differential In-gel Analysis*) para la detección automática del *spot*, el volumen del *spot* de cuantificación, la relación de normalización de volumen de las diferentes muestras cargadas en el mismo gel y cuantifica la intensidad de cada mancha en cada imagen usando como referencia las del patrón interno para normalizarlas. A continuación, se utilizó automáticamente el módulo de análisis variación biológica (*Biological Variation Analysis*) para hacer coincidir los puntos entre los diferentes geles y para identificar aquellos que muestran diferencias estadísticamente significativas entre las muestras. El análisis estadístico (ANOVA) se realizó en todos los *spots* que presentaban una perturbación ≥ ± 1,5 veces ($p>0.02$) en el contenido de proteína.

### 3.6.2.14. Identificación de proteínas en gel mediante MALDI-TOF-TOF-MS

Se prepararon geles preparativos que se cargaron con 300 μg de la muestra; la separación de proteínas se llevó a cabo en las mismas condiciones descritas anteriormente para los geles DIGE. Después de separadas mediante 2-DE, las proteínas se tiñeron con SYPRO Ruby® (BioRad) según las instrucciones del fabricante, y los *spots* seleccionados se cortaron utilizando el equipo Investigator™ProPic (Genomic Solutions). Las manchas se destiñeron, usando una disolución 100 mM de bicarbonato amónico y 40 % (v/v) acetonitrilo durante 15 min a temperatura ambiente, seguido de al menos dos pasos de lavado con 25 mM de bicarbonato amónico 50% acetonitrilo durante 25 min hasta que toda la tinción fue eliminada. Las piezas de gel se deshidrataron con acetonitrilo 100% (v/v) durante 5 min, retirándose este para secar las piezas de gel usando un *Speed-Vac* (ThermoElectron). La digestión proteolítica se llevó a cabo con 20 μL de tripsina (12,5 ng/μL de tripsina en bicarbonato de amonio 25 mM) a 25ºC durante 10 min seguido de 3 x 5 min de tratamiento en un horno de microondas (200W). La digestión se detuvo mediante la adición de 10 μL de 0,5% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA). Los péptidos resultantes se purificaron en una estación de PrepII Pro (Genomic Solutions) con una microcolumna C18 (ZipTip, Millipore), eluyendo con solución de matriz (5 mg/mL de alfa-ciano-4-hidroxicinámico en 70% de acetonitrilo y 0,1% de TFA). Las muestras fueron directamente depositadas sobre una placa Opti-TOF® MALDI (AB Sciex) utilizando el equipo Investigator™ ProMS (*Genomic Solutions*) y analizados mediante MALDI-TOF-TOF-MS modelo AB Sciex 4800, mediante adquisición positiva.

Los espectros fueron calibrados internamente usando las relaciones m/z de los péptidos derivados de auto-digestión de tripsina porcina (MH 842.509, MH 2211.104). La m/z se midió con una precisión de 720 ppm. Los espectros de fragmentación MS/MS de los 12 fragmentos de mayor intensidad. Los espectros obtenidos en el análisis MALDI-TOF-TOF-MS, con un / umbral de ruido de la señal ≥10, se ajustaron a una línea de base, y tras la deconvolución de los perfiles isotópicos, se detectaron los valores de los iones monoisotópicos de cada péptido.

Por último, las masas moleculares de los perfiles de péptidos trípticos se utilizaron para buscar en la base de datos IPI_Mouse (http://www.ebi.ac.uk/IPI/IPIhelp.html) con el software GPS Explorer v2.0 (Applied Biosystems) y la búsqueda de base de datos automatizada, utilizando el motor de búsqueda MASCOT (Matrix Science). Sus masas se compararon con las masas peptídicas teóricas de todas las proteínas. En este sentido, todos los fragmentos de péptidos obtenidos para cada digestión se sometieron a una búsqueda realizada mediante la combinación de péptidos de masas de huellas dactilares (PMF) y los resultados de las fragmentaciones de MS/MS. Los parámetros de búsqueda para el programa fueron los siguientes: Error máximo permitido de la masa péptido 100 ppm; cisteína como S-Carbamidomethyl-derivado, la oxidación de la metionina, la formación de ácido piroglutámico, y la acetilación de N-terminal.

#### 3.6.2.15. Estudios metabolómicos basados en DIMS mediante ESI-QqQ-TOF-MS

Los experimentos metabolómicos de extractos de mitocondrias, RBCs, tejidos y fluidos biológicos se llevaron a cabo por DIMS utilizando una fuente de ionización por electrospray (ESI). Los parámetros para analizador híbrido sistema QqQ-TOF fueron optimizados para obtener la

mayor sensibilidad con fragmentación mínima de iones moleculares, tanto en el modo de adquisición positivo como negativo. Para la adquisición de los experimentos MS/MS, el nitrógeno fue usado como gas de colisión. Los parámetros optimizados se resumen en la tabla 27.

**Tabla 27.** Condiciones operacionales DI-ESI-QqQ-TOF-MS para el estudio metabolómico.

| **Condiciones operacionales DI-ESI-QqQ-TOF-MS** | | |
|---|---|---|
| Flujo | 5 µL $min^{-1}$ | |
| Tiempo de adquisición | 0,2 min | |
| Rango m/z | 50-1100 | |
| Curtain gas (N2) | 1,13 L $min^{-1}$ | |
| Gas nebulizador (N2) | 1,56 L $min^{-1}$ | |
| Temperatura de la fuente | 60ºC | |
| | **Modo de adquisición** | |
| | **Modo positivo** | **Modo Negativo** |
| Voltaje de *Ion spray* (IS) | 3300 V | -4000 V |
| Potencial Declustering (DP) | 60 V | -100 V |
| Potencial Focusing (FP) | 250 V | -250 V |
| Ion energy (IE) | 2.0 V | -2.0 V |
| Canal electromultiplicador (CEM) | 2200 V | 2200 V |

La extracción de metabolitos a partir de las diferentes matrices biológicas se llevó a cabo como se describe en las diferentes secciones de tratamiento de la muestra. Tanto los extractos polares como lipofílicos fueron analizados en los modos de ionización (ESI+/ESI-) dando lugar a diferentes perfiles en un amplio rango espectral (m/z 50 a 1100). A modo de ejemplo, la Figura 76 muestra los espectros típicos obtenidos de extractos de hígado de ratón del grupo control (expuesto a 0,9% NaCl), tras 10 días desde el comienzo de la experiencia, obtenida por DI-ESI (±)-QqQ-TOF-MS, modelo QSTAR XL (Applied Biosystems). Todas las muestras se analizaron por duplicado y al azar usando DIMS, y las muestras se sometieron a un T-test con el fin de evitar perturbaciones de la señal causada por pequeñas variaciones en las condiciones experimentales.

A continuación, se utilizó un espectro de cada muestra y se procesaron los datos con el fin de encontrar diferencias entre los diferentes grupos de tratamiento.

Con el fin de encontrar biomarcadores, así como posibles perturbaciones en los diferentes ciclos metabólicos que permitan diferenciar entre los ratones tratados con algún xenobiótico y aquellos que han sido usados como control, los extractos individuales de todos los ratones pertenecientes a los diferentes grupos de exposición se estudiaron comparativamente los perfiles de masas. En los trabajos desarrollados en esta Tesis, los datos metabolómicos obtenidos mediante estas técnicas fueron procesados haciendo uso del software Markerview™ (Applied Biosystems). Para ello, la búsqueda de picos se hizo en intervalos de m/z de 0.1 Da, considerándose todos aquellas señales con una intensidad superior a 100 cuentas.

La evaluación de los resultados en experimentos tan complejos (donde el número de muestras y de variables es elevado) requiere el empleo de técnicas estadísticas multivariantes, ya que es difícil, como se ha visto, que una comparación de los perfiles obtenidos nos permita obtener a priori la posible discriminación entre los cuatro grupos, así como la determinación de posibles biomarcadores. Por ello, se utilizó el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), para llevar a cabo la clasificación de las muestras en distintos grupos. Este procedimiento estadístico permite realizar representaciones de los *scores*, que muestran la variabilidad entre muestras, y por lo tanto permiten separar los grupos de estudio, y de *loadings*, que muestran la variabilidad entre variables estableciendo la importancia relativa de las mismas en la separación de los grupos. Para este propósito, se ha utilizado el paquete de software estadístico SIMCA-P ™ (versión 11.5). En todos los experimentos desarrollados en esta Tesis

este análisis permite una buena clasificación de las muestras en los diferentes grupos de exposición como se demuestra en los respectivos *scores plots* obtenidos en los diferentes experimentos de exposición (ver apartado Resultados y Discusión).

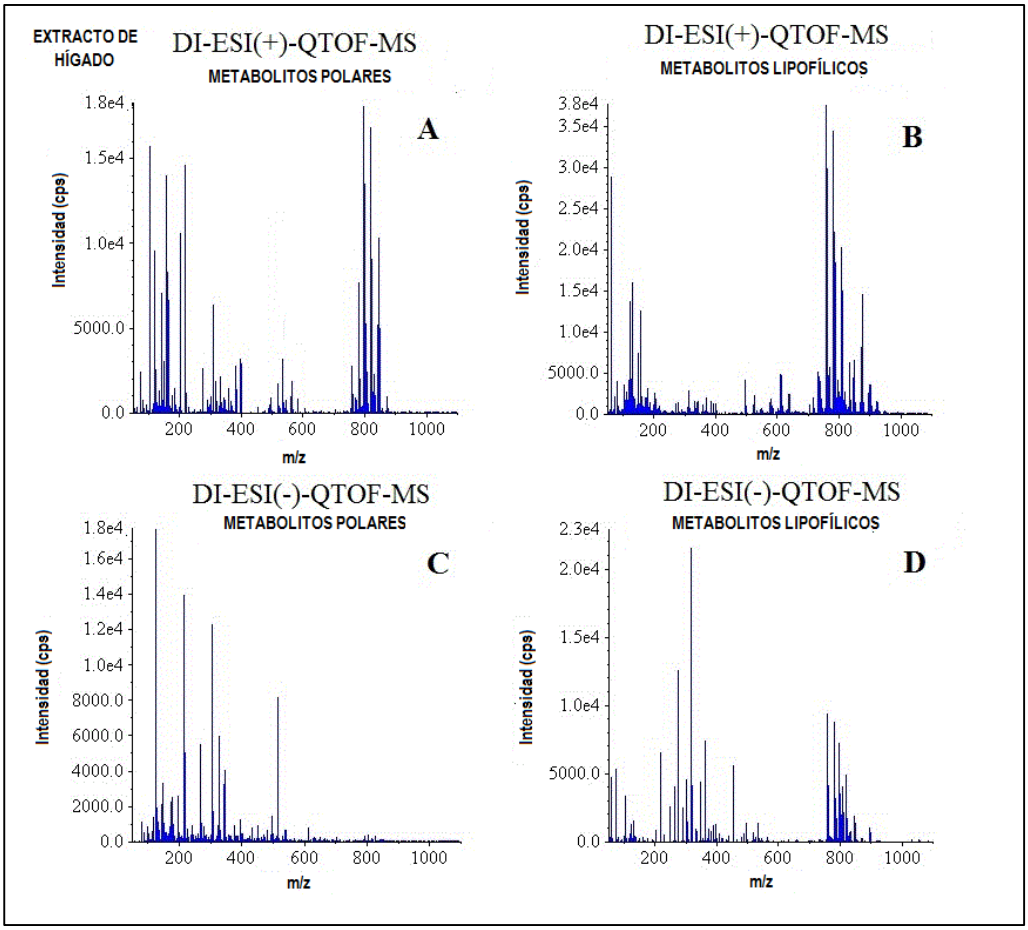



**Figura 76.** Espectros de masas obtenidos mediante DIMS de; A) extracto polar mediante adquisición positiva, B) extracto lipofílico mediante adquisición positiva, C) extracto polar mediante adquisición negativa y D) extracto lipofílico mediante adquisición negativa.

Con el objetivo de encontrar qué variables son las responsables de la separación, se utilizó el parámetro VIP (Influencia de la variable sobre la proyección). VIP es una suma ponderada de los cuadrados de PLS-DA, lo que indica la importancia de la variable a todo el modelo. El coeficiente VIP indica la variación conjunta entre cada variable explicativa y la variable respuesta. Por lo tanto, es posible seleccionar variables con la contribución más significativa para discriminar entre los perfiles metabolómicos correspondientes a grupos de exposición contra los controles. Solamente las variables con valores VIP > 1.5 fueron seleccionadas para los posteriores experimentos MS/MS con el fin de identificar los metabolitos alterados.

Una vez se han seleccionado las señales discriminantes mediante la aplicación de herramientas estadísticas, estos metabolitos marcadores deben ser identificados. En el caso de metabolómica basada en MS de alta resolución, la elucidación estructural puede llevarse a cabo mediante el conocimiento de la masa exacta y los perfiles de fragmentación. Para ello, existen numerosas bases de datos que permiten realizar la identificación mediante la comparación con espectros de referencia. Actualmente existen distintas bases de datos metabolómicas de acceso libre que facilitan este proceso de identificación, como como ya se mencionaron en la Introducción de la presente Tesis.

Alternativamente, los valores de $R^2Y$ (cum) y $Q^2$ (cum) del modelo combinado son los que nos indicaran la precisión y exactitud del modelo, es decir nos proporcionará la mejor clasificación y predicción entre ambos grupos.

#### 3.6.2.16. Estudios metabolómicos basados en GC-MS en mitocondrias, RBCs, tejidos y fluidos biológicos de ratón

La cromatografía de gases se llevó a cabo en una columna capilar (Factor four, VF-5MS 30 m x 0,25 mm ID, con 0,25 m de espesor de la película (Varian). La temperatura del inyector se mantuvo a 280 ºC utilizando He como gas portador a un flujo constante de 1 mL/min. Para lograr una buena separación, y con objeto de incrementar una mayor resolución de cara los resultados metabolómicos, la temperatura de la columna se mantuvo inicialmente a 60 ºC durante 5 min, y a continuación, se incrementó de 60º a 140 ºC a una velocidad de 7 ºC/min durante 4 min. Entonces, la temperatura de la columna se aumentó a 180 º C, con una rampa de 5 ºC/min durante 6 min. Seguidamente, la temperatura se aumentó a 280 º C a 5 º C / min, y se mantuvo durante 2 min. Para la detección por espectrometría de masas, la ionización se llevó a cabo por impacto electrónico (IE) con un potencial de 70 eV, usando el modo barrido completo en el rango de m/z 35 a 650, con una temperatura de la fuente de iones de 200 ºC.

A modo de ejemplo, la Figura 77 muestra un cromatograma (grupo control) de iones totales (TIC) típico de plasma de ratón, obtenido mediante esta metodología. Para el análisis, se inyectó 1 µL de muestra en modo sin división o *splitless*. La identificación de los metabolitos endógenos se basó en la comparación con los estándares correspondientes de acuerdo con sus tiempos de retención y las características de los espectros de masas o la búsqueda de la biblioteca de espectros de masas NIST (NIST 02), incluida en el software del equipo.

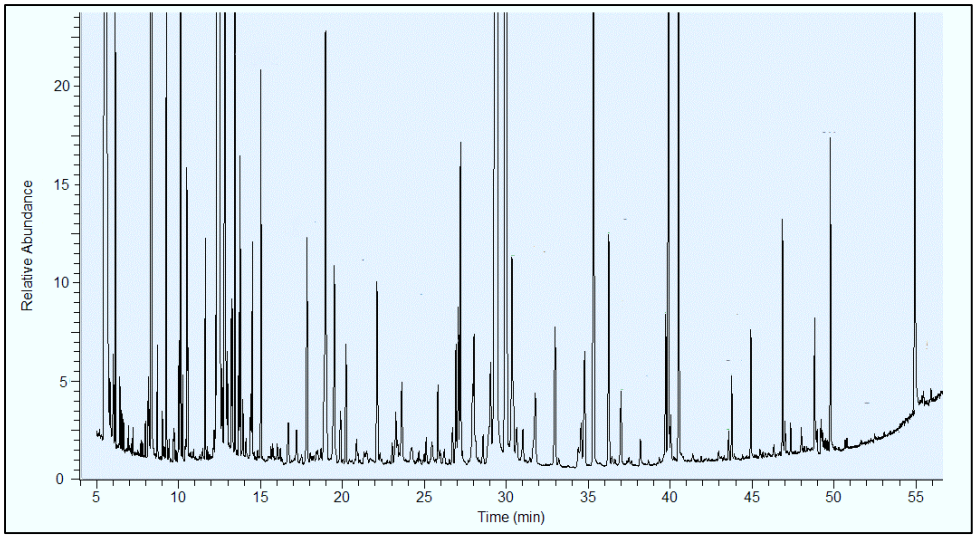



**Figura 77.** Cromatograma típico de plasma de ratón obtenido mediante GC-MS.

Por último, para construir las curvas de calibración, al cromatógrafo de gases se le inyectó 1 µL de las soluciones estándar a distintos niveles de concentración de los metabolitos de interés una vez derivatizados al igual que las matrices biológicas. Se monitorizaron dos o tres iones producto de cada metabolito, el ion precursor y los iones producto de los metabolitos estudiados.

#### 3.6.2.17. Medidas de actividades enzimáticas REDOX

En primer lugar, los órganos individuales fueron pulverizados por homogeneización criogénica. Cuatro actividades enzimáticas se analizaron espectrofotométricamente: catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión reductasa (GR) y peroxidasa guaicol (POD). Para ello, 50 mg de hígados de 5 ratones macho diferente por grupo de exposición se pesaron y se

homogeneizaron con un tampón en frío que contenía fosfato de potasio 50 mM (1/9, w/v) a pH 7,5. El material homogeneizado se centrifugó a 4 ºC durante 30 min a 10.000 g, utilizando el sobrenadante para determinar las difeterentes actividades enzimáticas de interés. A menos que se indique lo contrario, una unidad (U) se define como el consumo de 1µmol de sustrato por minuto.

- **Determinación de la actividad enzimática de la catalasa (CAT) (EC 1.11.1.6):** esta enzima se midió por el método de Aebi (1983) con varias modificaciones (Aebi, 1983). La mezcla de reacción contenía 50 mM de tampón de fosfato de potasio (pH 7), 10 mM de $H_2O_2$ y aproximadamente 30 µg de proteína por muestra. La velocidad de reacción $H_2O_2$ se monitorizó a 240 nm durante 2 min a 37 °C (coeficiente de extinción = 43,6 $mM^{-1}$ $cm^{-1}$). La actividad enzimática se expresó en unidades de $mg^{-1}$ de proteína.

- **Determinación de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa (SOD) (CE 1.15.1.1):** esta enzima se midió siguiendo el método descrito por McCord y Fridovich (1969) con modificaciones (McCord y Fidrovich, 1969). La dismutación del superóxido se ensayó midiendo la inhibición de la reducción dependiente de la xantina oxidasa dependiente de la reducción de nitroazul de tetrazolio (NBT). La mezcla de reacción (2 mL) contenía tampón de fosfato de potasio (pH 7), 0.5 mM de EDTA, 4 mM de xantina, 0,004 mM de NBT y 0,05 unidades de xantina oxidasa. La reducción del NBT se siguió a 530 nm. Una

unidad de SOD se definió como la cantidad de enzima que inhibe la tasa de aumento de la absorbancia en un 50%.

- **Determinación de la actividad enzimática de la peroxidasa de guayacol (POD) (EC 1.11.1.7):** la determinación de esta enzima se ensayó espectrofotométricamente a 470 nm por la prueba de guayacol de George en Colowick y Kaplan (1955) con algunas modificaciones (George en Colowick y Kaplan, 1955). La mezcla de reacción (2 mL) contenía 50 mM de tampón de fosfato de potasio (pH 7), 200µL 0,3% de $H_2O_2$, 200µL 1% guayacol y aproximadamente 30 µg de proteína. La actividad total peroxidasa se determinó siguiendo la tasa de formación de tetraguaiacol (coeficiente de extinción = 26,6 $mM^{-1}$ $cm^{-1}$).

- **Determinación de la actividad enzimática de la glutatión reductasa (GR) (CE 1.8.1.7):** se ensayó siguiendo la tasa de oxidación de NADPH a 340 nm como se describe en por Dringen y Gutterer (2002) con modificaciones (Dringen y Gutterer, 2002). La mezcla de reacción (2 mL) contenía 50 mM de tampón de fosfato de potasio (pH 7), 5 mM GSSG, 0,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM NADPH y aproximadamente 30 µg de proteína. (coeficiente de extinción = 6,2 $mM^{-1}$ $cm^{-1}$).

### 3.6.2.18. Cuantificación de la peroxidación lipídica en hígado de ratón

La peroxidación de lípidos se midió como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Diferentes mezclas de tejido pulverizado se prepararon por cada condición experimental mediante la mezcla de cantidades iguales de tejido hepático homogeneizada o plasma de 2-3 ratones por grupo; cada grupo representado réplicas biológicas. De cada muestra, 100 mg fueron homogenizados con 300 µL de 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, que contiene EDTA 1 mM, 1 mM de GSH y 1 mM PMSF y los peróxidos de lípidos en este homogeneizado se determinaron por el método de Buege y Aust (1978) con algunas modificaciones (Buege y Aust, 1978). Brevemente, 2-10 µL de lisados se mezclaron con 125 µL de 0,5% (w/v) de hidroxitolueno butilado en metanol, 50 µL de $H_2SO_4$ 0,66 N y 37,5 µL de 0,4 M $Na_2WO_4$, y el volumen total se ajustó a 1 mL con agua ultrapura. Las muestras se agitaron y centrifugaron (5000 g, 5 min) y los sobrenadantes se mezclaron con 250 µL de ácido tiobarbitúrico 1% (w/v en NaOH 0,1 M). Las mezclas se calentaron a 95 ºC durante 1 hora, se enfriaron a T ambiente en un baño de hielo, y su fluorescencia se determinó (Ex/Em 515/550 nm, 15 nm anchura de la ranura) en un espectrómetro de fluorescencia LS 50B (Perkin Elmer). Las concentraciones de TBARS en cada muestra se determinaron a partir de una curva estándar generada a partir de 1,1,3,3-tetraetoxipropano y se expresaron como nmol de MDA formado por 100 mg de tejido. Todas las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado.

### 3.6.2.19. Cuantificación absoluta de los niveles de mRNA por qRT-PCR

Los estudios transcripcionales se llevaron a cabo en una serie de etapas:

I. **Diseño de los cebadores o *primer*.** Los cebadores para amplificar específicamente secuencias de los genes Sod1, MT1 y A170 de *Mus musculus* fueron diseñados con el software Oligo 7.58 (Biología Molecular Insights) con características idénticas a otros cebadores utilizados por Pueyo y colaboradores (Pueyo *y col*., 2002) y anteriormente descritos (Abril *y col*., 2014). Todos los cebadores de interés se recogen en la tabla 28.

II. **Preparación de la muestra de ARN.** El ARN total de los hígados individuales se aisló con el Kit RNeasy Mini (Qiagen) y el ARN resultante se trató adicionalmente con DNasa I (QIAGEN RNasa libre de DNasa Set) para eliminar el ADN residual. Las muestras fueron limpiadas usando el mismo Kit RNeasy Mini, utilizando el protocolo de ARN *Clean Up* y desnaturalizadas por calentamiento a 65ºC durante 10 min. La integridad del ARN se determinó por electroforesis microcapilar mediante el uso del aparato Agilent 2100 Bioanalyzer, y las concentraciones de ARN se midieron con precisión utilizando el sistema de Hellma TrayCell (Hellma Analytics). La contaminación de ADN genómico fue probada mediante amplificaciones por PCR de muestras de ARN no retrotranscritas a cDNA. Tres mezclas por condición experimental (CD-grupos tratados y de control después de 6 y 10d) se prepararon combinando en un mismo tubo cantidades iguales de ARN total de 2-3 ratones de cada condición experimental (se consideran réplicas biológicas) y se utilizaron para la síntesis de cDNA.

**Tabla 28.** Cebadores usados en esta Tesis.

| Cebador[a] | Secuencia 5´-3´[b] | | Fuente |
|---|---|---|---|
| ***A170*** | ***F:*** | GGAAGAGAAGCCGCCTGACACCCACT | Prieto-Alamo *et al*. (2003). |
| | ***R:*** | CCCGTCAGGTTTGCTGACTTCCGAAG | |
| ***Ape1*** | ***F:*** | CTTCCGGCATCTCTACCCCAACACTGCT | Prieto-Alamo *et al*. (2003). |
| | ***R:*** | CCAACCAACATTCTTAGAGCGGGCATTCA | |
| ***Cat*** | ***F:*** | AATGCTCCAGGGCCGCCTTTTTGCCTACC | This work |
| | ***R:*** | GGTAATAGTTGGGGGCACCACCCTGGTTG | |
| ***Gpx1*** | ***F:*** | GCAGAAGCGTCTGGGACCTCGTG | Jurado *et al.* (2007). |
| | ***R:*** | GGGAATTCAGAATCTCTTCATTCTTGCCA | |
| ***Hmgcr*** | ***F:*** | GACTGTGGTTTGTGAAGCCGTCATTCCAG | Abril *et al.* (2014). |
| | ***R:*** | CAATGTTTGCTGCGTGGGCGTTGTAG | |
| ***Hmo1*** | ***F:*** | CTTCCGGCATCTCTACCCCAACACTGCT | Prieto-Alamo *et al*. (2003). |
| | ***R:*** | CCAACCAACATTCTTAGAGCGGGCATTCA | |
| ***Idi1*** | ***F:*** | CCATTAAGTAACCCAGGCGAGCTGGAAGAG | Abril *et al.* (2014). |
| | ***R:*** | CTTCCAAGGGTATTCCCAACTCGGCTTTC | |
| ***Igh*** | ***F:*** | ATTCCTGCGGCTGTTTCAGTGTGTCCAG | Abril *et al.* (2014). |
| | ***R:*** | GGGGTGGGAAGGTGTTCACTGTGACTTTG | |
| ***Mogat1*** | ***F:*** | GAGTGTGTCTCATGTGCTGAGCAAGGATG | Abril *et al.* (2014). |
| | ***R:*** | AGGGTGAATGTTCCTGGGTGAGCCTC | |
| ***Mt1*** | ***F:*** | GGCGGCTCCTGCACTTGCACC | Montes-Nieto *et al.* (2007) |
| | ***R:*** | TGCAGACACAGCCCTGGGCACAT | |
| ***Ogg1*** | ***F:*** | GCTGAGACAAGACCCCACTGAGTGCCTTT | Prieto-Alamo *et al*. (2003). |
| | ***R:*** | TGGAGGTTTGGGAAGCCATGATAAGTGACA | |
| ***Pla2g1b*** | ***F:*** | AAGTGCACCATCCCCGGGAGTGATC | This work |
| | ***R:*** | CAGCTTCTTGGCCTGACTGTAGCAGTGG | |
| ***Prdx1*** | ***F:*** | GTGTGTCCCACGGAGATCATTGCTTTCA | Fuentes-Almagro *et al.* (2012) |
| | ***R:*** | TGAGAATCCACAGAAGCGCCAATCACTTG | |
| ***Sod1*** | ***F:*** | GAAGGCCAGCATGGGTTCCACGTC | This work |
| | ***R:*** | TAAGAAACATGGTGGCCCGGCGG | |

[a] Nomenclatura del gen de acuerdo con el NCBI Gene database.

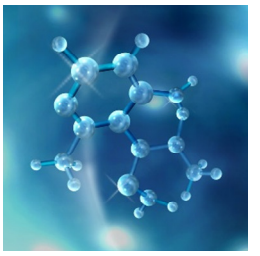
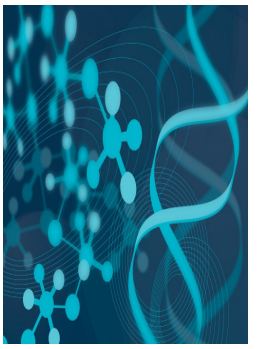
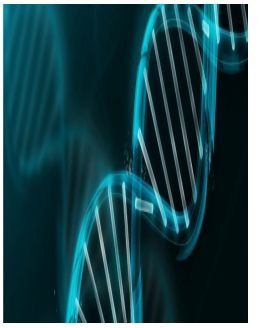
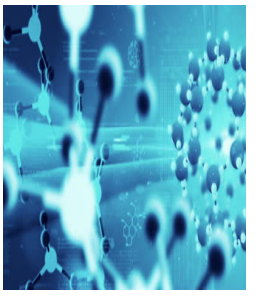
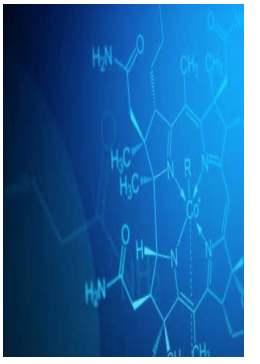
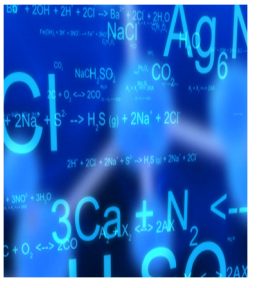
[b] Secuencia de cebadores directos (F) e inversos (R).

III. **qRT-PCR.** La cuantificación absoluta de los niveles de mRNA se llevó a cabo según se ha descrito previamente (Jurado *y col*., 2007). Brevemente, se llevó a cabo la síntesis de cDNA a partir de 2 µg de RNA total de cada muestra. La amplificación se llevó a cabo con 50 ng de cDNA por reacción mediante PCR a tiempo real y cada determinación se realizó por cuadruplicado. Para expresar los valores de Ct en términos de cuantificación absoluta, se construyó una curva de calibración con $10^2$ a $10^9$ moléculas por reacción utilizando un ARN sintetizado *in vitro* (Jurado *y col*., 2007; Prieto-Alamo *y col*., 2003) de

tamaño y concentración conocidos. El número de moléculas de transcripto se calcula a partir de la pendiente de la curva de calibración (Jurado *y col*., 2007; Prieto-Álamo *y col*., 2003). La fiabilidad de una cuantificación absoluta depende de las eficiencias de amplificación idénticas tanto para el blanco y el calibrador. Nuestros cebadores fueron diseñados para amplificar con óptima eficiencia (~ 100%) y alta linealidad (r>0,99) en el intervalo de 20 a 2 x $10^5$ pg de ARN total.

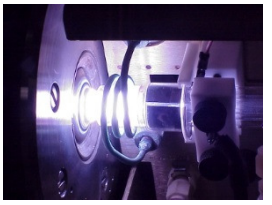
#### 3.6.2.20. Estudios histopatológicos en hígado de ratón

Para el estudio histopatológico, los 2 hígados enteros por cada grupo de exposición fueron fijados inmediatamente en una solución de formol tamponado al 4%. A este tratamiento le siguió un procedimiento de deshidratación. Para ello, pasamos las muestras por una serie gradual creciente de alcoholes, comenzando en Et-OH 70% y llegando finalmente a Et-OH 100%. Antes de introducir la muestra en parafina, esta fue aclarada con xilol. Una vez las muestras estuvieran incluídas en los bloques de parafina, se cortaron en un micrótomo rotatorio de precisión Leica Leitz 1512 (Leitz, Wetzlar, Alemania) en secciones de 4 µm de grosor. Tras desparafinar en xilol e hidratar las secciones en concentraciones decrecientes de etanol, estas se tiñeron con Hematoxilina- Eosina (Hematoxilina de Harris) y Azul Alcián respectivamente para el estudio histopatológico de rutina (Drury y Wallington, 1980). Las secciones de hígado fueron analizadas y fotografiadas mediante microscopio óptico Nicon Eclipse E400.

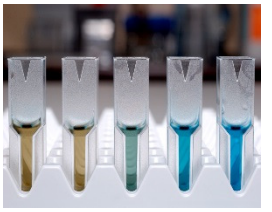







# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## Results and Discussion







# CAPÍTULO 1

## CHAPTER 1

**"Desarrollo de metodologías metalómicas y metabolómicas innovadoras en muestras biológicas basadas en la espectrometría de masas."**

***"Development of innovative metallomic and metabolomic methodologies in biological samples based on mass spectrometry."***

## 5.1. CAPÍTULO 1:

**"Desarrollo de metodologías metalómicas y metabolómicas innovadoras en muestras biológicas basadas en la espectrometría de masas."**

## PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

**Artículo 1:** Development of a new column switching method for simultaneous speciation of selenometabolites and selenoproteins in human serum. *Journal of Chromatography A,* 1318 (2013) 171-179.

**Artículo 2:** Simultaneous speciation of selenoproteins and selenometabolites in plasma and serum by dual size exclusion-affinity chromatography with online isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406 (2014) 2719-2725.

**Artículo 3:** Absolute quantification of superoxide dismutase in cytosol and mitochondria of mice hepatic cells exposed to mercury by a novel metallomic approach. *Analytical Chimica Acta,* 842 (2014) 42-50.

**Artículo 4:** Shotgun metabolomic approach based on mass spectrometry for hepatic mitochondria of mice under arsenic exposure. *Biometals,* 28 (2015) 341-351.

**Artículo 5:** Combination of direct infusion mass spectrometry and gas chromatography mass spectrometry for toxicometabolomic study of red blood cells and serum of mice *Mus musculus* after mercury exposure. *Journal of Chromatography B*, 985 (2015) 75-84.

El análisis cuantitativo de metaloproteínas es hoy día uno de los retos importantes de la química analítica y bioanalítica. La presencia de un heteroátomo en proteínas permite la aplicación de la espectrometría de masas inorgánica o elemental al estudio de metaloproteínas y proporciona una herramienta adecuada en el campo de la metalómica. En los últimos años, el desarrollo de nuevos métodos exactos y precisos para el análisis de metaloproteínas individuales es de importancia creciente, ya que numerosas metaloproteínas son excelentes biomarcadores de estrés oxidativo y enfermedades. Para ello, se requieren, fundamentalmente, métodos basados en el uso de análisis por dilución isotópica (IDA) post-columna o patrones de proteínas enriquecidas para obtener un grado suficiente de exactitud, precisión y bajos límites de detección, dada las bajas concentraciones en las que estas biomoléculas están presentes en las diversas matrices biológicas.

Como ya se mencionó en la introducción de la presente Tesis Doctoral es bien conocido que el selenio (Se) es un elemento esencial para los mamíferos, sin embargo, el mecanismo exacto utilizado por el Se para desempeñar su papel esencial en la salud humana aún no se conoce con exactitud. No obstante, ~~si~~ se ha comprobado que la mayoría de las funciones biológicas atribuidas al Se están mediadas por selenoproteínas. Por ello se precisa un mejor conocimiento del equilibrio de selenio mediante la cuantificación de las especies más frecuentes de este elemento, como la eGPx, SeAlb, SeP, selenito y selenato en el torrente sanguíneo, utilizando una metodología metalómica que permita la cuantificación absoluta de estas biomoléculas en el torrente sanguíneo. Para este propósito, en la presente Tesis Doctoral se ha hecho uso del ICP-MS como sistema de detección, dada su capacidad de detección multiisotópica, que nos permite aplicar el análisis de dilución isotópica para llevar a cabo una

cuantificación absoluta de especies de selenio de las que no se dispone comercialmente de patrones de calibración, especialmente en el caso de las metaloproteínas.

En este sentido, son numerosas las publicaciones científicas que han propuesto metodologías analíticas basadas en el uso de técnicas metalómicas con el propósito de conseguir el análisis de estas especies de selenio con buena resolución, estableciendo una cuantificación precisa y exacta de las selenoproteínas en fluidos biológicos mediante diferentes modalidades de cromatografía líquida, como la cromatografía de exclusión (SEC), la cromatografía de intercambio de aniones (AEC) y la cromatografía de afinidad (AFC). Sin embargo, la SEC no proporciona resultados satisfactorios debido a su baja resolución cromatográfica. Por otro lado, AEC ofrece buenas recuperaciones pero la resolución cromatográfica tampoco es aceptable. Metodologías más recientes, proponen el uso de la AFC para llevar a cabo la separación cromatográfica de SeP, SeAlb y eGHPx, sin embargo la eGPx se retiene débilmente y eluye junto con la matriz de la muestra (interferencias) y otras posibles especies de selenio presentes en los fluidos biológicos, como selenometabolitos. Por otra parte, estos procedimientos deben tener en cuenta las altas concentraciones de iones $Cl^-$ y $Br^-$ en los fluidos biológicos, como el plasma y el suero (~3.5 g $L^{-1}$ y ~3.5 mg $L^{-1}$, respectivamente), que provocan errores en la cuantificación de la eGPHx mediante el uso de ICP-MS, debido a la formación de especies poliatómicas de estos interferentes con los átomos de Ar del plasma del ICP-MS. Con el fin de minimizar el efecto de estas interferencias, se ha propuesto recientemente el acoplamiento en línea de la AEC con la AFC para eliminar estos problemas, y hacer posible la especiación de selenoproteínas en plasma. Sin embargo, los procedimientos propuestos hasta ahora no permiten resolver la interferencia causada por Br, y en

caso de estar presentes, los selenometabolitos como SeMet o SeCys, coeluirán con la eGPHx, por no poder retenerse en la AEC.

Los procedimientos metalómicos desarrollados en los artículos 1 y 2 de esta memoria (2D/SEC-AFC-HPLC-SUID-ICP-ORS-MS y 3D/SEC-AFC-AEC-HPLC-SUID-ICP-ORS-MS), permiten la especiación simultánea de selenoproteínas y selenometabolitos de baja masa molecular en suero y plasma. Además, el enfoque propuesto permite eliminar las típicas interferencias espectrales en suero/plasma causadas por Cl y Br, y se mejora notablemente la resolución cromatográfica con la introducción de una primera separación cromatográfica basada en el uso de SEC a baja presión, provocando la separación de selenometabolitos de la eGPHx, así como de los posibles interferentes de la matriz que impiden llevar a cabo una cuantificación precisa y exacta. Además, el uso de dos columnas de afinidad conectadas en paralelo para llevar a cabo la separación de SeP y SeAlb minimiza las etapas de manipulación de la muestra, que conlleva el uso de cartuchos off-line de SPE, propuesto por otros autores, mejorando de esta forma la cuantificación absoluta de las selenobiomoléculas presentes en el torrente sanguíneo. La metodología resultante es robusta, fiable y rápida, con un tiempo de ejecución cromatográfico menor de 35 min. Los límites de detección para las distintas especies de selenio se encuentran dentro del rango 0,2-1,3 ng de Se $g^{-1}$. La exactitud se evaluó mediante el análisis del material de referencia de suero humano (BCR-637) certificado por el contenido de Se total. Además, una vez validadas, se aplicaron estas metodologías (artículos 1 y 2) a dos materiales de referencia de plasma y suero, disponibles comercialmente, proporcionando por primera vez los niveles de las proteínas de selenio en los CRMs *Clinchek of plasma control, Level II* y *Clinchek of serum control, Level I* (Recipe Chemicals, Munich, Germany).

Por otro lado, la enzima Cu-Zn SOD es un homodímero con una masa molecular de 32 kDa que contiene seis moléculas de histidina y aspartato enlazados a Cu y Zn, en el que una de las moléculas de histidina se comparte entre los dos metales (Tainer *y col*., 1983). La enzima SOD cataliza la dismutación de radicales superóxido de oxígeno y peróxido de hidrógeno, lo que representa una importante mecanismo de defensa contra el estrés oxidativo (Fridovich, 1995). Por esta razón, es muy importante determinar de forma exacta y precisa de las metaloproteínas, como la Cu,Zn-SOD, que participan en el equilibrio redox de las células vivas.

En este sentido, la mitocondria es la principal fuente intracelular para la oxidación de los radicales libres ($O_2^{\cdot}$ y $NO^{\cdot}$). Las reacciones en cadena de radicales libres se inician por $O_2^{\cdot}$ y $NO^{\cdot}$ e implican una serie especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies de nitrógeno que son perjudiciales para las membranas de las mitocondrias (principalmente los lípidos), las proteínas y el ADN (Girotti, 1985). El radical se dismuta rápidamente en tres tipos de isoenzimas de SOD, Cu,Zn-SOD, Mn-SOD y SOD extracelular (EC-SOD) (Zhang *y col*., 1998). La actividad de SOD se exploró por primera vez en el hígado, comprobándose que la isoenzima Cu,Zn-SOD estaba presente en el citosol y la isoenzima Mn-SOD en la matriz mitocondrial (Fridovich, 1986). Sin embargo, en los últimos años, varios autores confirman la presencia de Cu,Zn-SOD en la fracción mitocondrial (Fridovich, 1986). Además, la SOD puede ser inducida por la exposición a muchos contaminantes, como metales tóxicos (Jamall *y col*., 1985). Por otra parte, la Cu,Zn-SOD también ha sido identificada como un biomarcador importante de daño oxidativo en el cerebro como consecuencia de la enfermedad de Alzheimer (AD) y Parkinson (PD) (Choi *y col*., 2005). Por todas estas razones, es necesario un método preciso, exacto y sensible para la cuantificación absoluta precisa de Cu, Zn-SOD.

En la actualidad, la mayoría de los métodos existentes para determinación de la enzima Cu,Zn-SOD se basan en la medida indirecta de su actividad enzimática mediante una reacción competitiva entre la propia enzima y una molécula eliminadora de superóxidos, utilizando, generalmente, un reactivo colorimétrico (Serra *y col*., 2000).

Sin embargo, estos métodos espectrofotométricos son muy susceptibles a las interferencias, como la presencia de otras enzimas capaces de reaccionar con los radicales superóxido o con reactivos de colorante. Por otro lado, debido a las grandes posibilidades de la espectrometría de masas elemental, principalmente el ICP-MS-ORS, para el análisis de metales a niveles de trazas y ultratrazas en proteínas y su posibilidad de acoplamiento a las técnicas de separación, esta técnica ofrece grandes posibilidades para el estudio analítico de estas biomoléculas. Asimismo, hace posible el uso de la dilución isotópica para la cuantificación exacta y precisa de moléculas que contienen Cu o Zn, entre otras. Para una separación y cuantificación efectiva de Cu,Zn-SOD se han desarrollado numerosos métodos de especiación basados en separaciones cromatográficas o electroforéticas (Nuevo-Ordóñez *y col*., 2010; Deitrich *y col*., 2010; González-Fernández *y col*., 2011; Flohe *y col*., 1984), siendo SEC-ICP-MS-ORS la técnica metalómica más ampliamente utilizada como una primera dimensión cromatográfica debido a su notable tolerancia a matrices complejas como es el caso de las matrices biológicas. Sin embargo, se obtiene una baja resolución para las proteínas que contienen cobre mediante el uso de SEC y, alternativamente, otros métodos introducen una segunda dimensión después de SEC con el fin de mejorar la resolución, pero el tiempo de análisis aumenta a 100 min, y se requieren procesos de aislamiento de fracciones *off-line*, eliminación de sales y etapas de preconcentración, que pueden ocasionar una cuantificación inexacta de dicha metaloproteína. Otra alternativa

desarrollada por Nuevo-Ordoñez *y col.,* se basó en el uso de membranas de cortes de 10 kDa, utilizando filtros centrífugos con el fin de eliminar las especies de baja masa molecular, así como preconcentrar la muestra, sin embargo estas técnicas *off-line* pueden provocar pérdidas de proteínas y/o su desnaturalización (Nuevo-Ordóñez *y col*., 2010).

En al artículo 3 de la presente Tesis Doctoral se describe un método para la cuantificación absoluta e identificación de Cu,Zn superóxido-dismutasa (Cu,Zn-SOD) en el citosol y las mitocondrias de células hepáticas de ratón mediante una metodología metalómica basada en la conmutación de columnas cromatográficas o "*column switching method*". El método utiliza sistemas cromatográficos ortogonales conectados en línea mediante el empleo de una válvula de 8-vías, usando como unidad de detección el ICP-MS equipado de una celda de reacción con octapolo (ICP-ORS-MS) y detector UV, lo que implica el fraccionamiento por exclusión por tamaños (SEC) de los extractos citosólicos y mitocondriales, seguido de una segunda dimensión cromatográfica basada en la cromatografía de intercambio de aniones en línea (AEC), conectadas entre sí mediante el empleo de la válvula citada de 8-vias. Tras esta segunda dimensión cromatográfica, la enzima Cu,Zn-SOD se identificó tras digestión tríptica por espectrometría de masa molecular (MS). El espectro MS/MS de varios péptidos doblemente cargado se utilizó para obtener la secuencia de la proteína empleando el motor de búsqueda MASCOT. Esta metodología optimizada reduce el tiempo de análisis y evita el uso de preconcentración de muestras y procedimientos de limpieza, tales como filtros de corte centrifugados, extracción en fase sólida (SPE), procedimientos de precipitación, aislamientos de fracciones en multicolectores *off-line*, etc.

En este sentido, el método es robusto, fiable y rápido con tiempo de ejecución cromatográfico inferior a 20 min. La precisión en términos de desviación estándar relativa (n = 5) es de 3.5% y el límite de detección de 0.21 ng $g^{-1}$ de Cu.

La aplicación de esta metodología a las células hepáticas de ratones expuestos al mercurio inorgánico revela que los niveles de Cu,Zn-SOD en la fracción citosólica y mitocondrial disminuyó, como consecuencia del estrés oxidativo causado por este metal tóxico. Es la primera vez que se ha cuantificado la Cu,Zn-SOD mitocondrial, en las células hepáticas de *Mus musculus*.

Por otro lado, los estudios toxicometabolómicos basados en espectrometría de masas están cobrando mayor importancia en los últimos años y requieren enfoques analíticos para la obtención de perfiles metabólicos no sesgados. Como ya se comentó en la introducción, las metodologías metabolómicas se basan principalmente en el uso de dos plataformas de análisis, de resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas (MS), basándose en el estudio completo de los metabolitos que participan en diferentes vías metabólicas de los organismos. Considerando el metaboloma como el conjunto de biomoléculas de baja masa molecular endógenos (típicamente <1000Da) presentes en la célula. El potencial de la RMN para los análisis de alto rendimiento, junto con la preparación de muestras rápida y sencilla, y su carácter no destructivo ha hecho esta técnica la más utilizada, convencionalmente en metabolómica. Sin embargo, la MS está ganando importancia debido a su sensibilidad y especificidad, así sus mayores posibilidades en el estudio de matrices complejas y para pequeñas cantidades de muestras. Normalmente la espectrometría de masas se acopla a la cromatografía líquida o gaseosa (LC o GC), o la electroforesis capilar (CE), con el fin de reducir la complejidad

de los espectros de masas, evitando interferencias isobáricas y minimizar la supresión iónica. Sin embargo, a pesar de las ventajas de las técnicas de separación acopladas a MS, numerosos estudios recomiendan utilizar DIMS sin ninguna separación previa, utilizando analizadores de masas de alta resolución, tales como los sistemas híbridos QqQ-TOF. En este sentido, la DIMS presenta varias ventajas en metabolómica, tales como su mayor sensibilidad al introducirse la muestra directamente en el analizador, permitir un análisis rápido de la muestra, una cobertura más amplia de metabolitos, ya que no existe exclusión de los compuestos asociados en la etapa de separación y la posibilidad de identificar metabolitos desconocidos, especialmente usando los experimentos de masas en tándem MS/MS.

Sin embargo, debido a la complejidad del metaboloma en cualquier muestra biológica, el análisis metabolómico por medio de varias plataformas analíticas es cada vez más frecuente. La combinación de la información que proviene de las diferentes técnicas analíticas conduce a un mayor conocimiento sobre el metaboloma en los organismos estudiados y a un aumento en la probabilidad de éxito en la detención de potenciales biomarcadores entre diferentes muestras. En este sentido, la capacidad de la DIMS en combinación con el GC-MS para medir metabolitos primarios claves, como aminoácidos, ácidos orgánicos o hidratos de carbono, implicados en las vías esenciales en el metabolismo de las mitocondrias de organismos (glucólisis, el ciclo de Krebs, ácidos grasos libres y otros), constituye una buena alternativa instrumental para este fin.

Las mitocondrias son los orgánulos celulares que proporcionan energía para el metabolismo intracelular. Este orgánulo desempeña un papel crucial en varios procesos celulares de vital importancia (Sas *y col.*, 2007). En este sentido, una disfunción mitocondrial causa una

reducción en la producción de ATP, daño oxidativo e induce apoptosis. Todos estos procesos están involucrados en la patogénesis de numerosos trastornos, por ejemplo, la enfermedad de Parkinson (PD), la enfermedad de Alzheimer (AD), enfermedad de Huntington (HD) y la enfermedad de Wilson (Orth *y col.*, 2001). Por otro lado, el hígado es un órgano central para la homeostasis del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. En este contexto, las mitocondrias de hepatocitos son esenciales en la regulación del flujo de metabolitos en la célula con el fin de ajustar la demanda energética, la desintoxicación de amoníaco, o las vías anabólicas (Esposti *y col.*, 2012). También es un órgano clave en el mantenimiento de la homeostasis de los lípidos, siendo el sitio principal de oxidación de ácidos grasos junto con el músculo (principalmente el proceso de β-oxidación que se produce en las mitocondrias) y es el único órgano capaz de sintetizar ácidos grasos por la lipogénesis *de novo* (Fabbrini *y col*., 2010). Además, este órgano es uno de los órganos más ricos en términos del número y la densidad de las mitocondrias, del orden de 500 a 4000 por hepatocito (Chatterjee *y col.,* 2012).

Por todas estas razones, en el artículo 4 de la presente Tesis Doctoral se ha optimizado una plataforma metabolómica basada en la aplicación general de DIMS utilizando un analizador de alta resolución (un sistema híbrido de triple tiempo cuadrupolo-tiempo de vuelo (QqQ-TOF) y un análisis complementario por GC-MS de los extractos mitocondriales de las células hepáticas de ratón, haciendo hincapié en puntos importantes como el aislamiento mitocondrias de las células hepáticas utilizando un kit comercial, tratamiento de la muestra para provocar la lisis celular, el análisis metabolómico general y un análisis de reconocimiento de patrones después de la caracterización de los perfiles mediante análisis discriminantes. Posteriormente, los metabolitos se identificaron mediante la combinación de análisis por MSMS y el uso de bases de datos

empleadas en metabolómica. Por último, este *workflow* metabolómico se aplicó a extractos mitocondriales de células hepáticas de *Mus musculus* sometido a exposición controlada a arsénico inorgánico, uno de los elementos más estudiados en relación con la toxicidad mamíferos.

Se observaron varias diferencias metabólicas entre los espectros de MS y cromatogramas de GC-MS de los extractos mitocondriales de los ratones control y aquellos que fueron sometidos a dosis controladas de arsénico inorgánico. Puede mencionarse la alteración que sufre la función de la acetil-CoA para transferir átomos de carbono en el grupo acetilo dentro del ciclo del ácido cítrico (ciclo de Krebs) para la producción de energía. Por otro lado, los ácidos grasos libres (AGL) constituyen una parte importante de la energía que se obtiene de la dieta y son también la principal fuente de los mamíferos para almacenar energía. Estos AGL se requieren para ser degradados por β-oxidación mitocondrial (proceso por el cual las moléculas de ácidos grasos se descomponen en la mitocondria para generar acetil-CoA) que al final genera energía a la célula en forma de trifosfato de adenosina (ATP). Se obtuvo un aumento de las concentraciones (alrededor del 60%) en numerosos ácidos grasos libres, tales como el ácido mirístico, ácido palmitoleico, ácido palmítico, ácido piranaric, ácido linolénico, ácido linoleico, ácido oleico, ácido esteárico, ácido araquidónico, ácido eicosatrienoico, ácido eicosenoico y DHA. Esta acumulación de ácidos grasos libres en fracciones mitocondriales de ratones tratados con As podría estar relacionado con el desglose de los fosfolípidos de membrana, tales como fosfatidilcolinas (PC) y la lipólisis de los triglicéridos (TGS). Por otro lado, se requiere carnitina en las células para el transporte de ácidos grasos desde el citosol a la mitocondria, durante la descomposición de los lípidos para la generación de energía metabólica por β-oxidación, por lo que este metabolito también se relaciona con el metabolismo de la energía en las mitocondria. En este sentido, la

producción masiva de acetil-CoA estimulará la piruvato carboxilasa (PC) para convertir el piruvato en oxaloacetato, que puede incorporarse en el ciclo de Krebs, y por lo tanto dar lugar a una mayor acumulación de productos intermedios del ciclo de Krebs discutido anteriormente.

Por otra parte, varios aminoácidos se han visto alterados en la fracción mitocondrial del hígado de ratones afectados por la exposición al arsénico. La degradación oxidativa de los aminoácidos produce el 10-15% de la energía metabólica total en las células animales. Para este propósito, ciertos aminoácidos se pueden convertir a siete intermediarios metabólicos del ciclo TCA (piruvato, α-cetoglutarato, succinil-CoA reductasa, fumarato, oxaloacetato, acetil-CoA reductasa o acetoacetato) (Valerio *y col.*, 2011). La histidina se convierte en formiminoglutamato, y el grupo formimino se transfiere a tetrahidrofolato, y los cinco carbonos restantes forman glutamato. Por un lado, a partir del glutamato, se sintetiza el aspartato mediante una reacción de transaminación, catalizada por la aspartato aminotransferasa, AST. Aspartato y asparagina se convierten en oxaloacetato, un metabolito que interviene en el ciclo del ácido cítrico (Lieberman *y col*., 2013). El aspartato, un aminoácido de cuatro carbonos, es convertido directamente a oxaloacetato y finalmente a acetil-CoA para cubrir los requisitos de ATP. Por otra parte, el glutamato puede ser excretado o también puede ser metabolizado a α-ketoglutarato, otro intermediario metabólico del ciclo TCA. La disminución de los niveles de histidina, arginina y glutamina, y un aumento en los niveles de glutamato confirman que el arsénico provoca perturbaciones en el metabolismo de la energía.

Por último, la creatina quinasa (CK) y la creatina quinasa mitocondrial (CKm) son enzimas que juegan un papel fundamental en la homeostasis de la energía celular. Además, la

creatina quinasa mitocondrial (CKm) está presente en el espacio intermembrana mitocondrial, donde produce la fosfocreatina (PCr) a partir de ATP mitocondrial generada y la creatina (Cr), importados desde el citosol (Schlattner *y col*., 2006). En situaciones de estrés oxidativo, la creatina se excreta como creatinina en la orina. Por todo ello, se obtuvo una disminución en los niveles de creatina en las mitocondrias de las células hepáticas de ratones expuestos a As.

En resumen, este *workflow* metabolómico proporciona una amplia información metabólica, que podría aplicarse a toxicología, farmacología y estudios clínicos, en los que se dispone, de forma general, de muestras complejas y cantidades muy pequeñas de éstas.

En este mismo sentido, en el artículo 5 de la presente Tesis Doctoral se aplicó este mismo *workflow* metabolómico para ratones expuestos a dosis controladas de mercurio inorgánico, pero en este caso fue optimizado para aplicar estas metodologías analíticas al suero y glóbulos rojos de la sangre de ratón de laboratorio *Mus musculus*. Para este propósito se optimizaron las etapas de aislamiento de RBCs, así como la preparación de la muestra para ser analizada por DIMS y GC-MS siguiendo las etapas que se detallan en el apartado experimental de la presente memoria.

El uso combinado de DI-ESI(±)-QTOF-MS y GC-MS permitió obtener una visión más profunda sobre los efectos toxicológicos inducidos por Hg inorgánico en el suero y los eritrocitos de ratones *Mus musculus*, después de 10 días de exposición por inyección subcutánea. El mecanismo básico de la toxicidad de Hg es la inducción de estrés oxidativo debido a la capacidad de este metal tóxico para formar complejos estables con los grupos sulfhidrilo de determinadas proteínas, y entre ellas numerosas enzimas (Clarkson, 1972). Por tanto, se ha evaluado el estado

redox de los grupos tioles de proteínas en el suero de los ratones tratados Hg, confirmando que en comparación con los ratones control, la densidad total de proteínas con tioles oxidados reversible fue mucho mayor en suero de ratones tratados Hg. En las proteínas, se forman enlaces disulfuro entre los grupos tioles de dos aminoácidos cisteína (Cys). La Cys es vulnerable a muchos electrófilos, especialmente ROS/RNS, que conducen a modificaciones redox y alteraciones en la estructura de la proteína, la función, o la señalización redox (Ying *y col*., 2007).

Por otro lado, se han observado los siguientes efectos metabólicos:

i) Disminución de los niveles de creatinina en suero y el aumento de la concentración de creatina en suero y eritrocitos. Estos resultados pueden estar relacionados con la disminución de la excreción de creatinina por la orina publicados por otros autores en ratas expuestas a mercurio (Nicholson *y col.*, 1985).

ii) Disminución de los niveles de glucosa y metabolitos intermedios del ciclo de Krebs en suero y glóbulos rojos, lo que refleja la nefrotoxicidad inducida por Hg a través de la alteración de estado ácido-base. Niveles más altos de ácido láctico en suero y eritrocitos apoyan esta idea que se relaciona con la disminución de los niveles de citrato, isocitrato y α-cetoglutarato observados en el suero, a través de las perturbaciones del ciclo de Krebs relacionados con la glucólisis.

iii) Alteraciones en los niveles de componentes de membranas, especialmente en muestras de suero. Se observaron aumentos en los niveles de metabolitos derivados de la colina, como la colina y fosfocolina, productos de degradación de fosfatidilcolinas (PC), principales componentes de la membrana plasmática, que participan en los mecanismos patológicos y funciones celulares claves, como la transducción de señales, la apoptosis, la necrosis, entre otras (Koivusalo y col., 2001; Bashir *y col*., 2006). Los aumentos en colina y fosfocolina en suero de los ratones tratados con Hg fueron acompañados con un aumento en los niveles de ácidos grasos libres (AGL), en paralelo a una disminución en los niveles de PCs, lo que confirma la ruptura de las membranas por peroxidación lipídica (Griffin *y col.*, 2001). Este proceso se inicia cuando la fosfolipasa $A_2$ libera AGL de las PCs para generar liso-PCs, posteriormente hidrolizadas a fosfocolina y esta a su vez a colina.

iv) Aumento de los niveles de AGLs en el suero y glóbulos rojos. Las RBCs están rodeadas por membranas, que contienen fosfolípidos, colesterol y proteínas. La desacilación/reacilación de fosfolípidos es la principal vía de reparación de las membranas de los eritrocitos (Ciclo de Lands) (Dise *y col*., 1980). La acilación de lisofosfolípidos endógenos se realiza para proceder a través de la activación inicial de los AGLs por esterificación con CoA, en una reacción dependiente de la presencia de ATP catalizada por la acil-CoA-ligasa (Mulder *y col.*, 1965). Los niveles elevados de AGLs en el suero de los ratones expuestos a Hg apoyan esta hipótesis. En este sentido, la L-carnitina es esencial en la renovación o

*turnover* de los fosfolípidos, en el metabolismo intermediario y para mantener la función normal de los RBC. Esto podría estar relacionado con el mecanismo de protección inducido por Hg en defensa a la peroxidación lipídica.

v) Perturbaciones en los niveles de metabolitos relacionados con el estrés oxidativo como la acumulación de ácido homocistéico (HCA) en los eritrocitos. Este hecho se relaciona con el estrés oxidativo inducido por Hg en los eritrocitos, disminuyendo la resistencia hemolítica (Arzumanyan *y col*., 2008). Otros metabolitos relacionados con el estrés oxidativo también se alteraron en los glóbulos rojos, incluyendo el glutatión reducido (GSH) y su forma oxidada (GSSG). La GSH tiene numerosas funciones biológicas, como el metabolismo y la regulación de importantes procesos celulares, tales como la expresión de genes, el ADN y la síntesis de proteínas, la proliferación celular y la apoptosis, transducción de señales, producción de citoquinas y la respuesta inmune, entre otras. GSH también juega un papel importante el mantenimiento de la forma reducida de tioles de proteínas de membrana, cuya oxidación puede alterar la estructura y/o función de las células. En condiciones oxidativas GSH se oxida de forma reversible al disulfuro de glutatión (GSSG). El aumento de GSSG y la caída paralela de los niveles de GSH en los eritrocitos después de 10 días de exposición a Hg, demuestra el estrés oxidativo inducido por Hg. Por otro lado, el aumento de ácido glutámico, requerido para la síntesis de GSH, también apoya esta hipótesis.

vi) El GSH también es necesario en el metabolismo de ascorbato. La GSH proporciona electrones para la reducción del ácido deshidroascórbico a ascorbato, o vitamina C, otro antioxidante celular importante. El ascorbato tiene un alto potencial de reducción, reduciendo a muchos oxidantes, como varias ROS (May, 1998). Nuestros resultados muestran alteraciones en el metabolismo del ascorbato en los eritrocitos bajo la exposición a Hg, un aumento en los niveles de treonato y treonolactona apoyan esta observación.

vii) Perturbaciones en los niveles de triacilglicéridos (TAG) que podrían estar relacionadas con procesos de apoptosis celular (Engelmann *y col*., 1996). Los estudios histopatológicos mostraron que el tratamiento Hg originó la inflamación, la acumulación de lípidos (esteatosis) y la disolución de la cromatinina (cariolisis) en las células hepáticas.

viii) Alteración del metabolismo de los aminoácidos, reflejado por un aumento de las concentraciones de valina e isoleucina, posiblemente a través de metabolismo de agotamiento de aminoácidos ramificados por la inhibición de la enzima α-ceto-ácido deshidrogenasa (Platell *y col*., 2000). También se detectaron niveles disminuidos de glutamina, principal fuente de $NH_4^+$ que reduce la acidosis celular (Hems, 1972). También se produjo un aumento de los niveles de arginina en el suero y RBCs, aminoácido antioxidante que protege a los ratones del estrés oxidativo (Dasgupta *y col*., 2006).

ix) Por último, el ácido úrico, producto de oxidación final del catabolismo de las purinas, se excreta en la orina. Por lo tanto, puede ser un biomarcador de estrés oxidativo, con un papel terapéutico potencial como antioxidante (Glantzounis *y col*., 2005). Por tanto, el aumento de los niveles de ácido úrico podría relacionarse con una respuesta protectora contra el estrés oxidativo inducido por este metal tóxico.

En resumen, este trabajo ilustra la alta fiabilidad del *workflow* toxicometabolómico basado en la MS para estudiar los efectos toxicológicos del Hg en suero y RBCs y puede ser utilizado para evaluar los efectos de otros metales tóxicos en el futuro.

**CAPÍTULO 1: Desarrollo de metodologías metalómicas y metabolómicas innovadoras en muestras biológicas basadas en la espectrometría de masas.**

Los artículos que forman parte de este apartado han sido retirados de la tesis debido a restricciones relativas a los derechos de autor. Dichos artículos han sido sustituidos por la referencia bibliográfica, enlace al texto completo (solo miembros de la UHU) y/o enlace Arias Montano, Repositorio Institucional de la Universidad de Huelva, así como resumen.

- García Sevillano, M.A., García Barrera, T., Gómez Ariza, J.L.: "Development of a new column switching method for simultaneous speciation of selenometabolites and selenoproteins in human serum. Journal of Chromatography A. Vol. 1318, págs. 171-179, (2013). DOI: 10.1016/j.chroma.2013.10.012

Enlace al texto completo del artículo (solo para miembros de la UHU):
http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.10.012

**RESUMEN:**
A method for the simultaneous speciation of selenoproteins and selenometabolites in human serum has been developed on the basis of in series three dimensional chromatography: size exclusion, affinity and anion exchange high performance liquid chromatography (3D/SE-AF-AEC-HPLC), using different columns of each type and hyphenation to inductively coupled plasma-(quadrupole) mass spectrometry (ICP-qMS). The method allows the quantitative simultaneous analysis of selenoprotein P (SeP), extracellular glutathione peroxidase (eGPx), selenoalbumin (SeAlb), selenite and selenate in human serum using species-unspecific isotope dilution (SUID). The 3D chromatographic separation is proposed to remove typical spectral interferences in this matrix from chloride and bromide on $^{77}Se$ ($^{40}Ar^{37}Cl$), $^{80}Se$ ($^{79}Br^{1}H$) and $^{82}Se$ ($^{81}Br^{1}H$). In addition, a previous method based on 2D/SE-AF-HPLC is proposed as a simple alternative when low molecular mass selenium species are absent in the samples. The method is robust, reliable and fast with typical chromatographic runtime less than 35 min. Detection limits are in the range of 0.2–1.3 ng of Se $g^{-1}$. Method accuracy for determination of total protein-bound to Se was assessed by analyzing an human serum reference material (BCR-637) certified for total Se content and method reliability checked in samples of human serum providing results in good agreement with the total selenium concentration. In addition, the application of the method to commercial human serum and plasma reference materials for quality control analysis, certified for total Se, has provided, for the first time, indicative levels of selenium containing proteins in these samples.

- García Sevillano, M.A., García Barrera, T., Gómez Ariza, J.L.: “Simultaneous speciation of selenoproteins and selenometabolites in plasma and serum by dual size exclusion-affinity chromatography with online isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry”. Analytical and Bioanalytical Chemistry. Vol. 406, n. 11, pags. 2719-2725, (2014). DOI: 10.1007/s00216-014-7629-7

Enlace al texto completo del artículo (solo para miembros de la UHU):
http://dx.doi.org/10.1007/s00216-014-7629-7

**RESUMEN:**
A method for the simultaneous speciation of selenoproteins and selenometabolites in mouse plasma has been developed based on in series two-dimensional size exclusion and affinity high-performance liquid chromatography (2D/SE-AF-HPLC), using two columns of each type, and hyphenation to inductively coupled plasma-(quadrupole) mass spectrometry (ICP-QMS). The method allows the quantitative determination of selenoprotein P (SeP), extracellular glutathione peroxidase (eGPx), selenoalbumin (SeAlb), and selenometabolites in mouse plasma using species-unspecific isotope dilution (SUID). The 2D chromatographic separation is proposed to remove typical spectral interferences in plasma from chloride and bromide on $^{77}Se$ ($^{40}Ar^{37}Cl$) and $^{82}Se$ ($^{81}Br^{1}H$). In addition, the approach increases chromatographic resolution allowing the separation of eGPx from Se metabolites of low molecular mass. The method is robust, reliable, and fast with a typical chromatographic runtime less than 20 min. Precision in terms of relative standard deviation ($n = 5$) is in the order of 4 %, and detection limits are in the range of 0.2 to 1.0 ng Se $g^{-1}$. Method accuracy for determination of total protein bound to Se was assessed by analyzing human serum reference material (BCR-637) certified for total Se content, and latterly applied to mouse plasma (*Mus musculus*). In summary, a reliable speciation method for the analysis of eGPx, selenometabolites, SeP, and SeAlb in plasma/serum samples is proposed for the first time and is applicable to the evaluation of Se status in human in clinical studies and other mammals for environmental or toxicological assessment.

- García Sevillano, M.A., García Barrera, T., Navarro, F., Gómez Ariza, J.L.: "Absolute quantification of superoxide dismutase in cytosol and mitochondria of mice hepatic cells exposed to mercury by a novel metallomic approach". Analytica Chimica Acta. Vol. 842, págs.. 42-50, (2014). DOI: 10.1016/j.aca.2014.07.014

Enlace al texto completo del artículo (solo para miembros de la UHU):
http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2014.07.014

**RESUMEN:**

In the last years, the development of new methods for analyzing accurate and precise individual metalloproteins is of increasing importance, since numerous metalloproteins are excellent biomarkers of oxidative stress and diseases. In that way, methods based on the use of post column isotopic dilution analysis (IDA) or enriched protein standards are required to obtain a sufficient degree of accuracy, precision and high limits of detection. This paper reports the identification and absolute quantification of Cu,Zn-superoxide dismutase (Cu,Zn-SOD) in cytosol and mitochondria from mice hepatic cells using a innovative column switching analytical approach. The method consisted of orthogonal chromatographic systems coupled to inductively coupling plasma-mass spectrometry equipped with a octopole reaction systems (ICP-ORS-MS) and UV detectors: size exclusion fractionation (SEC) of the cytosolic and mitochondrial extracts followed by online anion exchange chromatographic (AEC) separation of Cu/Zn containing species. After purification, Cu,Zn-SOD was identified after tryptic digestion by molecular mass spectrometry (MS). The MS/MS spectrum of a doubly charged peptide was used to obtain the sequence of the protein using the MASCOT searching engine. This optimized methodology reduces the time of analysis and avoids the use of sample preconcentration and clean-up procedures, such as cut-off centrifuged filters, solid phase extraction (SPE), precipitation procedures, off-line fractions insolates, etc. In this sense, the method is robust, reliable and fast with typical chromatographic run time less than 20 min. Precision in terms of relative standard deviation ($n$ = 5) is of 3–5% and detection limits is 0.21 ng Cu g−1.

The application of the methodology to hepatic cells from mice exposed to inorganic mercury reveals decreased levels of Cu,Zn-SOD in cytosolic and mitochondrial extracts, as a consequence of the oxidative stress caused by this toxic metal. Additionally, the quantification of mitochondrial Cu,Zn-SOD in hepatic cells from *Mus musculus* has been carried out for the first time.

- García Sevillano, M.A., García Barrera, T., Navarro, F., Montero Lobato, Z., Gómez Ariza, J.L.: "Shotgun metabolomic approach based on mass spectrometry for hepatic mitochondria of mice under arsenic exposure". Vol. 28, n. 2, págs. 341-351, (2015). DOI: 10.1007/s10534-015-9837-9

Enlace al texto completo del artículo (solo para miembros de la UHU):
http://dx.doi.org/10.1007/s10534-015-9837-9

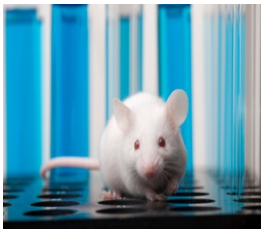
**RESUMEN:**
Mass spectrometry (MS)-based toxicometabolomics requires analytical approaches for obtaining unbiased metabolic profiles. The present work explores the general application of direct infusion MS using a high mass resolution analyzer (a hybrid systems triple quadrupole–time-of-flight) and a complementary gas chromatography–MS analysis to mitochondria extracts from mouse hepatic cells, emphasizing on mitochondria isolation from hepatic cells with a commercial kit, sample treatment after cell lysis, comprehensive metabolomic analysis and pattern recognition from metabolic profiles. Finally, the metabolomic platform was successfully checked on a case-study based on the exposure experiment of mice *Mus musculus* to inorganic arsenic during 12 days. Endogenous metabolites alterations were recognized by partial least squares-discriminant analysis. Subsequently, metabolites were identified by combining MS/MS analysis and metabolomics databases. This work reports for the first time the effects of As-exposure on hepatic mitochondria metabolic pathways based on MS, and reveals disturbances in Krebs cycle, β-oxidation pathway, amino acids degradation and perturbations in creatine levels. This non-target analysis provides extensive metabolic information from mitochondrial organelle, which could be applied to toxicology, pharmacology and clinical studies.

- García Sevillano, M.A., García Barrera, T., Navarro, F., Abril, N., Pueyo, C., López Barea, J., Gómez Ariza, J.L.: "Combination of direct infusion mass spectrometry and gas chromatography mass spectrometry for toxicometabolomic study of red blood cells and serum of mice Mus musculus after mercury exposure". Journal of Chromatography B. Vol. 985, págs. 75-84, (2015). DOI: 10.1016/j.jchromb.2015.01.029

Enlace al texto completo del artículo (solo para miembros de la UHU):
http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.01.029

**RESUMEN:**
Although mercury (Hg) is an important environmental and occupational pollutant, its toxicological effects, especially in serum and red blood cells (RBCs), have been scarcely studied. A toxicometabolomics workflow based on high resolution mass spectrometry

approaches has been applied to investigate the toxicological effects of Hg in *Mus musculus* mice after subcutaneous injection for 10 days, which produced inflammation and vacuolization, steatosis and karyolysis in the hepatic tissue. To this end, direct infusion mass spectrometry (DIMS) of polar and lipophilic extracts from serum and RBCs, using positive and negative mode of acquisition (ESI+/ESI−), and gas chromatography–mass spectrometry were used. A quantitative analysis of reversible oxidized thiols in serum proteins demonstrated a strong oxidative stress induction in the liver of Hg-exposed mice. Endogenous metabolites alterations were identified by partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA). Mercury-exposed mice show perturbations in energy metabolism, amino acid metabolism, membrane phospholipid breakdown and oxidative stress-related metabolites in serum along the exposure. This work reports for the first time the effects of Hg-exposure on RBCs metabolic pathways, and reveals disturbances in glycolysis, membrane turnover, glutathione and ascorbate metabolisms.







# CAPÍTULO 2

## CHAPTER 2

**"Combinación de metodologías –*ómicas* para el estudio de la toxicidad de arsénico, mercurio y cadmio en *Mus musculus*"**

***"A combination of –omics methodologies to study the toxicity of arsenic, mercury and cadmium in Mus musculus."***

## 5.2. CAPÍTULO 2:

**"Combinación de metodologías –*ómicas* para el estudio de la toxicidad de arsénico, mercurio y cadmio en *Mus musculus*"**

## PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

**Artículo 6:** Analysis of the biological response of mouse liver (*Mus musculus*) exposed to $As_2O_3$ based on integrated *-omics* approaches. *Metallomics*, 5 (2013) 1644-1655.

**Artículo 7:** Use of elemental and molecular mass spectrometry to assess the toxicological effects of inorganic mercury in the mouse *Mus musculus*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406 (2014) 5853-5865.

**Artículo 8:** Functional genomics and metabolomics reveal the toxicological effects of cadmium in *Mus musculus* mice. *Metabolomics*, 11 (2015) 1432-1450.

Como ya se comentó en la introducción de la presente Tesis Doctoral, los metales juegan un papel importante en el desarrollo y función de los organismos ya que el comportamiento de muchos genes, transcritos, proteínas, metaloproteínas y metabolitos depende de su interacción con los metales presentes en la célula, especialmente los metales de transición, tales Cu, Zn, Mn, Fe o Se, entre otros. Afortunadamente, las tecnologías analíticas modernas están proporcionando nuevas herramientas para investigar la toxicidad de los metales en profundidad, y comprender mejor las interacciones entre los metales y las células. La importancia de la vigilancia de los efectos de los metales pesados en los organismos vivos ha aumentado como consecuencia de los cambios naturales y las actividades antropogénicas que han llevado a un aumento de los niveles de metales tóxicos en los ecosistemas terrestres y acuáticos, entre ellos el arsénico, el cadmio y el mercurio, principalmente. En este sentido, se han utilizado organismos modelo de laboratorio para el estudio de la respuesta biológica, ya que ésta puede reflejar el impacto de los tóxicos sobre el metabolismo celular y homeostasis global utilizando diferentes biomoléculas (biomarcadores), tales como genes, transcritos, metaloproteínas, enzimas redox y metabolitos. Por todo lo anterior, en este capítulo se describe la integración de metodologías -*ómicas* para evaluar la toxicidad del arsénico, mercurio y cadmio en el ratón de laboratorio *Mus musculus*.

En el artículo 6 de la presente Tesis Doctoral, para evaluar la respuesta biológica del ratón *Mus musculus* sometido a exposición controlada de arsénico inorgánico, se ha hecho uso de la espectrometría de masas orgánica e inorgánica, utilizando el hígado como órgano de estudio. Los efectos toxicológicos de arsénico inorgánico trivalente administrado vía oral (3 mg $kg^{-1}$ de masa corporal y por día) se investigaron durante un período de 7 días utilizando metodologías metalómicas, metabolómicas y medida de actividad de enzimas REDOX. Para este

propósito, la metodología metalómica empleada se ha basado en el uso de la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) con detección de ICP-MS combinada con cromatografía de intercambio aniónico (AEC) para caracterizar la respuesta biológica de los ratones expuestos a este tóxico. Por otro lado, el enfoque metabolómico se ha basado en el uso de DIMS. Por último, el estudio se ha complementado con la evaluación de la actividad enzimática de las enzimas relacionadas con el estrés oxidativo como la superóxido dismutasa (SOD), glutatión reductasa (GR), catalasa (CAT) y peroxidasas.

El arsénico es un carcinógeno humano bien documentado que causa estrés oxidativo en animales. Se ha planteado la hipótesis de que las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden desempeñar un papel importante en la toxicidad del arsénico, debido a que el aumento de la producción de estos compuestos en presencia de arsénico, así como los daños que este elemento causa en el ADN y ARN, juegan un papel clave en la carcinogénesis (Szymańska-Chabowska *y col.*, 2009). Los seres humanos estamos expuestos principalmente al arsénico (As) del aire, los alimentos y el agua.

La toxicidad, la acumulación y la participación del arsénico en el metabolismo de los organismos dependen, en general, de la forma en la que el elemento está presente (Vahter, 1999; Hirano *y col.*, 2009), siendo las formas inorgánicas altamente tóxicas, y disminuyendo en las formas metiladas (ácido metilarsónico ($MA^V$) y ácido dimetilarsínico ($DMA^V$), que se consideran moderadamente tóxicas, habiendo incluso otras especies orgánicas como arsenobetaína (AsB), arsenocolina (AsC) y arsenoazúcares que se consideran inocuas (Geiszinger *y col.*, 2005; Fattorini *y col.*, 2004).

En los mamíferos, el arsénico inorgánico altamente tóxico se metaboliza en el hígado, después de la absorción desde el tracto gastrointestinal, para producir especies metiladas tales como $MA^{V}$ y $DMA^{V}$, que se excretan principalmente por la orina. Sin embargo, se ha demostrado recientemente que la biometilación del arsénico inorgánico no es necesariamente un proceso de desintoxicación, ya que los productos intermedios y finales formados durante este proceso pueden ser más reactivos y tóxicos que el arsénico inorgánico en sí mismo, como son las especies metiladas de arsénico trivalente $MMA^{III}$ y $DMA^{III}$ (Thomas *y col*., 2007). Además, se ha demostrado recientemente la elevada electrofilia de estas especies por los residuos que contienen tiol en las proteínas, provocando alteraciones en estas biomoléculas y por lo tanto en sus funciones biológicas (por ejemplo, inhibición de la actividad enzimática de una enzima) ~~que~~ lo que contribuye notablemente a la carcinogénesis del arsénico (Kitchin, 2001; Kitchin *y col*., 2998). Sin embargo, los mecanismos responsables de los efectos tóxicos de arsénico inorgánico todavía no están claros. Por esta razón, el uso de métodos de información masiva, *-ómicas*, podría ser una herramienta muy útil para este propósito.

El estrés oxidativo asociado a la presencia de $As_2O_3$ se estudió a través de las actividades redox en los extractos citosólicos de los ratones estudiados. Los resultados muestran una respuesta rápida de las enzimas relacionadas con el estrés oxidativo, reflejado en un aumento general de la actividad antioxidante como una respuesta defensiva a la inducción de estrés oxidativo. Esta capacidad de defensa se mantiene durante al menos 4 días y se supera después de una semana de exposición. Como moléculas protectoras de carácter antioxidante~~s~~ podemos mencionar la SOD, enzima responsable de la dismutación de los radicales superóxido altamente reactivo y potencialmente tóxico, y la glutatión reducida (GSH) que mantiene niveles adecuados

de reducción a nivel celular. Asimismo, la actividad de peroxidasas totales, un grupo de enzimas que reduce los niveles de peróxidos en la célula y por lo tanto lo protege de daño peroxidativo, se ha demostrado que presenta una activación constante, lo que representa que el daño oxidativo persiste al final de la exposición y la disminución del resto de enzimas al final del período de exposición, lo que podría estar relacionado con la inhibición parcial de dichos biomarcadores debido a la toxicidad del arsénico.

Por otro lado, la abundancia relativa de especies de arsénico en el hígado de ratones *Mus musculus* se evaluó mediante AEC-ICP-ORC-MS. Los resultados obtenidos muestran que los arsenicales metilados ($MA^V$ y $DMA^V$) son las especies predominantes en el hígado y el riñón. De manera general, la especiación de arsénico en el hígado de los ratones, después de la exposición a este elemento, muestra un aumento en las especies metiladas de forma progresiva. Sin embargo, al séptimo día de exposición se observó una disminución en los niveles de $DMA^V$, y $MA^V$ correlativamente y un ligero aumento de $iAs^{III}$. Este hecho puede estar relacionado con la saturación de la capacidad de metilación de arsénico inorgánico en el hígado, hecho que ya ha sido observado en ratones por otros autores (Vahter *y col*., 1980; Vahter, 1981).

Por último, el estudio metabolómico mostró perturbaciones en los niveles de taurina que es un metabolito con una actividad antioxidante remarcada, y además juega un papel importante en procesos celulares como la osmorregulación, estabilización de las membranas y la modulación de las funciones de señalización de calcio (Gurer *y col*., 2001; Sinha *y col*., 2008). Por otra parte, la tendencia opuesta entre la taurina y GSH durante el periodo de exposición puede estar relacionado con la producción alternativa de la taurina cuando la biosíntesis habitual de GSH a

partir de cisteína se bloquea por la presencia de arsénico. Además, se observó un aumento de los niveles de colina y su derivada fosfocolina. Como ya se indicó en el capítulo anterior, la mayoría de los fosfolípidos (PL) de las membranas celulares son glicerofosfolípidos, como las fosfatidilcolinas (PCs). Por otro lado, las lisofosfatidilcolinas (LPCs) derivan de las PCs por degradación producida por la acción enzimática de la fosfolipasa $A_2$ que elimina un AGL de la estructura de las PCs, originando LPCs. Estos metabolitos disminuyen bajo el estrés oxidativo producido por el arsénico. Los resultados obtenidos demuestran la degradación de los fosfolípidos de membrana (apoptosis celular). Además, esta hipótesis se apoya por los niveles alterados de AGLs que aumentan en hígado en presencia de arsénico. Además, se observó una disminución de los niveles de L-carnitina a lo largo del periodo de exposición. Como consecuencia del aumento progresivo de lípidos, el organismo requiere L-carnitina para el transporte de AGLs desde el citosol a las mitocondrias, con el fin de obtener energía metabólica por β-oxidación. Por otro lado, se observaron cambios en los niveles de glucosa, gliceraldehído-3-fosfato, piruvato y citrato. Este hecho puede relacionarse con alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos y con el agotamiento de la glucosa, como ya han señalado otros autores en relación a la exposición a arsénico inorgánico. La disminución de piruvato en hígado de los ratones expuestos, el cual es un producto final del ciclo de la glicolisis, también confirma este hecho. Por otro lado, en el ciclo de Krebs, la acetil-CoA transforma los átomos de carbono del grupo acetilo en ácido cítrico, el cual se oxida para producir energía. También se ha observado en hígado un aumento en las concentraciones de triacilglicéridos, y diacilglicéridos como resultado de la apoptosis inducida por el arsénico. Por último, la presencia del aminoácido arginina se alteró bajo la acción tóxica del arsénico, como consecuencia de sus propiedades antioxidantes.

En este mismo sentido, el objetivo del artículo 7 es caracterizar la respuesta bioquímica de ratones a la exposición de mercurio, haciendo uso de la espectrometría de masas orgánica e inorgánica. Se ha continuado el uso de enfoques metalómicos y metabolómicos para evaluar los efectos toxicológicos del mercurio inorgánico mediante administración de este elemento por vía subcutánea. El enfoque metalómico se basó en el uso de SEC-ICP-MS y la especiación de selenio se llevó a cabo mediante la metodología analítica desarrollada en el Capítulo 1, 2D/SEC-AF-SUID-ICP-ORS-qMS. Además, se ha empleado un enfoque metabolómico basado en el uso de DIMS para visualizar perturbaciones bioquímicas/anomalías en diversos tejidos animales y fluidos biológicos. Los resultados obtenidos se complementaron con estudios histopatológicos, para documentar los cambios macroscópicos que ocurrieron en el hígado tras la exposición controlada a este tóxico.

El enfoque metalómico empleado desveló que en los ratones expuestos a Hg durante 14 días disminuyó la intensidad de una biomolécula que contiene Cu en el hígado, que coeluye con el patrón de Cu,Zn-SOD (32 KDa), usado para la calibración de la columna. La intensidad de este pico se redujo en ~60% durante la exposición al mercurio, mientras que el pico equivalente de zinc disminuyó en ~20%. Por el contrario, la intensidad de mercurio unido a esta biomolécula (Hg-SOD) aumentó en ~30%, aunque la intensidad del pico de Hg era comparativamente de baja intensidad. Los cambios en la intensidad de los picos de Cu y Hg durante la exposición reflejan cambios en su concentración total en el hígado. En los riñones, la concentración de Cu y Zn aumentó a medida que aumenta el periodo de exposición, así como el nivel de Hg total, aunque en este caso la concentración de este elemento era unas 100 veces mayor en comparación con la del hígado. En el extracto citosólico de los riñones, se detectó un pico adicional de

aproximadamente 7 kDa que coeluye con el patrón de Cu,Zn,Cd-MTs. En especial, el pico de Cu-MTs aumentó notablemente en intensidad durante el período de exposición de 2 semanas. Una tendencia similar se observó en el pico de Hg-MT. El efecto del mercurio inorgánico en la acumulación de cobre en los riñones de ratas ha sido publicado anteriormente (Blanusa *y col.*, 1992). Estos resultados pueden racionalizarse en términos de una competencia entre Hg por las proteínas que contiene Cu, tales como SOD en el hígado que determina la redistribución de cobre entre el hígado y los riñones (Zalups, 1995), excretándose finalmente el mercurio por la orina (Zalups, 2000), posiblemente en forma de Hg-MT (Zalups *y col.*, 2000). Además, se observa una gran diferencia entre la baja intensidad del pico de Zn a 7 kDa y la correspondiente a los picos trazados por Cu y Hg que coeluyen a ese mismo tiempo de retención. Resultados que podría explicarse por las diferencias en la afinidad de unión de metales a MTs, ya que Cd, Hg o Cu, presentan mayor afinidad por esta biomolécula que Zn (Sabolic *y col.*, 2010).

Por otro lado, se observaron alteraciones en las especies de selenio de bajo peso molecular y en los niveles de selenoproteínas en el plasma de los ratones expuestos a mercurio inorgánico. El selenio es un elemento antagonista que modera los efectos tóxicos de los metales pesados, como el cadmio y el mercurio en los mamíferos (Chen *y col.*, 2006). Se ha publicado que el mercurio y el selenio interactúan en los mamíferos, y que la co-administración de los dos elementos mutuamente reduce su toxicidad (Magos *y col*., 1980). Por otro lado, se observa una disminución de los niveles de selenio en plasma cuando se administra el mercurio por vía subcutánea. Cómo ya se comentó en la introducción, en el plasma de los mamíferos el Se está presente principalmente en la estructura de cuatro biomoléculas, la SeP, la eGPx, la SeAlb y selenito libre. Además, es bien sabido que el mercurio inorgánico tiene una afinidad considerable

por los grupos tioles de las biomoléculas endógenas (Clarkson, 1997). Entre ellas la SeP que contiene varios grupos selenocisteína (SeCys) y cistina (Cys), con grupos tioles, comprobándose recientemente que esta proteína es el vehículo que suministra Se al cerebro (Burk *y col*., 2009). Por otro lado, se requieren especies de selenio de baja masa molecular (LMM) para la síntesis de SeP en el hígado, que luego son transportadas al plasma (Shiobara *y col*., 1998). Curiosamente, disminuyeron significativamente los niveles de especies de selenio de baja masa molecular en ratones después de 2 días de exposición a Hg. Estos resultados sugieren que estas especies de selenio se consumen inicialmente en el proceso de desintoxicación Hg. Al mismo tiempo, la síntesis de SeP aumenta en el hígado, lo que puede explicar la elevada concentración de esta selenoproteína 2 días después del inicio del experimento de exposición. A partir de entonces, la concentración plasmática de SeP disminuyó gradualmente hacia los niveles de pre-exposición. En general, estos resultados están de acuerdo con la formación de un complejo Hg-Se en plasma que contribuye a la desintoxicación del mercurio y que luego se pueden unir a la SeP (Gailer *y col*., 2000). Por último, y como ya se ha mencionado anteriormente, las eGPx representan una familia de enzimas antioxidantes cuya función principal es contrarrestar el efecto adverso de peróxido de hidrógeno ~~y~~ e hidroperóxidos orgánicos en los compartimentos intracelulares y extracelulares. En relación con este hecho, se ha observado una disminución de la actividad de la glutatión peroxidasa en el hígado después de que los ratones fueran sometidos a la exposición al mercurio (Agarwal *y col.,* 2010). Esta observación contrasta con los niveles ligeramente elevados de GPx observados en nuestro estudio al comienzo de la exposición.

En cuanto al enfoque metabolómico aplicado, se observó un aumento de los niveles de metabolitos que contiene colina, tales como colina y fosfocolina que puede ser racionalizado por

la degradación de las membranas celulares, al igual que en el caso de los ratones expuestos a arsénico. Estos metabolitos pueden ser considerados como productos de degradación de fosfatidilcolinas (PC), observándose además un aumento en los niveles de liso-fosfatidilcolinas (LPCs) y ácidos grasos libres que apoyan esta hipótesis. Nuestros resultados pueden racionalizarse en términos de una degradación de los fosfolípidos de membrana (apoptosis de las células) que a su vez es consistente con el daño hepático macroscópicamente observado en la histopatología. Otro cambio metabólico fue la alteración de los niveles de triacilglicéridos en respuesta a la exposición a mercurio, que como ya se mencionó en el caso de los ratones expuestos a arsénico, se asocia también con procesos de apoptosis celular. Por último, se observaron perturbaciones de las vías metabólicas relacionadas con la energía durante el experimento de exposición. Durante el período de exposición a mercurio, las concentraciones de glucosa en plasma disminuyeron gradualmente, lo que representa un efecto adverso del Hg sobre el metabolismo de los carbohidratos. Junto a la disminución de los niveles de glucosa se produce la reducción de otros compuestos intermedios del ciclo de Krebs. Además, se produce un aumento de los niveles de creatinina y creatina en plasma, que también se relaciona con la alteración del metabolismo de la energía después de la exposición al mercurio (Nankivell, 2001).

Por último, empleando este mismo enfoque metabolómico, y en este caso complementado con un enfoque genómico funcional (transcriptómico y proteómico), en el artículo 8 de la presente Tesis Doctoral se evaluó la toxicidad del cadmio (Cd) en ratones de laboratorio *Mus musculus* mediante la inyección subcutánea de este tóxico, un contaminante ambiental que se acumula en los organismos causando graves problemas de salud.

El cadmio no genera radicales libres directamente, en contraste con el As y Hg, sino que sustituye a Fe y Cu en diversas proteínas citoplasmáticas y de membrana. Por lo tanto, la acumulación de Cd en los tejidos provoca un aumento en la cantidad de iones libres o quelatos de Cu y Fe que sí participan en el estrés oxidativo por medio de reacciones Fenton (Valko *y col*., 2005). En relación con este hecho, se obtuvo un drástico aumento en los niveles de MDA hepático, como subproducto de la peroxidación lipídica en los ratones tratados con Cd. Este aumento de MDA es paralelo a la acumulación de Cd en el hígado y ambos parámetros se correlacionan positivamente (78,5%), lo que indica que, con independencia del mecanismo, el Cd provoca un intenso estrés oxidativo en el tejido hepático.

Adicionalmente, se han estudiado en el hígado de ratón las respuestas transcripcionales a la exposición Cd, centrándose en 14 genes implicados en la respuesta al estrés oxidativo, el transporte del metal, la reparación del ADN, la respuesta de choque térmico, el metabolismo de los lípidos y la respuesta inmune. El análisis en tiempo real PCR permitió evaluar con precisión los niveles de expresión basal de un conjunto seleccionado de genes en los hígados de ratones. El primer conjunto de genes codifican las principales moléculas de la red antioxidante, SOD, CAT, GPX y peroxirredoxina (PRDX), la hemo-oxigenasa 1 (HMO1), un prooxidante y potente agente proinflamatorio, la A170, homólogo de ratón de la sequestosoma humana 1 (SQSTM1) o p62. P62 / SQSTM1 / A170, son importantes reguladores de la expresión de citoquinas que controlan la respuesta inflamatoria (Kim *y col*., 2009). Los niveles de todos estos genes relacionados con antioxidantes hepáticos aumentaron a lo largo del periodo de exposición.

Por otro lado, la desintoxicación de Cd en las células hepáticas depende principalmente de la inducción de metalotioneínas (MTs), ya que al igual que en el caso del Hg, el Cd se une a los grupos tioles de las MTs. En este sentido, el Cd y el estrés oxidativo son particularmente fuertes inductores de genes MTs en el hígado, como se refleja en los niveles de transcripción de la MT1. Además, este elemento es un inmunotóxico que causa trastornos en la respuesta inmune celular (Afolabi *y col.*, 2012). En este estudio se obtuvo un aumento en la expresión de los genes que codifican las inmunoglobulinas (Igs), un aumento de los ARNm de IgG e IgM. En adición, el daño en el ADN de células de mamífero expuestas Cd no solo deriva de la inducción de las lesiones del ADN, sino también de la inactivación de varias enzimas de reparación del ADN. La AP-endonucleasa, APE1, juega un papel central en la vía de reparación por escisión de base (BER) del ADN. En este sentido, la 8-oxoguanina ADN glicosilasa 1 (OGG1) está relacionada con la reparación de 8-oxo-7,8-dihidroguanina, la lesión de bases de ADN oxidativo formada con mayor frecuencia (Hamann *y col.*, 2012). Es bien conocido que el cadmio decrece ampliamente la actividad OGG en las células y la actividad de la AP-endonucleasa a partir de extractos celulares o proteínas APE1 purificadas (Bravard *y col.*, 2010; Hamann *y col.*, 2012). En este estudio se confirmó que el Cd causa únicamente una pequeña disminución de OGG1 y APE1. Por último, aunque ha sido poco estudiado el efecto el Cd sobre el metabolismo de los lípidos en el hígado del ratón, Larregle y colaboradores (Larregle *y col.*, 2008) establecen que la exposición Cd en ratas aumenta el contenido de ácidos grasos libres (AGLs), triacilglicéridos (TGs) y colesterol total en hígado. El alto nivel de TAGs en ratas tratadas con Cd se atribuye a un aumento de la síntesis de TAGs. La presencia de los mARN de dos genes, Mogat1 (~ incrementado 8

veces) y Pla2g1B (aumentado ~100 veces), sugieren que también en el hígado de los ratones expuestos a Cd son más altos los niveles de AGLs y TGs.

En el estudio transcriptómico descrito previamente, se ha seleccionado un grupo de genes de acuerdo con el conocimiento previo de las alteraciones asociadas a la exposición a Cd. Una alternativa y enfoque potencialmente complementario para abordar este problema es el uso de una aproximación proteómica que evalúe las diferencias en los perfiles de expresión proteicos. Para este propósito, se estudiaron los extractos citosólicos de hígados de ratones *Mus musculus* sometidos a exposición controlada de cadmio inorgánico mediante el uso de 2DE-DIGE.

A pesar de que inicialmente se esperaba que la mayoría de las proteínas desreguladas por el Cd tendrían funciones antioxidantes, la mayor parte de las proteínas alteradas no presentan esta función. En este sentido la enzima 10-formiltetrahidrofolato deshidrogenasa (ALDH1L1) y la ornitina aminotransferasa (OAT) se alteraron por el tratamiento con Cd. La ALDH1L1 muy expresada en el hígado, está implicada en la apoptosis (Hoeferlin *y col*., 2013) y en la desintoxicación de los aldehídos de cadena de longitud intermedia, productos derivados de la peroxidación lipídica (Yadav *y col*., 2013). OAT, que se encuentra principalmente en el hígado, es una aminotransferasa mitocondrial dependiente de piridoxal-fosfato que participa en el metabolismo de la ornitina, que se ha demostrado que regula la apoptosis relacionada con las ROS (Lei *y col*., 2008). Ambas proteínas aumentaron en los extractos citosólicos de hígado de ratones tratados con Cd, corroborando el fuerte estrés oxidativo detectado y sugerido por los datos transcriptómicos. Otras tres proteínas alteradas fueron identificadas como proteínas de choque térmico, la chaperona Glucosa-regulada proteína 78 (GRP78), la proteína de choque

térmico 70 kDa 9 (HSPA9) y la proteína 1 asociada al receptor de factor de necrosis tumoral (TNF) (TRAP1), que tuvieron menor expresión en el hígado de los ratones tratados con Cd. Estas tres proteínas son proteínas de choque térmico citoprotectoras mitocondriales, relacionadas con la resistencia a los medicamentos y la protección de la apoptosis por amortiguar las especies reactivas de oxígeno (ROS). Por otro lado, nuestro estudio mostró que la exposición a Cd se asoció positivamente con el fibrinógeno marcador de inflamación sistémica, una glicoproteína soluble sintetizada por los hepatocitos. El aumento del contenido de fibrinógeno en la sangre se considera un indicador de un estado proinflamatorio (Dávalos *y col*., 2012). Además, las proteínas relacionadas con el metabolismo de la energía muestran grandes alteraciones metabólicas en el hígado de ratones por esta exposición a Cd. La subunidad B sintasa mitocondrial ATPasa disminuye, lo que sugiere que el suministro de ATP disminuyó en la fosforilación oxidativa durante la exposición al Cd. La fosfoglucomutasa (PGM1) que catalizan las reacciones reversibles necesarias para la glucólisis y gluconeogénesis también sufre perturbaciones, probablemente para atender a una mayor demanda energética causada por el Cd y para compensar la disminución de la fosforilación oxidativa. Finalmente, se observó una disminución en los niveles de Δ(3,5)-Δ-(2,4) -dienoil-CoA isomerasa (ECH), una enzima auxiliar en la β-oxidación de ácidos grasos insaturados que podría estar relacionada con una desregulación del metabolismo de los lípidos.

Para una mejor comprensión de los trastornos metabólicos causados por la exposición a Cd, los estudios transcriptómicos y proteómicos previamente comentados, fueron complementados con estudios metabolómicos basados en el uso de las técnicas de DIMS y GC-MS. Los resultados metabolómicos obtenidos muestran una desregulación metabólica inducida

por Cd, especialmente en el metabolismo de lípidos y la glucosa. En los ratones expuestos a Cd aumentan los niveles de triacilglicéridos (TGs), diglicéridos (DGs), ácidos grasos libres (AGLs) y liso-fosfatidilcolinas (LPCs), así como los de colina, fosfocolina, creatinina, glutamina y ácido láctico. En contraste, la exposición a cadmio provocó una disminución en los niveles de glucosa, taurina, glutamato, fenilalanina, creatina, citrato y fosfatidilcolinas (PCs) en el plasma e hígado. Mediante GC-MS se evaluó la disminución en el contenido de glucosa, isoleucina, glutamato, α-cetoglutarato, fenilalanina, isocitrato y el citrato y el aumento de los niveles de ácido láctico, glutamina y de colesterol. En general, los cambios metabólicos observados durante la exposición Cd pueden estar relacionados con perturbaciones en diferentes vías metabólicas, como sigue:

- Metabolismo de los carbohidratos. Los niveles de compuestos intermedios del metabolismo energético, incluyendo los niveles de glucosa y los componentes del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), citrato, isocitrato y α-cetoglutarato, se reducen. El ciclo TCA es una ruta principal para el metabolismo de carbohidratos, lípidos y aminoácidos. Además de ser responsable de la producción de ATP, el ciclo TCA también proporciona precursores para la biosíntesis de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Desideri *y col*., 2014). El mecanismo que puede explicar los niveles más bajos de algunos componentes del ciclo TCA es la oxidación por Cd de aconitasa, isocitrato deshidrogenasa (IDH) y α-cetoglutarato deshidrogenasa (α-KGDH) (Kil *y col*., 2006; Tretter *y col*., 2005) que afecta a la conversión de citrato en succinil-CoA; en realidad estas enzimas son muy sensibles al estrés oxidativo. Mientras que la acetil-CoA es esencial para mantener la síntesis de *novo* de AGLs, el oxalacetato puede

alimentar el ciclo de Krebs si hay cantidades de glutamato disponible y alimenta el ciclo a través de α-KG (Tretter *y col.*, 2005). De esta forma, la generación de NAD(P)H en el ciclo de Krebs se mantiene constante a pesar de estar la aconitasa bloqueada, este hecho podría explicar los bajos niveles de citrato y glutamato. El aumento de la glucólisis proporciona ventajas mediante la desviación de la glucosa para generar NADPH y acetil-CoA y activa los factores implicados en la biosíntesis de ácidos grasos (Tong *y col.*, 2011). En virtud de este cambio metabólico, la mayoría del piruvato generado a partir de la glucosa (>90%), se convierte en lactato por la lactato deshidrogenasa, para recuperar el $NAD^+$ necesario para mantener la glucólisis, producir ATP y asegurar la supervivencia celular (Desideri *y col.*, 2014). Otras dos evidencias del estudio proteómico apoyan, en primer lugar, la regulación de PGM1 para asegurar el suministro de glucosa a la vía glucolítica, en segundo lugar, la baja regulación de la chaperona mitocondrial TRAP1 que se une e inhibe la succinato deshidrogenasa, aliviando la inhibición de la respiración mitocondrial y promoviendo la oxidación de AGL, intermediarios del ciclo TCA, ATP y mejorar la supervivencia celular. Gran cantidad de evidencias apuntan hacia este cambio metabólico particularmente importante para las células altamente proliferativas, como las células tumorales, que requieren un suministro continuo de estos precursores para la síntesis de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Desideri *y col.*, 2014).

- Metabolismo lipídico. La reprogramación del metabolismo de los lípidos, en particular, la síntesis de ácidos grasos, es una característica importante subyacente a la toxicidad del Cd. Junto con los cambios en la glucólisis y el ciclo del TCA se incrementa la expresión de genes que codifican enzimas claves en la biosíntesis de AG y del colesterol. Los resultados obtenidos muestran un aumento significativo de AGLs, TGs y DGs, lo que indica que el aumento de los niveles de mRNA de Mogat1 (~ 8 veces) y Pla2g1B (~100 veces) comentado previamente. Además, al igual que en los estudios de exposición a As y Hg, los lípidos de membrana son particularmente sensibles a los radicales libres debido a la presencia de ácidos grasos poliinsaturados, que sufren peroxidación lipídica. El aumento de los niveles de colina y fosfocolina detectado en el hígado y plasma puede estar asociado con la rotura de las membranas celulares inducida por el Cd, a través de la peroxidación, debido al aumento del estrés oxidativo. El Cd disminuye los niveles de PCs, lo que probablemente se produce mediante el aumento de los niveles de PLA2G1B para liberar AGLs y LPCs de PCs (Ridgway, 2013).

- Metabolismo de los aminoácidos. Las alteraciones de los niveles de glucosa y de aminoácidos parecen ser una respuesta común a muchas toxinas en varias especies, como el As y Hg, previamente comentado. La glutamina es el más abundante aminoácido de origen natural en el cuerpo cuyo metabolismo se acelera durante cambios en los niveles de glucosa para proporcionar sustratos para la lipogénesis y la biosíntesis de ácidos nucleicos que son críticos para la

proliferación celular (Dakubo, 2010). El aumento acelerado del metabolismo de la glutamina impone un aumento de la ingesta de glutamina que se utiliza principalmente para generar lactato y alanina (Dakubo, 2010). Otros metabolitos que aumentan bajo la exposición a Cd son los aminoácidos aspartato, valina, glicina y serina. Por el contrario, los niveles de los aminoácidos isoleucina y fenilalanina, decrecen en el hígado/plasma de los ratones expuestos a Cd. Dos pequeños metabolitos, la taurina y la creatina, también disminuyen en hígado/plasma de los ratones bajo la acción del Cd. La taurina (ácido 2-aminoetanosulfónico), un derivado de la cisteína, es un aminoácido con un papel antioxidante importante (Maná *y col.*, 2009), que podría estar relacionado con el estrés oxidativo promovido por la exposición Cd. Por otro lado, la síntesis de creatina requiere de tres aminoácidos: glicina, metionina y arginina. Los niveles menores de creatina en el hígado de ratones expuestos a Cd pueden producirse por la transmetilación causada por el aumento de los niveles de colina. Por otra parte, la carnitina se degrada fácilmente en creatinina, la elevación de las concentraciones de creatinina en plasma podría indicar daño renal.

En resumen, la evaluación de la toxicidad de metales en ratones requiere herramientas multidisciplinares para integrar muchas vías metabólicas y las respuestas biológicas. De esta manera, se demuestra en este capítulo que las tecnologías *–ómicas* son muy valiosas para lograr la información masiva sobre las diferentes biomoléculas en células y organismos alterados bajo los efectos de los metales tóxicos.

**CAPÍTULO 2: Combinación de metodologías –ómicas para el estudio de la toxicidad de arsénico, mercurio y cadmio en Mus musculus**

Los artículos que forman parte de este apartado han sido retirados de la tesis debido a restricciones relativas a los derechos de autor. Dichos artículos han sido sustituidos por la referencia bibliográfica, enlace al texto completo (solo miembros de la UHU) y/o enlace Arias Montano, Repositorio Institucional de la Universidad de Huelva, así como resumen.

- García Sevillano, M.A., García Barrera, T., Navarro, F., Gómez Ariza, J.L.: "Analysis of the biological response of mouse liver (*Mus musculus*) exposed to As2O3 based on integrated *-omics* approaches". Metallomics. Nº 5, págs. 1644-1655, (2013). DOI: 10.1039/C3MT00186E

Enlace al texto completo del artículo:
http://dx.doi.org/10.1039/C3MT00186E

**RESUMEN:**
Organic and inorganic mass spectrometries were used to investigate the biochemical response of mice (*Mus musculus*) to inorganic arsenic exposure using liver as the target organ. The toxicological effects of trivalent inorganic arsenic after oral administration (3 mg $kg^{-1}$ body weight and per day) were investigated over a period of 7 days using metallomics, metabonomics and redox proteomics approaches. Size-exclusion chromatography (SEC) with ICP-MS detection was combined with anion exchange chromatography (AEC) to characterize the biological response of the exposed mice. On the other hand, direct infusion mass spectrometry (DI-ESI-QTOF-MS) of polar and lipophilic extracts using positive and negative modes of acquisition (ESI+/ESI−) provided information about time-dependent changes in endogenous metabolites identified by Partial Least Square-Discriminant Analysis (PLS-DA). Finally, the study has been complemented with the evaluation of up/down-regulation of enzymes related to oxidative stress such as superoxide dismutase (SOD), glutathione reductase (GR), catalase (CAT) and peroxidases in connection with metal toxicity issues. The results show that the inorganic arsenic methylation in the liver may reach the saturation point upon chronic exposure to the element. On the other hand, SEC-ICP-MS coupling provided information about metal containing-proteins and metabolites related to arsenic exposure (metallomics) which has been correlated with the changes in the global metabolism (metabonomics), also considering their consequences on the redox status of protein and protein expression (redox proteomics). Our study shows that arsenic causes biochemical pathway alterations, such as energy metabolism (*e.g.* glycolysis, Krebs cycle), amino acid metabolism, choline metabolism and degradation of membrane phospholipids (apoptosis). This work illustrates the high reliability of the integrated use of organic mass spectrometry for the metabonomic study of biochemical effects induced by $As_2O_3$, with inorganic mass spectrometry for metallomic and speciation assessment of arsenic biomethylation in the liver of exposed mice, and redox proteomics to evaluate inhibition of enzymatic activity in different proteins such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione

reductase (GR) caused by this element. In conclusion, the integration of metallomics, metabolomics and redox proteomics results provides a more comprehensive evaluation about the biological response in experiments dealing with exposure to toxic metals.

- García Sevillano, M.A., García Barrera, T., Navarro, F., Gailer, J., Gómez Ariza, J.L.: "Use of elemental and molecular-mass spectrometry to assess the toxicological effects of inorganic mercury in the mouse *Mus musculus*". Analytical and Bioanalytical Chemistry. Vol. 406, n. 24, págs. 5853-5865, (2014). DOI: 10.1007/s00216-014-8010-6

Enlace al texto completo del artículo (solo para miembros de la UHU):
http://dx.doi.org/10.1007/s00216-014-8010-6

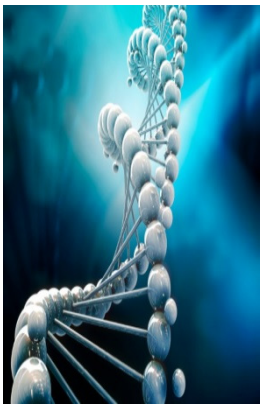
**RESUMEN:**
The biochemical response of mice (*Mus musculus*) to acute subcutaneous inorganic-mercury exposure was assessed over a 14-day period by analyzing cytosolic extracts of the liver, the kidneys, and blood plasma. Integrated metallomic and metabolomic approaches using elemental and molecular-mass spectrometry were used to obtain comprehensive insight into the toxicological effects of mercury regarding its distribution and possible perturbation of metabolic pathways. The metallomic approach involved the use of size-exclusion chromatography (SEC) coupled with multiaffinity chromatography inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) and isotopic-dilution analysis. The metabolomic approach involved the direct infusion of polar and lipophilic tissue extracts into a mass spectrometer (DIMS) in the positive and negative acquisition mode (ESI+and ESI−). The use of SEC–ICP-MS enabled us to detect changes in the metalloproteome in the liver and the kidneys during the exposure period, and revealed that interactions between Hg and endogenous Cu and Zn adversely affected the homeostasis of these essential metals. The detection of an Hg–Se detoxification product in mouse plasma substantiated the known interaction between Hg and Se in mammals. Use of DIMS in conjunction with partial-least-squares discriminant analysis (PLS-DA) uncovered time-dependent changes of endogenous metabolites over time, corroborated by histopathology investigation of specific mouse tissues. The perturbations of endogenous metabolic profiles were explained in terms of the adverse effect of mercury on energy metabolism (e.g. glycolysis, Krebs cycle), the degradation of membrane phospholipids (apoptosis), and increased levels of specific lipids in plasma. In summary, use of an SEC–ICP-MS-based metallomics approach in conjunction with molecular-mass-spectrometry-based metabolomics is revealed as a promising strategy to more comprehensively investigate the toxicological effects of harmful environmental pollutants and xenobiotics.

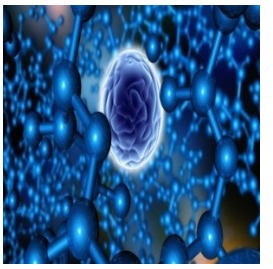
- García Sevillano, M.A., Abril, N., Fernández Cisnal, R., García Barrera, T., Pueyo, C., López Barea, J., Gómez Ariza, J.L.: "Functional genomics and metabolomics reveal the toxicological effects of cadmium in *Mus musculus* mice". Metabolomics. Vol. 11, n. 5, págs. 1432-1450, (2015). DOI: 10.1007/s11306-015-0801-z

Enlace al texto completo del artículo (solo para miembros de la UHU):
http://dx.doi.org/10.1007/s11306-015-0801-z

**RESUMEN:**

Cadmium (Cd) is an environmental pollutant that accumulates in the organisms causing serious health problems. Over the past decades, *omics* studies have been conducted trying to elucidate changes in the genome, the transcriptome or the proteome after Cd exposure. Metabolomics is relatively new to the *omics* revolution, but has shown enormous potential for investigating biological systems or their perturbations. When metabolomic data are interpreted in combination with genomic, transcriptomic and proteomic results, in the so-called systems biology approach, a holistic knowledge of the organism/process under investigation can be achieved. In this work, transcriptional and proteomic analysis (functional genomics) were combined with metabolomic workflow to evaluate the biological responses caused in *Mus musculus* mice by Cd (subcutaneous injection for 10 consecutive days). Animals showed high Cd levels in liver and plasma, drastic lipid peroxidation in liver, increased transcription of hepatic genes involved in oxidative stress, metal transport, immune response and lipid metabolism and moderate decreases of DNA repair genes mRNAs. 2DE-DIGE proteomics confirmed changes of hepatic proteins related to stress and immune responses, or involved in energy metabolism, suggesting a metabolic switch in the liver from oxidative phosphorylation to aerobic glycolysis, that was confirmed by metabolomics analysis, via DIMS and GC–MS. This metabolic alteration is particularly important for highly proliferating cells, like tumor cells, which requires a continuous supply of precursors for the synthesis of lipids, proteins and nucleic acids. The metabolic changes observed in mouse liver by metabolomics and the oxidative stress detected via functional genomics could be in the base of Cd hepatocarcinogenicity.








# CAPÍTULO 3

## CHAPTER 3

**"Estudios de interacciones entre elementos mediante el uso de tecnologías -*ómicas*"**

***"Elements interactions studies based on the use of omics technologies"***

## 5.3. CAPÍTULO 3:

**"Estudios de interacciones entre elementos mediante el uso de tecnologías *-ómicas*"**

## PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

**Artículo 9:** Cadmium toxicity in *Mus musculus* mice based on a metallomic study. Antagonistic interaction between Se and Cd in the bloodstream. *Metallomics*, 681 (2014) 672-681.

**Artículo 10:** A combination of metallomics and metabolomics studies to evaluate the effects of metal interactions in mammals. Application to *Mus musculus* mice under arsenic/cadmium exposure. Journal of Proteomics, 104 (2014) 66-79.

**Artículo 11:** Biological interactions between mercury and selenium in distribution and detoxification processes in mice under controlled exposure. Effects on selenoproteins. *Chemico-Biological Interactions*, 229 (2015) 82-90.

El hecho de que los seres vivos están expuestos a un medio ambiente complejo en el que coexisten numerosos elementos químicos y sus especies pueden estar presentes e interaccionan entre sí, hace difícil su estudio el cual precisa el desarrollo de nuevos métodos analíticos de especiación simultánea. En resumen, el metabolismo de los elementos traza no debe considerarse de forma aislada ya que existe una cantidad significativa de información sobre la respuesta biológica e implicaciones toxicológicas de los elementos que es necesario descifrar. Asimismo, es necesario desarrollar y optimizar métodos analíticos adecuados para la especiación química de estos sistemas biológicos ya que la mayoría de los métodos de especiación han sido desarrollados para el análisis de especies de un sólo elemento, sin considerar que determinadas especies químicas de diferentes elementos pueden interaccionar entre sí de forma antagónica o sinérgica, a través de mecanismos de cooperación o disponibilidad (Hill *y col*., 1970; García-Barrera *y col*., 2012).

Por otro lado, los sistemas biológicos son dinámicos, por lo que es necesario estudiar el tráfico de especies de elementos entre los órganos, tejidos o compartimentos celulares con el fin de descifrar los procesos bioquímicos de las interacciones en las que están involucrados (García-Barrera *y col.*, 2012). Aunque la aplicación de la espectrometría de masas inorgánica en combinación con espectrometría de masa orgánica puede dar una información muy completa sobre los procesos que se producen, como se ha visto en el capítulo anterior, se requieren nuevas estrategias analíticas para entender realmente el papel de las especies de los elementos en los sistemas biológicos y los mecanismos de sus interacciones. En este capítulo, se analizan las interacciones de los elementos más estudiados en este contexto (Cd/Se, As/Cd y Hg/Se).

Como se ha comentado en la introducción, el cadmio es un contaminante del medio ambiente altamente tóxico, que se acumula en los organismos. Varios estudios han mostrado el potencial carcinogénico del Cd en humanos y animales modelo, entre ellos el ratón *Mus musculus*. Recientemente, la exposición a Cd se ha asociado con varios efectos negativos sobre el sistema endocrino. Por otra parte, es bien sabido que el selenio (Se) presenta numerosas interacciones antagónicas con el cadmio, tales como la prevención del estrés oxidativo, y la protección contra la nefrotoxicidad y hepatotoxicidad inducida por este elemento tóxico. En el artículo 9 de la presente Tesis Doctoral se ha hecho uso de un enfoque metalómico basado en SEC-ICP-MS y de una separación cromatografía multidimensional basado en SEC acoplada a cromatografía de afinidad 2D-SEC-AF-ICP-ORS-MS para lograr una mejor comprensión de la función, los procesos de desintoxicación y la regulación de los metales en ratones (*Mus musculus*) bajo exposición controlada tanto a Cd, como a la mezcla de Cd más $^{77}Se$ (enriquecido isotópicamente) simultáneamente. Además, se aplicó la técnica de deconvolución de isótopos (IPD) para estudiar el destino de la especie $^{77}SeO_3^{2-}$ en ratones sometidos a la exposición al cadmio y su efecto en la biosíntesis de selenoproteínas. Por otra parte, la afinidad de Cd respecto a la SeP en el plasma de los ratones fue corroborada mediante AEC, tras una primera separación cromatográfica basada en AF, identificándose la identidad de la especie formada por espectrometría de masas orgánicas para confirmar su identidad.

Para comprobar la presencia de interacciones potenciales de metal-biomoléculas en los órganos de *Mus musculus* expuestos a Cd se utilizó el acoplamiento SEC-ICP-MS, sobre la base de que la exposición a Cd causa el cambio en la distribución de Zn y Cu endógeno en tejidos y fluidos biológicos, por el papel protector de ambos elementos frente a la toxicidad del Cd, por su

papel inductor en la producción de MTs (Jara-Biedma *y col*., 2013). En este sentido, los resultados obtenidos muestran que la ingesta de Cd provoca aumento de la intensidad de los picos trazados por el Cu en el plasma a aproximadamente 67 kDa, que puede estar relacionado con dos proteínas de transporte de cobre importantes en el torrente sanguíneo, tales como la albúmina de suero bovino (BSA) y transferrina (Tf) con 67 kDa y 79kDa, respectivamente (Meiling *y col*., 2007; Bogdan *y col*., 1994). Por otro lado, la intensidad de los picos trazados por Cd y Zn en la fracción de MTs en el hígado, aumentan constantemente con la exposición a Cd. La inducción de MTs se acompaña de un pequeño aumento de la intensidad de Zn asociado con la fracción de MTs. El mismo efecto se observó para Zn asociado con las fracciones de proteína de alto peso molecular. Además, se observa una mayor intensidad de los perfiles trazados por el Cd asociados a MT en el riñón en comparación con el hígado y el plasma, lo que confirma el hecho del papel de la orina como principal vía de excreción de Cd-MTs (Suzuki *y col*., 1981). Por último, se pudo observar el aumento en la presencia de Cu en los extractos citosólicos de riñón en los ratones expuestos a Cd a aproximadamente 7 kDa que está en contraste con la ausencia del pico equivalente para Zn. Posiblemente, la diferencia en la afinidad de unión de MTs para iones metálicos puede contribuir a este resultado, ya Cd, Hg o Cu pueden desplazar al Zn en estos macrocomplejos metálicos.

Además, se ha aplicado la cromatografía multidimensional 2D-SEC-AF-ICP-MS para lograr una mejor comprensión de la función de la SeP en los procesos de desintoxicación y la regulación de Cd en los ratones (*Mus musculus*) sometido a ensayos de exposición a este elemento. Utilizando el sistema SEC-ICP-MS se observó una acumulación de Cd en el plasma a lo largo del tiempo de exposición en la fracción de 55 kDa que está relacionada con la

selenoprotein P debido a su alta afinidad por Cd (Sasakura *y col*., 1998). Para confirmar esta asociación del Cd a la SeP, la fracción que contenía la SeP fue aislada, eliminada las sales y liofilizada, seguidamente purificada mediante una segunda dimensión cromatográfica basada en AEC-ICP-MS. En el cromatograma proporcionado por esta segunda dimensión cromatográfica se pudo observar un pico predominante trazado por $^{77}$Se exógeno (administrado por vía oral) y Cd, que se aisló con una columna de AEC e escala analítica, se liofilizó, y fue sometido a digestión tríptica para su identificación por nESI-QqQ-TOF/MS, que confirmó que se trataba de la SeP la proteína asociada al Cd, lo que demuestra el importante papel de la SeP en el tráfico de Cd en mamíferos. Además, se precisa de la presencia de metabolitos de Se y SeAlb para la síntesis de SeP en el hígado, que posteriormente se transportan al plasma, como ya ha sido mencionado en el capítulo anterior. En este sentido, se observa una disminución de los niveles de metabolitos de selenio tras la administración de Cd, así como una pequeña reducción de los niveles SeAlb a lo largo de la exposición, que apoyan esta hipótesis. Por último, se observó un aumento en los niveles de eGPx (enzima antioxidante que reduce la presencia de hidroperóxidos de lípidos en plasma) que puede estar relacionado con el transporte de esta enzima del hígado al plasma para neutralizar la peroxidación lipídica.

Por otro lado, IPD se aplicó a las muestras de sangre de los ratones expuestos simultáneamente a Cd y $^{77}$Se para obtener una visualización más profunda del mecanismo de las interacciones *in vivo* entre Cd y Se en el torrente sanguíneo. Para este propósito, se administró por vía oral $^{77}$Se para evaluar el comportamiento del selenio con abundancia isotópica natural (endógeno) y el enriquecido en el isótopo 77 (exógeno), y comprobar el efecto de este elemento en la biosíntesis de las selenoproteínas plasmógenas. En este caso, los resultados muestran el

aumento de Se exógeno en el torrente sanguíneo cuando se suministra simultáneamente junto con Cd a los ratones, siendo este efecto el más pronunciado para dosis más altas de selenio. Además, la concentración de cadmio en el torrente sanguíneo disminuye cuando se administran mayores niveles de Se enriquecido. Adicionalmente, cuando se aplica el acoplamiento SEC-AF-IPD-ICP-ORS-qMS a suero de ratones expuestos, se observa un aumento en la concentración de $^{77}$SeP, lo que confirma las observaciones publicadas por otros autores mediante experimentos similares. En resumen, los resultados confirman que la SeP juega un papel fundamental en la desintoxicación de Cd. Correlativamente, se obtiene una disminución en la concentración de $^{80}$SeP endógena, especialmente cuando el Cd se ingiere de forma simultánea, ya que $^{80}$SeP endógena se consume en la interacción con Cd.

Este artículo ilustra la alta fiabilidad del uso integrado de la espectrometría de masas inorgánica y orgánica para obtener una buena aproximación metalómica, constituyendo una buena alternativa para el estudio de la interacción entre los elementos en los organismos expuestos, el tráfico de metales y la homeostasis.

Con el mismo fin, el artículo 10 de la presente memoria se basó en la combinación de técnicas metalómicas y metabolómicas para el estudio de las interacciones entre el As y el Cd, metales tóxicos de importancia ambiental con efectos nocivos sobre el hombre. Además, este estudió se complementó con la medición de varios parámetros bioquímicos en sangre y una evaluación histopatológica en *Mus musculus* bajo la exposición a ambos xenobióticos. De nuevo, se hizo uso del acoplamiento 2D/SEC-AF-SUID-ICP-MS para caracterizar los efectos biológicos de la pareja As/Cd en las especies de selenio del torrente sanguíneo. Por otro lado, tanto el uso

de la DIMS como GC-MS proporcionan información sobre los cambios en los metabolitos producidos por las interacciones entre ambos metales.

Estos experimentos reflejan mejor lo que sucede en los episodios de contaminación del medio ambiente, en los que la presencia simultánea de varios xenobióticos es frecuente. También es conveniente para llevar a cabo estos estudios toxicológicos el análisis de varios órganos, ya que permite una interpretación más amplia de los procesos metabólicos que subyacen en el mecanismo de defensa contra sustancias tóxicas, este es el caso del hígado, riñón y plasma considerados en el presente estudio.

La exposición de ratones *Mus musculus* a As, Cd y As+Cd a lo largo de 12 días confirma la aparición de importantes interacciones entre estos elementos que reducen la presencia de As en plasma cuando se administra simultáneamente junto con Cd. El arsénico se metaboliza en el hígado formando especies metiladas para ser excretado en la orina y este proceso se ve reforzada por la presencia de Cd, por esta razón la presencia de As en el riñón es claramente más alta. La metilación de As en inducida por la presencia hepática de Cd, que se confirma por el marcado aumento de la intensidad del pico trazado por el arsénico en la fracción de SEC de baja masa molecular (<300 Da). Otra interacción de As/Cd se confirma también por la intensidad de pico de Cd a 7 kDa, asociado a Cd-MT como forma de excreción, que es mayor en el caso de la exposición Cd pero disminuye claramente cuando As/Cd son ingeridos simultáneamente.

Por otro lado, la sangre es el fluido biológico de mayor importancia para el transporte de biomoléculas entre hígado y el riñón. En este sentido, la participación de proteínas portadoras que contribuyen a la desintoxicación de As y Cd, especialmente selenoprotein P (SeP) y

selenoalbumin (SeAlb) juegan un papel fundamental. Este hecho explica la disminución de los niveles de la SeP en el plasma de ratones bajo la exposición a Cd. Sin embargo, esta reducción de la concentración de SeP es compensada bajo exposición a As/Cd. Además, glutatión peroxidasa extracelular (eGPx), una enzima antioxidante que reduce la presencia de hidroperóxidos de lípidos en el plasma, aumenta con la exposición a Cd, pero especialmente cuando As/Cd son ingeridos simultáneamente debido a la neutralización de la peroxidación lipídica causada por las mezclas de ambos xenobióticos.

En este artículo, estos resultados basados en enfoques metalómicos se combinaron con estrategias metabolómicas para obtener una evaluación más integral de los efectos perjudiciales de estos elementos tóxicos. En este sentido, tanto el As como el Cd desencadenan la inhibición de la ciclo TCA, pero este efecto se suaviza cuando ambos tóxicos son ingeridos simultáneamente, no observándose cambios significativos en las concentraciones de lactato. Por otro lado, la ingesta simultánea de As/Cd causa la degradación de fosfolípidos, tales como fosfatidilcolina, inducida por la fosfolipasa $A_2$, y el aumento correlativo de LPCs, glicerol-fosfocolina, y finalmente fosfocolina y colina. Además, los AGLs liberados de PCs también aumentan de forma más pronunciada en presencia de los dos metales. Estos procesos conducen a la degradación de las membranas celulares y la apoptosis que también está relacionado con el mayor aumento de los niveles de TGs y DGs observados tras la ingesta simultánea de ambos xenobióticos.

Por último, el efecto de la exposición conjunta e individual de As/Cd en el hígado de los ratones expuestos desde el punto de vista histopatológico es otro punto valioso al profundo

conocimiento de las consecuencias de estos elementos en mamíferos expuestos. En el presente estudio, el estudio de la sangre muestra la aparición de un proceso cirrótico inducido por Cd, que se agrava con la exposición conjunta de As/Cd. Un hígado cirrótico conduce a un aumento de las transaminasas (alanina transferasa y aspartato transferasa) que lesionan los hepatocitos. Por otra parte, la toxicidad que se origina provoca la reducción de la bilirrubina y albúmina, ya que hay menos capacidad para metabolizar la heme hepática y sintetizar albúmina. El efecto simultáneo de As/Cd produce lesiones más graves en el hígado, debido a la aparición adicional de hemorragia acompañada de cirrosis grave, y la condensación irreversible de la cromatina en el núcleo de las células (picnosis) sometidas a necrosis o apoptosis. El incremento de la ferritina refleja procesos inflamatorios, ya que la ferritina es una proteína reactante cuya presencia de incrementa en todos procesos de hinchazón hepatocelular. Este proceso es más marcado en el grupo de ratones expuestos a As/Cd, lo que sugiere que la co-administración de As y Cd da lugar a un daño hepático más pronunciado que la exposición a cada uno de los elementos por separado. Es bien sabido que las perturbaciones en los niveles de LPCs están asociados a esta patología (Puri *y col.*, 2009). La administración de As y Cd, juntos o por separado, da lugar a una lesión hepática diferencial, que se manifiesta por la aparición de esteatosis (enfermedad no alcohólica del hígado graso, NAFLD) y la infiltración de células de la sangre en el espacio de Disse. Por tanto, la aplicación complementaria de estudios bioquímicos e histopatológicos con enfoques metalómicos y metabolómicos constituye una aproximación experimental valiosa para obtener información general y conclusiones en relación a estudios toxicológicos.

El último artículo de este capítulo, artículo 11, considera el estudio de las Interacciones antagónicas entre mercurio (Hg) y selenio (Se) en ratón (*Mus musculus*). Como ya se comentó

en la introducción de la presente Tesis Doctoral, el Se presenta un efecto beneficioso contra la toxicidad del Hg que implica a una gran variedad de procesos bioquímicos y toxicológicos que no han sido esclarecidos completamente. Para este propósito, se ha utilizado un enfoque metalómico basado en el uso de SEC-ICP-MS, que se complementa con la especiación de selenoproteínas y especies de selenio de baja masa molecular en el suero y extractos citosólicos de hígado, utilizando un enfoque multidimensional basado en el acoplamiento múltiple 2D/SEC-AF-SUID-ICP-ORS-MS. Los resultados muestran interacciones entre Hg y Se en los órganos estudiados y en suero, lo que puede relacionarse con procesos de acumulación y desintoxicación, además de efectos antagónicos del mercurio en las selenoproteínas en extractos citosólicos hepáticos y el torrente sanguíneo cuando ambos elementos se administran al mismo tiempo.

Se observó un cambio significativo en los niveles de mercurio en los órganos y suero de los ratones examinados tras administrar este metal sólo o simultáneamente con selenio. Algunos autores han comprobado la reducción en la acumulación de Hg en el riñón en presencia de Se, y correlativamente el aumento de la presencia de Hg en otros órganos con importante actividad metabólica, especialmente en hígado y suero (Su *y col.*, 2008; Cuvin-Aralar *y col*., 1991). En el artículo 7 de la presente Tesis Doctoral, se comprueba que la administración de Hg produce una distribución no uniforme de este elemento tras la absorción, acumulándose principalmente en el riñón del ratón, usando condiciones experimentales similares a los trabajos anteriormente citados. En este sentido, los resultados obtenidos en este estudio muestran que la acumulación de Hg en el hígado y el suero de ratones expuestos a este elemento junto con Se sigue siendo alta. Posiblemente, el Se minimiza la acción tóxica del Hg mediante una mejora de la capacidad antioxidante de los organismos y el aumento de contenido de antioxidantes, como se ha

comprobado en ratas (Su *y col*., 2008). Asimismo, la acción beneficiosa de Se se puede atribuir a la formación de complejos no tóxicos Se-Hg que puede considerarse como un proceso que previene la toxicidad del Hg (Gailer *y col*., 2000).

Por otro lado, la concentración de Se en el hígado, los riñones y el suero de los ratones expuestos exclusivamente a Hg se incrementó, aproximadamente, en un 75% y 11%, respectivamente. Sin embargo se redujo alrededor del 12% en el suero en comparación con el grupo control. La distribución de Se es significativamente diferente entre los grupos de Hg+Bajo-Se y Hg+Alto-Se, obteniéndose un aumento de la concentración de Se en el hígado, el riñón y el suero, cuando la ingesta de este elemento aumenta.

Además, es bien conocido que la administración de Hg provoca perturbaciones en la distribución de Cu y Zn, como ya se ha mencionado anteriormente. En este experimento, la acumulación de Cu en los riñones y en el suero de los ratones expuestos al Hg se perturba en torno al 101% y -7%, respectivamente, en comparación con el grupo control. Los cambios en la distribución de los metales también se observa en los ratones simultáneamente expuestos a Hg y Se. Es notable la reducción de Cu en el hígado de los ratones expuestos al Hg (aproximadamente un 12%) cuando se administran altas concentraciones Se de forma simultánea (0,50 mg / kg de peso corporal / día de selenito). Alternativamente, cuando se evalúa la presencia de Zn en los diferentes órganos (hígado y riñón) y el suero, las concentraciones de Zn se perturban en torno al 6%, 32% y 32%, respectivamente, en comparación con el grupo control.

Con el fin de profundizar más en el estudio de las interacciones antagonistas entre el Hg y el Se, los extractos citosólicos de los diferentes órganos estudiados y el suero se analizaron por

SEC-ICP-MS. Los resultados más interesantes se observaron en relación a Cu, Zn y Hg. En el hígado, la exposición a Hg y Se durante 10 días incrementó la intensidad de tres picos trazados por los isótopos de este elemento, que refleja la unión de Hg a las proteínas de alto peso molecular (HMM), debido a la alta afinidad de mercurio a los grupos tioles de estas macromoléculas y su afinidad por algunos metabolitos endógenos incluyendo glutatión (GSH) o cisteína (Cys) (Clarkson *y col*., 2006). En este sentido, las proteínas con mayor masa molecular por lo general contienen más residuos Cys que las proteínas con una masa molecular inferior (LMM). La mayor concentración de mercurio en el hígado del ratón tras la ingesta simultánea de ambos elementos, puede explicar la presencia de este pico. Un segundo pico de Hg se eluye con un tiempo de retención análogo al patrón de calibración de la BSA, cuya intensidad de Hg disminuye cuando la dosis de Se aumenta, exhibiendo un máximo cuando el Hg se administra solo. En relación a esto, es bien sabido que el Hg forma complejos estables con la albúmina en suero humano (Fakayode *y col*., 2006). Además, el alto carácter electrofílico de $Hg^{2+}$ favorece la afinidad a los grupos Cys o SeCys en diferentes proteínas/metaloproteínas, como las selenoproteínas con masa molecular similar. Además, las selenoproteínas juegan un papel importante en la desintoxicación de Hg, principalmente la SeP, ya que contiene 6-10 grupos SeCys, y la alta reactividad de los grupos selenoles aumenta la posibilidad de unión entre el Hg y el Se. Por último, la intensidad del pico correspondiente a la posible molécula Hg-SOD aumenta de manera significativa con respecto al control. Este hecho podría estar relacionado con una disminución de la actividad enzimática de SOD en extractos citosólicos hepáticos observados en ratas bajo la administración de Hg, incluso cuando se ingiere Se simultáneamente (Agarwal *y col*., 2007). En el caso del suero, se obtuvieron dos picos ratones expuestos a Hg/Se. En este caso el cromatograma SEC-ICP-MS muestra una

distribución similar en los extractos citosólicos de hígado. Una primera fracción de moléculas de masa molecular elevada (HMM), relacionadas con proteínas ricas en residuos de Cys, y un segundo pico, en torno a 67 kDa, relacionado con proteínas transportadoras, como se discutió anteriormente para el hígado. Por último, cabe destacarse la presencia de un pico a 7 kDa en riñón, correspondiente al tiempo de retención de las MTs, que muestran una menor intensidad de los picos trazados por Cu, Zn y Hg, respectivamente, en presencia de Se, lo que parece estar relacionado con la inhibición en la producción de MTs (Cuvin-Aralar *y col*., 1991).

Por otra parte, en al artículo 7 de la presente Tesis Doctoral se comprobó cómo los niveles de las especies de selenio de LMM disminuyeron y se incrementaron correlativamente los niveles de SeP en el plasma de ratones tratados con Hg. Estos resultados sugieren que las especies de selenio de baja masa moléculas (LMM) se consumen en el proceso de desintoxicación Hg, para alcanzar los niveles de SeP necesarios para la redistribución de Hg en forma de Hg-SeP, y ser finalmente excretados. Para obtener una información más completa sobre este mecanismo de desintoxicación del Hg, se administró selenito en diferentes dosis para evaluar los efectos en los niveles de selenoproteínas en el extracto citosólico de hígado y suero, utilizando el enfoque multidimensional basado en 2D/SEC-AF-SUID-ICP-ORS-MS. Los resultados del estudio indican que los niveles SeP aumentan en el suero y extractos citosólicos hepáticos después del período de exposición a Hg, y este efecto es más pronunciado con el aumento de la suplementación de selenito. Este hecho pone de manifiesto la síntesis de SeP a partir de selenito y la interacción antagonista entre ambos elementos en ratones suero y el hígado, ya que el complejo Hg-SeP juega un papel importante como un vehículo para la desintoxicación de Hg (Chen *y col*., 2006). En relación a este efecto, la disminución de los niveles de las especies de

selenio de molécula de baja masa molecular (LMM) en suero y correlativamente su aumento en el extracto citosólico de hígado concuerdan con el requisito de la presencia de selenito para la síntesis de SeP en el hígado, que luego será transferida al torrente sanguíneo (Shiobara *y col*., 1998). Además, los niveles de SeP aumentan en el hígado, lo que puede explicar la elevada concentración de esta selenoproteína en este órgano tras el período de exposición a Hg, y este hecho se incrementa con el aumento de la suplementación de selenito. En relación a estos hechos, se obtuvieron valores más reducidos de niveles de SeAlb en el suero del ratón cuando el Hg se suministra solo, incrementándose la concentración hepática SeAlb, ya que esta selenoproteína de transporte se transfiere al hígado cuando la SeP se precisa para reducir los procesos de toxicidad (Shiobara *y col*., 1998). El pico de HMM trazado por el Hg en suero se atribuye a la selenoenzima eGPx que se encuentra en el torrente sanguíneo de los mamíferos, representando aproximadamente el 5% de selenio en plasma de ratón. En contraste, la fracción de selenoproteínas de HMM en el extracto citosólico de hígado puede contener otras selenoproteínas junto a la eGPx, como la tioredoxin reductasa (TrxR) que si estaría presente este órgano. Independientemente de la baja resolución que se alcance en esta fracción, el aumento de los niveles en ambas selenoenzimas redox podría estar relacionado con el daño oxidativo causado por la toxicidad de Hg. Se obtuvieron mayores concentraciones de ambas selenoenzimas cuando el Se se administró junto con el Hg, ya que sus propiedades antioxidantes ayudan a eliminar las ROS inducidas por Hg *in vivo* (Chen *y col*., 2006; Lin *y col*., 1999).

Finalmente, con el uso de la columna de afinidad (2D-SEC-AF-ICP-MS), se observó que el Hg estaba presente en el plasma en tres picos muy marcados en los extractos citosólicos de hígado y de suero, que corresponden a proteínas de alta masa molecular (HMM), uno de los

picos, así como las fracciones de SeP y SeAlb. Por otro lado, los resultados mostraron que la suplementación con Se promueve la unión de Hg a proteínas de masa molecular más alta, especialmente con dosis altas de Se, junto con Hg. Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas en la acumulación de Hg asociado a la SeP en suero. Además, en la fracción Hg-SeAlb se obtuvieron tendencias similares, apoyando la idea de que la formación de complejos de Hg-SeP y Hg-SeAlb causa la redistribución de Hg en el organismo.

Estos resultados proporcionan información sobre la distribución de los elementos, las interacciones y la homeostasis y pone de manifiesto nuevamente el potencial de este enfoque metalómico en experimentos de exposición controlada a uno o varios elementos químicos.

**CAPÍTULO 3: Estudios de interacciones entre elementos mediante el uso de tecnologías -ómicas**

Los artículos que forman parte de este apartado han sido retirados de la tesis debido a restricciones relativas a los derechos de autor. Dichos artículos han sido sustituidos por la referencia bibliográfica, enlace al texto completo (solo miembros de la UHU) y/o enlace Arias Montano, Repositorio Institucional de la Universidad de Huelva, así como resumen.

- García Sevillano, M.A., García Barrera, T., Navarro, F., Gómez Ariza, J.L.: "Cadmium toxicity in Mus musculus mice based on a metallomic study. Antagonistic interaction between Se and Cd in the bloodstream". Metallomics. Nº 6, págs. 672-681, (2014). DOI: 10.1039/C3MT00350G

Enlace al texto completo del artículo:
http://dx.doi.org/10.1039/C3MT00350G

**RESUMEN:**
Cadmium (Cd) is an important inorganic toxicant in the environment which impacts on human health. A metallomic approach based on size-exclusion chromatography (SEC) coupled to inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) and multidimensional chromatography separation based on SEC coupled to affinity chromatography 2D-SEC-AF-ICP-MS have been applied to achieve a better understanding of the function, detoxification processes and regulation of metals in mice (Mus musculus) under controlled exposure to both Cd and Cd plus (77)Se. Isotopic dilution analysis (IDA) was performed to quantify selenium containing proteins in mice plasma with ICP-qMS as a multielemental detector. Additionally, isotope pattern deconvolution (IPD) was applied to study the fate of enriched (77)selenite in mice subjected to cadmium exposure and the effect of selenoprotein production in plasma. Moreover, the affinity of Cd for SeP in plasma of mice was corroborated using anion exchange chromatography (AEC) after AF separation and identified by organic mass spectrometry. This work illustrates the high reliability of the integrated use of inorganic and organic mass spectrometry to get a metallomic approximation, which provides a good alternative to gain deep insight into the fate of elements in exposed organisms, providing information about metal trafficking, interactions and homeostasis.

- García Sevillano, M.A., García Barrera, T., Navarro Roldán, F., Montero Lobato, Z., Gómez Ariza, J.L.: "A combination of metallomics and metabolomics studies to evaluate the effects of metal interactions in mammals. Application to Mus musculus mice under arsenic/cadmium exposure". Journal of Proteomics. Vol. 104, págs. 66-79, (2014). DOI: 10.1016/j.jprot.2014.02.011

Enlace al texto completo del artículo (solo para miembros de la UHU):

http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2014.02.011

**RESUMEN:**

Arsenic and cadmium are toxic metals of environmental significance with harmful effects on man. To study the toxicological and biochemical effects of arsenic/cadmium in mammals a combined metallomic and metabolomic approach has been developed, complemented with the measurement of biochemical parameters in blood and histopathological evaluation of liver injury in mice *Mus musculus* under exposure to both xenobiotics. Size-exclusion chromatography (SEC) was combined with affinity chromatography (AF) and ICP-MS detection using species unspecific isotopic dilution analysis (SUID) to characterize the biological effects of As/Cd on selenium containing proteins in the bloodstream of exposed mice. On the other hand, both direct infusion mass spectrometry (DIMS) and gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) provided information about changes in metabolites caused by metals. The results show that As/Cd exposure produces interactions in the distribution of both toxics between organs and plasma of mice and antagonistic interactions with selenium containing proteins in the bloodstream. Interplay with essential metabolic pathways, such as energy metabolism and breakdown of membrane phospholipids were observed, which are more pronounced under As/Cd exposure. In addition, heavy metal and metalloid causes differential liver injury, manifested by steatosis (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) and infiltration of blood cells into the space of Disse.

***Biological significance***

This work presents new contributions in the study of arsenic/cadmium interactions in mice Mus musculus under controlled exposure. With the combination of metallomic and metabolomic approaches the traffic of As and Cd from liver to kidney by means of blood was observed and excretion of As (as arsenic metabolites) or Cd (as MTCd) is inhibited with the simultaneous administration of As/Cd, and these toxic elements have important influence in the levels of seleno-proteins in the plasma. In addition, the metabolomic approach reveals inhibition of different metabolic cycles such as tricarboxylic acid and phospholipid degradation that causes membrane damage and apoptosis that is histopathologically confirmed.

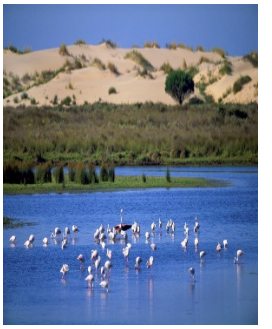
This article is part of a Special Issue entitled: Environmental and structural proteomics.

- García Sevillano, M.A., Rodríguez Moro, G., García Barrera, T., Navarro, F., Gómez Ariza, J.L.: "Biological interactions between mercury and selenium in distribution and detoxification processes in mice under controlled exposure. Effects on selenoprotein". Vol. 229, págs. 82-90, (2015). DOI: 10.1016/j.cbi.2015.02.001

Enlace al texto completo del artículo (solo para miembros de la UHU):
http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2015.02.001

**RESUMEN:**

Antagonistic interactions between mercury (Hg) and selenium (Se), were evaluated in mouse (*Mus musculus*), as a mammalian model, in a series of controlled exposure experiments. The beneficial effect of Se against Hg toxicity involves a variety of biochemical and toxicological processes that have not been clarified yet. For this purpose, a metallomic workflow based on the use of size-exclusion chromatography (SEC) with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) detection was complemented with the speciation of selenoproteins and low molecular mass selenium species in serum and liver cytosolic extracts using a multidimensional approach based on SEC-AF-HPLC-ICPMS, using species-unspecific isotope dilution (SUID)-ICP-MS for selenium quantification. The results showed potential interactions between Hg/Se in organs and serum related to accumulation and detoxification processes, in addition to the effects of mercury on selenoproteins in hepatic cytosolic extracts and bloodstream when both elements are administrated at the same time. These results provide information about elements distribution, interactions and homeostasis and reveal the potential of metallomic approaches in exposure experiments.









# CAPÍTULO 4

## CHAPTER 4

**"El uso de tecnologías *–ómicas* para evaluar la contaminación causada por metales en el Parque Nacional de Doñana usando el ratón de vida libre *Mus spretus* como bioindicador"**

***"Use of –omics technologies to assess metal pollution in Doñana National Park using Mus spretus as bioindicator"***

## 5.4. CAPÍTULO 4:

**"El uso de tecnologías –*ómicas* para evaluar la contaminación causada por metales en el Parque Nacional de Doñana usando el ratón de vida libre *Mus spretus* como bioindicador"**

## PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

**Artículo 12:** Biological response of free-living mouse *Mus spretus* from Doñana National Park under environmental stress based on assessment of metal-binding biomolecules by SEC-ICP-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404 (2012) 1967-1981.

**Artículo 13:** Use of Metallomics and Metabolomics to Assess Metal Pollution in Doñana National Park (SW Spain). *Environmental Science and Technology*, 48 (2014) 7747-7755.

**Artículo 14:** Metal interactions in mice under environmental stress. *Biometals,* 26 (2013) 651-666.

**Artículo 15:** Application of metallomic and metabolomic approaches in exposure experiments on laboratory mice for environmental metal toxicity assessment. *Metallomics,* 6 (2014) 237-248.

**Artículo 16:** Omics technologies and their applications to evaluate metal toxicity in mice *M. spretus* as a bioindicator. *Journal of Proteomics,* 104 (2014) 4-23.

**Artículo 17:** Environmental metabolomics: Biological markers for metal toxicity. *Electrophoresis,* 36 (2015) 2348-2365.

La monitorización de contaminantes en el medio ambiente proporciona, por un lado, información sobre los posibles efectos tóxicos de los xenobióticos, y por otro ~~lado~~ nos ayuda a conocer áreas de impacto y lugares donde la concentración de los mismos es más marcada. También es útil conocer la evolución temporal de la presencia de estos contaminantes, ya que los resultados obtenidos nos permiten relacionar la presencia de una sustancia tóxica concreta con posibles problemas medioambientales. En el trabajo experimental descrito en los artículos que integran este apartado se han desarrollado procedimientos metalómicos, metabolómicos, proteómicos y transcriptómicos para evaluar la contaminación ambiental en el Parque Nacional de Doñana y sus alrededores, usando como especie bioindicadora el ratón de vida libre *Mus spretus*, debido a su alta densidad de población en esta zona, y la posibilidad que presenta de extrapolar los resultados obtenidos en las experiencias de laboratorio, desarrollada en los capítulos anteriores, con la especie de laboratorio *Mus musculus* sometido a exposición controlada a contaminantes de naturaleza metálica. La homología genética entre ambas especies permite llevar a cabo estos estudios comparativos y usar las bases de datos de *Mus musculus* para identificar proteínas/metaloproteínas expresadas por *Mus spretus*. A su vez las experiencias de exposición a arsénico, cadmio y mercurio llevadas a cabo en *Mus musculus* nos informa acerca de la respuesta biológica de los organismos frente a estos contaminantes, así como de los procesos de homeostasis y tráfico de metales entre los órganos, para relacionarlos posteriormente con los cambios que se produzcan en la expresión de proteínas/metaloproteínas o metabolitos. Principalmente en *Mus spretus* como consecuencia de la exposición a los contaminantes mencionados.

Con este objetivo, en el artículo 12 de la presente memoria se examina y compara la respuesta biológica de los ratones *Mus spretus* capturados en Septiembre de 2011 de cuatro zonas contaminadas (La Rocina, ROC; El Partido, PAR; Ajolí, AJO y Matochal, MAT, descritas en el Experimental) y una zona no contaminada (Lucio del Palacio, LDP) del Parque Nacional de Doñana y las áreas circundantes en el suroeste de España. Los órganos con alta actividad metabólica, tales como hígado y los riñones se utilizaron para este propósito. Los cambios en los niveles de metal-biomoléculas causados por los contaminantes fueron evaluados por SEC-ICP-MS. Los resultados más interesantes se observaron en relación con el Mn, el grupo de Cu, Zn y Cd, y el elemento tóxico As. Para este propósito se hace uso de un enfoque metalómico basado en el uso de SEC-ICP-MS complementado con SEC a escala preparativa y cromatografía de intercambio aniónico o catiónico para caracterizar la respuesta biológica del ratón *Mus spretus* de vida libre capturados en el Parque Nacional de Doñana, afectado por contaminación metálica principalmente como consecuencia de la actividad industrial, agrícola y la minería que se practica a su alrededor. Este enfoque se ha aplicado a zonas contaminadas y no contaminadas del Parque Nacional de Doñana y su entorno. Los resultados muestran la alta presencia de Fe, Mn, Cu y Zn en los extractos citosólicos de hígado y As y Cd en los riñones, especialmente en las zonas más contaminadas. Los cromatogramas de exclusión de tamaño trazados por Mn en extractos citosólicos hepáticos son más intensos que en el riñón; la fracción más intensa coincide con el tiempo de retención del estándar de 32 kDa (SOD) y está presente tanto en hígado y el riñón, la intensidad de este pico se correlaciona con la concentración de Mn en los extractos y parece estar relacionada con las concentraciones de este elemento en los extractos posiblemente mediante la sustitución de los sitios activos de Zn de la anhidrasa carbónica (Zn-CA) por Mn para formar la

Mn-CA. Esta suposición explica que la intensidad de este pico es mayor cuanto mayor es la concentración de Mn en las muestras de suelo y sedimentos.

La mayor intensidad de los picos de Cu, Zn y Cd con una masa molecular aproximada de 7 kDa se observaron en extractos citosólicos de los ratones capturados en las áreas contaminadas, como MAT, aunque otros picos relacionados con las moléculas de 32 y 67 kDa de Cu y Zn presentan mayor intensidad en muestras de zonas con baja contaminación como LDP, en el que se identificó el pico a 32 kDa en el extracto citosólico de hígado como la enzima Cu,Zn-SOD por espectrometría de masas orgánica, tras una purificación mediante una segunda dimensión cromatográfica basada en AEC y su posterior digestión tríptica. Por último, se observaron dos picos de arsénico de baja masa molecular en los extractos de riñón, con mayor intensidad en las muestras de ROC. La combinación de cromatografía SEC y de intercambio de aniones preparativa permitió la identificación de arsenicales metilados (MMA y DMA).

En este sentido, en el artículo 13 de la presente Tesis Doctoral se hizo uso de este mismo enfoque metalómico, pero complementado con un estudio metabolómico y la medida de la actividad enzimática de varias enzimas redox en tres de las 5 áreas previamente estudiadas en el artículo anterior, LDP como zona control, y PAR y MAT como áreas de mayor contaminación metálica, usando el riñón como órgano diana, ya que éste es importante en la excreción/detoxificación de metabolitos solubles en agua, incluyendo metales y xenobióticos, debido a la fuerte interacción entre el riñón y el torrente sanguíneo.

En este estudio el contenido de metales en riñón de *M. spretus* procedentes de PAR y MAT fueron significativamente mayores respecto a los ratones capturados en la zona de

referencia LDP. Los metales esenciales, como Cu, Zn, Mn y Fe, tenían una presencia significativa en el riñón de todos los ratones, con independencia de su lugar de captura. En contraste, los elementos tóxicos, como Cd, As, Ni, Cr y Pb, estaban en concentraciones más elevadas en PAR y, en particular, en los ratones de MAT. Esta observación confirma resultados anteriores que muestran que las áreas arroceras de El Matochal se encuentran más contaminadas por metales que cualquier otra área de los alrededores de DNP, probablemente debido al amplio uso de metales empleados en la agricultura y a la ruptura de las balsas de las Minas de Aznalcóllar que afecta a esta zona. El estudio ionómico mostró una buena clasificación de las muestras de los tres grupos. Esta clasificación reveló que los ratones capturados en PAR y MAT presentan diferencias significativas respecto a los capturados en LDP, debido a sus altas concentraciones de Mn, Fe, Zn, Cu, As, Cd y Pb en el riñón, existiendo una correlación demostrada entre metales en suelos/sedimentos y sus niveles en el riñón de *M. spretus* procedente de DNP y sus alrededores.

Los resultados más interesantes se obtuvieron con Mn, Cu, Zn, Cd y As. Los extractos renales, como ya se ha comentado en el artículo anterior, presentan un pico de Mn de 32 a 35 kDa, muy probablemente relacionado con la Mn-superóxido dismutasa (Mn-SOD). Sin embargo, esta metaloproteína es exclusivamente mitocondrial. Alternativamente, el pico de Mn podría originarse por la sustitución de Zn por Mn en el sitio activo de la anhidrasa carbónica para obtener la Mn-CA. Esta hipótesis podría explicar el aumento de la intensidad de este pico con concentraciones de Mn en el riñón en el siguiente orden: MAT> PAR> LDP, también de acuerdo con la concentración total de Mn en los suelos y sedimentos. Sin embargo, se deben realizar más estudios para confirmar esta hipótesis. Adicionalmente, también se encontró un pico a 7 kDa de

Cu y Cd, atribuido a MT, de manera más pronunciada en los extractos citosólicos de riñón de ratones capturados en MAT, donde estos elementos están presente en concentraciones más altas. El pico de Cu-MT fue mayor en los PAR que en los animales MAT, mientras que la situación se invirtió para el pico de Cd-MT, muy probablemente debido al mayor contenido de Cd en el suelo y sedimentos de MAT. Como ya se ha mencionado, el Cd tiene una mayor afinidad por los grupos tioles de las MTs, dada su mayor electrofilia en comparación con el Cu; por lo tanto, el aumento de los niveles de Cd de MAT podrían conducir a la sustitución de Cu por Cd en estas metaloproteínas de bajo peso molecular.

También se detectó otro pico de Cu a ~32 kDa muy intenso en las muestras de PAR y MAT, pero de menor intensidad en LDP. Esta fracción se purificó como se describe en el artículo 12 y se identificó como la Cu,Zn-SOD, la cual constituye un excelente biomarcador de estrés oxidativo. Asimismo, se observaron tres picos de Zn que coinciden con el volumen muerto de la columna de SEC empleada (>70 kDa), un segundo pico que coeluye con la BSA (Zn,Cu-BSA, 67 kDa) y un tercer pico con la SOD (Cu,Zn-SOD, 32 kDa). Su intensidad fue mayor en ~~el~~ MAT y PAR. La alta concentración de Zn y Cu en los alrededores de DNP podría estar relacionada con la intensidad de los picos por encima de 67 kDa en estas áreas, asociada con estándares de proteínas transportadoras tales como Zn,Cu-BSA y transferrina (Cu,Zn-Tf).

El análisis metabolómico del riñón de ratón usando DI-ESI-QqQTOF-MS de los extractos polares y lipofílicos se empleó para evaluar las alteraciones en las vías metabólicas promovidas por elementos tóxicos en relación con (i) la actividad antioxidante, (ii) daño de la membrana, y (iii) el metabolismo energético. El glutatión reducido (GSH) es el principal antioxidante citosólico que

interviene en los procesos de desintoxicación de ROS y mantiene los grupos tioles de las proteínas. GSH también se une a xenobióticos electrófilos y metabolitos endógenos que luego son excretados. Ambas funciones del GSH, explican el menor contenido de GSH encontrado en ratones capturados en las zonas contaminadas PAR y MAT. Asimismo, una disminución de este metabolito antioxidante debe ir compensado por su síntesis *de novo* a partir glutamato, L-cisteína y glicina, que explica el aumento de glutamato encontrado en ratones PAR y MAT. La taurina, un antioxidante derivado de la L-cisteína juega un papel importante en la osmorregulación, estabilización de la membrana y la modulación de la señalización de $Ca^{2+}$, y también se incrementó en ratones de las áreas más contaminadas. Este comportamiento opuesto entre taurina y GSH, ya observada en *M. musculus* bajo la exposición al arsénico (García-Sevillano *y col*., 2013), podría deberse a una mayor síntesis de taurina, siendo disminuyendo la presencia de GSH en presencia de metales tóxicos. Las alteraciones simultáneas de GSH, taurina, y glutamato mostradas por el estudio metabolómico confirman el estrés oxidativo causado por la contaminación metálica. Por otro lado, el estudio metabolómico de los riñones de ratones confirmó que las membranas celulares constituyen objetivos preferentes de los daños oxidativos. Todos los cambios apuntaron a la degradación de PCs: (1) Los niveles de PCs disminuyeron en PAR y, sobre todo, en los ratones capturados en MAT; (2) Por el contrario, la concentración de todos los productos de degradación de PCs, incluyendo LPCs, tres ácidos grasos libres (AGLs), araquidónico, ácido oleico y ácido pipecólico, y colina, se incrementaron notablemente en los animales capturados en PAR y muy especialmente en MAT. También se observaron alteraciones en dos metabolitos adicionales, creatinina y L-carnitina, en el extracto renal de los ratones capturados en las áreas afectadas por contaminación metálica, así como de creatinina,

biomarcador conocido de daño renal (Yaqoob *y col.,* 1993) con mayores niveles en los extractos de riñón de ratones capturados en PAR y MAT. La L-carnitina transporta ácidos grasos desde el citosol a la matriz mitocondrial para la producción de energía a través de la β-oxidación, como ya se ha mencionado anteriormente. Por consiguiente, una disminución de L-carnitina disminuiría el estado de energía de los animales expuestos a contaminación metálica.

En resumen, estos resultados muestran diferencias en los niveles de metales y metaloproteínas, tales como MTs, Cu/Zn-SOD, o Mn-CA, en los riñones de ratones procedentes de estas zonas afectadas por contaminación metálica y sugieren perturbaciones en varias vías metabólicas debido a la presencia de metales en el ecosistema, tales como la ruptura de los fosfolípidos de la membrana que producen cambios en los niveles de PCs, LPCs, AGLs, colina, el metabolismo energético (L-carnitina), y algunos metabolitos relacionados con el estrés oxidativo (GSH, ácido glutámico, creatinina, y taurina). Por lo tanto, queda demostrado el potencial de estos enfoques metalómico y metabolómico en la evaluación y la comprensión de los riesgos para la salud y los efectos toxicológicos en las zonas contaminadas por metales tóxicos.

Los artículos 14 y 15 evalúan los resultados obtenidos en las exposiciones controladas a As, Cd y Hg (Capítulo 2) de ratones *Mus musculus* a estos metales tóxicos, teniendo en cuenta los cambios inducidos tanto en el metaloma como en el metaboloma como consecuencia de la alta homología genética entre los ratones *Mus musculus/Mus spretus*, que como ya ha sido mencionado con anterioridad, permite el uso de bases de datos del organismo modelos *Mus musculus* (que está secuenciado) para identificar las proteínas/metaloproteínas y metabolitos expresados en el ratón de vida libre *Mus spretus*. Para este propósito, se aplicó un enfoque

metalómico basado en el uso de SEC en combinación con otras técnicas de separación complementarias ortogonales y detección por ICP-ORS-qMS, seguido de la identificación de metalobiomoléculas por espectrometría de masas molecular. Además, la especiación simultánea de selenoproteínas y selenometabolitos en plasma de ratón se llevó a cabo mediante 2D/SEC-AF-SUID-ICP-ORS-qMS. Por último, se consideraron los cambios simultáneos en la expresión metabólica en ratones causadas por la exposición a metales (metaboloma), mediante el uso de DI-ESI-QqQ-TOF-MS. Posteriormente, los resultados obtenidos en condiciones controladas se extrapolaron a ratones de vida libre genéticamente homólogos capturados en el Parque Nacional de Doñana (DNP) y alrededores, afectados por la contaminación de As, Cd y Hg, en especial la zona MAT, como ya se ha comentado previamente.

En el artículo 15 se estudió la respuesta biológica en el plasma de los ratones de vida libre *Mus spretus* capturados en MAT y LDP. La respuesta de *Mus spretus* relacionada con la presencia de As en el área contaminada MAT revela la presencia de especies de bajo peso molecular de este elemento, que está de acuerdo con los experimentos de exposición de *Mus musculus* a As, como se ha descrito previamente. La elevada presencia de arsénico en los alrededores del DNP se ha comprobado anteriormente por otros autores, y la especiación de este elemento en el plasma de ratones de vida libre demostró la presencia de la $iAs^{III}$ pero especialmente DMA. Estos resultados confirman el uso potencial de arsénico en la sangre y el plasma como biomarcador de exposición a este elemento.

Por otro lado, en el cromatograma de Cu se observó un pico de alta intensidad a aproximadamente 67 kDa, que puede estar relacionado con proteínas de transporte tales como

Cu/Zn-BSA y Cu-f de 67 kDa y 79kDa, respectivamente. Se obtuvieron resultados similares para el Zn que confirma esta hipótesis. Se detectaron intensidades más altas de ambos metales en el plasma de los ratones capturados en MAT, que concuerda con el aumento de la presencia de estos picos cuando el Cd se administra a los ratones de laboratorio *Mus musculus.* Además, el perfil de Cd presenta diferencias entre ratones capturados en MAT de los capturados en LDP, y los cromatogramas muestran varios picos que se pueden explicar por la gran afinidad de este elemento a los grupos tiol de las proteínas. Después de exponer a los ratones *Mus musculus*, a Cd durante 12 días se obtuvo un patrón similar para el plasma. Además, la diferencia de intensidades entre los picos trazados por Cu y Zn respecto a Cd es también similar entre los animales de laboratorio y los de vida libre.

En este sentido, para evaluar la influencia de la contaminación metálica en la presencia relativa de selenoproteínas en el plasma de ratones de vida libre *Mus spretus*, se volvió a aplicar el enfoque 2D/SEC-AF-SUID-ICP-ORS-qMS, descrito anteriormente. Las concentraciones de SeP, SeAlb y Se-metabolitos fueron menores en los ratones de la zona contaminada (MAT) en comparación con la zona no contaminada (LDP), y correlativamente aumenta la concentración de eGPx. Se observaron efectos similares cuando As y Cd se administraron a ratones de laboratorio *Mus musculus*.

Además, se extrajeron los metabolitos presentes en el plasma de los ratones de vida libre *Mus spretus* y se analizaron por DI -ESI-QqQ-TOF-MS. Los resultados mostraron un aumento en los niveles de creatinina, LPCs, colina y ácido glutámico en el plasma de los ratones capturados en MAT en comparación con el área de control (LDP). Además, se observó una

disminución en los niveles de GSH, PCs, arginina y glucosa. Estos resultados presentan una elevada similitud con los metabolitos alterados en el plasma de los ratones *Mus musculus* sometidos a exposición controlada de arsénico, como se comentó en el capítulo 2.

En resumen, la respuesta biológica de los ratones de vida libre *Mus spretus* capturados en MAT, afectados por As, Cd y la contaminación de Hg tras la ruptura de las balsas de mina de pirita de Aznalcóllar en 1998, presenta una alta similitud con la respuesta de los ratones *Mus musculus* bajo expuesto a As y Cd en el laboratorio, utilizando también los enfoques metalómico y metabolómico. Por otro lado, aunque existen numerosos estudios que ponen de manifiesto la presencia de mercurio en esta área, en el presente trabajo, no se encontró ninguna respuesta biológica relacionada con este elemento, lo que sugiere la presencia de una forma química del mercurio no biodisponible para los ratones de vida libre de MAT o una concentración baja del citado elemento.

De esta forma queda demostrado que la integración de técnicas de información masiva como la metalómica y la metabolómica podría ser muy útil en el estudio de la toxicidad de metales en organismos modelo expuestos a metales (*Mus musculus*) y en la evaluación de los ecosistemas terrestres afectadas por la contaminación metálica usando los ratones de vida libre *Mus spretus* como bioindicadores.

Finalmente, los artículos 16 y 17 recogen una revisión bibliográfica relacionada con el uso de tecnologías –*ómicas* para la monitorización de la contaminación ambiental. En el artículo 16 se trata el uso de los enfoques -*ómicos* para evaluar la respuesta de los organismos que habitan en zonas afectadas por contaminación metálica e ilustra las posibilidades de diferentes

metodologías sobre la base de nuestros resultados, previamente comentados. La mayor parte de esta investigación se ha basado en los ratones de vida libre *Mus spretus*, bioindicador convencional usado para monitorear la contaminación por metales en el Parque Nacional de Doñana (DNP) (SW España). Asimismo en estas revisiones se discuten los beneficios del uso de técnicas *-ómicas* como microarrays heterólogos, metodologías proteómicas (2-DE, iTRAQ®), metalómicas, ionómicas o metabolómicas, poniendo de manifiesto la necesidad de una visión integradora de las mismas.

Para una evaluación completa de los efectos de los contaminantes sobre los organismos vivos, debido a la complejidad de los sistemas ambientales, es necesario disponer de herramientas multidisciplinares para resumir las múltiples variables y factores que contribuyen al estado de los ecosistemas.

Por esta razón, el uso de enfoques analíticos de información masiva, las *-ómicas*, representa una buena alternativa a los biomarcadores convencionales ya que este último enfoque es limitado por la exigencia de un conocimiento profundo de los mecanismos de toxicidad de los contaminantes en estudio. Sin embargo, las *-ómicas* son metodologías no dirigidas o *non-target* y por tanto abiertas a respuestas inesperadas bajo condiciones ambientales particulares. En relación a este artículo, cabe destacar lo siguiente:

(a) el interés del uso de bioindicadores de evaluación ambiental (como *M. spretus*) que son genéticamente homólogos a los animales secuenciados (*M. musculus*), que permite establecer relaciones interesantes entre la respuesta genética, la expresión de proteínas,

metabolitos, mejora de la producción o la inhibición de enzimas, metaloproteínas y metalo-metabolitos, considerando la interacción entre ellos.

(b) La respuesta a elementos tóxicos, tales como As, en ratones de vida libre *M. spretus* puede ser evaluada utilizando experimentos de exposición en el laboratorio con los ratones *M. musculus*, que muestra la metilación del arsénico en el hígado, alteraciones en el metabolismo energético y degradación de las membranas celulares. Asimismo, se confirman las interacciones entre Cd, Cu y Zn en hígado de ratones expuestos a Cd, así como la acumulación de Cd en el plasma asociado a SeP y MTs, proteínas relacionadas con los procesos de desintoxicación de metales. Además, no se observaron cambios metabólicos relacionados con la degradación de los fosfolípidos de membrana, metabolismo de la energía y el estrés oxidativo.

(c) Los resultados de la respuesta biológica obtenidos de ratones que viven en las zonas contaminadas y no contaminadas del Parque Nacional de Doñana se pueden correlacionar con los experimentos de laboratorio con *M. musculus.*

Por último, el artículo 17 recoge una revisión bibliográfica de la metabolómica ambiental, un campo emergente que se refiere a la aplicación de técnicas metabolómicas para caracterizar las interacciones de los seres vivos con su medio ambiente. En este sentido, la importancia de controlar los efectos de los metales tóxicos en los organismos vivos ha aumentado como consecuencia de los cambios naturales y las actividades antropogénicas que han llevado a un aumento de los niveles de metales tóxicos en los ecosistemas terrestres y acuáticos. Para este propósito, la metabolómica basada en MS para estudiar la toxicidad de metales está ganando importancia en los últimos años. La metabolómica ambiental puede ser utilizada para: (i)

caracteriza el modo de acción (MOA) de los metales tóxicos mediante experimentos controlados de laboratorio, (ii) evaluar la toxicidad (respuesta adversa a una sustancia biológica), que podría ser útil en la evaluación de riesgos, y (iii) desarrollar nuevos biomarcadores que se pueden aplicar en la biomonitorización ambiental (escenario realista del medio ambiente). En esta revisión, se discute cómo se puede aplicar la metabolómica basada en el uso de MS para estudiar la toxicidad de metales, teniendo en cuenta las características más importantes relacionadas con experimentos metabolómicos.

**CAPÍTULO 4: El uso de tecnologías –ómicas para evaluar la contaminación causada por metales en el Parque Nacional de Doñana usando el ratón de vida libre Mus spretus como bioindicador**

Los artículos que forman parte de este apartado han sido retirados de la tesis debido a restricciones relativas a los derechos de autor. Dichos artículos han sido sustituidos por la referencia bibliográfica, enlace al texto completo (solo miembros de la UHU) y/o enlace Arias Montano, Repositorio Institucional de la Universidad de Huelva, así como resumen.

- García Sevillano, M.A., González Fernández, M., Jara Biedma, R., García Barrera, T., López Barea, J., Pueyo, C., Gómez Ariza, J.L.: "Biological response of free-living mouse Mus spretus from Doñana National Park under environmental stress based on assessment of metal-binding biomolecules by SEC-ICP-MS". Analytical and Bioanalytical Chemistry. Vol. 404, n. 6, págs. 1967-1981, (2012). DOI: 10.1007/s00216-012-6274-2

Enlace al texto completo del artículo:
http://dx.doi.org/10.1007/s00216-012-6274-2

**RESUMEN:**
A metallomic approach based on the use of size-exclusion chromatography (Superdex-75) with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) detection is combined with anion or cation exchange chromatography to characterize the biological response of the free-living mouse *Mus spretus*. The approach has been applied to contaminated and non-contaminated areas from Doñana National Park (southwest Spain) and the surroundings. Several areas affected by differential contamination from mining, industrial, and agricultural activities have been considered. The high presence of Mn, Cu, and Zn in liver and As and Cd in kidney is remarkable, especially in contaminated areas. The size exclusion chromatograms traced by Mn in liver cytosolic extracts are more intense than in kidney; a Mn-peak matching with the standard of 32 kDa (superoxide dismutase) is present in these organs, and its intensity is correlated with the concentration of Mn in the extracts. High-intensity peaks traced by Cu, Zn, and Cd at 7 kDa (matching with metallothionein I standard) in liver extract are triggered by the presence of contaminants. Other peaks related with molecules of 32 and 67 kDa traced by Cu and Zn can also be observed, although their intensity is higher in sites with low contamination. In kidney extracts, the presence of a Cd-peak with *Mr* of 7 kDa (tentatively Cd-metallothionein) with high intensity under the action of contaminants was observed, but high biological responses are also proven in the protected area of the Park, which denotes a progressive increase of diffuse contamination.

- García Sevillano, M.A., García Barrera, T., Navarro Roldán, F., Abril, N., Pueyo, C., López Barea, J., Gómez Ariza, J.L.: "Use of Metallomics and Metabolomics to Assess Metal Pollution in Doñana National Park (SW Spain)". Environmental Science and Technology. Vol. 48 (14), págs. 7747-7755, (2014). DOI: 10.1021/es4057938

Enlace al texto completo del artículo (solo para miembros de la UHU):
http://dx.doi.org/10.1021/es4057938

**RESUMEN:**
Monitoring organism exposure to heavy metals has acquired increased importance in the last decades. The mouse *Mus spretus* has been used to assess the biological response to contaminants in the relevant ecological area of Doñana National Park (DNP) and surrounding areas (SW Spain), where many migrating birds land for breeding and feeding every year. A metallomics approach, based on the characterization of metal biomolecules using size exclusion chromatography coupled with inductively coupled plasma-mass spectrometry (SEC-ICP-MS) and a metabolomics approach based on direct infusion to a mass spectrometer (DI-ESI-QTOF-MS) followed by a partial linear square-discriminant analysis (PLS-DA), were used to compare the biological responses of *M. spretus* living in three areas of DNP (the reference) and surrounding areas (El Partido and El Matochal). The activities of key antioxidant enzymes, such as Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, CAT, GR, and guaiacol peroxidase, were also determined in connection with environmental contamination issues. The results show differences caused by the presence of metals in the ecosystem that affected to the levels of metals and metalloproteins, such as MT, Cu/Zn-SOD, or Mn-CA, the breakdown of membrane phospholipids, perturbations in metabolic pathways, related to energy metabolism, and oxidative stress.

- García Sevillano, M.A., Rodríguez Moro, G., García Barrera, T., Navarro, F., Gómez Ariza, J.L.: "Metal interactions in mice under environmental stress". Biometals. Vol. 26, n. 4, págs.. 651-666, (2013). DOI: 10.1007/s10534-013-9642-2

Enlace al texto completo del artículo (solo para miembros de la UHU):
http://dx.doi.org/10.1007/s10534-013-9642-2

**RESUMEN:**
A metallomic analytical approach based on the use of size exclusion chromatography coupled to ICP-MS has been used to obtain metal profiles related to overexpression or inhibition of metal-binding biomolecules, which is connected to exposure experiment

of laboratory mice *Mus musculus* to toxic metals, such as Cd, Hg and As. Exposure to Cd induces the formation of Cd-metallothionein in liver that reveals the protective role of this organ; however, exposure to Hg reduces the intensity of the peak associated to Cu-superoxide dismutase (Cu-SOD) while Hg-SOD peak increases, which suggests the competence of Cu and Hg for the active sites of SOD in liver that causes mercury translocation to kidney, in which the concentration of Hg as Hg-metallothionein increases drastically to be excreted by urine. It has been also observed the protective effect of selenium on mercury toxicity in blood plasma, which produces decreasing of the intensity of Se-protein in plasma with Hg exposure and correlative increases of Hg-albumin that transport mercury to kidney for excretion. Finally, arsenic exposure provokes the accumulation of small metabolites of this element, such as dimethylarsenic and monomethylarsenic for excretion. The application of the metallomic approach to liver extracts from free-living mouse *Mus spretus* shows the overexpression of Cu, Zn and Cd-peaks at 7 kDa (related to metal-metallothionein) in environmental contaminated sites, as well as the increase of peaks related to Cu- and Zn-SOD and Zn-albumin. However, in kidney, can be checked the presence of high concentration of arsenic small metabolites in contaminated areas, similarly to results found in exposure experiments. In addition, the application of a metabolomic approach based on direct infusion mass spectrometry to organ extracts (liver, kidney and serum) from mice (*M. musculus*) exposed to arsenic reveals important metabolic changes related to antioxidative activity, membrane cell damage, energy metabolism and arsenic elimination. Similar results were obtained from free-living mouse (*M. spretus*) from areas contaminated with arsenic. The integration of metallomics and metabolomics results provides a more comprehensive evaluation about the biological response in exposure experiments to toxic metals as well as in environmental assessment of contamination.

- García Sevillano, M.A., García Barrera, Gómez Ariza, J.L.: "Application of metallomic and metabolomic approaches in exposure experiments on laboratory mice for environmental metal toxicity assessment". Metallomics, Vol. 6, págs. 237-248, (2014). DOI: 10.1039/C3MT00302G

Enlace al texto completo del artículo:
http://dx.doi.org/10.1039/C3MT00302G

**RESUMEN:**

Metals have a central role in biological systems, regulating numerous cellular processes, and in other cases having toxic or deleterious effects on the metabolism. Hence, the study of metal-induced changes in cellular metabolic pathways is crucial to

understanding the biological response associated with environmental issues. In this context, the finding of biomarkers has great interest, representing -omics techniques, such as metallomics and metabolomics, powerful tools for this purpose. The present work evaluates the exposure of mice *Mus musculus* to toxic metals (As, Cd and Hg), considering the changes induced in both the metallome and metabolome as a consequence of the high genetic homology between *Mus musculus/Mus spretus* mice, which allows the use of the database from *M. musculus* to identify the proteins and metabolites expressed by *M. spretus*. For this purpose a metallomic approach based on size exclusion chromatography (SEC) in combination with other complementary orthogonal separation techniques and heteroelement monitoring by ICP-ORS-qMS was performed, followed by identification of metallobiomolecules by organic mass spectrometry. In addition, simultaneous speciation of selenoproteins and selenometabolites in mouse plasma was accomplished by tandem (double) SEC-(dual) affinity chromatography (AF)-HPLC and online isotope dilution analysis (IDA)-ICP-ORS-qMS. Finally, the simultaneous changes in metabolic expression in mice caused by metal exposure (metabolome) were considered, using direct infusion mass spectrometry (DI-ESI-QqQ-TOF-MS) of extracts from mice plasma. Subsequently altered metabolites were identified using MS/MS experiments. The results obtained under controlled conditions were extrapolated to homologous free-living mice captured in Doñana National Park (DNP) and surroundings (southwest Spain) affected by As, Cd and Hg pollution. In summary, such studies are needed to understand the effect of heavy metal exposure and cope with heavy metal toxicity.

- García Sevillano, M.A., García Barrera, T., Abril, N., Pueyo, C., López Barea, J., Gómez Ariza, J.L.: "Omics technologies and their applications to evaluate metal toxicity in mice M. spretus as a bioindicator". Journal of Proteomics, Vol. 104, págs. 4-23, (0214). DOI: 10.1016/j.jprot.2014.02.032

Enlace al texto completo del artículo (solo para miembros de la UHU):
http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2014.02.032

**RESUMEN:**

Metals are important components of living organisms since many biological functions critically depend on their interaction with some metal in the cell. However, human activities have increased toxic metal levels in the terrestrial and aquatic ecosystems affecting living organisms. The impact of metals on cellular metabolism and global homeostasis has been traditionally assessed in free-living organisms by using conventional biomarkers; however, to obtain a global vision of metal toxicity

mechanisms and the responses that metals elicit in the organisms, new analytical methodologies are needed. We review the use of omics approaches to assess the response of living organisms under metal stress illustrating the possibilities of different methodologies on the basis of our previous results. Most of this research has been based on free-living mice *Mus spretus*, a conventional bioindicator used to monitor metal pollution in Doñana National Park (DNP) (SW Spain), which is an important European biological reserve for migrating birds affected by agricultural, mining and industrial activities. The benefits of using omic techniques such as heterologous microarrays, proteomics methodologies (2-DE, iTRAQ®), metallomics, ionomics or metabolomics has been remarked; however, the complexity of these areas requires the integration of omics to achieve a comprehensive assessment of their environmental status. This article is part of a Special Issue entitled: Environmental and structural proteomics.

***Biological Significance***

This work presents new contributions in the study of environmental metal pollution in terrestrial ecosystems using Mus spretus mice as bioindicator in Doñana National Park (SW Spain) and surroundings. In addition, it has been demonstrated that the integration of omics multi-analytical approaches provides a very suitable approach for the study of the biological response and metal interactions in exposed and free-living mice (Mus musculus and Mus spretus, respectively) under metal pollution.

- García Sevillano, M.A., García Barrera, T., Gómez Ariza, J.L.: "Environmental metabolomics: Biological markers for metal toxicity". Electrophoresis. Vol. 36, págs. 2348-2365, (2015). DOI: 10.1002/elps.201500052

Enlace al texto completo del artículo (solo para miembros de la UHU):
http://dx.doi.org/10.1002/elps.201500052

**RESUMEN:**

Environmental metabolomics is an emerging field referred to the application of metabolomics to characterize the interactions of living organisms with their environment. In this sense, the importance of monitoring the effects of toxic metals on living organisms has increased as a consequence of natural changes and anthropogenic activities that have led to an increase of toxic metal levels in terrestrial and aquatic ecosystems. For this purpose, the use of metabolomics based on MS to study metal toxicity is gaining importance in recent years. Environmental metabolomics can be used to: discover the mode of action (MOA) of toxic metals through controlled

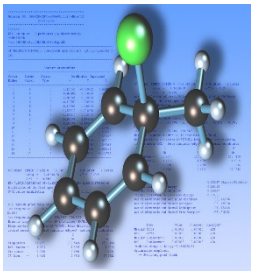
laboratory experiments; evaluate toxicity (biological adverse response to a substance), that may be useful in risk assessment; and develop new biomarkers (based in metabolome shifts discovered through controlled laboratory experiments) that may be applied in environmental biomonitoring (environmental realistic scenario). In this review, it is discussed how metabolomics based on MS can be applied to study metal toxicity, considering the most important hallmarks related to metabolomic experiments.

# CONCLUSIONES

Conclusions













# 6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en los diversos estudios desarrollados en la presente tesis doctoral permiten establecer las siguientes conclusiones:

I. Se han desarrollado y aplicado nuevas metodologías analíticas bajo una nueva una perspectiva metalómica/metabolómica, con objeto de integrar ambas aproximaciones y obtener una visión mucho más completa (holística) de los procesos que se producen en los organismos vivos como consecuencia de la contaminación, en este caso por contaminantes metálicos. En este sentido se han alcanzado propuestas metodológicas innovadoras que se van a ir enunciando en las siguientes conclusiones, de 2 a 5.

II. Se ha desarrollado un procedimiento analítico para la especiación simultánea de selenometabolitos y selenoproteínas (eGPx, $SeO_3^{2-}$, $SeO_4^{2-}$, SeP, SeAlb) en suero humano y de ratón, utilizando el acoplamiento 3D/SE-AF-AEC-HPLC-SUID–ICP-ORS-MS, utilizando una válvula de conexión de columnas de 8 puertos. El procedimiento se ha aplicado al análisis de estas especies en muestras de suero mejorando los resultados alcanzados por otros autores en cuanto a resolución cromatográfica y eliminación de las interferencias de Cl- y Br-, usuales en el suero.

III. Se ha desarrollado un procedimiento metalómico basado en el uso de sistemas cromatográficos ortogonales que integran la cromatografía de exclusión de tamaños (SEC) acoplada on-line con una columna de intercambio aniónico (AEC), usando como detectores ICP-MS y UV, con objeto de separar especies de Cu/Zn en el citosol y extractos

mitocondriales. La especie Cu,Zn-SOD purificada se identificó después de digestión tríptica mediante espectrometría de masas. Este procedimiento ha permitido, por primera vez, la identificación y cuantificación absoluta de moléculas de superóxido dimutasa (Cu,Zn-SOD), que se sobrexpresan en el citosol y las mitocondrias hepática del ratón *Mus musculus* como consecuencia de la exposición a mercurio.

IV. Se ha puesto a punto un procedimiento metabolómico basado en el uso combinado de la espectrometría de masas de alta resolución (DI-ESI-QqQ-TOF-MS) introduciendo la muestra mediante infusión directa, y la cromatografía de gases con detector de masas (GC-MS). El procedimiento se ha aplicado al análisis de extractos de mitocondria de células hepáticas de ratón. La plataforma metabolómica desarrollada se aplicó (por primera vez) en un experimento de exposición del ratón *Mus musculus* a arsénico inorgánico durante 12 días, comprobándose la alteración del ciclo de Krebs, así como la ruta metabólica de la β-oxidación, degradación de aminoácidos y perturbaciones en los niveles de creatinina. Este análisis no dirigido proporciona una información metabólica extensa sobre el funcionamiento de las mitocondrias bajo la exposición a arsénico, que puede aplicase en estudios toxicológicos, farmacológicos y clínicos.

V. Un procedimiento metabolómico semejante al descrito en la Conclusión 4 (DI-QqQ-TOF-MS y GC-MS) se ha aplicado a extractos de suero y glóbulos rojos de ratón *Mus musculus* expuesto a Hg mediante inyección subcutánea durante 10 días. Los resultados muestran perturbaciones en el metabolismo de la energía y aminoácidos, así como degradación de fosfolípidos de membranas y estrés oxidativo en el suero. Los resultados relacionados con las alteraciones del metabolismo de los glóbulos rojos, provocadas por la exposición a Hg,

han sido estudiados por primera vez, comprobándose alteraciones en la glicolisis, degradación de membranas, y perturbación del metabolismo del glutatión y el ascorbato.

VI. Las metodologías ómicas desarrolladas en las Conclusiones 2 a 5, se han aplicado al estudio de la toxicidad de arsénico, mercurio y cadmio en *Mus musculus*, mediante ensayos de exposición a estos elementos.

VII. Los efectos toxicológicos causados por la exposición de *Mus musculus* a arsénico inorgánico mediante administración oral durante 7 días, se han estudiado aplicando de forma combinada procedimientos metalómicos, metabolómicos y de proteómica redox, así como la evaluación de procesos de alteración de regulación de enzimas relacionadas con el estrés oxidativo, como la superóxido dismutasa (SOD), glutatión reductasa (GR) catalasa (CAT) y peroxidasas, para conocer las consecuencias de la toxicidad causada por este elemento, comprobándose que el arsénico causa alteraciones de rutas metabólicas, como alteración del metabolismo de la energía, de los aminoácidos, de la colina y degradación de membrana (apoptosis).

VIII. La respuesta bioquímica del ratón *Mus musculus* sometido a exposición subcutánea de mercurio inorgánico durante 14 días, se ha evaluado aplicando las metodologías ómicas antes descritas a extractos citosólicos de hígado, riñón y suero. Se ha comprobado mediante SEC-ICP-MS cambios en el metaloproteoma del hígado y riñón debido a la interacción del Hg con Cu y Zn, que afecta negativamente la homeostasis de estos metales esenciales. La detección del compuesto Hg-Se apoya la hipótesis de la interacción entre Hg y Se que se produce en mamíferos. El estudio metabolómico basado en DIMS revela cambios en metabolitos endógenos que dependen del tiempo, hecho que se confirma mediante datos

histopatológicos en los tejidos del ratón. Así se han detectado perturbaciones en los perfiles de los metabolitos endógenos relacionados con el ciclo dela energía, degradación de membrana y el aumento de lípidos en el plasma.

IX. La aplicación de procedimientos transcriptómicos y proteómicos (genómica funcional) combinada con la aproximación metabolómica desarrollada en esta Tesis, se ha utilizado para estudia la respuesta biológica del ratón *Mus musculus* expuesto a Cd, utilizando inyección subcutánea durante 10 días. Los resultados demuestran la aparición de un intensa peroxidación lipídica en hígado, la sobrexpresión de transcritos relacionados con el estrés oxidativo, transporte de metales, respuesta inmune y metabolismo de lípidos, y reducción moderada de mRNAs para la reparación de DNA. La aplicación de 2DE-DIGE confirma la presencia de cambios de proteínas hepáticas relacionadas con el estrés y la respuesta inmune, o implicadas en el metabolismo de la energía, lo que sugiere la existencia de un cambio metabólico en el hígado de la fosforilación oxidativa a la glicolisis aeróbica, hecho que fue confirmado mediante análisis metabolómico (DIMS y GC–MS). Este tipo de alteración metabólica es particularmente importante en células altamente proliferativas, como las células tumorales, las cuales requieren el aporte constante de precursores químicos para la síntesis de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.

X. Se han aplicado las metodologías ómicas al estudio de las interacciones Cd/Se, As/Cd y Hg/Se utilizando ensayos de exposición en el ratón *Mus musculus*.

XI. La aplicación de SEC-ICP-MS y el acoplamiento multidimensional 2D-SEC-AF-ICP-MS, para la especiación de selenio, al estudio del proceso de detoxificación de Cd en el ratón *Mus musculus*, en experiencias de exposición a Cd y Cd+$^{77}$Se, ha permitido conocer la

influencia de un elemento tóxico como el cadmio en la producción de Se-proteínas en el plasma, así como la distribución de los elementos en el organismo, tráfico de metales, interacciones y homeostasis. Para ello se ha aplicado análisis por dilución isotópica y técnicas de deconvolución del patrón isotópico (IPD), aprovechando el carácter de detector multielemental del ICP-MS y su capacidad para medir distintos isótopos de un mismo elemento.

XII. La aplicación de técnicas metalómicas (SEC-ICP-ORS-MS y 2D/SEC-AF-ICP-ORS-MS) y metabolómicas (DI-ESI(±)-QTOF-MS y GC-MS), usando técnicas de dilución isotópica inespecíficas (SUID) en el ICP-MS, al estudio de las interacciones As/Cd en experiencias de exposición en *Mus musculus*, complementadas con el estudio de parámetros bioquímicos en sangre y de la histopatología del hígado, permite caracterizar los efectos biológicos de la pareja As/Cd sobre las proteínas de selenio en el torrente sanguíneo, así como su acción sobre rutas metabólicas esenciales, como el metabolismo de la energía y estabilidad de membranas celulares. Además, la metodología utilizada proporciona información sobre los daños causados por estos metales tóxicos en el hígado, que cursan esteatosis e infiltración de glóbulos rojos en el espacio de Disse.

XIII. Se han evaluado las interacciones entre Hg y Se en ratón (*Mus musculus*), utilizando las técnicas metalómicas y metabolómicas descritas en las conclusiones anteriores. El efecto beneficioso del Se frente a la toxicidad del Hg implica una serie de procesos de detoxificación mediados por selenoproteínas, que se aprecian de forma especial en los extractos citosólicos hepáticos y en el torrente sanguíneo. Asimismo, ~~se aprecian~~ su efecto

se observa en los cambios de distribución de ambos elementos entre los distintos órganos, interacciones y homeostasis.

XIV. La aplicación de las metodologías metalómicas y metabolómicas, descritas en conclusiones anteriores, se ha trasladado al estudio de la contaminación metálica en espacios naturales, como el Parque Nacional de Doñana, utilizando como bioindicador el ratón de vida libre *Mus spretus*, lo que ha permitido evaluar la contaminación a través de la respuesta biológica de los animales de ese hábitat. Para ello se ha considerado la información que se disponía de los ensayos de exposición a metales, realizados con el *Mus musculus*, el cual posee una gran homología genética con el ratón *Mus spretus*. De esta forma se ha diseñado un método de trabajo muy innovador frente a las aproximaciones más convencionales, utilizadas generalmente en estudios ambientales.

XV. Se ha aplicado un procedimiento metalómico (SEC-ICP-MS combinado con AEC- y CAC-ICP-MS) para caracterizar la respuesta biológica del ratón de vida libre Mus spretus en el parque Nacional de Doñana (control) frente a zonas con contaminación diferencial de los alrededores. Se aprecia la sobreexpresión de diversas biomoléculas asociadas a Mn, Cu, Zn, As y Cd, en hígado y riñón, como consecuencia de la contaminación, como un pico de Mn a 32 kDa (posible superóxido dismutasa), y picos intensos asociados a Cu, Zn y Cd, a 7 kDa, que coinciden en tiempos de retención con el patrón de metalotioneina (MT-1), en hígado. Estos picos aumentan por la acción de los contaminantes. Además, se observa la aparición de otros picos a 32 y 67 kDa, asociados al Cu y al Zn, vinculados también a procesos de contaminación. Estas respuestas biológicas indican la existencia de un proceso

creciente de contaminación creciente en esta zona emblemática desde un punto de vista ecológico.

XVI. La aplicación del procedimiento combinado metalómico-metabolómico, descrito en las Conclusiones de 2 a 5, al estudio de la respuesta biológica del ratón *Mus spretus* en el Parque Nacional de Doñana y su entorno, junto a la medida de actividad de enzimas relacionadas con el estrés oxidativo, como las Cu,Zn-SOD, Mn-SOD, CAT, GR y guaiacol peroxidasa, muestra la aparición de diversos biomarcadores asociados a la contaminación metálica, como los altos niveles de MT, Cu,Zn-SOD, fosfolípidos asociados a la rotura de membrana, perturbación del metabolismo de la energía y del estrés oxidativo, vinculados de manera progresiva al aumento de la contaminación de unas zonas respecto otras.

XVII. El estudio comparativo de los resultados metalómicos y metabolómicos procedentes del ratón de vida libre (*Mus spretus*) procedente de Doñana y su entorno y el ratón de laboratorio *Mus musculus*, sometido este último a experimentos de exposición a elementos tóxicos, como Cd, Hg, As, muestra resultados similares en cuanto a expresión de metalobiomoléculas y alteraciones metabólicas, que demuestran el potencial de estas técnicas en estudios de campo relacionados con la contaminación.

XVIII. Como conclusión final, podemos destacar el potencial del uso combinado de estas técnicas metalómicas y metabolómicas basadas en las plataformas instrumentales y metodológicas descritas, para el estudio de ensayos de exposición a metales en mamíferos, dilucidación de la distribución de metales entre los diversos órganos, interacciones entre elementos, homeostasis y alteraciones metabólicas asociadas. Consecuentemente, ofrece grandes posibilidades para llevar a cabo estudios medioambientales de zonas amenazadas por la

contaminación metálica, con un paradigma metodológico no convencional basado en la respuesta biológica.

The results of the different studies conducted in this doctoral thesis allow establishing the following conclusions:

I. It has been developed and applied new analytical methodologies from a new metallomics/metabolomics approach in order to integrate both methodologies to get a much more complete (holistic) view of the processes occurring in living organisms as a result of contamination, in this case by metal contaminants. In this sense, we have achieved innovative methodological proposals that are to be stating the following conclusions 2 to 5.

II. It has been developed an analytical procedure for the simultaneous speciation of selenometabolitos and selenoproteins (eGPx, $SeO_3^{2-}$, $SeO_4^{2-}$, SEP SeAlb) in human and mouse serum using the coupling 3D/SE-AF-ACS-HPLC-ICP-SUID-ORS-MS using a 8-ports column switching valve. The method was applied to the analysis of these species in serum samples improving the results obtained by other authors, as better chromatographic resolution and elimination of interferences from $Cl^-$ and $Br^-$, usually present in serum.

III. A metallomic procedure has been developed based on the use of orthogonal chromatographic systems integrating size exclusion chromatography (SEC) coupled with on-line anion exchange column (AEC), using ICP-MS and UV as detectors, in order to separate species of Cu / Zn in the cytosol and mitochondrial extracts. The Cu, Zn-SOD purified species were identified after tryptic digestion by mass spectrometry. This procedure allowed for the first time, the absolute identification and quantification of superoxide dismutase (Cu, Zn-SOD) molecules, which is overexpressed in liver cytosol and mitochondria of the mouse *Mus musculus* under mercury exposure experiments.

IV. It has been performed a metabolomic procedure based on the combined use of high resolution mass spectrometry (DI-ESI-QqQ-TOF-MS) with sample introduction by direct infusion, and gas chromatography with mass detector (GC-MS). The approach has been applied to the analysis of mitochondrial extracts of mouse liver cells. The developed metabolomic platform was applied (for the first time) in an exposure experiment of mouse *Mus musculus* to inorganic arsenic during 12 days, proving the alteration of the Krebs cycle and the metabolic pathway of the β-oxidation, as well as amino acids degradation and disturbances in creatinine levels. This non-target analysis provides extensive information on the metabolic function of mitochondria upon exposure to arsenic, which can be applied in toxicological, pharmacological and clinical studies.

V. A metabolomic procedure similar to that described in Conclusion 4 (DI-QqQ-TOF-MS and GC-MS) has been applied to extracts from serum and red blood cells of ~~mouse~~ *Mus musculus* mice exposed to Hg by subcutaneous injection for 10 days. The results show disturbances in the energy metabolism and amino acids, and membrane phospholipid degradation, as well as oxidative stress in serum. Similar alterations were observed in red blood cells metabolism, under Hg exposure, which have been studied for the first time, reflecting alterations in glycolysis, membrane degradation and disturbance of glutathione and ascorbate metabolisms.

VI. The *omic* methodologies developed in the Conclusions 2-5, have been applied to the study of arsenic, mercury and cadmium toxicity in *Mus musculus*, using exposure experiments to these elements.

VII. The toxicological effects caused by exposure of *Mus musculus* to inorganic arsenic, using oral administration for 7 days, were studied using a combination of metallomics with metabolomics and proteomic redox and process evaluation of impaired regulation of related enzymes with oxidative stress, such as superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione reductase (GR) (CAT) and peroxidase, to know the consequences of toxicity caused by this element, verifying that arsenic causes alterations of metabolic pathways, such as altered metabolism energy, amino acid, hill and membrane degradation (apoptosis).

VIII. The biochemical response of mouse *Mus musculus* under subcutaneous inorganic mercury exposure for 14 days, was evaluated applying the *omic* methodologies above described to cytosolic extracts from liver, kidney and serum. The results from SEC-ICP-MS show changes in the metalloproteome in liver and kidney due to interaction with Hg Cu and Zn, which negatively affects the homeostasis of these essential metals. Detection of Hg-Se compound supports the hypothesis about the occurrence of interactions between Hg and Se in mammals. The metabolomic study based on DIMS reveals changes in endogenous metabolites depending on time, a fact that is confirmed by histopathological data in mouse tissues. Thus they were detected disturbance profiles of endogenous metabolites related to energy cycle, membrane degradation and increased presence of lipids in the plasma.

IX. The application of transcriptomics and proteomics procedures (functional genomics) combined with the metabolomic approach developed in this thesis, has been used to study the biological response of mouse *Mus musculus* exposed to Cd, using subcutaneous injection for 10 days. The results show the appearance of a strong lipid peroxidation in liver, overexpression of transcripts related to oxidative stress, metal transport, immune response

and lipid metabolism, and moderate reduction of mRNAs for DNA repair. Applying 2DE-DIGE confirms the presence of hepatic protein changes related to stress and immune response or involved in energy metabolism, suggesting the existence of a metabolic change in liver oxidative phosphorylation to aerobic glycolysis, a fact that was confirmed by metabolomic analysis (DIMS and GC-MS). Such metabolic disorder is particularly important in highly proliferating cells, such as tumor cells, which require the constant supply of chemical precursors for the synthesis of lipids, proteins and nucleic acids.

X. The omic methodologies have been applied to the study of Cd/Se, As/Cd and Hg /Se interactions, using exposure tests in the mouse *Mus musculus*.

XI. The application of SEC-ICP-MS and the multidimensional coupling 2D-SEC-AF-ICP-MS, for speciation of selenium, to study of the process of detoxification of Cd in the mouse *Mus musculus*, under exposure experiments to Cd and Cd+$^{77}$Se, has shown the influence of a toxic element such as cadmium in the production of Se-proteins in plasma, and the element distribution in the body, metals traffic, interactions and homeostasis. For this purpose, it has been applied isotope dilution analysis and isotopic pattern deconvolution techniques (IPD), on the basis of multielement character of ICP-MS detector and its ability to measure different isotopes of the same element.

XII. The application of metalllomic techniques (SEC-ICP-MS and ORS-2D / SEC-AF-ORS-ICP-MS) and metabolomic (DI-ESI (±) -QTOF-MS and GC-MS) using nonspecific isotope dilution techniques (SUID) on the ICP-MS, to the study of As/Cd interactions in *Mus musculus* under exposure experiences, and the study of biochemical parameters in blood, and liver histopathology, allow to characterize the biological effects of the couple As/Cd on

Se-proteins in the blood stream and its action on essential metabolic pathways, such as energy metabolism and stability of cell membranes. In addition, the methodology provides information on damage caused by these toxic metals in the liver, which causes steatosis and infiltration of red blood cells into the space of Disse.

XIII. The interactions between Hg and Se have been evaluated in mouse (*Mus musculus*) using the metallomics and metabolomic techniques described in previous conclusions. The beneficial effect of Se against the toxicity of Hg involves a series of detoxification processes mediated by selenoproteins, which can be seen specially observed in hepatic cytosolic extracts and the bloodstream. It have been also observed changes in the distribution of both elements among the mouse organs, interactions and homeostasis.

XIV. The application of metabolomics and metabolomics methodologies described in previous conclusions, has been transferred to the study of metal contamination in natural areas such as Doñana National Park, using the free-living mouse Mus spretus as bioindicator. This has allowed the assessment pollution through biological response of animals their habitat. For this purpose we have considered the information available from exposure experiments to metals, performed with *Mus musculus*, which has a high genetic homology with the mouse *Mus spretus*. In this way, it has designed a very innovative working method if comparing to more conventional approaches generally used in environmental studies.

XV. It has been applied a metallomic procedure (SEC-ICP-MS combined with AEC and CAC-ICP-MS) to characterize the biological response of free-living mouse *Mus spretus* in Doñana National Park (control) versus surrounding areas with differential pollution. Overexpression of various biomolecules associated with Mn, Cu, Zn, As, Cd, was observed

in liver and kidney, as a result of contamination. It can be mentioned a 32kDa-Mn peak (possible superoxide dismutase), and intense peaks associated to Cu, Zn and Cd, with 7 kDa retention times matching with metallothionein (MT-1) standard, in liver. This peak increased by the action of contaminants. Moreover, the occurrence of other peaks at 32 and 67 kDa, associated with Cu and Zn, also linked to process contamination is observed. These biological responses indicate the existence of an increasing process of pollution in this emblematic area from an ecological point of view.

XVI. The combined application of metabolomics-metabolomic procedures described in the conclusions 2 to 5, to the study of the biological response of mouse *Mus spretus* in the National Park of Doñana, along with the measure of enzymes activity related to oxidative stress, such as Cu, Zn-SOD, Mn-SOD, CAT, GR and guayacol peroxidase, shows the appearance of several biomarkers associated with metal contamination, such as high levels of MT, Cu,Zn-SOD, phospholipids associated with membrane break-down, disruption of energy metabolism and oxidative stress, progressively associated to differential contamination between zones under environmental study.

XVII. The comparative study of metallomic and metabolomic results from free-living mouse (*Mus spretus*) in Doñana National Park and the laboratory mouse *Mus musculus*, this latter subjected to exposure experiments to toxic elements such as Cd, Hg, As, shows similar results in terms metal-biomolecules expression and metabolic disorders, demonstrating the potential of these techniques in field studies related to pollution.

XVIII. As a final conclusion, we highlight the potential of the combined use of these metallomic and metabolomic techniques based on the instrumental and methodological platforms

described previously for the study of exposure experiments to metal in mammals, elucidation of the metal distribution among different organs, interactions between elements, homeostasis and associated metabolic disturbances. Consequently, the possibilities of these techniques are demonstrated to conduct environmental studies in areas threatened by metal contamination, as unconventional methodological paradigm based on the biological response.

# REFERENCIAS

# REFERENCIAS

Abrams, S.A., 2003. Stable isotopes in human nutrition: laboratory, methods and research applications, CABI. ed. Cambridge, MA.

Abrams, S.A., 1999. Using stable isotopes to assess mineral absorption and utilization by children. Am. J. Clin. Nutr.

Abril, N., Ruiz-Laguna, J., García-Sevillano, M.Á., Mata, A.M., Gómez-Ariza, J.L., Pueyo, C., 2014. Heterologous Microarray Analysis of Transcriptome Alterations in Mus spretus Mice Living in an Industrial Settlement. Environ. Sci. Technol. 48, 140205110927004. doi:10.1021/es4053973

Aebersold, R., Mann, M., 2003. Mass spectrometry-based proteomics. Nature 422, 198–207.

Afolabi, O.K., Oyewo, E.B., Adekunle, A.S., Adedosu, O.T., Adedeji, A.L., 2012. Impaired lipid levels and inflammatory response in rats exposed to cadmium. EXCLI J. 11, 677–687.

Agarwal, R. ,Behari, J.R., 2007. Role of Selenium in Mercury Intoxication in Mice. Ind. Health 45, 388–395.

Albaiges, J., Algaba, J., Arambarri, P., Cabrera, F., Baluja, G., Hernández, L.M., Castroviejo, J., 1987. Budget of organic and inorganic pollutants in the doñana national park (Spain). Sci. Total Environ. 63, 13–28.

Alhama, J., Ruiz-Laguna, J., Rodriguez-Ariza, A., Toribio, F., López-Barea, J., Pueyo, C., 1998. Formation of 8-oxoguanine in cellular DNA of Escherichia coli strains defective in different antioxidant defences. Mutagenesis 13, 589–594.

Allen, J., Davey, H.M., Broadhurst, D., Rowland, J.J., Oliver, S.G., Kell, D.B., 2004. Discrimination of modes of action of antifungal substances by use of metabolic footprinting. Appl. Environ. Microbiol. 70, 6157–65.

Alonso, E., Santos, A., Callejon, M., Jimenez, J.C., 2004. Speciation as a screening tool for the determination of heavy metal surface water pollution in the Guadiamar river basin. Chemosphere 56, 561–570.

Alp, O., Zhang, Y., Merino, E.J., Caruso, J.A., 2011. Selenium effects on arsenic cytotoxicity and protein phosphorylation in human kidney cells using chip-based nanoLC-MS/MS. Metallomics 3, 482–90.

Ames, S.K., Gorham, B.M., Abrams, S.A., 1999. Effects of high compared with low calcium intake on calcium absorption and incorporation of iron by red blood cells in small children. Am. J. Clin. Nutr. 70, 44–48.

Andrade, J.M., Cal-Prieto, M.J., Gómez-Carracedo, M.P., Carlosena, A., Prada, D., 2008. A tutorial on multivariate calibration in atomic spectrometry techniques. J. Anal. At. Spectrom. 23, 15–28.

Arzumanyan, E.S., Makhro, A. V., Tyulina, O. V., Boldyrev, A.A., 2000. 10.1007/s10628-008-1011-7. CrossRef List. Deleted DOIs 1, 44–46.

Asara, Y., Marchal, J.A., Carrasco, E., Boulaiz, H., Solinas, G., Bandiera, P., Garcia, M.A., Farace, C., Montella, A., Madeddu, R., 2013. Cadmium modifies the cell cycle and apoptotic profiles of human breast cancer cells treated with 5-fluorouracil. Int. J. Mol. Sci. 14, 16600–16616.

Bains, W., 1996. Company strategies for using bioinformatics. Trends Biotechnol. 14, 312–7.

Ballihaut, G., Pécheyran, C., Mounicou, S., Preud'homme, H., Grimaud, R., Lobinski, R., 2007. Multimode detection (LA-ICP-MS, MALDI-MS and nanoHPLC-ESI-MS2) in 1D and 2D gel electrophoresis for selenium-containing proteins. TrAC Trends Anal. Chem. 26, 183–190.

Baos, R., Jovani, R., Pastor, N., Tella, J.L., Jiménez, B., Gómez, G., González, M.J., Hiraldo, F., 2006. Evaluation of genotoxic effects of heavy metals and arsenic in wild nestling white storks (*Ciconia ciconia*) and black kites (*Milvus migrans*) from southwestern Spain after a mining accident. Environ. Toxicol. Chem. 25, 2794.

Barbas, C., Moraes, E.P., Villaseñor, A., 2011. Capillary electrophoresis as a metabolomics tool for non-targeted fingerprinting of biological samples. J. Pharm. Biomed. Anal. 55, 823–831.

Becker, J.S., 2010. Bioimaging of metals in brain tissue from micrometre to nanometre scale by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry: State of the art and perspectives. Int. J. Mass Spectrom. 289, 65–75.

Becker, J.S., Matusch, A., Becker, J.S., Wu, B., Palm, C., Becker, A.J., Salber, D., 2011. Mass spectrometric imaging (MSI) of metals using advanced BrainMet techniques for biomedical research. Int. J. Mass Spectrom. 307, 3–15.

Becker, J.S., Mounicou, S., Zoriy, M. V, Becker, J.S., Lobinski, R., 2008. Analysis of metal-binding proteins separated by non-denaturating gel electrophoresis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS) and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). Talanta 76, 1183–8.

Becker, J.S., Zoriy, M., Becker, J.S., Dobrowolska, J., Matusch, A., 2007. Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) in elemental imaging of biological tissues and in proteomics. J. Anal. At. Spectrom. 22, 736.

Becker, J.S., Zoriy, M., Dressler, V.L., Wu, B., Becker, J.S., 2008. Imaging of metals and metal-containing species in biological tissues and on gels by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS): A new analytical strategy for applications in life sciences. Pure Appl. Chem. 80, 2643–2655.

Berg, J.M., Shi, Y., 1996. The galvanization of biology: A growing appreciation for the roles of zinc. Science (80-. ). 271, 1081–1085.

Bettmer J, 2005. Metalloproteomics: a challenge for analytical chemists. Anal. Bioanal. Chem. 383, 370–371.

Blanusa, M., Prester, L., Radic, S., Kargacin, B., 1994. Inorganic mercury exposure, mercury-copper interaction, and DMPS treatment in rats, in: Environmental Health Perspectives. pp. 305–307.

Bogdan, G.M., Sampayo-Reyes, A., Vasken Aposhian, H., 1994. Arsenic binding proteins of mammalian systems: I. Isolation of three arsenite-binding proteins of rabbit liver. Toxicology 93, 175–193.

Bonilla-Valverde, D., Ruiz-Laguna, J., Muñoz, A., Ballesteros, J., Lorenzo, F., Gómez-Ariza, J.L., López-Barea, J., 2004. Evolution of biological effects of Aznalcóllar mining spill in the Algerian mouse (Mus spretus) using biochemical biomarkers. Toxicology 197, 123–38. doi:10.1016/j.tox.2003.12.010

Bowen, B.P., Northen, T.R., 2010. Dealing with the unknown: metabolomics and metabolite atlases. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 21, 1471–6. doi:10.1016/j.jasms.2010.04.003

Bravard, A., Campalans, A., Vacher, M., Gouget, B., Levalois, C., Chevillard, S., Radicella, J.P., 2010. Inactivation by oxidation and recruitment into stress granules of hOGG1 but not APE1 in human cells exposed to sub-lethal concentrations of cadmium. Mutat. Res. 685, 61–9.

Brown, R.K., Kelly, F.J., 1996. Peroxides and others products. Free Radicals: a Practical Approach, Oxford.

Bruce, S.J., Tavazzi, I., Parisod, V., Rezzi, S., Kochhar, S., Guy, P.A., 2009. Investigation of Human Blood Plasma Sample Preparation for Performing Metabolomics Using Ultrahigh Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. Anal. Chem. 81, 3285–3296.

Bruins, A.P., 1987. Ion spray interface for combined liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry. Anal. Chem. 59, 2642–2646.

Bruins, M.J., Dane, A.D., Strassburg, K., Vreeken, R.J., Newman, J.W., Salem, N., Tyburczy, C., Brenna, J.T., 2013. Plasma oxylipin profiling identifies polyunsaturated vicinal diols as responsive to arachidonic acid and docosahexaenoic acid intake in growing piglets. J. Lipid Res. 54, 1598–607.

Brzoska, M. M., Rogalska, J., 2013. Protective effect of zinc supplementation against cadmium-induced oxidative stress and the RANK/RANKL/OPG system imbalance in the bone tissue of rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. 272, 208–220.

Bundy, J.G., Davey, M.P., Viant, M.R., 2008. Environmental metabolomics: a critical review and future perspectives. Metabolomics 5, 3–21. doi:10.1007/s11306-008-0152-0

Burk, R.F., Hill, K.E., 2009. Selenoprotein P-expression, functions, and roles in mammals. Biochim. Biophys. Acta 1790, 1441–7.

Busto, M.E. del C., Montes-Bayón, M., Sanz-Medel, A., 2006. Accurate determination of human serum transferrin isoforms: Exploring metal-specific isotope dilution analysis as a quantitative proteomic tool. Anal. Chem. 78, 8218–26.

Cabañero, A.I., Madrid, Y., Cámara, C., 2007. Mercury–Selenium Species Ratio in Representative Fish Samples and Their Bioaccessibility by an In Vitro Digestion Method. Biol. Trace Elem. Res. 119, 195–211.

Cagnin, M., Moreno, S., Aloise, G., Garofalo, G., Villafuerte, R., Gaona, P., Cristaldi, M., 1998. Comparative study of Spanish and Italian terrestrial small mammal coenoses from different biotopes in Mediterranean peninsular tip regions. J. Biogeogr. 25, 1105–1113.

Camacho, J., Moreno, S., 1989. Datos sobre la distribucion espacial de micromamiferos en el Parque Nacional de Doñana. Doñana-Acta Vertebra. 16, 239–245.

Cañas, B., López-Ferrer, D., Ramos-Fernández, A., Camafeita, E., Calvo, E., 2006. Mass spectrometry technologies for proteomics. Brief. Funct. Genomic. Proteomic. 4, 295–320.

Cañas, B., Piñeiro, C., Calvo, E., López-Ferrer, D., Gallardo, J.M., 2007. Trends in sample preparation for classical and second generation proteomics. J. Chromatogr. A 1153, 235–58.

Chatterjee, A., Dasgupta, S., Sidransky, D., 2011. Mitochondrial subversion in cancer. Cancer Prev. Res. (Phila). 4, 638–54.

Chen, C., Yu, H., Zhao, J., Li, B., Qu, L., Liu, S., Zhang, P., Chai, Z., 2006. The Roles of Serum Selenium and Selenoproteins on Mercury Toxicity in Environmental and Occupational Exposure. Environ. Health Perspect. 114, 297–301.

Chen, J., Berry, M.J., 2004. Selenium and selenoproteins in the brain and brain diseases. J. Neurochem. 86, 1–12.

Chen, Y., Hall, M., Graziano, J.H., Slavkovich, V., van Geen, A., Parvez, F., Ahsan, H., 2007. A prospective study of blood selenium levels and the risk of arsenic-related premalignant skin lesions. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 16, 207–13.

Choi, A.L., Budtz-Jørgensen, E., Jørgensen, P.J., Steuerwald, U., Debes, F., Weihe, P., Grandjean, P., 2008. Selenium as a potential protective factor against mercury developmental neurotoxicity. Environ. Res. 107, 45–52.

Clarkson, T.W., 1997. The toxicology of mercury. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.

Clarkson, T.W., 1972. The pharmacology of mercury compounds. Annu. Rev. Pharmacol.

Clarkson, T.W., Magos, L., 2006. The toxicology of mercury and its chemical compounds. Crit. Rev. Toxicol. 36, 609–62.

Clarkson, T.W., Vyas, J.B., Ballatori, N., 2007. Mechanisms of mercury disposition in the body. Am. J. Ind. Med. 50, 757–64.

Coleman, J.E., 1998. Zinc enzymes. Curr. Opin. Chem. Biol. 2, 222–234.

Comisarow, M.B., Marshall, A.G., 1974. Fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy. Chem. Phys. Lett. 25, 282–283.

Consejeria de Medio Ambiente, 2000. Programa de Investigación del Corredor Verde del Guadiamar PICOVER 1999-2002.

Contreras-Acuña, M., García-Barrera, T., García-Sevillano, M.A., Gómez-Ariza, J.L., 2014. Arsenic metabolites in human serum and urine after seafood (Anemonia sulcata) consumption and bioaccessibility assessment using liquid chromatography coupled to inorganic and organic mass spectrometry. Microchem. J. 112, 56–64. doi:10.1016/j.microc.2013.09.007

Cristaldi, M., D'Arcangelo, E., Ieradi, L.A., Mascanzoni, D., Mattei, T., Van Axel Castelli, I., 1990. 137Cs Determination and mutagenicity tests in wild Mus musculus domesticus before and after the Chernobyl accident. Environ. Pollut. 64, 1–9.

Cristaldi, M., Ieradi, L.A., Mascanzoni, D., Mattei, T., 1991. Environmental Impact of the Chernobyl Accident: Mutagenesis in Bank Voles from Sweden. Int. J. Radiat. Biol. 59, 31–40.

Cuvin-Aralar, M.L.A., Furness, R.W., 1991. Mercury and selenium interaction: A review. Ecotoxicol. Environ. Saf. 21, 348–364.

Dakubo, G., 2010. The Warburg Phenomenon and Other Metabolic Alterations of Cancer Cells. In Mitochondrial Genetics and Cancer. Berlin, Heidelberg.

Das, K., Jacob, V., Bouquegneau, J.M., 2002. White-sided dolphin metallothioneins: purification, characterisation and potential role. Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol. 131, 245–251.

Dasgupta, T., Hebbel, R.P., Kaul, D.K., 2006. Protective effect of arginine on oxidative stress in transgenic sickle mouse models. Free Radic. Biol. Med. 41, 1771–80.

Davalos, D., Akassoglou, K., 2012. Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease. Semin. Immunopathol. 34, 43–62.

Davies, M.J., 2005. The oxidative environment and protein damage. Biochim. Biophys. Acta 1703, 93–109. doi:10.1016/j.bbapap.2004.08.007

Davis MT, Stahl DC, Hefta S.A., 1995. A microscale electrospray interface for on-line, capillary liquid chromatography/tandem mass spectrometry of complex peptide mixtures. Anal. Chem. 67, 4549–4556.

De Bièvre, P., 1994. Isotope-dilution mass spectrometry, Tech. Instrum. Anal. Chem. 15, 169– 183.

De Vos, R.C.H., Moco, S., Lommen, A., Keurentjes, J.J.B., Bino, R.J., Hall, R.D., 2007. Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Nat. Protoc. 2, 778–91.

Deagen, J.T., Butler, J.A., Zachara, B.A., Whanger, P.D., 1993. Determination of the distribution of selenium between glutathione peroxidase, selenoprotein P, and albumin in plasma. Anal. Biochem. 208, 176–81.

Degli Esposti, D., Hamelin, J., Bosselut, N., Saffroy, R., Sebagh, M., Pommier, A., Martel, C., Lemoine, A., 2012a. Mitochondrial roles and cytoprotection in chronic liver injury. Biochem. Res. Int. 2012, 387626.

Deitrich, C.L., Braukmann, S., Raab, A., Munro, C., Pioselli, B., Krupp, E.M., Thomas-Oates, J.E., Feldmann, J., 2010. Absolute quantification of superoxide dismutase (SOD) using species-specific isotope dilution analysis. Anal. Bioanal. Chem. 397, 3515–24.

Desideri, E., Vegliante, R., Ciriolo, M.R., 2015. Mitochondrial dysfunctions in cancer: genetic defects and oncogenic signaling impinging on TCA cycle activity. Cancer Lett. 356, 217–23.

Dise, C.A., Goodman, D.B.P., Rasmussen, H., 1980. Definition of the pathway for membrane phospholipid fatty acid turnover in human erythrocytes. J. Lipid Res. 21, 292–300.

Dong, X., Cheng, J., Li, J., Wang, Y., 2010. Graphene as a novel matrix for the analysis of small molecules by MALDI-TOF MS. Anal. Chem. 82, 6208–14.

Dos Santos, A.P.M., Mateus, M.L., Carvalho, C.M.L., Batoréu, M.C.C., 2007. Biomarkers of exposure and effect as indicators of the interference of selenomethionine on methylmercury toxicity. Toxicol. Lett. 169, 121–8.

Dunn, W.B., 2008. Current trends and future requirements for the mass spectrometric investigation of microbial, mammalian and plant metabolomes. Phys. Biol. 5, 011001.

Eaton, P., 2006. Protein thiol oxidation in health and disease: techniques for measuring disulfides and related modifications in complex protein mixtures. Free Radic. Biol. Med. 40, 1889–99. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.12.037

Eckerskorn, C., Strupat, K., Schleuder, D., Hochstrasser, D., Sanchez, J.C., Lottspeich, F., Hillenkamp, F., 1997. Analysis of Proteins by Direct-Scanning Infrared-MALDI Mass Spectrometry after 2D-PAGE Separation and Electroblotting. Anal. Chem. 69, 2888–2892.

El-Maraghy, S.A., Gad, M.Z., Fahim, A.T., Hamdy, M.A., 2001. Effect of cadmium and aluminum intake on the antioxidant status and lipid peroxidation in rat tissues. J. Biochem. Mol. Toxicol. 15, 207–14.

El-Sharaky, A.S., Newairy, A.A., Badreldeen, M.M., Eweda, S.M., Sheweita, S.A., 2007. Protective role of selenium against renal toxicity induced by cadmium in rats. Toxicology 235, 185–93.

Encinar, J.R., Alonso, J.I.G., Sanz-Medel, A., Main, S., Turner, P.J., 2001. A comparison between quadrupole, double focusing and multicollector ICP-MS instruments. Part I. Evaluation of total combined uncertainty for lead isotope ratio measurements. J. Anal. At. Spectrom. 16, 315–321.

Engelmann, J., Henke, J., Willker, W., Kutscher, B., Nössner, G., Engel, J., Leibfritz, D., 1996. Early stage monitoring of miltefosine induced apoptosis in KB cells by multinuclear NMR spectroscopy, in: Anticancer Research. pp. 1429–1439.

Fabbrini, E., Sullivan, S., Klein, S., 2010. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. Hepatology 51, 679–89. doi:10.1002/hep.23280

Fakayode, S.O., Taylor, A., Taylor, A.M., Myers, C., 2012. Determination of Mercury (II) Ion Concentrations in Human Serum Albumin Using Fluorescence Spectroscopy and Multivariate Regression Analysis. Appl. Spectrosc. 66, 999–1004.

Falnoga, I., Tusek-Znidaric, M., 2007. Selenium-mercury interactions in man and animals. Biol. Trace Elem. Res. 119, 212–20.

Fang, S.C., 1974. Induction of C-Hg cleavage enzymes in rat liver by dietary selenite. RES.COMMUN.CHEM.PATH.PHAR MACOL. 9, 579–582.

Farina, M., Rocha, J.B.T., Aschner, M., 2011. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: evidence from experimental studies. Life Sci. 89, 555–63.

Fassett, J.D., Paulsen, P.J., 1989. Isotope dilution mass spectrometry for accurate elemental analysis. Anal. Chem.

Fattorini, D., Regoli, F., 2004. Arsenic speciation in tissues of the mediterranean polychaete *Sabella spallanzanii.* Environ. Toxicol. Chem. 23, 1881.

Favretto, D., Cosmi, E., Ragazzi, E., Visentin, S., Tucci, M., Fais, P., Cecchetto, G., Zanardo, V., Viel, G., Ferrara, S.D., 2012. Cord blood metabolomic profiling in intrauterine growth restriction. Anal. Bioanal. Chem. 402, 1109–21.

Ferrarello, C.N., Ruiz Encinar, J., Centineo, G., Garc??a Alonso, J.I., Fern??ndez de la Campa, M.R., Sanz-Medel, A., 2002. Comparison of three different ICP-MS instruments in the study of cadmium speciation in rabbit liver metallothionein-1 using reversed-phase HPLC and post-column isotope dilution analysisPresented at the 2002 Winter Conference on Plasma Spectrometry, Scotts. J. Anal. At. Spectrom. 17, 1024–1029.

Fiehn, O., 2002. Metabolomics - The link between genotypes and phenotypes. Plant Mol. Biol. 48, 155–171.

Finkel, N.H., Prevo, B.G., Velev, O.D., He, L., 2005. Ordered Silicon Nanocavity Arrays in Surface-Assisted Desorption/Ionization Mass Spectrometry. Anal. Chem. 77, 1088–1095.

Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.F., Dougherty, B.A., Merrick, J.M., McKenney, K., Sutton, G., FitzHugh, W., Fields, C., Gocayne, J.D., Scott, J., Shirley, R., Liu, L.I., Glodek, A., Kelley, J.M., Weidman, J.F., Phillips, C.A., Spriggs, T., Hedblom, E., Cotton, M.D., Utterback, T.R., Hanna, M.C., Nguyen, D.T., Saudek, D.M., Brandon, R.C., Fine, L.D., Fritchman, J.L., Fuhrmann, J.L., Geoghagen, N.S.M., Gnehm, C.L., McDonald, L.A., Small, K. V., Fraser, C.M., Smith, H.O., Venter, J.C., 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of Haemophilus influenzae Rd. Science (80-. ). 269, 496–512.

Flohe, L., Otting, F., 1984. Superoxide dismutase assays. Methods Enzymol.

Forstner, U., Wittman, G.T.., 1981. Metal Pollution in the Aquatic environment, 2nd ed. Berlin, Heidelberg.

Fridovich, I., 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. Annu. Rev. Biochem. 64,97.

Fridovich, I., 1986. Superoxide dismutases. Adv. Enzymol. 58, 61.

Gailer, J., George, G.N., Pickering, I.J., Madden, S., Prince, R.C., Yu, E.Y., Denton, M.B., Younis, H.S., Aposhian, H.V., 2000. Structural Basis of the Antagonism between Inorganic Mercury and Selenium in Mammals. Chem. Res. Toxicol. 13, 1135–1142.

Galuska, C.E., Hartmann, M.F., Sánchez-Guijo, A., Bakhaus, K., Geyer, J., Schuler, G., Zimmer, K.-P., Wudy, S.A., 2013. Profiling intact steroid sulfates and unconjugated steroids in biological fluids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). Analyst 138, 3792–801.

Ganti, S., Weiss, R.H., 2011. Urine metabolomics for kidney cancer detection and biomarker discovery. Urol. Oncol. 29, 551–7.

Gao, S., Zhang, Z.-P., Karnes, H.T., 2005. Sensitivity enhancement in liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry using derivatization and mobile phase additives. J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 825, 98–110.

Garcia, A., Barbas, C., 2011. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)-based metabolomics. Methods Mol. Biol. 708, 191–204. doi:10.1007/978-1-61737-985-7_11

García Alonso, J.I., Gutiérrez Camblor, M., Montes Bayón, M., Marchante-Gayón, J.M., Sanz-Medel, A., 1997. Different quantification approaches for the analysis of biological and environmental samples using inductively coupled plasma mass spectrometry. Journal of mass spectrometry 32, 556-564. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9888(199705)32:5<556

García Novo, F., Merino Ortega, J., Ramírez Díaz, L., Ródenas Larios, M., Sancho Royo, F., Torres Martínez, A., González Bernáldez, F., Díaz Pineda, F., Allier, C., Bresset, V., Lacaste, A., 1977. Doñana, Prospección e inventario de ecosistemas. Ministerio de Agricultura, Madrid.

García-Barrera, T., Gómez-Ariza, J.L., González-Fernández, M., Moreno, F., García-Sevillano, M.A., Gómez-Jacinto, V., 2012. Biological responses related to agonistic, antagonistic and synergistic

interactions of chemical species. Anal. Bioanal. Chem. 403, 2237–53. doi:10.1007/s00216-012-5776-2.

García-Sevillano, M.A., González-Fernández, M., Jara-Biedma, R., García-Barrera, T., López-Barea, J., Pueyo, C., Gómez-Ariza, J.L., 2012. Biological response of free-living mouse Mus spretus from Doñana National Park under environmental stress based on assessment of metal-binding biomolecules by SEC-ICP-MS. Anal. Bioanal. Chem. 404, 1967–81. doi:10.1007/s00216-012-6274-2.

García-Sevillano, M.A., González-Fernández, M., Jara-Biedma, R., García-Barrera, T., Vioque-Fernández., A., López-Barea, J., Pueyo, C., Gómez-Ariza, J.L., 2012b. Speciation of arsenic metabolites in the free-living mouse *Mus spretus* from Doñana National Park used as a bioindicator for environmental pollution monitoring. Chem. Papers 66, 914-924.

García-Sevillano, M.A., García-Barrera, T., Gómez-Ariza, J.L., 2013a. Development of a new column switching method for simultaneous speciation of selenometabolites and selenoproteins in human serum. J. Chromatogr. A 1318, 171–9. doi:10.1016/j.chroma.2013.10.012.

García-Sevillano, M.A., García-Barrera, T., Navarro, F., Gómez-Ariza, J.L., 2013b. Analysis of the biological response of mouse liver (*Mus musculus*) exposed to $As_2O_3$ based on integrated -*omics* approaches. Metallomics 5, 1644–55. doi:10.1039/c3mt00186e

García-Sevillano, M.A., Jara-Biedma, R., González-Fernández, M., García-Barrera, T., Gómez-Ariza, J.L., 2013c. Metal interactions in mice under environmental stress. Biometals 26, 651–66.

García-Sevillano, M.A., García Barrera, T., Abril, N., Pueyo, C., López-Barea, J., Gómez-Ariza, J.L., 2013d. *Omics* technologies and their applications to evaluate metal toxicity in *M. spretus* mice as bioindicator. J. Proteomics 6, 237-48.

García-Sevillano, M.A., García-Barrera, T., Navarro, F., Gómez-Ariza, J.L. 2013e. Use of Metallomics and Metabolomics to Assess Metal Pollution in Doñana National Park (SW Spain). Environ. Sci. Technol., 48, 7747-7755.

García-Sevillano, M.A., García-Barrera, T., Gómez-Ariza, J.L., 2013f. Inorganic mass spectrometrybased metallomics for environmental monitoring of terrestrial ecosyste ms affected by metal pollution using Mus spretus as bioindicator. Integrated OMICS, 3, 88-98.

García-Sevillano, M.A., García-Barrera, T., Navarro, F., Gailer, J., Gómez-Ariza, J.L., 2014a. Use of elemental and molecular-mass spectrometry to assess the toxicological effects of inorganic mercury in the mouse *Mus musculus*. Anal. Bioanal. Chem. 406, 5853–65. doi:10.1007/s00216-014-8010-6.

García-Sevillano, M.Á., García-Barrera, T., Abril, N., Pueyo, C., López-Barea, J., Gómez-Ariza, J.L., 2014b. *Omics* technologies and their applications to evaluate metal toxicity in mice *M. spretus* as a bioindicator. J. Proteomics 104, 4–23. doi:10.1016/j.jprot.2014.02.032.

García-Sevillano, M.A., García-Barrera, T., Gómez-Ariza, J.L., 2014c. Absolute quantification of superoxide dismutase in cytosol and mitochondria of mice hepatic cells exposed to mercury by a novel metallomic approach, Anal Chim Acta. 842:42-50.

García-Sevillano, M.A., García-Barrera, T., Navarro, F., Gómez-Ariza, J.L., 2014d. Metabolomic study in plasma, liver and kidney of mice exposed to inorganic arsenic based on mass spectrometry. Anal. Bioanal. Chem. 406, 1455-69.

García-Sevillano, M.A., García-Barrera, T., Navarro, F., Gómez-Ariza, J.L., 2014e. Application of metallomic and metabolomic approaches in exposure experiments of laboratory mice for environmental metal toxicity assessment. Metallomics 6, 237-248.

García-Sevillano, M.A., García-Barrera, T., Navarro, F., Gómez-Ariza, J.L., 2014f. Cadmium toxicity in *Mus musculus* mice based on a metallomic study. Antagonistic interaction between Se and Cd in the bloodstream. Metallomics 6, 672-81.

García-Sevillano, M.A., García-Barrera, Gómez-Ariza, J.L., 2014g. Simultaneous speciation of selenoproteins and selenometabolites in plasma and serum by dual size exclusion-affinity chromatography with online isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry. Anal. .Bioanal. Chem. 406, 2719-2725.

García-Sevillano, M.A., Abril, N., Fernández-Cisnal, R., García Barrera, T., Pueyo, C., López-Barea, J., Gómez-Ariza, J.L., 2015a. Functional genomics and metabolomics reveal the toxicological effects of cadmium in *Mus musculus* mice. Metabolomics, 11, 1432-50.

García-Sevillano, M.A., Rodríguez-Moro, G., García-Barrera, T., Navarro, F., Gómez-Ariza, J.L., 2015b. Biological interactions between mercury and selenium in the distribution and detoxification processes in the mouse *Mus musculus* under controlled exposure. Effects on selenoproteins. Chem. Biol. Interactions. 229, 82-90.

García-Sevillano, M.A., García-Barrera, T., Navarro, F., Abril, N., Pueyo, C., López-Barea, J., Gómez-Ariza, J.L., 2015c. Combination of direct infusion mass spectrometry and gas chromatography mass spectrometry for toxicometabolomic study of red blood cells and serum of mice *Mus musculus* after mercury exposure. J Chromatography B 985, 75-84.

García-Sevillano, M.A., García-Barrera, T., Navarro, F., Montero-Lobato, Z., Gómez-Ariza, J.L., 2015d. Shotgun metabolomic approach by mass spectrometry in mouse hepatic mitochondria. A toxicometabolomic study in mice under acute arsenic exposure. Biometals 28, 341-351.

García-Sevillano, M.A., García-Barrera, Gómez-Ariza, J.L., 2015e. Environmental metabolomics: Biological markers for metal toxicity. Electrophoresis 36, 2348-2365.

*Geiszinger, A.E., Goessler, W., Francesconi, K.A., 2002. The marine polychaete Arenicola marina: its unusual arsenic compound pattern and its uptake of arsenate from seawater. M*ar. Environ. Res. 53, 37–50.

Gharbi, S., Gaffney, P., Yang, A., Zvelebil, M.J., Cramer, R., Waterfield, M.D., Timms, J.F., 2002. Evaluation of two-dimensional differential gel electrophoresis for proteomic expression analysis of a model breast cancer cell system. Mol. Cell. Proteomics 1, 91–98.

Girotti, A.W., 1985. Mechanisms of lipid peroxidation. J. Free Radic. Biol. Med. 1, 87–95.

Glantzounis, G., Tsimoyiannis, E., Kappas, A., Galaris, D., 2005. Uric Acid and Oxidative Stress. Curr. Pharm. Des. 11, 4145–4151.

Glaser, V., Nazari, E.M., Müller, Y.M.R., Feksa, L., Wannmacher, C.M.D., Rocha, J.B.T., de Bem, A.F., Farina, M., Latini, A., 2010. Effects of inorganic selenium administration in methylmercury-induced neurotoxicity in mouse cerebral cortex. Int. J. Dev. Neurosci. 28, 631–7.

Glass, R.S., Berry, M.J., Block, E., Boakye, H.T., Carlson, B.A., Gailer, J., George, G.N., Gladyshev, V.N., Hatfield, D.L., Jacobsen, N.E., Johnson, S., Kahakachchi, C., Kamiński, R., Manley, S.A., Mix, H., Pickering, I.J., Prenner, E.J., Saira, K., Skowrońska, A., Tyson, J.F., Uden, P.C., Wu, Q., Xu, X.-M., Yamdagni, R., Zhang, Y., 2008. Insights into the Chemical Biology of Selenium. Phosphorus. Sulfur. Silicon Relat. Elem. 183, 924–930.

Go, E.P., Apon, J. V, Luo, G., Saghatelian, A., Daniels, R.H., Sahi, V., Dubrow, R., Cravatt, B.F., Vertes, A., Siuzdak, G., 2005. Desorption/ionization on silicon nanowires. Anal. Chem. 77, 1641–6.

Goenaga Infante, H., Campenhout, K. Van, Schaumlffel, D., Blust, R., Adams, F.C., 2003. Multi-element speciation of metalloproteins in fish tissue using size-exclusion chromatography coupled on-line with ICP-isotope dilution-time-of-flight-mass spectrometry. Analyst 128, 651.

Gómez-Ariza, J.L., García-Barrera, T.. Lorenzo, F., Bernal, V., Villegas, M.J., Oliveira, V., 2004. Use of mass spectrometry techniques for the characterization of metal bound to proteins (metallomics) in biological systems. Anal. Chim. Acta, 524, 15–22.

Gómez-Ariza, J.L., Lorenzo, F., García-Barrera, T., 2005. Sample treatment selection for routine mercury speciation in seafood by gas chromatography-atomic fluorescence spectroscopy. Appl. Organomet. Chem. 19, 600–604.

Gómez-Ariza, J.L., Gonzalez-Fernandez, M., Garcia-Barrera, T., Lopez-Barea, J., Pueyo, C., 2008. Integration metallomics, proteomics and transcriptomics in environmental issues, in: Chemicke Listy.

Gómez-Ariza, J.L., Jahromi, E.Z., González-Fernández, M., García-Barrera, T., Gailer, J., 2011. Liquid chromatography-inductively coupled plasma-based metallomic approaches to probe health-relevant interactions between xenobiotics and mammalian organisms. Metallomics 3, 566–77. doi:10.1039/c1mt00037c.

González-Fernández, M., García-Barrera, T., Jurado, J., Prieto-Álamo, M.J., Pueyo, C., López-Barea, J., Gómez-Ariza, J.L., 2008. Integrated application of transcriptomics, proteomics, and metallomics in environmental studies. Pure Appl. Chem. 80, 2609–2626. doi:10.1351/pac200880122609.

González-Fernández, M., García-Barrera, T., Gómez-Ariza, J.L., 2011. Molecular mass spectrometric identification of superoxide dismutase in the liver of mice Mus musculus and Mus spretus using a metallomics analytical approach. Anal. Bioanal. Chem. 401, 2779–83.

Gonzalez-Fernández, M., García-Sevillano, M.A., Jara-Biedma, R., García-Barrera, T., Vioque, A., López-Barea, J., Pueyo, C., Gómez-Ariza, J.L., 2011. Size characterization of metal species in liver and brain from free-living (Mus spretus) and laboratory (Mus Musculus) mice by SEC-ICP-MS: Application to environmental contamination assessment. J. Anal. At. Spectrom. 26, 141–149. doi:10.1039/C0JA00127A.

González-Fernandez, M., García-Sevillano, M.A., Jara-Biedma, R., Navarro-Roldán, F., García-Barrera, T., López-Barea, J., Pueyo, C., Gomez-Ariza, J.L., 2013. Use of metallomics in environmental pollution assessment using mice mus musculus/mus spretus as bioindicators. Curr. Anal. Chem. 9, 229–243.

González Iglesias, H., Fernández Sánchez, M.L., García Alonso, J.I., Sanz-Medel, A., 2007. Use of enriched 74Se and 77Se in combination with isotope pattern deconvolution to differentiate and determine endogenous and supplemented selenium in lactating rats. Anal. Bioanal. Chem. 389, 707–13.

González Iglesias, H., Fernández Sánchez, M.L., Rodríguez-Castrillón, J.A., García-Alonso, J.I., López Sastre, J., Sanz-Medel, A., 2009. Enriched stable isotopes and isotope pattern deconvolution for quantitative speciation of endogenous and exogenous selenium in rat urine by HPLC-ICP-MS. J. Anal. At. Spectrom. 24, 460.

González-Iglesias, H., Fernández-Sánchez, M.L., López-Sastre, J., Sanz-Medel, A., 2012. Nutritional iron supplementation studies based on enriched (57) Fe, added to milk in rats, and isotope pattern deconvolution-ICP-MS analysis. Electrophoresis 33, 2407–15.

Gorshkov, M. V., Tolic, P., Paša Tolić, L., Udseth, H.R., Anderson, G.A., Huang, B.M., Bruce, J.E., Prior, D.C., Hofstadler, S.A., Tang, L., Chen, L.-Z., Willett, J.A., Rockwood, A.L., Sherman, M.S., Smith, R.D., 1998. Electrospray ionization—Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry at 11.5 tesla: Instrument design and initial results. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 9, 692–700.

Goyer, R.A., Clarkson, T., 2001. Toxic effects of metals. Casarett and Doull's Toxicology the Basic Science of Poisons. C.D. Klaassen. Kansas.811-867.

Grandjean, P., Brown, S.S., Reavey, P., Young, D.S., 1994. Biomarkers of chemical exposure: State of the art, in: Clinical Chemistry. pp. 1360–1362.

Griffin, J.., Mann, C.., Scott, J., Shoulders, C.., Nicholson, J.., 2001. Choline containing metabolites during cell transfection: an insight into magnetic resonance spectroscopy detectable changes. FEBS Lett. 509, 263–266. doi:10.1016/S0014-5793(01)03175-1.

Griffin, J.L., Blenkiron, C., Valonen, P.K., Caldas, C., Kauppinen, R.A., 2006. High-resolution magic angle spinning 1H NMR spectroscopy and reverse transcription-PCR analysis of apoptosis in a rat glioma. Anal. Chem. 78, 1546–52.

Griffiths, W.J., Koal, T., Wang, Y., Kohl, M., Enot, D.P., Deigner, H.-P., 2010. Targeted metabolomics for biomarker discovery. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 49, 5426–45.

Gromadzińska, J., Wasowicz, W., Sklodowska, M., Bulikowski, W., Rydzyński, K., 1996. The influence of atmospheric chromium on selenium content and glutathione peroxidase activity in blood of tannery workers. Environ. Health Perspect. 104, 1312–1316.

Guan, Z., Drader, J.J., Campbell, V.L., Laude, D.A., 1995. Real-Time Monitoring of the Gas Phase Reactions of a Single Ion Population Using the Remeasurement Experiment in Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. Anal. Chem. 67, 1453–1458.

Gürer, H., Ozgünes, H., Saygin, E., Ercal, N., 2001. Antioxidant effect of taurine against lead-induced oxidative stress. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 41, 397–402. doi:10.1007/s002440010265.

Halket, J.M., Waterman, D., Przyborowska, A.M., Patel, R.K.P., Fraser, P.D., Bramley, P.M., 2005. Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. J. Exp. Bot. 56, 219–43.

Hall, J.L., 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. J. Exp. Bot.

Hamann, I., König, C., Richter, C., Jahnke, G., Hartwig, A., 2012. Impact of cadmium on hOGG1 and APE1 as a function of the cellular p53 status. Mutat. Res. 736, 56–63.

Han, J., Tschernutter, V., Yang, J., Eckle, T., Borchers, C.H., 2013. Analysis of selected sugars and sugar phosphates in mouse heart tissue by reductive amination and liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. Anal. Chem. 85, 5965–73.

Hansen, J.C., Deguchi, Y., 1996. Selenium and fertility in animals and man - A review. Acta Vet. Scand.

Hansen, R.E., Roth, D., Winther, J.R., 2009. Quantifying the global cellular thiol-disulfide status. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106, 422–7. doi:10.1073/pnas.0812149106.

Harvey, D.J., 1999. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates. Mass Spectrom. Rev. 18, 349–451.

Hems, D.A., 1972. Metabolism of glutamine and glutamic acid by isolated perfused kidneys of normal and acidotic rats. Biochem. J. 130, 671–680.

Herbert G.C., Johnstone .R.A.W., 2000. Mass Spectrometry Basic. CRC Press LLC, Florida.

Heumann, K.G., 2004. Isotope-dilution ICP-MS for trace element determination and speciation: from a reference method to a routine method? Anal. Bioanal. Chem. 378, 318–29.

Heumann, K.G., 1998. Isotope dilution mass spectrometry, in: F. Adams, R. Gijbels, R. Van Grieken (Eds.), Inorganic Mass Spectrometry, Wiley, New York, 301-376.

Heumann, K.G., 1992. Isotope dilution mass spectrometry (IDMS) of the elements. Mass Spectrom. Rev. 11, 41–67.

Heumann, K.G., 1990. Elemental species analysis with isotope dilution mass spectrometry. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg. 153-168.

Heumann, K.G., Rottmann, L., Vogl, J., 1994. Elemental speciation with liquid chromatography-inductively coupled plasma isotope dilution mass spectrometry. J. Anal. At. Spectrom. 9, 1351–1355.

Hill, C.H., Matrone, G., 1970. Chemical parameters in the study of in vivo and in vitro interactions of transition elements. Fed. Proc. 29, 1474–1481.

Hillenkamp, F., Karas, M., Beavis, R.C., Chait, B.T., 1991. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. Anal. Chem. 63.

Hinojosa Reyes, L., Marchante-Gayon, J.M., Garcia Alonso, J.I., Sanz-Medel, A., 2003. Quantitative speciation of selenium in human serum by affinity chromatography coupled to post-column isotope dilution analysis ICP-MS. J. Anal. At. Spectrom. 18, 1210.

Hirano, S., Cui, X., Li, S., Kanno, S., Kobayashi, Y., Hayakawa, T., Shraim, A., 2009. Difference in uptake and toxicity of trivalent and pentavalent inorganic arsenic in rat heart microvessel endothelial cells. *Arch. Toxicol.,* 77, 305-312.

Hoeferlin, L.A., Fekry, B., Ogretmen, B., Krupenko, S.A., Krupenko, N.I., 2013. Folate stress induces apoptosis via p53-dependent de novo ceramide synthesis and up-regulation of ceramide synthase 6. J. Biol. Chem. 288, 12880–90.

Hoffman, D.J., Heinz, G.H., 1998. EFFECTS OF MERCURY AND SELENIUM ON GLUTATHIONE METABOLISM AND OXIDATIVE STRESS IN MALLARD DUCKS. Environ. Toxicol. Chem. 17, 161.

Horvat, M., Nolde, N., Fajon, V., Jereb, V., Logar, M., Lojen, S., Jacimovic, R., Falnoga, I., Liya, Q., Faganeli, J., Drobne, D., 2003. Total mercury, methylmercury and selenium in mercury polluted areas in the province Guizhou, China. Sci. Total Environ. 304, 231–56.

Hu, L., He, B., Wang, Y., Jiang, G., Sun, H., 2012. Metallomics in environmental and health related research: Current status and perspectives. Chinese Sci. Bull. 58, 169–176.

Hu, Q., Noll, R.J., Li, H., Makarov, A., Hardman, M., Graham Cooks, R., 2005. The Orbitrap: a new mass spectrometer. J. Mass Spectrom. 40, 430–43.

Hunt, D.F., Buko, A.M., Ballard, J.M., Shabanowitz, J., Giordani, A.B., 1981. Sequence analysis of polypeptides by collision activated dissociation on a triple quadrupole mass spectrometer. Biomed. Mass Spectrom. 8, 397–408.

Hurná, E., Siklenka, P., Hurná, S., 1997. Effect of selenium on cadmium genotoxicity investigated by micronucleus assay. Vet. Med. (Praha). 42, 339–342.

Idborg, H., Zamani, L., Edlund, P.-O., Schuppe-Koistinen, I., Jacobsson, S.P., 2005. Metabolic fingerprinting of rat urine by LC/MS Part 2. Data pretreatment methods for handling of complex data. J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 828, 14–20.

Ieradi, L.A., Cristaldi, M., Mascanzoni, D., Cardarelli, E., Grossi, R., Campanella, L., 1996. Genetic damage in urban mice exposed to traffic pollution. Environ. Pollut. 92, 323–328.

Ieradi, L.A., Moreno, S., Bolívar, J.P., Cappai, A., Di Benedetto, A., Cristaldi, M., 1998. Free-living rodents as bioindicators of genetic risk in natural protected areas. Environ. Pollut. 102, 265–268.

Jayasinghe, S.B., Caruso, J.A., 2011. Investigation of Se-containing proteins in Bertholletia excelsa H.B.K. (Brazil nuts) by ICPMS, MALDI-MS and LC–ESI-MS methods. Int. J. Mass Spectrom. 307, 16–27.

Jia, S., Kang, Y.P., Park, J.H., Lee, J., Kwon, S.W., 2011. Simultaneous determination of 23 amino acids and 7 biogenic amines in fermented food samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1218, 9174–82.

Jihen, E.H., Fatima, H., Nouha, A., Baati, T., Imed, M., Abdelhamid, K., 2010. Cadmium retention increase: a probable key mechanism of the protective effect of zinc on cadmium-induced toxicity in the kidney. Toxicol. Lett. 196, 104–9.

Jitaru, P., Goenaga-Infante, H., Vaslin-Reimann, S., Fisicaro, P., 2010. A systematic approach to the accurate quantification of selenium in serum selenoalbumin by HPLC-ICP-MS. Anal. Chim. Acta 657, 100–7.

Jitaru, P., Prete, M., Cozzi, G., Turetta, C., Cairns, W., Seraglia, R., Traldi, P., Cescon, P., Barbante, C., 2008. Speciation analysis of selenoproteins in human serum by solid-phase extraction and affinity HPLC hyphenated to ICP-quadrupole MS. J. Anal. At. Spectrom. 23, 402–406.

Jurczuk, M., 2003. Iron body status of rats chronically exposed to cadmium and ethanol. Alcohol Alcohol. 38, 202–207.

Jurczuk, M., Brzóska, M.M., Moniuszko-Jakoniuk, J., Gałazyn-Sidorczuk, M., Kulikowska-Karpińska, E., 2004. Antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to cadmium and ethanol. Food Chem. Toxicol. 42, 429–38.

Kaderbhai, N.N., Broadhurst, D.I., Ellis, D.I., Goodacre, R., Kell, D.B., 2003. Functional genomics via metabolic footprinting: monitoring metabolite secretion by Escherichia coli tryptophan metabolism mutants using FT-IR and direct injection electrospray mass spectrometry. Comp. Funct. Genomics 4, 376–91. doi:10.1002/cfg.302.

Kaltashov, I.A., Zhang, M., Eyles, S.J., Abzalimov, R.R., 2006. Investigation of structure, dynamics and function of metalloproteins with electrospray ionization mass spectrometry. Anal. Bioanal. Chem. 386, 472–81.

Kell, D.B., Brown, M., Davey, H.M., Dunn, W.B., Spasic, I., Oliver, S.G., 2005. Metabolic footprinting and systems biology: the medium is the message. Nat. Rev. Microbiol. 3, 557–565.

Kil, I.S., Shin, S.W., Yeo, H.S., Lee, Y.S., 2006. Mitochondrial NADP+-Dependent Isocitrate Dehydrogenase Protects Cadmium-Induced Apoptosis. Mol. Pharmacol. 70, 1053–1061.

Kim, J.Y., Ozato, K., 2009. The sequestosome 1/p62 attenuates cytokine gene expression in activated macrophages by inhibiting IFN regulatory factor 8 and TNF receptor-associated factor 6/NF-kappaB activity. J. Immunol. 182, 2131–40.

Kind, T., Tolstikov, V., Fiehn, O., Weiss, R.H., 2007. A comprehensive urinary metabolomic approach for identifying kidney cancerr. Anal. Biochem. 363, 185–95.

Kingdon, K.H., 1923. A Method for the Neutralization of Electron Space Charge by Positive Ionization at Very Low Gas Pressures. Phys. Rev. 21, 408–418.

Kitchin, K.T., 2001. Recent advances in arsenic carcinogenesis: modes of action, animal model systems, and methylated arsenic metabolites. Toxicol. Appl. Pharmacol. 172, 249–61.

Kitchin, K.T., Wallace, K., 2008. The role of protein binding of trivalent arsenicals in arsenic carcinogenesis and toxicity. J. Inorg. Biochem. 102, 532–9.

Koivusalo, M., Haimi, P., Heikinheimo, L., Kostiainen, R., Somerharju, P., 2001. Quantitative determination of phospholipid compositions by esi-ms: Effects of acyl chain length, unsaturation, and lipid concentration on instrument response. J. Lipid Res. 42, 663–672.

Koppenaal, D.W., Hieftje, G.M., 2007. Metallomics?an interdisciplinary and evolving field. J. Anal. At. Spectrom. 22, 855.

Koruda, T., 1995. Transfer of copper and zinc from ionic and metallothionein-bound forms to Cu, Zn--superoxide dismutase. Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol. 87, 287.

Koyu, A., Gokcimen, A., Ozguner, F., Bayram, D.S., Kocak, A., 2006. Evaluation of the effects of cadmium on rat liver. Mol. Cell. Biochem. 284, 81–5.

Krause, E., Wenschuh, H., Jungblut, P.R., 1999. The Dominance of Arginine-Containing Peptides in MALDI-Derived Tryptic Mass Fingerprints of Proteins. Anal. Chem. 71, 4160–4165.

Kruk, I., 1998. Environmental Toxicology and Chemistry of Oxygen Species. Berlin, Heidelberg.

Kryukov, G. V, Castellano, S., Novoselov, S. V, Lobanov, A. V, Zehtab, O., Guigó, R., Gladyshev, V.N., 2003. Characterization of mammalian selenoproteomes. Science 300, 1439–43.

Kufner, M.C., 1986. Tamaño, actividad, densidad relativa y preferencia de hábitat de los pequeños y medianos mamíferos de Doñana como factores condicionantes de su tasa de predación. Universidad Autónoma de Madrid.

Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, a, Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J.P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, a, Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, a, Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, a, Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, a, Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, a, Jones, M., Lloyd, C., McMurray, a, Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J.C., Mungall, a, Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R.H., Wilson, R.K., Hillier, L.W., McPherson, J.D., Marra, M. a, Mardis, E.R., Fulton, L. a, Chinwalla, a T., Pepin, K.H., Gish, W.R., Chissoe, S.L., Wendl, M.C., Delehaunty, K.D., Miner, T.L., Delehaunty, a, Kramer, J.B., Cook, L.L., Fulton, R.S., Johnson, D.L., Minx, P.J., Clifton, S.W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J.F., Olsen, a, Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., Gibbs, R. a, Muzny, D.M., Scherer, S.E., Bouck, J.B., Sodergren, E.J., Worley, K.C., Rives, C.M., Gorrell, J.H., Metzker, M.L., Naylor, S.L., Kucherlapati, R.S., Nelson, D.L., Weinstock, G.M., Sakaki, Y., Fujiyama, a, Hattori, M., Yada, T., Toyoda, a, Itoh, T., Kawagoe, C., Watanabe, H., Totoki, Y., Taylor, T., Weissenbach, J., Heilig, R., Saurin, W., Artiguenave, F., Brottier, P., Bruls, T., Pelletier, E., Robert, C., Wincker, P., Smith, D.R., Doucette-Stamm, L., Rubenfield, M., Weinstock, K., Lee, H.M., Dubois, J., Rosenthal, a, Platzer, M., Nyakatura, G., Taudien, S., Rump, a, Yang, H., Yu, J., Wang, J., Huang, G., Gu, J., Hood, L., Rowen, L., Madan, a, Qin, S., Davis, R.W., Federspiel, N. a, Abola, a P., Proctor, M.J., Myers, R.M., Schmutz, J., Dickson, M., Grimwood, J., Cox, D.R., Olson, M. V, Kaul, R., Shimizu, N., Kawasaki, K., Minoshima, S., Evans, G. a, Athanasiou, M., Schultz, R., Roe, B. a, Chen, F., Pan, H., Ramser, J., Lehrach, H., Reinhardt, R., McCombie, W.R., de la Bastide, M., Dedhia, N., Blöcker, H., Hornischer, K., Nordsiek, G., Agarwala, R., Aravind, L., Bailey, J. a, Bateman, a, Batzoglou, S., Birney, E., Bork, P., Brown, D.G., Burge, C.B., Cerutti, L., Chen, H.C., Church, D., Clamp, M., Copley, R.R., Doerks, T., Eddy, S.R., Eichler, E.E., Furey, T.S., Galagan, J., Gilbert, J.G., Harmon, C., Hayashizaki, Y., Haussler, D., Hermjakob, H., Hokamp, K., Jang, W., Johnson, L.S., Jones, T. a, Kasif, S., Kaspryzk, a, Kennedy, S., Kent, W.J., Kitts, P., Koonin, E. V, Korf, I., Kulp, D., Lancet, D., Lowe, T.M., McLysaght, a, Mikkelsen, T., Moran, J. V, Mulder, N., Pollara, V.J., Ponting, C.P., Schuler, G., Schultz, J., Slater, G., Smit, a F., Stupka, E., Szustakowski, J., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Wagner, L., Wallis, J., Wheeler, R., Williams, a, Wolf, Y.I., Wolfe, K.H., Yang, S.P., Yeh, R.F., Collins, F., Guyer, M.S., Peterson, J., Felsenfeld, a, Wetterstrand, K. a, Patrinos, a, Morgan, M.J., de Jong, P., Catanese, J.J., Osoegawa, K., Shizuya, H., Choi, S., Chen, Y.J., Szustakowki, J., 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 409, 860–921. doi:10.1038/35057062.

Larregle, E. V, Varas, S.M., Oliveros, L.B., Martinez, L.D., Antón, R., Marchevsky, E., Giménez, M.S., 2008. Lipid metabolism in liver of rat exposed to cadmium. Food Chem. Toxicol. 46, 1786–92.

Lavine, B., Workman, J.J., 2004. Chemometrics. Anal. Chem. 76, 3365–71.

Lavorante, A.F., Giné, M.F., Gervasio, A.P.G., Miranda, C.E.S., Fiore, M.F., Bellato, C.M., Carrilho, E., 2003. Identification of a Metallothionein in Synechococcus by Capillary Electrophoresis Hyphenated with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. Anal. Sci. 19, 1611–1616.

Lazarus, M., Orct, T., Jurasoviæ, J., Blanuša, M., 2009. The effect of dietary selenium supplementation on cadmium absorption and retention in suckling rats. Biometals 22, 973–83.

Lee, S.-W., Berger, S.J., Martinović, S., Pasa-Tolić, L., Anderson, G.A., Shen, Y., Zhao, R., Smith, R.D., 2002. Direct mass spectrometric analysis of intact proteins of the yeast large ribosomal subunit using capillary LC/FTICR. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99, 5942–7.

Lei, T., He, Q.-Y., Cai, Z., Zhou, Y., Wang, Y.-L., Si, L.-S., Cai, Z., Chiu, J.-F., 2008. Proteomic analysis of chromium cytotoxicity in cultured rat lung epithelial cells. Proteomics 8, 2420–9.

Li, Y., Jiang, Y., Yan, X.-P., 2005. On-line hyphenation of capillary electrophoresis with flame-heated furnace atomic absorption spectrometry for trace mercury speciation. Electrophoresis 26, 661–7.

Lieberman, M., Ricer, R., 2013. Biochemistry, Molecular Biology, and Genetics, 5th ed. Swanson, Kim, Glucksman.

Lin, C.Y., Viant, M.R., Tjeerdema, R.S., 2006. Metabolomics: Methodologies and applications in the environmental sciences. J. Pestic. Sci. 31, 245–251.

Lin, L., Yu, Q., Yan, X., Hang, W., Zheng, J., Xing, J., Huang, B., 2010. Direct infusion mass spectrometry or liquid chromatography mass spectrometry for human metabonomics? A serum metabonomic study of kidney cancer. Analyst 135, 2970–8.

Lin, S., Cullen, W.R., Thomas, D.J., 1999. Methylarsenicals and Arsinothiols Are Potent Inhibitors of Mouse Liver Thioredoxin Reductase. Chem. Res. Toxicol. 12, 924–930.

Listgarten, J., Emili, A., 2005. Statistical and computational methods for comparative proteomic profiling using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Mol. Cell. Proteomics 4, 419–34.

Liu, G., Wang, W., Shan, X., 1994. Factors influencing the separation of metallothioneins by capillary zone electrophoresis. J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. 653, 41–46.

Livingstone, D.R., 1993. Biotechnology and pollution monitoring: Use of molecular biomarkers in the aquatic environment. J. Chem. Technol. Biotechnol.

Livingstone, D.R., Kirchin, M.A., Wiseman, A., 1989. Cytochrome P-450 and oxidative metabolism in molluscs. Xenobiotica 19, 1041–1062.

Lobinski, R., Becker, J.S., Haraguchi, H., Sarkar, B., 2010. Metallomics: Guidelines for terminology and critical evaluation of analytical chemistry approaches (IUPAC Technical Report). Pure Appl. Chem. 82, 493–504.

Łobiński, R., Pereiro, I.R., Chassaigne, H., Wasik, A., Szpunar, J., 1998. Elemental speciation and coupled techniques-towards faster and reliable analyses: Plenary lecture. J. Anal. At. Spectrom. 13, 859–867.

López-Barea, J., 1995. Biomarkers in ecotoxicology: an overview. Arch. Toxicol. Suppl. Arch. fur Toxikologie. Suppl.

López-Barea, J., Pueyo, C., 1998. Mutagen content and metabolic activation of promutagens by molluscs as biomarkers of marine pollution. Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen. 399, 3–15.

Lu, M., Lai, Y., Chen, G., Cai, Z., 2011. Matrix interference-free method for the analysis of small molecules by using negative ion laser desorption/ionization on graphene flakes. Anal. Chem. 83, 3161–9.

Lu, M., Wang, H., Li, X.-F., Arnold, L.L., Cohen, S.M., Le, X.C., 2007. Binding of dimethylarsinous acid to cys-13alpha of rat hemoglobin is responsible for the retention of arsenic in rat blood. Chem. Res. Toxicol. 20, 27–37.

Lu, J., Holmgren, A., 2009. Selenoproteins. J. Biol. Chem. 284, 723–727.

Ma, R., McLeod, C.W., Tomlinson, K., Poole, R.K., 2004. Speciation of protein-bound trace elements by gel electrophoresis and atomic spectrometry. Electrophoresis 25, 2469–77.

Magos, L., Webb, M., 1980. The interactions of selenium with cadmium and mercury. Crit. Rev. Toxicol.

Mahler, K.L., Fleming, J.L., Dworkin, A.M., Gladman, N., Cho, H.-Y., Mao, J.-H., Balmain, A., Toland, A.E., 2008. Sequence divergence of Mus spretus and Mus musculus across a skin cancer susceptibility locus. BMC Genomics 9, 626.

Makarov, A., Denisov, E., Lange, O., Horning, S., 2006. Dynamic range of mass accuracy in LTQ Orbitrap hybrid mass spectrometer. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 17, 977–82.

Manna, P., Sinha, M., Sil, P.C., 2009. Taurine plays a beneficial role against cadmium-induced oxidative renal dysfunction. Amino Acids 36, 417–28.

Maret, W., 2010. Metalloproteomics, metalloproteomes, and the annotation of metalloproteins. Metallomics 2, 117–25.

Marshall, A.G., Hendrickson, C.L., Jackson, G.S., 1998. Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: A primer. Mass Spectrom. Rev. 17, 1–35.

Martin, P., Fareh, M., Poggi, M.C., Boulukos, K.E., Pognonec, P., 2006. Manganese is highly effective in protecting cells from cadmium intoxication. Biochem. Biophys. Res. Commun. 351, 294–9.

Masoum, S., Bouveresse, D.J.-R., Vercauteren, J., Jalali-Heravi, M., Rutledge, D.N., 2006. Discrimination of wines based on 2D NMR spectra using learning vector quantization neural networks and partial least squares discriminant analysis. Anal. Chim. Acta 558, 144–149.

Mateo, R., Taggart, M.A., Green, A.J., Cristòfol, C., Ramis, A., Lefranc, H., Figuerola, J., Meharg, A.A., 2006. Altered porphyrin excretion and histopathology of greylag geese (anser anser) exposed to soil

contaminated with lead and arsenic in the Guadalquivir marshes, southwestern Spain. Environ. Toxicol. Chem. 25, 203.

Matés, J., 2002. Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death. Int. J. Biochem. Cell Biol. 34, 439–458.

Matusch, A., Fenn, L.S., Depboylu, C., Klietz, M., Strohmer, S., McLean, J.A., Becker, J.S., 2012. Combined elemental and biomolecular mass spectrometry imaging for probing the inventory of tissue at a micrometer scale. Anal. Chem. 84, 3170–8.

May, J.M., 1998. Ascorbate function and metabolism in the human erythrocyte. Front. Biosci.

McAnoy, A.M., Wu, C.C., Murphy, R.C., 2005. Direct qualitative analysis of triacylglycerols by electrospray mass spectrometry using a linear ion trap. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 16, 1498–509.

McBee, K., Bickham, J.W., 1988. Petrochemical-related DNA damage in wild rodents detected by flow cytometry. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 40, 343–349.

McSheehy, S., Pannier, F., Szpunar, J., Potin-Gautier, M., Lobinski, R., 2002. Speciation of seleno compounds in yeast aqueous extracts by three-dimensional liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric and electrospray mass spectrometric detection. Analyst 127, 223–229.

McSheehy, S., Pohl, P., Szpunar, J., Potin-Gautier, M., Lobinski, R., 2001. Analysis for selenium speciation in selenized yeast extracts by two-dimensional liquid chromatography with ICP-MS and electrospray MS-MS detection. J. Anal. At. Spectrom. 16, 68–73.

McSheehy, S., Yang, W., Pannier, F., Szpunar, J., Łobiński, R., Auger, J., Potin-Gautier, M., 2000. Speciation analysis of selenium in garlic by two-dimensional high-performance liquid chromatography with parallel inductively coupled plasma mass spectrometric and electrospray tandem mass spectrometric detection. Anal. Chim. Acta 421, 147–153.

Mehrotra B., M.P., 2006. Bioinformatics approaches to integrate metabolomics and other systems biology data, in plant metabolomics. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, 105–115.

Meija, J., Centineo, G., Ignacio Garcia Alonso, J., Sanz-Medel, A., Caruso, J.A., 2005. Interpretation of butyltin mass spectra using isotope pattern reconstruction for the accurate measurement of isotope ratios from molecular clusters. J. Mass Spectrom. 40, 807–14.

Meija, J., Yang, L., Caruso, J.A., Mester, Z., 2006. Calculations of double spike isotope dilution results revisited. J. Anal. At. Spectrom. 21, 1294.

Meraz Ríos M.A., S.T.C., 2001. Animales modificados genéticamente: La herramienta del futuro). Rev. Digit. Univ. 1, 1–24.

Mesko, M.F., Hartwig, C.A., Bizzi, C.A., Pereira, J.S.F., Mello, P.A., Flores, E.M.M., 2011. Sample preparation strategies for bioinorganic analysis by inductively coupled plasma mass spectrometry. Int. J. Mass Spectrom. 307, 123–136.

Messaoudi, I., El Heni, J., Hammouda, F., Saïd, K., Kerkeni, A., 2009. Protective effects of selenium, zinc, or their combination on cadmium-induced oxidative stress in rat kidney. Biol. Trace Elem. Res. 130, 152–61.

Michalke, B., Berthele, A., Mistriotis, P., Ochsenkühn-Petropoulou, M., Halbach, S., 2007. Manganese species from human serum, cerebrospinal fluid analyzed by size exclusion chromatography-, capillary electrophoresis coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. J. Trace Elem. Med. Biol. 21 Suppl 1, 4–9.

Michalke, B., Schramel, P., 1997. Selenium speciation in human milk with special respect to quality control. Biol. Trace Elem. Res. 59, 45–56.

Moalla, S.M.N., Awadallah, R.M., Rashed, M.N., Soltan, M.E., 1997. Distribution and chemical fractionation of some heavy metals in bottom sediments of Lake Nasser. Hydrobiologia 364 I, 31–40.

Moghadaszadeh, B., Beggs, A.H., 2006. Selenoproteins and their impact on human health through diverse physiological pathways. Physiology (Bethesda). 21, 307–15.

Montaudo, G., Samperi, F., Montaudo, M.S., 2006. Characterization of synthetic polymers by MALDI-MS. Prog. Polym. Sci. 31, 277–357.

Montes Nieto, R., García-Barrera, T., Gómez-Ariza, J.-L., López-Barea, J., 2010. Environmental monitoring of Domingo Rubio stream (Huelva Estuary, SW Spain) by combining conventional biomarkers and proteomic analysis in Carcinus maenas. Environ. Pollut. 158, 401–8.

Moreno, S., 1998. Roedores. In Blanco J.C (Ed) Mamíferos de España, vol II, (ed) Planeta, 166-273.

Mostert, V., 2000. Selenoprotein P: properties, functions, and regulation. Arch. Biochem. Biophys. 376, 433–8.

Moxon, A.L., 1938. The effect of arsenic on the toxicity of seleniferous grains. Science 80.

Moxon, A.L., Paulsen, T.M., Johnson, L.E., 1947. Blood calcium and phosphorus levels in range cattle. J. Anim. Sci. 6, 489.

Mulder, E., Van Deenen, L.L.M., 1965. Metabolism of red-cell lipids I. Incorporation in vitro of fatty acids into phospholipids from mature erythrocytes. Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab. 106, 106–117.

Murugavel, P., Pari, L., 2007. Effects of diallyl tetrasulfide on cadmium-induced oxidative damage in the liver of rats. Hum. Exp. Toxicol. 26, 527–34.

Nankivell, B.J., 2001. Creatinine clearance and the assessment of renal function. Aust. Prescr.

Navarro-Alarcón, M., López-G de la Serrana, H., Pérez-Valero, V., López-Martínez, C., 1999. Serum and urine selenium concentrations as indicators of body status in patients with diabetes mellitus. Sci. Total Environ. 228, 79–85.

Navarro-Alarcón, M., López-G de la Serrana, H., Pérez-Valero, V., López-Martínez, M.C., 2002. Selenium concentrations in serum of individuals with liver diseases (cirrhosis or hepatitis): relationship with some nutritional and biochemical markers. Sci. Total Environ. 291, 135–141.

Navarro-Alarcón, M., López-G de la Serrana, H., Pérez-Valero, V., López-Martínez, M.C., 1998. Serum selenium levels as indicators of body status in cancer patients and their relationship with other nutritional and biochemical markers. Sci. Total Environ. 212, 195–202.

Nayak, R., Knapp, D.R., 2007. Effects of thin-film structural parameters on laser desorption/ionization from porous alumina. Anal. Chem. 79, 4950–6.

Nehru, L.B., Bansal, M.P., 1997. Effect of selenium supplementation on the glutathione redox system in the kidney of mice after chronic cadmium exposures. J. Appl. Toxicol. 17, 81–4.

Newairy, A.A., El-Sharaky, A.S., Badreldeen, M.M., Eweda, S.M., Sheweita, S.A., 2007. The hepatoprotective effects of selenium against cadmium toxicity in rats. Toxicology 242, 23–30.

Nicholson, J.K., Lindon, J.C., Holmes, E., 1999. "Metabonomics": Understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. Xenobiotica.

Nicholson, J.K., Timbrell, J.A., Sadler, P.J., 1985. Proton NMR spectra of urine as indicators of renal damage. Mercury-induced nephrotoxicity in rats. Mol. Pharmacol. 27, 644–651.

Niessen, W.M.A., 1999. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, Vol. 2, ed. New York, USA.

Nordberg, G.F., 2009. Historical perspectives on cadmium toxicology. Toxicol. Appl. Pharmacol. 238, 192–200.

Nuevo Ordoñez, Y., Montes-Bayón, M., Blanco-González, E., Sanz-Medel, A., 2010. Quantitative analysis and simultaneous activity measurements of Cu, Zn-superoxide dismutase in red blood cells by HPLC-ICPMS. Anal. Chem. 82, 2387–94.

Oñate, J.J., Pereira, D., Suárez, F., 2003. Strategic Environmental Assessment of the Effects of European Union's Regional Development Plans in Doñana National Park (Spain). Environ. Manage. 31, 642–55.

Ora, I., Bondesson, L., Jönsson, C., Ljungberg, J., Pörn-Ares, I., Garwicz, S., Påhlman, S., 2000. Arsenic trioxide inhibits neuroblastoma growth in vivo and promotes apoptotic cell death in vitro. Biochem. Biophys. Res. Commun. 277, 179–85.

Orth, M., Schapira, A.H., 2001. Mitochondria and degenerative disorders. Am. J. Med. Genet. 106, 27–36.

Outten, C.E., O'Halloran, T. V, 2001. Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. Science 292, 2488–92.

Palacios, O., Ruiz Encinar, J., Schaumlöffel, D., Lobinski, R., 2006. Fractionation of selenium-containing proteins in serum by multiaffinity liquid chromatography before size-exclusion chromatography-ICPMS. Anal. Bioanal. Chem. 384, 1276–83.

Palenzuela, B., Manganiello, L., Ríos, A., Valcárcel, M., 2004. Monitoring inorganic mercury and methylmercury species with liquid chromatography–piezoelectric detection. Anal. Chim. Acta 511, 289–294.

Palmiter, R.D., Findley, S.D., 1995. Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. EMBO J. 14, 639–649.

Palomo J., Gisbert J., Blanco J.C., 2007. Atlas Y Libro Rojo de Los Mamíferos Terrestres de España. Organismo Autónomo Parques Nacionales,. Madrid, pp. 464–466.

Pappas, AC, Zoidis, E, Fegeros, K, Surai, PF, and Zervas, G., 2011. Relation of cadmium to other elements and the antioxidant system. In Cadmium in the environment, Nova Scien. ed. New York, USA.

Parízek, J., Ostadalova, I., 1967. The protective effect of small amounts of selenite in sublimate intoxication. Experientia 23, 142–143.

Park, W.H., Seol, J.G., Kim, E.S., Hyun, J.M., Jung, C.W., Lee, C.C., Kim, B.K., Lee, Y.Y., 2000. Arsenic trioxide-mediated growth inhibition in MC/CAR myeloma cells via cell cycle arrest in association with induction of cyclin-dependent kinase inhibitor, p21, and apoptosis. Cancer Res. 60, 3065–3071.

Patti, G.J., Yanes, O., Siuzdak, G., 2012. Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 13, 263–9.

Peakall, D., 1994. Biomarkers: the way forward in environmental assessment. Toxicoloxy Ecotoxicol News 1, 55–60.

Perkins, C., Kim, C.N., Fang, G., Bhalla, K.N., 2000. Arsenic induces apoptosis of multidrug-resistant human myeloid leukemia cells thin express Bcr-Abl or overexpress MDR, MRP, Bcl-2, or Bcl-x(L). Blood 95, 1014–1022.

Platell, C., Kong, S.-E., McCauley, R., Hall, J.C., 2000. Branched-chain amino acids. J. Gastroenterol. Hepatol. 15, 706–717.

Polec-Pawlak, K., Schaumlffel, D., Szpunar, J., Prange, A., Lobinski, R., 2002. Analysis for metal complexes with metallothionein in rat liver by capillary zone electrophoresis using ICP double-focussing sector-field isotope dilution MS and electrospray MS detectionPresented at the 2002 Winter Conference on Plasma Spectrochemistry, S. J. Anal. At. Spectrom. 17, 908–912.

Polec, K., Szpunar, J., Palacios, O., Gonzalez-Duarte, P., Atrian, S., Lobinski, R., 2001. Investigation of metal binding by recombinant and native metallothioneins by capillary zone electrophoresis (CZE) coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) via a self-aspirating total consumption micronebulizer. J. Anal. At. Spectrom. 16, 567–574.

Połeć, K., Peréz-Calvo, M., García-Arribas, O., Szpunar, J., Ribas-Ozonas, B., Łobiński, R., 2002. Investigation of metal complexes with metallothionein in rat tissues by hyphenated techniques. J. Inorg. Biochem. 88, 197–206.

Prange, A., Schaumlöffel, D., 2002. Hyphenated techniques for the characterization and quantification of metallothionein isoforms. Anal. Bioanal. Chem. 373, 441–53.

Prange, A., Schaumlöffel, D., Brätter, P., Richarz, A.-N., Wolf, C., 2001. Species analysis of metallothionein isoforms in human brain cytosols by use of capillary electrophoresis hyphenated to inductively coupled plasma–sector field mass spectrometry. Fresenius' J. Anal. Chem. 371, 764–774.

Pröfrock, D., Prange, A., 2009. Compensation of gradient related effects when using capillary liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry for the absolute quantification of phosphorylated peptides. J. Chromatogr. A 1216, 6706–15.

Puri, P., Wiest, M.M., Cheung, O., Mirshahi, F., Sargeant, C., Min, H.-K., Contos, M.J., Sterling, R.K., Fuchs, M., Zhou, H., Watkins, S.M., Sanyal, A.J., 2009. The plasma lipidomic signature of nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology 50, 1827–38.

Purves, D., 1985. Trace element contamination of the environment, Elsevier. ed. Amsterdam. 260.

Putri, S.P., Yamamoto, S., Tsugawa, H., Fukusaki, E., 2013. Current metabolomics: technological advances. J. Biosci. Bioeng. 116, 9–16.

Rahman, K., 2007. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. Clin. Interv. Aging.

Ramautar, R., Demirci, A., Jong, G.J. de, 2006. Capillary electrophoresis in metabolomics. TrAC Trends Anal. Chem. 25, 455–466.

Ralston, N.V.C., Raymond, L.J., 2010. Dietary selenium's protective effects against methylmercury toxicity. Toxicology. 278, 112-23. doi: 10.1016/j.tox.2010.06.004.

Reeves, M.A., Hoffmann, P.R., 2009. The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation. Cell. Mol. Life Sci. 66, 2457–78.

Richards, M.P., Beattie, J.H., 1993. Characterization of metallothionein isoforms. J. Chromatogr. A 648, 459–468.

Rico, M.C., Hernández, L.M., González, M.J., Fernández, M.A., Montero, M.C., 1987. Organochlorine and metal pollution in aquatic organisms sampled in the Doñana National Park during the period 1983–1986. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 39, 1076–1083.

Ridgway, N.D., 2013. The role of phosphatidylcholine and choline metabolites to cell proliferation and survival. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 48, 20–38.

Río Segade, S., Tyson, J.F., 2003. Determination of inorganic mercury and total mercury in biological and environmental samples by flow injection-cold vapor-atomic absorption spectrometry using sodium borohydride as the sole reducing agent. Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc. 58, 797–807.

Robinson J, S.J., 2004. Observations on the levels of total mercury (Hg) an selenium (Se) in species common to the artisanal fisheries of Seychelles. Seychelles Med. Dent. J. 7, 56–60.

Rodríguez-Ariza, A., Alhama, J., Díaz-Méndez, F.., López-Barea, J., 1999. Content of 8-oxodG in chromosomal DNA of Sparus aurata fish as biomarker of oxidative stress and environmental pollution. Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen. 438, 97–107.

Rodríguez-Cea, A., del Rosario Fernández de la Campa, M., García Alonso, J.I., Sanz-Medel, A., 2006. The use of enriched 111Cd as tracer to study de novo cadmium accumulation and quantitative speciation in Anguilla anguilla tissues. J. Anal. At. Spectrom. 21, 270.

Rodríguez-González, P., Marchante-Gayón, J.M., García Alonso, J.I., Sanz-Medel, A., 2005a. Isotope dilution analysis for elemental speciation: a tutorial review. Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc. 60, 151–207.

Rodríguez-González, P., Rodríguez-Cea, A., Alonso, J.I.G., Sanz-Medel, A., 2005b. Species-specific isotope dilution analysis and isotope pattern deconvolution for butyltin compounds metabolism investigations. Anal. Chem. 77, 7724–34.

Rodríguez-Ortega, M.J., Rodríguez-Ariza, A., Gómez-Ariza, J.L., Muñoz-Serrano, A., López-Barea, J., 2009. Multivariate discriminant analysis distinguishes metal- from non metal-related biomarker responses in the clam Chamaelea gallina. Mar. Pollut. Bull. 58, 64–71.

Romero-Ruiz, A., Carrascal, M., Alhama, J., Gómez-Ariza, J.L., Abian, J., López-Barea, J., 2006. Utility of proteomics to assess pollutant response of clams from the Doñana bank of Guadalquivir Estuary (SW Spain). Proteomics 6 Suppl 1.

Rosen, B.P., 2006. Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification, Topics in Current Genetics, Topics in Current Genetics. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.

Rosenling, T., Stoop, M.P., Smolinska, A., Muilwijk, B., Coulier, L., Shi, S., Dane, A., Christin, C., Suits, F., Horvatovich, P.L., Wijmenga, S.S., Buydens, L.M.C., Vreeken, R., Hankemeier, T., van Gool, A.J., Luider, T.M., Bischoff, R., 2011. The impact of delayed storage on the measured proteome and metabolome of human cerebrospinal fluid. Clin. Chem. 57, 1703–11.

Rosenzweig, A.C., 2002. Metallochaperones. Chem. Biol. 9, 673–677.

Rottmann, L., Heumann, K.G., 1994a. Determination of heavy metal interactions with dissolved organic meterials in natural aquatic systems by coupling a high-performance liquid chromatography system with an inductively coupled plasma mass spectrometer. Anal. Chem. 66, 3709–3715.

Rottmann, L., Heumann, K.G., 1994b. Development of an on-line isotope dilution technique with HPLC/ICP-MS for the accurate determination of elemental species. Fresenius. J. Anal. Chem. 350, 221–227.

Ruíz-Laguna, J., García-Alfonso, C., Peinado, J., Moreno, S., Ieradi, LA., Cristaldi M., López-Barea, J., 2001. Biochemical biomarkers of pollution in Algerian mouse (Mus spretus) to assess the effects of the AznalcÓllar disaster on Doñana Park (Spain). Biomarkers 6, 146–60.

Ruíz-Laguna, J., Abril, N., Prieto-Alamo, MJ., López-Barea, J., Pueyo, C. 2004. Tissue, species, and environmental differences in absolute quantities of murine mRNAs coding for alpha, mu, omega, pi, and theta glutathione S-transferases. Gene Expr. 12,165-176.

Ruíz-Laguna, J., Abril, N., García-Barrera, T., Gómez-Ariza, JL.,López-Barea, J., Pueyo, C. 2006. Absolute Transcript Expression Signatures of Cyp and Gst Genes in Mus spretus to Detect Environmental Contamination. Environ.Sci.Technol. 40, 3646-3652.

Sabolić, I., Breljak, D., Skarica, M., Herak-Kramberger, C.M., 2010. Role of metallothionein in cadmium traffic and toxicity in kidneys and other mammalian organs. Biometals 23, 897–926.

Saito, Y., Hayashi, T., Tanaka, A., Watanabe, Y., Suzuki, M., Saito, E., Takahashi, K., 1999. Selenoprotein P in Human Plasma as an Extracellular Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase: ISOLATION AND ENZYMATIC CHARACTERIZATION OF HUMAN SELENOPROTEIN P. J. Biol. Chem. 274, 2866–2871.

Sánchez, A., 2009. Selenio y tiroides. Gländ. Tir. Paratir. 18, 40-45.

Sánchez López, F.J., Gil García, M.D., Martínez Vidal, J.L., Aguilera, P.A., Garrido Frenich, A., 2004. Assessment of Metal Contamination in Doñana National Park (Spain) using Crayfish (Procamburus Clarkii). Environ. Monit. Assess. 93, 17–29.

Santa, T., 2011. Derivatization reagents in liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. Biomed. Chromatogr. 25, 1–10.

Sanz-Medel, A., Montes-Bayón, M., Fernández Sánchez, M.L. 2003. Trace element speciation by ICP-MS in large biomolecules and its potential for proteomics. Anal. Bioanal. Chem. 377, 236–247.

Sanz-Medel, A., 2010. ICP-MS for multiplex absolute determinations of proteins. Anal. Bioanal. Chem. 398, 1853–9.

Sariego Muñiz, C., Marchante Gayón, J.M., García Alonso, J.I., Sanz-Medel, A., 2001. Speciation of essential elements in human serum using anion-exchange chromatography coupled to post-column isotope dilution analysis with double focusing ICP-MS. J. Anal. At. Spectrom. 16, 587–592.

Sas, K., Robotka, H., Toldi, J., Vécsei, L., 2007. Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. J. Neurol. Sci. 257, 221–39.

Sasakura, C., T. Suzuki, K., 1998. Biological interaction between transition metals (Ag, Cd and Hg), selenide/sulfide and selenoprotein P. J. Inorg. Biochem. 71, 159–162.

Schaumlöffel, D., Prange, A., Marx, G., Heumann, K.G., Brätter, P., 2002. Characterization and quantification of metallothionein isoforms by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-isotope-dilution mass spectrometry. Fresenius. J. Anal. Chem. 372, 155–163.

Schlattner, U., Tokarska-Schlattner, M., Wallimann, T., 2006. Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. Biochim. Biophys. Acta 1762, 164–80.

Scholz, M., Kaplan, F., Guy, C.L., Kopka, J., Selbig, J., 2005. Non-linear PCA: a missing data approach. Bioinformatics 21, 3887–95.

Schwarz, A., Heumann, K.G., 2002. Two-dimensional on-line detection of brominated and iodinated volatile organic compounds by ECD and ICP-MS after GC separation. Anal. Bioanal. Chem. 374, 212–9.

Sekhon, B., 2011. An overview of capillary electrophoresis: pharmaceutical, biopharmaceutical and biotechnology applications. J Pharm Educ Res 2, 2–36.

Serra, J.A., Marschoff, E.R., Domínguez, R.O., de Lustig, E.S., Famulari, A.L., Bartolomé, E.L., Guareschi, E.M., 2000. Comparison of the determination of superoxide dismutase and antioxidant capacity in neurological patients using two different procedures. Clin. Chim. Acta 301, 87–102.

Shearer, T.R., Anderson, R.S., Britton, J.L., 1983. Influence of selenite and fourteen trace elements on cataractogenesis in the rat. Investig. Ophthalmol. Vis. Sci. 24, 417–423.

Sheehan, D., Power, A., 1999. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. Comp. Biochem. Physiol. Part C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 123, 193–199.

Shen, Z.X., Chen, G.Q., Ni, J.H., Li, X.S., Xiong, S.M., Qiu, Q.Y., Zhu, J., Tang, W., Sun, G.L., Yang, K.Q., Chen, Y., Zhou, L., Fang, Z.W., Wang, Y.T., Ma, J., Zhang, P., Zhang, T.D., Chen, S.J., Chen, Z., Wang, Z.Y., 1997. Use of arsenic trioxide (As2O3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (AFL): II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients. Blood 89, 3354–3360.

Shi, H., Shi, X., Liu, K.J., 2004. Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis. Mol. Cell. Biochem. 255, 67–78.

Shiobara, Y., Suzuki, K.T., 1998. Binding of selenium (administered as selenite) to albumin after efflux from red blood cells. J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. 710, 49–56.

Sies, H., 1986. Biochemistry of oxidative stress. Angew. Chem. Int. 25, 1058–1071.

Sinha, M., Manna, P., Sil, P.C., 2008. Taurine protects the antioxidant defense system in the erythrocytes of cadmium treated mice. J. Biochem. Mol. Biol. 41, 657–663.

Smith, C.A., Want, E.J., O'Maille, G., Abagyan, R., Siuzdak, G., 2006. XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. Anal. Chem. 78, 779–87.

Soga, T., Ohashi, Y., Ueno, Y., Naraoka, H., Tomita, M., Nishioka, T., 2003. Quantitative Metabolome Analysis Using Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry. J. Proteome Res. 2, 488–494.

Sonne-Hansen, C., Dietz, R., Leifsson, P.., Hyldstrup, L., Riget, F.., 2002. Cadmium toxicity to ringed seals (Phoca hispida): an epidemiological study of possible cadmium-induced nephropathy and osteodystrophy in ringed seals (Phoca hispida) from Qaanaaq in Northwest Greenland. Sci. Total Environ. 295, 167–181.

Sørmo, E.G., Ciesielski, T.M., Øverjordet, I.B., Lierhagen, S., Eggen, G.S., Berg, T., Jenssen, B.M., 2011. Selenium moderates mercury toxicity in free-ranging freshwater fish. Environ. Sci. Technol. 45, 6561–6.

Spallholz, J.E., Mallory Boylan, L., Rhaman, M.M., 2004. Environmental hypothesis: is poor dietary selenium intake an underlying factor for arsenicosis and cancer in Bangladesh and West Bengal, India? Sci. Total Environ. 323, 21–32.

Stadtman, T.C., 1991. Biosynthesis and function of selenocysteine-containing enzymes. J. Biol. Chem.

Steinbrenner, H., Sies, H., 2009. Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. Biochim. Biophys. Acta 1790, 1478–85.

Stranges, S., Marshall, J.R., Trevisan, M., Natarajan, R., Donahue, R.P., Combs, G.F., Farinaro, E., Clark, L.C., Reid, M.E., 2006. Effects of selenium supplementation on cardiovascular disease incidence and mortality: secondary analyses in a randomized clinical trial. Am. J. Epidemiol. 163, 694–9.

Su, L., Wang, M., Yin, S.-T., Wang, H.-L., Chen, L., Sun, L.-G., Ruan, D.-Y., 2008. The interaction of selenium and mercury in the accumulations and oxidative stress of rat tissues. Ecotoxicol. Environ. Saf. 70, 483–9.

Sun, G., Yang, K., Zhao, Z., Guan, S., Han, X., Gross, R.W., 2007. Shotgun metabolomics approach for the analysis of negatively charged water-soluble cellular metabolites from mouse heart tissue. Anal. Chem. 79, 6629–40. doi:10.1021/ac070843.

Suzuki, Y., Yoshikawa, H., 1981. Cadmium, copper, and zinc excretion and their binding to metallothionein in urine of cadmium-exposed rats. J. Toxicol. Environ. Health 8, 479–487.

Suzuki, K.T., Kuroda, T., 1995. Transfer of copper and zinc from ionic and metallothionein - Bound forms to Cu, Zn - superoxide dismutase. Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol. 87, 287–296.

Suzuki, K.T., Ogra, Y., 2002. Metabolic pathway for selenium in the body: speciation by HPLC-ICP MS with enriched Se. Food Addit. Contam. 19, 974–83.

Szpunar, J., Bouyssiere, B., Lobinski, R., 2003. Sample Preparation for Trace Element Analysis, Comprehensive Analytical Chemistry, Comprehensive Analytical Chemistry. Elsevier.

Szpunar, J., 2004. Metallomics: a new frontier in analytical chemistry. Anal. Bioanal. Chem. 378, 54–6. doi:10.1007/s00216-003-2333-z.

Szpunar, J., 2005. Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics. Analyst 130, 442–65. doi:10.1039/b418265k.

Szymańska-Chabowska, A., Beck, A., Poręba, R., Andrzejak, R., Antonowicz-Juchniewicz, J., 2009. Evaluation of DNA damage in people occupationally exposed to arsenic and some heavy metals. Polish J. Environ. Stud. 18, 1131–1139.

Tainer, J.A., Getzoff, E.D., Richardson, J.S., Richardson, D.C., 1983. Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase. Nature 306, 284–287.

Tainer, J.A., Roberts, V.A., Getzoff, E.D., 1991. Metal-binding sites in proteins. Curr. Opin. Biotechnol. 2, 582–591. doi:10.1016/0958-1669(91)90084-I

Talmage, S.S., Walton, B.T., 1991. Small mammals as monitors of environmental contaminants. Rev. Environ. Contam. Toxicol.

Templeton, D.M., Ariese, F., Cornelis, R., Danielsson, L.G., Muntau, H., Van Leeuwen, H.P., Łobiński, R., 2000. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC recommendations 2000). Pure Appl. Chem.

Thomas, D.J., Li, J., Waters, S.B., Xing, W., Adair, B.M., Drobna, Z., Devesa, V., Styblo, M., 2007. Arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase and the methylation of arsenicals. Exp. Biol. Med.

Thomson, C.D., 1998. Selenium speciation in human body fluids†. Analyst 123, 827–831.

Timbrell, J. 2001. Principles of Biochemical Toxicology.Taylor & Francis. London, UK.

Tiziani, S., Emwas, A.-H., Lodi, A., Ludwig, C., Bunce, C.M., Viant, M.R., Günther, U.L., 2008. Optimized metabolite extraction from blood serum for 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. Anal. Biochem. 377, 16–23.

Tong, W.-H., Sourbier, C., Kovtunovych, G., Jeong, S.Y., Vira, M., Ghosh, M., Romero, V.V., Sougrat, R., Vaulont, S., Viollet, B., Kim, Y.-S., Lee, S., Trepel, J., Srinivasan, R., Bratslavsky, G., Yang, Y., Linehan, W.M., Rouault, T.A., 2011. The Glycolytic Shift in Fumarate-Hydratase-Deficient Kidney

Cancer Lowers AMPK Levels, Increases Anabolic Propensities and Lowers Cellular Iron Levels. Cancer Cell 20, 315–327.

Tonge, R.P., Shaw, J., Middleton, B., Rowlinson, R., Rayner, S., Young, J., Pognan, F., Hawkins, E., Currie, I., Davison, M., 2001. Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. Proteomics 1, 377–396.

Tretter, L., Adam-Vizi, V., 2005. Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 360, 2335–45.

Tull-Singleton, S., Kimball, S., McBee, K., 1994. Correlative analysis of heavy metal bioconcentration and genetic damage in white-footed mice (Peromyscus leucopus) from a hazardous waste site. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 52, 667–672.

Turner, M.A., Guallar-Hoyas, C., Kent, A.L., Wilson, I.D., Thomas, C.L., 2011. Comparison of metabolomic profiles obtained using chemical ionization and electron ionization MS in exhaled breath. Bioanalysis 3, 2731–2738.

Ursini, F., 1999. Dual Function of the Selenoprotein PHGPx During Sperm Maturation. Science (80-. ). 285, 1393–1396.

Vahter, M., Norin, H., 1980. Metabolism of 74As-labeled trivalent and pentavalent inorganic arsenic in mice. Environ. Res. 21, 446–457.

Vahter, M., 1981. Biotransformation of trivalent and pentavalent inorganic arsenic in mice and rats. Environ. Res. 25, 286–293.

Vahter, M., 1999. Methylation of inorganic arsenic in different mammalian species and population groups. Sci. Prog.

Valerio, A., D'Antona, G., Nisoli, E., 2011. Branched-chain amino acids, mitochondrial biogenesis, and healthspan: An evolutionary perspective. Aging (Albany. NY).

Valko, M., Morris, H., Cronin, M., 2005. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. Curr. Med. Chem. 12, 1161–1208.

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem. Biol. Interact. 160, 1–40.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int. J. Biochem. Cell Biol. 39, 44–84.

Van den Berg, R.A., Hoefsloot, H.C.J., Westerhuis, J.A., Smilde, A.K., van der Werf, M.J., 2006. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. BMC Genomics 7, 142. doi:10.1186/1471-2164-7-142

Vanhaecke, F., De Wannemacker, G., Moens, L., Dams, R., Latkoczy, C., Prohaska, T., Stingeder, G., 1998. Dependence of detector dead time on analyte mass number in inductively coupled plasma mass spectrometry. J. Anal. At. Spectrom. 13, 567–571.

Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P., Ballew, R.M., Huson, D.H., Wortman, J.R., Zhang, Q., Kodira, C.D., Zheng, X.H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P.D., Zhang, J., Gabor Miklos, G.L., Nelson, C., Broder, S., Clark, A.G., Nadeau, J., McKusick, V.A., Zinder, N., Levine, A.J., Roberts, R.J., Simon, M., Slayman, C., Hunkapiller, M., Bolanos, R., Delcher, A., Dew, I., Fasulo, D., Flanigan, M., Florea, L., Halpern, A., Hannenhalli, S., Kravitz, S., Levy, S., Mobarry, C., Reinert, K., Remington, K., Abu-Threideh, J., Beasley, E., Biddick, K., Bonazzi, V., Brandon, R., Cargill, M., Chandramouliswaran, I., Charlab, R., Chaturvedi, K., Deng, Z., Di Francesco, V., Dunn, P., Eilbeck, K., Evangelista, C., Gabrielian, A.E., Gan, W., Ge, W., Gong, F., Gu, Z., Guan, P., Heiman, T.J., Higgins, M.E., Ji, R.R., Ke, Z., Ketchum, K.A., Lai, Z., Lei, Y., Li, Z., Li, J., Liang, Y., Lin, X., Lu, F., Merkulov, G. V, Milshina, N., Moore, H.M., Naik, A.K., Narayan, V.A., Neelam, B., Nusskern, D., Rusch, D.B., Salzberg, S., Shao, W., Shue, B., Sun, J., Wang, Z., Wang, A., Wang, X., Wang, J., Wei, M., Wides, R., Xiao, C., Yan, C., Yao, A., Ye, J., Zhan, M., Zhang, W., Zhang, H., Zhao, Q., Zheng, L., Zhong, F., Zhong, W., Zhu, S., Zhao, S., Gilbert, D., Baumhueter, S., Spier, G., Carter, C., Cravchik, A., Woodage, T., Ali, F., An, H., Awe, A., Baldwin, D., Baden, H., Barnstead, M., Barrow, I., Beeson, K., Busam, D., Carver, A., Center, A., Cheng, M.L., Curry, L., Danaher, S., Davenport, L., Desilets, R., Dietz, S., Dodson, K., Doup, L., Ferriera, S., Garg, N., Gluecksmann, A., Hart, B., Haynes, J., Haynes, C., Heiner, C., Hladun, S., Hostin, D., Houck, J., Howland, T., Ibegwam, C., Johnson, J., Kalush, F., Kline, L., Koduru, S., Love, A., Mann, F., May, D., McCawley, S., McIntosh, T., McMullen, I., Moy, M., Moy, L., Murphy, B., Nelson, K., Pfannkoch, C., Pratts, E., Puri, V., Qureshi, H., Reardon, M., Rodriguez, R., Rogers, Y.H., Romblad, D., Ruhfel, B., Scott, R., Sitter, C., Smallwood, M., Stewart, E., Strong, R., Suh, E., Thomas, R., Tint, N.N., Tse, S., Vech, C., Wang, G., Wetter, J., Williams, S., Williams, M., Windsor, S., Winn-Deen, E., Wolfe, K., Zaveri, J., Zaveri, K., Abril, J.F., Guigó, R., Campbell, M.J., Sjolander, K. V, Karlak, B., Kejariwal, A., Mi, H., Lazareva, B., Hatton, T., Narechania, A., Diemer, K., Muruganujan, A., Guo, N., Sato, S., Bafna, V., Istrail, S., Lippert, R., Schwartz, R., Walenz, B., Yooseph, S., Allen, D., Basu, A., Baxendale, J., Blick, L., Caminha, M., Carnes-Stine, J., Caulk, P., Chiang, Y.H., Coyne, M., Dahlke, C., Mays, A., Dombroski, M., Donnelly, M., Ely, D., Esparham, S., Fosler, C., Gire, H., Glanowski, S., Glasser, K., Glodek, A., Gorokhov, M., Graham, K., Gropman, B., Harris, M., Heil, J., Henderson, S., Hoover, J., Jennings, D., Jordan, C., Jordan, J., Kasha, J., Kagan, L., Kraft, C., Levitsky, A., Lewis, M., Liu, X., Lopez, J., Ma, D., Majoros, W., McDaniel, J., Murphy, S., Newman, M., Nguyen, T., Nguyen, N., Nodell, M., Pan, S., Peck, J., Peterson, M., Rowe, W., Sanders, R., Scott, J., Simpson, M., Smith, T., Sprague, A., Stockwell, T., Turner, R., Venter, E., Wang, M., Wen, M., Wu, D., Wu, M., Xia, A., Zandieh, A., Zhu, X., 2001. The sequence of the human genome. Science 291, 1304–51.

Verret, W.J., Chen, Y., Ahmed, A., Islam, T., Parvez, F., Kibriya, M.G., Graziano, J.H., Ahsan, H., 2005. A Randomized, Double-Blind Placebo-Controlled Trial Evaluating the Effects of Vitamin E and Selenium on Arsenic-Induced Skin Lesions in Bangladesh. J. Occup. Environ. Med. 47, 1026–1035.

Verwaest, K.A., Vu, T.N., Laukens, K., Clemens, L.E., Nguyen, H.P., Van Gasse, B., Martins, J.C., Van Der Linden, A., Dommisse, R., 2011. 1H NMR based metabolomics of CSF and blood serum: A metabolic profile for a transgenic rat model of Huntington disease. Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis. 1812, 1371–1379.

Vinaixa, M., Rodríguez, M.A., Rull, A., Beltrán, R., Bladé, C., Brezmes, J., Cañellas, N., Joven, J., Correig, X., 2010. Metabolomic assessment of the effect of dietary cholesterol in the progressive development of fatty liver disease. J. Proteome Res. 9, 2527–38.

Vinaixa, M., Rodriguez, M.A., Samino, S., Díaz, M., Beltran, A., Mallol, R., Bladé, C., Ibañez, L., Correig, X., Yanes, O., 2011. Metabolomics reveals reduction of metabolic oxidation in women with polycystic ovary syndrome after pioglitazone-flutamide-metformin polytherapy. PLoS One 6, e29052.

Vioque-Fernández, A., de Almeida, E.A., Ballesteros, J., García-Barrera, T., Gómez-Ariza, J.-L., López-Barea, J., 2007. Doñana National Park survey using crayfish (Procambarus clarkii) as bioindicator: esterase inhibition and pollutant levels. Toxicol. Lett. 168, 260–8. doi:10.1016/j.toxlet.2006.10.023

Vioque-Fernández, A., Alves de Almeida, E., López-Barea, J., 2009. Assessment of Doñana National Park contamination in Procambarus clarkii: integration of conventional biomarkers and proteomic approaches. Sci. Total Environ. 407, 1784–97.

Vogl, J., Heumann, K.G., 1997. Determination of heavy metal complexes with humic substances by HPLC/ICP-MS coupling using on-line isotope dilution technique. Fresenius. J. Anal. Chem. 359, 438–441.

Vuckovic, D., 2012. Current trends and challenges in sample preparation for global metabolomics using liquid chromatography-mass spectrometry. Anal. Bioanal. Chem. 403, 1523–48. doi:10.1007/s00216-012-6039-y

Wahlen, R., McSheehy, S., Scriver, C., Mester, Z., 2004. Arsenic speciation in marine certified reference materials. J. Anal. At. Spectrom. 19, 876.

Wang, M., Feng, W., Lu, W., Li, B., Wang, B., Zhu, M., Wang, Y., Yuan, H., Zhao, Y., Chai, Z., 2007. Quantitative analysis of proteins via sulfur determination by HPLC coupled to isotope dilution ICPMS with a hexapole collision cell. Anal. Chem. 79, 9128–34.

Wang, S.S., Chen, L., Xia, S.K., Jiang, S.X., 2006. Cadmium-induced cytotoxicity and intracellular Ca2+ alteration in hepatocytes and protection by selenium. Fen Zi Xi Bao Sheng Wu Xue Bao 39, 350–356.

Wang, Z., Prange, A., 2002. Use of Surface-Modified Capillaries in the Separation and Characterization of Metallothionein Isoforms by Capillary Electrophoresis Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. Anal. Chem. 74, 626–631.

Want, E.J., Wilson, I.D., Gika, H., Theodoridis, G., Plumb, R.S., Shockcor, J., Holmes, E., Nicholson, J.K., 2010. Global metabolic profiling procedures for urine using UPLC-MS. Nat. Protoc. 5, 1005–18.

Watanabe, H., Kobayashi, K., Kato, Y., Oda, S., Abe, R., Tatarazako, N., Iguchi, T., 2008. Transcriptome profiling in crustaceans as a tool for ecotoxicogenomics: Daphnia magna DNA microarray. Cell Biol. Toxicol. 24, 641–7.

Watanabe, T., Kawasaki, H., Yonezawa, T., Arakawa, R., 2008. Surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (SALDI-MS) of low molecular weight organic compounds and synthetic polymers using zinc oxide (ZnO) nanoparticles. J. Mass Spectrom. 43, 1063–71.

Watson, A.D., 2006. Thematic review series: Systems Biology Approaches to Metabolic and Cardiovascular Disorders. Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems. J. Lipid Res. 47, 2101–2111.

Wei, J., Buriak, J.M., Siuzdak, G., 1999. Desorption-ionization mass spectrometry on porous silicon. Nature 399, 243–6.

Wei, L., Liao, P., Wu, H., Li, X., Pei, F., Li, W., Wu, Y., 2009. Metabolic profiling studies on the toxicological effects of realgar in rats by (1)H NMR spectroscopy. Toxicol. Appl. Pharmacol. 234, 314–25. doi:10.1016/j.taap.2008.11.010

Weiss, W., Görg, A., 2009. High-resolution two-dimensional electrophoresis. Methods Mol. Biol. 564, 13–32.

Whitehouse, C.M., Dreyer, R.N., Yamashita, M., Fenn, J.B., 1985. ELECTROSPRAY INTERFACE FOR LIQUID CHROMATOGRAPHS AND MASS SPECTROMETERS. Anal. Chem. 57, 675–679.

Williams, R.J.., 2001. Chemical selection of elements by cells. Coord. Chem. Rev. 216-217, 583–595. doi:10.1016/S0010-8545(00)00398-2

Wilm, M., Mann, M., 1996a. Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. Anal. Chem. 68, 1–8.

Wilm, M., Shevchenko, A., Houthaeve, T., Breit, S., Schweigerer, L., Fotsis, T., Mann, M., 1996b. Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. Nature 379, 466–469.

Wilson, I.D., Plumb, R., Granger, J., Major, H., Williams, R., Lenz, E.M., 2005. HPLC-MS-based methods for the study of metabonomics. J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 817, 67–76.

Winston, G.W., Di Giulio, R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. Aquat. Toxicol. 19, 137–161.

Winterbourn, C.C., 2008. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. Nat. Chem. Biol. 4, 278–86. doi:10.1038/nchembio.85

Wishart, D.S., 2011. Advances in metabolite identification. Bioanalysis 3, 1769–82.

Xu, F., Zou, L., Liu, Y., Zhang, Z., Ong, C.N., 2011. Enhancement of the capabilities of liquid chromatography-mass spectrometry with derivatization: general principles and applications. Mass Spectrom. Rev. 30, 1143–72.

Yadav, U.C.S., Ramana, K. V, 2013. Regulation of NF-κB-induced inflammatory signaling by lipid peroxidation-derived aldehydes. Oxid. Med. Cell. Longev. 2013, 690545.

Yanes, O., Tautenhahn, R., Patti, G.J., Siuzdak, G., 2011. Expanding coverage of the metabolome for global metabolite profiling. Anal. Chem. 83, 2152–61.

Yang, D.-Y., Chen, Y.-W., Gunn, J.M., Belzile, N., 2008. Selenium and mercury in organisms: Interactions and mechanisms. Environ. Rev. 16, 71–92.

Yaqoob, M., Bell, G.M., Stevenson, A., Mason, H., Percy, D.F., 1993. Renal impairment with chronic hydrocarbon exposure. Q. J. Med. 86, 165–174.

Yin, P., Zhao, X., Li, Q., Wang, J., Li, J., Xu, G., 2006. Metabonomics study of intestinal fistulas based on ultraperformance liquid chromatography coupled with Q-TOF mass spectrometry (UPLC/Q-TOF MS). J. Proteome Res. 5, 2135–43.

Yin, Z., Lee, E., Ni, M., Jiang, H., Milatovic, D., Rongzhu, L., Farina, M., Rocha, J.B.T., Aschner, M., 2011. Methylmercury-induced alterations in astrocyte functions are attenuated by ebselen. Neurotoxicology 32, 291–9.

Ying, J., Clavreul, N., Sethuraman, M., Adachi, T., Cohen, R.A., 2007. Thiol oxidation in signaling and response to stress: detection and quantification of physiological and pathophysiological thiol modifications. Free Radic. Biol. Med. 43, 1099–108. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.07.014

Yip, L.Y., Yong Chan, E., 2013. Gas Chromatography/Mass Spectrometry-Based Metabonomics, Proteomic and Metabolomic Approaches to Biomarker Discovery. Proteomic and Metabolomic Approaches to Biomarker Discovery. USA, 131–144.

Yoneda, S., Suzuki, K.T., 1997. Equimolar Hg-Se complex binds to selenoprotein P. Biochem. Biophys. Res. Commun. 231, 7–11.

Yoshizawa, K., Rimm, E.B., Morris, J.S., Spate, V.L., Hsieh, C., Spiegelman, D., Stampfer, M.J., Willett, W.C., 2002. Mercury and the risk of coronary heart disease in men. N. Engl. J. Med. 347, 1755–60.

Yu, Y.-Q., Gilar, M., Lee, P.J., Bouvier, E.S.P., Gebler, J.C., 2003. Enzyme-friendly, mass spectrometry-compatible surfactant for in-solution enzymatic digestion of proteins. Anal. Chem. 75, 6023–8.

Yuan, W., Anderson, K.W., Li, S., Edwards, J.L., 2012. Subsecond Absolute Quantitation of Amine Metabolites Using Isobaric Tags for Discovery of Pathway Activation in Mammalian Cells. Anal. Chem. 84, 2892–2899.

Zachara, B.A., Adamowicz, A., Trafikowska, U., Trafikowska, A., Manitius, J., Nartowicz, E., 2001. Selenium and glutathione levels, and glutathione peroxidase activities in blood components of uremic patients on hemodialysis supplemented with selenium and treated with erythropoietin. J. Trace Elem. Med. Biol. 15, 201–208.

Zalups, R.K., 1995. Disposition of administered inorganic mercury. Toxicol. Appl. Pharmacol. 130, 121–131.

Zalups, R.K., 2000. Molecular interactions with mercury in the kidney. Pharmacol. Rev.

Zalups, R.K., Koropatnick, J., 2000. Temporal changes in metallothionein gene transcription in rat kidney and liver: Relationship to content of mercury and metallothionein protein. J. Pharmacol. Exp. Ther. 295, 74–82.

Zeng, H., Combs, G.F., 2008. Selenium as an anticancer nutrient: roles in cell proliferation and tumor cell invasion. J. Nutr. Biochem. 19, 1–7.

Zhai, Q., Wang, G., Zhao, J., Liu, X., Tian, F., Zhang, H., Chen, W., 2013. Protective effects of Lactobacillus plantarum CCFM8610 against acute cadmium toxicity in mice. Appl. Environ. Microbiol. 79, 1508–15.

Zhang, B., Powers, R., 2012. Corrigendum. Future Med. Chem. 4, 1764–1765.

Zhang, L., 1998. Generation of Superoxide Anion by Succinate-Cytochrome c Reductase from Bovine Heart Mitochondria. J. Biol. Chem. 273, 33972–33976.

Zhang, T.-C., Cao, E.-H., Li, J.-F., Ma, W., Qin, J.-F., 1999. Induction of apoptosis and inhibition of human gastric cancer MGC-803 cell growth by arsenic trioxide. Eur. J. Cancer 35, 1258–1263.

Ziech, D., Franco, R., Georgakilas, A.G., Georgakila, S., Malamou-Mitsi, V., Schoneveld, O., Pappa, A., Panayiotidis, M.I., 2010. The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development. Chem. Biol. Interact. 188, 334–9.

Zieske, L.R., 2006. A perspective on the use of iTRAQTM reagent technology for protein complex and profiling studies. J. Exp. Bot. 57, 1501–1508.

Zubarev, R.A., Makarov, A., 2013. Orbitrap mass spectrometry. Anal. Chem. 85, 5288–96.

# OTRAS PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL

Anal Bioanal Chem (2012) 403:2237–2253
DOI 10.1007/s00216-012-5776-2

REVIEW

# Biological responses related to agonistic, antagonistic and synergistic interactions of chemical species

**T. García-Barrera · J. L. Gómez-Ariza · M. González-Fernández · F. Moreno · M. A. García-Sevillano · V. Gómez-Jacinto**

Received: 29 November 2011 / Revised: 17 January 2012 / Accepted: 20 January 2012 / Published online: 26 February 2012
© Springer-Verlag 2012

**Abstract** The fact that the essential or toxic character of elements is species specific has encouraged the development of analytical strategies for chemical speciation over the last twenty years; indeed, there are now a great number of them that provide very good performance. However, biological systems are exposed to a complex environment in which species of elements can interact in a synergistic/antagonistic fashion. Thus, the metabolism of trace elements cannot be considered in isolation. On the other hand, biological systems are dynamic, so it is necessary to study the trafficking of species of elements between organs, tissues or cell compartments in order to decipher the biochemical processes of the interactions in which they are involved. Although the application of liquid chromatography–inductively coupled plasma-based "metallomics" methods in combination with organic mass spectrometry can provide much-needed insight, new analytical strategies are required to really understand the role of species of elements in biological systems and the mechanisms of their interactions. In the present paper, the interactions of the most widely studied elements in this context (Se, Hg and As) are discussed, as well as other important interactions between different elements.



**Tamara García-Barrera** has been an associate professor of analytical chemistry at the University of Huelva (Spain) since 2009. Her research interests focus on environmental studies, such as the speciation of Hg/Se and As/Se, and metallomics. Her expertise includes liquid and gas chromatography, atomic spectroscopy, mass spectrometry and sample treatment. She has been honoured with the Andalusian Government's award for young researchers "X Premio Tercer Milenio", as well as the "Extraordinary Ph.D. Prize" from the University of Huelva, and prizes from the Illustrious Official College of Chemists of Seville, the Association of Chemical and Basic Industries of Huelva, the Regional Andalusian Group of the Spanish Society of Analytical Chemistry, and the Academy of Sciences, Arts and Letters of Huelva.

Published in the special issue *Young Investigators in Analytical and Bioanalytical Science* with guest editors S. Daunert, J. Bettmer, T. Hasegawa, Q. Wang and Y. Wei.

T. García-Barrera (✉) · J. L. Gómez-Ariza · M. González-Fernández · F. Moreno · M. A. García-Sevillano · V. Gómez-Jacinto
Department of Chemistry and Materials Science, Faculty of Experimental Sciences, University of Huelva, 21007 Huelva, Spain
e-mail: tamara@dqcm.uhu.es

T. García-Barrera · J. L. Gómez-Ariza · M. González-Fernández · F. Moreno · M. A. García-Sevillano · V. Gómez-Jacinto
Campus of Excellence CiA3, University of Huelva, 21007 Huelva, Spain

T. García-Barrera · J. L. Gómez-Ariza · M. González-Fernández · F. Moreno · M. A. García-Sevillano · V. Gómez-Jacinto
Research Center of Health and Environment (CYSMA), University of Huelva, 21007 Huelva, Spain

**Keywords** Speciation · Metals · Agonists · Synergist · Antagonist · Trafficking · Multispeciation · Mass spectrometry · ICP-MS

**Abbreviations used**

| | |
|---|---|
| APS | ATP sulfurylase/adenyl sulfate reductase |
| APSe-5′ | Adenylylselenate |
| CE | Capillary electrophoresis |

| | |
|---|---|
| DMA | Dimethylarsinate |
| ESI | Electrospray ionization |
| GPx | Glutathione peroxidase |
| HPLC | High-performance liquid chromatography |
| IC | Ion chromatography |
| ICP-AES | Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy |
| ICP-MS | Inductively coupled plasma mass spectrometry |
| MS | Mass spectrometry |
| MALDI | Matrix-assisted laser desorption ionization |
| $MeHg^+$ | Methylmercury |
| MA | Methylarsonate |
| $PheHg^+$ | Phenylmercury |
| SeBet | Selenobetaine |
| SeMet | Selenomethionine |
| SeProt | Selenoproteins |
| TlAc | Thallium acetate |

## Aims and scope

Over the last 20 years, chemical speciation studies have generated very important information, and have led to the development of powerful analytical methods utilized in the fields of health, environmental issues and food quality control. Nowadays, a deeper knowledge of the chemical species in biological systems is mandatory, and this requirement presents a real challenge to the analytical chemist. The "metallome" was defined by Williams as the distribution of elements, the concentrations at equilibrium of free metallic ions, or the free element contents in a cellular compartment, cell or organism [1]. The metallome refers to the identities and/or quantities of metals/metalloids and their species in such a biological context [2–5]. The complexity of biological molecules is much higher than those considered in classical speciation studies (i.e. inorganic arsenic, methylarsonate, methylmercury, $Cr^{6+}$ and other species), and the greatest difficulties for the analytical chemist working in this field are an absence of standards for identification, the labile character of the metal/metalloid–organic molecule and the typical concentrations of elements (in the range of sub-ng $g^{-1}$).

In science, is important to understand what happens inside the cell, which requires new analytical tools that are capable of extracting massive information on all of the molecular processes and reactions that take place in that cell at a given instant. Genomics techniques are very useful in this respect, as they can reveal the characteristics of the information present in the cellular core that determines cell function and behaviour. Proteomics studies also provide important information, as proteins are the workers that provide the functional expression of the genome. However, some important questions remain unsolved: which proteins, which forms of those proteins, and what quantities of them are expressed? Moreover, post-translational modifications such as the phosphorylation and glycosylation of proteins determine their function, and it is well known that many environmental factors or multigenic processes (i.e. ageing and disease) cannot be explained solely via genomics.

On the other hand, another important fact is that approximately one-third of all proteins require the presence of metals as cofactors to perform their functions [2, 6, 7]. These metals are responsible for the catalytic properties or structures of proteins, and their presence in molecules is determined in many cases by the genome [6]. In addition, to understand the behaviour of a cell, tissue or living organism, it is necessary to consider low molecular mass molecules, since they represent the final mechanism of action of the organism. Therefore, while genomics informs us about how an organism can potentially work and proteomics about how it do it, metabolomics explains how the organism works at a given instant. Since there are also a lot of metabolites that contain metals, the important information afforded by metallo-metabolomics should be integrated with the other "omics" [8, 9].

There is now a huge amount of information about the biological functions of elements in the literature, and numerous analytical methods have been developed for this purpose, providing a wide field of application. However, most of these methods focus on only one element or a very well-defined species family associated with an element, and some elements (or species of them) can counteract the actions of others through cooperation or availability mechanisms [10]. A good example of this is the antagonistic effect of selenium on mercury toxicity, which was first reported in 1967 following an experiment in which rats were treated with mercury chloride and selenite [11]. Since living organisms are usually exposed to a complex environment in which different elements and their species are present together, these types of interactions complicate the situation even further, and analytical methods that are capable of multispeciation while accounting for biological, synergistic and inhibitory effects have been published. Thus, the metabolism of trace elements cannot be considered in isolation.

The most well-studied interactions between species of elements are those related to Se, Hg and As, and the present paper focuses mainly on them. However, other important interactions between elements that are less frequently considered in the literature are also discussed.

## Agonistic actions of elements

As is well known, the use of metal ions by all living organisms depends on their relative abundances, availabilities and individual chemistries. These factors have served as

driving forces for the evolution of life on Earth, as asserted by Thiele et al. [12]. Another important factor is the lability of the metal–biomolecule link, which promotes the rapid assembly and disassembly of metal cores as well as the rapid association and dissociation of substrates. Thus, metal ions such as $Cr^{3+}$ and $Co^{3+}$, which are well known in inorganic chemistry for their kinetic inertness, are rarely utilized in biological systems, since metalloproteins consist of kinetically labile and thermodynamically stable units [13].

Among the 21 elements recognized as being essential to all living organisms, 11 are metals (Na, K, Mg, Ca, Mo, Mn, Fe, Co, Ni, Cu and Zn), six are nonmetals (H, C, N, O, P, S) and two are halogens (Cl and I). Essential ultratrace elements (dietary requirement of μg/day) include Si, V, Cr, Se, Br, Sn and F. Some elements have also biological concern due to their use in drugs or probes, such as Y, Cr, Tc, Co, Pt, Ag, Au, Cd and Hg. An example is the use of cisplatinum for the treatment of cancer [13–15]. As established by Shroeder, trace elements can be classified into two groups. The first includes all of the elements that participate in biochemical reactions (essential trace elements), and the second includes elements with other functions. The latter group can be further divided into those that do not cause damage to living beings when taken in at concentrations commonly found in the environment, and those that have deleterious effects at such concentrations. In this sense, there are elements with known essential functions (F, Si, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Se, Mo and I) that produce nutritional deficiencies in humans (F, Cr, Fe, Cu, Zn, Se and I) or animals (Si, Mn, Co, Ni and Mo) if not consumed in sufficient amounts, and other elements with suspected essential functions but unknown mechanisms of action (V, As, B, Br, Cd, Li, Pb and Sn). Finally, other elements such as Hg do not exhibit known essential functions. This classification of essential elements is not absolute, because some elements that were historically considered to be toxic are now considered to be essential, as in the cases of selenium, chromium [15, 16] and tungsten, which has been recently added to the list of metals found in biological systems [13]. In addition, the essential/toxic character of some elements (e.g. selenium and chromium) depends on their concentrations and/or chemical forms, which in turn depend on their chemical properties.

In bioinorganic chemistry, ligands are commonly amino acid side chains or constituents of nucleic acids. Coordination is critically dependent upon the three-dimensional folding of proteins and the tertiary structures of nucleic acids [13]. However, metals can also bind to prosthetic groups of metalloproteins (i.e. iron–protoporphyrin IX, magnesium–chlorophyll), bleomycin, siderophores, coenzymes (i.e. cobalamin–Co), and methylcobalamin. The latter can transfer a $CH_3^-$ ion to Hg, Pb, and Sn salts in aqueous solution; this biomethylation reaction probably contributes to the toxicity of these elements. Finally, metals can bind to complex assemblies such as cell membranes, viruses and intracellular compartments (i.e. ribosomes, mitochondria and the endoplasmic reticulum) [13]. In this way, some elements such as Cu, Zn, Cd, Hg and Ag coordinate to proteins through a sulfur atom while others do so through nitrogen or oxygen atoms such as Mo, Mn, Fe, Co, Ni, Cu and Zn. Metabolites of As, Se and I have a metalloid–carbon covalent bond. Other elements such as Al, Ni and Fe coordinate through small organic ligands. Mg, V, Fe, Co and Ni coordinate via tetrapyrrole ligands; Ca, Sr, Ba, La and Pb form complexes with polysaccharides; and Pt, Ru, Cr and Ni coordinate with nucleic acids and their constituents [17]. In selenoproteins (i.e. glutathione peroxidase, selenoprotein P), selenium is strongly bound to the organic moiety, since selenocysteine is genetically encoded into these selenoproteins and is thus an integral protein constituent [18].

Table 1 shows the most important antagonistic and synergistic interactions of the species of elements that are discussed in the following sections.

## Antagonistic interactions

### Arsenic and selenium

#### *Beneficial actions of arsenic species*

The first evidence of arsenic–selenium antagonism was obtained in 1938, when drinking water containing arsenite was found to completely protect rats from the otherwise lethal liver damage caused by seleniferous wheat or selenite [19]. Sodium arsenite and sodium arsenate, when used as sources of arsenic, were equally effective at preventing the toxic action of selenium in albino rats fed with seleniferous wheat (sodium selenite and selenium–cysteine). However, $AsS_2$ and $AsS_3$ were ineffective in this experiment [20]. Organic arsenicals have also been shown to protect against selenosis—at least partially. This is also the case for the antisyphilitic drugs neoarsphenamine, sulfarsphenamine, arsanilic acid and 3-nitro-4-hydroxyphenylarsonic acid [21, 22].

Arsenite has been found to be effective at preventing selenite-induced cataracts (75% protection) in rats [23]. Moreover, arsenic compounds also induce clinical remission in patients with acute promyelocytic leukaemia [24] and dermatological disease [25], and may represent a potential treatment for other cancers [26–29]. The first proof of the As/Se interaction in relation to cancer was found in mice [30] and rats [31], when $As^{III}$ antagonized the carcinogenic effect of $Se^{IV}$. Later, studies with human malignant melanoma cells demonstrated that arsenite-induced apoptosis is prevented by selenite [32].

**Table 1** Main antagonistic and synergistic interactions of species of elements of interest

| Interaction | | Living organism | Effect | Reference(s) |
|---|---|---|---|---|
| Interactions of selenium- and arsenic-containing species | | | | |
| $Se_{total}/As_{total}$ | A | Humans | DNA hypomethylation/cancer | [58] |
| | A | Humans | Se reduces the risk of As-related skin lesions and cancer | [52–54] |
| $SeO_3^{2-}$/iAs(III) | A | Rats | As prevents lethal liver damage caused by Se | [19] |
| | A | Rats | As prevents Se-induced cataracts | [23] |
| | A | Humans | Skin lesion/skin cancer | [185] |
| | A | Human cells | As-induced apoptosis is prevented by Se | [32] |
| | A | Mice | As prevents carcinogenic effect of Se | [30] |
| | A | Rats | As prevents carcinogenic effect of Se | [31] |
| | A | Rats | As protects against the toxicity of Se (growth, mortality rate, pathological condition of the liver) | [20, 33, 186] |
| | A | Rats | As induces mucosal glutathione synthesis, explaining its protective effect against Se | [187] |
| | A | Dogs | As antagonizes Se-induced subnormal growth and restricted food intake | [35] |
| | A | Cattle | As protects against Se toxicity | [36] |
| | A | Hogs | As protects against Se toxicity | [38] |
| | A | Steers | As protects against Se toxicity | [39] |
| | A | Mallards | As protects against Se toxicity | [40] |
| | A | Poultry | As protects against Se toxicity | [41–43] |
| | A | Mice | Se prevents As-induced cytotoxicity | [37] |
| | S | Cells | Se inhibits As methylation, increasing toxicity | [87] |
| | A | Fish cells | Se reduces the acute cytotoxicity of As | [56] |
| $SeO_3^{2-}/AsO_4^{3-}$ | A | Mice | Se decreases the ratio of organic/inorganic As | [109] |
| | A | Hamsters | Se decreases As methylation | [188] |
| | A | Plants | Se prevents As toxicity | [59] |
| $SeO_4^{2-}/AsO_4^{3-}$ | A | Fish cells | Se reduces the acute cytotoxicity of As | [56] |
| | S | Plant cells | Se increases the toxicity of As | [59] |
| SeMet/iAs(III) | A | Human cells | Se reduces As-induced cytotoxicity | [57] |
| SeBet/iAs(III) | S | Rats | Coadministration enhances the tumour-suppressive effect of Se | [86] |
| Interactions of selenium- and mercury-containing species | | | | |
| $Se_{total}/Hg_{total}$ | A | Humans | Se prevents Hg induced cardiovascular diseases | [66] |
| | A | Brown trout | Se inhibits Hg-induced induction of metallothionein | [69] |
| $Se_{total}/MeHg^+$ | A | Humans | Se inhibits Hg-induced neurotoxicity | [62] |
| | A | Octopus | Se demethylates $MeHg^+$ | [130] |
| | A | Humans | Se inhibits Hg-induced cardiovascular diseases | [67] |
| | A | Rats | Se may alter the reproductive and developmental toxicity of $MeHg^+$ | [72] |
| $SeO_3^{2-}/Hg^{2+}$ | A | Rats | Se antagonizes Hg-induced intestinal necrosis | [11] |
| | A | Rats | Se prevents Hg renotoxicity | [131] |
| | A | Rats | Se antagonizes Hg-induced inhibition of the enzymes of glutathione metabolism | [189] |
| | A | Tuna | Se prevents Hg-induced intestinal necrosis | [60] |
| | A | Mice | Se prolongs the half-lives of Hg-exposed animals | [190] |
| | A | Rats | Se changes the subcellular Hg distribution | [191] |
| | S | Oysters | High levels of Se increase Hg toxicity | [192] |
| $SeO_3^{2-}/MeHg^+$ | A | Chickens | Se changes the subcellular and pattern distribution of Hg | [193] |
| | A | Medaka fish | Se protects against Hg-induced histopathological changes | [151] |
| $SeO_2/Hg^{2+}$ | A | Chicks | Se toxicity is decreased by Hg | [194] |
| $SeO_4^{2-}/MeHg^+$ | A | Mice | Se protects against Hg-induced neurotoxicity | [63] |

**Table 1** (continued)

| Interaction | | Living organism | Effect | Reference(s) |
|---|---|---|---|---|
| | S | Human cells | Se and Hg inhibit DNA synthesis | [88] |
| | A | Human cells | Protection against $MeHg^{+}$ toxicity | [195] |
| | A | Fish | Se affects Hg bioaccumulation and toxicity | [152] |
| $SeMet/Hg^{2+}$ | A | Rats | Se inhibits the effects of Hg on organic activities | [141] |
| | A | Human cells | Se prevents Hg-induced apoptosis | [68] |
| $SeMet/MeHg^{+}$ | A | Rats | Se prevents Hg-induced porphyrinuria | [75] |
| | A | Zebrafish | Se reduces visual deficits due to developmental Hg exposure | [74] |
| | A | Diatoms and mussels | Se significantly inhibits the uptake of Hg | [196] |
| SeProt/ $Hg^{0}$ | A | Humans | Se detoxifies Hg | [197] |
| $SeProt/MeHg^{+}$ | A | Human cells | Hg induces a "selenium-deficient-like" condition | [136] |
| | A | Mice | Hg affects the activities of selenoenzymes | [71] |
| Interactions of selenium- and sulfur-containing species | | | | |
| Se species/S species | A | Bacterial systems | Se appears to use the sulfur enzymatic system | [79] |
| | A | Se-hyperaccumulator plant | Important differences between S and Se biochemistries | [84] |
| $SeO_3^{2-}$/S compounds | A | Plants | Reaction between Se and thiol groups induces loss of plants defence system efficiency and increases the levels of reactive oxygen species | [164] |
| $SeO_4^{2-}$/S compounds | A | Microalgae | Se exerts an antimetabolite action on the growth | [77] |
| | A | Green plants | Sulfur metabolites antagonize Se toxicity | [80] |
| | A | Yeast | Sulfur antagonizes Se toxicity | [83] |
| SeMet/sulfur compounds | A | Sheep | More Se is incorporated into wool and plasma protein when dietary S is limiting | [165] |

*A* antagonism, *S* synergism, *SeMet* selenomethionine, *SeProt* selenoproteins, *$MeHg^{+}$* methylmercury, *SeBet* selenobetaine, *iAs(III)* $AsO_3^{3-}$ or $AsO_2^{-}$

Protective effects of arsenic in rats [19, 20, 23, 33, 34], dogs [35], cattle [36], mice [37], hogs [38], steers [39], mallards [40] and poultry [41–43] have been observed/proposed. Several studies apparently suggest that the same interaction can occur in humans [44–49].

*Protection against arsenic toxicity by selenium*

Although the difference in concentration between selenium deficiency and toxicity is relatively small, it is a necessary element to animal life and possesses cancer chemopreventive properties [50]. On the other hand, it is known that arsenic exposure is associated with increased production of free radicals and oxidative stress, which can be reduced through the action of selenoproteins [51]. Some authors have concluded that a high dietary selenium intake in humans can reduce the risk of arsenic-related skin lesions [52–54], but the recommended daily intake of selenium may not be adequate in the presence of physiological stressors, such as chronic exposure to arsenic in drinking water [52].

In experiments carried out with cell lines, it was demonstrated that arsenic suppresses the necrosis induced by selenite in human leukaemia cells [55], and selenate and selenite (at nontoxic levels) reduced—but did not eliminate—the acute cytotoxicities of arsenate and, to a lesser extent, arsenite in fish cells (fibroblastic and epithelioid) [56]. In a recent study on human kidney cells, it was observed that selenomethionine (SeMet) significantly reduces the cytotoxic effect of inorganic arsenic, while inorganic selenium does not. In addition, it has been demonstrated that the presence of SeMet with $As^{III}$ enhances the appearance of phosphorylated proteins, although there is insufficient evidence to definitively conclude that these phenomena form part of a molecular mechanism that reduces cytotoxicity [57].

Global hypomethylation of DNA is thought to occur early in the development of some cancers, and it takes place in response to arsenic exposure and/or selenium deficiency in both in vivo and animal models. In a study on humans, selenium was found to be inversely associated with genomic leukocyte DNA methylation, and it may influence blood and urinary As concentrations as well as the relative proportions of As metabolites in blood [58].

In plants, several experiments have concluded that selenite co-exposure prevents against arsenate toxicity. In addition, the detection of the $Se^{II}$–$PC_2$ complex and Se–cysteinylserine glutathione in *Thunbergia alata* suggested that symptoms of increased toxicity may have been due to the competition of $Se^{II}$ with $As^{III}$ for sulfhydryl groups, which are crucial to arsenite detoxification in plant cells [59].

### Selenium and mercury

#### *Protection against mercury toxicity by selenium*

The antagonistic interaction between mercury and selenium was first reported in 1967, following an experiment involving the treatment of rats with mercury chloride and selenite [11]. After that, other experiments confirmed this finding in tuna fish [60] and other animals. Thus, in general, the simultaneous administration of selenite counteracts the negative impacts of exposure to inorganic mercury, particularly in relation to neurotoxicity, fetotoxicity [61–65] and cardiovascular diseases [66]. However, some authors have suggested that further studies of the potential interplay of these elements in cardiovascular diseases are warranted, especially in relation to fish consumption [67]. Also, quails fed with a methylmercury ($MeHg^+$)-containing diet survived longer when they were also fed tuna with high levels of selenium [60]. In humans, selenite- and SeMet-dependent protection against mercury-induced apoptosis and growth inhibition in human cells has been observed [68]. However, other studies have revealed that inorganic selenium is ineffective at preventing most $MeHg^+$-induced alterations in brain biochemistry, and that it is also toxic when present on its own [63].

The selenium to mercury molar ratio is very important (as described later in this paper), and it has been observed that the presence of a molar excess of Hg over Se is a strong inducer of metallothionein in trout [69].

As previously stated, selenium can also counteract the toxicity of methylmercury [70]. In a study performed in utero on mice that were administered $MeHg^+$ and Se, the group that was given the smallest amount of Se but the highest dose of $MeHg^+$ was most adversely affected in terms of neurobehavioural outcome [71]. In rodents, the presence of antioxidants such as Se and vitamin E in the diet may alter the reproductive and developmental toxicity of $MeHg^+$ [72]. Selenium has also been shown to reduce mercury bioavailability and trophic transfer in aquatic ecosystems [73].

A great number of studies have been carried out on the protective influence of selenocompounds against $MeHg^+$ toxicity, especially selenomethionine (SeMet) [74–76]. Also, the exposure of rats to $MeHg^+$ resulted in a significant increase in urinary porphyrins and a decrease in motor activity, which were counteracted by SeMet [75].

### Selenium and sulfur

#### *Protection against selenium toxicity by sulfur*

Selenium and sulfur atoms are chemically very similar, and selenate can be metabolized in several organisms to some degree by enzymes that reduce sulfate [77]. In 1941, Horn and Jones [78] reported the extraction from *Astragalus pectinatus* of a crystalline amino acid complex containing sulfur and selenium, which was assigned to a mixture of cystathionine and its selenium analogue. There are several enzymatic processes that do not distinguish selenium from sulfur and may therefore be important in selenium toxicity [79]. In addition, sulfate and other sulfur metabolites such as sulfur amino acids can antagonize selenate toxicity in a competitive fashion in green plants [80], *Desulphovibrio desulfuricans* [81, 82], yeast [83], and so on. Analysis of *Chlorella vulgaris* cells for selenium indicated that sulfate prevents the absorption of its selenium analogue, and that they compete during the process of absorption into the cell. Similar relations have also been found between L-methionine and its analogue selenium–methionine [77].

Organoselenium compounds are generally less stable and more reactive than their corresponding sulfur analogues, which can be related to the toxicity of selenium when it is incorporated instead of sulfur into cellular constituents. Studies carried out in algae suggest that, when exposed to sublethal but higher than trace level concentrations of Se, algal cells tend to substitute Se for some of their sulfur. Thus, Se appears to use the sulfur enzymatic system in Se-overloaded conditions, while Se-specific enzyme systems seem to operate when normal levels of Se are present, at least in bacterial systems [79].

In the Se-hyperaccumulator plant *A. bisulcatus*, similar trends were observed for oxidized and reduced Se and S species, but the proportions of them were very different; although sulfate and selenate reduction were correlated, the results suggested that there are important differences between the biochemistries of S and Se [84].

Therefore, although Se and S are in the same group of the periodic table, they differ in their biological properties, due in part to differences in their oxidation–reduction properties. In animals, Se tends to undergo reduction in vivo, in contrast to sulfur compounds, which are required in reduced form (i.e. amino acids). Another important difference between them is the acidity of their hydrides, and the selenohydryl group of selenocysteine is in its anionic form at physiological pH, while the sulfhydryl group is protonated [85].

## Synergistic interactions

### Arsenic and selenium

Selenobetaine in the chloride form [$(CH_3)_2Se^+CH_2COOH$] and its methyl ester are extensively metabolized in rat to mono-, di- and trimethylated selenides. Coadministration of selenobetaine with arsenite in rats enhances the tumor-

suppressive effect of selenobetaine, although arsenic by itself is totally ineffective. This can be related to the inhibition by arsenic of certain steps during selenium methylation, suggesting that partially methylated forms of selenium may be directly involved in the anticarcinogenic action of selenium [86].

In cells, selenite—rather than its methylated metabolites—is responsible for inhibiting arsenite methylation in cultured rat hepatocytes, and it may stimulate the observed increased cellular toxicity of inorganic arsenic [87].

### Selenium and mercury

Selenium and mercury are also less toxic to animals when administrated simultaneously rather than individually, since selenium can counteract the membrane-destabilizing characteristics of methylmercury and block it from binding to cells [88].

On a concentration basis, selenite and methylmercury hydroxide show equal efficacy at inhibiting DNA synthesis in the growth medium of carcinoma cells. However, if replication is expressed as a function of the amount of toxicant that binds per cell, sodium selenite is more toxic but selenite is taken up by cells more slowly than methylmercury. In addition, more selenium is needed in the growth medium to bring about the same degree of membrane damage. The best mutual protection appears to occur when there are equimolar amounts of selenite and methylmercury or a slight excess of selenite [88].

## Other interactions

In the literature, selenium, mercury and arsenic are the elements that have received the most interest in relation to their antagonistic and synergistic actions with other elements. However, there are other important interactions between species of elements that have been studied to a lesser degree. For example, selenium and zinc counteract the toxic effect of cadmium. This interaction has been studied in cultured cells (Se/Cd) [89] and rat kidney (Se/Cd, Zn/Cd) [90]. In addition to Se and Zn, Ca and P also appear to influence the toxicity of Cd (Ca/Cd, P/Cd), especially in relation to nephropathy and osteodystrophy [91].

On the other hand, it has been stated that cadmium and other elements ameliorate the frequency of selenium-induced cataracts [23], and that tungsten, bismuth, germanium and antimony (administered as trichloride, not sodium antimonate) partially protect against selenium toxicity (W/Se, Bi/Se, Ge/Se, Sb/Se) [21, 33, 92].

Selenium also interacts with nickel, and experiments carried out with Wistar rats indicate that the deleterious effects of $NiCl_2$ on rat reproduction are antagonized by $Na_2SeO_3$ (Se/Ni) [93]. Interactions between Cd, Cu and Pb in relation to the activities of soil urease and dehydrogenase have also been described [94]. Important antagonistic interactions between Cu and Zn have been noted in relation to health (Cu/Zn) [95]. On the other hand, Zn appears to be an antagonist of arsenic's induction of abnormal blood lipids in rats (Zn/As) [96], and an interesting interaction has been described between molybdenum and copper in diabetes mellitus (Mo/Cu) [97].

As described earlier, there are also many cases of trace element substitution, such as the replacement of sulfur by selenium (Se/S). Indeed, tungsten replaces molybdenum (W/Mo) and cadmium replaces zinc (Cd/Zn) in some enzyme families [98, 99], while copper substitutes for iron (Cu/Fe) as an oxygen carrier in some arthropods and molluscs [100]. Undoubtedly the most surprising interaction recently reported in *Science* relates to a bacterium that can grow with arsenic instead of phosphorus, suggesting that arsenic can be present in macromolecules as proteins or nucleic acids (As/P) [101]. This paper provides evidence for the presence of arsenate in macromolecules that normally contain phosphate—mainly nucleic acids and proteins. However, a technical comment that was subsequently published in the same journal pointed out that, although the previous work is a splendid example of the capacity of life to cope with extreme conditions, it does not show that life can emerge based on other elements different from the canonical [102]. That said, the former study has generated significant commentary, often as anonymous electronic communications. There are also other examples of arsenate substituting for phosphate in the literature [103].

These interactions, among others described in the literature, are summarized in Table 2.

## Trafficking of chemical species and interaction mechanisms

Studying the trafficking of elements between organs or tissues is mandatory in order to really understand the effects of interactions among them. Table 3 shows several examples of the trafficking of chemical species in living organisms. This topic has been reviewed by several authors, especially at intracellular level [104–107].

### As/Se

Several experiments in rats found that arsenic markedly increased the excretion of selenium into the gastrointestinal tract when both arsenite and selenite were injected at subacute dosages, and there were close-to-corresponding decreases in the amount of selenium retained in the liver. Also, selenite stimulated the gastrointestinal excretion of arsenic in experiments similar to those in which arsenic stimulated the gastrointestinal excretion of selenium [34]. Thus,

**Table 2** Other interactions between species of elements

| Interaction | | Living organism | Effects | Reference (s) |
|---|---|---|---|---|
| As/Cd | S | Humans | More pronounced renal toxicity than exposure to each of the agents alone | [198] |
| | S | Rats | Induce lipid peroxidation, glutathione and metallothionein, as well as the redistribution of essential elements | [199] |
| As/Zn | A | Rats | Zn counteracts As-induced abnormal blood lipids | [96] |
| | A | Rats | Zn prevents arsenic-induced tissue oxidative stress | [200] |
| As/P | A | Human cells | As perturbs phospholipid bilayer structures, modifying their thermotropic behaviour | [201] |
| | A | Bacterial systems | Bacterium that can grow with As instead of P | [101] |
| | A | Bacterial systems | Evidence for As in macromolecules that normally contain P | [103] |
| Sb/Se | A | Rats | Sb has a partially protective effect against Se toxicity | [21, 33, 92] |
| Bi/Se | A | Rats | Bi has a partially protective effect against Se toxicity | [21, 33] |
| Cd/Ca | A | Rats | Ca prevents Cd-induced carcinogenesis | [202] |
| | A | Zebrafish | Ca potentially detoxifies Cd | [203] |
| | S | Rainbow trout | Cd and Ca cooperate to impair oxidative phosphorylation in liver mithochondria | [204] |
| Cd/Zn | A | Rats | Zn counteracts the toxic effect of Cd | [90] |
| | A | Marine diatoms | Cd substitutes Zn in some enzyme families | [99] |
| | S | Plants | Zn and Cd at equimolar concentrations may overcome Cd toxicity | [205] |
| | S | Bean plants | Roots retain less Cd than is accumulated in shoots | [206] |
| | S | Hyperaccumulator plants | Accumulation of Zn and Cd in roots, petioles and leaves increase significantly with the separate addition of each | [207] |
| | S | Amphipods and crabs | Zn addition induces a decrease in Cd toxicity and accumulation | [208] |
| | A | Rats | Zn consumption may be beneficial against Cd hepatotoxicity | [209] |
| | A | Rats | Zn reduces Cd-induced metallothionein synthesis | [210] |
| | A | Rats | Zn prevents Cd-induced alterations in lipid metabolism | [211] |
| | S | Tomato plants | Zn and Cd produce oxidative stress | [212] |
| | A | Toads | Zn increases resistance to Cd toxicity | [213] |
| | A | Mice | Zn protects against effects of Cd on preimplantation mice embryos | [214] |
| Cd/Cu | S | Tilapia | Modifies the distribution of metals in organs | [215] |
| Cd/Hg | A | Rats | Cd causes higher Hg levels in the blood and lower levels in the heart, muscle and skeleton | [216] |
| Cd/Se | A | Human cells | Se protects against Cd toxicity | [89] |
| | A | Rats | Se prevents Cd-induced oxidative stress | [90] |
| | A | Rats | Se protects against Cd-induced nephrotoxicity and hepatotoxicity | [217] |
| | A | Mice | Se protects against Cd-induced chromosomal aberrations | [218] |
| | A | Monkeys | Se protects enzyme systems | [219] |
| | S | Rats | Se and Cd affect the hepatic gluconeogenic pathway | [220] |
| | A | Bacterial systems | Se protects against Cd-induced lipid peroxidation | [221, 222] |
| | A | Rats | Se partially restores Cd-induced oxidative stress and decreased sperm count and motility | [223] |
| | A | Rats | Se antagonizes the Cd-induced inhibition of hepatic drug metabolism | [224] |
| | A | Rats | Se antagonizes Cd-induced testicular damage | [225] |
| | A | Porcine cells | Se prevents Cd-induced apoptosis | [226] |
| | A | Rats | Hepatoprotective effects of Se against Cd | [227] |
| Zn/Pb | A | Rabbits | Zn may delay the accumulation of Pb in the cerebrum | [228] |
| Zn/Hg | A | Mice | Zn protects against low-dose Hg-induced testicular damage | [229] |
| | A | Hamsters | Teratogenic and embryopathic effects | [230, 231] |
| | A | Rats | Displacement of Zn from metallothionein by Hg | |
| Cu/Zn | A | Humans | Zn decreases Cu absorption | [95] |
| | A | Rats | Zn decreases Cu concentrations in kidney and liver | [232] |
| | A | Rats | Zn competes with Cu | [233] |
| | A | Humans and rats | Zn influences Cu-induced lipid peroxidation | [234] |
| Cu/Fe | A | Arthropods and molluscs | Fe substitutes Cu in some enzyme families | [100] |

**Table 2** (continued)

| Interaction | | Living organism | Effects | Reference (s) |
|---|---|---|---|---|
| | A | Rats | Cu influences Fe metabolism and the formation of haemoglobin | [235] |
| | A | Rats | Changes in Cu levels that accompany Fe deficiency are not mediated by changes in the transcription of the genes involved in Cu transport | [236] |
| Cu/Fe/Zn | A | Chicks | Ingestion of large amounts of Zn induces anaemia, primarily by depressing Fe absorption in chicks<br>Cu partially counteracts the effect of high levels of Zn on the endogenous excretion of Fe but does not alter the effect of Zn on iron absorption | [237] |
| Cu/Hg | A | Rats | Hg may alter the metabolism of Cu | [238] |
| Cu/Mo | A | Humans | Mo removes Cu from tissues, affecting diabetes mellitus | [97] |
| Ge/Se | A | Rats | Ge partially protects against Se toxicity | [21, 33] |
| Ni/Se | A | Rats | Se may antagonize the deleterious effects of Ni during reproduction | [93, 239] |
| | A | Rats | Se decreases hepatic, renal, cardiac and blood Ni burdens | |
| Se/Ag | S | Mice | Se protects against Ag-induced lipid peroxidation in the liver | [240, 241] |
| | A | Mushrooms | Se protects against lipid peroxidation due to Ag exposure | |
| Te/Se/Hg | S | Mice | Hg retention is increased by pre-administration of Te or Se | [242] |
| W/Mo | S | Humans | They are incorporated at the the active sites of enzymes | [98] |
| W/Se | A | Rats | W partially protects against Se toxicity | [21, 33] |

*A* antagonism, *S* synergism

selenium deficiency can decrease the excretion of inorganic and organic arsenic in animal models [108], and may induce the accumulation of As in mice liver [109]. On the other hand, selenium sufficiency increases the excretion of arsenic in pregnant women [110] and mice [108].

In relation to the mechanism of the As/Se interaction, X-rays were used to identify seleno-bis(*S*-glutathionyl) arsinium ion [$(GS)_2AsSe^-$] in the bile of rabbits injected with aqueous selenite and arsenite solutions in a study performed in the year 2000. This fact indicates that a lethal dose of selenium can be overcome by an otherwise lethal dose of arsenic in mammals [111].

Investigations into the mechanism of this biochemical interaction between $As^{III}$ and $Se^{IV}$ suggest that it occurs in blood and liver [112]. In addition, the interaction between $As^{V}$ and $Se^{IV}$ is related to the $As^{III}$–$Se^{IV}$ interaction, and injecting rats with $As^{V}$ and $Se^{IV}$ twice a week for four weeks resulted in the formation of a precipitate in kidney lysosomes, which was identified as $As_2Se$ [113].

## Hg/Se

### *Interaction mechanisms*

Various mechanisms have been proposed to explain the interactions between these elements:

(i) Selenium provokes the redistribution of mercury to less sensitive organs
(ii) There is competition between the elements for the same cleavage
(iii) Hg–Se complexes are formed
(iv) Selenium converts highly toxic Hg species to less toxic forms
(v) Selenium prevents the oxidative stress caused by Hg

It is believed that a 1:1 Hg–Se compound with low biological availability and activity is formed inside cells, so cell damage is quite low even in the presence of very high Hg concentrations if both elements are present in approximately equimolar quantities. This has been stated in studies of marine mammals [114] and humans that were exposed to high levels of inorganic mercury [115]. In 1978, experiments with marine organisms suggested a direct Hg–Se linkage, and the 1:1 molar ratio of mercury to selenium holds true for several species [114], including humans [115]. An Se:Hg molar ratio of >1 is suggested to be the threshold for protective action against Hg toxicity in tissues [116]. Different selenium to mercury molar ratios have been observed in some food organisms for marine mammals (16:1) [117], tuna fish (15:1 or 3:2, depending on the mercury levels) [118], mink fed mercury-contaminated freshwater fish (0.13:1) [119], sardines (2:1) [120], swordfish (17:1) [120], marbled sole [121], and so on. We can thus conclude that the 1:1 ratio is established internally in marine mammals [117]. In addition, in an experiment with mink, low Se/Hg ratios that decreased with exposure time were observed in liver and kidney, suggesting that they might reflect a low selenium intake in the diet [117].

**Table 3** Trafficking of species of elements in living organisms

| Interaction | Living organism | Effect | Reference(s) |
|---|---|---|---|
| As/Se | Pregnant women | Se sufficiency ↑[As] excretion | [110] |
| iAs(III)/$SeO_3^{2-}$ | Rats | ↑[Se, As] gastrointestinal excretion<br>↓[Se] in carcass, blood, expired air | [34] |
| | | High As doses ↑[Se] in kidneys | |
| | | Low As doses ↑[Se] in urine | |
| | Mice | Se deficiency ↑[As] in liver | [109] |
| | Mice | Excess Se in diet ↑[As] excreted (more marked for inorganic than methylated forms) | [109] |
| | Mice | Se sufficiency ↑[As] excretion<br>Se deficiency ↓[As] excretion | [108] |
| | Rat | ↓ Pulmonary excretion of volatile selenium | [243] |
| Sodium arsanilate/Se | Rats | ↓[Se] in gastrointestinal contents and carcass<br>↑[Se] expired air | [34] |
| MA,DMA/Se | Humans | Plasma Se concentrations are inversely related to total As in blood and urine, inversely related to %MA in blood, and positively associated with %DMA 1 in blood | [58] |
| Cd/Cu | Tilapia | ↑[Cu, Cd] in intestinal wall | [244] |
| Cd/Hg | Rats | ↑[Hg] in blood<br>↓[Hg] in heart, muscle and skeleton | [216] |
| Zn/Cu | Rats | ↓[Cu] in kidneys and liver | [232] |
| | Rat | Excessive Zn ↓[Cu] intestine, liver and placenta | [245] |
| | | Excessive Cu affects hepatic Zn metabolism | [246] |
| | Sheep | Excessive Zn ↓[Cu] intestine, liver and placenta | [247] |
| Zn/Pb | Rabbits | ↓[Pb] in the cerebrum | [228] |
| Cu/Fe | Rats | Reduced dietary iron ↑[Cu] in liver, serum and placenta | [236] |
| Cu/Mo | Humans | ↓[Cu] in tissues<br>↑[Cu] in serum and urine | [97] |
| $Se_{Total}/Hg_{Total}$ | Mammals, birds, and fish | ↑[Hg] in the food chain | [117] |
| $Hg^0/Se_{Total}$ | Rats | ↓[Hg] in kidney cortex, kidney medulla and thyroid | [197] |
| $Hg^{2+}/SeO_3^{2-}$ | Mice | ↓[Hg] in kidneys | [140] |
| | Mice | ↑[Hg] in kidneys, liver and brain | [248] |
| | Trout | ↓[Hg] muscle and kidneys<br>Liver, erythrocytes, bile and blood plasma were unaffected | [146] |
| | Rats | ↓[Hg] in kidneys | [249] |
| | Chicken | ↑[Hg] in liver and muscle | [149] |
| | Minnows | ↓[Hg] in kidneys | [250] |
| | Killifish | ↓[Hg] in kidneys<br>↑[Hg] in liver | [251] |
| | Rabbits | ↓[Hg] in kidneys | [70] |
| | Pigs | ↓[Hg] in kidneys<br>↑[Hg] in liver, spleen and lungs | [252] |
| | | ↑[Se] in liver, spleen and lungs | |
| | Rats | ↓[Hg] in kidneys<br>↑[Hg] in liver and spleen | [253] |
| | Rats | ↑[Hg] in liver | [254] |
| | Rats | ↓ [Hg] in lysosomes in proximal tubular cells | [255] |
| | Rats | ↓ Pulmonary excretion of volatile selenium | [243] |
| $Hg^{2+}/SeO_4^{2-}$ | Fish | ↓ Dietary Hg assimilation efficiency | [152] |
| $Hg^{2+}$/SeMet | Rats | ↓[Hg] in kidneys<br>↑[Hg] in liver and blood | [142] |
| | Fish | ↓ Dietary Hg assimilation efficiency | [152] |
| $Hg^{2+}$/SeCys | Fish | ↓ Dietary Hg assimilation efficiency | [152] |

**Table 3** (continued)

| Interaction | Living organism | Effect | Reference(s) |
|---|---|---|---|
| $MeHg^+/Se$ | Walleye fish | ↓[Hg] in liver and muscle | [150] |
| | Monkey | ↑[Se] and ↑[Hg] in occipital pole and thalamus | [256] |
| $MeHg^+/SeO_3^{2-}$ | Trout | ↓[Hg] in liver, muscle, kidneys, bile and erythrocytes<br>Blood plasma is unaffected | [146] |
| | Chicken | ↑[Hg] in kidneys and muscle | [149] |
| | Medaka fish | ↑[Se] bioaccumulation | [151] |
| | Rats | ↓[Hg] in kidneys<br>↑[Hg] in liver and spleen | [253] |
| | Rats | ↑[Hg] in liver | [120] |
| | Rats | ↑[Hg] in brain | [257, 258] |
| | | Se changes the ratio between $Hg^{2+}$ and $MeHg^+$ in liver but not in brain | [258] |
| | Rats | ↑ $MeHg^+$ demethylation in the brain | [259] |
| | Quails | ↑[Hg] in liver and brain<br>↑[Se] in liver, brain, blood and kidneys | [260] |
| | Mice | ↑[Hg] in liver | [261] |
| | Chickens | ↓[Hg] in liver and muscle | [262] |
| | Quails | ↑[Hg] in liver | [262] |
| | Hens | ↑[Hg] in liver | [263] |
| | Quails | ↓[Hg] in liver | [264, 265] |
| | Chickens | ↓[Hg] in liver | 266] |
| $MeHg^+/SeO_2$ | Rats | ↓[Hg] in blood and liver | [267] |
| $MeHg^+/SeO_4^{2-}$ | Rats | ↑[Hg] in kidneys and liver<br>↓[Hg] in brain | [268] |
| $MeHg^+$/SeMet | Ducks | ↑[Se] in liver and eggs<br>↑[Hg] in liver and eggs | [148] |
| | Rats | ↑[Hg] in blood and liver | [267] |
| | Ducks | ↑[Se] in liver and eggs<br>↑[Hg] in liver and eggs | [148] |
| $PheHg^+/SeO_3^{2-}$ | Chickens | ↓[Hg] in liver, kidneys and muscle | [269] |
| $TlAc/SeO_3^{2-}$ | Rat | ↓ Pulmonary excretion of volatile selenium | [244] |
| Te/Se/Hg | Mice | ↑[Hg] in kidneys and spleen | [243] |

*iAs(III)* $AsO_3^{3-}$ or $AsO_2^-$, *SeMet* selenomethionine, *SeCys* selenocystine, *MeHg*$^+$ methylmercury, *PheHg*$^+$ phenylmercury, *MA* methylarsonate, *DMA* dimethylarsinate, *TlAc* thallium acetate, ↑*[]* increase in the concentration, ↓*[]* decrease in the concentration

The possibility that HgSe formation is responsible for the 1:1 molar ratio is supported by experiments that showed two facts: (i) enzymatically digested liver and plasma fractions with a 1:1 molar ratio release mercury and selenium in insoluble forms [122]; (ii) binding to the same plasma protein is preceded by the conversion of selenite to $H_2Se$ in red blood cells [123].

Selenium can also affect the activities of enzymes that cleave the carbon–mercury bond in organic mercury compounds. Experiments with rats show that PMA cleavage enzymes in liver are enhanced when sodium selenite is added to drinking water [124]. It has also been observed that MeHg exposure exerts an inhibitory effect on paraoxonase 1 activity, which can be counteracted by selenium in humans [125]. Other hypotheses are that: (i) selenium can promote the redistribution of Hg from more sensitive organs (kidney, central nervous system) to less sensitive ones (muscle), and that there is competition from Se for the same receptors; (ii) complexes such as tiemannite [126] or Se–Hg–S [127] are formed, or; (iii) the conversion of $MeHg^+$ into less toxic forms is promoted and oxidative damage is prevented [128]. In addition, Yang et al. proposed that Se is involved in the demethylation of $MeHg^+$ in the liver to form less toxic inorganic Hg compounds [129]; other authors later proposed the same mechanism in octopus [130].

The formation of Hg–Se complexes is discussed in detail in the next section.

### *Biochemical interactions*

Different selenium compounds and selenium itself ("biological selenium") incorporated in vivo into liver tissue have

differing abilities to form Hg–Se compounds. These abilities increase in the following order: biological Se < selenomethionine < selenite, so the protective effects of selenium compounds against mercury toxicity may follow the same order [131]. Mercury ions can react with thiols (–SH) and selenols (–SeH), which are functional groups found in cysteine and selenocysteine, so these ions can be incorporated into proteins, prosthetic groups of enzymes and peptides. Mercury ions can also react with selenides ($Se^{2-}$), and through hydrogen selenide they can form complexes with glutathione, which can ultimately bond to selenoprotein P [132]. This complex [$GSH_5(HgSe)_{100}$] is formed in erythrocytes and then transferred to plasma, before finally bonding to selenoprotein P [112, 133].

Similar complexes can also form in other cells with active selenium metabolism or during the degradation of metal-bound proteins and metallo(selenoproteins) in lysosomes (biomineralization processes), which represents the last step of detoxification [134]. A direct interaction between $MeHg^+$ and the selenol group of GPx (glutathione peroxidase) has also been reported [64, 135], but another molecular mechanism has been proposed to explain the reduced activity of the enzyme after $MeHg^+$ exposure, based on the fact that cultured cells showed that $MeHg^+$ induced a "selenium-deficient-like" condition, which affects GPx1 synthesis through a posttranscriptional effect [136].

Mercury vapour shows similar behaviour to $MeHg^+$ in relation to its ability to penetrate cell membranes, where it is oxidized into the biologically active form $Hg^{2+}$ by catalase. Ions generated in situ in this manner can react with endogenously generated, highly reactive Se metabolites such as $HSe^-$, meaning that some of the selenium is unavailable for selenoprotein synthesis [132]. Mercury can also trigger an increase in the number of free radicals, which induce lipid, protein and DNA oxidation [137–139].

### *Trafficking*

Selenite administered simultaneously and in an equimolar dose to $HgCl_2$ decreases the mercury content of kidney but increases it in other tissues [140] such as liver and blood [141] and alters the plasma binding of mercury, and both mercury and selenium become attached to the same protein fraction in a 1:1 molar ratio [142]. Exposing rodents to low doses of $MeHg^+$ induces the accumulation of Hg in target organs [143–145]. In this way, Hg levels after co-exposure to SeMet have been measured in the brains, kidneys and livers of fish, aquatic birds, rodents and primates, but a number of inconsistencies have been found [146–148].

On the other hand, an increase in the retention of mercury due to the presence of selenium has been observed in marine mammals, which may counteract the positive effect of the selenium-induced decrease in the toxicity of mercury [117]. Adding sodium selenite to the feed of chickens induces a decrease in organic mercury bioaccumulation, although not for $MeHg^+$ [149]. However, it seems that a threshold concentration of selenium in fish body parts must be reached before a clear protective role of selenium against mercury assimilation becomes noticeable [150]. Also, concurrent exposure to methylmercury chloride and selenite led to increased selenium accumulation in medaka fish [151]. The influence of mercury on endogenous selenium after lifelong or acute exposure to mercury vapour ($Hg^0$) has also been studied in man and animals [132]. Besides the well-known phenomenon of Se co-accumulation due to the formation of Hg–Se complexes, notable Se coexcretion was observed in rats (at least at the beginning of Hg exposure), and there were also higher accumulation rates of Hg in rats with lower basal selenium levels [133]. Since the antagonistic interaction of mercury and selenium is dependent on the species of these elements, when Se and Hg are administrated concurrently to fish as dietary supplements, different selenium species such as selenite, selenate, seleno-DL-cysteine and selenomethionine affect Hg accumulation in different ways [152].

### Se/S

The biotransformation of selenate to selenite by two-electron reduction can be performed in at least three different ways: (i) by substituting selenate into the sulfate reduction pathway [reduction by ATP sulfurylase/adenyl sulfate (APS) reductase] [153, 154], (ii) by substituting selenate into the nitrate uptake pathway (microbial nitrate reductases can reduce selenate) [155], or (iii) using a specific selenate reductase. In nonhyperaccumulating plants, it seems that selenate reduction occurs via pathway (i), and that this is the rate-limiting step in selenate transformation [154, 156–158]. In Se-hyperaccumulating *A. bisulcatus* [156, 159] and *Escherichia coli* [160], selenate reduction is preceded by the activation of selenate by ATP sulfurylase to form 5′-adenylylselenate (APSe), and then APSe can be nonenzymatically reduced by gluthathione. In plants [161] and *E. coli* [160], the reduction of selenite to selenide appears to occur nonenzymatically, which may explain why selenite is more readily assimilated by plants into organic forms than selenate is [162, 163].

In plants, toxicity is due to the substitution of S by Se in cysteine and methionine, altering the tertiary structures and catalytic activities of proteins and inhibiting enzymes involved in chlorophyll biosynthesis. The reaction between Se and thiol groups reduces the efficiency of plant defence systems and increases the number of reactive oxygen species. In *Senecio scandens*, selenite induces oxidative stress but selenate does not affect it significantly [164].

In mammals, studies carried out in sheep reveal that more selenium (derived from dietary SeMet) is incorporated into wool and plasma proteins when dietary sulfur is limiting [165]. In humans, studies suggest that replacing sulfur by selenium in established cancer chemopreventive agents results in more effective chemopreventive analogs [166].

## Analytical strategies and techniques for multielement biological studies

Although there are now very powerful analytical techniques and sample preparation procedures that can be applied to element speciation and metallomics, biological systems require multielement analytical strategies that allow the characterization of processes involving the interactions and trafficking of key elements. While various analytical methods have been reported to perform multispeciation, thus potentially allowing the interactions of elements in biological samples to be probed in detail, such methods for determining the species of various elements in an isolated analysis have a number of disadvantages: they are (i) time-consuming, (ii) complex, (iii) cumbersome in terms of sample manipulation, as the samples are usually small in volume or quantity, (iv) they lose a significant amount of information, and so on.

Detection is less problematic because a number of techniques allow multielemental detection [i.e. inductively coupled plasma with either mass spectrometry (ICP-MS) or atomic emission spectroscopy (ICP-AES)] or can be used to identify an element in a molecule based on its isotopic pattern (organic MS). The difficult tasks in multispeciation are chromatographic separation (when used) and sample preparation when determining chemical species with different charges and polarities. For instance, mercury species are positively charged, except for complexes formed with anionic ligands, while selenium species are anions, cations or zwitterions. Therefore, while it is difficult to use a chromatographic stationary phase and a carefully selected mobile phase in this case, it is mandatory. In addition, and in contrast to conventional proteomic approaches, sample preparation plays a much more critical role during the determination of metalloproteins in biological tissues, due to trace metal contamination issues and the possibility of compromising the integrity of the metal–protein bonds of the metalloproteins of interest. General considerations regarding the drawbacks of and solutions for this kind of analysis have been exhaustively reviewed [5, 167–173].

ICP-MS is undoubtedly a valuable technique in this field, since it (i) allows multi-isotopic analysis (including of non-metals such as S, P, Se), (ii) has detection capabilities, (iii) is highly sensitive, (iv) is matrix tolerant, and (v) has a wide linear range. However, combining it with organic mass spectrometry is mandatory for element speciation in biochemical tissues, especially with electrospray ionization (ESI) or matrix-assisted laser desorption (MALDI). ESI-MS is better than MALDI-MS for tandem mass spectrometry and for coupling it on-line to separation techniques (HPLC, CE), while MALDI-MS is recommended for low-complexity matrices. The main differences between them are that ESI-MS is sensitive to concentration and both covalent and noncovalent bonds are preserved, while MALDI-MS is mass sensitive and only covalent bonds are preserved. Several very interesting reviews and papers consider the use of organic mass spectrometry [174], inorganic mass spectrometry [7, 175] and isotopic dilution techniques [176–179] in bioinorganic analytical chemistry.

Several attempts have been made to perform the multispeciation of biological samples and other sample types using extraction plus chromatographic separation. The simultaneous extraction of arsenic and selenium compounds has been performed with protease XIV and α-amylase, with subsequent detection by ion chromatography (IC) and ICP-MS [180]. Simultaneous speciation of mercury and arsenic have been carried out using two atomic fluorescence detectors coupled on-line or ICP-MS after UV irradiation, cold vapour and hydride generation [181, 182]. Mercury and selenium species in urine samples have been analyzed simultaneously using reversed-phase HPLC-ICP-MS [183], and a column-switching system coupled to ICP-MS that also allows the separation of chiral species [184]. However, the analytical methods developed for multispeciation generally require very experienced analysts, and they are limited to a certain number of species of only two elements. Therefore, a compromise between the analytical procedures employed is usually required for multispeciation, which currently makes it a very difficult task.

## Concluding remarks

Our knowledge of the interactions of species of elements in biological systems is currently limited. Indeed, the essential/toxic character of some species of elements is still unclear, and many other new species of elements will be discovered in the near future. On the other hand, the fact that each species has its own essential/toxic character makes very difficult to understand some interactions between elements that are present together in a biological system. Also, although a lot of information on the antagonistic or synergistic actions of species of elements is available in the literature, some of these appear to be contradictory, and in other cases the conclusions are poorly probed at the experimental level. In addition, taking into account the complexity of biological systems, some important effects may be caused by the interplay of more than two elements, but such interactions

are rarely reported. Moreover, it is necessary to study the trafficking of elements between organs or tissues to really understand the effects of interactions among elements. This topic has been addressed by several authors, but usually only on an element by element basis, not for multielement interactions. Finally, studying the interactions of species of elements in biological systems requires combined knowledge of biology, chemistry, medicine, biochemistry, molecular biology, nutrition, toxicology, microbiology and genetics, which greatly complicates the situation. What is true, however, is that advances in analytical techniques are being claimed in this field.

**Acknowledgments** This work was supported by the project CTM2009-12858-C02-01 from the Spanish Ministry of Science and Education, and the projects P08-FQM-03554 and P09-FQM-4659 from the Innovation, Science and Enterprise Agency (Andalusian Government). M. González-Fernández thanks the Spanish Ministry of Education/Ministry of Science and Innovation (Campus of Excellence—CiA3 Program) for a postdoctoral grant. M.A. García Sevillano thanks the Ministry of Education for a Ph.D. scholarship (FPU). V. Gómez-Jacinto thanks the Ministry of Innovation and Science for a Ph. D. grant.

## References

1. Williams RJP (2001) Coord Chem Rev 216–217:583–595
2. Lobinski R, Sabine Becker J, Haraguchi H, Sarkar B (2010) Pure Appl Chem 82:493–504
3. Szpunar J (2004) Anal Bioanal Chem 378:54–56
4. Koppenaal DW, Hieftje GM (2007) J Anal At Spectrom 22:855–855
5. Mounicou S, Szpunar J, Lobinski R (2009) Chem Soc Rev 38 (4):1119–1138
6. Tainer JA, Roberts VA, Getzoff ED (1991) Curr Opin Biotechnol 2:582–591
7. Bettmer J, Montes Bayón M, Ruiz Encinar, Fernández Sánchez ML, Fernández de la Campa MR, Sanz Medel A (2009) J Proteomics 72:989–1005
8. Rensing C, Ghosh M, Rosen BP (1999) J Bacteriol 181:5891–5897
9. Szpunar J (2005) Analyst 130:442–465
10. Hill CH, Matrone G (1970) Fed Proc 29:1474–1481
11. Parizek J, Ostadalova I (1967) Experientia 23:142–143
12. Thiele DJ, Gitlin JD (2008) Nat Chem Biol 4(3):145–147
13. Lippard SJ, Berg JM (1994) Principles of bioinorganic chemistry. University Science, Mill Valley
14. Cowan JA (1997) Inorganic biochemistry: an introduction, 2nd edn. Wiley-VCH, New York
15. Escanero JF (1998) In: Cocho JA, Escanero JF, González de Buitrago JM (eds) Elementos Traza: Aspectos Bioquímicos, Analíticos y Clínicos. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, Barcelona
16. Shroeder HA, Nason AP (1971) Clin Chem 17:461–474
17. Schaumlöffel D, Lobinski R (2005) Int J Mass Spectrom 242:217–223
18. Berry MJ, Banu L, Chen YY, Mandel SJ, Kieffer JD, Harney JW, Larsen PR (1991) Nature 353(6341):273–276
19. Moxon AL (1938) Science 88:447–457
20. DuBois KP, Moxon AL, Olson OE (1940) J Nutr 19:477–482
21. Moxon AL, Jensen CW, Paynter CR (1947) Proc S Dak Acad Sci 26:21
22. Hendrick C, Klug HL, Olson OE (1953) J Nutr 51:131–137
23. Shearer TR, Anderson RS, Britton JL (1983) Invest Ophthalmol Vis Sci 24:417–423
24. Shen ZX, Chen GQ, Ni JH, Li XS, Xiong SM, Qiu QY, Zhu J, Tang W, Sun GL, Yang KQ, Chen Y, Zhou L, Fang ZW, Wang YT, Ma J, Zhang P, Zhang TD, Chen SJ, Chen Z, Wang ZY (1997) Blood 89:3354–3360
25. Bobe P, Chelbi-Alix MK (2008) Med Sci 24:967–971
26. Perkins C, Kim CN, Fang GF, Bhalla KN (2000) Blood 95:1014–1022
27. Zhang TC, Cao EH, Li JF, Ma W, Qin JF (1999) Eur J Cancer 35:1258–1263
28. Ogra I, Bondersson L, Jonsson C (2000) Biochem Biophys Res Commun 277:179–185
29. Park WH, Seol JG, Kim ES (2000) Cancer Res 60:3065–3071
30. Schrauzer GN, White DA, McGuinness JE, Xchneider CJ, Bell LJ (1978) Bioinorg Chem 9:245–253
31. Ip C, Ganther HE (1988) Carcinogenesis 9:1481–1484
32. Wang ZF, Guo X (2011) Biol Trace Elem Res 140:7–17
33. Moxon AL, DuBois KP (1939) J Nutr 18:477–482
34. Levander OA, Baumann CA (1966) Toxicol Appl Pharmacol 9:98–105
35. Rhian M, Moxon AL (1943) J Pharm Exp Therap 78:249–264
36. Olson OE (1960) Feed Age 10:49–50
37. Biswas S, Talukder G, Sharma A (1999) Mutat Res 441:155–160
38. Moxon AL (1941) Proc Sth Dakota Acad Sci 21:34–36
39. Moxon AL, Rhian M, Anderson HD, Olson OE (1944) J Animal Sci 3:299–309
40. Stanley TR Jr, Spann JW, Smith GJ, Rosscoe R (1994) Arch Environ Contam Toxicol 26:444–451
41. Thapar NT, Guenthner E, Carlson CW, Olson OE (1969) Poultry Sci 48:1987–1993
42. Moxon AL, Wilson WO (1944) Poultry Sci 22:149–151
43. Krista LM, Carlson CW, Olson OE (1961) Poultry Sci 40:1365–1367
44. Wuyi W, Linsheng Y, Shaofan H, Jianán T, Hairong L (2001) Curr Sci 81:1215–1218
45. Yang L, Wang W, Hou S, Peterson PJ, Williams WP (2002) Environ Geochem Health 24:359–374
46. Wang CT, Chang WT, Huang CW, Chou SS, Lin CT, Liau SJ, Wang RT (1994) Eur J Clin Chem Clin Biochem 32:107–111
47. Wang CT (1996) Eur J Clin Chem Clin Biochem 34:493–497
48. Horng CJ, Lin SR (1997) Talanta 45:75–83
49. Wang CT, Chang WT, Huang KC, Wang RT (1997) Anal Sci 13:497–500
50. Brown KM, Arthur JR (2001) Public Health Nutr 4:593–599
51. Shi H, Shi X, Liu KJ (2004) Moll Cell Biochem 255:67–78
52. Chen Y, Hall M, Graziano JH, Slavkovich V, van Geen A, Parvez F, Ahsan H (2007) Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 16:207–213
53. Spallholz JE, Mallory BL, Rhaman MM (2004) Sci Total Environ 323:21–32
54. Verret WJ, Chen Y, Ahmed A, Islam T, Parvez F, Kibriya MG, Graziano JH, Ahsan HJ (2005) Occup Environ Med 47:1026–1035
55. Zeng H (2001) Biol Trace Elem 83:1–15
56. Babich H, Martin AN, Borefreund E (1989) Toxicol Lett 45:157–164
57. Alp O, Zhang Y, Merino EJ, Caruso JA (2011) Metallomics 3:482–490
58. Pilsner JR, Hall MN, Liu X, Ahsan H, Llievski V, Slavkovich V, Levy D, Factor-Litvak P, Graziano JH, Gamble MV (2011) Environ Health Perspect 119:113–118

59. Bluemlein K, Klimm E, Raab A, Feldmann J (2009) Environ Chem 6:486–494
60. Ganther HE, Goudie C, Kopecky MJ, Wagner P, Oh SH, Hoekstra WG (1972) Science 172:1122–1124
61. Raymond LJ, Ralston NVC (2004) Seychelles Med Dent J 7:56–60
62. Choi AL, Budtz-Jorgensen E, Jorgensen PJ, Steuerwald U, Debes F, Weihe P, Grandjean P (2008) Environ Res 107:45–52
63. Glaser V, Nazari EM, Müller YMR, Feksa L, Wannmacher CMD, Rocha JBT, Bem AFD, Farina M, Latini A (2010) Inter J Develop Neurosci 28:631–637
64. Farina M, Rocha JBT, Aschner M (2011) Life Sci 89:555–563
65. Yin Z, Lee E, Ni M, Jiang H, Milatovic D, Rongzhu L, Farina M, Rocha JBT, Aschner M (2011) Neurotoxicol 32:291–299
66. Yoshizawa K, Rimm EB, Morris JS, Spate VL, Hsieh CC, Spiegelman D, Stampfer MJ, Willet WC (2002) N Engl J Med 347:1755–1760
67. Park K, Mozaffarian D (2010) Curr Atheroscler Rep 12:414–422
68. Frisk P, Wester K, Yaqob A, Lindh U (2003) Biol Trace Elem Res 92:105–114
69. Sormo E, Ciesielki TM, Overjordet IB, Lierhagen S, Eggen GS, Berg T, Jenssen BM (2011) Environ Sci Technol 45: 6561–6566
70. Imura N, Naganuma A (1991) In: Suzuki T (ed) Advances in mercury toxicology. Plenum, New York
71. Watanave C, Yin K, Kasanuma Y, Satoh H (1999) Neurotoxicol Teratol 21:83–88
72. Beyrouty P, Chan HM (2006) Neurotoxicol Teratol 28:49–58
73. Kehrig HdoA, Seixas TG, Palermo EA, Baeta AP, Castelo-Branco CW, Malm O, Moreira I (2009) Environ Sci Pollut Res 16(1):10–24
74. Weber DN, Connaughton VP, Dellinger JA, Klemer D, Udvadia A, Carvan MJ III (2008) Physiol Behav 93:250–260
75. Dos Santos APM, Mateus ML, Carvalho CML, Batoréu MCC (2007) Toxicol Lett 169:121–128
76. Wen-Xiong W, Wong RSK, Wang J, Yu-Fong Y (2004) Aquat Toxicol 68:39–50
77. Shrift A (1954) Am J Bot 41:223–230
78. Horn JM, Jones DB (1941) J Biol Chem 139:649–660
79. Stadtman TC (1980) Ann Rev Biochem 49:93–110
80. Hurd-Karrer AM (1938) Am J Bot 25:666–675
81. PostGate J (1949) Nature 164:670–671
82. PostGate J (1952) J Gen Microbiol 6:128–142
83. Fels IG, Cheldelin VH (1949) Arch Biochem 22:402–405
84. Pickering IJ, Wright C, Bubner B, Ellis D, Persans MW, Yu EY, George GN, Prince RC, Salt DE (2003) Plant Physiol 131:1460–1467
85. Channa Reddy C, Massaro EJ (1983) Fundam Appl Toxicol 3:431–436
86. Ip C, Ganther HE (1990) Cancer Res 50:1206–1211
87. Walton FS, Waters SB, Jolley SL (2003) Toxicol 16:261–265
88. Gruenwedel DW (1984) Adv Exp Med Biol 177:229–240
89. Frisk P, Yaqob A, Lindh U (2002) Sci Total Environ 296:189–197
90. Messaoudi I, El Heni J, Hammouda F, Said K, Kerkeni A (2009) Biol Trace Elem Res 130:152–161
91. Sonne-Hansen C, Dietz R, Leifsson PS, Hyldstrup L, Riget EF (2002) Sci Total Environ 295:167–181
92. Moxon A, Rhian M (1943) Physiol Rev 23:305–337
93. Käkelä R, Käkelä A, Hyvärinen H (1999) Comp Biochem Phys C 123:27–37
94. Chaperon S, Sauvé S (2008) Ecotoxicol Environ Safety 70:1–9
95. Bremner I, Beattie JH (1995) Proc Nutr Soc 54:489–499
96. Fang LY, Wei JZ, Yang J, Liu ZY, Li JY (2006) Chin J Epidemiol 25:9–11
97. Rodríguez-Flores C, Preciado-Puga M, Wrobel K, Garay-Sevilla MAE, Wrobel K (2011) Diabetes Res Clin Pract 91(3):333–341
98. Hille R (2002) Trends Biochem Sci 27:360–367
99. Lane T, Morel F (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97:4627–4631
100. Jameson G, Ibers J (2007) In: Bertini I, Gray H, Stiefel I, Valentine J (eds) Biochemical inorganic chemistry: structure and reactivity. University Science, Sausalito
101. Wolfe-Simon F, Switzer-Blum J, Kulp TR, Gordon GW, Hoeft SE, Pett-Ridge J, Stolz JF, Webb SM, Weber PK, Davies PCW, Anbar AD, Oremland RS (2011) Science 332:1163–1166
102. Schoepp-Cothenet B, Nitschke W, Barge LM, Ponce A, Russell MJ, Tsapin AI (2011) Science 332:1149
103. Rosen BP, Ajees AA, McDermott TR (2011) Bioessays 33:350–357 (and references therein)
104. Finney LA, O'Halloran TV (2003) Science 300:931–936
105. Banci L, Bertini I, Ciofi-Baffoni S, Finney LA, Outten CE, O'Halloran TV (2002) J Mol Biol 323:883–897
106. Huffman DL, O'Halloran TV (2000) J Biol Chem 275 (25):18611–18614
107. O'Halloran TV, Cizewski-Culotta V (2000) J Biol Chem 275 (33):25057–25060
108. Miyazaki K, Watanabe C, Mori K, Yoshinda K, Ohtsuka R (2005) Toxicol 208:357–365
109. Kenyon EM, Hughes MF, Levander OA (1997) Environ Toxicol Pharmacol 51:279–299
110. Christian WJ, Hopenhayn C, Centeno JA, Todorov T (2006) Environ Res 100:115–122
111. Gailer J, George GN, Pickering IJ, Prince RC, Ringwald SC, Pemberton JE, Glass RS, Younis HS, DeYoung DW, Aposhian HV (2000) J Am Chem Soc 122:4637–4639
112. Gailer J (2007) Coord Chem Rev 251:234–254
113. Berry JP, Galle P (1994) J Submicrosc Cytol Pathol 26:203–210
114. Koeman H, van de Ven WSM, de Goeij JJM, Tjioe PS, van Haaften JL (1975) Sci Total Environ 3:279–287
115. Kosta L, Byrne AR, Zelenko V (1975) Nature 254:238–239
116. Peterson SA, Ralston NVC, Whanger PD, Oldfield JE, Mosher WD (2009) Environ Bioindic 4:318–334
117. Beijer K, Jernelov A (1978) Environ Health Perspectives 25:43–45
118. Gather HE, Goudie C, Sunde ML, Kopicky MJ, Wagner P, Oh SH, Hoekstra Wg (1972) Science 175:1122–1124
119. Jernelov A, Johansson A, Sorenson L, Svenson A (1976) Toxicol 6:315–321
120. Cabañero AI, Madrid Y, Cámara C (2007) Biol Trace Elem Res 119:195–211
121. Yamashita Y, Amlund H, Suzuki T, Hara T, Hossain MA, Yabu T, Touhata K, Yamashita M (2011) Fish Sci 77:679–686
122. Naganuma A, Imura N (1981) Pharmacol Biochem Behav 15:449–454
123. Gasiewicz TA, Smith JC (1978) Chem Biol Interact 23:171–183
124. Fang C (1974) Res Commun Chem Pathol Pharmacol 9:579–582
125. Ayotte P, Carrier A, Ouellet N, Boiteau V, Abdous B, Sidi EA, Chateau-Degat ML, Dewailly E (2011) Environ Health Perspect 119:1077–1083
126. Das K, Jacob V, Bouquegneau JM (2002) Comp Biochem Physiol C 131:245–251
127. Gailer J, George GN, Pickering IJ, Madden S, Prince RC, Yu EY, Denton HS, Younis HS, Aposhian HV (2000) Chem Res Toxicol 13:1135–1142
128. Hoffman DJ, Heinz GH (1998) Environ Toxicol Chem 17:161–166
129. Yang DY, Chen YW, Gunn JM, Belzile N (2008) Environ Rev 16:71–92
130. Raimundo J, Vale C, Canario J, Branco V, Moura I (2010) Environ Pollut 158:2094–2100
131. Magos L, Clarkson TW, Sparrow S, Hudson AR (1987) Arch Toxicol 60:422–426

132. Falnoga I, Tusek-Znidaric M (2007) Biol Trace Elem Res 119:212–220
133. Yoneda S, Suzuki KT (1997) Toxicol Appl Pharmacol 143:274–280
134. Dansher G, Stoltenberg M (2006) Prog Histochem Cytochem 41:57–140
135. Pohaska JR, Ganther HE (1977) Chem Biol Interact 16:155–167
136. Usuki F, Yamashita A, Fujimura M (2011) J Biol Chem 286:6641–6649
137. Clarkson TW (1997) Crit Rev Clin Lab Sci 34:369–464
138. Lund BO, Miller MD, Woods JS (1993) Biochem Pharmacol 45:2017–2024
139. Perottoni J, Rodrigues OED, Paixao MW, Zeni G, Lobato LP, Braga AL, Rocha JBT, Emanuelli T (2004) Food Chem Toxicol 42:17–28
140. Eybl V, Sykora J, Mertl F (1969) Arch Toxicol 25:296–305
141. Su L, Wang M, Yin ST, Wang HL, Chen L, Sun LG, Ruan DY (2008) Ecotoxicol Environ Diet 70:483–489
142. Burk RF, Foster KA, Greenfield PM, Kiker KW (1974) Proc Soc Exp Biol Med 145:782–785
143. Friberg L, Mottet NK (1989) Biol Trace Elem Res 21:201–206
144. Berntssen MGH, Hylland K, Lundebye AK (2004) Food Chem Toxicol 42:1359–1366
145. Harry GJ, Harris WM, Burka LT (2004) Toxicol Lett 154:183–189
146. Bjerregaard P, Andersen BW, Rankin JC (1999) Aquat Toxicol 45:171–180
147. Cuvin-Aralar MLA, Furness RW (1991) Ecotoxicol Environ Safety 21:348–364
148. Heinz GH, Hoffman D (1998) Environ Toxicol Chem 17:139–145
149. Cabañero AI, Madrid Y, Cámara C (2005) J Agric Food Chem 53:2125–2132
150. Yang DY, Ye X, Chen YW, Belzile N (2010) Sci Total Environ 408:1676–1683
151. Liao CY, Zhou QF, Fu JJ, Shi JB, Yuan CG, Jiang GB (2007) Environ Toxicol 22:69–77
152. Dang F, Wang WX (2011) Environ Sci Technol 45:3116–3122
153. Shrift A (1969) Plant Physiol 20:475–495
154. Setya A, Murillo M, Leustek T (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93:13383–13388
155. Sabaty M, Avazeri C, Pignol D, Vermeglio A (2001) Appl Environ Microbiol 143:1181–1189
156. Shaw WH, Anderson JW (1974) Biochem J 139:37–42
157. Brunell JN (1981) Plant Physiol 67:316–324
158. Pilon-Smits EAH, Hwang S, Lytle CM, Ahu Y, Tai JC, Bravo RC, Chen Y, Leustek T, Terry N (1999) Plant Physiol 119:123–132
159. Shaw WH, Anderson JW (1972) Biochem J 127:237–247
160. Muller S, Heider J, Bock A (1997) Arch Microbiol 168:421–427
161. Ng BH, Anderson JW (1978) Phytochemistry 17:2069–2074
162. Shrift A, Virupaksha TK (1965) Biochim Biophys Acta 100:65–75
163. de Souza MP, Pilon-Smits EA, Lytle CM, Hwang S, Tai J, Honma TS, Yeh L, Terry N (1998) Plant Physiol 117:1487–1494
164. Paciolla C, De Leonardis S, Dipierro S (2011) Plant Biosystems 145:253–259
165. White CL (1980) Aust J Biol Sci 33:699–707
166. Sanmartín C, Plano D, Font M, Palop JA (2011) Curr Cancer Drug Targets 11:496–523
167. Manley SA, Gailer J (2009) Expert Rev Proteomics 6:251–265
168. Manley SA, Byrns S, Lyon AW, Brown P, Gailer J (2009) J Biol Inorg Chem 14:61–74
169. Michalke B, Berthele A, Mistriotis P, Ochsenkuehn-Petropoulou M, Halbach S (2007) J Trace Elem Med Biol 21(S1):4–9
170. da Silva MAO, Sussulini A, Arruda MAZ (2010) Expert Rev Proteomics 7:387–400
171. Zeini Jahromi E, Gailer J (2010) Metallomics 2:460–468
172. Pei KL, Gailer J (2009) Metallomics 1:403–408
173. Gómez-Ariza JL, Zeini-Jahromi E, González-Fernández M, García-Barrera T, Gailer J (2011) Metallomics 3:566–577
174. Lobinski R, Schaumloffel D, Szpunar J (2006) Mass Spectrom Rev 25:255–289 (and references therein)
175. Mounicou S, Szpunar J, Lobinski R (2010) Eur J Mass Spectrom 16(3):243–253 (and references therein)
176. Schaumloffel D, Lobinski R (2005) Int J Mass Spectrom 242:217–223 (and references therein)
177. Rodríguez-González P, García Alonso JI (2010) J Anal At Spectrom 25(3):239–259
178. Rodríguez-González P, Marchante-Gayón JM, García Alonso JI, Sanz-Medel A (2005) Spectrochim Acta B 60(2):151–207
179. Rodríguez-González P, Ruiz Encinar J, García Alonso JI, Sanz-Medel A (2003) Analyst 128(5):447–452
180. Tsai CY, Jiang SJ (2011) Anal Sci 27(3):271–276
181. Gómez-Ariza JL, Lorenzo F, García-Barrera T (2005) Anal Bioanal Chem 382:485–492
182. Gómez-Ariza JL, Lorenzo F, García-Barrera T (2004) J Chromatogr A 1056:139–144
183. Li YF, Chen C, Li B, Wang Q, Wang J, Gao Y, Zhao Y, Chai Z (2007) J Anal At Spectrom 22:925–930
184. Moreno F, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL (2010) Analyst 135:2700–2705
185. Kolachi NF, Kazi TG, Wadhwa SK, Afridi HI, Baig JA, Khan S, Shah S (2011) Sci Total Environ 409:3092–3097
186. Palmer IS, Thiex N, Olson OE (1983) Nutr Rep Int 27:249–258
187. Pisciotto PT, Graziano JH (1980) Biochim Biophys Acta 628:241–243
188. Holmberg RE, Ferm VR (1969) Arch Environ Health 18:873–877
189. Chung AS, Maines MD (1982) Biochem Pharmacol 31:3093–3100
190. Parizek J, Benes I, Ostadolova I, Babicky A, Benes J, Lener J (1969) Physiol Bohemoslov 18:95–103
191. Miura K, Imura N (1982) J Appl Toxicol 2:145–150
192. Glickstein N (1978) Mar Biol 49:113–117
193. Cabañero AI, Madrid Y, Cámara C (2005) J Anal At Spectrom 20:847–855
194. Hill CH (1974) J Nutr 104:593–598
195. Frisk P, Yaqob A, Nilsson K, Lindh U (2001) Biol Trace Elem Res 80:251–268
196. Weng-Xiong W, Wong RSK, Wang J, Yen YF (2004) Aquat Toxicol 68:39–50
197. Falgona I, Tusek-Znidaric M (2007) Biol Trace Elem Res 119:212–220
198. Nordberg GF, Jin T, Hong F, Zhang A, Buchet JP, Bernard A (2005) Toxicol Appl Pharmacol 206:191–197
199. Yáñez L, Carrizales L, Zanatta MT, Mejía JJ, Batres L, Diaz-Barriga F (1991) Toxicology 67:227–234
200. Modi M, Kaul RK, Kannan GM, Flora SJS (2006) J Trace Elem Med Biol 20:197–204
201. Suwalsky M, Rivera C, Villena F, Sotomayor CP, Jemiola-Rzeminskad M, Strzalkad K (2007) Biophys Chem 127:28–35
202. Kasprzak KS, Poirier LA (1985) Toxicology 34:221–230
203. Meinelt T, Playle RC, Pietrock M, Burnison BK, Wienke A, Steinberg CEW (2001) Aquat Toxicol 54:205–215
204. Adiele RC, Stevens D, Kamunde C (2010) Aquat Toxicol 96:319–327
205. Chakravarty B, Srivastava S (1997) Agric Ecosys Environ 61: 45–50
206. Chaoui A, Ghorbal MH, Ferjani EE (1997) Plant Sci 126: 21–28

207. Qiu RL, Thangavel P, Hu PJ, Senthilkumar P, Yinga RR, Tang YT (2011) J Hazard Mater 186:1425–1430
208. Rainbow PS, Amiard-Triquet C, Amiard JC, Smith BD, Langston WJ (2000) Aquat Toxicol 50:189–204
209. Rogalska J, Pilat-Marcinkiewicz B, Brzóska MM (2011) Chem Biol Interact 193:191–203
210. Scheuhammer AM, Onosaka S, Rodgers K, Cherian MG (1985) Toxicol 36:101–108
211. Rogalska J, Brzóska MM, Roszczenko A, Moniuszko-Jakoniuk J (2009) Chem Biol Interact 177:142–152
212. Cherif J, Mediouni C, Ammar WB, Jemal F (2011) J Environ Sci 23:837–844
213. Herkovits J, Perez-Coll CS (1995) Biol Trace Elem Res 49:171–175
214. Belmonte N, Rivera O, Herkovits J (1989) Bull Environ Contam Toxicol 43:107–110
215. Pelgrom SMGJ, Lamers LPM, Lock RAC, Balm PHM, Bonga SEW (1995) Environ Pollut 90:415–423
216. Komsta-Szumska E, Chmielnicka J (1983) Toxicol Lett 17:349–354
217. Flora SJS, Behari JR, Ashquin M, Tandon SK (1982) Chem-Biol Interact 42:345–351
218. Mukherjee A, Sharma A, Talukder G (1988) Toxicol Lett 41:23–29
219. Sidhu M, Sharma M, Bhatia M, Awasthi YC, Nath R (1993) Toxicology 83:203–213
220. Bell RR, Soliman MRI, Early JL (1990) Toxicology 65:161–168
221. Caballero Aráuz IL, Afton S, Wrobel K, Caruso JA, Gutiérrez Corona JF, Wrobe K (2008) J Hazard Mat 153:1157–1164
222. Sugawara N, Sugawara C (1984) J Appl Biochem 6:199–204
223. Messaoudi I, Banni M, Saïd L, Saïd K, Kerkeni A (2010) Chem-Biol Interact 188:94–101
224. Early JL Jr, Schnell RC (1981) Toxicol Appl Pharmacol 58:57–67
225. Prohaska JR, Mowafy M, Ganther HE (1977) Chem-Biol Interact 18:253–265
226. Liu Y, Cai YQ (2007) Toxicol in Vitro 21:677–684
227. Newairy AA, El-Sharaky AS, Badreldeen MM, Eweda SM, Sheweita SA (2007) Toxicology 242:23–30
228. Hietanen E, Aitio A, Koivusaaei U, Kilpiö J, Nevalainen T, Närhi M, Savolainen H, Vainio H (1982) Toxicology 25:113–127
229. Orisakwe OE, Afonne OJ, Nwobodo E, Asomugha L, Dioka CE (2001) Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 95:92–96
230. Gale TF (1973) Environ Res 6:95–105
231. Day FA, Funk AE, Brady FO (1984) Chem-Biol Interact 50:159–174
232. Irato P, Sturniolo GC, Giacon G, Magro A, D'Inca R, Mestriner C, Albergoni V (1996) Biol Trace Elem Res 51:87–96
233. Irato P, Albergoni V (2005) Chem-Biol Interact 155:155–164
234. Filipe PM, Fernandes AC, Manso CF (1995) Biol Trace Elem Res 47:51–56
235. Ramírez-Cárdenas L, Brunoro Costa NM, Pinheiro Reis F (2005) Nutr Res 25:79–92
236. Gambling L, Dunford S, McArdlea HJ (2004) J Nutr Biochem 15:366–372
237. Pimentel JL, Greger L, Cook ME, Stahl JL (1992) J Nutr Biochem 3:140–145
238. Blanusa M, Prester L, Radić S, Kargacin B (1994) Environ Health Perspect 102:305–307
239. Khadelwal S, Flora SJS, Tandon SK (1990) Chem-Biol Interact 75:341–347
240. Rungy J (1987) Toxicology 45:135–142
241. Serafín MAH, Wrobel K, Gutiérrez CJF, Wrobel K (2007) Mycol Res 111:626–632
242. Khayat A, Dencker L (1984) Chem-Biol Interact 50:123–133
243. Levander OA, Argrett LC (1969) Toxicol Appl Pharmacol 14:308–314
244. Pelgrom SMGJ, Lamers LPM, Lock RAC, Balm PHM, Bonga SEW (1995) Environ Pollut 9:415–423
245. Hall AC, Young BW, Bremner I (1979) J Inorg Biochem 11:57–66
246. Blalock TL, Dunn MA, Cousins RJ (1988) J Nutr 118:222–228
247. Bremner I, Young BW, Mills CF (1976) Brit J Nutr 36:551–561
248. Agarwal R, Behari JR (2007) Ind Health 45:388–395
249. Chen RW, Whanger PD, Weswig PH (1974) Pharmacol Res Commun 6:571–579
250. Cuvin-Aralar MLA, Furness RW (1990) Bull Environ Contam Toxicol 45:775–782
251. Sheline J, Schimdt-Nielsen B (1975) Methylmercury–selenium: interaction in the killifish, *Fundulus heteroclitus*. In: Vernberg FJ, Calabrese A, Thurberg FP, Vernberg WB (ed) Symp on Physiological Responses of Marine Biota to Pollutants, Milford, CT, USA, Nov 1975
252. Hansen JC, Kristensen P, Al-Masri SN (1981) Nord Vet Med 33:57–64
253. Potter S, Matrone G (1974) J Nutr 104:638–647
254. Johnson S, Pond WG (1974) Nutr Rep Int 9:135–147
255. Miura K, Mori R, Imura N (1981) Ecotoxicol Environ Saf 5:351–367
256. Björkman L, Mottet K, Nylander M, Vahter M, Lind B, Friberg L (1995) Arch Toxicol 69:228–234
257. Magos L, Webb M, Hudson AR (1977) Arch Toxicol 38:201–207
258. Brzeznicka EA, Chmielnicka J (1985) Environ Health Perspect 60:423–431
259. Yamane Y, Fukino H, Aida Y, Imagawa M (1977) Chem Pharmacol Bull 25:2831–2837
260. El-Begearmi MM, Sunde ML, Ganther HE (1977) Poultry Sci 56:313–322
261. Glynn AW, Lind Y (1995) Pharmacol Toxicol 77:41–47
262. Sell JL, Horani FG (1976) Nutr Rep Int 14:439–447
263. Emerick RJ, Palmer IS, Carlson CW, Nelson RA (1976) Fed Proc 35:577–582
264. Welsh SO, Soares JH (1974) Fed Proc 33:660
265. Stoewsand GS (1974) Bull Environ Contam Toxicol 11:152–156
266. Ansari MS, Britton WM (1974) Poultry Sci 53:1134–1137
267. Seppanen K, Laalikainen R, Salonen JT, Kantola M, Lötjönen S, Harri M, Nüurminen L, Kaikkomem J, Nyyssönen K (1998) Biol Trace Elem Res 65:197–210
268. Ralston NVC, Ralston CR, Blackwell JL, Raymond JL (2008) Neurotoxicol 29:802–811
269. Kosutzka E, Pribilincova J, Ledec M, Maretta M (2002) Acta Vet (Beograd) 52:355–360

Anal Bioanal Chem
DOI 10.1007/s00216-013-7564-z

RESEARCH PAPER

# Metabolomic study in plasma, liver and kidney of mice exposed to inorganic arsenic based on mass spectrometry

**M. A. García-Sevillano · M. Contreras-Acuña · T. García-Barrera · F. Navarro · J. L. Gómez-Ariza**

Received: 22 September 2013 / Revised: 29 November 2013 / Accepted: 7 December 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

**Abstract** The mechanism of arsenic toxicity still remains unclear, although enzymatic inhibition, impaired antioxidants metabolism and oxidative stress may play a role. The toxicological effects of trivalent inorganic arsenic on laboratory mouse *Mus musculus* after oral administration (3 mg/kg body weight/day) were investigated along 12 days, using a metabolomic approach based on direct infusion mass spectrometry to polar and lipophilic extracts from different organs and fluids (liver, kidney, and plasma). Positive and negative acquisition modes ($ESI^+$/$ESI^-$) were used throughout the experiments. The most significant endogenous metabolites affected by exposure were traced by partial least square-discriminant analysis and confirmed by tandem mass spectrometry (MS/MS) and gas chromatography coupled to MS. In this work, the toxic effect of arsenic has been related with important metabolic pathways, such as energy metabolism (e.g., glycolysis, Krebs cycle), amino acids metabolism, choline metabolism, methionine cycle, and degradation of membrane phospholipids (cell apoptosis). In addition, this work illustrates the high reliability of mass spectrometry based on a metabolomic approach to study the biochemical effects induced by metal exposure.

**Keywords** Arsenic · ICP-MS · Metabolomics · Metals · *Mus musculus* · Mass spectrometry

M. A. García-Sevillano · M. Contreras-Acuña · T. García-Barrera (✉) · J. L. Gómez-Ariza (✉)
Department of Chemistry and Materials Science, Faculty of Experimental Science, University of Huelva, Campus de El Carmen, 21007 Huelva, Spain
e-mail: tamara@dqcm.uhu.es
e-mail: ariza@uhu.es

M. A. García-Sevillano · M. Contreras-Acuña · T. García-Barrera · J. L. Gómez-Ariza
Research Center on Health and Environment (CYSMA), University of Huelva, Campus El Carmen, 21007 Huelva, Spain

M. A. García-Sevillano · M. Contreras-Acuña · T. García-Barrera · J. L. Gómez-Ariza
International Campus of Excellence on Agrofood (ceiA3), University of Huelva, Campus El Carmen, 21007 Huelva, Spain

F. Navarro
Department of Environmental Biology and Public Health, Cell Biology. Faculty of Experimental Sciences, University of Huelva, Campus El Carmen, 21007 Huelva, Spain

## Introduction

Arsenic (As) is one of the most widely studied elements in relation to mammal toxicity. This element is a widespread pollutant in the environment found in water, soil, and air from natural and anthropogenic sources, occurring in both inorganic and organic chemical forms, which strongly differ in terms of toxicity, accumulation, and involvement of arsenic respect to metabolism of living organisms [1, 2]. Inorganic forms of arsenic (iAs) are highly toxic [arsenite ($iAs^{III}$) and arsenate($iAs^{V}$)] ($LD_{50}$ for mice are 4.5 mg $kg^{-1}$ per body weight and per day (bw/d) and 14–18 mg $kg^{-1}$ for the arsenite and arsenate by subcutaneous injection, respectively), producing a wide range of adverse health effects, but this toxicity decreases in the methylated forms [methylarsonic acid ($MA^{V}$) and dimethylarsinic acid ($DMA^{V}$)] ($LD_{50}$ for mice are 1,800 and 1,200 mg $kg^{-1}$ for the $MA^{V}$ and $DMA^{V}$ by subcutaneous injection, respectively), which are considered moderately toxic and can be excreted in urine after iAs ingestion; however, other organic species such as arsenobetaine (AB) ($LD_{50}$ for mice is 10,000 mg $kg^{-1}$ by subcutaneous injection), arsenocholine (AsC), and arsenosugars are regarded as innocuous [3–5]. In recent decades, the biomethylation of iAs has been considered as a detoxification mechanism, but methylated trivalent arsenicals, such as methylarsonite ($MA^{III}$) and dimethylarsinite ($DMA^{III}$), are toxic intermediates that arise

Published online: 22 January 2014

during biomethylation process of arsenic in mammals and have been recently identified as cancer promoters [6–8]. Otherwise, pentavalent arsenicals are significantly less toxic than their equivalent trivalent forms [9, 10]. On the other hand, it has been recently demonstrated that arsenic species have high affinity for thiol-containing residues of proteins [11], especially the trivalent form due to its higher reactivity, as a consequence increase the number of proteins involved, such as tubulin and actin [12], hemoglobin [13, 14], metallothionein [15], galectin-I, thioredoxin peroxidase II [16], and others. This fact results in alterations of their biological functions (i.e., enzyme inhibition and metabolic pathways) that markedly contribute to arsenic carcinogenesis [17, 18]. Additionally, it is well known that $iAs^{III}$ can perturb the metabolism of selenium at environmentally relevant doses [19], which could also be related with its mechanism of arsenic carcinogenesis [20].

In some areas, drinking water containing high levels of inorganic arsenic and industrial pollution are major sources of exposure to iAs for population through oral ingestion. This is an important problem for more than 200 million people in many countries chronically exposed to iAs through contaminated drinking water. Once ingested the soluble forms of As are readily absorbed from the gastrointestinal tract to bloodstream and distributed to organs. $iAs^{V}$ can be metabolized by consecutive reduction to $iAs^{III}$ and oxidative biomethylation that convert the element to methylarsenic ($MA^{V}$) and dimethylarsenic ($DMA^{V}$), which contain arsenic in a pentavalent oxidation state [21]. Human arsenic exposure is related to several health problems such as liver damage and cardiovascular disease [22] and has been demonstrated the capacity of $iAs^{III}$ and $MA^{V}$ to cross the blood–brain barrier [23, 24]. Moreover, a number of epidemiological studies have shown the association between the presence of arsenic in drinking water and the risk of cancer (skin, lung, bladder, liver, and kidney) [25–28], although the mechanisms involved in these carcinogenic processes and toxic effects caused by inorganic arsenic remain still unclear.

The metabolome is the set of low molecular mass compounds (typically <1,000 Da) present in biological systems [29]. Metabolomics is the analysis of the metabolome under certain endogenous (physiological) or exogenous (exposure) conditions. Metabolomics refers to the measurement of the entirety of metabolites in a cell [30], whereas metabolomics describes "the quantitative measurement of the dynamic multiparametric metabolic response of living systems to pathophysiological stimuli or genetic modification" [31, 32]. Two disciplines have been highlighted by Nicholson as a necessary complement to metabolomics: analytical chemistry and chemometrics [32]. Metabolomic approaches have been developed in many areas of biomedical research including toxicology [33] because they allow for the detection of metabolic response to chemical exposure with the purpose of finding biomarkers about the actual physiological status of living organisms. For this reason, metabolomics plays a key role to understand the results of complex biological processes, such as metal exposure experiments [34]. The main analytical techniques that are employed for metabolomic studies are based on nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and mass spectrometry (MS). MS is also a major technique for molecular identification of unknown metabolites, especially through the use of tandem MS/MS experiments for fragment ion studies using direct infusion [35–38]. The metabolic fingerprint of biofluid or tissues extracts obtained by MS or NMR-based methods contain few hundreds to thousands signals related to both genetic and environmental contributions. MS approaches used in metabolomics normally requires a previous separation of metabolic components using either gas chromatography (GC), liquid chromatography (LC), or capillary electrophoresis (CE) to avoid traditional isobaric interferences affecting direct infusion. However, a number of studies have proposed the use of direct infusion to the mass spectrometer (DIMS) without any previous separation using high-resolution mass analyzers, such as hybrid systems triple quadrupole-time-of-flight (QqQ-TOF) [34, 38, 39] or Orbitrap [40]. In this sense, DIMS exhibits several advantages in metabolomics such as high-throughput screening capability, fast analysis, and wider nontarget metabolite coverage than chromatographic and electrophoretic couplings, since there is not exclusion of compounds associated to the separation step. For these reasons, DIMS is recommended to be a fast diagnostic method for evaluating the toxicological effects of metals, while LC-MS is necessary when comprehensive screening of biomarkers is required [41]. Considering that a much higher throughput can be obtained without a chromatographic step, DIMS could be developed as a fast metabolomic approach to evaluate the possible alterations in metabolic cycles caused by toxic metals [41]. On the other hand, ability of GC-MS to measure key primary metabolites, such as aminoacids, organic acids, or carbohydrates, involved in essential pathways in the metabolism of organisms (glycolysis, Krebs cycle) makes it an interesting alternative in toxicology and, in particular, in the discovery of potential biomarkers.

A crucial step in metabolomics is to get a suitable sample extraction to recover as many metabolites as possible present in the biological fluid or tissue. Most of strategies consider the use of multiplexed extractions under certain conditions for selective recovery of different families or classes of metabolites, such as lipids [42], or water-soluble metabolites [43], related to certain potential biomarkers in the mass range of typically between 50 and 1,000 $m/z$. On the other hand, complete extraction of metabolites is one current weak point in metabolomic studies, being necessary the development of extraction procedures for both polar and nonpolar metabolites from matrix to get a nontargeted multi-metabolite analysis to assess about alterations related to the effects of arsenic in mice.

The aim of the present study is to determine the biochemical alterations in the metabolic pathways of mice subjected to acute exposure to arsenic during 12 days by oral administration using mass spectrometry complemented by PLS-DA. For this purpose, DIMS has been applied, in both positive and negative ionization modes, to liver, kidney, and plasma of mice (*Mus musculus*) to obtain metabolic information. Subsequently, metabolites were identified using MS/MS experiments and a metabolomics database. Additionally, a complementary metabolomic approach based on GC-MS was applied to quantify and validate the metabolic pathways altered by DIMS in plasma from mice affected by acute doses of inorganic arsenic during 12 days of exposure.

## Experimental

### Standard solutions and reagents

$As_2O_3$ (99.995 %, trace metals basis) used to prepare acute doses for oral administration was supplied by Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). All solvents used for sample preparation were of optima grade for mass spectrometry. Methanol and chloroform were purchased from Fisher Chemical (Geel, Belgium), while ethanol, pyridine, and formic acid were supplied by Sigma-Aldrich. Water was purified with a Milli-Q Gradient system (Millipore, Watford, UK). Derivatizing agents, methoxylamine hydrochloride, and *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA) containing 1 % (*w*/*v*) trimethylchlorosilane (TMCS), were obtained from Sigma-Aldrich. Alanine, valine, isoleucine, proline, glycine, serine, threonine, glutamic acid, phenylalanine, fructose, galactose, glucose, tyrosine, tryptophan, urea, aspartic acid, glutamine, cholesterol, α-ketoglutarate, isocitric acid, citric acid, lactic acid, and uric acid, purchased from Sigma-Aldrich, were used as standard substances in gas chromatographic quantification.

### Apparatus

A cryogenic homogenizer SPEX SamplePrep (Freezer/Mills 6770) was used to prepare tissue homogenates. The extraction was carried out with a pellet mixer (VWR, UK). Metabolomic experiments were performed by direct infusion in a high resolution mass spectrometer QSTAR XL Hybrid system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the electrospray ionization (ESI) source. Gas chromatography analysis were performed in a Trace GC ULTRA gas chromatograph coupled to an ion trap mass spectrometer detector ITQ900, both from Thermo Fisher Scientific (Bremen, Germany), using a Factor Four capillary column VF-5MS 30 m×0.25 mm ID, with 0.25 μm of film thickness (Varian).

### Animals and exposure protocol

*M. musculus* (inbred BALB/c strain) mice were obtained from Charles River Laboratory (Spain). Thirty-two mice of 7 weeks of age were fed ad libitum with conventional pellets containing an arsenic concentration <0.35 μg $g^{-1}$. The animals were allowed to acclimate for 5 days with free access to food and water under controlled condition (temperature in the range of 25–30 °C and a 12-h light–dark cycle) prior to start exposure experiments. *M. musculus* mice were divided into two groups, one used as control and the other subjected to As(III) (in the form $As_2O_3$) exposure, using an oral administration of 100 μL of a solution containing 3 mg of As per kilogram of body weight per day during a total period of 12 days. The control mice were subjected to oral administration of 100 μL of ultrapure water with 0.9 % (*w*/*v*) NaCl per day for 12 days. The acute oral arsenite dose of 3 mg $kg^{-1}$ bw/day was selected taking into account the $LD_{50}$ for mice (42 mg $kg^{-1}$), which was not exceed over experiment the overall exposure experiment (12 days).

Eight mice of each group were killed on the sixth day from the beginning of the experience and again on the last day of the exposure experiment to assess the effect of arsenic and the diet. Mice were individually anesthetized by isoflurane inhalation and exsanguinated by cardiac puncture, dissected using a ceramic scalpel, and finally, the organs were transferred rapidly to dry ice. Individual organs were excised, weighed in Eppendorf vials, cleaned with 0.9 % (*w*/*v*) NaCl solution in individual Petri dish, drained on a clean absorbent paper, frozen in liquid nitrogen, and stored at −80 °C until they were used for extracts preparation. Plasma collection was carried out by centrifugation (4,000×*g*, 30 min, 4 °C) after addition of heparin (ANTICLOT) as anticoagulant. Mice were handled according to the norms stipulated by the European Community. The investigation was performed after approval by the Ethical Committee of the University of Huelva (Spain).

### Analytical procedures

*Sample treatment for DI-ESI(±)-QTOF-MS analysis* First of all, individual organs were disrupted by cryogenic homogenization. Sample preparation of individual tissues for metabolomic analysis based on DI-ESI(±)-QTOF-MS was carried out in two-step. Firstly, polar metabolites were extracted with a mixture of (1:1, *v*/*v*) methanol/water by adding 500 μL to 50 mg of tissue in an Eppendorf tube followed by vigorous vortex shaking during 5 min. Then, the cells were disrupted using a pellet mixer (2 min) under low temperature, followed by centrifugation at 4,000×*g* for 10 min at 4 °C. The supernatant was carefully collected and transferred to another Eppendorf. The pellet was homogenized again, using a pellet mixer for 2 min with 100 μL of (1:1, *v*/*v*) methanol/water mixture, then it was centrifuged at the same conditions

described above and the pellet was kept for further treatment. After that, both supernatants were combined (600 μL), and the resulting polar extract was taken to dryness under nitrogen stream and stored to −80 °C until analysis. The pellet was extracted with 500 μL of a mixture (2:1, *v*/*v*) chloroform/methanol, using a pellet mixer (2 min), to extract lipophilic metabolites and centrifuged at the same conditions described above. Finally, the resulting supernatant was taken to dryness under nitrogen stream and stored to −80 °C until analysis.

For DI-ESI(±)-QTOF-MS of plasma samples, proteins were removed from blood plasma by adding 400 μL of methanol/ethanol mixture (4:1, *v*/*v*) to 100 μL of plasma in an Eppendorf tube followed by vigorous vortex shaking for 5 min at room temperature and centrifugation at 4,000×*g* for 10 min at 4 °C. The supernatant was carefully collected avoiding contamination with the precipitated proteins, transferred to another Eppendorf tube, and the resulting supernatant was taken to dryness under nitrogen stream for storage at to −80 °C until analysis. The pellet was homogenized again, with 200 μL of a mixture of (2:1, *v*/*v*) chloroform/methanol, using a pellet mixer (2 min), to extract lipophilic metabolites and centrifuged (10,000×*g* at 4 °C for 10 min). Finally, the resulting supernatant was taken to dryness under nitrogen stream and stored to −80 °C until analysis.

The polar extracts were reconstituted to 200 μL of a mixture of methanol/water (4:1, *v*/*v*) and lipophilic extracts were reconstituted to 200 μL of (1:1) chloroform/water mixture before the analysis by ESI-MS. For data acquisitions from positive ionization, 0.1 % (*v*/*v*) formic acid was added to polar extract and 30 mM of ammonium acetate to lipophilic extract. In the case of negative ionization, intact extracts were directly infused to the mass spectrometer.

*Sample treatment for GC-MS analysis* Sample preparation before GC-MS analysis should be performed carefully to ensure the reliability of metabolomic analysis. Plasma was thawed at 4 °C and vortex-mixed before use. For the extraction of metabolites from plasma, 100 μL of plasma samples was mixed with 400 μL of 1:1 methanol/ethanol mixture in an Eppendorf tube and vortexed for 5 min at room temperature, followed by centrifugation at 4,000×*g* for 10 min at 4 °C. The supernatant was transferred to another Eppendorf tube and dried under nitrogen stream. Plasma metabolites are not volatile and a previous derivatization step is mandatory. To this end, they were derivatized following a previously published procedure [44]. Briefly, all dried samples were derivatized with 50 μL of methoxylamine hydrochloride solution (20 mg $mL^{-1}$ in pyridine) at 70 °C for 40 min for protection of carbonyl groups by methoximation, followed by treatment with 50 μL MSTFA with 1 % (*w*/*v*) of TMCS at 50 °C for 40 min for derivatization of primary amines and primary and secondary hydroxy groups in the case of MTSFA. In addition, TMCS aids in the derivatization of amides and secondary amines and hindered hydroxy groups, as a previously published elsewhere with some modifications [44]. Finally, the derivatized samples were vortex-mixed for 2 min before GC analysis, centrifuged at 4,000×g for 5 min and supernatant collected for analysis.

*Analysis of samples by DI-ESI-QTOF-MS* Metabolomic experiments of liver, kidney, and plasma extracts from mice exposed to arsenic were performed by DIMS using an ESI. The parameters for hybrid analyzer QqQ-TOF system were optimized to obtain the higher sensitivity with minimal fragmentation of molecular ions, both in positive and negative ion modes. To acquire MS/MS spectra, nitrogen was used as collision gas (Table 1).

The extraction of metabolites from organs and plasma were carried out as described in the sample treatment section. Both extracts were analyzed in positive ($ESI^+$) and negative ($ESI^-$) ion modes resulting different profiles in a wide spectral range (*m*/*z* 50–1,100). Figure 1 shows the typical spectrum of mice plasma from control group (exposed to 0.9 % NaCl), after 6 days from the beginning of the experience, obtained by DI-ESI(±)-QTOF-MS. When these extracts were analyzed in positive ion mode ($ESI^+$), metabolic profiles exhibited peaks in a wide range, including signals in the *m*/*z* interval 50–1,100. Both extracts show similar mass profiles, although several important differences can be remarked. In polar extracts, a large number of signals can be observed, with different intensities in the *m*/*z* range 50–400; in addition, several clusters of peaks at higher *m*/*z* values can also be remarked, Fig. 1a, probably associated to structurally related compounds, such as lyso-phosphatidylcholines (LPCs, *m*/*z* 400–600) and phosphatidylcholines (PCs, *m*/*z* 750–900). In lipophilic extracts (Fig 1b), peak clusters at *m*/*z* above 500 can also be observed, being remarkable that the number of peaks in these clusters and their intensities increase. Alternatively, the analysis of

**Table 1** Operating conditions for DI-ESI-QqQ-TOF-MS

| DI-ESI(±)-QTOF-MS conditions | | |
|---|---|---|
| Flow | 5 μL $min^{-1}$ | |
| Acquisition time | 0.2 min (1.005 s per scan) | |
| m/z range | 50–1,100 | |
| Curtain gas ($N_2$) | 1.13 L $min^{-1}$ | |
| Nebulizer gas ($N_2$) | 1.56 L $min^{-1}$ | |
| Source temperature | 60 °C | |
| | Acquisition mode | |
| | Positive | Negative |
| Ion spray voltage (IS) | 3500 V | −4,000 V |
| Declustering potential (DP) | 60 V | −100 V |
| Focusing potential (FP) | 250 V | −250 V |
| Ion energy (IE) | 2.0 V | −2.0 V |
| Channel electron multiplier (CEM) | 2,400 V | 2,400 V |

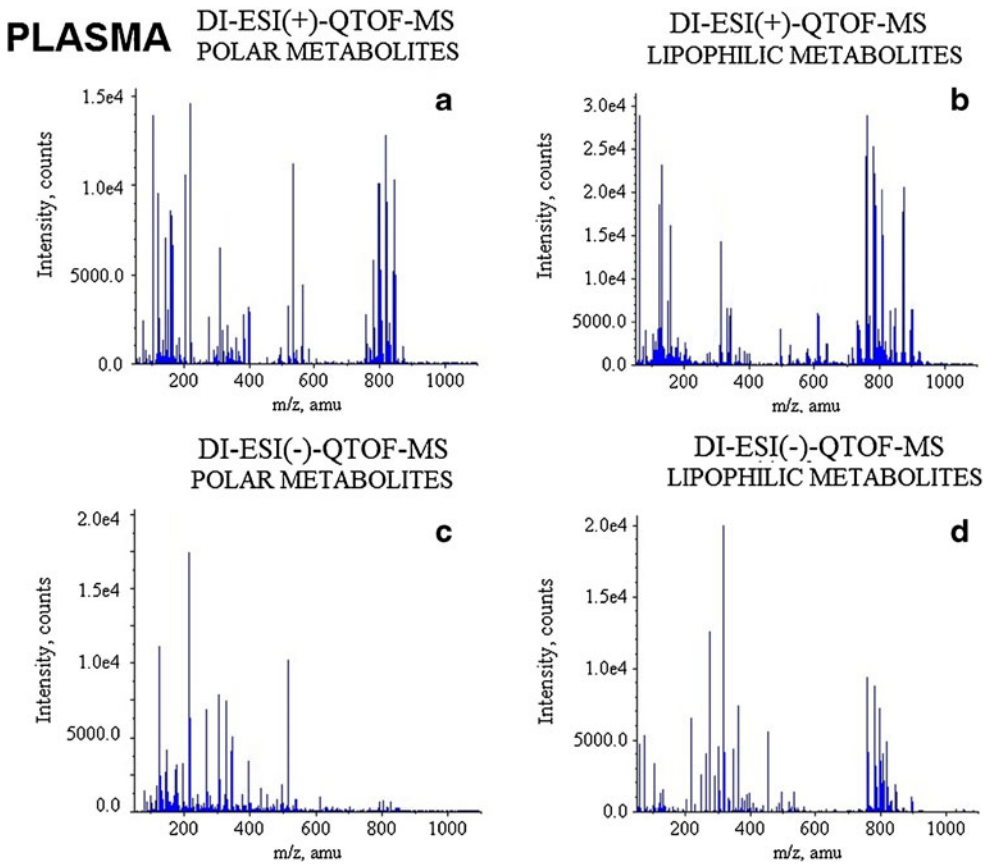



**Fig. 1** Mass spectra from plasma extracts of control mice. (**a**) $ESI^+$ spectrum of polar metabolites. (**b**) $ESI^+$ spectrum of lipophilic metabolites. (**c**) $ESI^-$ spectrum of polar metabolites. (**d**) $ESI^-$ spectrum of lipophilic metabolites

these extracts in negative mode ($ESI^-$) gave completely different profiles (Fig 1c, d), which only exhibit signals with high sensitivity at *m/z* values under 500 in both extracts. On the other hand, high molecular mass metabolites (*m/z* 500–1,000) show a very low intensity, but the same manner as in $ESI^+$, their intensity increase in the second extraction step. These results confirm the complementarily of the extraction procedure and molecule ionization mode to get a high diversity of signals.

*Analysis of samples by GC-MS* Chromatography was performed on a Factor Four capillary column VF-5MS 30 m× 0.25 mm ID, with 0.25 μm of film thickness (Varian). The injector temperature was kept at 280 °C. Helium carrier gas was used at a constant flow rate of 1 mL/min. To acquire a good separation, the column temperature was initially maintained at 60 °C for 5 min, and then increased from 60 to 140 °C at a rate of 7 °C/min for 4 min. Then, the column temperature was increased to180°C at 5 °C/min for another 6 min. Finally, the temperature was increased to 280 °C at 5 °C/min, and held for 2 min. For mass spectrometry detection, ionization was carried out by electronic impact (EI) with a voltage of 70 eV, using full scan mode in the *m/z* range of 35–650, with an ion source temperature of 200 °C. Typical GC-MS total ion current chromatograms from control mice plasma (exposed to 0.9 % NaCl), after 6 days from the beginning of the experience are shown in Fig. 2. For the analysis, 1 μL of sample was injected in splitless mode. The identification of endogenous metabolites was based on comparison with the corresponding standards according to their retention times and mass spectra characteristics, complementarily, searching on NIST Mass Spectral Library (NIST 02) was used.

*Data analysis* Markerview™ software (Applied Biosystems) was employed to filter the mass spectrometric results. Statistical data analysis (Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) were performed by means of statistical software packages SIMCA-P™ (version 11.5, published by UMetrics AB, Umeå, Sweden). PLS-DA is a partial least squares regression of a set *Y* of binary variables describing the categories of a categorical variable on a set *X* of predictor variables. It is a compromise between the usual discriminant analysis and a discriminant analysis on the significant principal components of the predictor variables [45]. The data were processed in order to find differences between mice groups submitted to different exposure time and to trace the metabolites altered by arsenic for later identification by their molecular mass and fragments in MS/MS experiments. In addition, altered metabolites were characterized using different

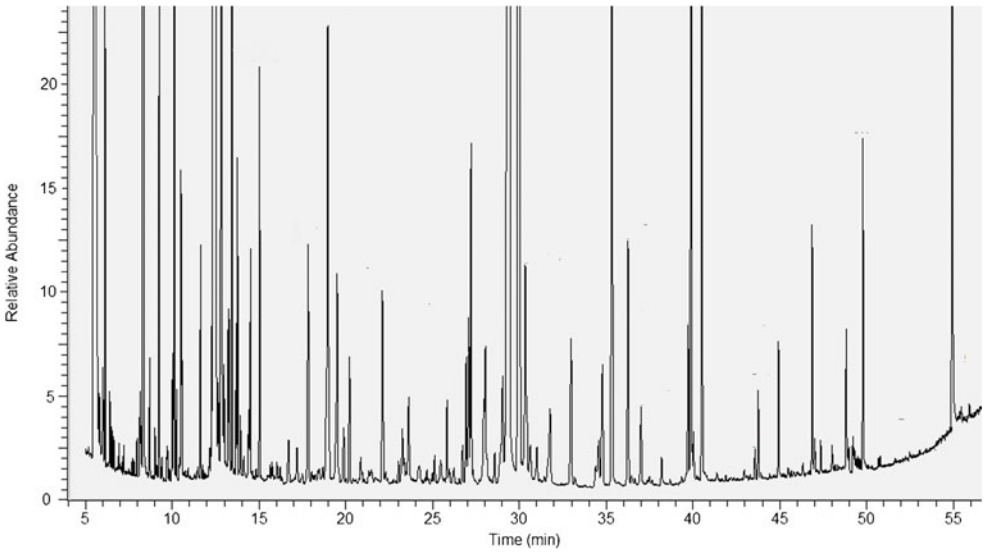



**Fig. 2** Typical chromatographic profile obtained from control mice plasma

databases of metabolomics based on DI-ESI-QqQ-TOF/MS, such as Human Metabolome Database (http://www.hmdb.ca), METLIN (http://metlin.scripps.edu), and Mass Bank (http://www.massbank.jp). In GC-MS analysis, identification of metabolites was performed using the NIST Mass Spectral Library (NIST 02).

## Results

### Metabolomic study of liver from *Mus musculus* mice under arsenic exposure by DI-ESI(±)-QTOF-MS

In order to discriminate between exposure groups, a PLS-DA was performed employing the intensities of the *m*/*z* signals in polar and lipophilic liver extracts, using positive and negative modes (Fig. 4). The models allow a good classification of the samples into two groups, which are showed by the respective scores plots (Fig. 3). To identify which variables were responsible for this separation, the variable influence on the projection (VIP) parameter was used. VIP is a weighted sum of squares of the PLS-DA weight, which indicates the importance of the variable to the whole model. VIP coefficients reflect the relative importance of each *X* variable for each *X* variate in the prediction model. VIP coefficients thus represent the importance of each *X* variable in fitting both the *X*- and *Y*-variates, since the *Y*-variates are predicted from the *X*-variates. VIP allows to classify the *X*-variables according to their explanatory power of *Y*. Predictors with large VIP, larger than 1, are the most relevant for explaining *Y*. Thus, it is possible to select variables with the most significant contribution in discriminating between metabolomic profiles corresponding to groups of exposure against controls. Only metabolites with VIP>2 have been considered good biomarkers. Such as strict criterion was set because of the large number of variables or metabolites in the mass spectra (Fig. 1). The *t* test was performed in succession, and the variables without significant differences between the exposed mice and the controls ($p>0.01$) were eliminated. Goodness of the model was measured through the $R^2Y$ and $Q^2$ values, provided by the software (indicative of class separation and predictive power of the model, respectively). These parameters are ranged between 0 and 1 and indicate the variance explained by the model for all the data analyzed ($R^2$), and this variance in a test set by cross-validation ($Q^2$). In particular, for all the analysis performed, the values of $R^2Y$ (cum) and $Q^2$ (cum) of the combined model are 0.90–0.99 and 0.8–0.95, respectively, indicating that a combination of datasets between groups provides the best classification and prediction. Mostly altered metabolites have been obtained in polar extracts from liver tissue (Table 2), but a number of metabolites were found in lipophilic extracts, which demonstrates the complementarity of using both extracts. Application of both ionization modes is also an important and critical point.

### Metabolomic study of kidney from *Mus musculus* mice under arsenic exposure by DI-ESI(±)-QTOF-MS

The application of the metabolomic approach to kidney tissue, using MS signals in a wide *m*/*z* range (*m*/*z* 50–1100), allows discrimination between control and exposed mice (12th day) using polar metabolites with positive and negative acquisition modes (Fig. 4). The involvement of kidney in excretion and detoxification of water soluble metabolites and its relationship to blood plasma composition provides to these results an especial interest in health and biomedical fields. As it can be seen in Table 3, an important number of polar metabolites are altered under inorganic arsenic exposure.

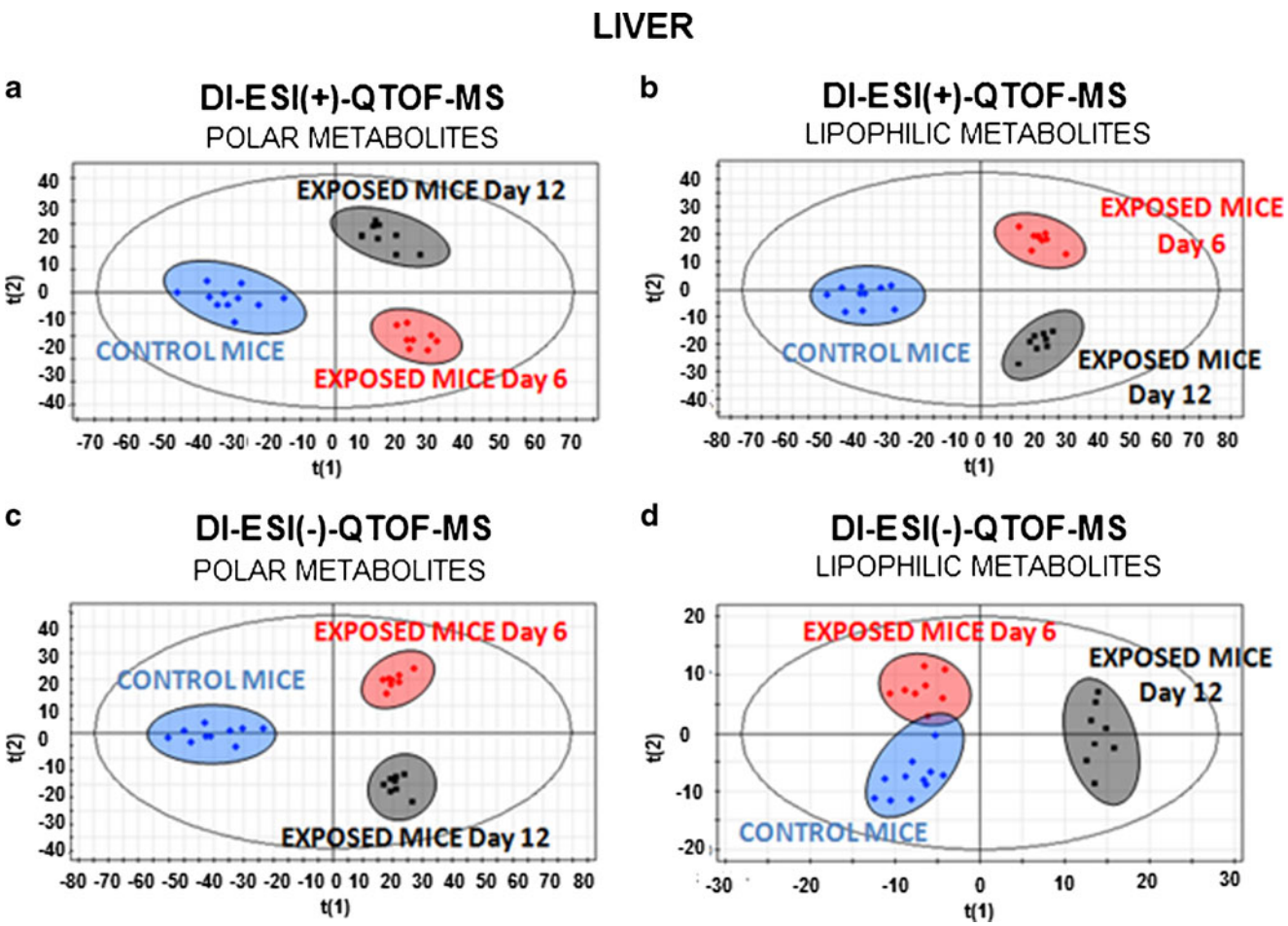



**Fig 3** Scores plots of PLS-DA for $ESI^+$ and $ESI^-$ ionization modes of polar and lipophilic mice liver extracts exposed to inorganic arsenic during 12 days

**Table 2** Altered metabolites from liver of mice (*Mus musculus*) exposed to arsenic ($As_2O_3$) during 12 days of acute exposure

| Altered metabolites | *m/z* | Extract | Altered metabolites | *m/z* | Extract |
|---|---|---|---|---|---|
| Taurine ↑ | 124.01 ($H^-$) | Polar | $MA^V$ ↑ | 141.05 ($H^+$) | Polar |
| Methionine ↑ | 150.05 ($H^+$) | Polar | $DMA^V$ ↑ | 139.04 ($H^+$) | Polar |
| Arginine ↓ | 175.09 ($H^+$) | Polar | Glutamic acid ↑ | 147.05 ($H^+$) | Polar |
| Betaine ↑ | 118.08 ($H^+$) | Polar | Carnitine ↓ | 162.10 ($H^+$) | Polar and lipophilic |
| Cysteine ↑ | 122.02 ($H^+$) | Polar | Choline ↑ | 104.09 ($H^+$) | Polar and lipophilic |
| Homocysteine ↓ | 136.03 ($H^+$) | Polar | Phosphatidylcholines (PC) ↓ | 700-850 | Polar and Lipophilic |
| Tryptophan ↓ | 205.09 ($H^+$) | Polar | Pyruvate ↓ | 89.02 ($H^+$) | Lipophilic |
| Glyceraldehide-3-phosphate ↓ | 168.99 ($H^-$) | Polar | Pipecolic acid ↑ | 130.08 ($H^+$) | Lipophilic |
| Phosphorylcholine ↑ | 185.07 ($H^+$) | Polar | Arachidonic acid ↑ | 303.24 ($H^-$) | Lipophilic |
| Citric acid ↑ | 193.03 ($H^+$) | Polar | Oleic acid ↑ | 281.25 ($H^-$) | Lipophilic |
| Glutathione ↓ | 308.08 ($H^+$) | Polar | Linoleic acid ↑ | 279.25 ($H^-$) | Lipophilic |
| Glucose ↓ | 203.05 ($Na^+$) | Polar | Lyso-phosphatidylcholines (Lyso-PC) ↑ | 450–600 | Polar and lipophilic |
| Xanthine ↑ | 153.03 ($H^+$) | Polar | Diglycerides ↑ | 600–700 | Lipophilic |
| Hypoxanthine ↑ | 137.04 ($H^+$) | Polar | Triglycerides ↑ | 850–950 | Lipophilic |

Variations compared to control mice: ↑ increasing signal intensity, ↓ decreasing signal intensity

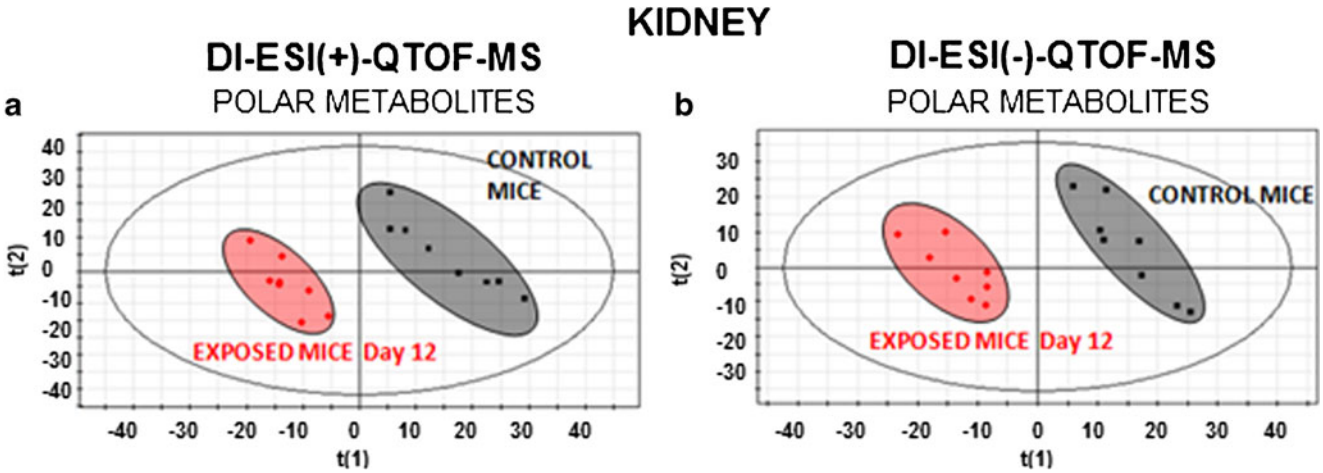



**Fig 4** Scores plots of PLS-DA for $ESI^+$ of polar and lipophilic metabolites from mice kidney tissue exposed to inorganic arsenic during 12 days

Metabolomic study of plasma from *Mus musculus* mice under arsenic exposure by DI-ESI(±)-QTOF-MS

The application of PLS-DA to mass spectra signals from polar and lipophilic metabolites of plasma samples establish a slight separation between exposed and control mice for a wide range of peaks (*m/z* 50–1,100) using positive and negative acquisition mode (Fig. 5). In this case, the values of $R^2Y$ (cum) and $Q^2$ (cum) of the combined model are 0.90–0.99 and 0.80–0.90, respectively. Several polar metabolites are altered in plasma under inorganic arsenic exposure (see Table 4).

Quantification of altered metabolites in plasma from *Mus musculus* mice under arsenic exposure by GC-MS

GC-MS was applied to confirm and quantify some of the altered metabolites traced by DI-ESI(±)-QTOF-MS. Additionally, using GC-MS, it is possible to analyze others metabolites nonionized using ESI ionization source. For this purpose, three derivatizing reagents were used for plasma samples analysis in order to get as much metabolic information as possible. Plasma metabolic profiles of five mice plasma of each group of exposure were obtained with the method previously described in experimental section. The concentration of mice plasma metabolites are shown in Table 5.

## Discussion

Perturbations in energy metabolism

Intermediate metabolites in energy metabolism such as glucose, glyceraldehide-3-phosphate, pyruvate, and citric acid are altered under inorganic arsenic exposure. The levels of these compounds decrease in liver and plasma according to results obtained by DI-ESI(±)-QTOF-MS (Tables 2 and 4). These results are confirmed by GC-MS analysis of plasma (Table 5), which shows decreased concentrations of lactic acid and alanine and increased concentrations of isocitric acid, α-ketoglutarate, glutamic acid, and citric acid. This fact can be related to perturbations in carbohydrate metabolism (Fig. 6A), and is consistent with the depletion of glucose, reported by Szinicz and Forth [46], as toxic effect of arsenic in rats. Other authors [47, 48] have also reported significant depletion of glucose in blood and liver of guinea pigs after arsenic exposure. The decreased level of pyruvate in liver, as end product of glycolysis cycle, supports this idea (Table 2), which is also borne by the formation of acetyl-CoA via pyruvate

**Table 3** Altered metabolites from kidney of mice (*Mus musculus*) exposed to arsenic ($As_2O_3$) during 12 days of acute exposure

| Altered metabolites | *m/z* | Extract | Altered metabolites | *m/z* | Extract |
|---|---|---|---|---|---|
| Taurine ↑ | 124.01 ($H^-$) | Polar | Phosphorylcholine ↑ | 185.07 ($H^+$) | Polar |
| Arginine ↓ | 175.11 ($H^+$) | Polar | Citric acid ↑ | 193.03 ($H^+$) | Polar |
| Methionine ↑ | 150.05 ($H^+$) | Polar | $DMA^V$ ↑ | 139.04 ($H^+$) | Polar |
| Choline ↑ | 104.09 ($H^+$) | Polar | Betaine aldehyde ↑ | 102.09 ($H^+$) | Polar |
| Phosphatidylcholines ↓ | 700–850 | Polar | Uric acid ↑ | 169.05 ($H^+$) | Polar |
| Creatinine ↑ | 114.06 ($H^+$) | Polar | | | |

Variations compared to control mice: ↑ increasing signal intensity, ↓ decreasing signal intensity

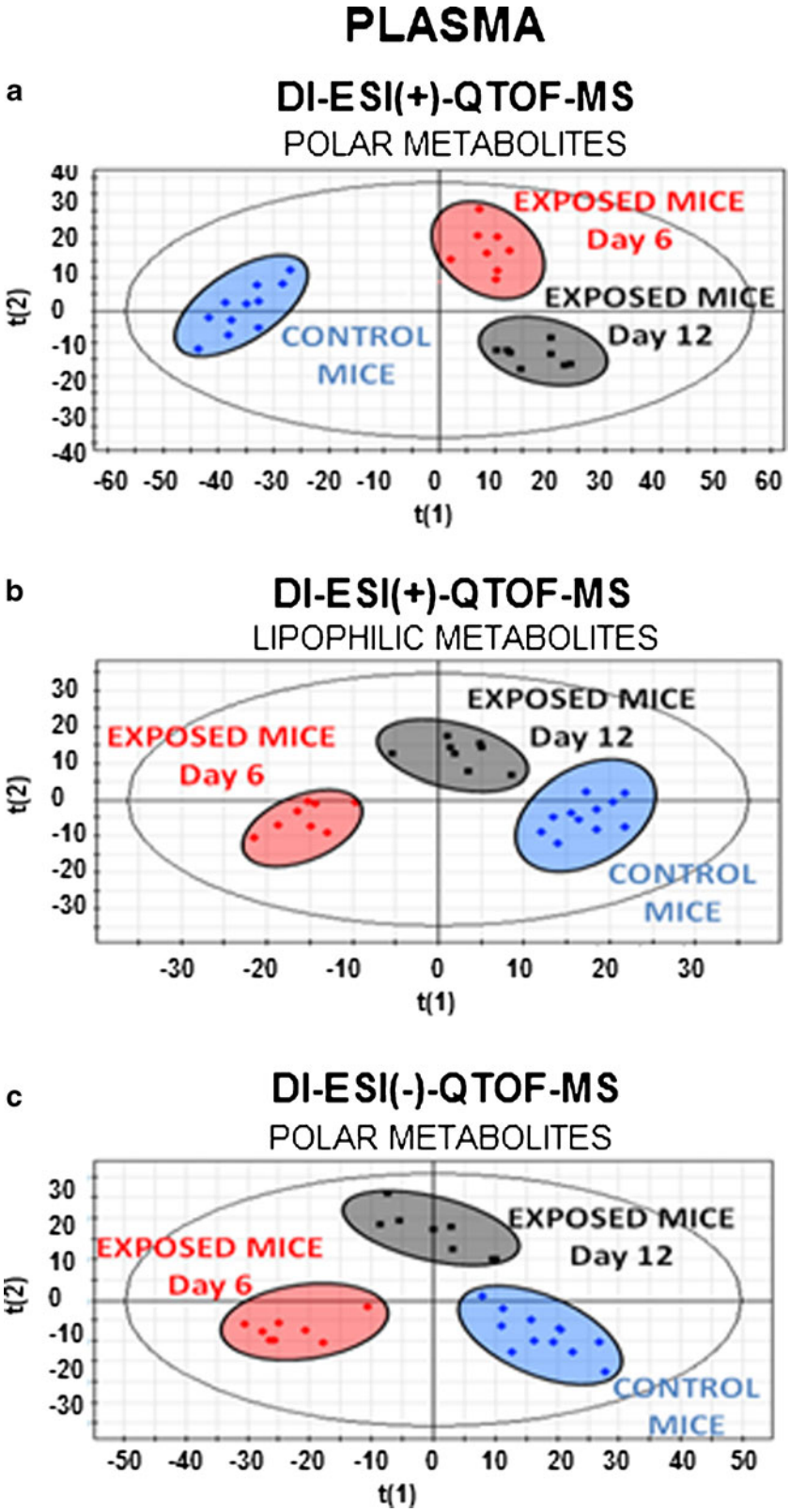



**Fig 5** Scores plots of PLS-DA for $ESI^+$ of polar and lipophilic metabolites from mice plasma exposed to inorganic arsenic during 12 days

metabolism (Fig. 6A). The main function of acetyl-CoA is to convey carbon atoms within the acetyl group to the citric acid cycle (Krebs cycle) to be oxidized for energy production. As intermediate compound in the Krebs cycle, high levels of citric acid have been observed along arsenic exposure in liver, kidney, and

**Table 4** Altered metabolites from plasma of mice (*Mus musculus*) exposed to arsenic ($As_2O_3$) during 12 days of acute exposure

| Altered metabolites | *m/z* | Extract | Altered metabolites | *m/z* | Extract |
|---|---|---|---|---|---|
| Taurine ↑ | 124.01 ($H^-$) | Polar | Acetyl-carnitine ↑ | 204.11 ($H^+$) | Polar |
| Arginine ↓ | 175.11 ($H^+$) | Polar | Glutamic acid ↑ | 147.05 ($H^+$) | Polar |
| Methionine ↑ | 150.05 ($H^+$) | Polar | Creatine ↑ | 132.07 ($H^+$) | Polar |
| Choline ↑ | 104.09 ($H^+$) | Polar | Homocysteine ↓ | 136.03 ($H^+$) | Polar |
| Phosphorylcholine ↑ | 185.07 ($H^+$) | Polar | Phosphatidylcholines (PC) ↓ | 700–850 | Polar and Lipophilic |
| $MA^V$ ↑ | 141.05 ($H^+$) | Polar | Lyso-phosphatidylcholines (Lyso-PC) ↑ | 450–600 | Polar and Lipophilic |
| $DMA^V$ ↑ | 139.04 ($H^+$) | Polar | Diglycerides ↑ | 600–700 | Lipophilic |
| Citric acid ↑ | 193.03 ($H^+$) | Polar | Triglycerides ↑ | 850–950 | Lipophilic |
| Glutathione ↓ | 308.04 ($H^+$) | Polar | Pyruvate ↓ | 89.02 ($H^+$) | Lipophilic |
| Glucose ↓ | 203.05 ($Na^+$) | Polar | | | |

Variations compared to control mice: ↑ increasing signal intensity, ↓ decreasing signal intensity

plasma (see Tables 2, 3, and 4, respectively). The increased concentration of citric acid, isocitric acid, α-ketoglutarate, and glutamic acid observed in plasma confirm this hypothesis (see Table 5).

On the other hand, an increased presence of lipids (free fatty acids, triacylglycerols, diacylglycerols, and LPCs) was observed in liver and plasma (see Tables 2 and 4, respectively) as a result of apoptosis induced by arsenic (Fig. 7B). This fact

**Table 5** Quantification of mice plasma metabolites (*Mus musculus*) exposed to arsenic ($As_2O_3$) by GC-MS during 12 days of acute exposure

| Plasma metabolites | PLASMA | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Retention time (min) | Control mice ($n$=5) Mean±SD | As exposed mice day 6 ($n$=5) Mean±SD | As exposed mice day 12 ($n$=5) Mean±SD |
| Lactic acid (mmol $L^{-1}$) | 5.6 | 1.66±0.11 | 1.31±0.12 | 1.09±0.19 |
| Alanine (mmol $L^{-1}$) | 6.0 | 0.326±0.021 | 0.303±0.024 | 0.254±0.032 |
| Valine (mmol $L^{-1}$) | 11.6 | 0.216±0.042 | 0.198±0.021 | 0.222±0.032 |
| Urea (mmol $L^{-1}$) | 12.5 | 360±12 | 344±21 | 377±29 |
| Isoleucine (mmol $L^{-1}$) | 13.2 | 0.0681±0.009 | 0.0702±0.013 | 0.0669±0.015 |
| Proline (mmol $L^{-1}$) | 13.3 | 0.142±0.005 | 0.151±0.007 | 0.138±0.012 |
| Glycine (mmol $L^{-1}$) | 13.4 | 0.184±0.009 | 0.211±0.012 | 0.224±0.018 |
| Serine (mmol $L^{-1}$) | 14.5 | 0.0982±0.003 | 0.0922±0.007 | 0.0102±0.01 |
| Threonine (mmol $L^{-1}$) | 15.0 | 0.129±0.008 | 0.121±0.011 | 0.131±0.014 |
| Aspartic acid (mmol $L^{-1}$) | 17.2 | 0.086±0.009 | 0.081±0.012 | 0.089±0.008 |
| Glutamine (mmol $L^{-1}$) | 22.1 | 0.648±0.021 | 0.618±0.033 | 0.651±0.018 |
| Glutamic acid (mmol $L^{-1}$) | 23.1 | 0.134±0.08 | 0.148±0.12 | 0.175±0.21 |
| α-Ketoglutarate (mmol $L^{-1}$) | 23.5 | 0.144±0.007 | 0.172±0.012 | 0.204±0.021 |
| Phenylalanine (mmol $L^{-1}$) | 25.5 | 0.0562±0.006 | 0.0548±0.004 | 0.0553±0.002 |
| Isocitric acid (mmol $L^{-1}$) | 25.9 | 0.512±0.021 | 0.554±0.015 | 0.589±0.033 |
| Citric acid (mmol $L^{-1}$) | 27.2 | 3.21±0.24 | 3.52±0.32 | 3.84±0.36 |
| Fructose (mmol $L^{-1}$) | 27.9 | 0.935±0.033 | 0.902±0.024 | 0.942±0.045 |
| Galactose (mmol $L^{-1}$) | 29.0 | 0.125±0.013 | 0.117±0.016 | 0.114±0.021 |
| Glucose (mmol $L^{-1}$) | 29.9 | 8.24±0.47 | 7.85±0.68 | 6.85±0.89 |
| Tyrosine (mmol $L^{-1}$) | 31.0 | 0.115±0.012 | 0.105±0.016 | 0.121±0.015 |
| Uric acid (mmol $L^{-1}$) | 37.0 | 0.142±0.006 | 0.168±0.01 | 0.192±0.02 |
| Tryptophan (mmol $L^{-1}$) | 38.1 | 0.094±0.011 | 0.087±0.009 | 0.101±0.01 |
| Cholesterol (mmol $L^{-1}$) | 54.6 | 1.26±0.05 | 1.52±0.09 | 1.73±0.08 |

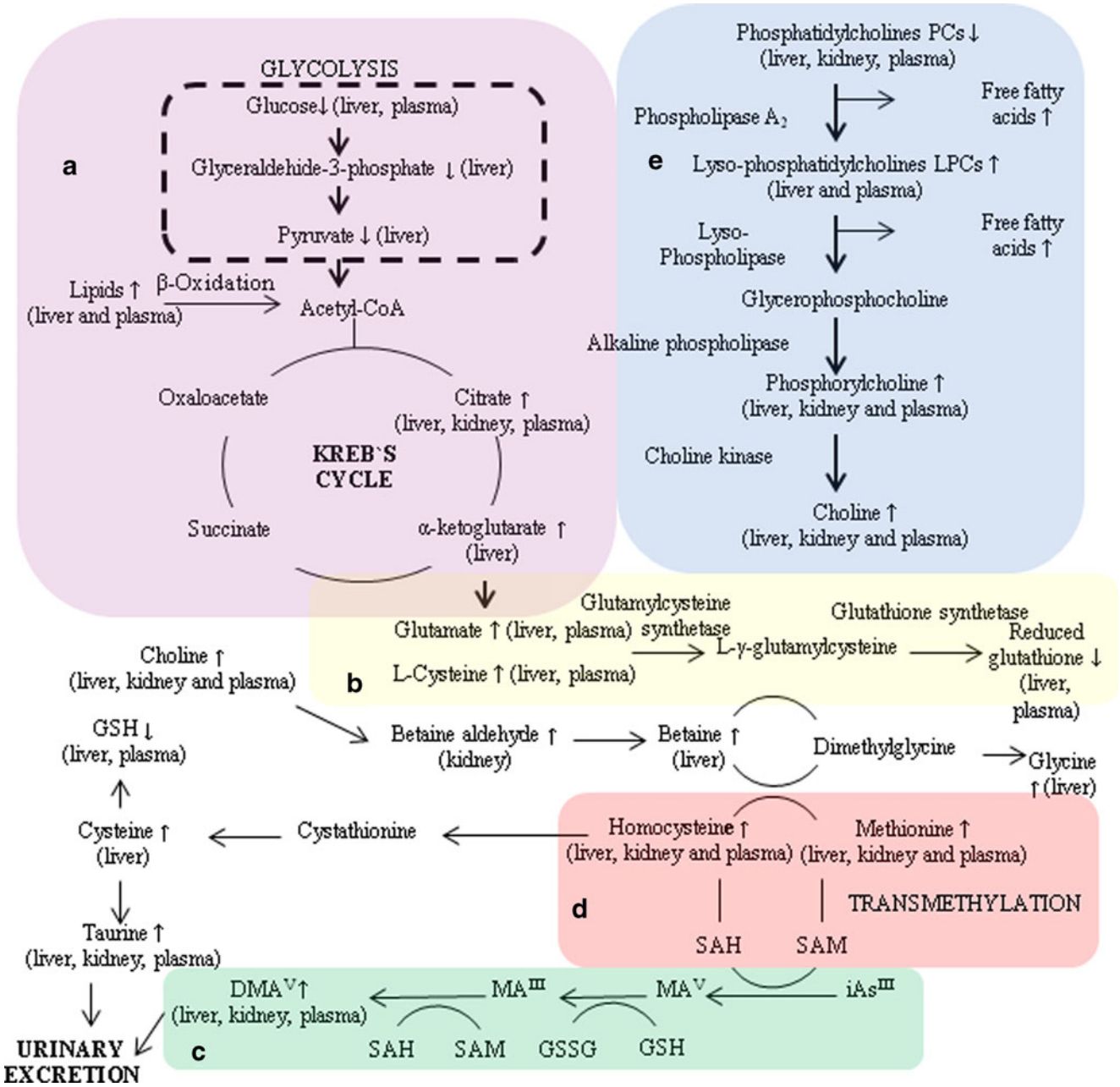



**Fig 6** Schematic representation of the energy metabolic pathways (**a**), synthesis of reduced glutathione (**b**), biomethylation of inorganic arsenic (**c**), alterations in methionine cycle (transmethylation) (**d**), and breakdown of membrane phospholipids

has been observed in rat glioma and under effect of realgar undergoing apoptosis [33, 36]. In addition, increased levels of carnitine in liver (Table 2) as well as acetyl-carnitine in plasma (Table 4) are observed along the exposure time. Carnitine is required in living cells for the transport of fatty acids from the cytosol into the mitochondria during the breakdown of lipids for the generation of metabolic energy by β-oxidation. Therefore, this metabolite is also related to energy metabolism.

Perturbations in amino acid metabolism

Alterations of glucose and amino acid concentrations seem to be a common response to many toxins in several species and are likely indicative of a general response to xenobiotics exposure rather than specific biological response to a particular toxicant [49]. However, other metabolites altered under arsenic exposure were the aminoacids arginine, tryptophan, cysteine, glutamic acid, and methionine, some of them with

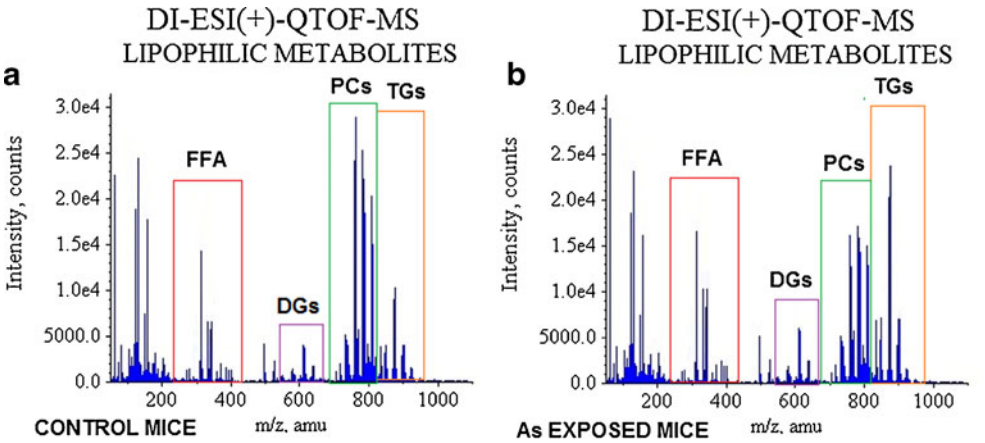



**Fig 7** $ESI^+$ mass spectra of pool of plasma lipophilic extracts (*m/z* 50–1,100) from (**a**) control mice and (**b**) exposed mice to inorganic arsenic during 12 days

antioxidant activity such as arginine [50] and tryptophan [51]. In the exposure experiment, decreased levels of arginine have been observed in liver, kidney, and plasma (see Table 2, 3, 4, and 5, respectively), and tryptophan in liver (see Table 2).

On the other hand, decreased levels of glutathione in liver and plasma and correlative increase in amino acids cysteine and glutamic acid (see Table 2, 4, and 5) can be observed. Glutathione can be biosynthesized in the body from the amino acids L-cysteine, L-glutamic acid, and glycine (Fig. 6B), and in reduced form, GSH, is an antioxidant compound that can protect cell from free radicals, which may play an important role against arsenic carcinogenesis, due to their activity as electron donors in arsenic methylation (Fig. 6C) [52]. Therefore, glutathione level decreases as a consequence of oxidative stress caused by arsenic and correlatively increases the presence of L-cysteine and L-glutamic acid to contribute to glutathione production. In addition, it is well known that $iAs^{III}$ inhibits the activity of GSSG reductase enzyme [53].

In addition, methionine, involved in the biosynthesis of cysteine, carnitine, taurine, lecithin, phosphatidylcholine, and other phospholipids, increases in liver, kidney, and plasma (see Table 3, 4, and 5, respectively). The role of methionine in arsenic methylation is important due to the conversion of methionine into *S*-adenosylmethionine (SAM) by methionine adenosyltransferase. SAM donates a methyl group to arsenic to form methyl and dimethyl arsenic (Fig. 6D) [54], which also contributes to the rise in the concentration of methionine during arsenic exposure.

## Degradation of membrane phospholipids

The increased levels of choline containing metabolites, such as choline and phosphorylcholine, were detected in liver and plasma principally after arsenic intake and have been associated with drug induced disruption of cell membrane [55]. One of the most important families of altered metabolites found in our study was phosphatidylcholines whose levels decrease in exposed mice. The majority of phospholipids in cellular membranes consist of glycerophospholipids such as phosphatidylcholine (PC), the most abundant phospholipids component in all the lipoprotein classes with levels ranging from 60 to 80 % of total phospholipids [56]. PC is involved in pathological mechanisms and crucial cellular functions such as signal transduction, apoptosis, necrosis, and protein sorting [57–59]. LPCs are produced by degradation of PC under enzymatic action of phospholipase A2, which releases one of the fatty acid groups (Fig. 6E). LPC is rapidly hydrolyzed to glycerophosphocholine and, finally, phosphorylcholine and choline.

The results show that intensities in MS spectra from different PC family compounds decreased under inorganic arsenic exposure in the *m/z* range of 700–850 in polar and lipophilic extracts using positive mode ($ESI^+$) (Fig. 7). Secondly, LPC (*m/z* 450–600) increased in exposed mice in polar extract using positive mode of acquisition (Fig. 7). These results demonstrate breakdown of membrane phospholipids (cell apoptosis), which is corroborated by the increase in free fatty acids in the lipophilic extract from liver $ESI^+$ and $ESI^-$ analysis (Fig. 7), such as pipecolic, arachidonic, oleic, linoleic, gamma-linolenic, docosahexanoic, piranaric, and lauric acids, as a consequence of PCs degradation (Fig. 6E).

## Alterations in degradation choline pathway and methionine cycle

Degradation of phospholipids from cell membranes leads to accumulation of choline in plasma and tissues. As a consequence, perturbations in the pathway of choline degradation can be observed, which is shown by the increased levels of betaine aldehyde in kidney (Table 3). This metabolite is an intermediate compound in the oxidation of choline to betaine, reaction catalyzed by the enzyme choline monooxigenase. Betaine is a source of methyl groups required for methylation of inorganic arsenic and constitutes a detoxification mechanism for this element (Fig. 6D); for this reason, the betaine

level increases in liver extract (Table 2). Therefore, the level of methionine increases in liver, kidney, and plasma of exposed mice, as previously mentioned, and correlatively the level of homocysteine, biosynthesized from methionine, that is recycled back to methionine completing the cycle.

In addition, changes in taurine levels in liver, kidney, and plasma can be observed (see Table 2, 4 and 5, respectively). Taurine has many important metabolic roles, such as conjugation of bile acids, antioxidation, osmoregulation, membrane stabilization, and modulation of calcium signaling. It also acts as an antioxidant and protects against toxicity of a number of substances (such as lead and cadmium) [60, 61]. Moreover, the opposite alteration of taurine and GSH has been related by GSH, which is a competitive metabolic product with taurine from cysteine. This fact suggests that the biosynthesis of GSH from cysteine was blocked, and the cysteine was diverted to produce taurine. The same results have been observed by other authors when realgar ($As_4S_4$) is administered to rats [33].

### Induction of cell apoptosis and vascular risk

Perturbations in triglycerides and diglycerides levels in response to arsenic can also be observed (Fig. 7). Perturbations in triglycerides levels have previously been demonstrated in both bank voles under arsenic exposure [62] and rats under cadmium exposure [63]. In addition, increased biosynthesis of triglycerides and diacylglycerol has been found in apoptotic KB cells [64]. However, the mechanism for the relationship between increased lipids metabolites and cell apoptosis still remains unclear.

On the other hand, arsenic exposure has been correlated with a large number of cardiovascular diseases. In our study, we found slightly increased levels of di- and triglycerides in liver and plasma of exposed mice (see Table 2 and 5, respectively) that, together with the large amount of free fatty acid previously commented, suggest a situation of hyperlipidemia, which constitutes one of the most important vascular risk factors. Cardiovascular diseases such as hypertension, QT prolongation, peripheral arterial disease, atherosclerosis, impaired microcirculation, coronary heart disease, and stroke are well recognized in relation to dose and duration of arsenic exposure [65, 66]. Similar results have been obtained in renal tissue of exposed bank vole to cadmium [55].

### Other metabolites

Other metabolites altered under arsenic exposure were also observed. Increased levels of xanthine and hypoxanthine were found in liver tissue from mice exposed to inorganic arsenic (see Table 2). Xanthine is a product generated in degradation pathway of purine. Xanthine is formed by oxidation of hypoxanthine by xanthine oxidase, an enzyme that generates reactive oxygen species [67]. This enzyme can further catalyze the oxidation of xanthine to uric acid [68]; for this reason, it is reasonable to expect that the observed altered levels of uric acid in kidney in arsenic exposed mice. In mammals, uric acid is the final oxidation (breakdown) product of purine metabolism and is excreted in urine [69]. For this reason, uric acid may be a marker of oxidative stress [70], and may have a potential therapeutic role as an antioxidant [69]. Thus, elevated levels of uric acid could be associated with a protective response caused by oxidative stress. In addition, increased concentration of uric acid is obtained in plasma by GC-MS (see Table 5). On the other hand, creatine is not an essential nutrient, as it is biosynthesis in the body from L-arginine, glycine, and L-methionine. It is reasonable the high levels of plasma creatine as a consequence of transmethylation perturbation due to increased choline levels (see Table 4). Moreover, creatine functions as part of the cell's energy shuttle from mitochondria to the cytosol. In addition, creatine is excreted as creatinine in the urine. The increased levels of creatinine in kidney support this idea (see Table 3).

## Conclusions

Mass spectrometry has been proven to be an efficient technique to investigate the biochemical effects of trivalent inorganic arsenic. The time-dependent changes in endogenous metabolites by oral administration of arsenic were identified by PLS-DA method. Mass spectrometry analysis of polar and lipophilic metabolites of liver, kidney tissues, and plasma by DI-ESI(±)-QTOF-MS using positive and negative modes of acquisition highlighted a number of perturbations in the endogenous metabolites profiles, which could be explained to arsenic induced biochemical pathways alterations. In addition, complementarily of gas chromatography coupled to mass spectrometry with DI-ESI(±)-QTOF-MS has been demonstrated. The toxicity mechanism of arsenic still remains unclear, although enzymatic inhibition, impaired antioxidant metabolism, and oxidative stress, may play a role. In this work, the toxic effect of arsenic has been related in some metabolic pathways, such as energy metabolism (e.g., glycolysis, Krebs cycle), amino acid metabolism, choline metabolism, methionine cycle (transmethylation), purine metabolism, and degradation of membrane phospholipids (cell apoptosis). In addition, analysis of polar and lipophilic extracts using positive and negative mode ($ESI^+/ESI^-$) allows the study and characterization of a great number of possible biomarkers. Additionally, although DIMS had comparable classification and prediction capability to LC-MS, as reported by other authors. LC-MS method is necessary when comprehensive screening of biomarkers is required. For this reason, a complementary chromatography separation based on reverse phase and hydrophilic interaction chromatography using

UPLC-ESI-QqQ-MS will be applied in the future. In this way, changes in the metabolome that were apparent after an exposure to 6 versus 12 days of exposure can be discussed, which would have been very useful from a biochemical point of view. In summary, mass spectrometry technique-based metabolomics approach can be employed to investigate the toxicological effects of different metals and other xenobiotics in the future using experiment exposure.

**Acknowledgments** This work was supported by the project CTM2012-38720-C03-01 from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, and by projects P08-FQM-3554, P09-FQM-4659, P08-CVI-03829, and P08-RNM-00523 from the Regional Ministry of Economy, Innovation, Science and Employment (Andalusian Government, Spain). M.A. García Sevillano thanks the Spanish Ministry of Education for a PhD scholarship.

## References

1. Vahter M (1999) Methylation of inorganic arsenic in different mammalian species and population groups. Sci Progress 82:69–88
2. Hirano S, Cui X, Li S, Kanno S, Kobayashi Y, Hayakawa T, Shraim A (2003) Difference in uptake and toxicity of trivalent and pentavalent inorganic arsenic in rat heart microvessel endothelial cells. Arch Toxicol 77:305–312. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12799770
3. Geiszinger AE, Goessler W, Francesconi KA (2002) Identification of the new arsenic-containing betaine, trimethylarsoniopropionate, in tissues of a stranded sperm whale Physeter catodon. Marine Environ Res 53:37–50
4. Fattorini D, Regoli F (2004) Arsenic speciation in tissues of the mediterranean polychaete *Sabella spallanzanii*. Environ Toxicol Chem 23:1881–1887
5. Fattorini D, Notti A, Regoli F (2006) Characterization of arsenic content in marine organisms from temperate, tropical, and polar environments. Chem Ecol 22:405–414
6. Wnek SM, Jensen TJ, Severson PL, Futscher BW, Gandolfi AJ (2010) Monomethylarsonous acid produces irreversible events resulting in malignant transformation of a human bladder cell line following 12 weeks of low-level exposure. Toxicol Sci 116:44–57
7. Naranmandura H, Ogra Y, Iwata K, Lee J, Suzuki KT, Weinfeld M, Le XC (2009) Evidence for toxicity differences between inorganic arsenite and thioarsenicals in human bladder cancer cells. Toxicol Appl Pharmacol 238:133–140
8. Hirata S, Toshimitsu H, Aihara M (2006) Determination of arsenic species in marine samples by. HPLC-ICP-MS. Anal Sci 22:39–43
9. Petrick JS, Jagadish B, Mash EA, Aposhian HV (2001) Monomethylarsonous acid (MMA(III)) is more toxic than arsenite in Chang human hepatocytes. Chem Res Toxicol 14:651–656
10. Thomas DH, Li J, Waters SB, Xing W, Adair BD, Drobna Z, Devesa V, Styblo M (2007) Arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase and methylation of arsenicals. Exp Biol Med 232:3–13
11. Aposhian HV, Aposhian MM (2006) Arsenic toxicology: five questions. Chem Res Toxicol 19:1–15
12. Menzel DB, Hamadeh HK, Lee E et al (1999) Arsenic binding proteins from human lymphoblastoid cells. Toxicol Lett 105:89–101
13. Winski SL, Carter DE (1995) Interactions or rat red blood cell sulfhydryls with arsenate and arsenite. J Toxicol Environ Health 46: 379–397
14. Lu M, Wang H, Li XF et al (2004) Evidence of hemoglobin binding to arsenic as a basis for the accumulation of arsenic in rat blood. Chem Res Toxicol 17:1733–1742
15. Ngu TT, Stillman MJ (2006) Arsenic binding to human metallothionein. J Am Chem Soc 128:12473–12483
16. Chang KN, Lee TC, Tam MF, Chen YC, Lee LW, Lee SY, Lin PJ, Huang NR (2003) Identification of galectin I and thioredoxin peroxidase II as two arsenic-binding proteins in Chinese hamster ovary cells. J Biochem 371:495–503
17. Kitchin KT (2001) Identification of galectin I and thioredoxin peroxidase II as two arsenic-binding proteins in Chinese hamster ovary cells. Toxicol Appl Pharm 172:249–261
18. Kitchin KT, Wallace K (2008) The role of protein binding of trivalent arsenicals in arsenic carcinogenesis and toxicity. J Inorg Biochem 102:532–539
19. Gailer J, Ruprecht L, Reitmeir P, Benker B, Schramel P (2004) Mobilization of exogenous and endogenous selenium to bile after the intravenous administration of environmentally relevant doses of arsenite to rabbits. Appl Organomet Chem 18:670–675
20. Carew MW, Leslie EM (2010) Selenium-dependent and Independent Transport of Arsenic by the Human Multidrug Resistance Protein 2 (MRP2/ABCC2): Implications for the Mutual Detoxification of Arsenic and Selenium. Carcinogenesis 31:1450–1455
21. Hughes MF, Kenyon EM, Edwards BC, Mitchell CT, Del Razo LM, Thomas DJ (2003) Accumulation and metabolism of arsenic in mice after repeated administration of arsenate. Toxicol Appl Pharmacol 191:202–210
22. Carlson-Lynch H, Beck BD, Boardman PD (1994) Arsenic risk assessment. Environ Health Perspect 102:354–356
23. García-Chávez E, Santamaría A, Díaz-Barriga F, Mandeville P, Juárez BI, Jiménez-Capdeville ME (2003) Arsenite-induced formation of hydroxyl radical in the striatum of awake rats. Brain Res 976: 82–89
24. Piao F, Ma N, Hiraku Y, Murata M, Oikawa S, Cheng F, Zhong L, Yamauchi T, Kawanishi S, Yokoyama K (2003) Oxidative DNA damage in relation to neurotoxicity in the brain of mice exposed to arsenic at environmentally relevant levels. J Occup Health 47:445–449
25. Brown KG, Boyle KE, Chen CW, Gibb HJ (1989) A dose-response analysis of skin cancer from inorganic arsenic in drinking water. Risk Anal 9:519–528
26. Chen CJ, Chuang YC, You SL, Lin TM, Wu HY (1986) A retrospective study on malignant neoplasms of bladder, lung and liver in blackfoot disease endemic area in Taiwan. Br J Cancer 53:399–405
27. Warner ML, Moore LE, Smith MT, Kalman DA, Fanning E, Smith AH (1994) Increased micronuclei in exfoliated bladder cells of individuals who chronically ingest arsenic-contaminated water in Nevada. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 3:583–590
28. Szymanska-Chabowska A, AntonowiczJuchniewicz J, Andrzejak R (2007) The concentration of selected cancer markers (TPA, TPS, CYFRA 21-1, CEA) in workers occupationally exposed to arsenic (As) and some heavy metals (Pb, Cd) during a two-year observation study. Int J Occup Med Environ Health 20:229–239
29. Bowen BP, Northen TR (2010) Dealing with the unknown: metabolomics and metabolite atlases. J Am Soc Mass Spectrom 21:1471–1476
30. Fiehn O (2002) Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. Plant Mol Biol 48:155–171
31. Beger RD, Sun J, Schnackenberg LK (2010) Metabolomics approaches for discovering biomarkers of drug-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity. Toxicol Appl Pharmacol 243:154–166
32. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E (1999) 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. Xenobiotica 29:1181–1189
33. Wei L, Liao P, Wu H, Li X, Pei F, Li W, Wu Y (2009) Metabolic profiling studies on thetoxicological effects of realgar in rats by (1)H NMR spectroscopy. Toxicol Appl Pharmacol 234:314–325

34. García-Sevillano MA, Jara-Biedma R, González-Fernández M, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL (2013) Metal interactions in mice under environmental stress. Biometals 5:855–860
35. Dunn WB (2008) Current trends and future requirements for the mass spectrometric investigation of microbial, mammalian and plant metabolomes. Phys Biol 5:1–11
36. Griffin JL, Blenkiron C, Valonen PK, Caldas C, Kauppinen RA (2006) High-Resolution Magic Angle Spinning (1)H NMR Spectroscopy and Reverse Transcription-PCR. Anal Chem 78:1546–1552
37. Lin L, Yu Q, Yan X, Hang W, Zheng J, Xing J, Huanga B (2010) Direct infusion mass spectrometry or liquid chromatography mass spectrometry for human metabonomics? A serum metabonomic study of kidney cancer. Analyst 135:2970
38. González-Domínguez R, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL (2012) Metabolomic approach to Alzheimer's disease diagnosis based on mass spectrometry. Chem Papers 66:829–835
39. Sun G, Yang K, Zhao Z, Guan S, Han X, Gross RW (2007) Shotgun metabolomics approach for the analysis of negatively charged water-soluble cellular metabolites from mouse heart tissue. Anal Chem 79: 6629–6640
40. Favretto D, Cosmi E, Ragazzi E, Visentin S, Tucci M, Fais P, Cecchetto G, Zanardo V, Viel G, Ferrara SD (2012) Cord blood metabolomic profiling in intrauterine growth restriction. Anal Bioanal Chem 402:1109–1121
41. Lin L, Yu Q, Yan X, Hang W, Zheng J, Xing J, Huang B (2010) A serum metabonomic study of kidney cancer. Analyst 135:2970–2978
42. Watson AD (2006) Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems. J Lipid Res 47:2101–2111
43. Sun G, Yang K, Zhao Z, Guan S, Han X, Gross RW (2007) Shotgun metabolomics approach for the analysis of negatively charged water-soluble cellular metabolites from mouse heart tissue. Anal Chem 79: 6629–6640
44. Jiye A, Trygg J, Gullberg J, Johansson AI, Jonsson P, Antti H, Marklund SL, Moritz T (2005) Extraction and GC/MS Analysis of the Human Blood. Plasma Metabolome. Anal Chem 77:8086–8094
45. Pérez-Enciso M, Tenenhaus M (2003) Prediction of clinical outcome with microarray data: a partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) approach. Human Genetics 112:581–592
46. Reichl FX, Szinicz L, Kreppel H, Forth W (1988) Effect of arsenic on carbohydrate metabolism after single or repeated injection in guinea pigs. Arch Toxicol 62:473–475
47. Reichl FX, Szinicz L, Kreppel H, Fichtl B, Forth W (1990) Effect of glucose in mice after acute experimental poisoning with arsenic trioxide ($As_2O_3$). Arch Toxicol 64:336–338
48. Szinicz W (1988) Effect of $As_2O_3$ on gluconeogenesis. Forth Arch Toxicol 61:444–449
49. Connor SC, Wu W, Sweatman BC, Manini J, Haselden JN, Crowther DJ, Waterfield DJ (2004) Effects of feeding and body weight loss on the 1H-NMR-based urine metabolic profiles of male Wistar Han Rats: Implications for biomarker discovery. Biomarkers 9:156–179
50. Dasgupta T, Hebbel RP, Kaul DK (2006) Protective effect of arginine on oxidative stress in transgenic sickle mouse models. Free Radical Biol Med 41:1771–1780
51. Watanabe S, Togashi S, Takahashi N, Fukui T (2002) L-Tryptophan as an antioxidant in human placenta extract. J Nutr Sci Vitaminol 48: 36–39
52. Jin Y, Zhao F, Zhong Y, Yu X, Sun D, Liao Y, Lv X, Li G, Sun G (2010) Effects of exogenous GSH and methionine on methylation of inorganic arsenic in mice exposed to arsenite through drinking water. Environ Toxicol 25:361–366
53. Stýblo M, Thomas DJ (1995) In vitro inhibition of glutathione reductase by arsenotriglutathione. Biochem Pharmacol 49:971–977
54. Thomas DJ, Styblo M, Lin S (2001) The cellular metabolism and systemic toxicity of arsenic. Toxicol Appl Pharmacol 176:127–144
55. Griffin JL, Mann CJ, Scott J, Shoulders CC, Nicholson JK (2001) Choline containing metabolites during cell transfection: an insight into magnetic resonance spectroscopy detectable changes. FEBS Lett 509:263–266
56. Skipski VP et al (1967) Lipid composition of human serum lipoproteins. Biochem J 104:340–352
57. Koivusalo M, Haimi P, Heikinheimo L, Kostiainen R, Somerharaju P (2001) Quantitative determination of phospholipid compositions by ESI-MS: effects of acyl chain length, unsaturation, and lipid concentration on instrument response. J Lipid Res 42:663–672
58. Bashir S, Harma Y, Irshad M, Gupta SD, Dogra TD (2006) Arsenic-induced cell death in liver and brain of experimental rats. Basic Clin Pharmacol Toxicol 98:38–43
59. Zacarias A, Bolanowski D, Bhatnagar A (2002) Comparative measurements of multicomponent phospholipid mixtures by electrospray mass spectroscopy: relating ion intensity to concentration. Anal Biochem 308:152–159
60. Gürer H, Ozgünes H, Saygin E, Ercal E (2001) Antioxidant Effect of Taurine Against Lead-Induced Oxidative Stress. Arch Environ Cont Toxicol 41:397–402
61. Sinha M, Manna P, Sil PC (2008) Taurine protects antioxidant defense system in the erythrocytes of cadmium treated mice. BMB Reports 41:657–663
62. Griffin JL, Walker LA, Shore RF, Nicholson JK (2001) High-resolution magic angle spinning 1H-NMR spectroscopy studies on the renal biochemistry in the bank vole (Clethrionomys glareolus) and the effects of arsenic (As3+) toxicity. Xenobiotica 31:377–385
63. Griffin JL, Walker LA, Shore RF, Nicholson JK (2001) Metabolic profiling of chronic Cadmium exposure in the rat. Chem Res Toxicol 14:1428–1434
64. Engelmann J, Henke J, Willker W, Kutscher B, Nossner G, Engel J, Leibfritz D (1996) Early stage monitoring of miltefo- sien induced apoptosis in KB cells by mulktinuclear NMR. Anticancer Res 16: 1429–1439
65. World Health Organization (2001) Arsenic and arsenic compounds. WHO, Geneva
66. States JC, Srivastava S, Chen Y, Barchowsky A (2009) Arsenic and Cardiovascular Disease. Toxicol Sci 107:312–323
67. Ardan T, Kovaceva J, Cejková J (2004) Comparative histochemical and immunohistochemical study on xanthine oxidoreductase/xanthine oxidase in mammalian corneal epithelium. Acta Histochem 106:69–75
68. Harrison R (2002) Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? Free Radic Biol Med 33:774–797
69. Glantzounis GK, Tsimoyiannis EC, Kappas AM, Galaris DA (2005) Uric acid and oxidative stress. Curr Pharm Des 11:4145–4151
70. Becker BF (1993) Towards the physiological function of uric acid. Free Radical Biol Med 14:615–631

Journal of Chromatography A, 1282 (2013) 133–141

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma

# Speciation of arsenic in marine food (*Anemonia sulcata*) by liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry and organic mass spectrometry

M. Contreras-Acuña[a,b,c], T. García-Barrera[a,b,c,*], M.A. García-Sevillano[a,b,c], J.L. Gómez-Ariza[a,b,c]

[a] Department of Chemistry and Materials Science, Faculty of Experimental Sciences, University of Huelva, Campus de El Carmen, 21007 Huelva, Spain
[b] Research Center on Health and Environment (CYSMA), University of Huelva, Spain
[c] International Campus of Excellence on Agrofood (ceiA3), University of Huelva, Spain

ARTICLE INFO

*Article history:*
Received 30 October 2012
Received in revised form 15 January 2013
Accepted 16 January 2013
Available online 25 January 2013

*Keywords:*
Arsenic
Speciation
*Anemonia sulcata*
Seafood
Cooking
Mass spectrometry

ABSTRACT

Arsenic species have been investigated in *Anemonia sulcata*, which is frequently consumed food staple in Spain battered in wheat flour and fried with olive oil. Speciation in tissue extracts was carried out by anion/cation exchange chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-(AEC/CEC)–ICP-MS). Three methods for the extraction of arsenic species were investigated (ultrasonic bath, ultrasonic probe and focused microwave) and the optimal one was applied. Arsenic speciation was carried out in raw and cooked anemone and the dominant species are dimethylarsinic acid ($DMA^V$) followed by arsenobetaine (AB), $As^V$, monomethylarsonic acid ($MA^V$), tetramethylarsonium ion (TETRA) and trimethylarsine oxide (TMAO). In addition, arsenocholine (AsC), glyceryl phosphorylarsenocholine (GPAsC) and dimethylarsinothioic acid (DMAS) were identified by liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry (HPLC–MS). These results are interesting since GPAsC has been previously reported in marine organisms after experimental exposure to AsC, but not in natural samples. In addition, this paper reports for the first time the identification of DMAS in marine food.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

The toxicity of inorganic arsenic species is a well-known fact. Some marine organisms can accumulate arsenic from ~2 $\mu g\,L^{-1}$ that is the typical level in seawater [1] to in some instances several hundreds of $\mu g\,g^{-1}$ (dry weight) [2,3]. Arsenic can be found in the environment in form of inorganic species such as arsenate ($As^V$) and arsenite ($As^{III}$) as well as the organic species monomethylarsonic acid ($MA^V$), dimethylarsinic acid ($DMA^V$), arsenobetaine (AB) and trimethylarsine oxide (TMAO) [4]. Arsenate is the major specie present in oxic seawater [5,6], but biotransformations involving several organisms convert this specie to less toxic methylated forms (MA and DMA) via reduction to arsenite, also toxic [7]. Although this biomethylation of inorganic arsenic (iAs) has been considered as a detoxification mechanism during the last decades, methylated trivalent arsenicals are toxic intermediates that convert it into an intoxication process. Methylated trivalent arsenicals are more toxic than the pentavalent ones [8,9] and in this way, $MA^{III}$ and $DMA^{III}$ have recently been considered to play a role as cancer promoters in humans [10,11]. These compounds are further transformed by marine organisms into non-toxic species such as AB and a variety of arsenoribosides [2,12]. On the other hand, the biotransformation of arsenic species in marine organisms is complex, depends on the organism and more than 50 different species have been identified to date [13,14]. In fish and crustaceans, AB is the most abundant arsenic specie along with traces of $MA^V$, $DMA^V$, tetramethylarsonium ion (TETRA) and TMAO [15,16]. However, in marine algae, arsenosugars (derivatives of dimethylarsinoylribosides and trimethylarsonioribosides) are the dominant arsenic species [2,14,17].

For mammals, inorganic forms of arsenic (arsenate ($As^V$) and arsenite ($As^{III}$) are more toxic, while methylated forms ($MA^V$ and $DMA^V$) are considered only moderately toxic [18,19]. Other arsenic species, like TMAO and TETRA are also considered moderately toxic, whereas arsenobetaine (AsB), arsenocholine (AsC) and other arsenosugars (AsS) are considered as innocuous [20]. In humans, once ingested, soluble forms of As are readily absorbed from the gastrointestinal tract to the bloodstream and distributed to organs. Inorganic As can be metabolized by consecutive reduction and oxidative biomethylations after ingestion, then it is converted to methylarsenic ($MA^V$) and dimethylarsenic ($DMA^V$), which contain arsenic in a trivalent or pentavalent oxidation state [21].

* Corresponding author at: Department of Chemistry and Materials Science, Faculty of Experimental Sciences, University of Huelva, Campus de El Carmen, 21007 Huelva, Spain. Tel.: +34 959 219962; fax: +34 959 219942.
*E-mail address:* tamara@dqcm.uhu.es (T. García-Barrera).

0021-9673/$ – see front matter © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.068

Comparatively little is known about the formation of thiol-organoarsenic species as well as their environmental toxicity and potentially harmful effects on human health. Two thiol-organoarsenic species, dimethylarsinothioic acid (DMAS) and dimethyldithioarsinic acid have recently been reported in vegetation, animals, human beings [22–28] and in landfill leachate [29]. The first characterization of a thio-organoarsenate (2-dimethylarsinothioyl acetic acid) isolated from a biological source (sheep's urine) was performed in 2004 [30]. DMAS was first reported in sheep urine, been wrongly identified as dimethylarsinous acid ($DMA^{III}$) [22]. Cytotoxicity testing with HepG2 cells derived from human hepatocarcinoma indicated that DMAS is about 10-fold more cytotoxic than DMA [23]. In addition, cytotoxic intermediates are generated by the interaction of DMAS with glutathione (GSH), while an excessive amount of GSH suppressed the generation of these intermediates [31]. Moreover, DMAS induced cell-cycle arrest, aneuploidy, chromosome structural aberrations, apoptotic mode of cell death, and abnormalities of spindle organization and centrosome integrity [31].

The extraction of arsenic species has been carried out using different procedures, but actually the ultrasonic probe has become the method of choice for speciation analysis in a great number of papers [32–35]. Among the ultrasonic generating instruments, the most commonly used are the ultrasonic bath and the ultrasonic probe. With the probe the transmission of acoustic energy in the medium is direct since the probe is introduced into the sample. The power can be amplified and for this reason the transmitted energy can be 100-fold higher than those obtained with an ultrasonic bath [36]. In spite of the good performance of traditional microwave ovens, the use of focused microwave radiation could be advantageous because of the better safety conditions due to the operation at atmospheric pressure and simultaneous control of different heating programs for each sample independently [37]. Focused microwave assisted extraction at atmospheric pressure has given satisfactory results for the quantitative extraction of PAHs, polychlorobiphenyls and pesticides from environmental matrices [38–41] with advantages of security, easy manipulation and sample preparation automatization. Microwave irradiation is often used instead of conventional heating because the solvent is rapidly heated in a reproducible way. Moreover, the selective interaction with polar molecules allows both local heating and extraction efficiency to be improved [41].

The most successful approaches for arsenic species separation and detection involve the use of liquid chromatography coupled to an element specific detector, such as atomic fluorescence spectroscopy (HPLC-AFS) [42,43] or inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) [4,13,44–46]. Detection of the different arsenic species by using ICP-MS is generally accepted as the most powerful method, although it gives only elemental information. Thus the combination of the element specific detector with organic mass spectrometry, usually with an electrospray ionization source (ESI) is necessary to obtain unequivocal results. To this end, 50 different species have been identified in marine organisms by HPLC with selected reaction monitoring electrospray tandem mass spectrometry [46].

In Spain, *Anemonia sulcata* is frequently consumed battered in wheat flour and fried with olive oil. This anemone, autochthonous of the Iberian Peninsula has a cylindrical form, is approximately 6 cm tall and 3 cm wide and attach themselves to submarine rocks. In this paper, speciation of arsenic has been carried out in raw and cooked *A. sulcata*. For this purpose, rapid and efficient extraction methods based on focused techniques (ultrasonic probe and focused microwave) have been optimized. The speciation of arsenic using anion exchange chromatography (AEC) and cation exchange chromatography (CEC) has been performed by HPLC–ICP-MS and HPLC–MS.

## 2. Experimental

### 2.1. Standard solutions, reagents and samples

All reagents used for sample preparation were of the highest available purity. Sodium arsenite and sodium arsenate, used for preparation of arsenic (III) and arsenic (V) standards, respectively, by dissolution in ultrapure water, and arsenobetaine (AsB) were purchased from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany). Monomethylarsonic acid ($MMA^V$) and dimethylarsinic acid ($DMA^V$) were purchased from Supelco (Bellefonte, USA). Dimethylarsinothioic acid (DMAS) was synthesized and supplied by Dr. Vélez and Dr. Devesa (Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC), Valencia, Spain). Tetramethylarsonium ion (TETRA) and trimethylarsine oxide (TMAO) (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) were donated by Dr. Riansares Muñoz (Universidad Complutense de Madrid).

Individual solutions for HPLC–ICP-MS analyses were prepared at 1 mg $mL^{-1}$ of each compound. Working solutions were prepared daily by appropriate dilution of the stock solutions with water. The stock solutions were stored at 4 °C in darkness.

Ammonium carbonate $(NH_4)_2CO_3$ (Fluka), ammonium hydroxide (Sigma–Aldrich), pyridine purchased from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany), and formic acid (>98%, Fluka, puriss, p.a.) were used to prepare the mobile phases of AEC and CEC.

For total element determination, nitric acid (65 mass%) and hydrogen peroxide (30 mass%) of Suprapur® grade (Merck, Darmstadt, Germany) were used for mineralization of the samples.

Calibration of the mass spectrometer was performed daily using the standards kit from Applied Biosystems (PE Sciex, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A tuning solution containing Li, Y, Tl, Co and Ce (1 μg $L^{-1}$ each) used for the ICP-MS optimization was purchased from Agilent Technologies (USA).

Samples of raw anemones where purchased in a local restaurant of Huelva (Southwest Spain). Cooked anemones were prepared from the whole animal that was battered in wheat flour and fried with olive oil.

The validation of the methodology for total arsenic determination and speciation was carried out with a certified material of dogfish muscle (DORM-2, National Council of Canada).

### 2.2. Total arsenic determination

A microwave accelerated reaction system model MARS (CEM Corporation, Matthews, NC, USA) was used for the mineralization of the samples. First of all, 20 anemones were pooled and freeze-dried. From the lyophilized pool, ~100 mg were digested in a microwave reaction system using 800 μL of a mixture of $HNO_3$:$H_2O_2$ (4:1, v/v). The resulting solution was made up to 10 mL and filtered through iso-disc poly(vinylidene difluoride) filters (25 mm diameter, 0.45 μm pore-size). The total content of arsenic was measured using an Agilent 7500ce ICP-MS spectrometer (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) equipped with an octopole collision cell. The internal standard used for the calibration curves was rhodium (Rh) at 1 μg $L^{-1}$.

The ICP-MS conditions (Table 1) in He mode were optimized using an aqueous solution of 1 μg $mL^{-1}$ of $^{75}As$ with 2 vol.% HCl. The flow-rate of He collision gas was set at 3.9 mL $min^{-1}$ in order to avoid the interference of $^{40}Ar^{35}Cl^+$. The detection limit of the method for total arsenic is 6.5 ng $g^{-1}$. The recovery of total arsenic is 95% ($n = 5$) of the certified value (18.0 ± 1.1 μg $g^{-1}$) in dogfish muscle (DORM-2, National Council of Canada).

A blank with the reagents used for total arsenic determination was run simultaneously to the sample preparation. Acid digestion of wheat flour was carried out using the same procedure previously described for the anemones. The total concentration of arsenic in

**Table 1**
Operating conditions of HPLC-ICP-ORC-MS.

| IEC conditions | | | |
|---|---|---|---|
| Anion-exchange chromatography | Column | Hamilton PRP X-100 (250 mm × 4.6 mm × 5 μm) | |
| | Mobile phase | Ammonium carbonate, 50 mM (pH 8.5) | |
| | Flow-rate | 0.8 mL $min^{-1}$ | |
| | Injection volume | 50 μL | |
| Cation-exchange chromatography | Column | Supelcosil SCX (250 mm × 4.6 mm × 5 μm) | |
| | Mobile phase | Pyridine, 20 mM (pH 2.5) | |
| | Flow-rate | 1.0 mL $min^{-1}$ | |
| | Injection volume | 50 μL | |
| **ICP-MS conditions** | | | |
| Forward power | 1500 W | He flow | 3.9 mL $min^{-1}$ |
| Plasma gas flow-rate | 15.0 L $min^{-1}$ | $Q_{oct}$ | −18 V |
| Auxiliary gas flow-rate | 1.0 L $min^{-1}$ | $Q_p$ | −16 V |
| Carrier gas flow-rate | 0.9 L $min^{-1}$ | Dwell time | 0.3 per isotope |
| Sampling depth | 8 mm | Isotopes monitored | $^{75}As$, $^{103}Rh$ |
| Sampling and skimmer cones | Nickel | – | – |

wheat flour is 16 ± 1.2 ng $g^{-1}$ that represent only about 0.3 and 0.9% of the total arsenic in raw and cooked samples. The total concentration of arsenic in the cooking olive oil was measured using a previously described procedure [47].

### 2.3. Extraction of arsenic species from raw and cooked anemones

For the extraction of arsenic species from anemones, 5 mL of a mixture of methanol/water (1:1, v/v) was added to 0.1000 g of a lyophilized pool of 20 anemones (raw or cooked). Three different methods were used:

(i) *Ultrasonic bath*: An ultrasonic bath model Powersonic 510 (Hwashin Tecnology, Korea) was used. The species were extracted using a previously described method for speciation of arsenic in mussels [45]. The extraction was carried out with a power of 510 W during 30 min at 25 °C.
(ii) *Ultrasonic probe*: An ultrasonic probe model UW 2200 (Bandelin Electronic, Berlin, Germany) was used. The extraction was carried out during 3 min at 550 W.
(iii) *Focused microwave*: The extraction of the arsenic species was also carried out in a focused microwave model Discover equipped with an automatic arm model Explorer (CEM Corporation, Matthews, USA). The sample prepared as above described was introduced in a Pyrex reactor and the extraction was carried out at 50 °C during 5 min with magnetic stirring. The temperature control in the instrument is carried out with a stream of compressed air and the power was set at 150 W.

After each procedure the extract was centrifuged at 10,000 rpm during 10 min using a centrifuge model 5804 R (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Then, the supernatant was filtered using a GF/C glass fiber filter with a diameter of 1.98 cm. The total volume was evaporated until dryness under vacuum at 50 °C in a rotary evaporator. Finally, 1 mL of ultrapure water was added and analyzed. A rotary evaporator (Buchi R-114) was used to reduce the volume of the extracts. All the filters were cleaned with 5 mL of the extracting solution before the use to avoid the contamination of the samples.

### 2.4. Chromatographic separation and detection of arsenic species by ICP-MS: stability of the arsenic species

Elemental detection was performed with an inductively coupled plasma mass spectrometer model Agilent 7500ce (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) equipped with an octopole collision cell and a micromist nebulizer. Chromatographic separations were performed using a Model 1100 HPLC pump as the delivery system (Agilent, Wilmington, DE, USA). The HPLC–ICP-MS conditions are shown in Table 1.

The separation of the arsenic species was performed in a 25 cm × 4.1 mm Hamilton PRP X-100 column (Hamilton, Reno, NV, USA). The mobile phase contained 50.0 mM of $(NH_4)_2CO_3$ at pH = 8.5 (adjusted with 5 N ammonium hydroxide) and was flushed at 0.8 mL $min^{-1}$ through the column [48]. Since AB, TETRA (tetramethylarsonium ion) and TMAO coelute in this column, the separation was carried out using a cation exchange column [49] (Supelcosil LC-SCX, 25 cm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase used was 20 mM pyridine at pH 2.5 as mobile phase at 1 mL $min^{-1}$. A 1100 Series HPLC pump (Agilent, Germany) was used to separate the arsenic species.

One important aspect considered was the As species stability in anemone extracts during storage. A crucial requirement to obtain relative concentration of arsenic species is to maintain the concentration of the original chemical species in the sample extract before the analysis. This is a special requirement for speciation analysis. Feldmann et al. [50] evaluated the stability of arsenic species in freshly collected urine samples and they found that the freshly collected urine samples are stable for at least 2 months when stored at temperatures under either 4 °C or −20 °C. On the other hand, other authors have evaluated the stability of arsenic species in rice extracts during 2 months at different temperatures and solvents [51]. In our study, in order to evaluate how long the extracts could be stored without the risk of any species loss or transformation, an evaluation of stability of different arsenicals in anemones extracts was carried out during 3 months (time required to complete this work). Once the samples were prepared, they were stored at −80 °C in 6 different aliquots of 100 μL for triplicate in an Eppendorf vial. The measurements of $As^V$, $MA^V$, $DMA^V$, AB, AsC, DMAS, TETRA and TMAO were carried out every 15 days by anionic and cationic exchange chromatography (AEC/CEC-ICP-MS). The results obtained in the stability study are presented in Fig. 1S (see electronic supplementary material) in which we can see the concentration of each species in the extract along the experiment. In general, processing or storage by freezing do not change the arsenic species concentration or alter the speciation pattern greatly; however, a significant decrease of AB (4% in 90 days) and AsC (12% in 90 days) concentrations after storage was observed. Decreased levels of AB were found at the end of the experiment and would be related with degradation to $DMA^V$ during storage an increase of 3% in $DMA^V$ concentration was observed after 75 days of storage, similar results have been observed in urine sample after 8 months stored [50]. In addition,

decreased levels of AsC were observed along the experiment time as a result of oxidation to AB. The loss of arsenocholine (AC) in blue mussels following storage (frozen for 3 months) has been reported for other authors [52]. Finally, significant increase in the TETRA concentration (11% in 90 days) was observed, this is probably due to a degradation of AB, as has been recently reported in fish tissue [53].

Supplementary material related to this article found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.068.

### 2.5. Identification of arsenic species by HPLC coupled to mass spectrometry

For the standardless identification of arsenic species, HPLC was coupled to a triple quadrupole instrument model API 2000 (AB/MDS Sciex, Concord, Canada) via an electrospray (ESI) interface using a PEEK tube. The flow-rate was reduced to 300 μL min$^{-1}$ using a post-column split. To enhance sensitivity, 10% (v/v) of formic acid was added to the anion exchange chromatographic mobile phase and the source temperature was maintained at 400 °C. Data were collected in positive ion mode (ES$^+$) and the mass analyzer scanned from $m/z$ 50 to 400. The ionspray voltage (IS) was set at 5500 V and the declustering and focusing potentials (ring potentials) at 30 and 400 V, respectively. The curtain gas and nebulizer gas (high purity nitrogen) were fixed at 15 and 10 units, respectively. The ion energy (IE) was fixed at 0.5 V with a channel electron multiplier (CEM) of 2500 V. In the experiment, the entrance potential (EP) was set at 10 V and collision cell rod offset (RO2) at −20 V. The scan time was equal to 0.5 s. Data were treated with the manufacturer's software (Analyst 4.1).

The collision energy and declustering potential in the product ion mode varied between the experiments and therefore it was optimized as appropriate. Table 2 shows the optimal conditions for tandem mass spectrometry and ion transitions used for Multiple Reaction Monitoring (MRM). In all the experiments, collision cell exit potential (CXP) was set at 2 V and collision gas (CAD) at 5 units.

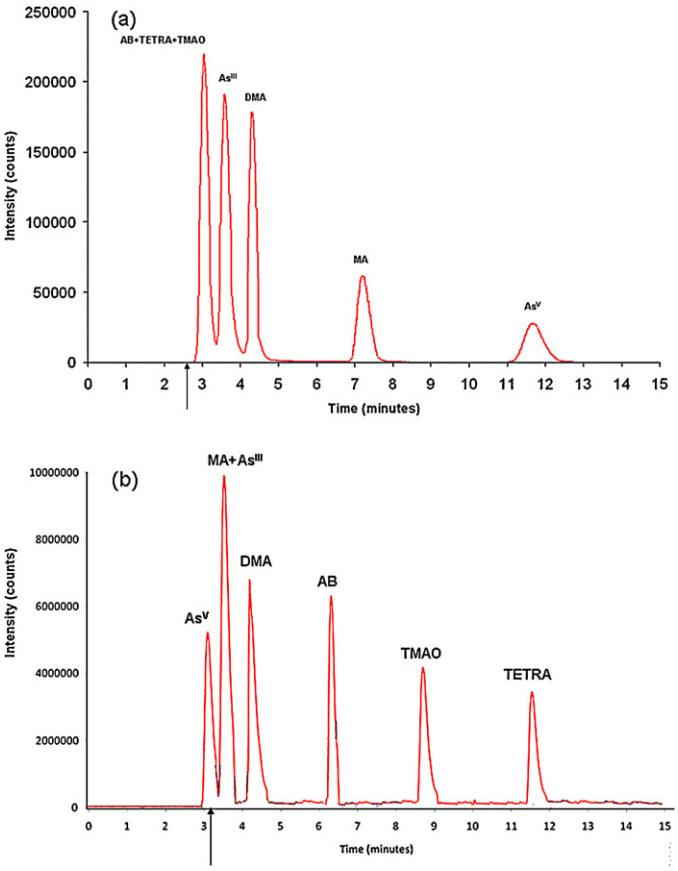



**Fig. 1.** Chromatogram (a): HPLC-(AEC)–ICP-MS chromatogram of the standards at 100 μg L$^{-1}$ of each (as As). Chromatogram (b): HPLC-(CEC)–ICP-MS chromatogram of the standards at 100 μg L$^{-1}$ of each (as As). The black arrow in the abscissa indicates the void volume of the columns. Operating conditions of HPLC–ICP-ORC-MS are summarized in Table 1.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Optimization of the extraction procedure

Three different extraction procedures were compared for the speciation of arsenic in the sea anemone, namely: (i) ultrasonic bath, (ii) ultrasonic probe and (iii) focused microwave. For the extraction of arsenic species by ultrasonic bath a previously validated method was used [48]. The extraction procedures investigated in this work are very simple since only few variables were found to affect the recovery of the analytes. For the extraction with focused techniques the most important variable is the extraction time. This variable was optimized from 3 to 15 min and the optimum corresponds to 3 min for the ultrasonic probe and 5 min for the focused microwave for all the analytes. However, using the ultrasonic bath the time required for an efficient extraction is 30 min. The temperature in the focused microwave enhances the extraction of the analytes, but temperatures higher than 50 °C do not increase extraction yield and taking into account that higher values affect the stability of the arsenic species, 50 °C was selected for further experiments. With the ultrasonic probe the power was optimized, but we did not observe any change in the response of the analytes.

The recovery assays were carried out with ten portions of a pooled sample of 20 anemones fortified with 50 μg g$^{-1}$ ($n$ = 5) of AB, DMA$^V$, MA$^V$, As$^V$, As$^{III}$, TMAO and TETRA. For AB, the recovery is 85% using either ultrasonic probe or the focused microwave. The recovery of AB with the ultrasonic bath is 80%. For the other species the results are very similar and higher than 80% in all the cases using either the ultrasonic probe or the focused microwave. Although the results obtained with focused microwave and ultrasonic probe were very similar, the last one was selected in further experiments since sample preparation is automatized which represents an evident simplification of the analysis. Finally, the extraction method based on the focused microwave was validated using a certified reference material of dogfish muscle. The recovery of AB in the certified reference material is 85% ($n$ = 3) of the certified value (16.4 ± 1.1 μg g$^{-1}$). The concentration of DMA$^V$ and TETRA in this reference material has been previously reported by other authors as 0.27 ± 0.06 and 0.20 ± 0.09 μg g$^{-1}$, respectively [54,55]. With the focused microwave extraction, the recoveries of DMA$^V$ and TETRA are 90% and 95% of the reported value, respectively.

### 3.2. Speciation of arsenic in raw and cooked A. sulcata

The concentration of the species was measured by internal calibration using rhodium as internal standard. The detection and quantification limits (LODs and LOQs, respectively) were calculated with the data generated in the linearity studies. After reshaping the calibration function, LOD and LOQ were calculated as the analyte concentration that corresponds to a signal equal to "$a$ + 3 $Sy/x$" and "$a$ + 10 $Sy/x$", respectively, where "$a$" is the origin ordinate, and "$Sy/x$" represents the random errors in the values for the slope and intercept. The detection limits using HPLC–ICP-MS are 5.9, 4.6, 4.1, 4.1, 5.2, 1.0 and 3.5 ng g$^{-1}$, for AB, DMA, MA, As$^V$, As$^{III}$, TMAO and TETRA, respectively.

**Table 2**
Operating conditions for tandem mass spectrometry.

| Arsenic species | Declustering potential (V) | Collision energy (V) | Ion transitions in MRM mode |
|---|---|---|---|
| AB | 80 | 30 | 179 → 120/179 → 105 |
| AsC | 80 | 30 | 165 → 121/165 → 105 |
| DMAS | 80 | 50 | 155 → 137/155 → 121/155 → 109 |
| GPAsC | 80 | 50 | 317 → 226/317 → 165/317 → 121 |

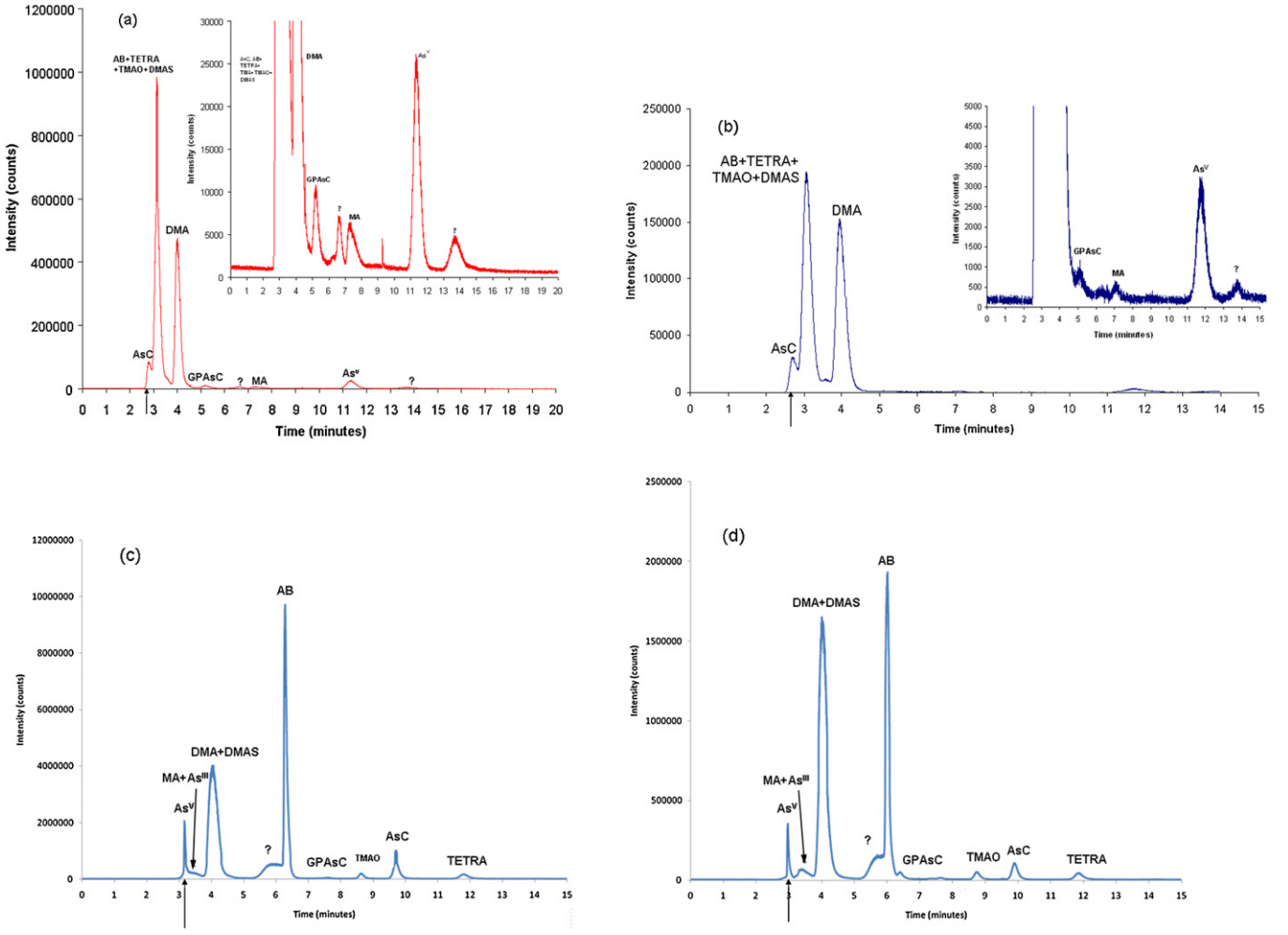



**Fig. 2.** Chromatograms obtained from a pool of anemones raw (a) and cooked (b) using HPLC-(AEC)–ICP-MS and HPLC-(CEC)–ICP-MS (raw, c and cooked, d). The black arrow in the abscissa indicates the void volume of the columns. Operating conditions of HPLC–ICP-ORC-MS are summarized in Table 1. The insets of (a) and (b), represent the same chromatograms magnified.

Fig. 1a and b shows typical chromatograms of a solution containing 100 μg $L^{-1}$ of the standards (as As) obtained by HPLC-(AEC)–ICP-MS and HPLC-(CEC)–ICP-MS, respectively, and Fig. 2, the chromatograms obtained from a raw (Fig. 2a) and cooked sample (Fig. 2b) using the same approach. In these samples, AB, $DMA^V$, $MA^V$ and $As^V$ were clearly identified by retention time matching with the standards using HPLC-(AEC)–ICP-MS and they were later confirmed using HPLC–MS. However, four unidentified peaks were

**Table 3**
Speciation of arsenic in raw and cooked anemones.

Raw anemones (ng $g^{-1}$ as As ± $\sigma$[a])

| AB | DMA | MA | $As^V$ | TETRA | TMAO | AsC | GPAsC | DMAS | Total arsenic | Total arsenic (as sum of the species) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1156 ± 20 | 1541 ± 11 | 79 ± 2 | 295 ± 9 | 160 ± 6 | 48 ± 3 | 302 ± 8 | 105 ± 4 | 983 ± 47 | 4905 ± 52 | 4669 |

Cooked anemones (ng $g^{-1}$ as As ± $\sigma$[a])

| AB | DMA | MA | $As^V$ | TETRA | TMAO | AsC | GPAsC | DMAS | Total arsenic | Total arsenic (as sum of the species) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 504 ± 10 | 897 ± 18 | ND | 90 ± 3 | 36.2 ± 0.4 | 11.2 ± 0.5 | 65 ± 4 | ND | 105 ± 15 | 1758 ± 15 | 1708 |

ND, not detected.
[a] Standard deviation of three extractions of the same sample that was a pool of 20 anemones ($n$ = 10).

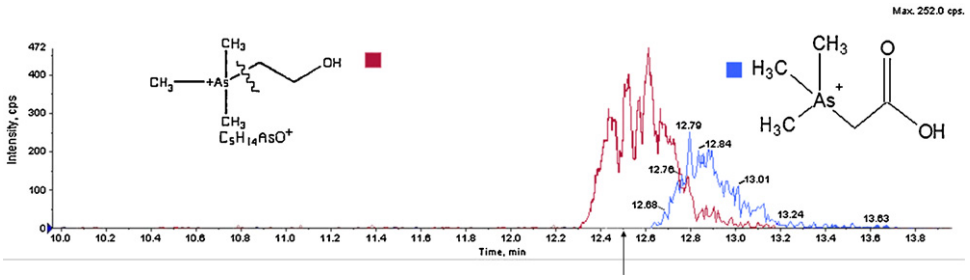



**Fig. 3.** Extracted chromatogram of the MRM transitions of AsC ($m/z$ transition 165 → 105; red chromatogram) and AB ($m/z$ transition 179 → 120; blue chromatogram) obtained from raw anemones. Delay time of 10 min in the injection. Chromatographic conditions used for HPCL-(AEC) are given in Table 1. The black arrow in the abscissa indicates the void volume of the column. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

detected (Fig. 2a). A latter study based on organic mass spectrometry (Section 3.3) allows the identification of them as arsenocholine (AsC, Fig. 2a) and glyceryl phosphorylarsenocholine (GPAsC, Fig. 2a) as well as several arsenic species that coelute with AB (Fig. 2a): dimethylarsinothioic acid (DMAS), TETRA and TMAO. The identification of other two peaks (Fig. 2a) using HPLC–MS was not possible. In Fig. 2, we can also see the chromatograms obtained from a raw (c) and cooked samples (d) using the coupling HPLC-(CEC)–ICP-MS which allows the quantification of AsC that elutes almost in the void volume of the anionic column, and the separation of TETRA (Fig. 2c) and TMAO (Fig. 2c) species that coelute with AB using HPLC-(AEC)–ICP-MS.

The presence of all the arsenic species was confirmed by HPLC–MS (Section 3.3) and the concentrations in raw and cooked

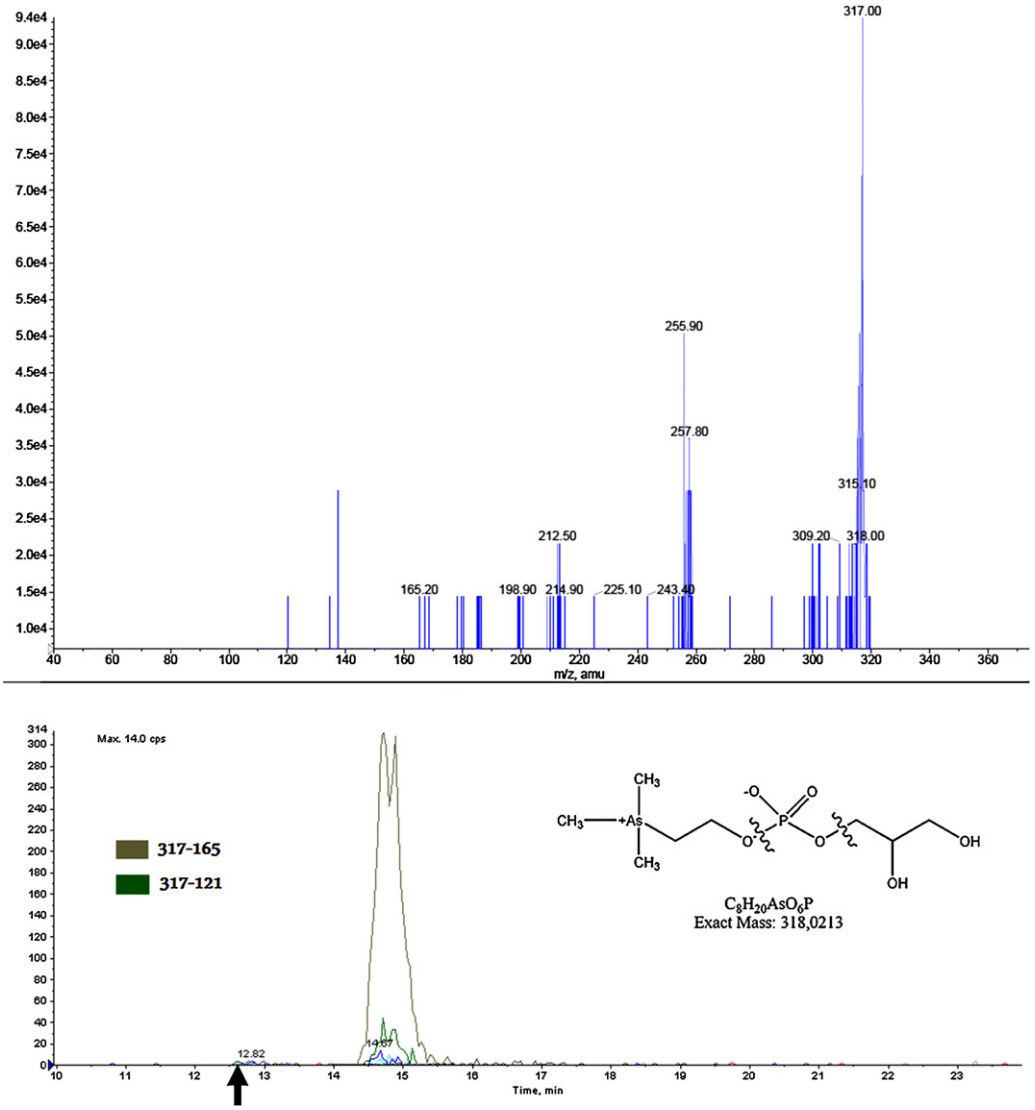



**Fig. 4.** Extracted chromatogram of the MRM transitions for GPAsC ($m/z$ transitions: 317 → 165/317 → 121) obtained from raw anemones and MS/MS spectra of 317 $m/z$. Delay time of 10 min in the injection. Chromatographic conditions used for HPCL-(AEC) are given in Table 1. The black arrow in the abscissa indicates the void volume of the column.

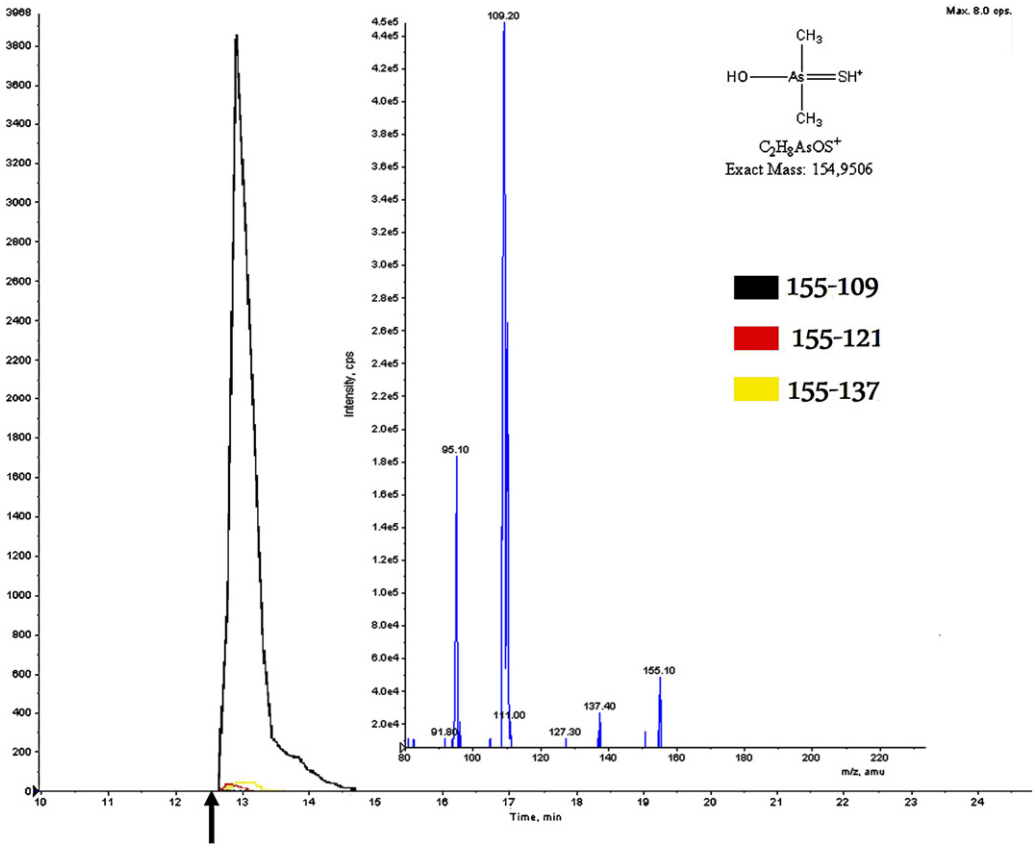



**Fig. 5.** Extracted chromatogram of the MRM transitions for DMAS ($m/z$ transitions: 155 → 137/155 → 121/155 → 109) obtained from raw anemones and MS/MS spectra of $m/z$ 155. Delay time of 10 min in the injection.

samples were measured using HPLC-(AEC)–ICP-MS except for TMAO, AsC and TETRA that were measured by HPLC-(CEC)–ICP-MS and, AB and DMAS by HPLC-(AEC)–MS using multiple reaction monitoring (MRM). Since the standards of AsC, GPAsC and DMAS were not available, they were quantified using the standard calibration curve of DMA. Results obtained are collected in Table 3 where all the concentrations are referred as As. It can be observed that total arsenic concentration, calculated as the sum of the species identified in the samples, accounts for almost total arsenic present in the samples, representing 95% and 97% in raw and cooked samples, respectively. The total concentrations of arsenic in raw and cooked anemones are 4905 and 1758 ng $g^{-1}$, respectively (dry weight). This means that 64% of the total arsenic is lost after cooking that is in good agreement with a previous report about the 60% of total arsenic loss in the seaweed *Hizikia fusiforme* (which has a very high inorganic arsenic content) after treatment with traditional washing and soaking [56]. On the basis of this finding, the total concentration of arsenic in the cooking olive oil was measured and it represents 90% of the total arsenic released from the anemones. Although the decrease of total arsenic in seafood after cooking has been previously reported, the increase of this element is also possible, usually correlated with the weight losses and moisture concentration changes [56].

Although AB has been reported as the major species in most marine organisms, DMA is the dominant one in *A. sulcata* representing about 31% of the total arsenic in raw and 51% after cooking. The presence of AB is also important and accounts for 24% (raw) and 29% (cooked) of total arsenic, followed by DMAS (20% in raw and 6% in cooked), AsC (6% in raw and 4% in cooked), $As^V$ (6% in raw and 5% in cooked), TETRA (3% in raw and 2% in cooked), GPAsC (2% in raw and below the detection limit in cooked), MA (1.6% in raw and under detection limit in cooked) and TMAO (1% in raw and 0.6% in cooked). As previously reported for seafood [44,57], the percentage of inorganic arsenic (6% in raw and 5% in cooked) does not exceed 10% of the total arsenic. On the other hand, the concentration of all the species in cooked anemones decreases significantly against those present in raw anemones (Table 3). In this sense, in cooked anemones the concentration of AB and DMA is about 2-fold lower, MA and GPAsC are not present, and concentrations of $As^V$, TETRA, TMAO, AsC and DMAS are much lower, especially the last. However, the relative concentrations of the species (%) against the total concentration of As in raw and cooked anemones are almost the same for all the species, except for DMA and DMAS which represent an opposite trend, increasing the concentration of DMA with cooking and decreasing DMAS. These results represent a positive outcome for consumers since cytotoxicity test involving HepG2 cells derived from human hepatocarcinoma indicated that DMAS is about 10-fold more cytotoxic than DMA [23].

It has been reported an increase of inorganic arsenic, DMA and TETRA (tetramethylarsonium ion) in some types of seafood when they are baked, fried or grilled and the surface of the product may reach high temperatures [58]. It has also been checked that TETRA is formed by decarboxylation and methylation of AB [58]. However, our results show that concentrations of TETRA, TMAO and inorganic arsenic decrease after cooking the anemones.

Speciation of arsenic has been previously carried out in nine different types of anemones in an environmental study published elsewhere [59] but not in *A. sulcata*. The total concentration of arsenic in these anemones ranged from 1600 to 7000 ng $g^{-1}$ that is 4-fold lower than that in *A. sulcata* (Table 3, raw anemones: 4905 ng $g^{-1}$) and some arsenic species are different. Thus usual arsenic species in anemones are AB, trimethylarsoniopropionate

(TMAP), AsC and TETRA while arsenate, MA, DMA and TMAO are absent in all the samples [59]. As commented before, in *A. sulcata* DMA is the dominant specie and, MA and TMAO are also present.

### 3.3. Identification of arsenic compounds in A. sulcata by HPLC–MS

Two of the four arsenic compounds that do not match with any standard in HPLC-(AEC)–ICP-MS (Fig. 2a) of extracts from *A. sulcata* were identified by HPLC-(AEC)–MS as AsC [60] and glyceryl phosphorylarsenocholine (GPAsC). The retention times were 2.7 min for AsC (almost in the void volume, Fig. 3) and 5.1 min for GPAsC (Fig. 4). It has been reported that mussels exposed to AsC had AB as the major arsenic compound in their tissues and GPAsC as a minor [61], which is in good agreement with the concentrations measured in unexposed anemones (Table 3). GPAsC and phosphatidylarsenocholine have also been identified in yelloweye mullet (*Aldrichetta forsteri*) after oral administration of AsC [62]. In *A. sulcata*, the MS/MS of the molecular ion of GPAsC at $m/z$ 317 (Fig. 4) gives the $m/z$ 165 ion, indicating the possible presence of arsenocholine $[(CH_3)_3As(CH_2)_2OH]^+$. The $m/z$ 121 is also consistent with this hypothesis as it can be assigned to $[(CH_3)_3AsH^+]$. The peak with $m/z$ 225 can be assigned to the arsenocholine ion with a phosphate group that looses a molecule of $H_2O$. Finally, the $m/z$ 317 can be assigned to the deprotonated GPAsC.

In addition, using organic mass spectrometry, dimethylarsinothioic acid (DMAS) (Fig. 5) was identified at the same retention time of AB. The other two arsenicals detected by HPLC-(AEC)–ICP-MS (Fig. 2a) and that detected by HPLC-(CEC)–ICP-MS (Fig. 2c), were not identified because of their low concentrations in the samples. The presence of DMAS has been previously reported in vegetation, animals, human beings [22–26] and in landfill leachate [29]. The compound identified as DMAS (Fig. 5) corresponds to the molecular ion $m/z$ 155 $[(CH_3)_2As(=S)(OH)+H^+]$ and the fragmentation pattern is the same than that previously described for this specie [29]. The daughter ion at $m/z$ 137 corresponds to $[M+H^+]–H_2O$ to give $[(CH_3)_2AsS]^+$ and the fragment at $m/z$ 109 is a daughter ion of $[M+H^+]–H_2O$ with a loss of two methyl groups.

## 4. Conclusions

The present paper reports for the first time the speciation of arsenic in *A. sulcata* that is consumed and highly appreciated in the south of Spain. The combination of anion/cation exchange chromatography coupled to ICP-MS with organic mass spectrometry allowed the standardless identification of arsenocholine (AsC), glyceryl phosphorylarsenocholine (GPAsC) and dimethylarsinothioic acid (DMAS), a thiol-organoarsenic specie. GPAsC has been reported for the first time in a natural sample (not exposed to AsC) while DMAS has been reported for the first time in seafood. In raw samples of *A. sulcata* the dominant species are: DMA > AB > DMAS > AsC > $As^V$ > TETRA > GPAsC > MA > TMAO, in raw anemones. After cooking the anemones, battered in wheat flour and fried with olive oil, 64% of the total arsenic is lost, about 90% is released to the cooking olive oil and the order of predominant arsenic species is the same, but GPAsC and MA are absent. Three simple and rapid extraction methods that allow very good recoveries have been optimized and validated. The focused microwave used in this paper has several advantages including safety, easy of operation and automatization of sample preparation. The ICP-MS constitutes a powerful technique for the speciation of arsenic since it provides very low detection limits. In addition, the use of the collision cell eliminates suitably the interferences on the arsenic signal some of them caused by the complex matrix that has been analyzed. However, this technique should be combined with organic mass spectrometry since in real samples the presence of unidentified arsenicals is very common.

## Acknowledgments

The authors thank the Spanish "Ministerio de Educación y Ciencia (MEC)" project CTM2009-12858-C02-01 and the projects P08-FQM-03554 and P09-FQM-4659 from the Consejería de Innovación Ciencia y Empresa (Junta de Andalucía) for funding. The authors also thank Dr. Vicenta Devesa and Dinoraz Vélez (Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC), Valencia, Spain) and Dr. Riansares Muñoz (Universidad Complutense de Madrid) for the kind donation of TMAO, TETRA and DMAS. M.A. García Sevillano thanks the Ministerio de Educación for a PhD scholarship.

## References

[1] K.A. Francesconi, J.S. Edmonds, Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev. 31 (1993) 111.
[2] K.A. Francesconi, J.S. Edmonds, in: J.O. Nriagu (Ed.), Arsenic in the Environment. Part 1. Cycling and Characterization, J. Wiley and Sons, Inc., New York, USA, 1994, p. 430.
[3] Y. Shibata, M. Morita, in: J.W. Kiceniuk, S. Ray (Eds.), Analysis of contaminants in edible aquatic sources, VCH, New York, USA, 1994.
[4] Y. Li, G.K.-C Low, J.A. Scoot, R. Amal, Chemosphere 79 (2010) 794.
[5] L.G. Sillen, in: M. Sears (Ed.), Oceanography, American Association for the Advancement of Science, Washington, DC, USA, 1961, p. 549.
[6] IMO:FAO:UNESCO:WMO:WHO:IAEA:UN:UNEP, Review of Potentially Harmful Substances-Arsenic, Mercury and Selenium, Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution (GESAMP), Reports and Studies No. 28, World Health Organization, USA, 1986.
[7] J.M. Neff, Environ. Toxicol. Chem. 2 (1988) 191.
[8] J.S. Petrick, B. Jagadish, E.A. Mash, E.A.H.V. Aposhian, Chem. Res. Toxicol. 14 (2001) 651.
[9] D.H. Thomas, J. Li, S.B. Waters, W. Xing, B.M. Adair, Z. Drobna, V. Devesa, M. Styblo, Exp. Biol. Med. 232 (2007) 3.
[10] S.M. Wnek, T.J. Jensen, P.L. Severson, B.W. Futscher, A.J. Gandolfi, Toxicol. Sci. 116 (2010) 44.
[11] H. Naranmandura, Y. Ogra, K. Iwata, J. Lee, K.T. Suzuki, M. Weinfeld, X.C. Le, Toxicol. Appl. Pharmacol. 238 (2009) 133.
[12] J.L. Gómez-Ariza, D. Sánchez-Rodas, I. Giráldez, E. Morales, Talanta 51 (2000) 257.
[13] S. Hirata, H. Toshimitsu, M. Aihara, Anal. Sci. 22 (2006) 39.
[14] E.H. Larsen, G. Pritzl, S.H. Hansen, J. Anal. At. Spectrom. 8 (1998) 1075.
[15] S. Hirata, K. Honda, O. Shikino, N. Maekawa, M. Aihara, Spectrochim. Acta B 55 (2000) 1089.
[16] T. Kajiya, M. Ahiara, S. Hirata, Spectrochim. Acta B 59 (2004) 543.
[17] S. Hirata, Y. Ishida, M. Ahiara, K. Honda, O. Shikito, Anal. Chim. Acta 483 (2001) 205.
[18] A.E. Geiszinger, W. Goessler, K.A. Francesconi, Mar. Environ. Res. 53 (2002) 37.
[19] D. Fattorini, F. Regoli, Environ. Toxicol. Chem. 23 (2004) 1881.
[20] D. Fattorini, A. Notti, A.F. Regoli, Chem. Ecol. 22 (2006) 405.
[21] D.J. Thomas, S.B. Waters, M. Styblo, Toxicol. Appl. Pharmacol. 198 (2004) 319.
[22] H.R. Hansen, A. Raab, M. Jaspars, B.F. Milne, J. Feldmann, Chem. Res. Toxicol. 17 (2004) 1086.
[23] R. Raml, A. Rumpler, W. Goessler, M. Vahter, L. Li, T. Ochi, K.A. Francesconi, Toxicol. Appl. Pharmacol. 222 (2007) 374.
[24] K.T. Suzuki, K. Iwata, H. Naranmadura, N. Suzuki, Toxicol. Appl. Pharmacol. 208 (2007) 166.
[25] H. Naranmadura, K. Suzuki, Toxicol. Appl. Pharmacol. 227 (2008) 390.
[26] S.K.V. Yathavakilla, M. Fricke, P.A. Creed, D.T. Heitkemper, N.V. Shockey, C. Schwegel, J.A. Caruso, J.A. Creed, Anal. Chem. 80 (2008) 775.
[27] K.M. Kubachka, M.C. Kohan, S.D. Conklin, K. Herbin-Davis, J.T. Creed, D.J. Thomas, J. Anal. At. Spectrom. 24 (2009) 1062.
[28] R. Raml, W. Goessler, K.A. Francesconi, J. Chromatogr. A 1128 (2006) 164.
[29] Y. Li, G.K.C. Low, J.A. Scott, R. Amal, J. Hazard. Mater. 188 (2011) 140.
[30] H. Rusz Hansen, R. Pickford, J. Thomas-Oates, M. Jaspars, J. Feldmann, Angew. Chem. Int. Ed. 43 (2004) 337.
[31] T. Ochi, K. Kita, T. Suzuki, A. Rumpler, W. Goessler, K.A. Francesconi, Toxicol. Appl. Pharmacol. 228 (2008) 59.
[32] E. Sanz, R. Muñoz-Olivas, C. Camara, J. Chromatogr. A 1097 (2005) 1.
[33] E. Sanz, R. Muñoz-Olivas, C. Dietz, J. Sanz, C. Camara, J. Anal. At. Spectrom. 22 (2007) 131.
[34] S.G. Salgado, M.A. Quijano-Nieto, M.M. Bonilla-Simón, Talanta 68 (2006) 1522.
[35] A. Huerga, I. Lavilla, C. Bendich, Anal. Chim. Acta 534 (2005) 121.
[36] A.I. Cabañero, Y. Madrid, C. Cámara, Anal. Bioanal. Chem. 381 (2005) 373.
[37] M.F. Mesko, J.S.F. Pereira, D.P. Moraes, J.S. Barin, P.A. Mello, J. Neri, G. Paniz, J.A. Nóbrega, M.G.A. Korn, E.M.M. Flores, Anal. Chem. 82 (2010) 2155.
[38] H. Budzinski, A. Papineau, P. Baumard, P. Garringes, C.R. Acad. Sci. 321 (1995) 69.

[39] H. Budzinski, A. Papineau, P. Baumard, P. Garringes, S. Wise, J. Pure Appl. Chem. 9 (1996) 225.
[40] H. Budzinski, M. Letellier, K. Le Menach, P. Garringes, J. Chromatogr. A 837 (1999) 187.
[41] M. Letellier, H. Budzinski, J. Bellocq, J. Connan, Org. Geochem. 30 (1999) 1353.
[42] D. Sánchez-Rodas, J.L. Gómez-Ariza, F. Lorenzo, T. García-Barrera, J. Chromatogr. 139 (2004) 1056.
[43] J.L. Gómez-Ariza, F. Lorenzo, T. García-Barrera, Anal. Bioanal. Chem. 282 (2005) 485.
[44] S. McSheehy, P. Pohl, R. Lobinski, J. Szpunar, Anal. Chim. Acta 440 (2001) 3.
[45] K.A. Francesconi, J. Gailer, J.S. Edmonds, W. Goessler, K.J. Irgolic, Comp. Biochem. Physiol. 122 (1999) 131.
[46] V. Nischwitz, S. Pergantis, J. Anal. At. Spectrom. 21 (2006) 1277.
[47] C. Benincasa, J. Lewis, E. Perri, G. Sindona, A. Tagarelli, Anal. Chim. Acta 585 (2007) 366.
[48] J.A. Brisbin, C. B'Hymer, J.A. Caruso, Talanta 58 (2002) 133.
[49] A. Chatterjee, Talanta 51 (2000) 303.
[50] J. Feldmann, V.W.-M. Lai, W.R. Cullen, M. Ma, X. Lu, X.C. Le, Clin. Chem. 45 (1999) 1988.
[51] I. Pizarro, M. Gómez, M.A. Palacios, C. Cámara, Anal. Bioanal. Chem. 376 (2003) 102.
[52] L. Dahl, M. Molin, H. Amlund, H. Margrete Meltzer, K. Julshamn, J. Alexander, J.J. Sloth, Food Chem. 123 (2010) 720.
[53] I. Pizarro, M. Gómez, C. Cámara, M.A. Palacios, Anal. Chim. Acta 495 (2003) 85.
[54] G. Williams, J.M. West, I. Koch, K.J. Reimer, E.T. Snow, Sci. Total Environ. 407 (2009) 2650.
[55] J. Kirby, W. Maher, J. Anal. At. Spectrom. 17 (2002) 838.
[56] V. Devesa, D. Velez, R. Montoro, Food Chem. Toxicol. 46 (2008) 1.
[57] O. Muñoz, V. Devesa, M.A. Súñer, D. Vélez, R. Montoro, I. Urieta, M.L. Macho, M. Jalón, J. Agric. Food Chem. 48 (2000) 4369–4376.
[58] V. Devesa, A. Martínez, M.A. Súñer, V. Benito, D. Vélez, R. Montoro, J. Agric. Food Chem. 49 (2001) 2267.
[59] T.D. Ninh, Y. Nagashima, K. Shiomi, Chemosphere 70 (2008) 1168.
[60] V. Nischwitz, S. Pergantis, Environ. Chem. 4 (2003) 187.
[61] J. Gailer, K.A. Francesconi, J.S. Edmonds, K.J. Irgolic, Appl. Organomet. Chem. 9 (1995) 341.
[62] K.A. Francesconi, R.V. Stick, J.S. Edmonds, Cell. Mol. Life Sci. 46 (1990) 464.

*Send Orders of Reprints at reprints@benthamscience.net*

*Current Analytical Chemistry,* **2013,** *9,* **229-243**



# Use of Metallomics in Environmental Pollution Assessment Using Mice *Mus musculus/Mus spretus* as Bioindicators

M. González-Fernandez[a,b,c], M. Angel García-Sevillano[a,b,c], R. Jara-Biedma[a,b,c], F. Navarro-Roldán[c,d], T. García-Barrera[*,a,b,c], Juan López-Barea[e], C. Pueyo[e] and J.L. Gomez-Ariza[*,a,b,c]

[a]*Department of Chemistry and CC.MM. Fac. of Experimental Sciences. University of Huelva. Campus de El Carmen.21007 Huelva. Spain*

[b]*Campus of Excellence International CEIA3. University of Huelva. Spain*

[c]*Research Center of Health and Environment (CYSMA). University of Huelva. Campus de El Carmen. 21007 Huelva. Spain*

[d]*Department of Environmental Biology and Public Health, University of Huelva, Campus de El Carmen. 21071 Huelva. Spain*

[e]*Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Campus de Rabanales. Ed. Severo Ochoa, 1407, Córdoba. Spain*

**Abstract:** A metallomic analytical approach based on the use of size exclusion chromatography (Superdex-75 and Superdex$^{TM}$-Peptide) coupled to ICP-MS has been used to obtain metal profiles related to metallobiomolecules overexpression or inhibition in mice caused by contamination. The method is complemented with a second chromatographic dimension (anion and cation exchange chromatography) for species purification and isolation, and in some cases metal-species identification by mass spectrometry. The biological response of free-living mice *Mus spretus* (liver, kidney and brain) from contaminated and non-contaminated areas of areas of Doñana National Park (southwest Spain) and the surroundings were found to be affected by differential contamination. The results reveal the presence of high concentration of Fe, Cu and Zn in liver and As and Cd in kidney in contaminated areas. Upregulation of peaks traced by Cu, Zn and Cd at 7 kDa (matching with metallothionein I standard) in liver cytosolic extract is triggered by the presence of contaminants. Other Cu and Zn-peaks located at 32 kDa are also overexpressed by pollution and can be related to upregulation of superoxide dismutase. In kidney the presence of Cu, Zn and Cd-binding peaks located at 7 kDa from sites affected by contamination can also be observed. Finally, the abundance of low molecular mass As species in kidney due to the excretion of this element as methyl and dimethylarsenic is remarkable. In addition, the laboratory mice *Mus musculus* was used as control due to already sequenced and genetically homologous to *Mus spretus*. For this reason, biological response of *Mus musculus* to metal contamination was checked by exposure experiments to Cd and As and results were compared with those obtained from *Mus spretus* from contaminated areas.

**Keywords:** Metallomics, SEC-ICP-MS, Mus spretus, Mus musculus, environmental metallomics, biological response, contamination.

## INTRODUCTION

Monitoring of environmental issues is conventionally performed by chemical analysis of trace toxic elements (e.g. Cd, As, Pb, Hg, etc), organic contaminants (pesticides, PCBs, PAHs), emerging contaminants (endocrine disruptors, pharmaceuticals, health care products and detergents) and, recently, nanoparticles. However, it is well known that harmful effects of pollution episodes are better assessed by the biological response of living organisms (bioindicators), which are carefully selected for this purpose because they reflect the effect of contaminants on cellular metabolism and global homeostasis. Therefore, changes at molecular level under environmental stress (biomarkers) have been used for the evaluation of contamination and its consequences. Numerous conventional biomarkers can be cited, such as cytochromes P450 (CYPs) and glutathione-S-transferases (GSTs), related to the presence of organic pollutants, as well as metallothioneins (MTs) in the protection against toxic metals. Upregulation of enzymes related with oxidative stress such as superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidases (GPX) and peroxiredoxins (PRX) can also be used for this purpose. However, these biomarkers require a deep knowledge of their toxicity mechanisms and they assess a limited number of well-known metabolites excluding others which are also altered by contamination but whose relationship with pollution is still unknown. For these reasons, omic techniques (proteomics and metallomics) are becoming the recent alternatives in environmental studies [1].

Metallomics technique [2,3] considers that metal-binding biomolecules represent a substantial part of molecules in-

*Address correspondence to these authors at the Department of Chemistry and CC.MM. Fac. of Experimental Sciences. University of Huelva. Campus de El Carmen.21007 Huelva. Spain; Tel: +34959219968; Fax: +34959219942; E-mails: ariza@uhu.es; tamara@dqcm.uhu.es

**1875-6727/13 $58.00+.00** **© 2013 Bentham Science Publishers**

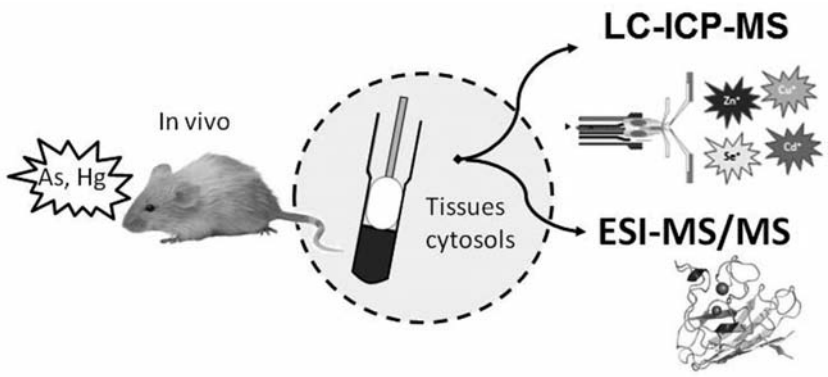



**Fig. (1).** Experimental platform used in metallomics

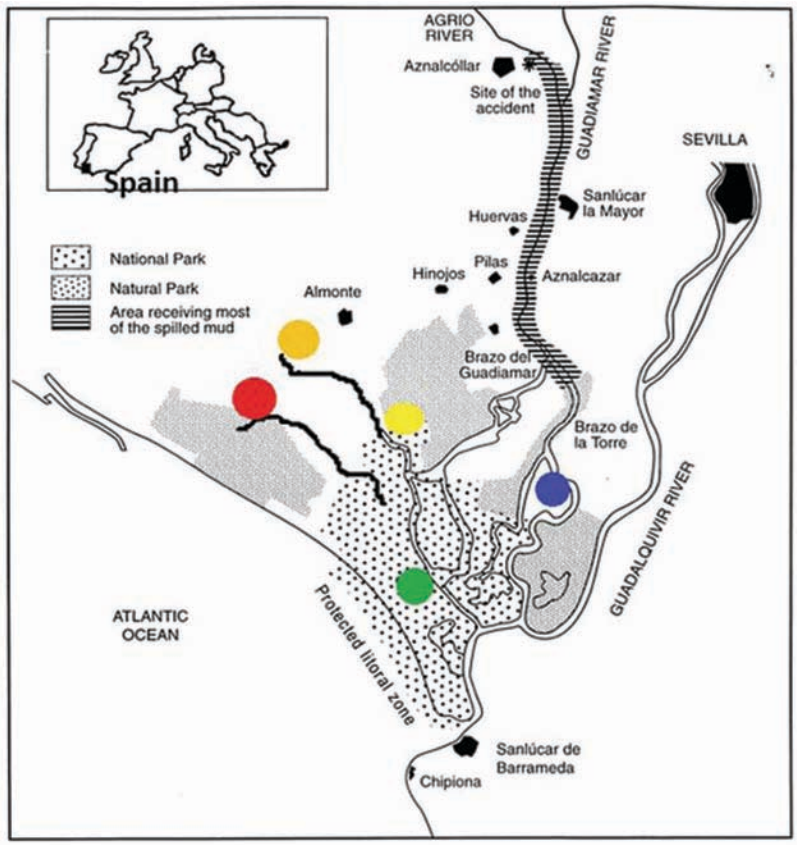



**Fig. (2).** Sampling area in Doñana National Park and surrounding (SW Spain): red spot, "La Rocina stream", contaminated site; blue spot, "El Matochal", high contamination point; golden spot, medium contaminated area; yellow spot, site with low presence of contaminant; green spot, control point at the center of the Park.

volved in cell metabolism, and the presence of a metal cofactor in a protein can help to trace the changes in metalloproteins and metallometabolites overexpression or inhibition in living organisms, triggered by contamination [3-10]. This is usually a non-targeted analysis in which lack of standards associated to signals traced by instrumental couplings (mainly LC-ICP-MS) make their identification difficult. Therefore, metallomic approaches also include, generally, molecule identification techniques, such as tandem mass spectrometry, in a three-dimensional experimental platform [4] (Fig. **1**).

The selection of living-organisms suitable for environmental metallomic studies is another important issue, since metalloproteins identification by mass spectrometry requires the use of sequenced organisms to avoid cumbersome *de novo* sequencing, which has limited applicability to the vast number of proteins involved in these studies. However, model-organisms used in environmental monitoring are usually non-sequenced. For this reason the couple of mice *Mus musculus*/*Mus spretus* has been chosen for this purpose in the present study, considering the following points: (a) The study has been centred in the Doñana National Park and surrounding areas (SW Spain, Fig. **2**) where the Algerian mouse (*Mus spretus*) attains high population densities and can be used as bioindicator of contamination; (b) the model laboratory mouse *Mus musculus* has been already sequenced [11];

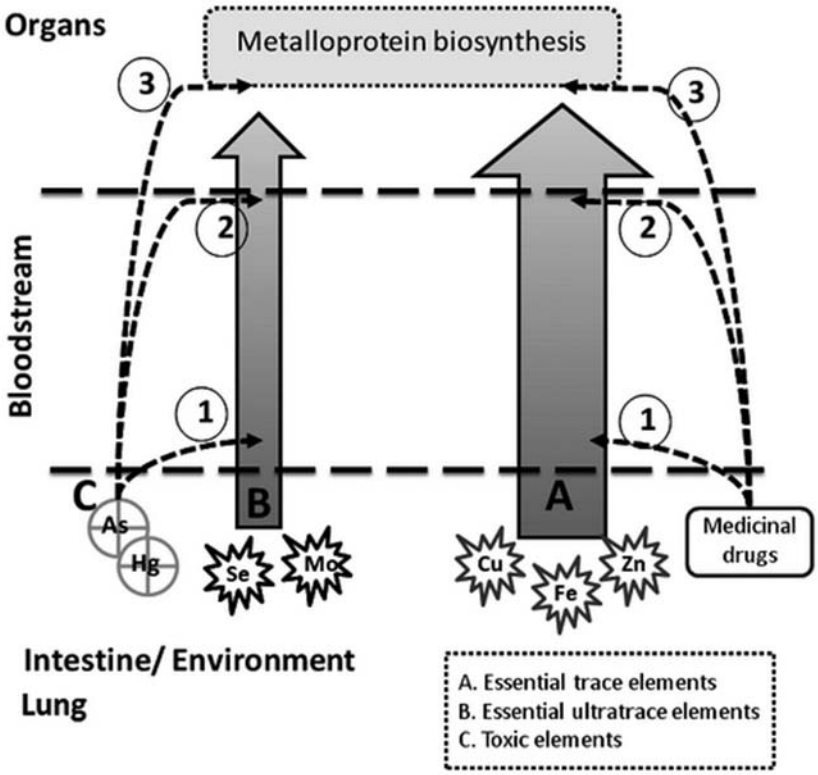



**Fig. (3).** Conceptual depiction about interaction of contaminants and metalloprotein synthesis in mammals.

and (c) it has been demonstrated experimentally that the genetic homology between *M. musculus* and *M. spretus* [12,13] allows the use of database from *M. musculus* to identify the proteins expressed by *M. spretus*.

Another important issue is that pollutants monitoring based on mice and other mammals allows to visualize the action of contaminants on essential elements or metallobiomolecules trafficking through well-known biological "selectivity filters" [14] represented by: (i) external interactive tubular structures, such as lung bronchial tubes, gastrointestinal tract or whatever, or superficial organs such as the skin; (ii) transport fluids such as blood and lymph; (iii) cellular membranes in the organs; and (iv) cytosol and subcellular organelles, in which many proteins and metabolites are involved [15]. Therefore, the contaminants can harmfully affect the aforementioned processes (Fig. **3**) which can be visualized in exposure experiments and latterly related with changes in protein or metabolite expression in free-living bioindicators [16].

In the present work we considered the use of mouse *Mus spretus* to assess its biological response against contaminants in the relevant ecological area of Doñana National Park and surroundings (southwest Spain) in which many migrating birds land for breeding and feeding. For this purpose, a metallomics approach based on size characterization of metal biomolecules by SEC-ICP-MS has been used, complemented by a second dimension chromatography for species purification and isolation. In addition, exposure experiments to Cd, Hg and As were performed with model mice *Mus musculus* and changes in biomolecules expression traced by the metallomic method proposed a comparision with those in free-living mice.

## EXPERIMENTAL

### Standard Solutions and Reagents

All reagents used for sample preparation were of the highest available purity. Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) and tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP) (BioUltra grade, >98%) were obtained from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). Helium and hydrogen, used as collision and reaction gases, respectively, in a LC-ICP-ORC-MS system, were of high-purity grade (>99.999%).

Standards used for mass calibration of analytical SEC columns (mass range 70-3 kDa) were: ferritin (440 kDa) (purity 95%), bovine serum albumin (67 kDa) (purity 96%), superoxide dismutase containing Cu and Zn (32 kDa) (purity > 70%), metallothionein I containing Cd, Cu and Zn (7 kDa) (purity > 95%) and arsenobetaine (179 Da) (purity > 98%). All these reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). The mobile phase solution used in SEC was 20 mM of ammonium acetate (Suprapure grade) purchased from Merck (Darmstadt, Germany), which was prepared daily with ultrapure water (18 MΩcm) from a Milli-Q system (Millipore, Watford, UK) and the pH adjusted to 7.4 with ammonia solution, this later prepared by dilution of 20% (w/v) ammonia solution (Suprapur, Merck) with ultrapure water. The void volume was determined using ferritin (440 kDa).

In the case of SEC columns for low molecular mass species (10-0.1 kDa) mass calibrants were the following: bovine serum albumin (67kDa) (purity 96%), metallothionein I containing Cd, Cu and Zn (7 kDa) (purity > 95%), Vitamin $B_{12}$ (1.35 kDa) (purity > 96%), reduced glutathione (307 Da) (purity 98–100%) and arsenobetaine (179 Da). All these rea-

**Table 1. Operating Conditions for ICP-MS, SEC and IEC.**

| *SEC conditions* | |
|---|---|
| Column | Superdex™-75 (10 X 300 X 13μm) |
| Resolution range | 3-70 kDa |
| Mobile phase | Ammonium acetate 20 mmol $L^{-1}$ (pH 7.4) |
| Flow rate | 0.7 mL $min^{-1}$ |
| Injection volumen | 20 μL |
| UV. Visible wavelength | 254 nm |
| Column | Superdex™-Peptide (300 x 10mm x13μm) |
| Resolution range | <10 kDa |
| Mobile phase | Ammonium acetate 20 mmol $L^{-1}$ (pH 7.4) |
| Flow rate | 0.7 mL $min^{-1}$ |
| Injection volumen | 50 μL |
| UV. Visible wavelength | 254 nm |
| Column | Hiload 26/60 Superdex 30 Prep (600 x 26mm x 34μm ) |
| Resolution range | < 10kDa |
| Mobile phase | Ammonium acetate 20 mmol $L^{-1}$ (pH 7.4) |
| Flow rate | 2 mL $min^{-1}$ |
| Injection volume | 500 μL |
| UV. Visible wavelength | 254 nm |
| *IEC conditions* | |
| Column | Hamilton PRP X-100 (250 x 4.6 mm x 5$\mu$m) |
| Mobile phase | Sodium dihydrogen phosphate 30 mM (pH 6) |
| Flow rate | 1 mL $min^{-1}$ |
| Injection volumen | 20 μL |
| *ICP-MS conditions* | |
| Forward power | 1500 W |
| Plasma gas flow rate | 15.0 L $min^{-1}$ |
| Auxiliary gas flow rate | 1.0 L $min^{-1}$ |
| Carrier gas flow rate | 0.9 L $min^{-1}$ |
| Sampling depth | 8 mm |
| Sampling and skimmer cones | Ni |
| He flow | 3.9 mL $min^{-1}$ |
| $H_{2\ flow}$ | 3.5 mL $min^{-1}$ |
| $Q_{oct}$ | -18 V |
| $Q_p$ | -16 V |
| Dwell time | 0.3 per isotope |
| Isotopes monitored | Using helium as collision gas: $^{53}Cr$, $^{55}Mn$, $^{63}Cu$, $^{65}Cu$, $^{64}Zn$, $^{66}Zn$, $^{75}As$, $^{57}Fe$, $^{103}Rh$, $^{114}Cd$. |
| | Using hydrogen as reaction gas: $^{56}Fe$, $^{80}Se$. |

gents were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Standard stock solutions at a concentration of 10 mg $mL^{-1}$ were prepared by dissolving the respective compound in ultrapure water. Arsenic (III) and arsenic (V) standards were prepared from sodium arsenate and sodium arsenite (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) in water. Arsenite ($iAs^{III}$), arsenate ($iAs^{V}$), methylarsonic acid (MMA), dimethylarsinic acid (DMA), tetramethylarsonium ion (TMA), trimethylarsineoxide (TMAO) and arsenobetaine (AsB) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). The mobile phase solution used in SEC was 20 mM of ammonium acetate as described previously, however, for anion exchange chromatography a 30 mM of sodium dihydrogen phosphate was used, which was purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) and the pH adjusted at 6.0 by addition of 20% $NH_3$ (w/v) aqueous solution.

## Apparatus

A cryogenic homogenizer SPEX SamplePrep (Freezer/Mills 6770) was used to prepare the homogenates. Homogenized tissues were subsequently disrupted with a glass/teflon homogenizer. The extraction was followed by ultracentrifugation with an ultracentrifuge Beckman model L9-90 K (rotor 70 Ti). Polycarbonate bottles of 10 ml with cap assembly (Beckman Coulter) were used for this purpose. A microwave oven (CEM Matthews, NC, USA, model MARS) was used for the mineralization of extracts.

Separation of the analytes was performed as described elsewhere [17]. A glass analytical size exclusion column Superdex™-75 (10 x 300 mm; 13 μm) (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) with an exclusion limit of 100 kDa (effective separation range from 3 to 70 kDa) was used for this purpose. Metal-linked biomolecules were detected with an inductively coupled plasma mass spectrometer Agilent 7500ce (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) equipped with an octopole collision/reaction cell. Chromatographic separations were performed using a Model 1100 HPLC pump with detector UV (Agilent, Wilmington, DE, USA) as the delivery system. ICP-MS measurement conditions (Table **1**) for mode He and $H_2$ were optimized by using a $HNO_3$ 2% (v/v) aqueous solution of $^{59}Co$, $^{7}Li$, $^{89}Y$ and $^{205}Tl$ (1 mg $L^{-1}$). The flows of collision/reaction gases were fixed at 3.7 mL $min^{-1}$ for He and at 3.5 mL $min^{-1}$ for $H_2$ in order to avoid or reduce the interferences.

## Sampling Area, Animals, Exposure Experiments and Sample Preparation

*Free-living mice sampling:* Free-living mice (*Mus spretus*) were collected during November and December 2010, in five sampling areas from Doñana National Park (DNP), southwest Spain, affected by differential contamination (Fig. **2**). The site "Lucio del Palacio (LDP-green spot) located at the center of the Park can be considered as a non-contaminated area. The other points were: "La Rocina Stream" (ROC- red spot) with strawberry, citrus fruit and grape fields in the surroundings, which s in addition were affected by diffused pollution from the petrochemical and chemical activities from the industrial belt of Huelva and acid waters and metals from northwest mining metallurgical activities in the Huelva province (Riotinto mine); "El Partido" (PAR- orange spot) and "El Ajolí" (AJO- brown spot) sites, up- and down-"El Partido" stream, respectively, which are under the influence of citrus fruit and grape fields; and "El Matochal" (MAT- blue spot) site next to Guadiamar

**Table 2. Sampling Points and Type of Samples.**

| Area (code) | UTM Coordinates | | Mice | |
|---|---|---|---|---|
| | X | Y | Male | Female |
| Lucio del Palacio (LDP) | 193800 | 4099515 | 8 | 4 |
| La Rocina (ROC) | 178653 | 4119937 | 7 | 5 |
| El Ajolí (AJO) | 192352 | 4124977 | 9 | 8 |
| El Matochal (MAT) | 208681 | 4102207 | 7 | 6 |
| El Partido (PAR) | 191173 | 4124977 | 8 | 9 |

**Table 3. Weight of Organs Used in *Mus spretus* Pools Preparation.**

| Sampling Area | Livers/g | Kidneys/g |
|---|---|---|
| Lucio del Palacio (LDP) | 0.62, 0.59, 0.64, 0.70, 0.56 | 0.27, 0.25, 0.26, 0.22, 0.25 |
| La Rocina (ROC) | 0.72, 0.68, 0.70, 0.61, 0.59 | 0.23, 0.25, 0.24, 0.22, 0.23 |
| Ajolí (AJO) | 0.61, 0.73, 0.61, 0.67, 0.71 | 0.24, 0.22, 0.18, 0.21, 0.23 |
| Matochal (MAT) | 0.73, 0.59, 0.66, 0.61, 0.57 | 0.20, 0.21, 0.22, 0.23, 0.22 |
| Partido (PAR) | 0.68, 0.70, 0.59, 0.60, 0.64 | 0.29, 0.25, 0.26, 0.28, 0.31 |

stream that is affected by rice growing fields and suffered the input of metals transported by the Guadiamar river affected by the rupture of Aznalcollar mine tailing pond in 1998 [18]. The sampling sites are shown in Table **2**, which include the codes for the samples, UTM coordinates and number of mice of each sex sampled. *Mus Spretus* mice were caught with Sherman live-traps, which were mounted during the evenings and checked by the next morning. Adult animals were taken alive to a laboratory at Doñana Biological Reserve, and site/date of capture, sex, weight and external measurements were recorded.

### *Exposure Experiments with Mus musculus*

Exposure to Cd was performed by subcutaneous injection (100 μL) of increasing doses of 0.1 to 1 mg Cd (in the form of $CdCl_2$) per kg of body weight per day during a total period of 10 days. Three subgroups of 10 mice (A, B and C) were separated and sacrificed at days 2, 6 and 10 of the experiment, respectively. The control group of mice was subcutaneously injected with 100 μL of ultrapure water per day for 10 days. Subgroup controls were also sacrificed at the same time during that experiment.

Similarly, mice were exposed to mercury ($HgCl_2$ aqueous solution), by subcutaneous injection (120 μL) of a dose of 3 mg of Hg per kg of body weight per day during a total period of 14 days. Three subgroups of 10 mice (A, B and C) were separated and sacrificed at days 2, 7 and 14. Subgroup controls were also used for comparison to which 120 μL of ultrapure water per day was injected.

Finally, arsenic (sodium arsenate in water) was orally administrated in a dose of 4.3 mg of As per Kg of body weight per day during 7 days (subgroup at 2, 4 and 7 days).

Mice (*Mus musculus and Mus spretus*) were individually killed by cervical dislocation and dissected. Individual organs were excised, weighed in Eppendorf vials, cleaned with 0.9% NaCl solution, frozen in liquid nitrogen and stored at -80 ºC until they were used for extract preparation. Mice were handled according to the norms stipulated by the European Community. The investigation was performed after approval by the Ethical Committee of the University of Huelva (Spain).

*Sampling of soil and sediments from the areas of study:* Samples were collected in three different areas for each sampling site. Sediments and soils samples were collected using a polypropylene spatula, and subsequently transferred to acid-rinsed polypropylene bottles. The samples were air dried, sieved to select the fraction <2 mm and ground in an agate mortar for later sieving to select the fraction <0.63 microns.

## Analytical Procedures

*Sample preparation*: Pools of livers and kidneys from 5 different male mice (Table **3**) were treated following a procedure described elsewhere [19]. Briefly, the organs were disrupted by cryogenic homogenization in a 6770 freezer/mill apparatus (2 min at rate 15) from Spex SamplePrep (Metuchen, NJ, USA). After that the metal-biomolecules were extracted with a solution (3 ml $g^{-1}$) containing 20 mM ammonium acetate buffer solution at pH 7.4, 1 mM TCEP and 1 mM PMSF using a glass/teflon homogenizer in a cold chamber at a constant temperature of 4ºC. Then the extracts were centrifuged at 120,000 g for 1 h at 4 ºC. Extracts were stored under nitrogen atmosphere to avoid oxidation by air and at -80 ºC until analysis. Total protein content (Bradford method) in the extracts of liver and kidney from *Mus spretus* are given in Table **4**.

**Table 4. Protein Content (mean of three Replicates, μg $mL^{-1}$) in the Extracts of Livers and Kidneys from *Mus spretus*.**

| ORGAN | LDP | AJO | PAR | MAT | ROC |
|---|---|---|---|---|---|
| LIVER | 21.23±0.04 | 22.29±0.09 | 19.61±0.02 | 20.03±0.06 | 19.45±0.05 |
| KIDNEYS | 12.23±0.03 | 15.26±0.01 | 16.09±0.01 | 17.33 ±0.07 | 17.26±0.02 |

*Determination of total metals concentration in extracts from different organs:*. For this purpose, the extracts were exactly weighed (0.250 g) in 5-ml microwave vessels and 800μL of a mixture containing nitric acid and hydrogen peroxide (4:1 v/v) was added. After 10 min, the PTFE vessels were closed and introduced into the microwave oven. The mineralization was carried out at 400 W from room temperature ramped to 160ºC for 15 min and kept for 40 min at this temperature. Then the solutions were made up to 2 ml by adding ultrapure water and the metals were analyzed by ICP-MS. The element Rh was added as internal standard (1μg $mL^{-1}$). All the analyses were performed using three replicates.

*Determination of total metals concentration in soil and sediment:*. The fraction <63 μm was digested in a microwave-accelerated reaction system. For this purpose, the samples were weighed exactly (0.250 g) in PTFE microwave vessels and 5 mL of nitric acid, 2 mL of hydrofluoric acid and 1 mL of hydrochloric acid were added, the vessels were closed and introduced into the microwave oven. The mineralization was carried out at 800 W from room temperature ramped to 180ºC for 10 min and kept for 50 min at this temperature. After digestion 6 mL of saturated boric acid was added to neutralize the excess of hydrofluoric acid. Then the solutions were made up to 25 ml, filtered through Iso-Disc poly-(vinylidene difluoride) filters (25-mm diameter, 0.45-μm pore size) and stored at 4ºC until analysis by ICP-MS. In all the analyses performed three replicates and Rh were added as internal standard (1μg $mL^{-1}$). Recovery experiments were performed by spiking the different samples with 1, 5, 50 or 100 μg $L^{-1}$ of metals depending on the relative concentration of each metal in the sample.

*Analysis of tissue extracts using analytical SEC-ICP-MS:*. The extracts were filtered through Iso-Disc poly-(vinylidene difluoride) filters (25-mm diameter, 0.2-μm pore size) to avoid column overloading or clogging. The SEC-ICP-MS online coupling was performed by connecting the outlet of the chromatographic column to the Micromist nebulizer inlet (GlasExpansion, Switzerland) of the ICP-MS by means of a 30cm PEEK tubing (0.17 i.d. mm). The quality control of the SEC-ICP-MS system to overcome the problems related to contamination, loss and stability of species has been described elsewhere [19]. The retention times corresponding to the peaks of standards used for SEC-ICP-MS column calibration are the following: ferritin 11.5 min, bovine serum albumin (BSA) 13.7 min, superoxide dismutase containing Cu and Zn (Cu,Zn-SOD) 16.3 min, metallothionein I containing Cd, Cu and Zn (Cd,Cu,Zn-MT1) 21.0 min, and arsenobetaine (AsB) 26.1 min.

Other chromatographic separations were performed using an analytical SEC column (10x300 mm, 13 μm) Superdex™-Peptide (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) with an exclusion limit of 10 kDa (with an effective separation range from 10 to 0.1 kDa). Preparative size exclusion chromatography was carried out by using a Hiload 26/60 Superdex 30 Prep for separation range <10 kDa (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). Anion-exchange HPLC separations were carried out using a Hamilton PRP X-100 (250 x 4.6 mm x 5$\mu$m) column.

## RESULTS AND DISCUSSION

The use of whole animals to assess the action of contaminants on living-organisms visualizes the interactions of xenobiotics on essential elements in the different biological filters (lungs, intestine, blood stream, cellular membranes, cytosol, organelles, etc), which can affect the traffic of these elements to biological sites where metalloproteins assemblies occur. Since many metalloproteins play a vital role for living-organisms health, the identification of changes in metalloprotein expression and in other metal-species of biological significance caused by contamination (Metallomics) represent a recent, innovative and powerful approach for environment quality assessment. Metallomics has been applied to assess the incidence of contaminants on living organisms in Doñana National Park, considering upregulation or down-regulation of metalloproteins and metallospecies caused by inputs of metals and other contaminants.

### Occurrence of Contaminants in Doñana National Park and Surroundings

The influence of metals and other contaminants on ecosystems quality has been well established [20,21], especially in wetlands, where water acts as carrier spreading contaminants to the most remote points. In addition, many pollutants are highly persistent, in particular metals, which are intrinsically non-biodegradable [22] and maintain their harmful effects for a long time. Zhang *et al.* [23] reported the accumulation of toxic metal in eggs and leather of little egret in wetland affected by industrial and agricultural pollution. Other studies consider the harmful effects of organochlorine pesticides and other organic pollutants on peregrine falcon population in emblematic natural areas, such as Rocky Mountains, which caused eggshell thickness due to these contaminants [24-27]. Dong *et al.* [28] reached the similar conclusions in relation to eggs from different birds (herons, egret and cattle egret) living in Tai lake in China. Egg contamination by organochlorine compounds has also been reported in Danube delta in which contaminant accumulation depends on birds' specie [29].

**Table 5. Concentration of Elements (mean of three replicates, μg $g^{-1}$) in the Extracts of the Different Organs of mice *Mus spretus* from Sampling Sites.**

| | Sampling Point | Cu | Zn | As | Cd |
|---|---|---|---|---|---|
| LIVER | LDP | 0.43±0.09 | 3.65±0.85 | 0.0020±0.0004 | 0.0101±0.0004 |
| | AJO | 0.33±0.09 | 3.10±0.62 | 0.0015±0.0005 | 0.0027±0.0009 |
| | PAR | 0.52±0.04 | 4.12±0.34 | 0.0016±0.0002 | 0.0232±0.0004 |
| | MAT | 0.80±0.10 | 4.46±0.77 | 0.0028±0.0007 | 0.0523±0.0009 |
| | ROC | 1.12±0.12 | 5.65±0.58 | 0.0023±0.0007 | 0.0463±0.0011 |
| KIDNEY | LDP | 0.36±0.03 | 1.84±0.20 | 0.0025±0.0006 | 0.015±0.0004 |
| | AJO | 0.26±0.02 | 1.50±0.17 | 0.0018±0.0008 | 0.0131±0.0002 |
| | PAR | 0.49±0.02 | 2.04±0.14 | 0.0018±0.0003 | 0.018±0.0005 |
| | MAT | 0.65±0.02 | 2.80±0.20 | 0.0027±0.0003 | 0.021±0.0004 |
| | ROC | 0.73±0.01 | 3.26±0.19 | 0.0038±0.0011 | 0.029±0.0006 |

The diffuse contamination in Doñana National Park by metals, organochlorine and organic pollutants was early reported by Albaigés *et al*. in 1987 [30]. In 1998, a toxic mud spillage from Aznalcollar mine reached the northeastern boundary of the Park overflowing about a 0.2 % of its surface [18]. Since toxic mud contained high concentrations of heavy metals (mainly Zn, Pb, As and Cu) many studies have been performed to monitor the environmental status of the Park [31-36] and evaluate the potential effect of metals on protected species, particularly more than 200 species of birds [37-40], and different terrestrial animals, such as dear, wild pig, lynx [41], and others. In addition, other studies have considered the presence of organic contaminants, such as organochlorines in eagle [42], flamingo eggs [43], red kite [44] and lynx [45], due to agricultural and industrial activities around. However, specimens of these protected species are difficult to collect to assure their conservation and most of the studies are based on dead specimens [37,40], addled or abandoned eggs [42], and blood from living animals captured and released [46]. For this reason, other non-protected bioindicators living in the Park have been used for environmental studies, such as crayfish (Procambarus clarkii) [47, 48], fishes (*Cyprinus carpio, Barbus barbus, Mugil capito, Anguilla anguilla*) [49], mollusks (Scrobicularia plana) [50] and small mammals, in particular the mouse *Mus spretus*, that lives and feeds in small areas around the capture site, and responds to metals, pesticides and other contaminants [51,52]. Moreover, conventional pollutant monitoring in the Park based on the analysis of xenobiotics has been substituted by the study of genotoxic effects [53], analysis of biochemical biomarkers [52,48] and other tests based on biological responses [54]. Most recently, an integrated approach combining biomarkers and proteomics has been proposed for *Procambarus clarkii* [55] and *Scrobicularia plana* [56,57] to assess aquatic environments, proteomic [13] and transcriptomic [12] studies of *Mus spretus* to monitor terrestrial ecosystems of Doñana Park.

### *Concentration of Metals in Sampling Sites*

The presence of metals in the extracts of liver and kidney of *Mus spretus* from the five sampling sites was evaluated and the results are shown in Table **5**. It the higher presence of chromium, manganese, iron, copper and zinc in liver and arsenic and cadmium in kidney is remarkable, although only concentrations of Cu, Zn, As and Cd are shown in Table **5** because these elements provide more interesting results in metal-traced profiles by SEC-ICP-MS. The highest concentrations of Cu and Zn were found in mice captured in ROC followed by MAT, although levels of metals in LDP, at the center of Doñana National Park, are higher than expected. In addition, concentrations of As in kidney are higher than liver.

Further analyses of metals in soils and sediments from the zone (Table **6**) reveal that concentration of Cu, Zn and Cd in LDP are higher than that in AJO, reaching values similar to PAR. However, the concentration of As in LDP clearly exceeds the one found in AJO and PAR.

## Changes in Metalloproteins Expression of Free-Living Mouse (*Mus spretus*) Caused by Contamination

The differential presence of pollutants in the sites considered (Fig. **2**) allows checking of their influence in the protein expression of mice used as bioindicators. The waters from "El Partido" stream (PAR) are mainly characterized by high

**Table 6. Concentration of Elements (mean of three replicates, μg $g^{-1}$) in Soils and Sediments from Doñana National Park and Surroundings.**

| SAMPLING SITES | | Cu | Zn | As | Cd |
|---|---|---|---|---|---|
| SEDIMENTS | LDP | 17.0±1.1 | 63.7±0.1 | 5.6±0.1 | 0.320±0.007 |
| | AJO | 14.3±1.2 | 25.5±0.7 | 2.0±0.5 | 0.084±0.002 |
| | PAR | 20.7±2.3 | 64.1±1.4 | 5.1±0.9 | 0.853±0.016 |
| | MAT | 25.8±2.0 | 248.5±4.7 | 16.5±0.1 | 1.434±0.009 |
| | ROC | 31.7±2.3 | 301.4±5.3 | 18.8±0.1 | 1.977±0.007 |
| SOILS | LDP | 9.4±0.3 | 66.6±2.8 | 6.0±0.3 | 0.151±0.006 |
| | AJO | 7.0±0.2 | 36.1±0.3 | 2.8±0.1 | 0.040±0.004 |
| | PAR | 13.4±0.2 | 69.9±1.3 | 5.9±0.3 | 0.162±0.006 |
| | MAT | 16.0±0.2 | 65.7±0.1 | 13.7±0.1 | 0.322±0.003 |
| | ROC | 21.4±0.4 | 83.3±0.2 | 15.9±0.1 | 0.444±0.002 |

concentrations of organic matter, dissolved inorganic salts and substances rich in nitrogen and phosphorous that makes this site potentially hazardous [57], the presence of pharmaceutical active compounds has also been detected [58]. the presence of nitrate [59] and metals in pore waters in "La Rocina" stream (ROC) is remarkable that suggests the transport of contaminants from the Iberian Pyrite Belt [34]. In addition, previous proteomic studies performed with the bioindicator *P. clarkii* [55] revealed upregulation of proteins in ROC and PAR and the inhibition of esterase, a biomarker that denotes the presence of pesticides. In MAT the presence of non-essential elements (such as Cd and Hg) has been detected in tissues of shrews associated to pollution from mine activities [40] and the Comet assay in blood from *Mus spretus* denotes DNA damage in animals from this site against controls (*Mus domesticus*) captured in a non-contaminated area [60]. Finally, AJO is an area with low contamination and LDP, at the centre of the Park, is usually considered as a non-contaminated site.

Biological response of free-living mice *Mus spretus* to contamination at the sites described above was studied in organs with high metabolic activity such as liver and kidneys. The up and downregulation of metal-biomolecules caused by pollutants was traced by SEC-ICP-MS. The most interesting results were obtained by the response of Cu-, Zn- and Cd-biomolecules, and the toxic element As.

It can be observed that the induction of Cu, Zn and Cd-peaks at 7 KDa in liver extracts from *Mus spretus* (Fig. **4**), which matches well with the standard of metallothionein I, is represented by dotted lines. The intensity of Cu-peak from the contaminated area ROC (Fig. **4a**) is clearly higher than that from other sites also found to be affected by contamination, such as MAT (65 % of ROC) and PAR (30% of ROC), which is in agreement with the relative concentration of metals in these points (Table **6**). In the other sites with low contamination AJO and LDP this peak shows a decreasing intensity, however, it is remarkable that the response of LDP exceeds to AJO, which agrees with the higher concentration of metals found in soils and liver extract from LDP (Tables **5** and **6**) and denotes increasing occurrence of diffuse contamination in the hearth of Doñana Park. Similar profiles were observed for Zn- and Cd-peaks although with lower intensity (Fig. **4b** and **c**). Another peak traced by Cu, that can be related with the standard of superoxide dismutase (SOD) at about 32 kDa, also shows higher intensity for samples from ROC, MAT and PAR, but the response is lower in LDP (Fig. **4a**). In Fig. **4b** two signals traced by Zn can be seen that match with the standards of bovine serum albumin (Zn,Cu-BSA) and superoxide dismutase (Cu,Zn-SOD) at about 67 kDa and 32 kDa, respectively. The presence of pollutants in sites such as ROC and MAT enhances the intensity of these peaks, however, in the low-contaminated LDP the intensity decreases.

In kidney extracts the presence of Cu-, Zn- and Cd-peaks at about 7 kDa can be also observed (Fig. **5**), although the intensity is lower than that in liver. The upregulation of this peak in more polluted sites such as ROC and MAT can be observed again. In LDP the response is higher than expected, indicating the presence of low levels of contamination.

Figure **6a** shows the As-traced profiles obtained by SEC-ICP-MS using a SuperdexTM-peptide column with effective range from 7 to 0.1 kDa, which allows better resolved chromatograms for the low molecular mass As-molecules present in cytosolic extracts (Fig. **6a**). The highest intensity of signal was obtained from ROC, in which total As concentration in kidney extract is also the highest (Table **5**). The intensity of signals traced by arsenic is higher in kidney than in liver, therefore further studies were performed on kidney extract from ROC. Two peaks related to low molecular mass metabolites can be observed at 26 and 27.5 min, and to confirm their identities they were collected with a preparative column Hiload 26/60 Superdex 30 Prep. Latterly, the peak associated with the molecular weight range 100–300 Da was collected for analysis by anion exchange chromatography (Fig. **6b**). The chromatogram shows the predominance of methylated arsenicals (MMA and DMA) in kidney, since they match well with the corresponding standards.

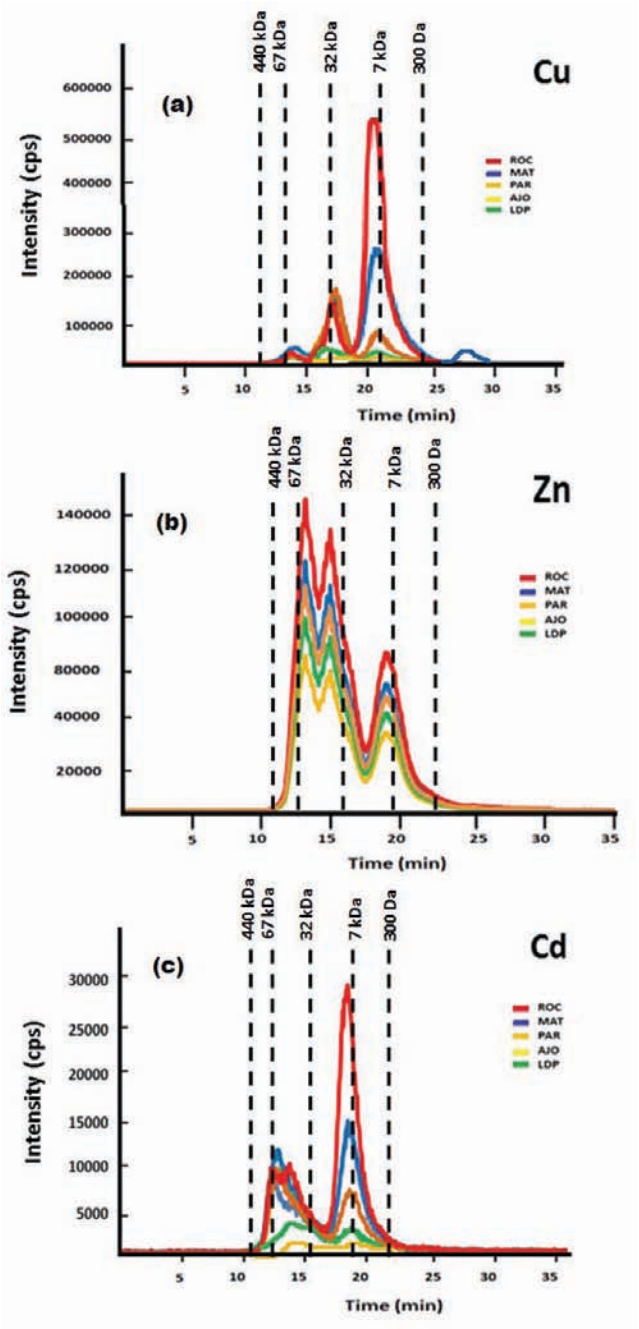



**Fig. (4).** Molecular mass distribution of metal-biomolecules complexes in liver *Mus spretus* extracts from sampling sites by SEC-ICP-MS. (a), Cu-containing biomolecules; (b), Zn-containing biomolecules; (c), Cd-containing biomolecules. Chromatographic conditions: column, Superdex$^{TM}$-75 (10 x 300 mm; 13 µm); mobile phase, ammonium acetate 20 mmol L$^{-1}$ (pH 7.4); flow rate, 0.7 ml min$^{-1}$; injection volume, 20 µl.

## Exposure Experiments of Model Mouse (*Mus musculus*) to Toxic Elements

It is widely accepted that chronic exposure to elements such as arsenic, nickel, chromium and cadmium increases cancer incidence and toxicological disorders in individuals. However, the molecular mechanisms underlying their ability

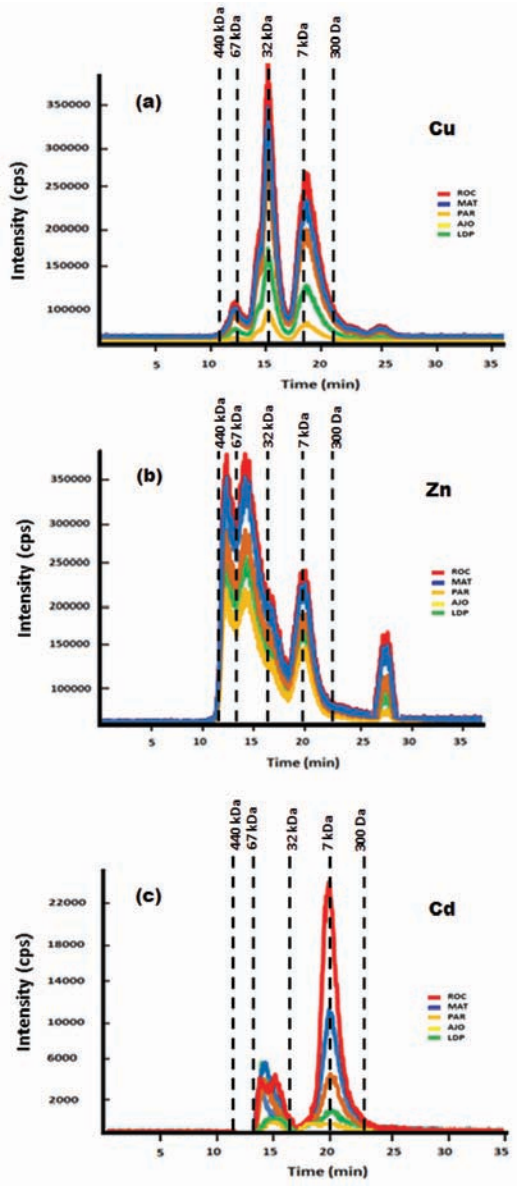



**Fig. (5).** Molecular mass distribution of metal-biomolecules complexes in kidney liver *Mus spretus* extracts from sampling sites by SEC-ICP-MS. (a), Cu-containing biomolecules; (b), Zn-containing biomolecules; (c), Cd-containing biomolecules. Chromatographic conditions: column, Superdex$^{TM}$-75 (10 x 300 mm; 13 µm); mobile phase, ammonium acetate 20 mmol L$^{-1}$ (pH 7.4); flow rate, 0.7 ml min$^{-1}$; injection volume, 20 µl.

to transform cells remain largely unknown [61]. For this reason controlled exposure experiments can provide suitable information about the biological response of model organisms against these contaminants or other analogous, as well as metal homeostasis and traffic among the organs. Several examples can be cited in relation to this issue: (i) the study of carcinogens Cd and As, and benzo(a)pyrene (BaP) in mice reveals the occurrence of interactions between As and BaP, but not between Cd and BaP, inducing DNA damage in polychromatic erythrocytes in mouse bone-marrow [62]; (ii) the combined treatment of Cd-exposed animals with Se and Zn assures a significant decrease in plasma and testicle of Cd concentrations and a more efficient

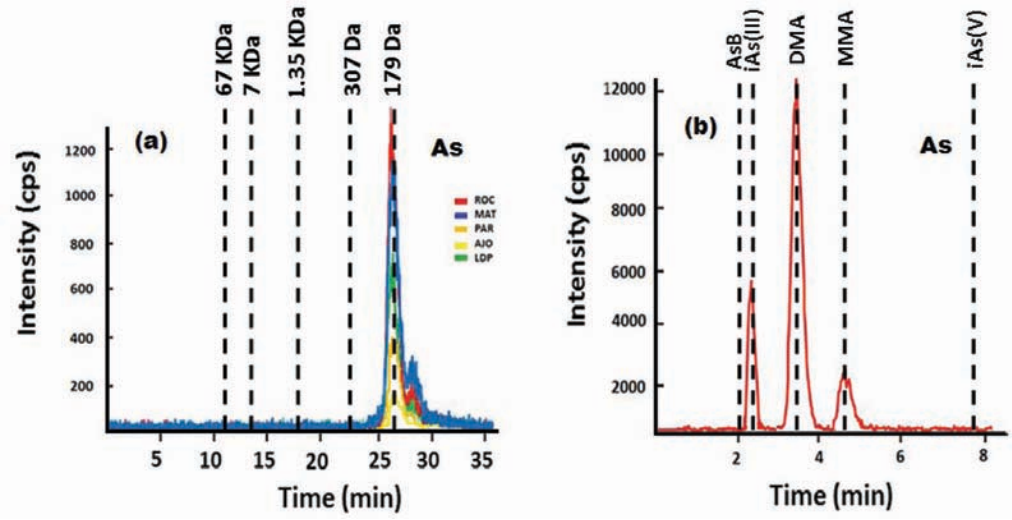



**Fig. (6).** (a) Molecular mass distribution of metal-biomolecules complexes in kidney liver *Mus spretus* extracts from sampling sites by SEC-ICP-M (chromatographic conditions: column, Superdex$^{TM}$-Peptide (300 x 10mm x13μm); mobile phase, ammonium acetate 20 mmol $L^{-1}$ (pH 7.4); flow rate, 0.7 ml $min^{-1}$; injection volume, 50 μl). (b) Anion exchange chromatogram of chromatographic SEC fraction with molecular mass range 100 to 300 Da (chromatographic conditions: column, Hamilton PRP X-100 (250 x 4.6 mm x 5$\mu$m); mobile phase, sodium dihydrogen phosphate 30 mM (pH 6); flow rate, 1.0 ml $min^{-1}$; injection volume, 20 μl).

protection against the observed testicular damage [63]; (iii) the effects of cadmium and zinc ions on translational machinery and death of mouse liver cells were evaluated on outbred mice under intraperitoneal injections of these elements which showed zinc protection of translation machinery against inhibition, although the number of apoptotic cells in the liver does not decreases [64]; (iv) it has been tested that tissue accumulation of total arsenic in mice follows the range kidney>lung>urinary bladder skin>blood>liver, monomethyl arsenic was the predominant metabolite in kidney, whereas dimethylarsenic was the predominant specie in lung. Urinary bladder tissue had roughly equivalent levels of inorganic arsenic and dimethylarsenic, as in skin. These data indicate that pharmacokinetic models for arsenic metabolism and disposition need to include mechanisms for organ-specific accumulation of some arsenicals [65]; (v) acute effects of mercury on mouse blood, kidneys, and liver provoke the induction of metallothionein, while mercuric chloride poisoning causes an increase in hepatic and renal MT levels which is not modified by antioxidant treatments [66].

We have performed exposure experiments to cadmium, in which mice (*Mus musculus*) were subcutaneously injected with $CdCl_2$ aqueous solution as described in the Experimental. The results demonstrated the protective action of liver against this toxic element which is trapped as Cd-metallothionein (Fig. **7a**). The progressive increase in intensity with exposure (group C) of peaks related to a Cd-binding molecule (molecular mass about 7 KDa) can be observed. In addition, other molecules traced by Cu and Zn are shown in Fig. **7b** and **c**, in which the appearance of Cu- and Zn-peaks at 7 kDa can also be seen that increases slightly with the exposure, although with intensity lower than that of Cd-peak, as well as other -Cu and Zn-peaks at retention time related to the standard superoxide dismutase (SOD, 32 KDa). The oxidative stress caused by the exposure to Cd could be the cause of this Cu,Zn-SOD upregulation that reaches higher intensity in more exposed specimens (group C).

The exposure to mercury of *Mus musculus* by subcutaneous injection of aqueous mercury chloride during 14 days (see Experimental for further details) showed a peak in liver extract related to Cu-containing biomolecule that matches with Cu,Zn-SOD (32 KDa), decreasing in intensity about a 60 % under exposure (Fig. **8a**; group C), while the equivalent peak of mercury molecule (the putative Hg-SOD) increases a 30 % (Fig. **8b**; group C), although the intensity of this peak is very low. These facts are in agreement with the total concentration of these elements in liver extract, in which the levels of copper decreases from 1.5 to 0.75 μg $g^{-1}$ (groups A to C) and those of mercury increases from 0.075 to 0.125 μg $g^{-1}$ (groups A to C). The low concentration of mercury in liver extract is remarkable despite the high exposure of mice from group C. To explain these facts we consider the concentration of these metals in kidney, other organs with high metabolic activity, prove that Cu concentration increases from 0.5 to 1.5 μg $g^{-1}$ (groups A to C) and those of Hg from 2 to 14 μg $g^{-1}$; in addition, SEC-ICP-MS profiles in kidney show that peaks related to Cu-metallothionein (Cu-MT, Fig **8c**) and Hg-metallothionein (Hg-MT, Fig. **8d**) increase drastically, especially the latter one. These results suggest that Hg competes with Cu for the active sites of SOD in liver, and the residence time of mercury in this organ is very short [67] ending up to kidneys [68] in which mercury burden is slowly excreted by the urine. This hypothesis can explain the high presence of Hg in kidney, mainly as Hg-MT, that is a well-known scavenging molecule associated to mercury detoxification [69].

Finally, oral exposure to arsenic (see Experimental for more details) reveals that the element is mainly accumulated in kidney (Fig. **9**) and two peaks traced by As of low molecular mass (in the range about 200 to 130 Da) were found. These peaks are analogous to that found in free-living *Mus spretus* (Fig. **6**), related to MMA and DMA, that increase with exposure. In liver the behavior of arsenic is inverse and these two peaks decreases with the doses. This behavior rep-

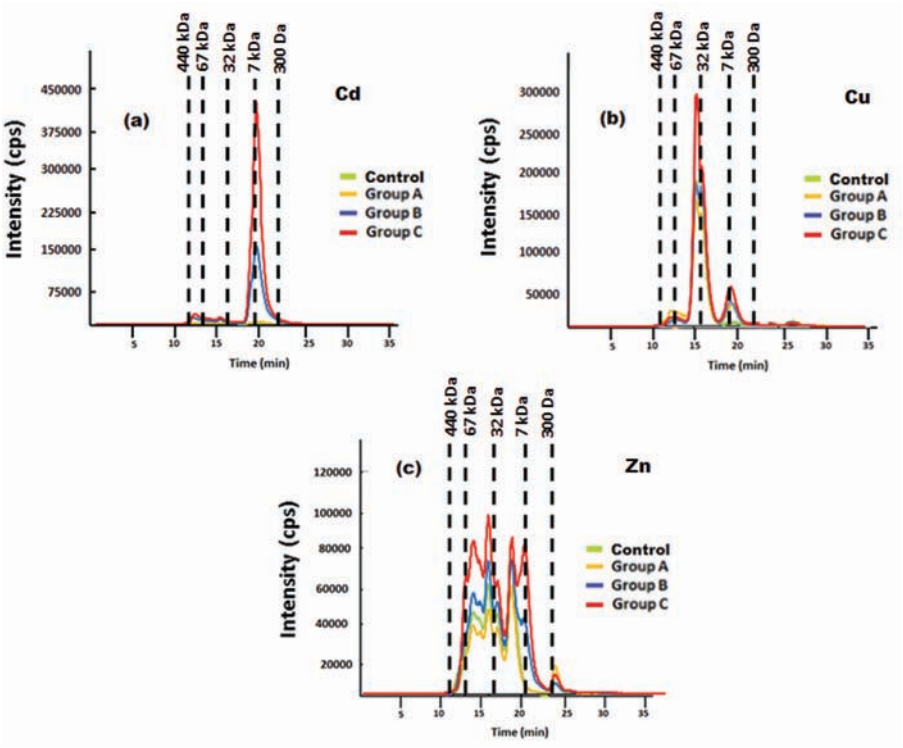



**Fig. (7).** Exposure of mice *Mus musculus* subcutaneously injected with increasing dose of cadmium ($CdCl_2$) aqueous solution (groups A, B and C). Changes in metalloproteins expression were traced by SEC-ICP-MS (column, Superdex$^{TM}$-75 (10 x 300 mm; 13 µm). (a), Cd-containing biomolecules; (b), Cu-containing biomolecules; (c), Zn-containing biomolecules.

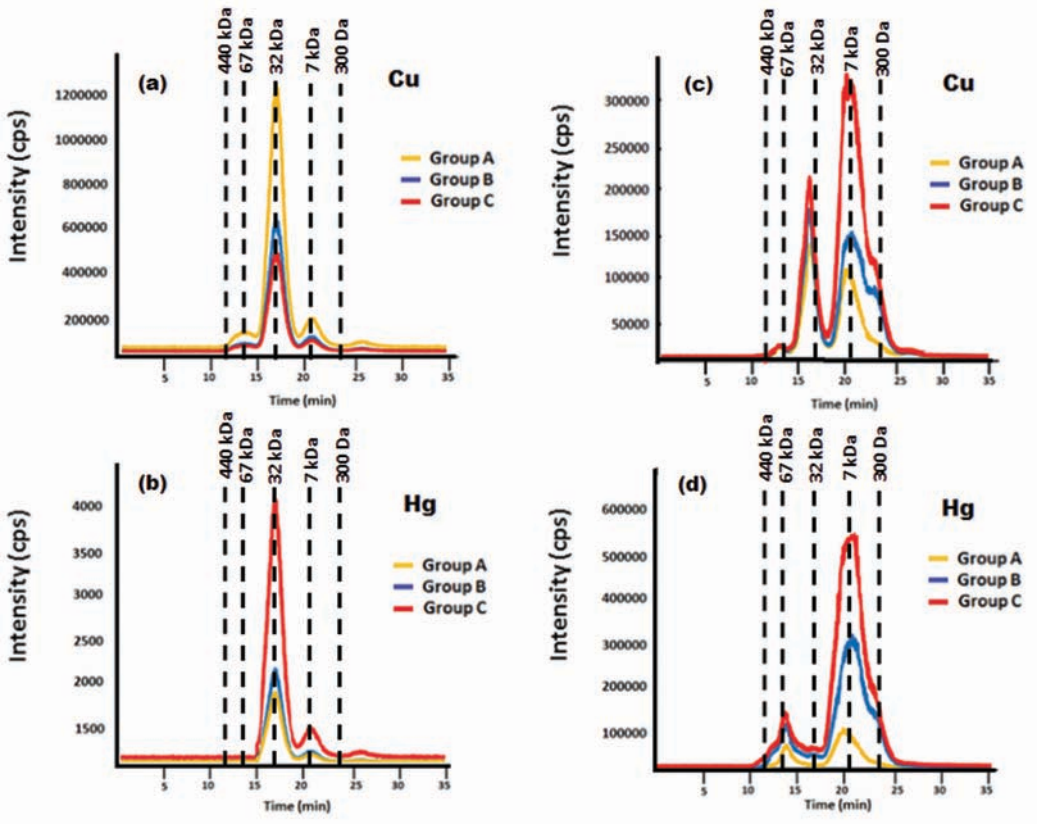



**Fig. (8).** Exposure of mice *Mus musculus* subcutaneously injected with increasing dose of mercury ($HgCl_2$) aqueous solution (groups A, B and C). Changes in metalloproteins expression were traced by SEC-ICP-MS (column, Superdex$^{TM}$-75 (10 x 300 mm; 13 µm). (a), Cu-containing biomolecules in liver; (b), Hg-containing biomolecules in liver; (c), Cu-containing biomolecules in kidney; (d) Hg-containing proteins in kidney.

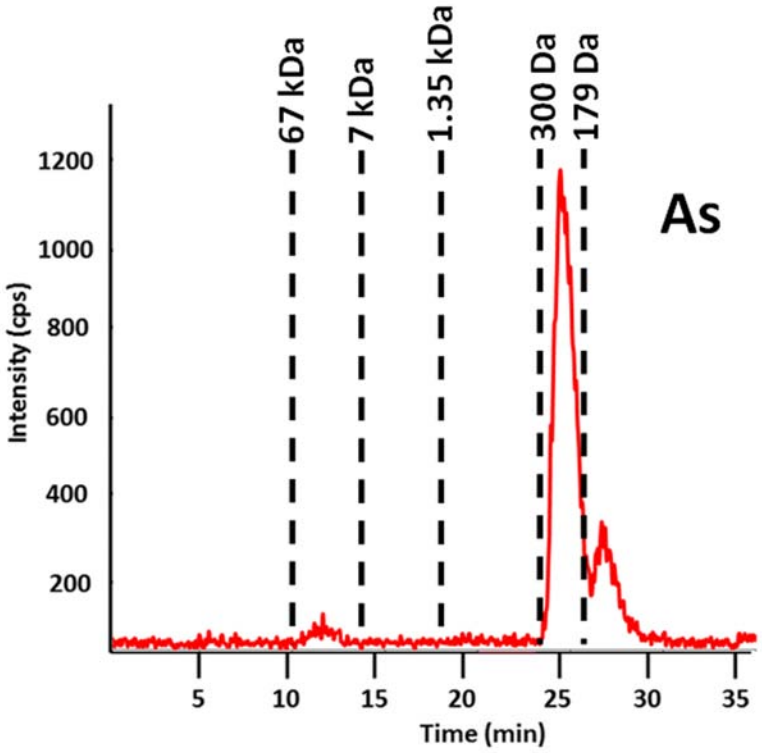



**Fig. (9).** Exposure of mice *Mus musculus* to arsenic ($Na_3AsO_4$ in aqueous solution) orally administrated. Anion exchange chromatogram with ICP-MS detection from SEC fraction of molecular mass range 100 to 300 Da obtained from kidney extract. Chromatographic conditions: column, Hamilton PRP X-100 (250 x 4.6 mm x 5$\mu$m); mobile phase, sodium dihydrogen phosphate 30 mM (pH 6); flow rate, 1.0 ml $min^{-1}$; injection volume, 20 µl).

resents a progressive traffic of this element to the kidney for excretion.

### Comparative Metallomic Study of *Mus musculus* and *Mus spretus* Response Under the Action of Metal Contaminants

The results obtained in exposure experiments on model mice *Mus musculus* (Figs. **7** to **9**) can be used to validate the biological response in free-living mice *Mus spretus* (Figs. **4** to **6**) in the area under study, considering the close genetic similarity between both species. This comparison is especially interesting for toxic elements such as Cd, Hg or As, which can reach the sampling sites from the contaminant sources previously mentioned. The figure **10**-(1) shows the differences in intensity of peaks traced by Cd (of about 7 KDa) from liver extract of *Mus musculus*, which was subcutaneously exposed to this element (aqueous solution of $CdCl_2$) for 7 days at increasing dose from 0.1 to 0.7 mg Cd per kg of body weight per day, which represents a total dose of 0,056 mg for specimen of about 20 g of weight (group B), see red *Bar (a)* in Fig. **10-1**. As discussed previously, this peak can be related to the upregulation of Cd-metallothionein provoked by the exposure to this element. *Bar (b)*, in the same figure, represents the intensity of this peak in mice exposed to Cd only for 2 days (group A), receiving a total dose of 0.006 mg (mice of 20 g weight). The biological response of *Mus spretus* to the presence of this element in the area under scrutiny can be evaluated for the same peak, *Bars (c)* to *(e)* in Fig. **10-(1)**, demonstrate that mice from contaminated areas, such as ROC and MAT, show a response comparable to group A, and denote the interplay of this contaminant on free-living organisms of these sites. On the other hand, Fig. **10-(2)** comparatively reflects the response of *Mus spretus* to arsenic occurrence, showed by the appearance of a peak of monomethylarsenic in kidney extracts from ROC and MAT (*Bars (b)* and *(c)*, respectively, which are comparable in intensity with that from *Mus musculus* which is orally exposed to a dose of 4.3 mg of As ($Na_3AsO_4$) per Kg of body weight per day during 7 days (subgroup C), *Bar (a)*. This fact confirms the considerable presence of this element in the surroundings of Doñana National Park, and the significant response in LDP, in the center of this ecological reserves (*Bar (d)*), represents a warning signal about the threats of the Park.

Finally, the absence of response in relation to the presence of mercury confirms the low environmental incidence of the element in the area considered.

## CONCLUSION

The use of size exclusion chromatography (Superdex$^{TM}$-75; effective separation range from 70 to 3 kDa), coupled to ICP-MS on cytosolic extracts of organs with high metabolic activity (liver and kidney) from free-living mice (*Mus spretus*), is a good analytical approach to assess the biological response to contaminants of animals habiting environmentally threatened areas, as is the case of Doñana National Park (southwest Spain) and surroundings. This area exhibits a differential occurrence of contaminants, especially metals

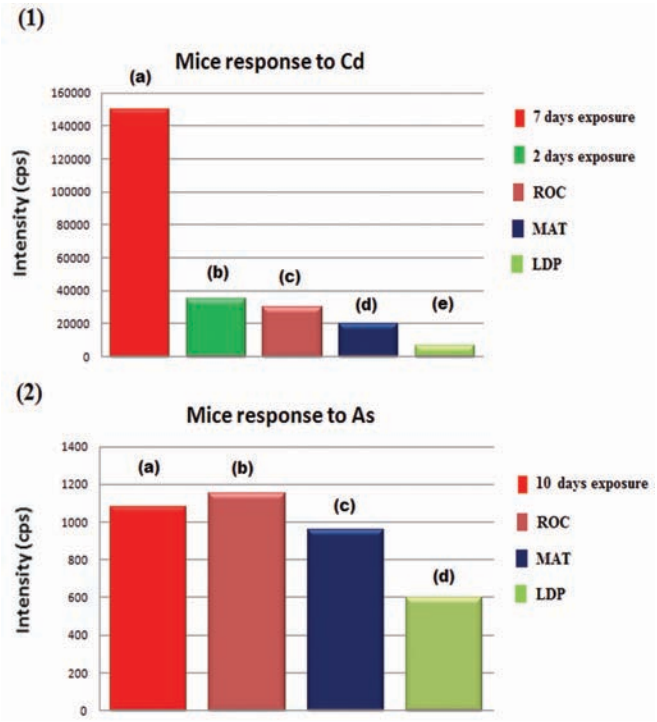



**Fig. (10).** (1) Comparison of Cd-MT peak intensities in liver extract from mouse *Mus musculus* exposed to cadmium and free-living *Mus spretus*: (a) M. musculus moderately exposed; (b) *M. musculus* poorly exposed; (c) *M. spretus* from very contaminated area (ROC); (d) *M. spretus* from significantly contaminated point (MAT). (2) Comparison of monomehtylarsenic peak intensities in kidney extract from mouse *Mus musculus* exposed to cadmium and free-living *Mus spretus*: (a) *M. musculus* highly exposed to arsenic; (b) *M. spretus* from very contaminated area (ROC); (c) *M. spretus* from significantly contaminated point (MAT); (d) *M. spretus* from the control area (LDP).

such as cadmium and arsenic, and mice represent organisms with complex metabolic pathways involving important biological filters to regulate metal/biomolecules intertwined interactions and trafficking. The upregulation of Cu, Zn and Cd-metallothioneins in liver of mice from highly contaminated areas, such as ROC and MAT, is remarkable. Other metallobiomolecules related to oxidative stress such as Cu and Zn superoxide dismutase (Cu,Zn-SOD; 32 kDa) are also upregulated in liver by the contamination. The kidneys have a behavior similar to liver but with lower expression levels. Other toxic elements such as As, which is very abundant in this area, provokes the presence of low molecular mass As-molecules, which requires the use of other type of SEC columns (Superdex$^{TM}$-peptide) with low effective separation range (7 to 0.1 kDa). The collection of this As low molecular mass fraction with a preparative SEC column (Hiload 26/60 Superdex 30 Prep) followed by a second dimension anion exchange chromatography (Hamilton PRP X-100) confirms the presence of methylated arsenicals (MMA and DMA) in kidneys with high concentrations in areas with marked contamination, such as ROC and MAT. The presence of these arsenical species in liver is lower.

On the other hand, exposure experiments of laboratory mouse *Mus musculus* to Cd, As and Hg allow to obtain metal profiles that reveal the marked upregulation of Cd-MT in liver, induced by subcutaneous injection of this element and the increased presence of MMA and DMA in kidney due to oral exposure to arsenate. Subcutaneous exposure to mercury provokes decrease in Cu-SOD signal intensity and the correlative increases of Hg-SOD signal in kidney, which can be attributed to interaction of Hg and Cu competing for the active sites of this biomolecule. As a consequence, mercury induces Cu translocation to kidneys in which peaks related to Cu-MT and Hg-MT increase markedly, especially the latter for mercury detoxification.

Finally, comparison of exposure experiments on model mice *Mus musculus* with the biological response of free-living mice *Mus spretus* using chromatographic-ICP-MS profiles, reveals the upregulation of Cd-MT in liver extract caused by exposure to this element in environmental contaminated sites ROC and MAT, and the high levels of monomethylarsenic in kidney extracts from mice of these areas. This fact can be associated to the significant presence of this element in the surroundings of Doñana National Park. On the other hand, the appreciable response of mice from LDP is remarkable, a theoretically non-contaminated area, that attracts the attention about the threats of the Park. Additionally, the absence of mercury responses in *Mus spretus* reveals the lack of this element in the area considered.

Therefore, the metallomic approach proposed to assess the biological response to contaminants provides us a powerful and unequivocal alternative to conventional methods for environmental pollution studies.

## CONFLICT OF INTEREST

The author(s) confirm that this article content has no conflicts of interest.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the project CTM2009-12858-C02-01 y CTM2009-12858-C02-02 from the Ministerio de Ciencia e Innovación, and the projects P08-CVI-03829 P08-RNM-00523, P08-FQM-03554 and P09-FQM-4659 from Consejería de Innovación Ciencia y Empresa (Junta de Andalucía). M.González-Fernández thanks the Campus of Excellence International CEIA3 for financial support, M. Angel García-Sevillano thanks the Ministerio de Ciencia e Innovación for a predoctoral scholarship and R. Jara-Biedma to the Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa (Junta de Andalucía) for a predoctoral scholarship.

## REFERENCES

[1] López-Barea, J.; Gómez-Ariza J.L. Environmental Proteomics and Metallomics. *Proteomics*, **2006**, *6*(1), S51-S62.

[2] Haraguchi, H.; Matsuura, H., Proceedings of the International Symposium on Bio-trace Elements 2002 (BITREL 2002),Wako, Japan, October 28-November 2, 2002; Enomoto, S.; Seko, Y., Eds.; The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN): Wako, Japan, **2003**; pp. 3-8.

[3] Szpunar, J. Metallomics: a new frontier in analytical chemistry. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2004**, *378*, 54-56.

[4] Gómez-Ariza, J.L.; García-Barrera, T.; Lorenzo, F.; Bernal, V.; Villegas, M.J.; Oliveira, V. Use of mass spectrometry techniques

for the characterization of metal bound to proteins (metallomics) in biological systems. *Anal. Chim. Acta*, **2004**, *524*, 15-22.

[5] Szpunar, J.; Lobinski, R.; Prange, A. Hyphenated techniques for elemental speciation in biological systems - Focal Point. *Appl. Spectroscopy*, **2003**, *57*, 102A - 112A .

[6] Jakubowski, N.; Lobinski, R.; Moens, L. Metallobiomolecules. The basis of life, the challenge of atomic spectroscopy. *J. Anal. At. Spectrom*., **2004**, *19*, 1-4.

[7] Sanz-Medel, A. From metalloproteomics to heteroatom-tagged proteomics. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2005,** *381*, 1-2.

[8] Koppenaal, D.W.; Hieftje, G.M. Metallomics - An Interdisciplinary and Evolving Field. *J. Anal. At. Spectrom.*, **2007,** *22*(8), 855.

[9] Shi, W.; Chance, M. R. Metallomics and metalloproteomics. *Cell Mol. Life Sci.*, **2008**, *65*, 3040-3048.

[10] Mounicou, S.; Szpunar, J.; Lobinski, R. Metallomics: the concept and methodology. *Chem. Soc. Rev*., **2009,** *38*, 1119–1138.

[11] The Genome Institute at Washington University. Genomes. *Mus musculus*. http://genome.wustl.edu/genomes/view/mus_musculus/ (Accessed January 20, **2011**).

[12] Ruiz-Laguna, J.; Abril, N.; García-Barrera, T.; Gómez-Ariza, J.L.; López-Barea, J.; Pueyo, C. Absolute transcript expression signatures of Cyp and Gst genes in *Mus spretus* to detect environmental contamination, *Environ. Sci. Technol.* **2006,** *40*, 3646–3652.

[13] Montes-Nieto, R.; Fuentes-Almagro, C.A.; Bonilla-Valverde, D.; Prieto-Alamo, M.J.; Jurado, J.; Carrascal, M.; Gómez-Ariza, J.L.; López-Barea, J.; Pueyo, C. Proteomics in free-living *Mus spretus* to monitor terrestrial ecosystems, *Proteomics*, **2007**, *7*(23) 4376–4387.

[14] Maret, W. Metalloproteomics, metalloproteomes, and the annotation of metalloproteins. *Metallomics*, **2010**, *2*, 117–125.

[15] Lindley, P. F., "Proteins of various functions containing copper". In: Handbook of Metalloproteins, vol. 2; Eds.; Messerschmidt, A.; Huber, R.; Poulos, T.; Wieghardt, K. John Wiley & Sons, Ontario, Canada, **2001**; pp. 793–811.

[16] González-Fernández, M.; García-Sevillano, M.A.; Jara-Biedma, R.; García-Barrera, T.; Vioque, A.; López-Barea, J.; Pueyo, C.; Gómez-Ariza. J.L. Size characterization of metal species in liver and brain from free-living (*Mus spretus*) and laboratory (*Mus Musculus*) mice by SEC-ICP-MS: Application to environmental contamination assessment. *J. Anal. At. Spectrom.* **2011**, *26*, 141-149.

[17] González-Fernández, M.; García-Barrera T.; Arias-Borrego, A.; Bonilla-Valverde, D.; López-Barea, J.; Pueyo, C.; Gómez-Ariza, JL. Metal-binding molecules in the organs of Mus musculus by size-exclusion chromatography coupled with UV spectroscopy and ICP-MS. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2008**, *390*, 17–28.

[18] Grimalt, J.O.; Ferrer, M.; Macpherson, E. The mine tailing accident in Aznalcollar. *Sci Total Environ*., **1999**, *242*, 3-11.

[19] García-Sevillano, M.A.; González-Fernández, M.; Jara-Biedma, R.; García-Barrera, T.; Gómez-Ariza, J.L., *Anal. Bioanal. Chem.*, **2012**, *404*(6-7), 1967-1981.

[20] Qadir, A.; Malik, R.N.; Husain, S.Z. Spatio-temporal variations in water quality of Nullah Aik-tributary of the river Chenab, Pakistan. *Environ. Monit. Assess*., **2008**, *140*, 43–59.

[21] Qadir, A.; Malik, R.N. Assessment of an index of biological integrity (IBI) to quantify the quality of two tributaries of river Chenab, Sialkot, Pakistan. *Hydrobiologia*, **2009**, *621*, 127–153.

[22] Burger, J.; Gochfeld, M.; Sullivan, K.; Irons, D. Mercury, arsenic, cadmium, chromium, lead, and selenium in feathers of pigeon guillemots (*Cepphus columba*) from Prince William Sound and the Aleutian Islands of Alaska. *Sci. Total Environ.*, **2007**, *387*, 175–184.

[23] Zhang, Y.; Raun, L.; Fasola, M.; Boncomagni, E.; Dong, Y.; Dai, N.; Gandini, C.; Orvini, E.; Ruiz, X. Little egret (*Egretta garzetta)* and trace-metals concentration in wetlands of China. *Environ. Monit. Assess.*, **2006**, *118*, 355–368.

[24] Berger, D.D.; Sindelar, C.E. Jr; Gamble, K.E. The status of breeding peregrines of the eastern United States. In: *Peregrine falcon populations: their biology and decline*. Ed.; Hickey, J.J. University of Wisconsin Press, Madison, **1969**; pp 165–173.

[25] Steidl, R.J.; Griffin, C.R.; Niles, L.J.; Clark, K.E. Reproductive success and eggshell thinning of reestablished peregrine falcon population in New Jersey. *J. Wildl. Manage*., **1991**, *55*, 294–299.

[26] USFWS (US Fish and Wildlife Service) Contaminants in peregrine falcon (Falco peregrinus) eggs from Virginia, Maryland, and West Virginia. Technical report of the USFWS, Virginia Field Office, Gloucester, VA, **1994**; pp 19.

[27] Clark, K.E.; Zhao, Y.; Kane, C.M. Organochlorine pesticides, PCBs, dioxins, and metals in postterm peregrine falcon (*Falco peregrinus*) eggs from the Mid-Atlantic states, 1993-1999. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **2009**, *57*, 174-184.

[28] Dong, Y.H.; Wang, H.; An, Q.; Ruiz, X.; Fasola, M.; Zhang, Y.M. Residues of organochlorinated pesticides in eggs of water birds from Tai Lake in China. *Environ. Geochem. Health*, **2004**, *26*, 259-268.

[29] Aurigi, S.; Focardi, S.; Hulea, D.; Renzoni, A. Organochlorine contamination in bird's eggs from the Danube Delta. *Environ. Pollut.*, **2000**, *109*, 61-67.

[30] Albaiges, J.; Algaba, J.; Arambarri, P.; Cabrera, F.; Baluja, G.; Hernández, L.Ma.; Castroviejo, J. Budget of organic and inorganic pollutants in the Doñana National Park (Spain), *Sci. Total Environ.*, **1987**, *63*, 1-28.

[31] Manzano, M.; Ayora, C.; Domenech, C.; Navarrete, P.; Garralon, A.; Turrero, M.J. The impact of the Aznalcóllar mine tailing spill on groundwater. *Sci. Total Environ.*, **1999**, *242*, 189-209.

[32] Gómez-Parra, A.; Forja, J.M.; DelValls, T.A.; Sáenz, I.; Riba, I. Early contamination by heavy metals of the Guadalquivir Estuary after the Aznalcóllar Mining Spill (SW Spain). *Mar. Pollut. Bull*., **2000**, *40*(12), 1115-1123.

[33] Taggart, M.A.; Carlisle, M.; Pain, D.J.; Williams, R.; Osborn, D.; Joyson, A.; Meharg, A.A. The distribution of arsenic in soils affected by the Aznalcóllar mine spill, SW Spain. *Sci. Total Environ.*, **2004**, *323*, 137–152.

[34] Tovar-Sanchez, A.; Huerta-Diaz, M.A.; Negro, J.J.; Bravo, M.A, Sañudo-Wilhelmy, S.A. Metal contamination in interstitial waters of Doñana Park. *J. Environ. Manage*., **2006**, *78*, 286–293

[35] Turner, J.N.; Brewer, P.A.; Macklin, M.G. Fluvial-controlled metal and As mobilisation, dispersal and storage in the Río Guadiamar, SW Spain and its implications for long-term contaminant fluxes to the Doñana wetlands. *Sci. Total Environ*., **2008**, *394*, 144-161.

[36] Olías, M.; González, F.; Cerón, J. C.; Bolívar, J.P.; González-Labajo, J.; García-López, S. Water quality and distribution of trace elements in the Doñana aquifer (SW Spain). *Environ. Geol*., **2008**, *55*, 1555–1568.

[37] Hernández, L.M.; Gómara, B.; Fernández, M.; Jiménez, B.; González, M.J.; Baos, R.; Hiraldo, F.; Ferrer, M.; Benito, V.; Suñer, M.A.; Devesa, V.; Muñoz, O.; Montoro R. Accumulation of heavy metals and As in wetland birds in the area around Doñana National Park affected by the Aznalcollar toxic spill. *Sci. Total Environ*., **1999**, *242*, 293-308.

[38] Benito, V.; Devesa, V.; Muñoz, O.; Suñer, M.A.; Montoro, R.; Baos, R.; Hiraldo, F.; Ferrer , M.; Fernández, M.; González, M.J. Trace elements in blood collected from birds feeding in the area around Doñana National Park affected by the toxic spill from the Aznalcóllar mine. *Sci. Total Environ*., **1999**, *242*, 309-323.

[39] Taggart, M.A.; Figuerola, J.; Green, A.J.; Mateo, R.; Deacon, C.; Osborn, D.; Meharg, A.A. After the Aznalcóllar mine spill: Arsenic, zinc, selenium, lead and copper levels in the livers and bones of five waterfowl species. *Environ. Res*., **2006**, *100*, 349–361.

[40] Sánchez-Chardi, A.; Oliveira Ribeiro, C.A.; Nadal, J. Metals in liver and kidneys and the effects of chronic exposure to pyrite mine pollution in the shrew *Crocidura russula* inhabiting the protected wetland of Doñana. *Chemosphere*, **2009**, *76*, 387–394.

[41] Millán, J.; Mateo, R.; Taggart, M.A.; López-Bao, J.V.; Viota, M.; Monsalve, L.; Camarero, P.R.; Blázquez, E.; Jiménez, B. Levels of heavy metals and metalloids in critically endangered Iberian lynx and other wild carnivores from Southern Spain. *Sci. Total Environ*., **2008**, *399*, 193-201.

[42] Hernández, M.; González, L.M.; Oria, J.; Sánchez, R.; Arroyo, B. Influence of contamination by organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls on the breeding of the spanish imperial eagle (*Aquila adalberti*). *Environ. Toxicol. Chem*., **2008**, *27*(2), 433–441.

[43] Guitart, R.; Clavero, R.; Mateo, R.; Máñez, M. Levels of Persistent Organochlorine Residues in Eggs of Greater Flamingos from the Guadalquivir Marshes (Doñana), Spain. *J. Environ. Sci. Heal. B.*, **2005**, *40* (5) 753-760.

[44] Gómara, B. González, M.J.; Raquel Baos, R.; Hiraldo, F.; Abad, E.; Rivera, J.; Jiménez, B. Unexpected high PCB and total DDT levels in the breeding population of red kite (Milvus milvus) from Doñana National Park, south-western Spain. *Environ. Int.*, **2008**, *34*, 73–78.

[45] Mateo, R.; Millán, J.; Rodríguez-Estival, J.; Camarero, P.R.; Palomares, F,; Ortiz-Santaliestra, M.E. Levels of organochlorine pesti-

cides and polychlorinated biphenyls in the critically endangered Iberian lynx and other sympatric carnivores in Spain. *Chemosphere*, **2012**, *86*(7), 691-700.

[46] Gómez, G.; Baos, R.; Gómara, B.; Jiménez, B.; Benito, V.; Montoro, R.; Hiraldo, F.; González, M. J. Influence of a mine tailing accident near Doñana National Park (Spain) on heavy metals and arsenic accumulation in 14 species of waterfowl (1998 to 2000). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **2004**, *47*, 521-529.

[47] Sánchez López, F.J.; Gil García, M.D.; Martínez Vidal, J.L.; Aguilera, P.A.; Garrido Frenich. Assessment of metal contamination in Doñana National Park (Spain) using crayfish (*Procamburus clarkii*). *Environ. Monit. Assess.*, **2004**, *93*, 17–29.

[48] Vioque–Fernández, A.; Alves de Almeida, E.; Ballesteros, J. ; García-Barrera, T.; Gómez-Ariza, J.L.; López-Barea, J. Doñana National Park survey using crayfish (*Procambarus clarkii*) as bioindicator: Esterase inhibition and pollutant levels. *Toxicol. Lett*., **2007**, *168*, 260–268.

[49] Rico, M.C.; Hernández, L.M.; González, M.J.; Fernández, M.A.; Montero, M. C. Organochlorine and Metal Pollution in Aquatic Organisms Sampled in the Doñana National Park During the Period 1983-1986. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*., **1987**, *39*, 1076-1083.

[50] Romero-Ruiz, A.; Alhama, J.; Blasco, J.; Gómez-Ariza, J.L.; López-Barea, J. New metallothionein assay in *Scrobicularia plana*: Heating effect and correlation with other biomarkers. *Environ. Pollut.*, **2008**, *156*, 1340–1347.

[51] Leoni, S.; Torrice, A.; Chiuchiarelli, G.; Bruscalupi, G.; Cristaldi, M. Cell-cycle protein modifications in the kidney of *Mus spretus* from Doñana National Park. *Environ. Toxicol*., **2008**, *23*, 44-51.

[52] Bonilla-Valverde, D.; Ruiz-Laguna, J.; Muñoz, A.; Ballesteros, J.; Lorenzo, F.; Gómez-Ariza, J.L.; López-Barea, J. Evolution of biological effects of Aznalcóllar mining spill in the Algerian mouse (*Mus spretus*) using biochemical biomarkers. *Toxicology*, **2004**, *197*, 123–138.

[53] Baos, R.; Jovani, R.; Pastor, N.; Tella, J.L.; Jiménez, B.; Gómez, G.; González, M.J.; Hiraldo, F. Evaluation of genotoxic effects of heavy metals and arsenic in wild nestling white storks (*Ciconia ciconia*) and black kites (*Milvus migrans*) from southwestern Spain after a mining accident. *Environ. Toxicol. Chem.*, **2006**, *25*(10), 2794–2803.

[54] Mateo, R.; Taggart, M.A.; Green, A.J.; Cristofol, C.; Ramis, A.; Lefranc, H.; Figuerola, J.; Meharg, A.A. Altered porphyrin excretion and histopathology of greylag geese (*Anser anser*) exposed to soil contaminated with lead and arsenic in the Guadalquivir Marshes, southwestern Spain. *Environ. Toxicol. Chem.*, **2006**, *25*(1), 203–212.

[55] Vioque-Fernández, A.; Alves de Almeida, E.; López-Barea, J. Assessment of Doñana National Park contamination in *Procambarus clarkii*: Integration of conventional biomarkers and proteomic approaches. *Sci. Total Environ*., **2009**, *407*, 1748-1797.

[56] Romero-Ruiz, A; Carrascal, M.; Alhama, J.; Gomez-Ariza, J.L.; Abián, J.; López-Barea, J. Utility of proteomics to assess pollutant response of clams from the Doñana bank of Guadalquivir Estuary (SW Spain). *Proteomics*, **2006**, *6*(1), S245-S255.

[57] Arambarri, P.; Cabrera, F.; González-Quesada, R. Quality evaluation of the surface waters entering the Doñana National Park (SW Spain). *Sci. Total Environ.*, **1996**, *191*, 185-196.

[58] Camacho-Muñoz, M.D.; Santos, J.L.; Aparicio, I.; Alonso, E. Presence of pharmaceutically active compounds in Doñana Park (Spain) main watersheds. *J. Hazard. Mat.*, **2010**, *177*, 1159–1162.

[59] Tortosa, G.; Correa, D.; Sánchez-Raya, A.J.; Delgado, A.; Sánchez-Monedero, M.A.; Bedmar, E.J. Effects of nitrate contamination and seasonal variation on the denitrification and greenhouse gas production in La Rocina Stream (Doñana National Park, SW Spain). *Ecol Eng*, **2011**, *37*,539–548.

[60] Festa, F.; Cristaldi, M.; Ieradi, L.A.; Moreno, S.; Cozzia, R. The Comet assay for the detection of DNA damage in *Mus spretus* from Doñana National Park. *Environ Res*, **2003**, *91*, 54–61.

[61] Martínez-Zamudio, R.; Ha, H.C. Environmental epigenetics in metal exposure. *Epigenetics*, **2011**, *6*, 820–827.

[62] Lewinska, D.; Arkusz, J.; Stanczyk, M.; Palus, J.; Dziubałtowska, E.; Stepnik, M. Comparison of the effects of arsenic and cadmium on benzo(*a*)pyrene-induced micronuclei in mouse bone-marrow. *Mutat. Res*, **2007**, *632*, 37–43.

[63] Saïd, L.; Banni, M.; Kerkeni, A.; Saïd, K.; Messaoudi, I. Influence of combined treatment with zinc and selenium on cadmium induced testicular pathophysiology in rat. *Food Chem. Toxicol*., **2010**, *48*, 2759–2765.

[64] Staneviciene, I.; Sadauskiene, I.; Lesauskaite, V.; Ivanoviene, L.; Kasauskas, A.; Ivanov, L. Subacute effects of cadmium and zinc ions on protein synthesis and cell death in mouse liver, *Medicina (Kaunas)*, **2008**; *44*(2), 131-138.

[65] Kenyon, E.M.; Hughes, M.F.; Adair, B.M.; Highfill, J.H.; Crecelius, E.A.; Clewell, H.J.; Yager, J.W. Tissue distribution and urinary excretion of inorganic arsenic and its methylated metabolites in C57BL6 mice following subchronic exposure to arsenate in drinking water. *Toxicol. Appl. Pharm.*, **2008**, *232*, 448–455.

[66] Brandao, R.; Santos, F.W.; Farina, M.; Zeni, G.; Bohrer, D.; Rocha, J.B.T.; Nogueira. C.W. Antioxidants and metallothionein levels in mercury-treated mice. *Cell. Biol. Toxicol*., **2006**, *22***,** 429–438.

[67] Zalups, R.K. Progressive losses of renal mass and the renal and hepatic disposition of administered inorganic mercury. *Toxicol Appl Pharmacol*., **1995**, *130***,**121–131.

[68] Zalups, R.K. Molecular interactions with mercury in the kidney. *Pharmacol. Rev*., **2000**, *52***,** 113–143.

[69] Zalups, R.K.; Koropatnick, J. Temporal changes in metallothionein gene transcription in rat kidney and liver: Relationship to content of mercury and metallothionein protein, *J. Pharmcol. Exp. Ther*., **2000**, *295*, 74–82.

Received: January 24, 2011 Revised: March 04, 2012 Accepted: March 05, 2012

Journal of Chromatography A, 1282 (2013) 133–141

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma

# Speciation of arsenic in marine food (*Anemonia sulcata*) by liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry and organic mass spectrometry

M. Contreras-Acuña[a,b,c], T. García-Barrera[a,b,c,*], M.A. García-Sevillano[a,b,c], J.L. Gómez-Ariza[a,b,c]

[a] Department of Chemistry and Materials Science, Faculty of Experimental Sciences, University of Huelva, Campus de El Carmen, 21007 Huelva, Spain
[b] Research Center on Health and Environment (CYSMA), University of Huelva, Spain
[c] International Campus of Excellence on Agrofood (ceiA3), University of Huelva, Spain

ARTICLE INFO

*Article history:*
Received 30 October 2012
Received in revised form 15 January 2013
Accepted 16 January 2013
Available online 25 January 2013

*Keywords:*
Arsenic
Speciation
*Anemonia sulcata*
Seafood
Cooking
Mass spectrometry

ABSTRACT

Arsenic species have been investigated in *Anemonia sulcata*, which is frequently consumed food staple in Spain battered in wheat flour and fried with olive oil. Speciation in tissue extracts was carried out by anion/cation exchange chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-(AEC/CEC)–ICP-MS). Three methods for the extraction of arsenic species were investigated (ultrasonic bath, ultrasonic probe and focused microwave) and the optimal one was applied. Arsenic speciation was carried out in raw and cooked anemone and the dominant species are dimethylarsinic acid ($DMA^V$) followed by arsenobetaine (AB), $As^V$, monomethylarsonic acid ($MA^V$), tetramethylarsonium ion (TETRA) and trimethylarsine oxide (TMAO). In addition, arsenocholine (AsC), glyceryl phosphorylarsenocholine (GPAsC) and dimethylarsinothioic acid (DMAS) were identified by liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry (HPLC–MS). These results are interesting since GPAsC has been previously reported in marine organisms after experimental exposure to AsC, but not in natural samples. In addition, this paper reports for the first time the identification of DMAS in marine food.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

The toxicity of inorganic arsenic species is a well-known fact. Some marine organisms can accumulate arsenic from ~2 $\mu g\,L^{-1}$ that is the typical level in seawater [1] to in some instances several hundreds of $\mu g\,g^{-1}$ (dry weight) [2,3]. Arsenic can be found in the environment in form of inorganic species such as arsenate ($As^V$) and arsenite ($As^{III}$) as well as the organic species monomethylarsonic acid ($MA^V$), dimethylarsinic acid ($DMA^V$), arsenobetaine (AB) and trimethylarsine oxide (TMAO) [4]. Arsenate is the major specie present in oxic seawater [5,6], but biotransformations involving several organisms convert this specie to less toxic methylated forms (MA and DMA) via reduction to arsenite, also toxic [7]. Although this biomethylation of inorganic arsenic (iAs) has been considered as a detoxification mechanism during the last decades, methylated trivalent arsenicals are toxic intermediates that convert it into an intoxication process. Methylated trivalent arsenicals are more toxic than the pentavalent ones [8,9] and in this way, $MA^{III}$ and $DMA^{III}$ have recently been considered to play a role as cancer promoters in humans [10,11]. These compounds are further transformed by marine organisms into non-toxic species such as AB and a variety of arsenoribosides [2,12]. On the other hand, the biotransformation of arsenic species in marine organisms is complex, depends on the organism and more than 50 different species have been identified to date [13,14]. In fish and crustaceans, AB is the most abundant arsenic specie along with traces of $MA^V$, $DMA^V$, tetramethylarsonium ion (TETRA) and TMAO [15,16]. However, in marine algae, arsenosugars (derivatives of dimethylarsinoylribosides and trimethylarsonioribosides) are the dominant arsenic species [2,14,17].

For mammals, inorganic forms of arsenic (arsenate ($As^V$) and arsenite ($As^{III}$) are more toxic, while methylated forms ($MA^V$ and $DMA^V$) are considered only moderately toxic [18,19]. Other arsenic species, like TMAO and TETRA are also considered moderately toxic, whereas arsenobetaine (AsB), arsenocholine (AsC) and other arsenosugars (AsS) are considered as innocuous [20]. In humans, once ingested, soluble forms of As are readily absorbed from the gastrointestinal tract to the bloodstream and distributed to organs. Inorganic As can be metabolized by consecutive reduction and oxidative biomethylations after ingestion, then it is converted to methylarsenic ($MA^V$) and dimethylarsenic ($DMA^V$), which contain arsenic in a trivalent or pentavalent oxidation state [21].

* Corresponding author at: Department of Chemistry and Materials Science, Faculty of Experimental Sciences, University of Huelva, Campus de El Carmen, 21007 Huelva, Spain. Tel.: +34 959 219962; fax: +34 959 219942.
*E-mail address:* tamara@dqcm.uhu.es (T. García-Barrera).

0021-9673/$ – see front matter © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.068

Comparatively little is known about the formation of thiol-organoarsenic species as well as their environmental toxicity and potentially harmful effects on human health. Two thiol-organoarsenic species, dimethylarsinothioic acid (DMAS) and dimethyldithioarsinic acid have recently been reported in vegetation, animals, human beings [22–28] and in landfill leachate [29]. The first characterization of a thio-organoarsenate (2-dimethylarsinothioyl acetic acid) isolated from a biological source (sheep's urine) was performed in 2004 [30]. DMAS was first reported in sheep urine, been wrongly identified as dimethylarsinous acid ($DMA^{III}$) [22]. Cytotoxicity testing with HepG2 cells derived from human hepatocarcinoma indicated that DMAS is about 10-fold more cytotoxic than DMA [23]. In addition, cytotoxic intermediates are generated by the interaction of DMAS with glutathione (GSH), while an excessive amount of GSH suppressed the generation of these intermediates [31]. Moreover, DMAS induced cell-cycle arrest, aneuploidy, chromosome structural aberrations, apoptotic mode of cell death, and abnormalities of spindle organization and centrosome integrity [31].

The extraction of arsenic species has been carried out using different procedures, but actually the ultrasonic probe has become the method of choice for speciation analysis in a great number of papers [32–35]. Among the ultrasonic generating instruments, the most commonly used are the ultrasonic bath and the ultrasonic probe. With the probe the transmission of acoustic energy in the medium is direct since the probe is introduced into the sample. The power can be amplified and for this reason the transmitted energy can be 100-fold higher than those obtained with an ultrasonic bath [36]. In spite of the good performance of traditional microwave ovens, the use of focused microwave radiation could be advantageous because of the better safety conditions due to the operation at atmospheric pressure and simultaneous control of different heating programs for each sample independently [37]. Focused microwave assisted extraction at atmospheric pressure has given satisfactory results for the quantitative extraction of PAHs, polychlorobiphenyls and pesticides from environmental matrices [38–41] with advantages of security, easy manipulation and sample preparation automatization. Microwave irradiation is often used instead of conventional heating because the solvent is rapidly heated in a reproducible way. Moreover, the selective interaction with polar molecules allows both local heating and extraction efficiency to be improved [41].

The most successful approaches for arsenic species separation and detection involve the use of liquid chromatography coupled to an element specific detector, such as atomic fluorescence spectroscopy (HPLC-AFS) [42,43] or inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) [4,13,44–46]. Detection of the different arsenic species by using ICP-MS is generally accepted as the most powerful method, although it gives only elemental information. Thus the combination of the element specific detector with organic mass spectrometry, usually with an electrospray ionization source (ESI) is necessary to obtain unequivocal results. To this end, 50 different species have been identified in marine organisms by HPLC with selected reaction monitoring electrospray tandem mass spectrometry [46].

In Spain, *Anemonia sulcata* is frequently consumed battered in wheat flour and fried with olive oil. This anemone, autochthonous of the Iberian Peninsula has a cylindrical form, is approximately 6 cm tall and 3 cm wide and attach themselves to submarine rocks. In this paper, speciation of arsenic has been carried out in raw and cooked *A. sulcata*. For this purpose, rapid and efficient extraction methods based on focused techniques (ultrasonic probe and focused microwave) have been optimized. The speciation of arsenic using anion exchange chromatography (AEC) and cation exchange chromatography (CEC) has been performed by HPLC–ICP-MS and HPLC–MS.

## 2. Experimental

### 2.1. Standard solutions, reagents and samples

All reagents used for sample preparation were of the highest available purity. Sodium arsenite and sodium arsenate, used for preparation of arsenic (III) and arsenic (V) standards, respectively, by dissolution in ultrapure water, and arsenobetaine (AsB) were purchased from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany). Monomethylarsonic acid ($MMA^V$) and dimethylarsinic acid ($DMA^V$) were purchased from Supelco (Bellefonte, USA). Dimethylarsinothioic acid (DMAS) was synthesized and supplied by Dr. Vélez and Dr. Devesa (Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC), Valencia, Spain). Tetramethylarsonium ion (TETRA) and trimethylarsine oxide (TMAO) (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) were donated by Dr. Riansares Muñoz (Universidad Complutense de Madrid).

Individual solutions for HPLC–ICP-MS analyses were prepared at 1 mg $mL^{-1}$ of each compound. Working solutions were prepared daily by appropriate dilution of the stock solutions with water. The stock solutions were stored at 4 °C in darkness.

Ammonium carbonate $(NH_4)_2CO_3$ (Fluka), ammonium hydroxide (Sigma–Aldrich), pyridine purchased from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany), and formic acid (>98%, Fluka, puriss, p.a.) were used to prepare the mobile phases of AEC and CEC.

For total element determination, nitric acid (65 mass%) and hydrogen peroxide (30 mass%) of Suprapur® grade (Merck, Darmstadt, Germany) were used for mineralization of the samples.

Calibration of the mass spectrometer was performed daily using the standards kit from Applied Biosystems (PE Sciex, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A tuning solution containing Li, Y, Tl, Co and Ce (1 μg $L^{-1}$ each) used for the ICP-MS optimization was purchased from Agilent Technologies (USA).

Samples of raw anemones where purchased in a local restaurant of Huelva (Southwest Spain). Cooked anemones were prepared from the whole animal that was battered in wheat flour and fried with olive oil.

The validation of the methodology for total arsenic determination and speciation was carried out with a certified material of dogfish muscle (DORM-2, National Council of Canada).

### 2.2. Total arsenic determination

A microwave accelerated reaction system model MARS (CEM Corporation, Matthews, NC, USA) was used for the mineralization of the samples. First of all, 20 anemones were pooled and freeze-dried. From the lyophilized pool, ~100 mg were digested in a microwave reaction system using 800 μL of a mixture of $HNO_3$:$H_2O_2$ (4:1, v/v). The resulting solution was made up to 10 mL and filtered through iso-disc poly(vinylidene difluoride) filters (25 mm diameter, 0.45 μm pore-size). The total content of arsenic was measured using an Agilent 7500ce ICP-MS spectrometer (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) equipped with an octopole collision cell. The internal standard used for the calibration curves was rhodium (Rh) at 1 μg $L^{-1}$.

The ICP-MS conditions (Table 1) in He mode were optimized using an aqueous solution of 1 μg $mL^{-1}$ of $^{75}As$ with 2 vol.% HCl. The flow-rate of He collision gas was set at 3.9 mL $min^{-1}$ in order to avoid the interference of $^{40}Ar^{35}Cl^+$. The detection limit of the method for total arsenic is 6.5 ng $g^{-1}$. The recovery of total arsenic is 95% ($n = 5$) of the certified value (18.0 ± 1.1 μg $g^{-1}$) in dogfish muscle (DORM-2, National Council of Canada).

A blank with the reagents used for total arsenic determination was run simultaneously to the sample preparation. Acid digestion of wheat flour was carried out using the same procedure previously described for the anemones. The total concentration of arsenic in

**Table 1**
Operating conditions of HPLC-ICP-ORC-MS.

| IEC conditions | | | |
|---|---|---|---|
| Anion-exchange chromatography | Column | Hamilton PRP X-100 (250 mm × 4.6 mm × 5 μm) | |
| | Mobile phase | Ammonium carbonate, 50 mM (pH 8.5) | |
| | Flow-rate | 0.8 mL $min^{-1}$ | |
| | Injection volume | 50 μL | |
| Cation-exchange chromatography | Column | Supelcosil SCX (250 mm × 4.6 mm × 5 μm) | |
| | Mobile phase | Pyridine, 20 mM (pH 2.5) | |
| | Flow-rate | 1.0 mL $min^{-1}$ | |
| | Injection volume | 50 μL | |
| **ICP-MS conditions** | | | |
| Forward power | 1500 W | He flow | 3.9 mL $min^{-1}$ |
| Plasma gas flow-rate | 15.0 L $min^{-1}$ | $Q_{oct}$ | −18 V |
| Auxiliary gas flow-rate | 1.0 L $min^{-1}$ | $Q_p$ | −16 V |
| Carrier gas flow-rate | 0.9 L $min^{-1}$ | Dwell time | 0.3 per isotope |
| Sampling depth | 8 mm | Isotopes monitored | $^{75}As$, $^{103}Rh$ |
| Sampling and skimmer cones | Nickel | – | – |

wheat flour is 16 ± 1.2 ng $g^{-1}$ that represent only about 0.3 and 0.9% of the total arsenic in raw and cooked samples. The total concentration of arsenic in the cooking olive oil was measured using a previously described procedure [47].

### 2.3. Extraction of arsenic species from raw and cooked anemones

For the extraction of arsenic species from anemones, 5 mL of a mixture of methanol/water (1:1, v/v) was added to 0.1000 g of a lyophilized pool of 20 anemones (raw or cooked). Three different methods were used:

(i) *Ultrasonic bath*: An ultrasonic bath model Powersonic 510 (Hwashin Tecnology, Korea) was used. The species were extracted using a previously described method for speciation of arsenic in mussels [45]. The extraction was carried out with a power of 510 W during 30 min at 25 °C.
(ii) *Ultrasonic probe*: An ultrasonic probe model UW 2200 (Bandelin Electronic, Berlin, Germany) was used. The extraction was carried out during 3 min at 550 W.
(iii) *Focused microwave*: The extraction of the arsenic species was also carried out in a focused microwave model Discover equipped with an automatic arm model Explorer (CEM Corporation, Matthews, USA). The sample prepared as above described was introduced in a Pyrex reactor and the extraction was carried out at 50 °C during 5 min with magnetic stirring. The temperature control in the instrument is carried out with a stream of compressed air and the power was set at 150 W.

After each procedure the extract was centrifuged at 10,000 rpm during 10 min using a centrifuge model 5804 R (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Then, the supernatant was filtered using a GF/C glass fiber filter with a diameter of 1.98 cm. The total volume was evaporated until dryness under vacuum at 50 °C in a rotary evaporator. Finally, 1 mL of ultrapure water was added and analyzed. A rotary evaporator (Buchi R-114) was used to reduce the volume of the extracts. All the filters were cleaned with 5 mL of the extracting solution before the use to avoid the contamination of the samples.

### 2.4. Chromatographic separation and detection of arsenic species by ICP-MS: stability of the arsenic species

Elemental detection was performed with an inductively coupled plasma mass spectrometer model Agilent 7500ce (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) equipped with an octopole collision cell and a micromist nebulizer. Chromatographic separations were performed using a Model 1100 HPLC pump as the delivery system (Agilent, Wilmington, DE, USA). The HPLC–ICP-MS conditions are shown in Table 1.

The separation of the arsenic species was performed in a 25 cm × 4.1 mm Hamilton PRP X-100 column (Hamilton, Reno, NV, USA). The mobile phase contained 50.0 mM of $(NH_4)_2CO_3$ at pH = 8.5 (adjusted with 5 N ammonium hydroxide) and was flushed at 0.8 mL $min^{-1}$ through the column [48]. Since AB, TETRA (tetramethylarsonium ion) and TMAO coelute in this column, the separation was carried out using a cation exchange column [49] (Supelcosil LC-SCX, 25 cm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase used was 20 mM pyridine at pH 2.5 as mobile phase at 1 mL $min^{-1}$. A 1100 Series HPLC pump (Agilent, Germany) was used to separate the arsenic species.

One important aspect considered was the As species stability in anemone extracts during storage. A crucial requirement to obtain relative concentration of arsenic species is to maintain the concentration of the original chemical species in the sample extract before the analysis. This is a special requirement for speciation analysis. Feldmann et al. [50] evaluated the stability of arsenic species in freshly collected urine samples and they found that the freshly collected urine samples are stable for at least 2 months when stored at temperatures under either 4 °C or −20 °C. On the other hand, other authors have evaluated the stability of arsenic species in rice extracts during 2 months at different temperatures and solvents [51]. In our study, in order to evaluate how long the extracts could be stored without the risk of any species loss or transformation, an evaluation of stability of different arsenicals in anemones extracts was carried out during 3 months (time required to complete this work). Once the samples were prepared, they were stored at −80 °C in 6 different aliquots of 100 μL for triplicate in an Eppendorf vial. The measurements of $As^V$, $MA^V$, $DMA^V$, AB, AsC, DMAS, TETRA and TMAO were carried out every 15 days by anionic and cationic exchange chromatography (AEC/CEC-ICP-MS). The results obtained in the stability study are presented in Fig. 1S (see electronic supplementary material) in which we can see the concentration of each species in the extract along the experiment. In general, processing or storage by freezing do not change the arsenic species concentration or alter the speciation pattern greatly; however, a significant decrease of AB (4% in 90 days) and AsC (12% in 90 days) concentrations after storage was observed. Decreased levels of AB were found at the end of the experiment and would be related with degradation to $DMA^V$ during storage an increase of 3% in $DMA^V$ concentration was observed after 75 days of storage, similar results have been observed in urine sample after 8 months stored [50]. In addition,

decreased levels of AsC were observed along the experiment time as a result of oxidation to AB. The loss of arsenocholine (AC) in blue mussels following storage (frozen for 3 months) has been reported for other authors [52]. Finally, significant increase in the TETRA concentration (11% in 90 days) was observed, this is probably due to a degradation of AB, as has been recently reported in fish tissue [53].

Supplementary material related to this article found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.068.

### 2.5. Identification of arsenic species by HPLC coupled to mass spectrometry

For the standardless identification of arsenic species, HPLC was coupled to a triple quadrupole instrument model API 2000 (AB/MDS Sciex, Concord, Canada) via an electrospray (ESI) interface using a PEEK tube. The flow-rate was reduced to 300 μL min$^{-1}$ using a post-column split. To enhance sensitivity, 10% (v/v) of formic acid was added to the anion exchange chromatographic mobile phase and the source temperature was maintained at 400 °C. Data were collected in positive ion mode (ES$^+$) and the mass analyzer scanned from $m/z$ 50 to 400. The ionspray voltage (IS) was set at 5500 V and the declustering and focusing potentials (ring potentials) at 30 and 400 V, respectively. The curtain gas and nebulizer gas (high purity nitrogen) were fixed at 15 and 10 units, respectively. The ion energy (IE) was fixed at 0.5 V with a channel electron multiplier (CEM) of 2500 V. In the experiment, the entrance potential (EP) was set at 10 V and collision cell rod offset (RO2) at −20 V. The scan time was equal to 0.5 s. Data were treated with the manufacturer's software (Analyst 4.1).

The collision energy and declustering potential in the product ion mode varied between the experiments and therefore it was optimized as appropriate. Table 2 shows the optimal conditions for tandem mass spectrometry and ion transitions used for Multiple Reaction Monitoring (MRM). In all the experiments, collision cell exit potential (CXP) was set at 2 V and collision gas (CAD) at 5 units.

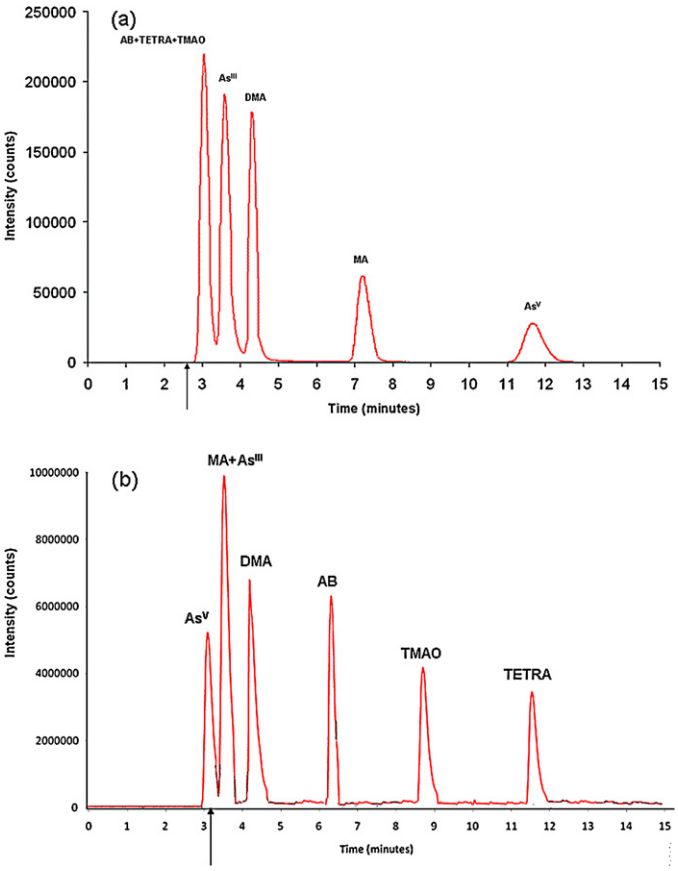



**Fig. 1.** Chromatogram (a): HPLC-(AEC)–ICP-MS chromatogram of the standards at 100 μg L$^{-1}$ of each (as As). Chromatogram (b): HPLC-(CEC)–ICP-MS chromatogram of the standards at 100 μg L$^{-1}$ of each (as As). The black arrow in the abscissa indicates the void volume of the columns. Operating conditions of HPLC–ICP-ORC-MS are summarized in Table 1.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Optimization of the extraction procedure

Three different extraction procedures were compared for the speciation of arsenic in the sea anemone, namely: (i) ultrasonic bath, (ii) ultrasonic probe and (iii) focused microwave. For the extraction of arsenic species by ultrasonic bath a previously validated method was used [48]. The extraction procedures investigated in this work are very simple since only few variables were found to affect the recovery of the analytes. For the extraction with focused techniques the most important variable is the extraction time. This variable was optimized from 3 to 15 min and the optimum corresponds to 3 min for the ultrasonic probe and 5 min for the focused microwave for all the analytes. However, using the ultrasonic bath the time required for an efficient extraction is 30 min. The temperature in the focused microwave enhances the extraction of the analytes, but temperatures higher than 50 °C do not increase extraction yield and taking into account that higher values affect the stability of the arsenic species, 50 °C was selected for further experiments. With the ultrasonic probe the power was optimized, but we did not observe any change in the response of the analytes.

The recovery assays were carried out with ten portions of a pooled sample of 20 anemones fortified with 50 μg g$^{-1}$ ($n$ = 5) of AB, DMA$^V$, MA$^V$, As$^V$, As$^{III}$, TMAO and TETRA. For AB, the recovery is 85% using either ultrasonic probe or the focused microwave. The recovery of AB with the ultrasonic bath is 80%. For the other species the results are very similar and higher than 80% in all the cases using either the ultrasonic probe or the focused microwave. Although the results obtained with focused microwave and ultrasonic probe were very similar, the last one was selected in further experiments since sample preparation is automatized which represents an evident simplification of the analysis. Finally, the extraction method based on the focused microwave was validated using a certified reference material of dogfish muscle. The recovery of AB in the certified reference material is 85% ($n$ = 3) of the certified value (16.4 ± 1.1 μg g$^{-1}$). The concentration of DMA$^V$ and TETRA in this reference material has been previously reported by other authors as 0.27 ± 0.06 and 0.20 ± 0.09 μg g$^{-1}$, respectively [54,55]. With the focused microwave extraction, the recoveries of DMA$^V$ and TETRA are 90% and 95% of the reported value, respectively.

### 3.2. Speciation of arsenic in raw and cooked A. sulcata

The concentration of the species was measured by internal calibration using rhodium as internal standard. The detection and quantification limits (LODs and LOQs, respectively) were calculated with the data generated in the linearity studies. After reshaping the calibration function, LOD and LOQ were calculated as the analyte concentration that corresponds to a signal equal to "$a$ + 3 $Sy/x$" and "$a$ + 10 $Sy/x$", respectively, where "$a$" is the origin ordinate, and "$Sy/x$" represents the random errors in the values for the slope and intercept. The detection limits using HPLC–ICP-MS are 5.9, 4.6, 4.1, 4.1, 5.2, 1.0 and 3.5 ng g$^{-1}$, for AB, DMA, MA, As$^V$, As$^{III}$, TMAO and TETRA, respectively.

**Table 2**
Operating conditions for tandem mass spectrometry.

| Arsenic species | Declustering potential (V) | Collision energy (V) | Ion transitions in MRM mode |
|---|---|---|---|
| AB | 80 | 30 | 179 → 120/179 → 105 |
| AsC | 80 | 30 | 165 → 121/165 → 105 |
| DMAS | 80 | 50 | 155 → 137/155 → 121/155 → 109 |
| GPAsC | 80 | 50 | 317 → 226/317 → 165/317 → 121 |

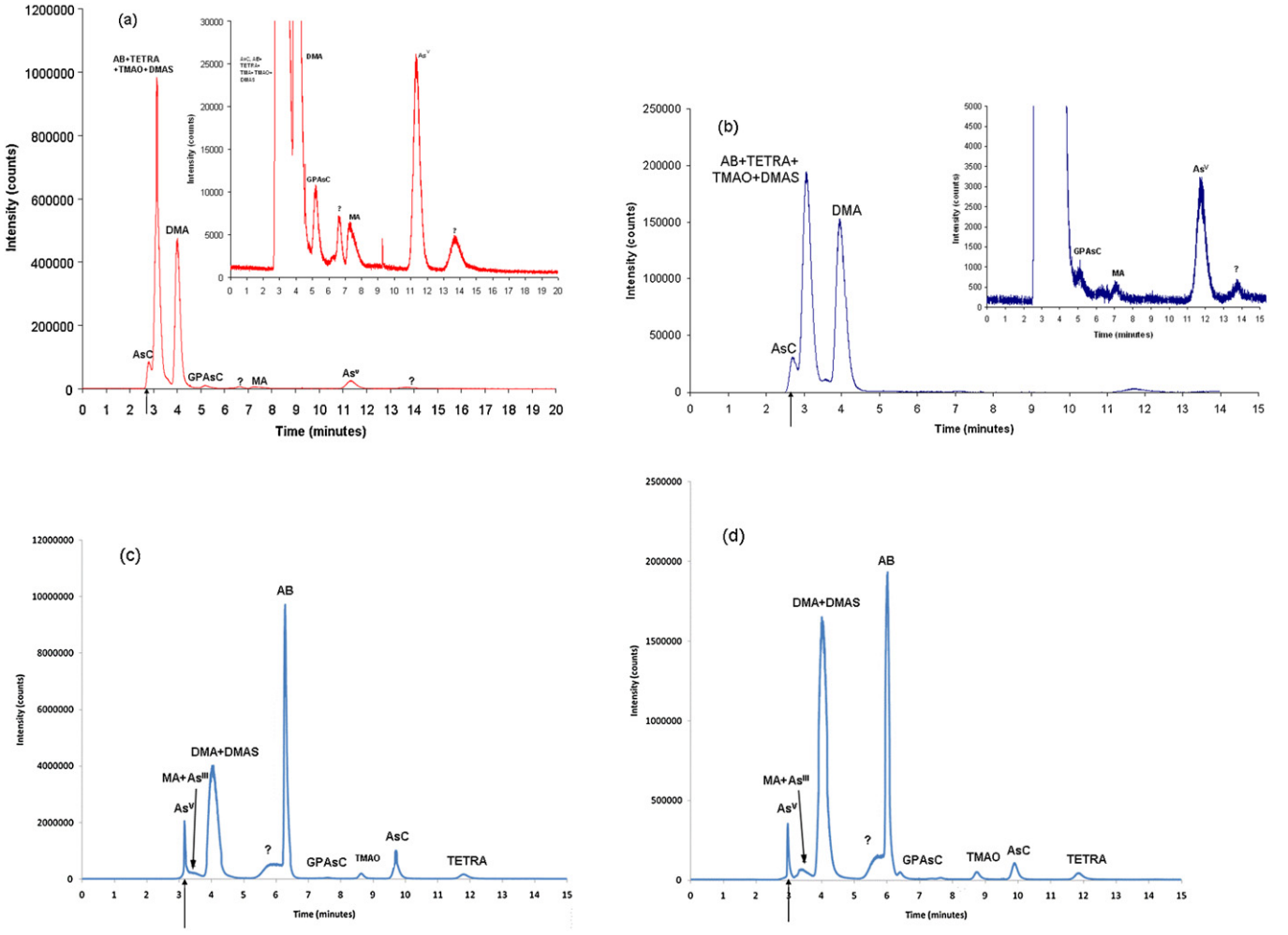



**Fig. 2.** Chromatograms obtained from a pool of anemones raw (a) and cooked (b) using HPLC-(AEC)–ICP-MS and HPLC-(CEC)–ICP-MS (raw, c and cooked, d). The black arrow in the abscissa indicates the void volume of the columns. Operating conditions of HPLC–ICP-ORC-MS are summarized in Table 1. The insets of (a) and (b), represent the same chromatograms magnified.

Fig. 1a and b shows typical chromatograms of a solution containing 100 μg $L^{-1}$ of the standards (as As) obtained by HPLC-(AEC)–ICP-MS and HPLC-(CEC)–ICP-MS, respectively, and Fig. 2, the chromatograms obtained from a raw (Fig. 2a) and cooked sample (Fig. 2b) using the same approach. In these samples, AB, $DMA^V$, $MA^V$ and $As^V$ were clearly identified by retention time matching with the standards using HPLC-(AEC)–ICP-MS and they were later confirmed using HPLC–MS. However, four unidentified peaks were

**Table 3**
Speciation of arsenic in raw and cooked anemones.

Raw anemones (ng $g^{-1}$ as As ± $\sigma$[a])

| AB | DMA | MA | $As^V$ | TETRA | TMAO | AsC | GPAsC | DMAS | Total arsenic | Total arsenic (as sum of the species) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1156 ± 20 | 1541 ± 11 | 79 ± 2 | 295 ± 9 | 160 ± 6 | 48 ± 3 | 302 ± 8 | 105 ± 4 | 983 ± 47 | 4905 ± 52 | 4669 |

Cooked anemones (ng $g^{-1}$ as As ± $\sigma$[a])

| AB | DMA | MA | $As^V$ | TETRA | TMAO | AsC | GPAsC | DMAS | Total arsenic | Total arsenic (as sum of the species) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 504 ± 10 | 897 ± 18 | ND | 90 ± 3 | 36.2 ± 0.4 | 11.2 ± 0.5 | 65 ± 4 | ND | 105 ± 15 | 1758 ± 15 | 1708 |

ND, not detected.
[a] Standard deviation of three extractions of the same sample that was a pool of 20 anemones ($n$ = 10).

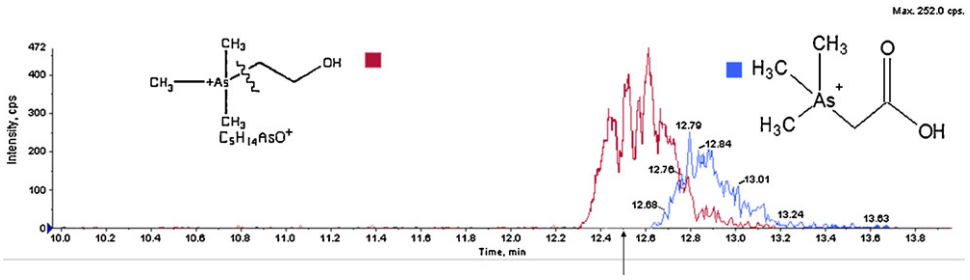



**Fig. 3.** Extracted chromatogram of the MRM transitions of AsC ($m/z$ transition 165 → 105; red chromatogram) and AB ($m/z$ transition 179 → 120; blue chromatogram) obtained from raw anemones. Delay time of 10 min in the injection. Chromatographic conditions used for HPCL-(AEC) are given in Table 1. The black arrow in the abscissa indicates the void volume of the column. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

detected (Fig. 2a). A latter study based on organic mass spectrometry (Section 3.3) allows the identification of them as arsenocholine (AsC, Fig. 2a) and glyceryl phosphorylarsenocholine (GPAsC, Fig. 2a) as well as several arsenic species that coelute with AB (Fig. 2a): dimethylarsinothioic acid (DMAS), TETRA and TMAO. The identification of other two peaks (Fig. 2a) using HPLC–MS was not possible. In Fig. 2, we can also see the chromatograms obtained from a raw (c) and cooked samples (d) using the coupling HPLC-(CEC)–ICP-MS which allows the quantification of AsC that elutes almost in the void volume of the anionic column, and the separation of TETRA (Fig. 2c) and TMAO (Fig. 2c) species that coelute with AB using HPLC-(AEC)–ICP-MS.

The presence of all the arsenic species was confirmed by HPLC–MS (Section 3.3) and the concentrations in raw and cooked

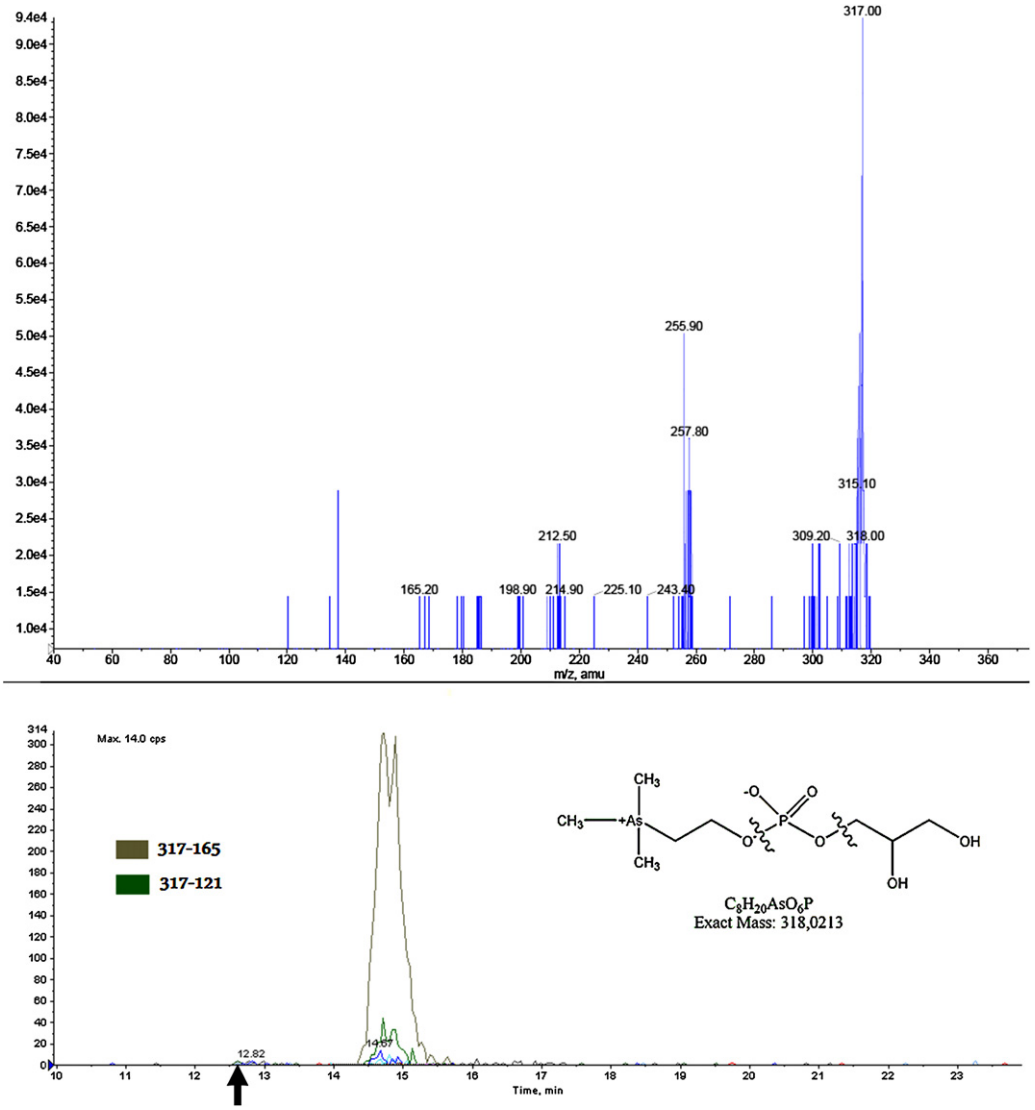



**Fig. 4.** Extracted chromatogram of the MRM transitions for GPAsC ($m/z$ transitions: 317 → 165/317 → 121) obtained from raw anemones and MS/MS spectra of 317 $m/z$. Delay time of 10 min in the injection. Chromatographic conditions used for HPCL-(AEC) are given in Table 1. The black arrow in the abscissa indicates the void volume of the column.

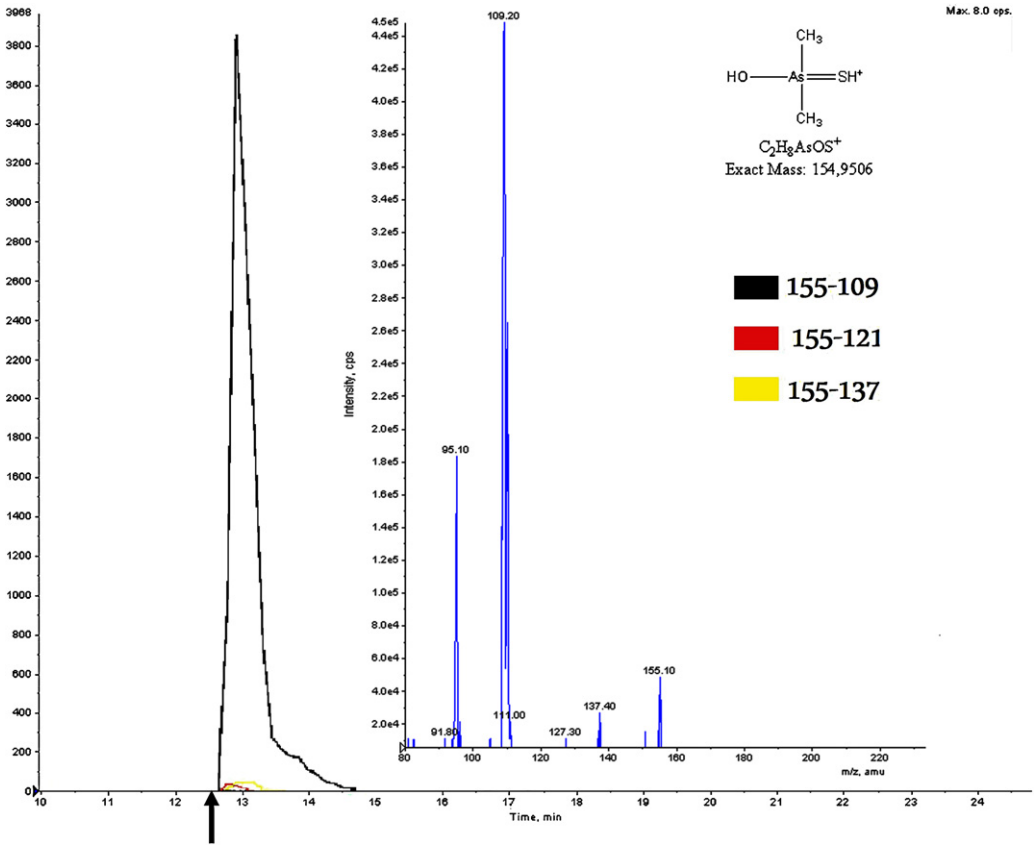



**Fig. 5.** Extracted chromatogram of the MRM transitions for DMAS ($m/z$ transitions: 155 → 137/155 → 121/155 → 109) obtained from raw anemones and MS/MS spectra of $m/z$ 155. Delay time of 10 min in the injection.

samples were measured using HPLC-(AEC)–ICP-MS except for TMAO, AsC and TETRA that were measured by HPLC-(CEC)–ICP-MS and, AB and DMAS by HPLC-(AEC)–MS using multiple reaction monitoring (MRM). Since the standards of AsC, GPAsC and DMAS were not available, they were quantified using the standard calibration curve of DMA. Results obtained are collected in Table 3 where all the concentrations are referred as As. It can be observed that total arsenic concentration, calculated as the sum of the species identified in the samples, accounts for almost total arsenic present in the samples, representing 95% and 97% in raw and cooked samples, respectively. The total concentrations of arsenic in raw and cooked anemones are 4905 and 1758 ng $g^{-1}$, respectively (dry weight). This means that 64% of the total arsenic is lost after cooking that is in good agreement with a previous report about the 60% of total arsenic loss in the seaweed *Hizikia fusiforme* (which has a very high inorganic arsenic content) after treatment with traditional washing and soaking [56]. On the basis of this finding, the total concentration of arsenic in the cooking olive oil was measured and it represents 90% of the total arsenic released from the anemones. Although the decrease of total arsenic in seafood after cooking has been previously reported, the increase of this element is also possible, usually correlated with the weight losses and moisture concentration changes [56].

Although AB has been reported as the major species in most marine organisms, DMA is the dominant one in *A. sulcata* representing about 31% of the total arsenic in raw and 51% after cooking. The presence of AB is also important and accounts for 24% (raw) and 29% (cooked) of total arsenic, followed by DMAS (20% in raw and 6% in cooked), AsC (6% in raw and 4% in cooked), $As^V$ (6% in raw and 5% in cooked), TETRA (3% in raw and 2% in cooked), GPAsC (2% in raw and below the detection limit in cooked), MA (1.6% in raw and under detection limit in cooked) and TMAO (1% in raw and 0.6% in cooked). As previously reported for seafood [44,57], the percentage of inorganic arsenic (6% in raw and 5% in cooked) does not exceed 10% of the total arsenic. On the other hand, the concentration of all the species in cooked anemones decreases significantly against those present in raw anemones (Table 3). In this sense, in cooked anemones the concentration of AB and DMA is about 2-fold lower, MA and GPAsC are not present, and concentrations of $As^V$, TETRA, TMAO, AsC and DMAS are much lower, especially the last. However, the relative concentrations of the species (%) against the total concentration of As in raw and cooked anemones are almost the same for all the species, except for DMA and DMAS which represent an opposite trend, increasing the concentration of DMA with cooking and decreasing DMAS. These results represent a positive outcome for consumers since cytotoxicity test involving HepG2 cells derived from human hepatocarcinoma indicated that DMAS is about 10-fold more cytotoxic than DMA [23].

It has been reported an increase of inorganic arsenic, DMA and TETRA (tetramethylarsonium ion) in some types of seafood when they are baked, fried or grilled and the surface of the product may reach high temperatures [58]. It has also been checked that TETRA is formed by decarboxylation and methylation of AB [58]. However, our results show that concentrations of TETRA, TMAO and inorganic arsenic decrease after cooking the anemones.

Speciation of arsenic has been previously carried out in nine different types of anemones in an environmental study published elsewhere [59] but not in *A. sulcata*. The total concentration of arsenic in these anemones ranged from 1600 to 7000 ng $g^{-1}$ that is 4-fold lower than that in *A. sulcata* (Table 3, raw anemones: 4905 ng $g^{-1}$) and some arsenic species are different. Thus usual arsenic species in anemones are AB, trimethylarsoniopropionate

(TMAP), AsC and TETRA while arsenate, MA, DMA and TMAO are absent in all the samples [59]. As commented before, in *A. sulcata* DMA is the dominant specie and, MA and TMAO are also present.

### 3.3. Identification of arsenic compounds in A. sulcata by HPLC–MS

Two of the four arsenic compounds that do not match with any standard in HPLC-(AEC)–ICP-MS (Fig. 2a) of extracts from *A. sulcata* were identified by HPLC-(AEC)–MS as AsC [60] and glyceryl phosphorylarsenocholine (GPAsC). The retention times were 2.7 min for AsC (almost in the void volume, Fig. 3) and 5.1 min for GPAsC (Fig. 4). It has been reported that mussels exposed to AsC had AB as the major arsenic compound in their tissues and GPAsC as a minor [61], which is in good agreement with the concentrations measured in unexposed anemones (Table 3). GPAsC and phosphatidylarsenocholine have also been identified in yelloweye mullet (*Aldrichetta forsteri*) after oral administration of AsC [62]. In *A. sulcata*, the MS/MS of the molecular ion of GPAsC at $m/z$ 317 (Fig. 4) gives the $m/z$ 165 ion, indicating the possible presence of arsenocholine $[(CH_3)_3As(CH_2)_2OH]^+$. The $m/z$ 121 is also consistent with this hypothesis as it can be assigned to $[(CH_3)_3AsH^+]$. The peak with $m/z$ 225 can be assigned to the arsenocholine ion with a phosphate group that looses a molecule of $H_2O$. Finally, the $m/z$ 317 can be assigned to the deprotonated GPAsC.

In addition, using organic mass spectrometry, dimethylarsinothioic acid (DMAS) (Fig. 5) was identified at the same retention time of AB. The other two arsenicals detected by HPLC-(AEC)–ICP-MS (Fig. 2a) and that detected by HPLC-(CEC)–ICP-MS (Fig. 2c), were not identified because of their low concentrations in the samples. The presence of DMAS has been previously reported in vegetation, animals, human beings [22–26] and in landfill leachate [29]. The compound identified as DMAS (Fig. 5) corresponds to the molecular ion $m/z$ 155 $[(CH_3)_2As(=S)(OH)+H^+]$ and the fragmentation pattern is the same than that previously described for this specie [29]. The daughter ion at $m/z$ 137 corresponds to $[M+H^+]–H_2O$ to give $[(CH_3)_2AsS]^+$ and the fragment at $m/z$ 109 is a daughter ion of $[M+H^+]–H_2O$ with a loss of two methyl groups.

## 4. Conclusions

The present paper reports for the first time the speciation of arsenic in *A. sulcata* that is consumed and highly appreciated in the south of Spain. The combination of anion/cation exchange chromatography coupled to ICP-MS with organic mass spectrometry allowed the standardless identification of arsenocholine (AsC), glyceryl phosphorylarsenocholine (GPAsC) and dimethylarsinothioic acid (DMAS), a thiol-organoarsenic specie. GPAsC has been reported for the first time in a natural sample (not exposed to AsC) while DMAS has been reported for the first time in seafood. In raw samples of *A. sulcata* the dominant species are: DMA > AB > DMAS > AsC > $As^V$ > TETRA > GPAsC > MA > TMAO, in raw anemones. After cooking the anemones, battered in wheat flour and fried with olive oil, 64% of the total arsenic is lost, about 90% is released to the cooking olive oil and the order of predominant arsenic species is the same, but GPAsC and MA are absent. Three simple and rapid extraction methods that allow very good recoveries have been optimized and validated. The focused microwave used in this paper has several advantages including safety, easy of operation and automatization of sample preparation. The ICP-MS constitutes a powerful technique for the speciation of arsenic since it provides very low detection limits. In addition, the use of the collision cell eliminates suitably the interferences on the arsenic signal some of them caused by the complex matrix that has been analyzed. However, this technique should be combined with organic mass spectrometry since in real samples the presence of unidentified arsenicals is very common.

## Acknowledgments

The authors thank the Spanish "Ministerio de Educación y Ciencia (MEC)" project CTM2009-12858-C02-01 and the projects P08-FQM-03554 and P09-FQM-4659 from the Consejería de Innovación Ciencia y Empresa (Junta de Andalucía) for funding. The authors also thank Dr. Vicenta Devesa and Dinoraz Vélez (Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC), Valencia, Spain) and Dr. Riansares Muñoz (Universidad Complutense de Madrid) for the kind donation of TMAO, TETRA and DMAS. M.A. García Sevillano thanks the Ministerio de Educación for a PhD scholarship.

## References

[1] K.A. Francesconi, J.S. Edmonds, Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev. 31 (1993) 111.
[2] K.A. Francesconi, J.S. Edmonds, in: J.O. Nriagu (Ed.), Arsenic in the Environment. Part 1. Cycling and Characterization, J. Wiley and Sons, Inc., New York, USA, 1994, p. 430.
[3] Y. Shibata, M. Morita, in: J.W. Kiceniuk, S. Ray (Eds.), Analysis of contaminants in edible aquatic sources, VCH, New York, USA, 1994.
[4] Y. Li, G.K.-C Low, J.A. Scoot, R. Amal, Chemosphere 79 (2010) 794.
[5] L.G. Sillen, in: M. Sears (Ed.), Oceanography, American Association for the Advancement of Science, Washington, DC, USA, 1961, p. 549.
[6] IMO:FAO:UNESCO:WMO:WHO:IAEA:UN:UNEP, Review of Potentially Harmful Substances-Arsenic, Mercury and Selenium, Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution (GESAMP), Reports and Studies No. 28, World Health Organization, USA, 1986.
[7] J.M. Neff, Environ. Toxicol. Chem. 2 (1988) 191.
[8] J.S. Petrick, B. Jagadish, E.A. Mash, E.A.H.V. Aposhian, Chem. Res. Toxicol. 14 (2001) 651.
[9] D.H. Thomas, J. Li, S.B. Waters, W. Xing, B.M. Adair, Z. Drobna, V. Devesa, M. Styblo, Exp. Biol. Med. 232 (2007) 3.
[10] S.M. Wnek, T.J. Jensen, P.L. Severson, B.W. Futscher, A.J. Gandolfi, Toxicol. Sci. 116 (2010) 44.
[11] H. Naranmandura, Y. Ogra, K. Iwata, J. Lee, K.T. Suzuki, M. Weinfeld, X.C. Le, Toxicol. Appl. Pharmacol. 238 (2009) 133.
[12] J.L. Gómez-Ariza, D. Sánchez-Rodas, I. Giráldez, E. Morales, Talanta 51 (2000) 257.
[13] S. Hirata, H. Toshimitsu, M. Aihara, Anal. Sci. 22 (2006) 39.
[14] E.H. Larsen, G. Pritzl, S.H. Hansen, J. Anal. At. Spectrom. 8 (1998) 1075.
[15] S. Hirata, K. Honda, O. Shikino, N. Maekawa, M. Aihara, Spectrochim. Acta B 55 (2000) 1089.
[16] T. Kajiya, M. Ahiara, S. Hirata, Spectrochim. Acta B 59 (2004) 543.
[17] S. Hirata, Y. Ishida, M. Ahiara, K. Honda, O. Shikito, Anal. Chim. Acta 483 (2001) 205.
[18] A.E. Geiszinger, W. Goessler, K.A. Francesconi, Mar. Environ. Res. 53 (2002) 37.
[19] D. Fattorini, F. Regoli, Environ. Toxicol. Chem. 23 (2004) 1881.
[20] D. Fattorini, A. Notti, A.F. Regoli, Chem. Ecol. 22 (2006) 405.
[21] D.J. Thomas, S.B. Waters, M. Styblo, Toxicol. Appl. Pharmacol. 198 (2004) 319.
[22] H.R. Hansen, A. Raab, M. Jaspars, B.F. Milne, J. Feldmann, Chem. Res. Toxicol. 17 (2004) 1086.
[23] R. Raml, A. Rumpler, W. Goessler, M. Vahter, L. Li, T. Ochi, K.A. Francesconi, Toxicol. Appl. Pharmacol. 222 (2007) 374.
[24] K.T. Suzuki, K. Iwata, H. Naranmadura, N. Suzuki, Toxicol. Appl. Pharmacol. 208 (2007) 166.
[25] H. Naranmadura, K. Suzuki, Toxicol. Appl. Pharmacol. 227 (2008) 390.
[26] S.K.V. Yathavakilla, M. Fricke, P.A. Creed, D.T. Heitkemper, N.V. Shockey, C. Schwegel, J.A. Caruso, J.A. Creed, Anal. Chem. 80 (2008) 775.
[27] K.M. Kubachka, M.C. Kohan, S.D. Conklin, K. Herbin-Davis, J.T. Creed, D.J. Thomas, J. Anal. At. Spectrom. 24 (2009) 1062.
[28] R. Raml, W. Goessler, K.A. Francesconi, J. Chromatogr. A 1128 (2006) 164.
[29] Y. Li, G.K.C. Low, J.A. Scott, R. Amal, J. Hazard. Mater. 188 (2011) 140.
[30] H. Rusz Hansen, R. Pickford, J. Thomas-Oates, M. Jaspars, J. Feldmann, Angew. Chem. Int. Ed. 43 (2004) 337.
[31] T. Ochi, K. Kita, T. Suzuki, A. Rumpler, W. Goessler, K.A. Francesconi, Toxicol. Appl. Pharmacol. 228 (2008) 59.
[32] E. Sanz, R. Muñoz-Olivas, C. Camara, J. Chromatogr. A 1097 (2005) 1.
[33] E. Sanz, R. Muñoz-Olivas, C. Dietz, J. Sanz, C. Camara, J. Anal. At. Spectrom. 22 (2007) 131.
[34] S.G. Salgado, M.A. Quijano-Nieto, M.M. Bonilla-Simón, Talanta 68 (2006) 1522.
[35] A. Huerga, I. Lavilla, C. Bendich, Anal. Chim. Acta 534 (2005) 121.
[36] A.I. Cabañero, Y. Madrid, C. Cámara, Anal. Bioanal. Chem. 381 (2005) 373.
[37] M.F. Mesko, J.S.F. Pereira, D.P. Moraes, J.S. Barin, P.A. Mello, J. Neri, G. Paniz, J.A. Nóbrega, M.G.A. Korn, E.M.M. Flores, Anal. Chem. 82 (2010) 2155.
[38] H. Budzinski, A. Papineau, P. Baumard, P. Garringes, C.R. Acad. Sci. 321 (1995) 69.

[39] H. Budzinski, A. Papineau, P. Baumard, P. Garringes, S. Wise, J. Pure Appl. Chem. 9 (1996) 225.
[40] H. Budzinski, M. Letellier, K. Le Menach, P. Garringes, J. Chromatogr. A 837 (1999) 187.
[41] M. Letellier, H. Budzinski, J. Bellocq, J. Connan, Org. Geochem. 30 (1999) 1353.
[42] D. Sánchez-Rodas, J.L. Gómez-Ariza, F. Lorenzo, T. García-Barrera, J. Chromatogr. 139 (2004) 1056.
[43] J.L. Gómez-Ariza, F. Lorenzo, T. García-Barrera, Anal. Bioanal. Chem. 282 (2005) 485.
[44] S. McSheehy, P. Pohl, R. Lobinski, J. Szpunar, Anal. Chim. Acta 440 (2001) 3.
[45] K.A. Francesconi, J. Gailer, J.S. Edmonds, W. Goessler, K.J. Irgolic, Comp. Biochem. Physiol. 122 (1999) 131.
[46] V. Nischwitz, S. Pergantis, J. Anal. At. Spectrom. 21 (2006) 1277.
[47] C. Benincasa, J. Lewis, E. Perri, G. Sindona, A. Tagarelli, Anal. Chim. Acta 585 (2007) 366.
[48] J.A. Brisbin, C. B'Hymer, J.A. Caruso, Talanta 58 (2002) 133.
[49] A. Chatterjee, Talanta 51 (2000) 303.
[50] J. Feldmann, V.W.-M. Lai, W.R. Cullen, M. Ma, X. Lu, X.C. Le, Clin. Chem. 45 (1999) 1988.
[51] I. Pizarro, M. Gómez, M.A. Palacios, C. Cámara, Anal. Bioanal. Chem. 376 (2003) 102.
[52] L. Dahl, M. Molin, H. Amlund, H. Margrete Meltzer, K. Julshamn, J. Alexander, J.J. Sloth, Food Chem. 123 (2010) 720.
[53] I. Pizarro, M. Gómez, C. Cámara, M.A. Palacios, Anal. Chim. Acta 495 (2003) 85.
[54] G. Williams, J.M. West, I. Koch, K.J. Reimer, E.T. Snow, Sci. Total Environ. 407 (2009) 2650.
[55] J. Kirby, W. Maher, J. Anal. At. Spectrom. 17 (2002) 838.
[56] V. Devesa, D. Velez, R. Montoro, Food Chem. Toxicol. 46 (2008) 1.
[57] O. Muñoz, V. Devesa, M.A. Súñer, D. Vélez, R. Montoro, I. Urieta, M.L. Macho, M. Jalón, J. Agric. Food Chem. 48 (2000) 4369–4376.
[58] V. Devesa, A. Martínez, M.A. Súñer, V. Benito, D. Vélez, R. Montoro, J. Agric. Food Chem. 49 (2001) 2267.
[59] T.D. Ninh, Y. Nagashima, K. Shiomi, Chemosphere 70 (2008) 1168.
[60] V. Nischwitz, S. Pergantis, Environ. Chem. 4 (2003) 187.
[61] J. Gailer, K.A. Francesconi, J.S. Edmonds, K.J. Irgolic, Appl. Organomet. Chem. 9 (1995) 341.
[62] K.A. Francesconi, R.V. Stick, J.S. Edmonds, Cell. Mol. Life Sci. 46 (1990) 464.

Microchemical Journal 112 (2014) 56–64

Contents lists available at ScienceDirect

Microchemical Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/microc

# Arsenic metabolites in human serum and urine after seafood (*Anemonia sulcata*) consumption and bioaccessibility assessment using liquid chromatography coupled to inorganic and organic mass spectrometry

M. Contreras-Acuña, T. García-Barrera *, M.A. García-Sevillano, J.L. Gómez-Ariza

*Department of Chemistry and Materials Science, Faculty of Experimental Sciences, University of Huelva, Campus de El Carmen, 21007, Huelva, Spain*
*Research Center on Health and Environment (CYSMA), University of Huelva, Spain*
*International Campus of Excellence on Agrofood (ceiA3), University of Huelva, Spain*

ARTICLE INFO

*Article history:*
Received 28 June 2013
Received in revised form 4 September 2013
Accepted 12 September 2013
Available online 19 September 2013

*Keywords:*
Arsenic
Speciation
*Anemonia sulcata*
Seafood
Bioaccessibility
Mass spectrometry

ABSTRACT

The present paper reports for the first time the bioaccessibility of arsenic species in *Anemonia sulcata* and its metabolization in the human body after the ingestion of this seafood, a delicacy highly appreciated in the south of Spain. Speciation in tissue extracts and human fluids was carried out by anion/cation exchange chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry ((IC)-ICP-MS). Results obtained show that about 54% of the arsenic present in the anemones is lost after cooking, around 95% of total arsenic in cooked anemones is bioaccessible and 85% of the amount ingested is eliminated from the body by urine in 90 h. The relative abundance of As in urine varies along the time, but after the first 10 h follows the order arsenobetaine (AB) ≈ $DMA^V$ (dimethylarsinate) > arsenocholine (AsC) > tetra-methyl-arsonium (TETRA) > trimethyl-arsine oxide (TMAO) > $MA^V$ (monomethylarsonate) > $iAs^V$ > dimethylarsenoethanol (DMAE), while the major species in cooked anemones is AB followed by $DMA^V$ > dimethylmonothioarsinic acid ($DMAS^V$) > AsC > TETRA > TMAO > $iAs^V$ > glycerylphosphorylarsenocholine(GPAsC) > $MA^V$ > DMA. After 30 min from the ingestion, $DMA^V$ is the most abundant in human serum, followed by AB, $MA^V$ and AsC. Finally, the use of organic mass spectrometry allowed the standardless identification of AsC, GPAsC, $DMAS^V$ and DMAE.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Arsenic has been recognized as a global toxin that affects human health [1] and can be the promoter of some types of cancers such as skin, lung, urinary bladder and liver [2]. Humans can be exposed to arsenic by contaminated water, soil, atmosphere and food, especially seafood [3], as well as products or supplements based on algae (especially *Hijiki seaweed*) and cereals or cereal derived foods [4]. The levels of arsenic in marine organisms can vary widely, but almost all samples fall within the range of about 5–100 mg As $kg^{-1}$ dry mass while terrestrial foods, in contrast almost invariably, have low levels of arsenic with most samples having less than 0.05 mg As $kg^{-1}$ dry mass, except rice that can typically contain 0.1–0.4 mg As $kg^{-1}$ dry mass, 500–1000 times lower than in seafood [3]. In addition, in some countries, such as Japan, China and Korea, food from marine sources constitutes an important part of the diet and a series of studies has been undertaken to determine the chemical form of arsenic in the organisms that contribute to the human diet [5].

On the other hand, As toxicity is strongly related to the chemical species in which it is present and seafood, that is the main source of total As in the human diet, contains mainly organic As species which are less toxic than inorganic arsenic (iAs). In mammals, inorganic forms of arsenic (arsenate (As(V)) and arsenite (As(III))) are more toxic, while methylated forms, $MA^V$ (monomethylarsonate) and $DMA^V$ (dimethylarsinate), are considered only moderately toxic [6,7]. In addition, other arsenic species, like trimethyl-arsine oxide (TMAO) and tetra-methyl-arsonium (TETRA) are also considered moderately toxic, whereas arsenobetaine (AB), arsenocholine (AsC) and other arsenosugars (AsS) show no toxicity [8]. In addition, As(III) is more toxic than (As(V)) most probably due to enhanced cellular uptake and accumulation of the former (LD50 for mice are 4.5 mg $kg^{-1}$ and 14–18 mg $kg^{-1}$ for the arsenite and arsenate, respectively) [9,10]. Metabolites of As(III), in particular trivalent methylated metabolites, are considered the main determinant of arsenic-induced toxicities [11], as they have a high binding affinity for sulphydryl and thiol groups of proteins in various organs as compared with As(V) [12]. In this sense, methylated arsenic has much lower toxicity compared to inorganic arsenic (LD50 for mice are 1800 mg $kg^{-1}$ and 1200 mg $kg^{-1}$ for the $MA^V$ and $DMA^V$, respectively) and the trivalent methylated forms $MA^{III}$ and $DMA^{III}$ have been recently identified as cancer promoters [13–15]. In contrast, arsenobetaine has the least toxicity of the typical arsenicals investigated in human biological fluids (LD50 for mice is

* Corresponding author at: Department of Chemistry and Materials Science, Faculty of Experimental Sciences, University of Huelva, Campus de El Carmen, 21007, Huelva, Spain. Tel.: +34 959 219962; fax: +34 959 219942.
*E-mail address:* tamara@dqcm.uhu.es (T. García-Barrera).

0026-265X/$ – see front matter © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2013.09.007

10,000 mg $kg^{-1}$). Thus, due to the different toxicities between the arsenicals, analysis of total arsenic is insufficient for complete risk assessment evaluation [16].

In humans, arsenic compounds can be easily absorbed by the gastrointestinal tract and transported to the blood. It has been reported that the absorption respect to the dose is 50% for As(III) and more than 95% for arsenobetaine and arsenocholine [17]. In the human body, inorganic arsenic (iAs) is metabolized to methylated forms; As(V) is reduced to As(III) and later methylated by oxidative addition. The reduction is carried out by glutathione, cysteine and dithiothreitol and the methyl groups are provided by S-Adenosyl methionine. The main species is DMA, however the metabolic pathway can continue to trimethylated species. The $DMA^V$ and $MA^V$ can be easily identified in urine and individuals that do not consume a high quantity of seafood present 10–30% inorganic arsenic, 10–20% $MA^V$ and 55–80% $DMA^V$ [18]. The metabolism and excretion of pentavalent and trivalent dimethylated arsenic in mice after oral administration have also been reported [19]. The proportion of arsenic compounds varies with the age since the urine from children can contain until 50% more than the urine from adults [20]. All evidence to date indicates that although AB is bioavailable to humans, it is excreted directly without metabolization and the presence in urine indicates the consumption of fish and crustaceous. When the arsenic comes from the consumption of algae, mussels, or ingested as a pure synthesized compound, that contains arsenosugars, they are metabolized to $DMA^V$ and the proportion of this compound increases significantly [3,18,21]. Moreover, $DMA^V$ is the major metabolite produced from inorganic arsenic, and the intermediates produced in route to $DMA^V$ are thought to play a role in arsenic's mode of toxic action [22]. Thus, the possibility exists for inorganic arsenic and arsenosugars to have at least some common intermediate metabolites, in which case arsenosugars might also be capable of producing toxic effects [3]. Like in the case of arsenosugars and iAs, arsenolipids are also converted to $DMA^V$ by humans [23]. Then, although the biomethylation of iAs has been considered as a detoxification mechanism during the last decades, intermediate toxic methylated trivalent arsenicals make it as an intoxication process [24,25]. On the other hand, thioarsenicals are new-found sulfur containing arsenic metabolites, which has been identified in urine of animals as well as in marine organisms. Methylation of inorganic arsenic resulted in the formation of thiolated metabolites; dimethylarsinothioic acid ($DMAS^V$), dimethyldithioarsinic acid ($DMDTA^V$) and monomethylmonothioarsonic acid ($MMMTA^V$) commonly detected in mammals urine (including human) after long-term exposure to inorganic or other arsenic species ($MA^V$, $DMA^V$ or TMAO) [26]. However, how these thioarsenicals are produced during the metabolism of As(III) and the source of sulfur remains unknown [26].

In order to study the metabolism in humans after food consumption it is important to know the effect of cooking on arsenic species in the food, which can considerably change the total content of arsenic and the ratios between species. Traditional washing and soaking of *Hizikia fusiforme* seaweed, which has very high inorganic arsenic contents, may reduce the contents by up to 60% [27] that is in good agreement with the 64% of total arsenic lost in cooked *Anemonia sulcata*, which is battered in flour and fried in olive oil [28]. *A. sulcata* is a marine organism very appreciated delicacy in Spain, especially in the south, where it is served as delicious meal. The speciation of arsenic shows that $DMA^V$ is the dominant species in *A. sulcata* followed by AB [28].

In the present paper, speciation of arsenic has been carried out in human urine and serum after the consumption of the anemones using a combination of inductively coupled plasma mass spectrometry and organic mass spectrometry with anion/cation exchange high performance liquid chromatography ((IC)-ICP-MS and -MS). The speciation data allows deeper insight into arsenic metabolism in human body after the consumption of this particular food that contains unusual arsenic species as GPAsC and $DMAS^V$.

## 2. Experimental

### 2.1. Standard solutions, reagents and seafood samples

Analytical grade reagents were used throughout. The chemical standards used were AB (95%, Fluka, Steinheim, Germany), As(III) and As(V) (99%, Merck, Darmstadt, Germany), DMA, MA, TETRA and TMAO (99%, Supelco, Bellefonte, USA). Tetramethylarsonium ion (TETRA) and trimethylarsine oxide (TMAO) (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) were donated by Dr. Riansares Muñoz (Universidad Complutense de Madrid). All the standards were dissolved in doubly deionized water (18 MΩ cm) obtained with a Milli-Q Gradient system (Millipore, Watford, UK) and stored at 4 °C in the dark. Working solutions were prepared daily by appropriate dilution of the stock solutions at 1000 mg $L^{-1}$. For total element determination, nitric acid (65 mass %) and hydrogen peroxide (30 mass %) of Suprapur® grade (Merck, Darmstadt, Germany) were used for mineralization of the samples. Certified Reference Materials of dogfish muscle (DORM-2) and lobster hepatopancreas (TORT-2) (National Research Council Canada) were used for quality control assays. Reference materials were also used for lyophilized urine (Clinchek of urine control, Level II) and serum (Level I) (Recipe Chemicals, Munich, Germany). Digestive enzymes (porcine pepsin, porcine pancreatin, amylase) and bile salts (approx. 50% sodium cholate and 50% sodium deoxycholate) were obtained from Sigma Aldrich (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA). The creatinine was determined with the Jaffe's reaction using a commercial Kit (Spinreact, Barcelona, Spain).

Ammonium carbonate $(NH_4)_2CO_3$ (Fluka, Seelze, Germany), ammonium hydroxide (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) and pyridine (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) were used in the mobile phases for the chromatographic separation. Calibration of the mass spectrometer was daily performed using the standards kit from AB Sciex (AB Sciex, Foster City, CA, USA). Methanol was purchased from Aldrich (Aldrich, Steinheim, Germany). A tuning solution containing Li, In, U, Co and Ce (1 μg $L^{-1}$ each) used for the ICP-MS optimization was purchased from Thermo Fisher Scientific (Bremen, Germany). Calibration of the mass spectrometer was daily performed using the standards kit from Applied Biosystems (AB Sciex, Foster City, CA, USA). Samples of raw anemones were purchased in a local restaurant (Southwest Spain). Cooked anemones were prepared from the whole animal that was battered in wheat flour and fried with olive oil.

### 2.2. Apparatus

Chromatographic separations were performed using a Model 1100 high-performance liquid chromatography (HPLC) pump (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA) as delivery system. Injections were performed using a Rheodyne valve with a 50 μL or 100 μL sample loop and arsenic species were separated using two chromatographic columns, based on anion exchange chromatography (25 cm × 4.6 mm, 5 μm Hamilton PRP X-100 column) and cation exchange chromatography (Supelcosil LC-SCX, 25 cm × 4.6 mm, 5 μm).

A centrifuge model 5804 R (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) was used for the separation of phases. The extraction of the arsenic species was also carried out in a focused microwave model Discover equipped with an automatic arm model Explorer (CEM Corporation, Matthews, USA). On the other hand, the mineralization of the samples was carried out in a microwave model MARS5. The elemental detection was performed in a Thermo Scientific XSeries2 ICP-MS fitted with a collision cell and nickel sampler and skimmer cones. The exit of the column was connected to the Miramist nebulizer (Burgener, Mississauga, Ontario, Canada) of the ICP-MS by means of polyetheretherketone (PEEK) tube. For total metal determination Micromist nebulizer (Glass Expansion, Romainnotier, Switzerland) was used. The standardless identification of arsenic species was performed by means of an HPLC coupled to a triple quadrupole instrument model API 2000 (AB Sciex, Concord, Canada) via an electrospray (ESI) interface using a PEEK tube.

**Table 1**
Experimental conditions used in HPLC-ICP-MS.

| | | |
|---|---|---|
| *HPLC conditions* | | |
| Anionic Exchange Chromatography | Column | Hamilton PRP X-100 (250 mm × 4.6 mm × 5 μm) |
| | Mobile phase | Ammonium carbonate, 50 mM (pH 8.5) |
| | Flow-rate | 1.2 mL $min^{-1}$ |
| | Injection volume | 50 μL |
| Cationic Exchange Chromatography | Column | Supelcosil SCX (250 mm × 4.6 mm × 5 μm) |
| | Mobile phase | Pyridine, 20 mM (pH 2.5) |
| | Flow-rate | 1.2 mL $min^{-1}$ |
| | Injection volume | 50 μL |
| *ICP-MS conditions* | | |
| Forward power | | 1300 W |
| Plasma gas flow rate | | 13.0 L $min^{-1}$ |
| Auxiliary gas flow rate | | 1.0 L $min^{-1}$ |
| Carrier gas flow rate | | 1.0 L $min^{-1}$ |
| Sampling and skimmer cones | | Xi interface of nickel |
| He flow | | 4.0 mL $min^{-1}$ |
| $Q_{oct}$ | | −19 V |
| $Q_p$ | | −17 V |
| Focus | | −9.0 V |
| Dwell time | | 0.1 per isotope |
| Isotopes monitored | | $^{75}As$, $^{77}ArCl^+$ |

### 2.3. Human exposure experiments and samples collection

The samples of human urine and plasma were collected from 5 volunteers before and after the consumption of 100 g of cooked anemones. Before the consumption of the anemones, the analyses of urine samples were repeated until the presence of arsenic was minimal and constant. During the experiment other seafood was eliminated from the diet of the volunteers. The volunteers consumed cooked anemones in the morning, as well as all urines between the first 90 h, were collected. Serum samples were collected immediately after the ingestion of 100 g of cooked anemones and every 30 min to 2 h. All the subjects have creatinine values inside the range of 0.3–3 g $L^{-1}$, recommended by the World Health Organization (WHO) for the acceptability of urine samples for biological monitoring [29] and all the data have been corrected with the creatine levels. On the other hand, blood samples from 5 volunteers were obtained by venipuncture of the antecubital region at Juan Ramón Jiménez Hospital (Huelva, Spain), before the consumption of seafood and every 30 min during 2 h after consumption. All samples were collected in BD Vacutainer SST II tubes with gel separator and Advance vacuum system, previously cooled in a refrigerator. The samples were immediately cooled and protected from light for 30 min to allow clot retraction to obtain serum after centrifugation (4000 g for 10 min). The serum was divided into aliquots in Eppendorf tubes and frozen at −80 °C until analysis. The investigation was performed after approval by the Ethical Committee of the University of Huelva (Spain).

### 2.4. Analytical procedures

#### 2.4.1. Determination of total arsenic in human biological fluids and anemones

The serum samples were weighed (0.2000 g) into 5-mL teflon microwave vessels and 800 μL of a 4:1 (v/v) mixture of nitric acid and hydrogen peroxide was added. The mineralisation was carried out with a microwave accelerated reaction system at 400 W from ambient temperature ramped to 160 °C within 15 min, held at this temperature for 20 min and finally, the solutions were made up to 2 mL to reduce matrix effects. The anemone samples (raw or cooked) were pooled (12 anemones), lyophilized and weighed (0.5000 g) into 50-mL teflon microwave vessels and digested with 2.5 mL of a 4:1 (v/v) mixture of nitric acid and hydrogen peroxide. The mineralisation was carried out at 800 W from ambient temperature ramped to 160 °C within 15 min, held at this temperature for 30 min and finally, the solutions were made up to 10 mL. Urine samples were only diluted 1:5 with ultrapure water, centrifuged at 4.000 *g* during 5 min and analyzed by ICP-MS. All the samples were filtered through Iso-Disc poly(vinylidene difluoride) filters (25 mm diameter, 0.45 μm pore-size) and analyzed by ICP-MS using rhodium (1 μg $L^{-1}$) as the internal standard. All the analyses were repeated three times. A blank with the reagents used for total arsenic determination was run simultaneously to the sample preparation.

The detection limit of the instrumental method determined as three times the standard deviation of a blank (3σ) for total arsenic is 11 ng $L^{-1}$. The recovery of total arsenic is 95% (n = 5) of the certified value (18.0 ± 1.1 μg $g^{-1}$) in dogfish muscle and 98% (n = 5) of the certified value (21.6 ± 1.8) in lobster hepatopancreas. The recovery of total arsenic is 101% (n = 5) of the certified value (82 ± 16 μg $L^{-1}$) in urine and 99% (n = 5) of the certified value (11.3 ± 2.3 μg $L^{-1}$) in serum, using the same microwave mineralization conditions previously described by serum and anemone samples.

#### 2.4.2. Study of the bioaccessible fraction by in vitro gastrointestinal digestion

First to all, cooked anemones were pooled (12 anemones) and lyophilized during 24 h. The in-vitro digestion was performed in triplicate by exact weighing of 1.0000 g of cooked anemone into 100 mL Erlemeyer flasks according to the procedure described elsewhere by Mounicou et al. [30]. Briefly, for a gastric digestion an aliquot of 10 mL of gastric juice (100 mg pepsin + 10 mL 150 mM NaCl, pH 2.5) was

**Table 2**
Evaluation of arsenic species concentrations in human urine and serum samples during storage period.

| Human urine | As(III) (%) | As(V) (%) | $MA^V$ (%) | $DMA^V$ (%) | AB (%) | As(III) (%) | As(V) (%) | $MA^v$ (%) | $DMA^V$ (%) | AB (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Volunteer urine samples stored at two months at −80 °C | | | | | Spiked volunteer urine samples stored at two months at −80 °C | | | | |
| 15 days | 99 | <LOD | 100 | 101 | 99 | 98 | 101 | 102 | 101 | 103 |
| 30 days | 102 | <LOD | 96 | 99 | 96 | 104 | 105 | 98 | 97 | 98 |
| 45 days | 98 | <LOD | 97 | 97 | 97 | 99 | 111 | 97 | 95 | 96 |
| 60 days | 94 | <LOD | 91 | 93 | 89 | 105 | 118 | 93 | 91 | 88 |
| Human serum | As(III) (%) | As(V) (%) | $MA^v$ (%) | $DMA^V$ (%) | AB (%) | As(III) (%) | As(V) (%) | $MA^v$ (%) | $DMA^V$ (%) | AB (%) |
| | Volunteer urine samples stored at two months at −80 °C | | | | | Spiked urine samples stored at two months at −80 °C | | | | |
| 15 days | 101 | 98 | 102 | 98 | 99 | 102 | 100 | 101 | 99 | 98 |
| 30 days | 99 | 106 | 99 | 100 | 101 | 100 | 101 | 97 | 102 | 100 |
| 45 days | 100 | 106 | 101 | 96 | 98 | 97 | 104 | 99 | 98 | 96 |
| 60 days | 98 | 110 | 97 | 94 | 94 | 99 | 110 | 95 | 96 | 93 |

LOD of As(III) and As(V) are 3.5 and 2.4 ng As $g^{-1}$, respectively.

**Table 3**
Arsenic speciation in cooked anemones and bioaccessible fraction by in vitro digestion.

| | As(III) | As(V) | $MA^V$ | $DMA^V$ | AB | AsC |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Cooked anemone (μg As $g^{-1}$) | <LOD | 0.086 | 0.027 | 1.7 | 3.2 | 0.34 |
| Standard deviation (μg As $g^{-1}$) | – | 0.004 | 0.003 | 0.1 | 0.3 | 0.05 |
| Bioaccessible extract from cooked anemone (μg As $g^{-1}$) | <LOD | 0.11 | 0.031 | 1.5 | 3.1 | 0.32 |
| Standard deviation (μg As $g^{-1}$) | – | 0.005 | 0.002 | 0.09 | 0.4 | 0.03 |
| Limit of detection (LOD, ng As $g^{-1}$) | 3.5 | 2.4 | 2.2 | 1.8 | 0.91 | |
| Bioaccessibility (%) | – | 128 | 115 | 88 | 97 | 94 |

| | $DMAS^V$ | GPAsC | TMAO | TETRA | TOTAL As | TOTAL As (as sum of the species) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Cooked anemone (μg As $g^{-1}$) | 0.76 | 0.035 | 0.12 | 0.26 | 6.6 | 6.5 |
| Standard deviation (μg As $g^{-1}$) | 0.02 | 0.003 | 0.009 | 0.02 | 0.1 | 0.2 |
| Bioaccessible extract from cooked anemone (μg As $g^{-1}$) | 0.72 | 0.034 | 0.12 | 0.25 | 6.4 | 6.2 |
| Standard deviation (μg As $g^{-1}$) | 0.03 | 0.002 | 0.007 | 0.03 | 0.2 | 0.2 |
| Limit of detection (LOD, ng As $g^{-1}$) | | | 0.72 | 3.5 | 0.098 | – |
| Bioaccessibility (%) | 95 | 97 | 100 | 96 | 96 | 95 |

added to a cooked anemone sample. Then, the sample was incubated during 4 h at 37 °C with orbital-horizontal shaking at 150 rpm. On the other hand, for the intestinal extraction, pH was adjusted to 7.4, and 10 mL of intestinal juice was added (3% (w/v) pancreatin + 1% (w/v) amylase + 1.5 g $L^{-1}$ bile salts in ultrapure water). The sample was incubated during 4 h at 37 °C with orbital-horizontal shaking at 150 rpm. Then, the extract was centrifugated at 8.000 *g* during 30 min at 4 °C and the supernatant was separated for the total As determination and speciation.

For the determination of total arsenic bioaccessible fraction, 1.0000 g of the obtained extract was weighted and digested using the same procedure than for the total arsenic determination in anemones above described.

*2.4.3. Sample preparation and analysis by HPLC-ICP-MS and -MS*

Urine samples were diluted 1:5 with ultrapure water, centrifuged at 4.000 *g* during 5 min, filtered through 0.45 μm and injected directly in the IC-ICP-MS or -MS for the analysis. On the other hand, 0.1000 g of serum samples were weighted and arsenic species were extracted by protein precipitation with 500 μL of a 2:1 (v/v) methanol/water mixture by vigorous vortex shaking during 5 min, followed by centrifugation at 4000 *g* during 10 min at 4 °C. The supernatant was evaporated to

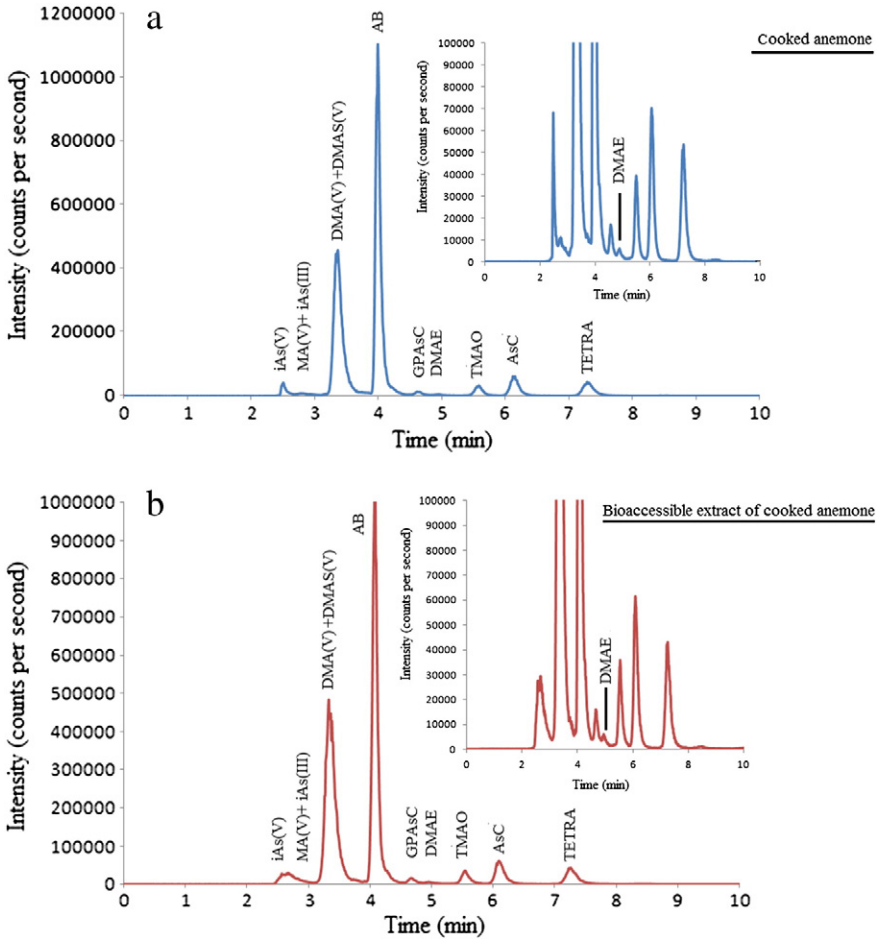



**Fig. 1.** (a) Typical HPLC-CEC-ICP-MS chromatogram of cooked anemones. (b) As-metabolites in the bioaccessible extract of cooked anemones. Chromatographic conditions are given in Table 1.

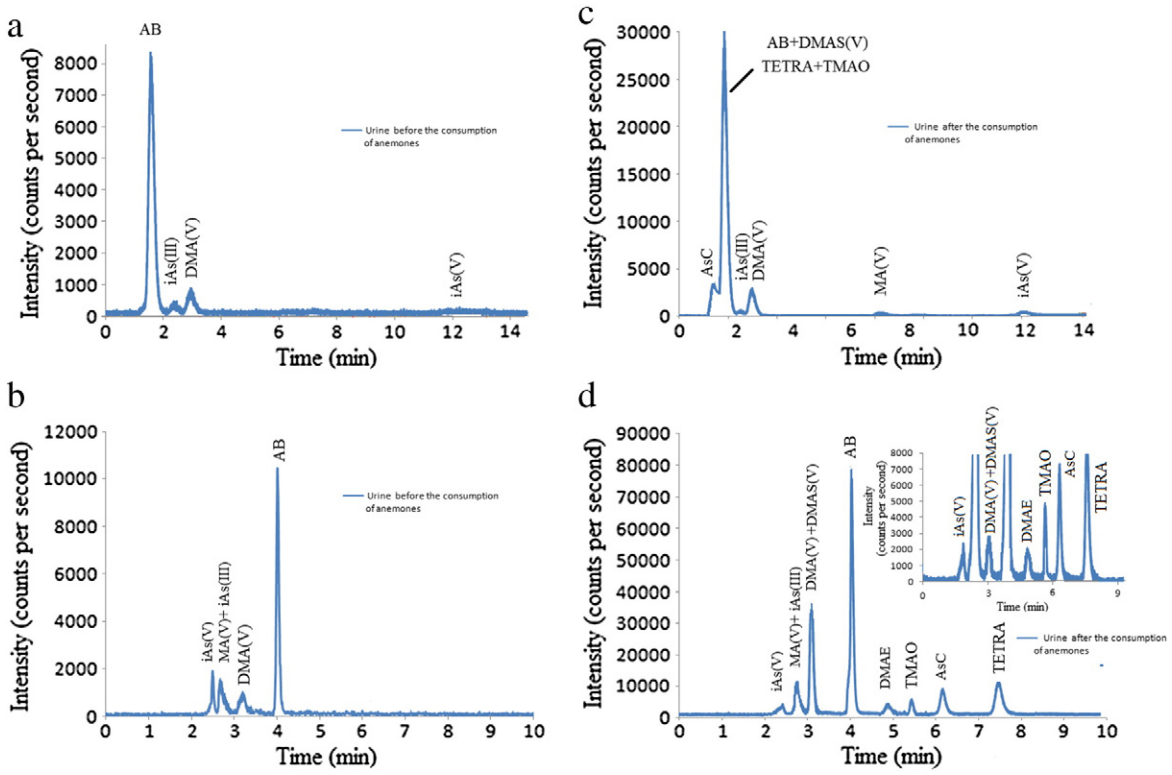



**Fig. 2.** Speciation of arsenic in human urine (n = 3) before (a,b) and 20 h after the consumption of cocked anemones (c,d) by HPLC-(CEC)-ICP-MS (a,c) and HPLC-(AEC)-ICP-MS (b,d). Chromatographic conditions are given in Table 1.

dryness under a nitrogen stream and stored at −80 °C until analysis. The extract was reconstituted to 200 μL with mobile phase, stirred, centrifuged again (4000 *g*, at 4 °C for 10 min) and finally, the clean supernatant was collected for the analysis.

The procedure for the speciation of arsenic species in raw and cooked *A. sulcata* has been published elsewhere [28]. Briefly: 5 mL of a (1:1, v/v) methanol/water mixture was added to 0.1000 g of a lyophilized pool of 20 anemones (raw or cooked) and arsenic species were extracted using a focused microwave at 50 °C and 150 W during 5 min with magnetic stirring. After that, the extract was centrifuged at 10,000 *g* during 10 min and the supernatant evaporated until dryness under vacuum at 50 °C in a rotary evaporator. Finally, 1 mL of ultrapure water was added, filtered through Iso-Disc poly-(vinylidene difluoride) filters (10-mm diameter, 0.2-μm pore size) and analyzed. All the filters were cleaned with 5 mL of the extracting solution before the use to avoid the contamination of the samples. The bioaccessible fraction of the arsenic species was obtained by exact weighing of 0.5000 g of the extract after gastrointestinal digestion that was extracted using the same procedure with the serum samples, but reconstituted to 1000 μL with mobile phase. All the extracts were filtered through Iso-Disc poly-(vinylidene difluoride) filters (10-mm diameter, 0.2-μm pore size) to avoid column overloading or clogging and the filters were cleaned with 5 mL of ultrapure water before use to avoid the contamination of the samples.

The chromatographic separation and detection of arsenic species have been carried out using anion/cation exchange liquid chromatography coupled to ICP-MS. The analytical method for the chromatographic separations and detection has been previously optimized and published elsewhere [28]. Briefly, the separation of the arsenic species was performed by anion exchange chromatography, using as mobile phase 50 mM of $(NH_4)_2CO_3$ at pH = 8.5 (adjusted with 5 M ammonium hydroxide) flushed at 1.2 mL $min^{-1}$ through the column. Since AB, TETRA and TMAO coelute in this column, the separation was carried out using a cation exchange column with 20 mM pyridine at pH 2.5 as mobile phase at 1.2 mL $min^{-1}$. The HPLC-ICP-MS online coupling was performed by connecting the outlet of the chromatographic column to ICP-MS nebulizer through a PEEK tube. The ICP-MS parameters using He as collision gas were optimized with an aqueous solution of 1 μg $L^{-1}$ of As with 2 vol.% HCl and 4 mL $min^{-1}$ of He was enough to avoid the interference of $^{40}Ar^{35}Cl^{+}$. Signal intensity at m/z 77 was monitored and used to correct this interference. Table 1 shows the experimental conditions used in the HPLC-ICP-MS coupling.

For the identification of unknown arsenic species, the samples were also analyzed by organic mass spectrometry. Data were collected in positive ion mode (ES+) and the mass analyzer scanned from m/z 50 to 400. The ionspray voltage (IS) was set at 5500 V and the declustering and focusing potentials (ring potentials) at 30 and 400 V, respectively. The curtain gas and nebulizer gas (high purity nitrogen) were fixed at 15 and 10 units, respectively. The ion energy (IE) was fixed at 0.5 V with a channel electron multiplier (CEM) of 2500 V. In the experiment, the entrance potential (EP) was set at 10 V and collision cell rod offset (RO2) at −20 V. The scan time was equal to 0.5 s. Data were treated with the manufacturer's Analyst 1.4.1. Software. The collision energy and declustering potential in the product ion mode varied between the experiments and therefore was optimized as appropriate. In all the experiments, collision cell exit potential (CXP) was set at 2 V and collision gas (CAD) at 5 units. Optimal conditions for tandem mass spectrometry and ion transitions used for Multiple Reaction Monitoring (MRM) have been previously described elsewhere [28].

## 3. Results and discussion

### 3.1. Stability of the arsenic species in the samples

In order to ascertain the integrity of species and prevent (inter)conversion during the experiment, the stability in the samples under the storage conditions should be evaluated. Feldmann et al. [31] evaluated the stability of arsenic species in freshly collected urine samples and

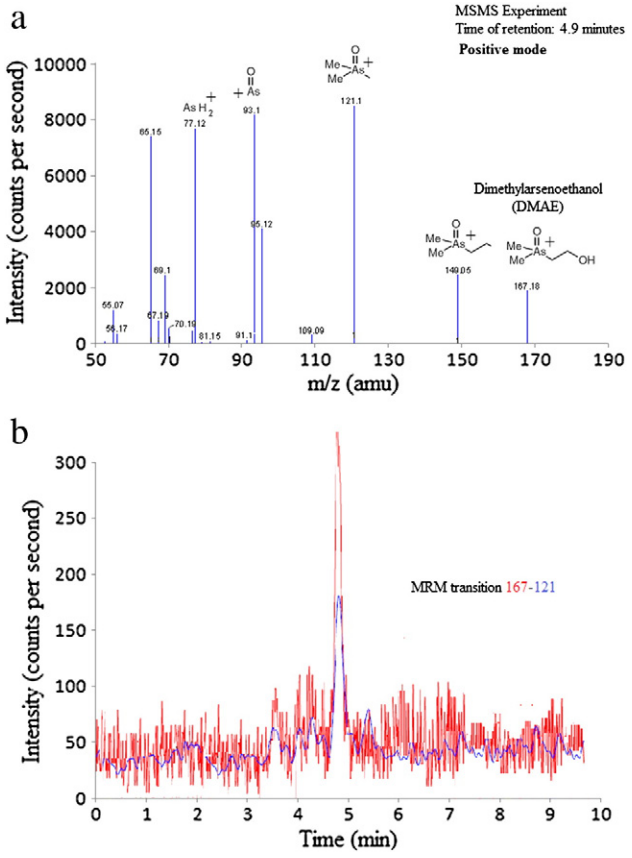



**Fig. 3.** (a) MS/MS spectrum of peak at 4.9 min obtained from an human urine 20 h after the consumption of anemones using by HPLC-(CEC)-ESI-QqQ-MS (Multiple Channel Accumulation (MCA) = 20, Collision Energy (CE) = 30 V and Declustering Potential (DP) = 80 V). (b) MRM chromatogram of the 167 → 121 *m/z* transition obtained from the same urine sample by HPLC-(CEC)-ESI-QqQ-MS (CE = 25 V and DP = 80 V). The chromatographic conditions are given in Table 1.

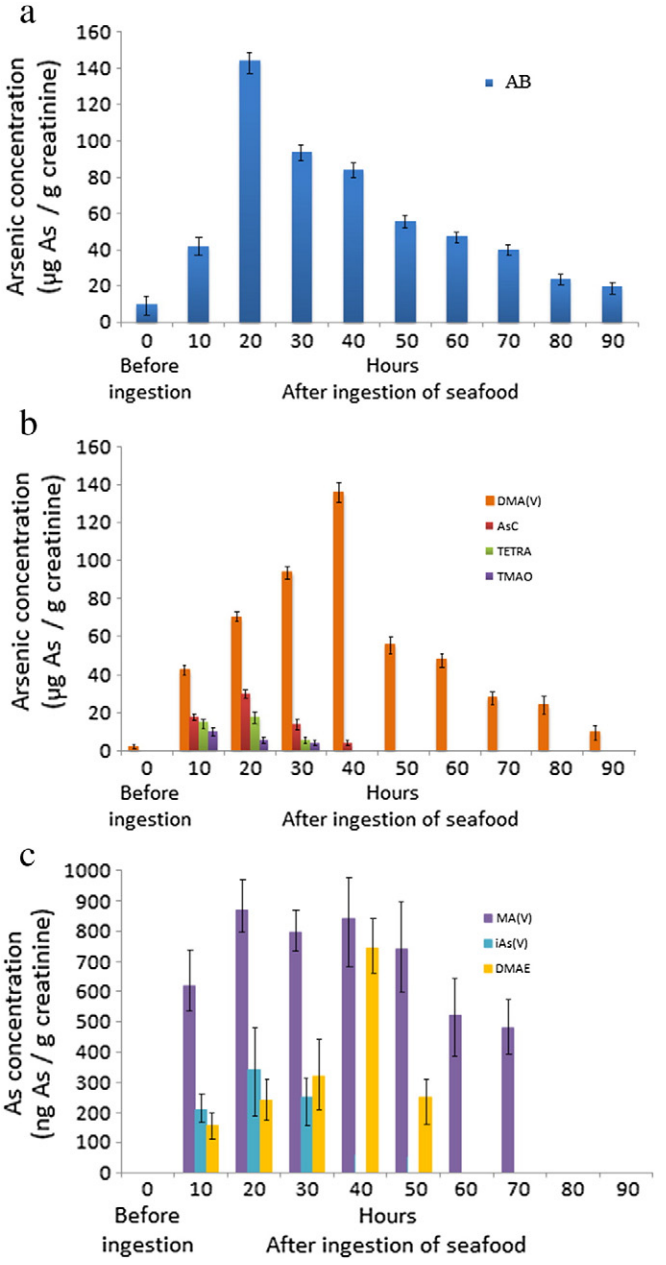



**Fig. 4.** Relative concentrations of arsenic metabolites in urinary samples (n = 5 volunteers) normalized against the concentration of creatinine, before and after the consumption of 100 g of cooked anemones per volunteer.

they found that the freshly collected urine samples are stable for at least 2 months when stored at temperatures under either 4 °C or −20 °C. Once the samples were obtained, they were stored at −80 °C in 10 different aliquots of 100 μL using Eppendorf tubes. Replicated aliquots of these samples were placed in separate eppendorf tubes and were supplemented with AB, As(III), As(V), $MA^V$ and $DMA^V$ (20 μg $L^{-1}$ as arsenic). The evaluation of arsenic species stability was carried out each fifteen days during two months by AEC-ICP-MS and CEC-ICP-MS using the procedures above described. The analysis was carried out by duplicate.

In general, processing or storage by freezing neither change the arsenic species concentration nor alter the speciation pattern greatly; however, a significant decrease of AB in urine and serum concentration after storage was observed. Decreased levels of AB were found at the end of the experiment that maybe related with degradation to $DMA^V$ during storage. Moreover, insignificant degradations of $MA^V$ and $DMA^V$ concentrations were observed after 45 days of storage at −80 °C in both biological fluids (Table 2). In addition, increased levels of $iAs^V$ were observed along the storage time at −80 °C, more pronounced in urine that in serum. Finally, insignificant increase of As(III) was observed after 60 days from the beginning of the experience, and similar results were obtained by Feldmann et al. [31]. In conclusion, low temperature conditions (−80 °C) are suitable for the storage of human urine and serum samples for up to 2 months without substantial changes of arsenicals without the addition of any additive. It may be possible that with higher storage times, the stability of arsenic species varies with the sample matrix. A similar stability study for the anemones extracts was performed and published elsewhere [28].

### 3.2. Arsenic speciation and bioaccessible fraction in cooked A. sulcata

The detection and quantification limits (LODs and LOQs, respectively) were calculated with the data generated in the linearity studies. After obtaining the calibration function, LOD and LOQ were calculated as the analyte concentration that corresponds to a signal equal to "a + 3 Sy/x" and "a + 10 Sy/x" respectively, where "a" is the origin ordinate, and "Sy/x" indicates the random errors in the values for the slope and intercept. The detection limits using HPLC-ICP-MS are shown in Table 3. Due to the absence of the standards, the concentration of AsC, $DMAS^V$ and GPAsC was calculated using the calibration curve of $DMA^V$, since these arsenicals have an arsenic atom per metabolite and have similar structures,

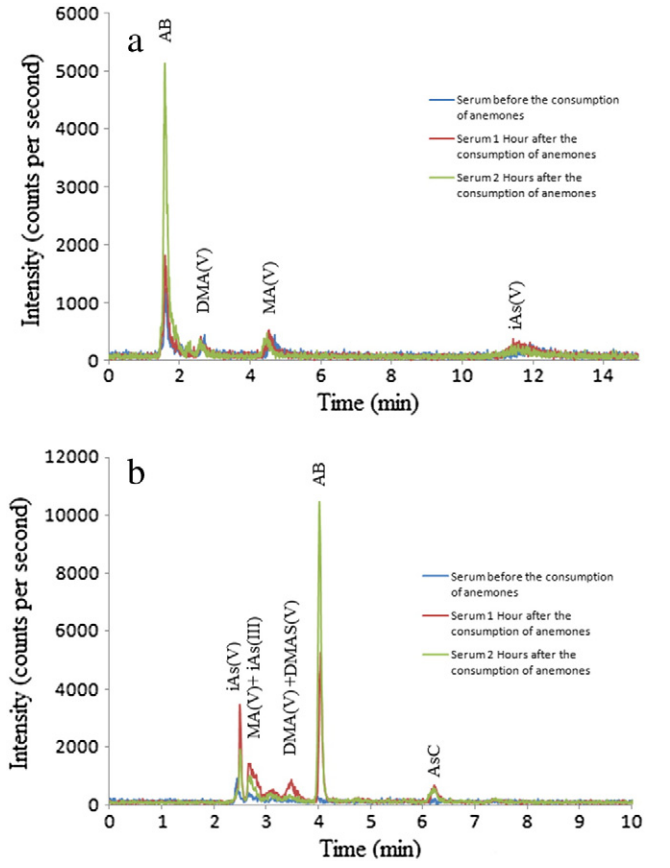



**Fig. 5.** Speciation of arsenic in a serum sample (n = 3) before and after the consumption of cocked anemones by (a) HPLC-AEC-ICP-MS and (b) HPLC-CEC-ICP-MS. Chromatographic conditions are given in Table 1.

therefore present similar ionization efficiency in the plasma making possible the quantification. In this study, the total concentration of arsenic in *A. sulcata* is 12.2 ± 0.54 and 6.62 ±0.31 μg $g^{-1}$ in raw and cooked samples, respectively (n = 12 anemones pooled per group) suggesting that 54% of the arsenic is lost after cooking. These concentrations are higher than those previously reported in these anemones (4.9 ± 0.21 and 1.7 ± 0.11 μg $g^{-1}$ in raw and cooked samples, respectively) [28], which can be related with different arsenic concentrations in the water where they were captured. In this study, the dominant species in cooked *A. sulcata* is AB representing about 48% of the total arsenic as in most marine organisms [32]. AB represents the end point of the arsenic cycle in the marine ecosystems and it is largely inert, non-toxic and rapidly excreted [33]. The presence of $DMA^V$ is also important and accounts for around 26% of the total arsenic, followed by $DMAS^V$ (12%), AsC (5%), TETRA (4%), TMAO (2%) and low concentrations of $iAs^V$, GPAsC and $MA^V$. Although inorganic arsenic, mainly as arsenate ($iAs^V$), is the predominant form of arsenic in seawater, inorganic compounds comprise only a small proportion of total cooked seafood sample (about 1–2%) [34]. On the other hand, generally little or no $MA^V$ and $DMA^V$ is found in seafood, but $DMA^V$ is the second abundant species in these anemones. In this sense, trace levels of $MA^V$ (0.4% of the total) were detected in this organism but in the case of $DMA^V$ the concentration of this arsenical was 1.7 (μg $g^{-1}$). Besides these methylated forms, TMAO and TETRA were also observed, which have been found in some species of marine organisms at trace levels [33], but may be major species in some mollusks [33]. In addition, $DMAS^V$ has been previously reported in vegetation, animals and human beings [35–41] while GPAsC has been found in yellow eye mullet (*Aldrichetta forsteri*) and mussels after oral administration of arsenocholine [42]. However, the presence of GPAsC and $DMAS^V$ in *A. sulcata* is curious since the former was not previously identified in a natural sample (without exposure to AsC) and the latter was never found in marine food before [28]. On the other hand, it is well known that AsC is a metabolic precursor of AB (48% in the anemones) in marine organisms [43], but in this study low levels have been found (5%) in cooked anemones.

Fig. 1 shows the chromatogram obtained by HPLC-CEC-ICP-MS from cooked anemones and bioaccessible extracts (Fig. 1a and b, respectively). As can be seen, nine main arsenic species were separated. In a previous work, only eight arsenic species were found in *A. sulcata* [28], which can be explained by the low concentration of this new species that made impossible the identification by organic mass spectrometry. This new arsenical has been identified in the present work by HPLC-(CEC)-ESI-QqQ-MS as dimethylarsenoethanol (DMAE) (see next section). As can be seen in Table 3, around 95% of the total arsenic is bioaccessible after in vitro gastric and intestinal digestion. In general, the bioaccessibility of all arsenic species is high, being the more remarkable As(V) and $MA^V$. The percentages higher than 100% may indicate the transformation of other species into them during the gastrointestinal digestion.

### 3.3. Speciation of arsenic in human urine and serum after the consumption of cooked *A. sulcata*

Arsenic metabolites were identified and quantified in urine and serum samples after the consumption of this seafood by HPLC-ICP-MS. Total arsenic concentration in human urine and serum from five volunteers was evaluated during five days before the ingestion of cooked anemones. All seafood products and other foods of daily consumption in which arsenic can occur at significant concentrations (e.g. rice with about 500 ng.$g^{-1}$ of arsenic) [44] were avoided during the experiment, and the results (8 μg of total arsenic $L^{-1}$ of urine) were within the reference interval for people not consuming seafood [45]. In the case of serum, the concentration of arsenic of the volunteers before the beginning of the experience was 1.92 ± 0.32 ng As $g^{-1}$, which is also in good agreement with normal concentrations in previously published works. On the other hand, higher concentrations in human serum have been related by reduced renal excretion of arsenic or insufficient dialysis of the arsenic species [46,47].

### 3.4. Human urine samples

Fig. 2 shows typical HPLC-ICP-MS chromatograms (Fig. 2a and c with AEC, Fig. 2b and d with CEC) of a urine sample from one subject before (Fig. 2a and b) and 20 h after the consumption of the anemones (Fig. 2c and d). An unknown compound was determined in urine using HPLC-(CEC)-ICP-MS, which is non-detectable by HPLC-(AEC)-ICP-MS. This peak was observed in cooked anemone extracts when the same chromatography conditions are applied (Fig. 1), and was identified by HPLC-(CEC)-ESI-QqQ-MS as DMAE (Fig. 3). The presence of DMAE in urine may be explained by its presence in this seafood since DMAE has been found a significant metabolite in urine after ingestion of arsenosugars from seafood [48], but these arsenicals are not detected in *A. sulcata*.

Before the consumption of the anemones, AB and $DMA^V$ are the major arsenic metabolites in human urine, as stated by other authors [49]. The relative abundance of the arsenic species in urine along the experiment is represented in Fig. 4 as a mean of the five volunteers, and corrected with creatinine levels. The standard deviations show that the concentrations of arsenic species in the urine samples from the different volunteers are similar among them. As can be observed, the relative abundance of As varies along the time, but after the first 10 h follows the order AB ≈ $DMA^V$ > AsC > TETRA > TMAO > $MA^V$ > As(V) > DMAE, while the major species in cooked anemones is AB followed by $DMA^V$ > $DMAS^V$ > AsC > TETRA > TMAO > As(V) > GPAsC > $MA^V$ > DMAE (Table 3, Fig. 1). Thus, the dominant species in urine after the first 20 h is AB, with a mean value of total AB excreted during this period of 140 μg As $g^{-1}$ of creatinine (Fig. 4a), which accounts about 40% of the total AB in 100 g of cooked anemones, and the concentration decreases to 23 μg As μg $g^{-1}$ of creatinine after 80 h (88% of the total AB in 100 g of cooked anemones is excreted

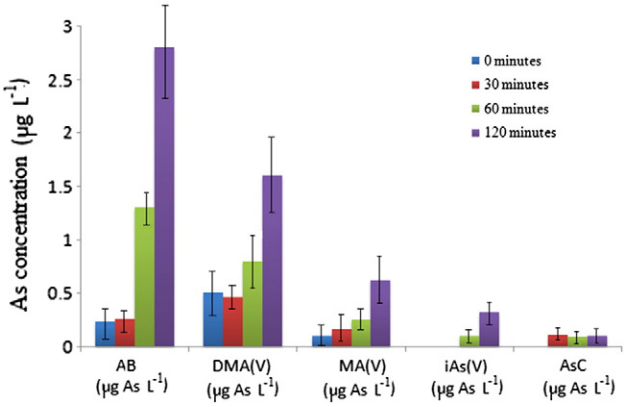



**Fig. 6.** Relative concentration of arsenic metabolites in serum samples collected for 5 volunteers before and after the consumption of 100 g of cooked anemones per volunteer.

during 90 h). These results are in good agreement with other experiments after ingestion of shrimp, in which 66% of arsenobetaine is eliminated from the body after 36 h [50]. Other arsenic species can be transformed into AB such as AsC, which after oral administration is rapidly absorbed or transformed into AB, with little or no degradation to inorganic arsenic, $MA^V$, and $DMA^V$ [43,51]. As previously reported, $DMA^V$ is not totally eliminated from the body [52], which is in good agreement with the almost constant concentration determined along the experiment. About 130% of $DMA^V$ present in 100 g of the anemones is excreted by urine during 90 h (408 µg $g^{-1}$ of creatinine) (Fig. 4b). This fact suggests the biotransformation of other arsenic species, like $DMAS^V$ into $DMA^V$, which is supported by the absence of the former in urine and its presence in *A. sulcata*. In addition, after in vitro gastrointestinal digestion, the concentration of As(V) is high, which can be also transformed into $DMA^V$ as previously described [25]. Other arsenicals are less abundant in urine as can be observed in Fig. 4b and c, especially As(V), $MA^V$ and DMAE. Some of them are quickly eliminated from the body, such as AsC, TETRA, TMAO and As(V), or progressively, like $MA^V$ and DMAE. In this experiment, 89% and 93% of the TMAO and TETRA present in 100 g of cooked anemones, respectively, are excreted by urine during the period 10–30 h without biotransformation (Fig. 4b). The excretion of DMAE in urine is slower than for the discussed arsenicals and about 80% of the total DMAE ingested is excreted during the period 20–50 h (Fig. 4c). In summary, about 95% of total arsenic in cooked anemones is bioaccessible (Table 3) and 85% of the amount ingested is eliminated from the body by urine in 90 h.

### 3.5. Human serum samples

Fig. 5 shows typical HPLC-ICP-MS overlapped chromatograms of serum samples before consumption and 1 and 2 h after, using AEC (Fig. 5a) and CEC (Fig. 5b). In contrast to the results obtained for the anemones and urine, in human serum samples, only AB, As(V), $MA^V$, $DMA^V$ and AsC are detected. As can be observed in the chromatograms (Fig. 5a and b), the peak at 2.5 min in CEC (Fig. 5b) is about 5 fold higher than the peak at 11.7 min in AEC (Fig. 5a). The explanation is the $^{40}Ar^{35}Cl$ interference, which coelutes with As(V) in CEC (Fig. 5b), as suggested by other authors [53].

As in the case of urine, human serum samples from 5 volunteers were collected before and after the consumption of 100 g of cooked anemones every 30 min. The mean total concentration of arsenic in serum before the consumption is 1.92 ± 0.32 ng $g^{-1}$ which accounts for 81 ± 17% of the total arsenic determined as sum of the species. The reason may be that As(III) is likely bound to proteins and peptides in serum [54,55] which precipitate during the methanol/water extraction procedure, thus causing losses of As(III) in the pellet upon centrifugation [56].

Fig. 6 shows the evolution of the different arsenicals during 2 h after the ingestion. After 30 min from the ingestion, $DMA^V$ is the most abundant in serum, followed by AB, $MA^V$ and AsC. After this period of time, the amount of AsC in human serum is constant during 2 h (Fig. 6), but the concentration of other arsenicals increased progressively with a common pattern and As(V) can be only detected after 1 h. This fact supports the idea that in humans, after the absorption of As(V) by the gastrointestinal tract, it is quickly reduced to As(III) in the blood, which easily cross the cell membrane at physiological pH and is methylated and later oxidized [57].

## 4. Conclusions

Despite the obvious interest about the complete knowledge of human arsenic metabolism, exposure experiments are very difficult and some organisms have been proved to be poor models because of their different behavior compared to humans, like in the case of rats. A bioaccessibility study of an arsenic containing seafood, namely *A. sulcata*, and later monitoring of human biological fluids after consumption have been used in this paper to show the real exposure to arsenic, providing a deeper insight into the arsenic metabolism of humans after the consumption of these sea organisms that are not usually studied. Speciation in tissue extracts and human fluids (urine and serum) was carried out by anion/cation exchange chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry ((IC)-ICP-MS). The ICP-MS constitutes a powerful technique for the speciation of arsenic since it provides very low detection limits, tolerance to matrix and large linearity range. In addition, the use of the collision cell eliminates suitably the interferences on the arsenic signal, some of them caused by the complex matrix that has been analyzed. However, this technique should be combined with organic mass spectrometry since in real samples the presence of unidentified arsenicals is very common. The use of organic mass spectrometry in this work allowed the standardless identification of AsC, GPAsC, $DMAS^V$ and DMAE in the analyzed samples.

## Acknowledgments

The authors thank the Spanish Ministry of Science and Innovation project CTM2009-12858-C02-01 and the projects P08-FQM-03554 and P09-FQM-4659 from Regional Ministry of Economy, Innovation, Science and Employment (Andalusian Government) for funding. The authors also thank Dr. Vicenta Devesa and Dinoraz Vélez (Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC), Valencia, Spain) and Dr. Riansares Muñoz (Universidad Complutense de Madrid) for the kind donation of TMAO, TETRA and DMAS. M.A. García Sevillano thanks the Ministerio de Educación for a PhD scholarship.

## References

[1] T. Grossman, C.B. Klein, Genetic and epigenetic effects of environmental arsenicals, Metallomics 3 (2011) 1397.
[2] A.H. Smith, M. Goycolea, R. Haque, M.L. Biggs, Marked increase in bladder and lung cancer mortality in a region of Northern Chile due to arsenic in drinking water, Am. J. Epidemiol. 147 (1998) 660.
[3] K. Francesconi, Arsenic species in seafood: origin and human health implications, Pure Appl. Chem. 82 (2010) 373.
[4] EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Scientific opinion on arsenic in food, EFSA J. 7 (10) (2009) 1351(199 pp.).
[5] S. McSheehy, J. Szpunar, R. Morabito, P. Quevauviller, The speciation of arsenic in biological tissues and the certification of reference materials for quality control, Trends Anal. Chem. 22 (2003) 191.
[6] A.E. Geiszinger, W. Goessler, K.A. Francesconi, The marine polychaete Arenicola marina: its unusual arsenic compound pattern and its uptake of arsenate from seawater, Mar. Environ. Res. 53 (2002) 37.
[7] D. Fattorini, F. Regoli, Arsenic speciation in tissues of the Mediterranean polychaete *Sabella spallanzanii*, Environ. Toxicol. Chem. 23 (2004) 1881.
[8] D. Fattorini, A. Notti, A.F. Regoli, Characterization of arsenic content in marine organisms from temperate, tropical, and polar environments, Chem. Ecol. 22 (2006) 405.
[9] H.V. Aposhian, M.M. Aposhian, Arsenic toxicology: five questions, Chem. Res. Toxicol. 19 (2006) 1.
[10] H. Yamauchi, B.A. Fowler, in: J.O. Nriagu (Ed.), Arsenic in the Environment, Part II: Human Health and Ecosystems, J. Wiley and Sons, Inc., New York, USA, 1994, p. 35.

[11] F. Ebert, A. Weiss, M. Bültemeyer, I. Hamann, A. Hartwig, T. Schwerdtle, Arsenicals affect base excision repair by several mechanisms, Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen. 715 (2011) 32.
[12] H. Naranmandura, N. Suzuki, T.K. Suzuki, Trivalent arsenicals are bound to proteins during reductive methylation, Chem. Res. Toxicol. 19 (2006) 1010.
[13] S.M. Wnek, T.J. Jensen, P.L. Severson, B.W. Futscher, A.J. Gandolfi, Monomethylarsonous acid produces irreversible events resulting in malignant transformation of a human bladder cell line following 12 weeks of low-level exposure, Toxicol. Sci. 116 (2010) 44.
[14] H. Naranmandura, Y. Ogra, K. Iwata, J. Lee, K.T. Suzuki, M. Weinfeld, X.C. Le, Systemic distribution and speciation of diphenylarsinic acid fed to rats, Toxicol. Appl. Pharmacol. 237 (2009) 214.
[15] S. Hirata, H. Toshimitsu, M. Aihara, Determination of arsenic species in marine samples by HPLC-ICP-MS, Anal. Sci. 22 (2006) 39.
[16] P.B. Tchounwou, J.A. Centeno, A.K. Patlolla, Arsenic toxicity, mutagenesis, and carcinogenesis—a health risk assessment and management approach, Mol. Cell. Biochem. 255 (2004) 47.
[17] M. Vahter, in: W.R. Chappel (Ed.), Arsenic Exposure and Health Effects, Elsevier, Amsterdam, 1999, p. 267.
[18] X.C. Le, in: W.T. Marcel Dekker (Ed.), Arsenic Speciation in the Environment and Humans, in Environment Chemistry of Arsenic, Frankenberger, Inc., New York, USA, 2000, p. 95.
[19] M.F. Hughes, V. Devesa, B.M. Adair, S.D. Conklin, J.T. Creed, M.Y. Styblo, E.M. Kenion, D.J. Thomas, Tissue dosimetry, metabolism and excretion of pentavalent and trivalent dimethylated arsenic in mice after oral administration, Toxicol. Appl. Pharmacol. 227 (2008) 26.
[20] G. Concha, G. Vogler, D. Lezeano, B. Nermell, M. Vahter, Exposure to inorganic arsenic metabolites during early human development, Toxicol. Sci. 44 (1998) 185.
[21] X.C. Le, W.R. Cullen, K.J. Reimer, Human urinary arsenic excretion after one-time ingestion of seaweed, crab, and shrimp, Clin. Chem. 40 (1994) 617.
[22] M. Vahter, Mechanisms of arsenic biotransformation, Toxicology 181–182 (2002) 211.
[23] E. Schmeisser, A. Rumpler, M. Kollroser, G. Rechberger, W. Goessler, K.A. Francesconi, Arsenic fatty acids are human urinary metabolites of arsenolipids present in cod liver, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 45 (2006) 150.
[24] J.S. Petrick, B. Jagadish, E.A. Mash, H.V. Aposhian, Monomethylarsonous acid (MMA(III)) and arsenite: LD(50) in hamsters and in vitro inhibition of pyruvate dehydrogenase, Chem. Res. Toxicol. 14 (2001) 651.
[25] D.H. Thomas, J. Li, S.B. Waters, W. Xing, B.M. Adair, Z. Drobna, V. Devesa, M. Styblo, Arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase and the methylation of arsenicals in the invertebrate chordate *Ciona intestinalis*, Exp. Biol. Med. 232 (2007) 3.
[26] K. Rehman, H. Naranmandura, Arsenic metabolism and thioarsenicals, Metallomics 4 (2012) 881.
[27] V. Devesa, D. Velez, R. Montoro, Effect of thermal treatments on arsenic species contents in food, Food Chem. Toxicol. 46 (2008) 1.
[28] M. Contreras-Acuña, T. García-Barrera, M.A. García-Sevillano, J.L. Gómez-Ariza, Speciation of arsenic in marine food (*Anemonia sulcata*) by liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry and organic mass spectrometry, J. Chromatogr. A 1282 (2013) 133.
[29] WHO, Biological Monitoring of Chemical Exposure in the Workplace, vol. 1, 1996.
[30] S. Mounicou, J. Szpunar, R. Lobinski, D. Andrey, C.J. Blake, Bioavailability of cadmium and lead in cocoa: comparison of extraction procedures prior to size-exclusion fast-flow liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection (SEC-ICP-MS), J. Anal. At. Spectrom. 17 (2002) 880.
[31] J. Feldmann, V.W.-M. Lai, W.R. Cullen, M. Ma, X. Lu, X.C. Le, Sample preparation and storage can change arsenic speciation in human urine, Clin. Chem. 45 (1988).
[32] J.S. Edmonds, K.A. Francesconi, The origin of arsenobetaine in marine animals, Appl. Organomet. Chem. 2 (1988) 297.
[33] W.R. Cullen, K.J. Reimer, Arsenic speciation in the environment, Chem. Rev. 89 (1989) 713.
[34] K.A. Francesconi, J.S. Edmonds, Arsenic species in marine samples, Croact. Chem. Acta 71 (1998) 343.
[35] H.R. Hansen, A. Raab, M. Jaspars, B.F. Milne, J. Feldmann, Sulfur-containing arsenical mistaken for dimethylarsinous acid [DMA(III)] and identified as a natural metabolite in urine: major implications for studies on arsenic metabolism and toxicity, Chem. Res. Toxicol. 17 (2004) 1086.
[36] R. Raml, A. Rumpler, W. Goessler, M. Vahter, L. Li, T. Ochi, K.A. Francesconi, Thiodimethylarsinate is a common metabolite in urine samples from arsenic-exposed women in Bangladesh, Toxicol. Appl. Pharmacol. 222 (2006) 374.
[37] K.T. Suzuki, K. Iwata, H. Naranmadura, N. Suzuki, Metabolic differences between two dimethylthioarsenicals in rats, Toxicol. Appl. Pharmacol. 218 (2007) 166.
[38] H. Naranmandura, K. Suzuki, Formation of dimethylthioarsenicals in red blood cells, Toxicol. Appl. Pharmacol. 227 (2008) 390.
[39] S.K.V. Yathavakilla, M. Fricke, P.A. Creed, D.T. Heitkemper, N.V. Shockey, C. Schwegel, J.A. Caruso, J.T. Creed, Arsenic speciation and identification of monomethylarsonous acid and monomethylthioarsonic acid in a complex matrix, Anal. Chem. 80 (2008) 775.
[40] K.M. Kubachka, M.C. Kohan, S.D. Conklin, K. Herbin-Davis, J.T. Creed, D.J. Thomas, In vitro biotransformation of dimethylarsinic acid and trimethylarsine oxide by anaerobic microflora of mouse cecum analyzed by HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MS, J. Anal. At. Spectrom. 24 (2009) 1062.
[41] R. Raml, W. Goessler, K.A. Francesconi, Improved chromatographic separation of thio-arsenic compounds by reversed-phase high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, J. Chromatogr. A 1128 (2006) 164.
[42] K.A. Francesconi, R.V. Stick, J.S. Edmonds, Glycerylphosphorylarsenocholine and phosphatidylarsenocholine in yelloweye mullet (*Aldrichetta forsteri*) following oral administration of arsenocholine, Cell. Mol. Life Sci. 46 (1990) 464.
[43] E. Marafante, M. Vahter, L. Dencker, Metabolism of arsenocholine in mice, rats and rabbits, Sci. Total. Environ. 34 (1984) 223.
[44] G.X. Sun, P.N. Williams, A.M. Carey, Y.G. Zhu, C. Deacon, A. Raab, J. Feldmann, R.M. Islam, A.A. Meharg, Inorganic arsenic in rice bran and its products are an order of magnitude higher than in bulk grain, Environ. Sci. Technol. 42 (2008) 7542.
[45] Anonymous, in: R.E. Crossgrove (Ed.), Arsenic in Drinking Water, National Academy Press, Washington, 1999, p. 83.
[46] J. De Kimpe, R. Cornelis, L. Mees, R. Vanholder, in: M. Anke, D. Meissner, C.F. Mills (Eds.), Trace Elements in Man and Animals, Verlag Media Touristik, Gersforf, Germany, 1993, p. 845.
[47] A. Salvadeo, C. Minola, S. Segagni, G. Villa, Trace metal changes in dialysis fluid and blood of patients on hemodialysis, Int. J. Artif. Organs 2 (1979) 17.
[48] K.A. Francesconi, R. Tanggaard, C.J. McKenzie, W. Goessler, Arsenic metabolites in human urine after ingestion of an arsenosugar, Clin. Chem. 48 (2002) 92.
[49] V.W.-M. Lai, Y. Sun, E. Ting, W.R. Cullen, K.J. Reimer, Arsenic speciation in human urine: are we all the same? Toxicol. Appl. Pharmacol. 198 (2004) 297.
[50] X.C. Le, M. Ma, V.W.-M. Lai, in: W.R. Chappell, C.O. Abernathy, R.L. Calderon (Eds.), Arsenic Exposure and Human Health Effects, Elsevier, Science BV, 1999, p. 69.
[51] T. Kaise, S. Fukui, The chemical form and acute toxicity of arsenic compounds in marine organisms, Appl. Organomet. Chem. 6 (1992) 155.
[52] L. Benramdane, M. Accominotti, L. Fanton, D. Malicier, J.J. Vallon, Arsenic speciation in human organs following fatal arsenic trioxide poisoning—a case report, Clin. Chem. 45 (1999) 301.
[53] R. Raml, G. Raber, A. Rumpler, T. Bauernhofer, W. Goessler, K.A. Francesconi, Individual variability in the human metabolism of an arsenic-containing carbohydrate, 2′,3′-dihydroxypropyl 5-deoxy-5-dimethyl-arsinoyl-D-riboside, a naturally occurring arsenical in seafood, Chem. Res. Toxicol. 22 (2009) 1534.
[54] J. Gailer, Arsenic-selenium and mercury–selenium bonds in biology, Coord. Chem. Rev. 251 (2007) 234.
[55] X. Zhang, L. Mees, R. Cornelis, R. Vanholder, N. Lameire, Chemical speciation of arsenic in serum of uraemic patients, Analyst 123 (1998) 13.
[56] Z. Slejkovec, I. Falgona, W. Goessler, J.T. van Elteren, R. Raml, H. Podgornik, P. Cernelc, Analytical artefacts in the speciation of arsenic in clinical samples, Anal. Chim. Acta 607 (2008) 83.
[57] C.H. Tseng, A review on environmental factors regulating arsenic methylation in humans, Toxicol. Appl. Pharmacol. 235 (2009) 338.

VERSITA

Chemical Papers 66 (10) 914–924 (2012)
DOI: 10.2478/s11696-012-0207-6

ORIGINAL PAPER

# Speciation of arsenic metabolites in the free-living mouse *Mus spretus* from Doñana National Park used as a bio-indicator for environmental pollution monitoring‡

[a,b,c]Miguel Ángel García-Sevillano, [a,b,c]Macarena González-Fernández, [a,b,c]Rocío Jara-Biedma, [a,b,c]Tamara García-Barrera*, [d]Amalia Vioque-Fernández, [d]Juan López-Barea, [d]Carmen Pueyo, [a,b,c]José Luis Gómez-Ariza*

[a] *Department of Chemistry and Material Science, Faculty of Experimental Sciences,* [c] *Research Centre of Health and Environment (CYSMA), University of Huelva, Campus El Carmen, 21007-Huelva, Spain*

[b] *International Agrifood Campus of Excellence, CIA3, CIDERTA Building, University of Huelva, Huelva Business Park, 21007-Huelva, Spain*

[d] *Department of Biochemistry and Molecular Biology, Campus de Rabanales, University of Córdoba, Ed. Severo Ochoa, 1407-Córdoba, Spain*

Received 29 October 2011; Revised 12 April 2012; Accepted 14 April 2012

A speciation approach based on orthogonal chromatographic systems coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) was used to characterise the biological response of free-living mice *Mus spretus* to environmental pollution caused by arsenic in different areas of the Doñana National Park (south-west Spain). The relative presence of inorganic and organic forms of arsenic was studied in cytosolic extracts from high metabolic activity organs of *Mus spretus* mice: kidneys, liver, and brain. An instrumental coupling of size-exclusion chromatography with UV and collision/reaction cell-ICP-MS detectors (SEC-UV-ICP-ORC-MS) both in analytical and preparative scale was used for this purpose. The results showed the presence of low molecular mass (LMM) molecules linked to arsenic in these tissues especially in the kidneys, where the presence of these arsenic metabolites was higher. On the other hand, the presence of these arsenicals varied from one area to the other, which can be related to a different occurrence of contaminants. These low molecular mass fractions were collected by preparative SEC chromatography for later study with ion exchange chromatography and detection by ICP-ORC-MS, using both anionic and cationic columns. The results showed the higher presence of MMA and DMA in kidneys of mice caught in contaminated areas and the existence of small amounts of unidentified arsenicals when cation-exchange chromatography was used, which could be related to the presence of dimethylarsinoylethanol (DMAE), thioarsenic species, or arsenocholine (AsC).
© 2012 Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences

**Keywords:** *Mus spretus*, arsenic speciation, arsenic metabolites, environmental pollution, Doñana National Park

## Introduction

Arsenic is one of the most important global environmental toxic elements present in the terrestrial crust (medium concentration about 3 mg $kg^{-1}$) in the form of arsenopyrite (FeAsS) and represents the 20th most abundant element in our environment (Łobiński & Marczenko, 1997). Soils contain 0.05–0.2 mg $kg^{-1}$

*Corresponding author, e-mail: ariza@uhu.es; tamara@dqcm.uhu.es
‡Presented at the 5th Meeting on Chemistry & Life 2011, Brno, 14–16 September 2011.

of this element, but marine sediments can accumulate up to 40 mg $kg^{-1}$ of As (Francesconi & Edmonds, 1994). Arsenic is commonly found in several chemical forms; the toxicity, environmental mobility, accumulation in living organisms, and involvement in living-organisms' metabolism usually depend on the form in which the element is present (Vahter, 1999; Hirano et al., 2003). Inorganic forms of arsenic are highly toxic, but this toxicity decreases in the methylated forms (monomethylarsonic acid ($MMA^V$) and dimethylarsinic acid ($DMA^V$)), which are considered moderately toxic; however, other organic species such as arsenobetaine (AsB), arsenocholine (AsC), and arsenosugars are regarded as innocuous (Geiszinger et al., 2002; Fattorini & Regoli, 2004; Fattorini et al., 2006). However, monomethylarsonous acid ($MMA^{III}$) formed in vivo is more toxic than arsenite in hamsters (Petrick et al., 2001; Thomas et al., 2007).

Arsenobetaine, arsenocholine, arsenosugars, and arsenolipids are usually present in aquatic organisms and marine animals (Edmonds & Francesconi, 1981, 1987). In mammals, highly toxic inorganic arsenic is metabolised in the liver, after absorption from the gastrointestinal tract, to produce methylated species such as $MMA^V$ and $DMA^V$ which are excreted in the urine (Del Razo et al., 1997; Hughes et al., 2003). However, in recent years it has been demonstrated that biomethylation of inorganic arsenic is not necessarily a detoxification process, because the intermediates and products formed may be more reactive and toxic than inorganic arsenic (Thomas et al., 2007).

The environmental relevance of arsenic is due to its toxicity to mammals in which it leads to irreversible damage to the central nervous system, bones, red blood cells, and kidneys. An excessive intake of arsenic may cause skin lesions and peripheral vascular diseases, in addition to cancer of the lungs, liver, skin, and bladder (Fadrowski et al., 2010; Bates et al., 1992). Oxidative stress associated with arsenic has been related to carcinogenic processes and this element was reported as having the capacity to cross the blood-brain barrier (BBB) (García-Chávez et al., 2003; Piao et al., 2005).

Free-living organisms have been used in environmental pollution assessment since they provide more unequivocal information about the biological responses to contaminants than the direct analysis of contaminants. The mouse *Mus spretus* has been used for this purpose in the Doñana National Park (SW Spain) and surrounding areas since it is not a protected species and it feeds on plants, seeds, and insects around its burrow, hence it duly reflects the action of contaminants in the area in which it is caught (González-Fernández et al., 2011). This free-living organism has not been yet genetically sequenced although it exhibits a close genetic homology with the conventional laboratory mouse *Mus musculus*, which has been sequenced. This facilitates proteomic studies of *Mus spretus* using the database from *Mus musculus* in order to monitor the action of contaminants on terrestrial ecosystems (Montes-Nieto et al., 2007).

The area of study, the Doñana National Park, has been declared a UNESCO World Heritage Site due to its ecological importance. However, this area suffers from contamination threats caused by adjacent agricultural activities, mining, and industrial activities (Funes et al., 2006; Vioque-Fernández et al., 2009). Therefore, monitoring of the environmental quality of this area is necessary and *Mus spretus* as an unprotected species living in the park that reaches a higher density of population is an appropriate bio-indicator for this purpose.

The present work explores a speciation approach to compare the biological response of *Mus spretus* collected from five areas of the Doñana Park with different levels of contamination. The differences in levels of arsenic metabolites can be used for unequivocal environmental contamination assessment. Several organs from *Mus spretus* were studied and the highest concentration of arsenic was found in the kidneys. The metallo-metabolites profiles in the kidneys from *Mus spretus* were studied using SEC with the ICP-ORC-MS detection. The results show the presence of low molecular mass (LMM) molecules linked to arsenic in these tissues, the intensity of which varies from one area to the other, which can be related to different levels of contaminants. These low molecular mass fractions were collected for later study by ion-exchange chromatography and ICP-ORC-MS detection, using both anionic and cationic columns.

## Experimental

### *Standard solutions, reagents, and instrumentation*

All reagents used for sample preparation were of the highest available purity. Phenylmethanesulphonyl fluoride (PMSF) and reduced L-glutatione were obtained from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany). Helium of high-purity grade (> 99.999 %) was used as collision gas in ICP-ORC-MS experiments.

The standards used for mass calibration of the SEC columns were: bovine serum albumin (67 kDa) (purity 96 %), metallothionein I containing Cd, Cu, and Zn (7 kDa) (purity > 95 %), vitamin $B_{12}$ (1.35 kDa) (purity > 96 %), reduced glutathione (307 Da) (purity 98–100 %), and arsenobetaine (179 Da). All these reagents were purchased from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany). Standard stock solutions with a concentration of 10 mg $mL^{-1}$ were prepared by dissolving the respective compound in ultrapure water. Sodium arsenite and sodium arsenate, used for preparation of arsenic(III) and arsenic(V) standards, respectively, by dissolution in water, and arsenobetaine (AsB) were purchased from Sigma–Aldrich (Stein-

heim, Germany). Monomethylarsonic acid ($MMA^V$) and dimethylarsinic acid ($DMA^V$) were purchased from Supelco (Bellefonte, USA). Tetramethylarsonium ion ($TMA^+$) and trimethylarsine oxide (TMAO) were supplied by Dr. Vélez (Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC), Valencia, Spain). Individual working solutions for HPLC-ICP-MS analyses were prepared with a concentration of 1 mg $mL^{-1}$ of each of the compounds. Working solutions were prepared on the day of use by appropriate dilution of the stock solutions with water. The stock solutions were stored at 4 ℃ in darkness.

The mobile phase used in SEC was 20 mM of ammonium acetate (pH 7.4) (Suprapur® grade) purchased from Merck (Darmstadt, Germany). The void volume of the SEC column was determined by extrapolation of the retention time of bovine serum albumin (BSA). The mobile phase was prepared on the day of use in ultrapure water (18 MΩ cm) obtained from a Milli-Q system (Millipore, Watford, UK) and the pH was adjusted to pH 7.4 with ammonia solution (20 mass %) (Suprapur®, Merck, Darmstadt, Germany). The mobile phase used in the anion-exchange chromatography (AEC) was 30 mM of sodium dihydrogen phosphate (p.a.) purchased from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany) and the pH adjusted to 6.0 by addition of the appropriate volume of 20 mass % $NH_3$ aqueous solution. The mobile phase for the cation-exchange chromatography was 20 mM aqueous solution (Milli-Q water) of pyridine purchased from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany), with pH adjusted to 2.5 with formic acid (> 98 %, Fluka, puriss, p.a.).

For total element determination, nitric acid (65 mass %) and hydrogen peroxide (30 mass %) of Suprapur® grade (Merck, Darmstadt, Germany) were used for mineralisation of the samples.

A cryogenic homogeniser SPEX SamplePrep, Freezer/Mills 6770 (Metuchen, NJ, USA) was used to prepare a sample homogenate. Cytosolic extracts were obtained from this homogenate using a Teflon/glass homogeniser in a cold-chamber at 4 ℃.

The extraction was followed by ultracentrifugation (ultracentrifuge Beckman model L9-90 K; rotor 70 Ti) using polycarbonate bottles of 10 mL with cap assembly (Beckman Coulter). Elemental detection was

**Table 1.** Operating conditions of HPLC-ICP-ORC-MS

| | | | |
|---|---|---|---|
| SEC conditions | | | |
| Analytical column | Column | Superdex$^{TM}$-Peptide (300 mm × 10 mm × 13 μm) | |
| | Resolution range | < 10 kDa | |
| | Mobile phase | Ammonium acetate, 20 mmol $L^{-1}$ (pH 7.4) | |
| | Flow-rate | 0.7 mL $min^{-1}$ | |
| | Injection volume | 20 μL for liver and kidney extracts and 100 μL for brain extracts | |
| | Visible wavelength | 254 nm | |
| Preparative column | Column | Hiload 26/60 Superdex 30 Prep (600 mm × 26 mm × 34 μm ) | |
| | Resolution range | < 10 kDa | |
| | Mobile phase | Ammonium acetate, 20 mmol $L^{-1}$ (pH 7.4) | |
| | Flow-rate | 2 mL $min^{-1}$ | |
| | Injection volume | 500 μL | |
| | Visible wavelength | 254 nm | |
| IEC conditions | | | |
| Anion-exchange chromatography | Column | Hamilton PRP X-100 (250 mm × 4.6 mm × 5 μm) | |
| | Mobile phase | Sodium dihydrogen phosphate, 30 mM (pH 6) | |
| | Flow-rate | 1 mL $min^{-1}$ | |
| | Injection volume | 20 μL | |
| Cation-exchange chromatography | Column | Supelcosil SCX (250 mm × 4.6 mm × 5 μm) | |
| | Mobile phase | Pyridine, 20 mM (pH 2.5) | |
| | Flow-rate | 1.2 mL $min^{-1}$ | |
| | Injection volume | 20 μL | |
| ICP-MS conditions | | | |
| Forward power | 1500 W | He flow | 3.9 mL $min^{-1}$ |
| Plasma gas flow-rate | 15.0 L $min^{-1}$ | $Q_{oct}$ | –18 V |
| Auxiliary gas flow-rate | 1.0 L $min^{-1}$ | $Q_p$ | –16 V |
| Carrier gas flow-rate | 0.9 L $min^{-1}$ | Dwell time | 0.3 per isotope |
| Sampling depth | 8 mm | Isotopes monitored | $^{75}As$ |
| Sampling and skimmer cones | Nickel | – | – |

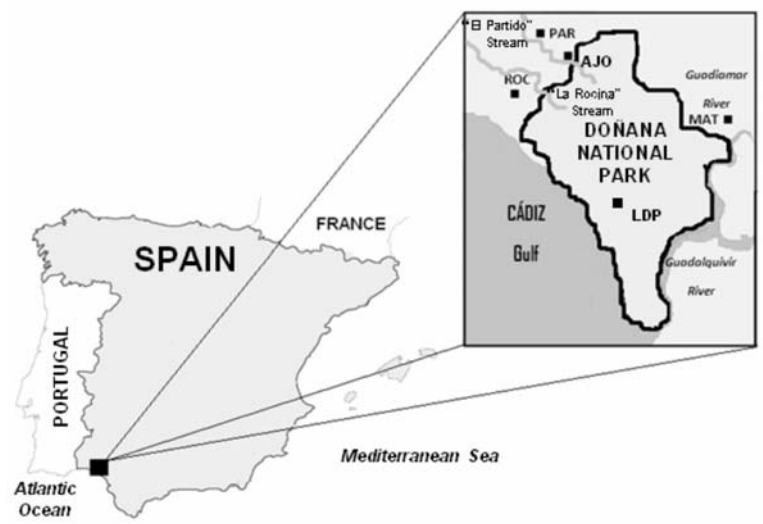



**Fig. 1.** Sampling area in Doñana National Park and its surroundings (SW Spain).

performed using an Agilent 7500ce ICP-MS spectrometer (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) equipped with an octopole collision cell. Chromatographic separations were performed using a Model 1100 HPLC pump as the delivery system with a UV detector (Agilent, Wilmington, DE, USA). The ICP-MS conditions (Table 1) in He mode were optimised using an aqueous solution of 1μg $mL^{-1}$ of $^{75}As$ with 2 vol. % HCl. The flow-rate of He collision gas was set at 3.9 mL $min^{-1}$ in order to avoid the interference of $^{40}Ar^{35}Cl^{+}$. An AKTA-Prime system (pump and UV detector at 254 nm) (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) was used as the eluent delivery system, equipped with a 2 mL sample loop.

Analytical SEC was performed with a Superdex$^{TM}$-Peptide (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) column (10 mm × 300 mm, 13 μm) with an exclusion limit of 10 kDa (with an effective separation range of 0.1–10 kDa). Preparative SEC was carried out using a Hiload 26/60 Superdex 30 Prep for separation range < 10 kDa (low molecular mass (LMW)) (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). Anion-exchange HPLC separations were carried out using a Hamilton PRP X-100 (250 mm × 4.6 mm × 5 μm) column. Cation-exchange separations were carried out using a Supelcosil LC-SCX (250 mm × 4.6 mm × 5 μm) column.

A MARS microwave-accelerated reaction system (CEM, Matthews, NC, USA) was used for mineralisation of the samples.

### *Sampling area, animals, and sample preparation*

Free-living mice (*Mus spretus*) were collected between November 10th and December 11th (2009) in five sampling areas from the Doñana National Park (DNP) and its surroundings with different levels of contamination (Fig. 1). The sampling point site "Lucio del Palacio" (LDP) was considered as the control area because it is located in the centre of the park where the contaminants' input is lower. In 2007, the World Wildlife Fund warned that strawberry farms surrounding the park, where 95 % of Spanish strawberries were produced, threatened to cause catastrophic damage to the park by depleting the surrounding groundwater, as well as creating considerable pesticide pollution; in addition, plastic cover waste from the crops was accumulated in the "La Rocina" stream (ROC). The other areas studied were: upstream and downstream on the Partido (PAR and AJO, respectively) affected by citrus fruit, strawberry, and grape crops; the "La Rocina"(ROC) was also affected by agricultural activities, and also by diffused pollution from the petrochemical and chemical activities from the industrial belt of Huelva and mining activities from the north (Riotinto mine); and the "El Matochal" (MAT) site next to the Guadiamar river with inputs from rice fields and metals from mining spillage caused by the disaster in the Aznalcóllar mine, in which about 4 million cubic metres of acidic water and 2 million cubic meters of mud containing toxic metals, mainly zinc, lead, copper, arsenic, and aromatic amines were released (Fernandez et al., 1992). The sampling sites are summarised in Table 2, which includes the codes of the samples, UTM coordinates, type of sample (reference/problem), and number of mice of each sex sampled. *Mus spretus* mice were caught using Sherman live-traps baited with hazelnut cream over bread, which were mounted during the evenings and checked the next morning. Adult animals were taken alive to a laboratory at Doñana Biological Reserve, and data on site/date of collection, sex, mass, and external measurements were recorded.

The mice were individually killed by cervical dislocation and dissected. Individual organs were excised, weighed in Eppendorf vials, cleaned with 0.9 mass %

**Table 2.** Sites under study

| Area (code) | UTM coordinates | | Type | Number of mice | |
|---|---|---|---|---|---|
| | X | Y | | Males | Females |
| Lucio del Palacio (LDP) | 193800 | 4099515 | Negative control | 18 | 15 |
| La Rocina (ROC) | 178653 | 4119937 | Problem | 7 | 4 |
| Ajolí (AJO) | 192352 | 4124977 | Problem | 21 | 11 |
| Matochal (MAT) | 208681 | 4102207 | Problem | 16 | 9 |
| Partido (PAR) | 191173 | 4124977 | Problem | 9 | 8 |

NaCl solution, frozen in liquid nitrogen, and stored at –80 ℃ until they were used for extract preparation. Mice were handled in accordance with the standards stipulated by the European Community. The investigation was performed after approval by the Ethical Committee of the University of Huelva (Spain).

### *Samples preparation and determination of total metal concentration*

Livers, kidneys, and brains from 5 different male mice were pooled and treated following a procedure described elsewhere (González-Fernández et al., 2011). Briefly, the samples were disintegrated by cryogenic homogenisation in a 6770 freezer/mill apparatus (1 min at maximum rate). Then, the metal-biomolecules were extracted with a solution (3 mL per g of sample) containing ammonium acetate buffer solution (20 mM) at pH 7.4, GSH (1 mM), and phenylmethanesulphonylfluoride (PMSF, 1 mM) using a glass/teflon homogeniser. Finally, the extracts were centrifuged at 120000 $g$ for 1 h at 4 ℃ and stored at –80 ℃ until analysis.

The extracts were precisely weighed (0.200 g) in 5-mL teflon microwave vessels and 640 μL of nitric acid and 160 μL of hydrogen peroxide was added. The mineralisation was carried out at 400 W from ambient temperature increased to 160 ℃ within 15 min and held at this temperature for 40 min. Then, the solutions were made up to 2 mL and analysed by ICP-MS using rhodium (1 μg $mL^{-1}$) as the internal standard. All the analyses were repeated three times.

### *Analysis of extracts with SEC coupled to ICP-MS*

First, the extracts were filtered through Iso-Disc poly(vinylidene difluoride) filters (25 mm diameter, 0.2 μm pore-size) to avoid column overloading or clogging and ultrafiltered with AMICON 30K (Millipore) by centrifugation at 10000 $g$ at 4 ℃ for 30 min. Analytical SEC-ICP-ORC-MS online coupling was performed by connecting the outlet of the chromatographic column to the Micromist nebuliser inlet (Glass Expansion, Switzerland) of the ICP-MS by means of a 30 cm PEEK tubing (0.6 mm i.d.). Preparative SEC-ICP-ORC-MS was performed with an analogous coupling using a Babington nebuliser inlet (Agilent Technologies, Japan). Collection of the fraction containing arsenic metabolites was performed on the latter chromatographic system without atomic detector, monitoring the molecules output from the chromatographic system with a non-destructive UV detector.

**Table 3.** Concentration of arsenic (ng $g^{-1}$) in the extracts of mice organs

| Organ | LDP | AJO | PAR | MAT | ROC |
|---|---|---|---|---|---|
| Liver | < LOD | < LOD | 1.2 ± 0.2 | 1.6 ± 0.2 | 1.8 ± 0.3 |
| Brain | < LOD | < LOD | < LOD | < LOD | < LOD |
| Kidney | < LOD | 3.2 ± 0.5 | 2.4 ± 0.7 | 5.4 ± 1.1 | 4.3 ± 0.5 |

### *Analysis of kidney extracts by IEC coupled to ICP-MS*

The fraction isolated by preparative SEC-ICP-ORC-MS was lyophilised and 10-times pre-concentrated with ultrapure water. Finally, this fraction was centrifuged at 10000 $g$ at 4 ℃ for 10 min and stored at –80 ℃ until analysis. The IEC-ICP-ORC-MS online coupling was performed by connecting the outlet of the chromatographic column to the Micromist nebuliser inlet (Glass Expansion, Switzerland) of the ICP-ORC-MS by means of a 30 cm PEEK tubing (0.15 mm i.d.).

## Results and discussion

### *Presence of arsenic in organ extracts*

The amounts of arsenic present in the extracts from the different organs (liver, brain, and kidneys) of *Mus spretus* are shown in Table 3. Recovery experiments were performed by spiking the extracts with 10 μg $L^{-1}$ of arsenic. In all the samples, recoveries are in the range of 80–110 %. Instrumental detection limit (LOD) was 0.046 μg $L^{-1}$ As. The most significant differences between the areas of study and the organs were observed in the kidneys.

The greater presence of arsenic in the kidneys is remarkable. In the brain, the element was always under the limit of detection in the amount of extract

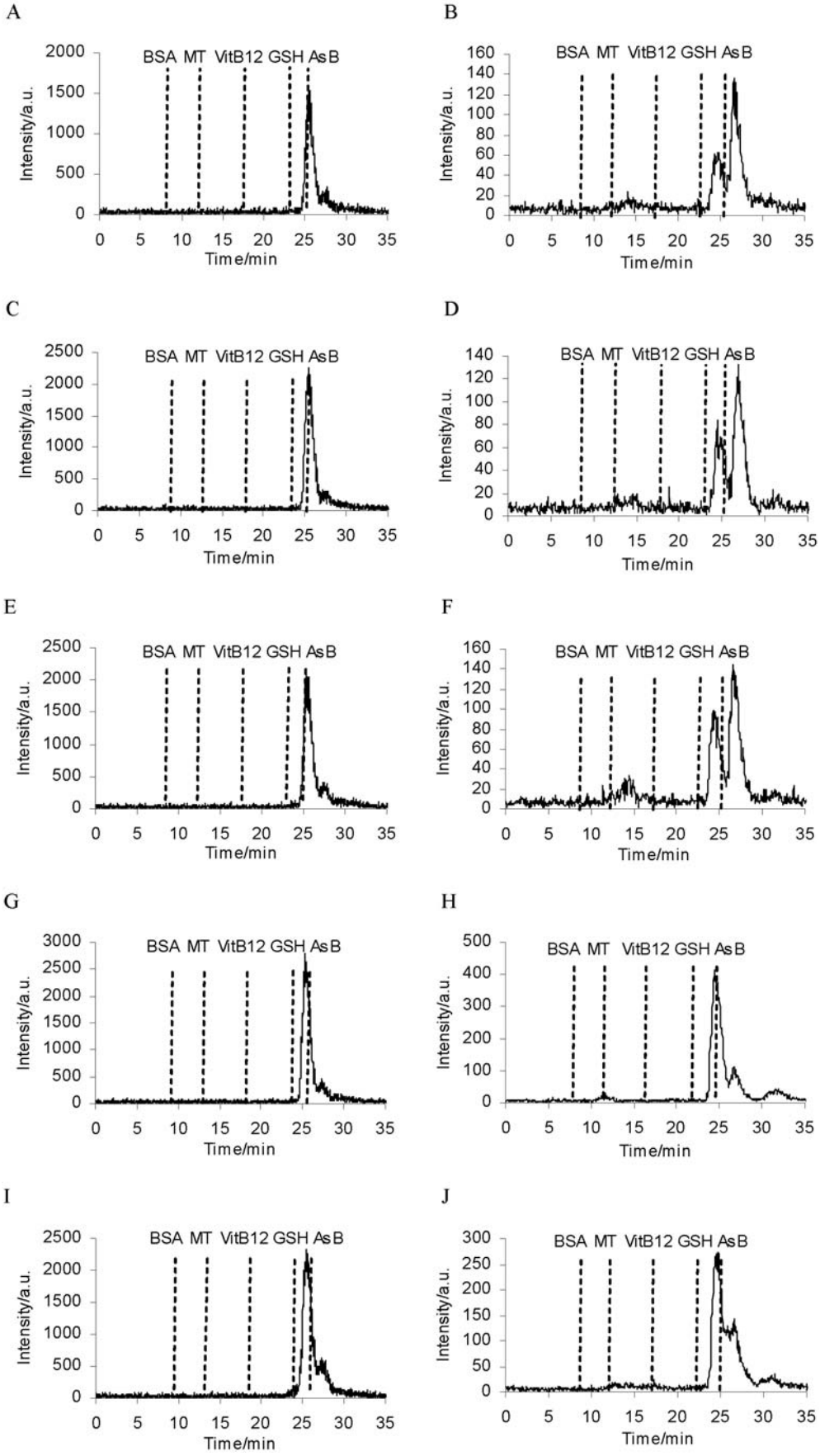



**Fig. 2.** Arsenic metabolites in kidney and liver from *Mus spretus* recorded by SEC-ICP-ORC-MS: LDP kidney (A), LDP liver (B), AJO kidney (C), AJO liver (D), PAR kidney (E), PAR liver (F), MAT kidney (G), MAT liver (H), ROC kidney (I), ROC liver (J). For chromatographic conditions, see Table 1 (analytical column).

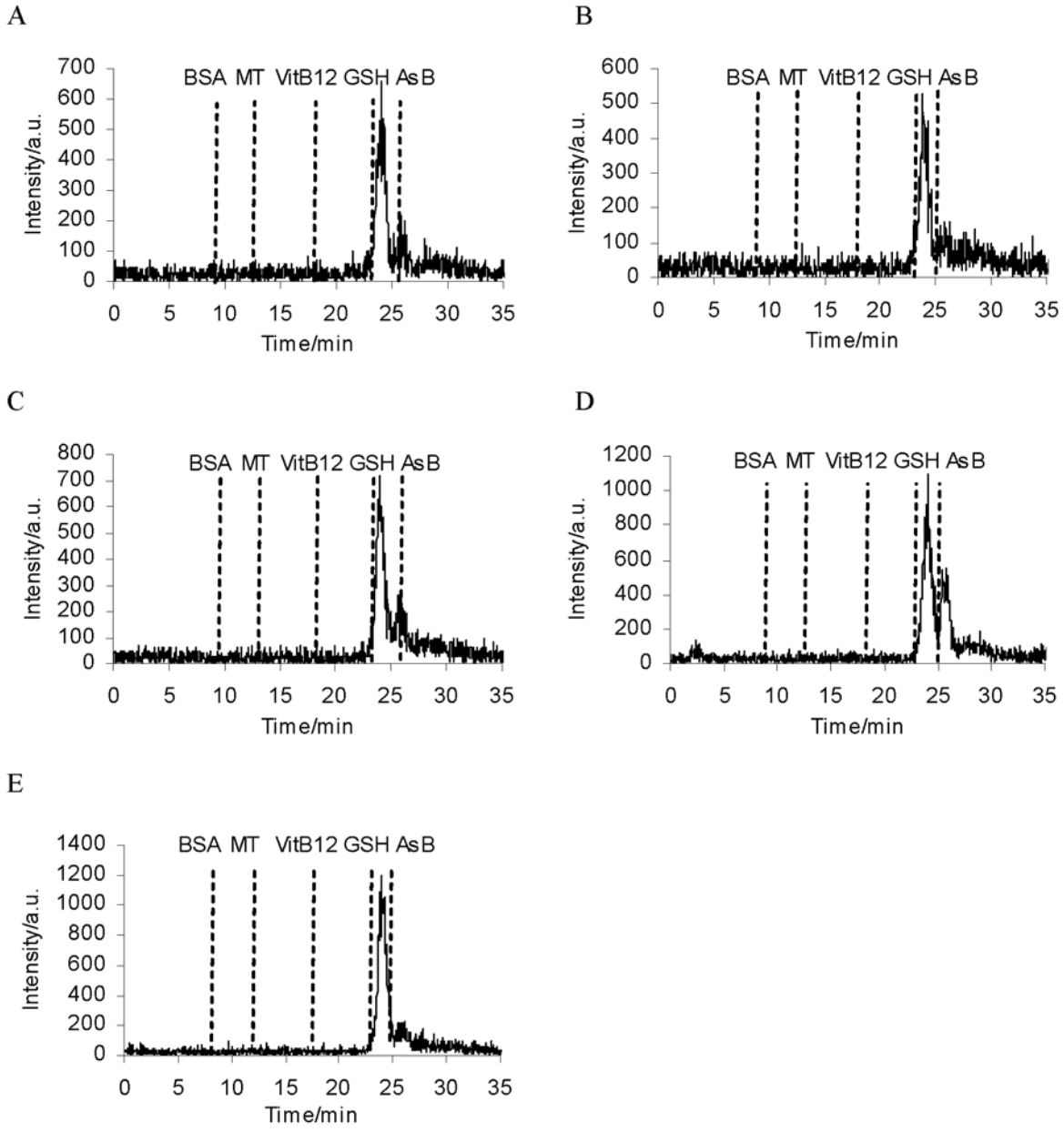



**Fig. 3.** Arsenic metabolites in brain from *Mus spretus* recorded by SEC-ICP-ORC-MS: LDP (A), AJO (B), PAR (C), MAT (D), ROC (E). For chromatographic conditions, see Table 1 (analytical column).

analysed (0.2 g). The highest concentration of arsenic was found in the kidneys of mice caught in the areas of MAT, AJO, and ROC.

### *SEC profiles of arsenic compounds in cytosolic extracts from Mus spretus*

The relative abundance of As-species in livers and kidneys from the sites under study was evaluated in the cytosolic fraction of these organs by analytical SEC-ICP-ORC-MS using a Superdex$^{TM}$-Peptide column with effective range of separation $< 10$ kDa. The results are shown in Fig. 2.

The intensity of the signals of arsenic is higher in the kidneys than in the liver. Two peaks related to low molecular mass metabolites can be observed in the liver and kidney extracts at 26 min and 27.5 min of retention time. It is well known that inorganic arsenic in the liver of mammals goes through several stages of a biotransformation process that produces organic arsenic species (mainly $MMA^V$ and $DMA^V$) (Naranmandura & Suzuki, 2008), although As-containing proteins are also present. These species of arsenic are finally excreted through the urine as pentavalent methylated arsenic forms (Mandal et al., 2001; Suzuki et al., 2002). This can explain the higher concentration of arsenic metabolites in the kidneys in relation to other organs.

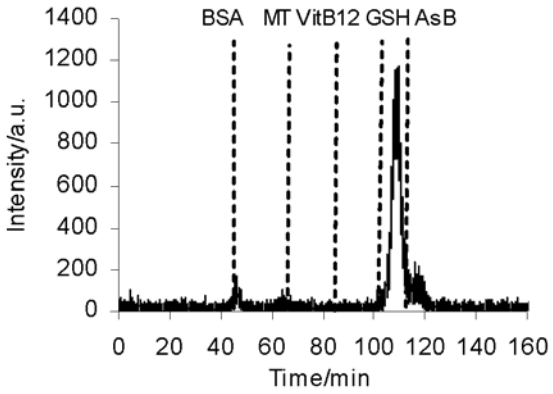



**Fig. 4.** Arsenic metabolites in kidneys from *Mus spretus* caught in MAT recorded by SEC-ICP-ORC-MS. For chromatographic conditions, see Table 1 (preparative column).

The presence of two peaks is also observed in the brain extracts from mice caught in the ROC and MAT areas (Fig. 3). These signals can be observed when an extract's volume of 100 μL is injected into the chromatographic systems; a lower volume in a range of 10–20 μL was used for analyses of liver and kidney extracts. The presence of arsenic species in the brain other than $DMA^V$ can be explained by the presence of other As metabolites in blood that cross the blood-brain barrier (BBB) when the capacity of methylation in the liver is exceeded (Vahter, 1981; Vahter & Norin, 1980; Hughes et al., 2003). Experiments performed with rats as a model of mammals revealed that As could cross the BBB and produce an increased quantity of reactive oxygen species (ROS) as well as cause oxidative stress (Piao et al., 2005).

The extracts of kidney from *Mus spretus* caught in MAT were analysed by SEC using both types of columns (analytical and preparative). The chromatograms obtained by in-series UV and ICP-ORC-MS detection are shown in Fig. 4. The arsenic fractionation profile obtained with the LMM column shows one peak using the ICP-ORC-MS detection, which is associated with the molecular mass range of 100–400 Da according to mass calibration. However, confirmation of specific arsenic-metabolites is not possible using only a SEC separation (Michalke & Schramel, 2004) and a complementary IEC method was applied for further purification of the arsenic SEC fraction.

### *Arsenic speciation by IEC-ICP-ORC-MS*

The As-peak with the highest intensity in the SEC-ICP-ORC-MS chromatogram corresponds to the fraction with retention time of 100–123 min. This fraction was collected from 2 mL of the kidney extract of mice caught in each area of study and subsequently submitted to a multi-dimensional orthogonal chromatographic separation based on anion- and cation-exchange interactions, monitoring the presence of As in the eluent by ICP-ORC-MS. Chromatograms of the arsenic standards used for calibration with two columns are shown in Fig. 5. Fig. 6 shows the chromatograms obtained from the kidney extracts of mice from MAT spiked with 50 μg $L^{-1}$ of each arsenic species, using either an anion-exchange column (Fig. 6C) or a cation-exchange column (Fig. 6D).

The results obtained by IEC show that methylated metabolites (MMA and DMA) are the predominant species in the kidneys. The higher intensity of MMA and DMA in the kidneys of mice from contaminated

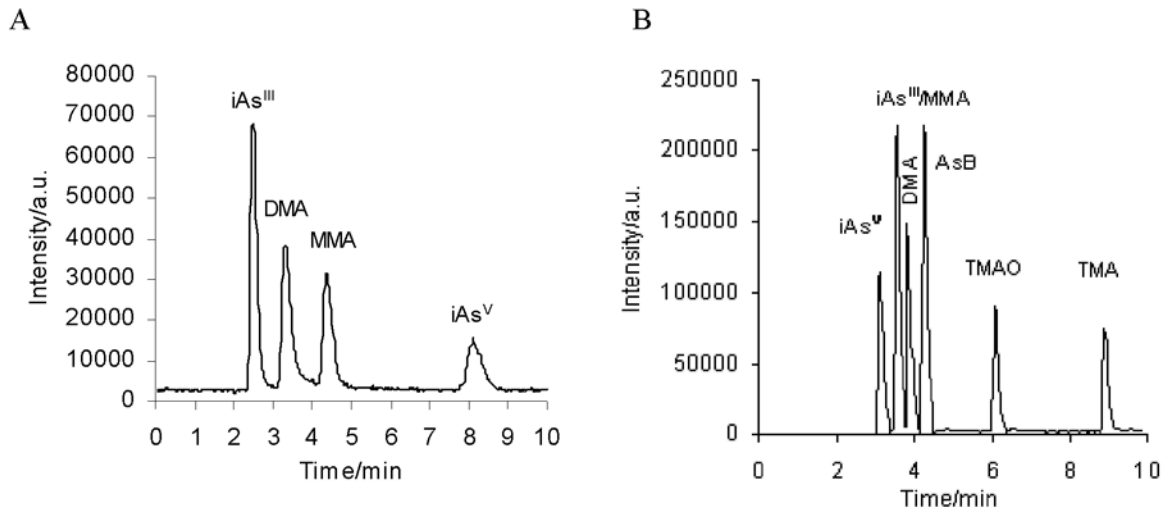



**Fig. 5.** Chromatogram of As standards with PRP-X100 column ($iAs^{III}$, $iAs^V$, $DMA^V$, and $MMA^V$). For chromatographic conditions, see Table 1 (anion-exchange chromatographic column) (A); chromatogram of As standards with Supelcosil SCX column ($iAs^{III}$, $iAs^V$, AsB, $DMA^V$, $MMA^V$, TMAO, and TMA). For chromatographic conditions, see Table 1 (cation-exchange chromatographic column) (B).

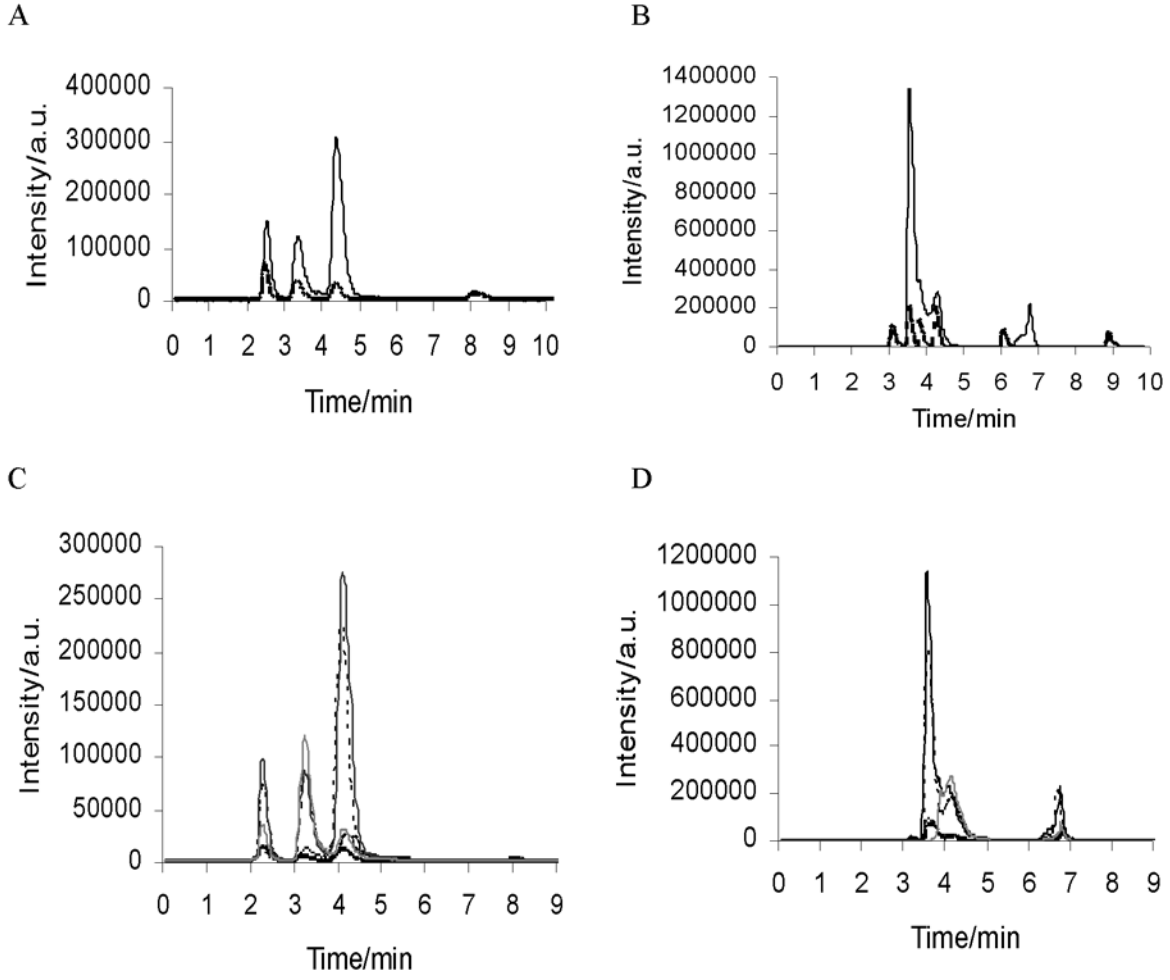



**Fig. 6.** Speciation of arsenic metabolites in kidney from *Mus spretus* caught in different areas of study by IEC-ICP-ORC-MS: kidney (- -) and kidney MAT (—) extracts from *Mus spretus* spiked with 50 μg $L^{-1}$ of each of the following arsenicals: $iAs^{III}$, $iAs^{V}$, $DMA^{V}$, and $MMA^{V}$). For chromatographic conditions, see Table 1 (anion-exchange chromatographic column) (A); kidney (- -) and kidney MAT (—) extracts from *Mus spretus* spiked with 50 μg $L^{-1}$ of each of the following arsenicals: $iAs^{III}$, $iAs^{V}$, AsB, $DMA^{V}$, $MMA^{V}$, TMAO, and TMA. For chromatographic conditions, see Table 1 (cation-exchange chromatographic column) (B); As-metabolites in kidney extracts from *Mus spretus* under anion-exchange conditions (C); As-metabolites in kidney extracts from *Mus spretus* under cation-exchange conditions (D); for C and D: LDP (– – –), AJO (---), PAR (- - -), MAT (—) (black), ROC (—) (grey).

sites such as ROC, MAT, and AJO (Fig. 6C) contrasts with the lower content of these metabolites in the areas with low contamination (LDP and PAR). This can be related to the significant amount of arsenic in ROC, affected by the diffuse contamination of this element transported in lixiviates from pyrite mines waste located in the north-east of Huelva province (Riotinto mine). In MAT, the proximity of the Guadiamar stream introduces arsenic and other metals from the Aznalcóllar mine tailing pond where rupture of the upstream dam occurred in 1998 (Grimalt et al., 1999). In addition, the concentration of arsenic in interstitial waters from Guadiamar sediments is very remarkable (Tovar-Sanchez et al., 2006). These issues explain the higher presence of arsenic species in these sampling sites. In PAR and LDP (uncontaminated areas), analogous peaks are observed but with lower intensity.

When cation-exchange chromatography is used (Fig. 6D), a peak at 4 min can be observed, which is not associated with the presence of arsenobetaine, although its retention time closely matches that of the corresponding standard of this arsenic species because this species is frequently found in aquatic organisms and marine mammals (Edmonds & Francesconi, 1981, 1987). However, other arsenic species can also be related to this peak due to their similar chromatographic behaviour, such as dimethylarsinoylethanol (DMAE), a metabolite present in human urine and in urine from experimental animals (Francesconi et al., 2002), and thioarsenic species such as monomethylmonothioarsonic acid ($MMMTA^{V}$), dimethylmonothioarsonic acid ($DMMTA^{V}$), and dimethyldithioarsonic acid ($DMDTA^{V}$) (Suzuki et al., 2010). In addition, an unidentified peak at about 7 min can be related to the presence of arsenocholine (AsC) according to the retention time using the same column and under

the identical chromatographic conditions reported by Chatterjee (2000). This metabolite is present at the highest concentration in mice from MAT and AJO (Fig. 6D).

## Conclusions

The use of SEC-ICP-MS coupling is a good choice to assess changes in the regulation of metal-binding biomolecules in environmental bio-indicators (e.g. *Mus spretus*) caused by contamination episodes. The first application of this arsenic speciation approach to the bio-indicator *Mus spretus* has provided promising results in the assessment of environmental stress resulting from pollution. However, further research is needed to separate SEC peaks containing arsenic in the liver, brain and plasma and to unequivocally identify unidentified peaks by organic mass spectrometry (Qq-TOF-MS).

*Acknowledgements. This work was supported by the projects: CTM-2009-12858-C02 01 (Ministerio de Ciencia e Innovación-Spain), P08-FQM-03554 and P09-FQM-04659 (Consejería de Innovación, J. A). M. A. García-Sevillano wishes to thank Ministerio de Educación for a PhD scholarship (FPU). M. González-Fernández wishes to thank Ministerio de Ciencia e Innovación for a pre-doctoral scholarship. R. Jara-Biedma wishes to thank Consejería de Innovación Ciencia y Empresa (Junta de Andalucía) for a pre-doctoral scholarship. We are grateful to Dr. Vélez (Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC), Valencia, Spain) for supplying the arsenic standards.*

## References

Bates, M. N., Smith, A. H., & Hopenhayn-Rich, C. (1992). Arsenic ingestion and internal cancers: A review. *American Journal of Epidemiology*, *135*, 462–476.

Chatterjee, A. (2000). Determination of total cationic and total anionic arsenic species in oyster tissue using microwave-assisted extraction followed by HPLC–ICP-MS. *Talanta*, *51*, 303–314. DOI: 10.1016/s0039-9140(99)00264-7.

Del Razo, L. M., García-Vargas, G. G., Vargas, H., Albores, A., Gonsebatt, M. E., Montero, R., Ostrosky-Wegman, P., Kelsh, M., & Cebrián, M. E. (1997). Altered profile of urinary arsenic metabolites in adults with chronic arsenicism. A pilot study. *Archives of Toxicology*, *71*, 211–217. DOI: 10.1007/s002040050378.

Edmonds, J. S., & Francesconi, K. A. (1981). Arseno-sugars from brown kelp (*Ecklonia radiata*) as intermediates in cycling of arsenic in a marine ecosystem. *Nature*, *289*, 602–604. DOI: 10.1038/289602a0.

Edmonds, J. S., & Francesconi, K. A. (1987). Transformations of arsenic in the marine environment. *Experientia*, *43*, 553–557. DOI: 10.1007/bf02143584.

Fadrowski, J. J., Navas-Acien, A., Tellez-Plaza, M., Guallar, E., Weaver, V. M., & Furth, S. L. (2010). Blood lead level and kidney function in US adolescents: The third national health and nutrition examination survey. *Archives of Internal Medicine*, *170*, 75–82.

Fattorini, D., & Regoli, F. (2004). Arsenic speciation in tissues of the Mediterranean polychaete Sabella spallanzanii. *Environmental Toxicology & Chemistry*, *23*, 1881–1887. DOI: 10.1897/03-562.

Fattorini, D., Notti, A., & Regoli, F. (2006). Characterization of arsenic content in marine organisms from temperate, tropical, and polar environments. *Chemistry and Ecology*, *22*, 405–414. DOI: 10.1080/02757540600917328.

Fernandez, M. A., Hernandez, L. M., Gonzalez, M. J., & Tabera, M. C. (1992). Organochlorinated compounds and selected metals in water and soils from Doñana National Park (Spain). *Water, Air and Soil Pollution*, *65*, 293–305. DOI: 10.1007/bf00479893.

Francesconi, K. A., & Edmonds, J. S. (1994). Biotransformation of arsenic in the marine environment. In J. O. Nriagu (Ed.), *Arsenic in the environment. Part 1: Cycling and characterization* (*Wiley series in advances in environmental science and technology*, Vol. *26*, pp. 221–262). New York, NY, USA: Wiley.

Francesconi, K. A., Tanggaard, R., McKenzie, C. J., & Goessler, W. (2002). Arsenic metabolites in human urine after ingestion of an arsenosugar. *Clinical Chemistry*, *48*, 92–101.

Funes, V., Alhama, J., Navas, J. I., López-Barea, J., & Peinado, J. (2006). Ecotoxicological effects of metal pollution in two mollusc species from the Spanish South Atlantic littoral. *Environmental Pollution*, *139*, 214–223. DOI: 10.1016/j.envpol.2005.05.016.

García-Chávez, E., Santamaría, A., Díaz-Barriga, F., Mandeville, P., Juárez, B. I., & Jiménez-Capdeville, M. E. (2003). Arsenite-induced formation of hydroxyl radical in the striatum of awake rats. *Brain Research*, *976*, 82–89. DOI: 10.1016/s0006-8993(03)02697-0.

Geiszinger, A. E., Goessler, W., & Francesconi, K. A. (2002). The marine polychaete *Arenicola marina*: its unusual arsenic compound pattern and its uptake of arsenate from seawater. *Marine Environmental Research*, *53*, 37–50. DOI: 10.1016/s0141-1136(01)00106-4.

González-Fernández, M., García-Sevillano, M. A., Jara-Biedma, R., García-Barrera, T., Vioque, A., López-Barea, J., Pueyo, C., & Gómez-Ariza, J. L. (2011). Size characterization of metal species in liver and brain from free-living (*Mus spretus*) and laboratory (*Mus Musculus*) mice by SEC-ICP-MS: Application to environmental contamination assessment. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, *26*, 141–149. DOI: 10.1039/c0ja00127a.

Grimalt, J. O., Ferrer, M., & Macpherson, E. (1999). The mine tailing accident in Aznalcollar. *The Science of the Total Environment*, *242*, 3–11. DOI: 10.1016/s0048-9697(99)00372-1.

Hirano, S., Cui, X., Li, S., Kanno, S., Kobayashi, Y., Hayakawa, T., & Shraim, A. (2003). Difference in uptake and toxicity of trivalent and pentavalent inorganic arsenic in rat heart microvessel endothelial cells. *Archives of Toxicology*, *77*, 305–312. DOI: 10.1007/s00204-003-0447-x.

Hughes, M. F., Kenyon, E. M., Edwards, B. C., Mitchell, C. T., Del Razo, L. M., & Thomas, D. J. (2003). Accumulation and metabolism of arsenic in mice after repeated oral administration of arsenate. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *191*, 202–210. DOI: 10.1016/s0041-008x(03)00249-7.

Łobiński, R., & Marczenko, Z. (1997). *Spectrochemical trace analysis for metals and metalloids* (*Wilson & Wilson's comprehensive analytical chemistry*, Vol. *XXX*). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.

Mandal, B. K., Ogra, Y., & Suzuki, K. T. (2001). Identification of dimethylarsinous and monomethylarsonous acids in human urine of the arsenic-affected areas in West Bengal, India. *Chemical Research in Toxicology*, *14*, 371–378. DOI: 10.1021/tx000246h.

Michalke, B., & Schramel, P. (2004). Manganese speciation in human milk using size exclusion chromatography combined with strong anion exchange chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry detection. *Jour-*

*nal of Analytical Atomic Spectrometry*, *19*, 121–128. DOI: 10.1039/b304177h.

Montes-Nieto, R., Fuentes-Almagro, C. A., Bonilla-Valverde, D., Prieto-Álamo, M. J., Jurado, J., Carrascal, M., Gómez-Ariza, J. L., López-Barea, J., & Pueyo, C. (2007). Proteomics in free-living *Mus spretus* to monitor terrestrial ecosystems. *Proteomics*, *7*, 4376–4387. DOI: 10.1002/pmic.200700409.

Naranmandura, H., & Suzuki, K. T. (2008). Formation of dimethylthioarsenicals in red blood cells. *Toxicology and Applied Pharmacol*ogy, *227*, 390–399. DOI: 10.1016/j.taap.2007.11.008.

Petrick, J. S., Jagadish, B., Mash, E. A., & Aposhian, H. V. (2001). Monomethylarsonous acid ($MMA^{III}$) and arsenite: $LD_{50}$ in hamsters and in vitro inhibition of pyruvate dehydrogenase. *Chemical Research in Toxicology*, *14*, 651–656. DOI: 10.1021/tx000264z.

Piao, F., Ma, N., Hiraku, Y., Murata, M., Oikawa, S., Cheng, F., Zhong, L., Yamauchi, T., Kawanishi, S., & Yokoyama, K. (2005). Oxidative DNA damage in relation to neurotoxicity in the brain of mice exposed to arsenic at environmentally relevant levels. *Journal of Occupational Health*, *47*, 445–449. DOI: 10.1539/joh.47.445.

Suzuki, K. T., Mandal, B. K., & Ogra, Y. (2002). Speciation of arsenic in body fluids. *Talanta*, *58*, 111–119. DOI: 10.1016/s0039-9140(02)00260-6.

Suzuki, S., Arnold, L. L., Pennington, K. L., Chen, B., Naranmandura, H., Le, X. C., & Cohen, S. M. (2010). Dietary administration of sodium arsenite to rats: Relations between dose and urinary concentrations of methylated and thiometabolites and effects on the rat urinary bladder epithelium. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *244*, 99–105. DOI: 10.1016/j.taap.2009.12.026.

Thomas, D. H., Li, J., Waters, S. B., Xing, W., Adair, B. M., Drobna, Z., Devesa, V., & Styblo, M. (2007). Arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase and the methylation of arsenicals. *Experimental Biology and Medicine*, *232*, 3–13.

Tovar-Sanchez, A., Huerta-Diaz, M. A., Negro, J. J., Bravo, M. A., & Sañudo-Wilhelmy, S. A. (2006). Metal contamination in interstitial waters of Doñana Park. *Journal of Environmental Management*, *78*, 286–293. DOI: 10.1016/j.jenvman.2005.04.028.

Vahter, M. (1981). Biotransformation of trivalent and pentavalent inorganic arsenic in mice and rats. *Environmental Research*, *25*, 286–293. DOI: 10.1016/0013-9351(81)90030-x.

Vahter, M. (1999). Methylation of inorganic arsenic in different mammalian species and population groups. *Science Progress*, *82*, 69–88.

Vahter, M., & Norin, H. (1980). Metabolism of $^{74}$As-labeled trivalent and pentavalent inorganic arsenic in mice. *Environmental Research*, *21*, 446–457. DOI: 10.1016/0013-9351(80)90049-3.

Vioque-Fernández, A., Alves de Almeida, E., & López-Barea, J. (2009). Assessment of Doñana National Park contamination in *Procambarus clarkii*: Integration of conventional biomarkers and proteomic approaches. *Science of the Total Environment*, *407*, 1784–1797. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2008.11.051.

View Article Online / Journal Homepage / Table of Contents for this issue
Dynamic Article Links

JAAS

Cite this: *J. Anal. At. Spectrom.*, 2011, **26**, 141

www.rsc.org/jaas

PAPER

# Size characterization of metal species in liver and brain from free-living (*Mus spretus*) and laboratory (*Mus Musculus*) mice by SEC-ICP-MS: Application to environmental contamination assessment†

**M. Gonzalez-Fernández,[a] M. A. García-Sevillano,[a] R. Jara-Biedma,[a] T. García-Barrera,*[a] A. Vioque,[b] J. López-Barea,[b] C. Pueyo[b] and J. L. Gómez-Ariza*[a]**

***Received 20th August 2010, Accepted 28th October 2010***
**DOI: 10.1039/c0ja00127a**

Published on 25 November 2010. Downloaded on 04/09/2014 13:08:44.

The molecular mass distribution of various metals was evaluated in cell lysates obtained from liver and brain of mice using size-exclusion chromatography (Superdex-75) with ICP-MS detection. Free-living mice *Mus spretus* were collected in polluted and non-polluted sites from Doñana National Park (southwest Spain) and SEC(HPLC)-ICP-MS was used to generate element specific chromatograms for essential metals (Cu and Zn) as well as toxic metals and metalloids (Cd, As, Pb). Different molecular mass fractions containing Cu are remarkably abundant in liver from the specimens captured in the polluted area. The fraction of about 7 kDa is especially important since it matches with a metallothionein I standard. Zn and Cd chromatograms also show peaks with similar molecular mass, but lower intensity. Analogous chromatograms from the non-contaminated site show a considerable depletion of these metal-containing biomolecules possibly due to low contamination. Chromatograms from the liver of laboratory mice *Mus musculus* (genetically close to *Mus spretus*) were also obtained for comparison revealing a great similarity with non contaminated samples. On the other hand, metal profiles from brain extracts do not reflect significant differences between polluted and clean areas in comparison with those obtained from liver of *Mus spretus*. Finally, the daily *in vivo* subcutaneous administration of Cd aqueous solution to *Mus musculus* during 10 days resulted in great rise of a Cd-peak of 7 KDa in the extract from the liver extract that matches with the Cd-methallothionein standard. Other Cd-binding molecules with higher molecular mass are also bioinduced by Cd exposure that probably constitutes a protection mechanism against this toxic element. The application for the first time of this metallomic approach to free-living mouse *Mus spretus* provides promising results for environmental stress assessment.

## Introduction

Metal ions present in living systems at trace levels play important roles in metabolic processes. Essential elements such as Cu, Zn, Fe, Mn and Se are integral constituents of numerous proteins where the metals can have either structural or catalytic roles. Deficiency or excess of these elements in mammalian organisms can result in metabolic dyshomeostasis which in turn can eventually lead to oxidative stress and toxicity that can ultimately cause disease and even death.[1–3] On the other hand, the presence of toxic metals, such as Cd, Pb, and As in mammalian tissues can adversely affect the intracellular biochemistry even at very low concentrations.[4]

Cadmium is known to be toxic to mammals and can lead to irreversible damage to bones,[5,6] lungs and especially to the kidneys.[7] The urinary cadmium excretion is marked by the presence of several proteins in urine,[8] which produces irreversible tubular damage. Occupational exposure to this element by inhalation of fine dust and fumes can provoke lung diseases increasing the risk of lung cancer.[9] Waalkes *et al.*[10] have demonstrated that subcutaneous injection of Wistar rats with cadmium chloride in the dorsal thoracic midline either at a single dose ranging from 0 to 40.0 μmol $kg^{-1}$ or separate doses of 5 μmol $kg^{-1}$ can induce prostate cancer. Cadmium treatment had no effect on rat survival and the highest incidence of cancer was observed with the 40.0 μmol $kg^{-1}$ dose.[10] However, more recent data support that only an uptake of cadmium *via* the respiratory system has carcinogenic potential.[11]

The environmentally abundant metalloid arsenic has no known nutritional requirement for mammalian organisms.[12]

[a]*Department of Chemistry and Material Science, Faculty of Experimental Science, University of Huelva, Campus de El Carmen, 21007 Huelva, Spain. E-mail: ariza@uhu.es; tamara@dqcm.uhu.es*
[b]*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Edificio Severo Ochoa, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, 14071 Córdoba, Spain*

† This article is part of a themed issue highlighting outstanding and emerging work in the area of speciation.

View Article Online

Published on 25 November 2010. Downloaded on 04/09/2014 13:08:44.

Nevertheless, mammals—including humans—metabolize highly toxic inorganic arsenic to methylated metabolites, such as methylarsonic acid and dimethylarsinic acid which are excreted in the urine.[13] The biomethylation of inorganic arsenic in mammals may ultimately turn out to be demonstrated to be an important detoxification mechanism since it has been recently demonstrated that the As–S bond in complexes that are formed *in vivo* between methylated arsenic(III) species and glutathione is stronger than that between arsenite and glutathione. This is important as stable glutathione-complexes are likely to be more efficiently effluxed from the liver to the bloodstream by ATP-driven glutathione-conjugate export pumps.[14] Organoarsenic species such as arsenosugars, arsenobetaine, arsenocholine and arsenolipids[15] are present in aquatic organisms and marine animals.[16,17]

Lead at trace levels can adversely affect the brain, the central nervous system, blood cells, and kidneys.[18] Several large epidemiological studies of lead workers have found inconclusive evidence of an association between lead exposure and the incidence of cancer.[19,20] However, exposure to high lead levels can produce renal tubular damage with glycosuria and aminoaciduria (saturnine gout),[21] although, there is no agreement between the correlation of creatinine levels in serum (related to the renal function) and lead levels in blood. Loghman-Adham,[21] for instance, has found a linear correlation for lead levels above 40 μg/100 ml whereas Gerhardsson *et al.*[22] have shown no correlation below 60 μg/100 ml of lead.

The use of free-living organisms in environmental pollution assessment is a useful approach because biological responses allow a more accurate appraisal of the qualitative state of an ecosystem than the mere presence of a toxic substance (*i.e.* in soil). In fact, both methodologies are valuable and complementary. Many pollutants, including transition metals and other prooxidant chemicals, generate reactive oxygen species that promote oxidative stress, damage biomolecules, alter glutathione status of cells and induce antioxidative enzymes, heat-shock proteins and metallothioneins.[23,24] However, the use of these biomolecules as biomarkers requires a deep knowledge of toxicity mechanisms and proteomics based approaches have a great potential to unravel complex biological problems, since they allow to reveal changes in protein expression, such as in liver cytosolic extracts from *Mus musculus*,[25] without any previous knowledge of the mechanism of toxicity (Environmental Proteomics[26]). In addition, the up/downregulation of proteins and biomolecules has been linked to the exposure of organisms to toxic metals (Environmental Metallomics[26]).

Doñana Natural Park (Fig. 1) is one of the most important European biological reserves, in which millions of migrating birds land each year in their way to or from Africa. This park was declared a UNESCO Biosphere Reserve in 1981. However, Doñana Park is subject to ecological pressures, due to the input from adjacent agriculture, mining and industrial activities.[27,28] Several bioindicators have been proposed for environmental studies in Doñana surroundings, such as the bivalves *Chamelea gallina*,[29] *Crassostrea angulata* and *Mytilus galloprovincialis*,[27] the crayfish *Procambarus clarkii*,[28] and especially the mouse *Mus spretus*.[25] The latter is a well characterized aboriginal species that attains high population densities in marshlands areas feeding on plants, seeds and insects around its burrow. *M. spretus* has proved to be a useful sentinel species in monitoring programs at Doñana National Park, through the use of different biometric, cytogenetic, and biochemical biomarkers,[30–33] as well as in proteomics monitoring.[25]

It has been demonstrated that *Mus spretus* is genetically related to the sequenced mouse *Mus musculus*[33] (classical inbred laboratory species) and that the absolute transcript expression profiling (mRNA levels) of selected genes in *M. spretus* is a suitable novel bioassay to assess its exposure to pollutants. For this purpose, specific primers were designed based on gene sequences from *Mus musculus* that amplified in *Mus spretus* gave single products exhibiting generally 100% sequence identity with *Mus musculus*. This homology has allowed the use of proteomics of free-living non-sequenced *Mus spretus* in monitoring terrestrial ecosystems,[25] using the database from *Mus musculus*. The successful results obtained with the integration of transcriptomic and proteomic approaches in the couple *Mus musculus*/*Mus spretus* for environmental studies allows to propose the integration of *-omics* (transcriptomics, proteomics and more recently metallomics) in environmental studies,[34] since bioindicators generally used in environmental assessment are not genetically sequenced and the use of other genetically homologous sequenced species avoids the cumbersome work of *de novo* sequencing. In connection with this, a metallomics approach based on the analysis of cytosolic extracts from different organs of *Mus musculus*[34] by preparative size exclusion chromatography coupled to ICP-MS was performed to obtain information about metal-linking biomolecules present in this species, for later comparison with those in *Mus spretus* and the integration with proteomic data.

The present work reports comparative metallomics experiments[35–40] which are based on the use of analytical SEC with ICP-MS detection to address the changes of the distribution of key essential (Cu and Zn) and toxic (Cd, As, Pb) elements in liver and brain of *Mus spretus* from contaminated and non-contaminated areas of Doñana Natural Park and the surrounding area. Preliminary data about the molecular size of Cd-containing molecules in the organs of *Mus musculus* after Cd-stress will also be presented. To the best of our knowledge, this work is the first exposure study that compares the size distribution of metal containing molecules in a laboratory sequenced mouse and non-sequenced free-living one, both with a high genetic homology.

## Experimental

### Standard solutions and reagents

All reagents used for sample preparation were of the highest available purity. Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), reduced L-Glutatione (GSH) and benzonase nuclease (Ultrapure grade) were obtained from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). Tris buffer was prepared daily with Trizma base (Sigma Aldrich) and adjusted to pH to 8 with hydrochloric acid (25%). Helium, used as collision gas in a LC-ICP-ORC-MS system, was of high-purity grade (>99.999%).

Standards used for mass calibration of the SEC columns were: ferritin (440 kDa) (purity 95%), bovine serum albumin (6.7 kDa) (purity 96%), superoxide dismutase (32 kDa) (purity > 70%), metallothionein I containing Cd, Cu and Zn (7 kDa)

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2011

View Article Online

Published on 25 November 2010. Downloaded on 04/09/2014 13:08:44.

(purity ≥ 95%) and reduced glutathione (307 Da) (purity 98–100%). All these reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). The mobile phase solution used in SEC was 20 mM of ammonium acetate (pH 7.4) (Suprapure grade) purchased from Merck (Darmstadt, Germany). The void volume was determined using ferritin (440 kDa). The mobile phase was prepared daily with ultrapure water (18 MΩcm) from a Milli-Q system (Millipore, Watford, UK) and the pH adjusted to pH 7.4 with ammonia solution, this later prepared by dilution of 20% (w/v) ammonia solution (Suprapur, Merck) with ultrapure water.

### Instrumentation

A cryogenic homogenizer SPEX SamplePrep (Freezer/Mills 6770) was used to prepare the homogenates. Tissues were previously disrupted using an UltraTurrax T-25 homogenizer. The extraction was followed by ultracentrifugation with an ultracentrifuge Beckman model L9-90 K (rotor 70 Ti). Polycarbonate bottles of 10 ml with cap assembly (Beckman Coulter) were used for this purpose.

Analytes were separated on a 10 × 300 mm (13 μm) Superdex™-75 column (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) with an exclusion limit of 100 kDa (with an effective separation range from 3 to 70 kDa). Elemental detection was performed using an inductively coupled plasma mass spectrometer Agilent 7500ce (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) equipped with an octopole collision cell. Chromatographic separations were performed using a Model 1100 HPLC pump with detector UV (Agilent, Wilmington, DE, USA) as the delivery system. ICP-MS measurement conditions (Table 1) for mode He were optimized by using a $HNO_3$ 2% (v/v) aqueous solution of $^{59}Co$, $^{7}Li$, $^{89}Y$ and $^{205}Tl$ (1 μg $L^{-1}$).

### Sampling area, animals and sample preparation

Free-living mice (*Mus spretus*) were collected between November 10th and December 11th 2009) in two sampling areas from Doñana National Park (DNP), southwest Spain: a non-contaminated site "Lucio del Palacio" (LDP) (green spot) and the contaminated zone "La Rocina" stream-ROC (red spot) (Fig. 1). The sampling point LDP is situated in the center of Doñana Natural Park and is an area not affected by pesticides and fertilizers from surrounding agricultural activities and metals from mining activities in the north-east of the Park which are transported by the Guadiamar and Guadalquivir rivers. However, "La Rocina" stream is affected by diffused pollution from several sources: (i) petrochemical and chemical activities from the industrial belt of Huelva (one of the most important in Spain); (ii) acid waters and metals from north-west miner-metallurgical activities in the north-west of Huelva province[41] (Rio Tinto mines); and (iii) the strawberry crops close to "La Rocina" stream which use high amounts of biocides—as organochlorine pesticides—and nitrogen fertilizers.

**Table 1** Operating conditions for ICP-MS and SEC

| | |
|---|---|
| SEC conditions | |
| Column | Superdex™-75 (10 × 300 × 13μm) |
| Resolution range | 3–70 kDa |
| Mobile phase | Ammonium acetate 20 mmol $L^{-1}$ (pH 7.4) |
| Flow rate | 0.7 ml $min^{-1}$ |
| Injection volume | 20 μl |
| UV-visible wavelength | 254 nm |
| ICP-MS conditions | |
| Forward power | 1500 W |
| Plasma gas flow rate | 15.0 L $min^{-1}$ |
| Auxiliary gas flow rate | 1.0 L $min^{-1}$ |
| Carrier gas flow rate | 0,9 L $min^{-1}$ |
| Sampling depth | 8 mm |
| Sampling and skimmer cones | Pt |
| He flor | 3.9 mL $min^{-1}$ |
| $Q_{oct}$ | −18 V |
| $Q_p$ | −16 V |
| Dwell time | 0.3 per isotope |
| Isotopes monitored | $^{55}Mn$, $^{60}Ni$, $^{63}Cu$,$^{65}Cu$, $^{64}Zn$, $^{66}Zn$, $^{75}As$,$^{208}Pb$, $^{53}Cr$, $^{56}Fe$, $^{57}Fe$,$^{59}Co$, $^{82}Se$, $^{114}Cd$ |

Table 2 shows the sites studied, including their codes, UTM coordinates, type (reference/problem) and number of mice of each sex sampled. *Mus Spretus* mice were caught with Sherman® live-traps baited with a mixture of sardines and oil over bread, which were mounted during the evenings and checked the next morning. Adult animals were taken alive to a laboratory at Doñana Biological Reserve, and site/date of capture, sex, weight and external measurements were recorded. *Mus musculus* (inbred BALB/c strain) mice were obtained from Charles River Laboratory (Spain). Mice of 7 weeks of age were fed ad libitum with feed conventional pellets. This feed contained 11.9% moisture, 16.1% crude protein, 3.1% crude oil, 60% N-free extract (including starch, sugars, crude fiber, *etc.*) and 5.1% total minerals. Element concentrations in the feed were as follows (the limits recommended for each of these elements are indicated in parentheses): 70 mg $kg^{-1}$ Mn (40–100 mg $kg^{-1}$), 17 mg $kg^{-1}$ Cu (10–35 mg $kg^{-1}$), 200 μg $kg^{-1}$ Pb (less than 1500 μg $kg^{-1}$), 21 μg $kg^{-1}$ Hg (less than 100 μg $kg^{-1}$), 70 μg $kg^{-1}$ As (less than 1,000 μg $kg^{-1}$), 51 μg $kg^{-1}$ Cd (less than 250 μg $kg^{-1}$), 160 μg $kg^{-1}$ Se (less than 600 μg $kg^{-1}$).

*Mus musculus* mice were divided in two groups, one of which was used as control and the other group subjected to Cd exposure by subcutaneous injection (100 μL) of an increasing doses of 0.1 to 1 mg Cd (in the form of $CdCl_2$) per kg of body weight per day during a total period of 10 days. Three subgroups of 10 mice (A, B and C) were separated and sacrificed at days 2, 6 and 10 of the experiment, respectively. The control mice were subcutaneously injected with 100 μL of ultrapure water per day for 10 days.

*Mus musculus* and *Mus spretus* mice were individually killed by cervical dislocation and dissected. Individual organs were excised, weighed in Eppendorf vials, cleaned with 0.9% NaCl solution, frozen in liquid $N_2$ and stored at −80 °C until they were used for extract preparation. Mice were handled according to the norms stipulated by the European Community. The investigation was performed after approval by the Ethical Committee of the University of Córdoba (Spain).

**Sample preparation.** Livers and brains from 5 different animals were pooled. The weight of livers used for the pool preparation from *Mus musculus* were: 1.24, 1.39, 1.43, 1.36 and 1.44 g, and the brains: 0.31, 0.27, 0.35, 0.35, 0.29 g. For *Mus spretus* the weight of pooled livers and brains are given in Table 3. Pooled tissues were disrupted with cryogenic homogenization in a 6770 freezer/

View Article Online

Published on 25 November 2010. Downloaded on 04/09/2014 13:08:44.

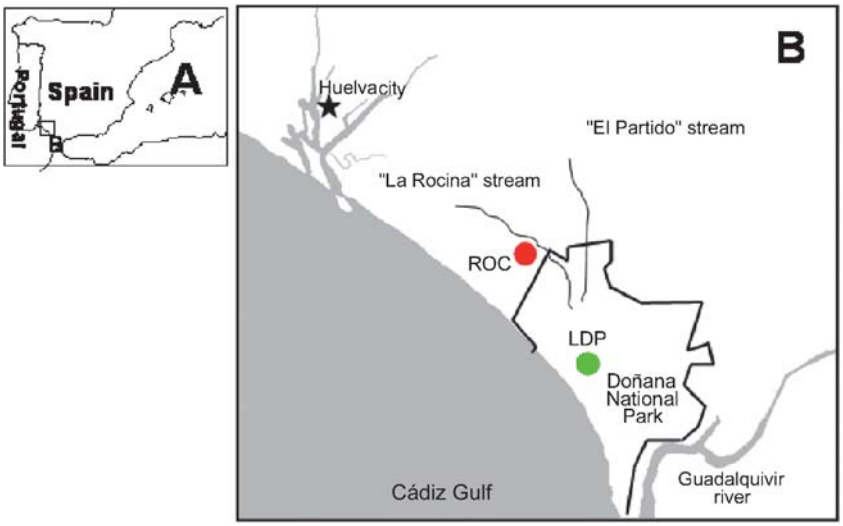



**Fig. 1** Sampling area in Doñana National Park and surrounding (SW Spain). A. area location; B. Localization of sampling point: "Lucio del Palacio" (LDP, green spot) non-contaminated site; "La Rocina" stream (ROC, red spot) contaminated site.

**Table 2** Sampling sites with area code, UTM coordinates, type of sample and gender

| | UTM coordinates | | Type | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Area (code) | *X* | *Y* | Mice | Males | Females |
| Lucio del Palacio (LDP) | 193800 | 4099515 | Negative Control | 18 | 15 |
| Rocina (ROC) | 178653 | 4119937 | Problem | 7 | 4 |

mill apparatus (1min at rate 15) from Spex SamplePrep (Metuchen, NJ, USA). After that a solution (3 ml $g^{-1}$) was added containing the following: 25 mM Tris-base buffer solution at pH 7.2, 1 mM GSH and 1 mM PMSF (phenylmethanesulfonylfluoride). Later, benzonase was added (50 U $ml^{-1}$) to inhibit the action of nucleases in the extracts which were incubated for 30 min at room temperature and, finally, centrifuged at 45 000 rpm for 1 h at 4 °C. Extracts were stored at −80 °C until analysis. The total protein content (Bradford method) in the extracts of livers and brains from *Mus musculus* was 17.300 ± 0.018 mg $ml^{-1}$ and 1.690 ± 0.003 mg $ml^{-1}$, respectively. In liver extract of *Mus spretus* from LDP and ROC protein content was 12.500 ± 0.013 mg $ml^{-1}$ and 15.400 ± 0.034 mg $ml^{-1}$, respectively, and in brain extract 4.040 ± 0.001 mg $ml^{-1}$ (LDP) and 5.210 ± 0.004 mg $ml^{-1}$ (ROC).

**Table 3** Weight of the organs from *Mus spretus* pooled

| Sampling area | Livers/g | Brains/g |
|---|---|---|
| Lucio del Palacio (LDP) | 0.43 | 0.43 |
| | 0.39 | 0.30 |
| | 0.74 | 0.41 |
| | 0.54 | 0.30 |
| | 0.48 | 0.32 |
| Rocina (ROC) | 0.56 | 0.30 |
| | 0.77 | 0.36 |
| | 0.62 | 0.37 |
| | 0.75 | 0.35 |
| | 0.81 | 0.32 |

### Analysis of extracts with SEC coupled to ICP-MS

First of all, the extracts were filtered through Iso-Disc poly-(vinylidene difluoride) filters (25-mm diameter, 0.2-μm pore size) to avoid column overloading or clogging. The SEC-ICP-MS on-line coupling was performed by connecting the outlet of the chromatographic column to the Micromist nebulizer inlet (Glas Expansion, Switzerland) of the ICP-MS by means of a 50-cm PEEK tubing (0.17 i.d. mm). The instrumental operating conditions are given in Table 1.

The quality control of the SEC-ICP-MS system to overcome problems related to contamination, loss and stability of species

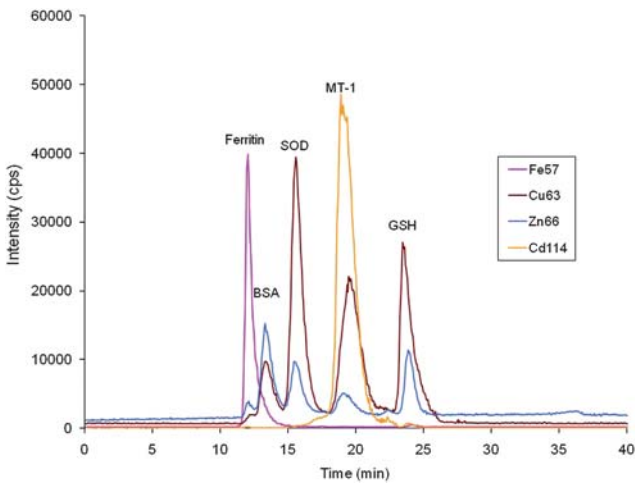



**Fig. 2** SEC-ICP-MS chromatograms of standards used for column calibration. Ferritin (440 KDa), bovine serum albumin (BSA, 67 KDa), superoxide dismutase (SOD, 32 KDa), metallothionein I (MT-1, 7 KDa), reduced glutathione (GSH, 307 Da). Chromatographic conditions: column, Superdex™-75 (10 × 300 × 13μm); mobile phase, ammonium acetate 20 mmol $L^{-1}$ (pH 7.4); flow rate, 0.7 ml $min^{-1}$; injection volume, 20 μl.

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2011

View Article Online

Published on 25 November 2010. Downloaded on 04/09/2014 13:08:44.

has been described elsewhere.[42] The SEC-ICP-MS chromatograms of the standards used for column calibration have been included in Fig. 2.

## Results and discussion

A metallomic approach based on the use of size exclusion chromatography (SEC) with ICP-MS detection was applied to liver and brain from both laboratory *Mus musculus* and the free-living *Mus spretus* mice which has been previously demonstrated to be useful as a bioindicator for pollution monitoring at Doñana National Park (southwest Spain).[25,30,31] This is, to the best of our knowledge, the first attempt to gain information about the influence of contamination on the presence of metal-linking biomolecules in tissues (*e.g.* liver and brain) from aboriginal free-living mouse. *Mus musculus* is genetically homologous with *Mus spretus*[33] and has been used as model for comparison. Additionally, an exposure experiment of *Mus musculus* to Cd provides preliminary information about the action of toxic metals on the metabolism of this mouse species and allows potential correlations with respect to the behaviour of *Mus spretus* in relation to toxic elements.

### Size characterization of essential and toxic metal species in liver and brain from *Mus musculus* using mass calibrated SEC column with ICP-MS detection

The analysis of liver and brain samples from laboratory mice *Mus musculus* with SEC-ICP-ORC-MS using a Superdex™-75 column gave typical chromatograms shown in Fig. 3. A Cu containing peak with remarkable intensity was observed (blue line in Fig. 3A) in the brain extract, with molecular mass close to the standard metallothionein I (7 kDa) and a retention time of ~18 min. In the liver (Fig. 3C) a Cu-peak of remarkable intensity elutes with a retention time of ~15 min, which is identical with the superoxide dismutase standard (32 kDa). The Zn-specific chromatogram (red line) is similar to that traced by Cu, although peak intensity (number of counts) are about 18% lower in brain and 37% lower in the liver. The Zn-specific chromatogram is similar to that traced by Cu in brain although the relative intensities of peaks are different. The Zn-specific chromatogram shows a small peak at retention time ~18 min that can be related with an isoform of Zn-metallothionein I (the Zn-MT1 standard was separately injected to the chromatographic system with retention time at 19.6 min).

When these results are compared with previous studies based on the use of a semipreparative column Hiload Superdex 75 Prep (separation range of 3–70 kDa)[41] and a different extraction procedure, the results are quite similar. However, it is remarkable the absence of Cu and Zn molecules of low molecular mass (with retention times in the range of 26.4 to 27 min) in the chromatograms depicted in Fig. 3 A and C. This fact can be explained by the modifications in the tissue extraction procedure in the present study with the purpose to avoid the drawbacks associated with conventional extraction procedures.[25] Since metalloproteins are often of no particular interest in conventional proteomics studies, commercial extraction mixtures usually contain metal-complexing reagents such as EDTA in the protease inhibitors and DTT to prevent the formation of –S–S– bonds from cysteine residues. In the present extraction treatment, EDTA has been eliminated and reduced glutathione (GSH) was used instead of DTT. This fact explains the absence

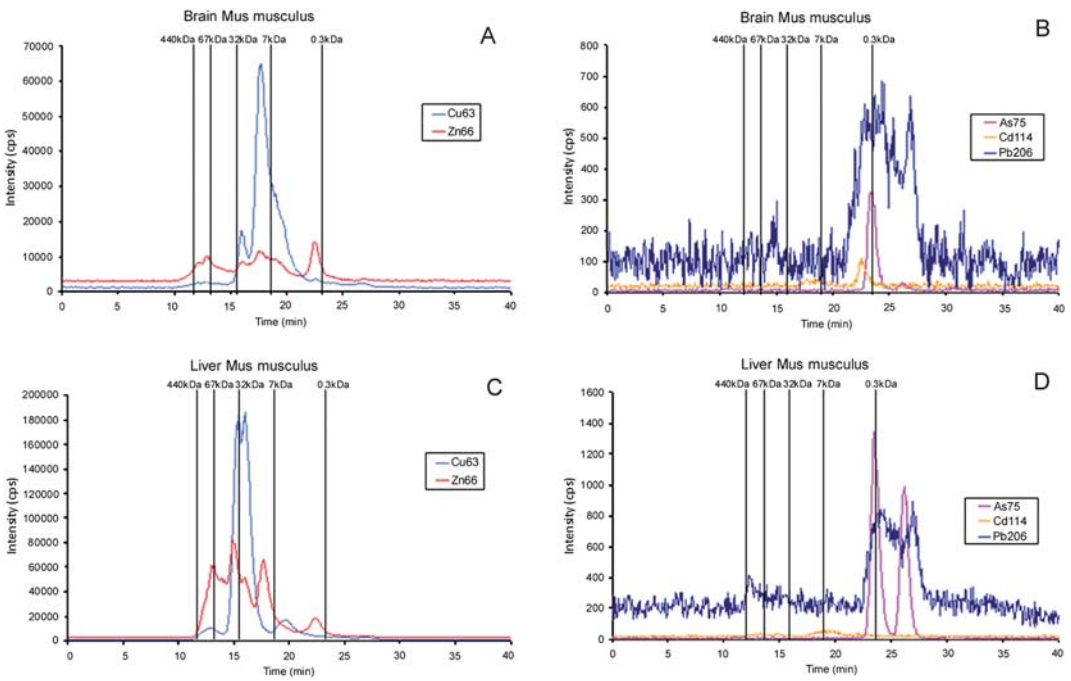



**Fig. 3** Molecular mass distribution of metal–biomolecule complexes in liver and brain *Mus musculus* extracts by SEC-ICP-MS. A and C, essential elements (Cu- and Zn-containing biomolecules) in brain and liver, respectively; B and D, toxic elements (Cd-, As-, and Pb-containing biomolecules) in brain and liver, respectively. Chromatographic conditions: column, Superdex™-75 (10 × 300 × 1 3μm); mobile phase, ammonium acetate 20 mmol $L^{-1}$ (pH 7.4); flow rate, 0.7 ml $min^{-1}$; injection volume, 20 μl.

View Article Online

Published on 25 November 2010. Downloaded on 04/09/2014 13:08:44.

of low molecular mass Cu and Zn peaks in Fig. 3, which could be attributed to partial metal leaching from metallo-proteins by metal-complexing reagents and the subsequent formation of low molecular mass metal-binding molecules.[41]

Peaks from toxic metals such as Cd, Pb and As can also be observed in Fig. 3B and 3D, although the intensities are lower and the retention times denotes the presence of predominantly small (<300 Da) molecular weight As, Cd and Pb-containing entities. It is remarkable that the detection of a single Cd peak must be attributed to the bioaccumulation of this element from the mouse food, despite its rather low Cd concentration (51 μg $kg^{-1}$). Only the As-peaks present a suitable intensity for further identification studies. It is remarkable that two well resolved peaks of this element in the liver extract that can be related with low molecular mass As-metabolites.[43,44] Presence of As in the liver extract can also be attributed to the content of this element in the food (70 μg $kg^{-1}$ As), further studies should perform the arsenic species analysis in the mouse food to know the source of arsenic species for the mouse.

### Size characterization of essential and toxic species in liver and brain from *Mus spretus* collected in different sites of Doñana National Park using mass calibrated SEC column with ICP-MS detection

A non-contaminated site in the "heart" of the Park, "Lucio del Palacio" (LDP) was used as negative reference (LDP) to compare with that of a neighbouring site ("La Rocina" ROC), which is contaminated by agricultural and industrial effluents. The mouse *M. spretus*, traditionally used as environmental bioindicator in the southwest Spain, collected in both sites was subjected to the metallomics approach proposed in this study.

The Fig. 4–5 and 6 show the results for liver and brain, respectively, for LDP and ROC. Chromatograms from *Mus musculus* have also been included for comparison. The increased intensity of a Cu-peak in the liver (at 19.6 min) from mice collected from the ROC site as compared to the LDP site is evident, this fact can be related to the significant presence of copper in ROC, area affected by the diffuse contamination of metals, mainly copper, coming from pyrite mines waste lixiviation from the north-east of Huelva province. In *Mus musculus* an analogous peak is observed with low intensity, very similar to that of LDP, which can be related to the peak obtained with the Cu-MT1 standard injected under similar chromatographic conditions. However, the peak of about 32 KDa, related to the superoxide dismutase standard, shows a higher intensity in *Mus musculus* (Fig. 4A). The Zn-specific chromatogram shows a peak at 19.6 min in liver that also shows a manifest intensity in the specimens from ROC in relation to the control (LDP), Fig. 4B.

The As, Cd and Pb-specific chromatograms of the liver extracts demonstrated that the sensitivity of the signals decreases considerably (Fig. 4C and 4D and Fig. 5). A Cd-peak with retention time at 19.6 min (molecular mass about 7 kDa), similar to that traced by Cu and Zn can be observed (Fig. 4D) in samples from ROC, but the intensity of this peak in LDP is lower. In addition, two peaks traced by As are observed in ROC, at the same retention time than those observed for *Mus musculus*, although the intensity in this case is clearly lower in ROC samples (Fig. 4C). This fact confirms that presence of As in *Mus musculus* can be related to the small content of this element in the food. Finally, when Pb-linking molecules are considered in liver

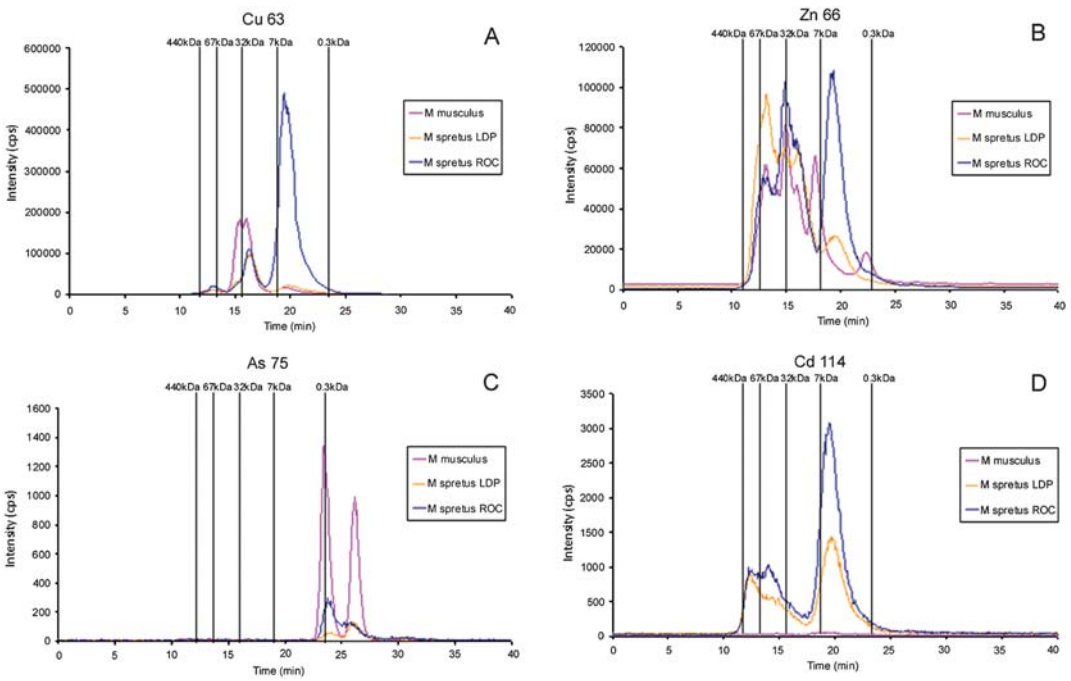



**Fig. 4** Molecular mass distribution of metal-biomolecules complexes in liver *Mus spretus* extracts from LDP and ROC by SEC-ICP-MS. A, Cu-containing biomolecules; B, Zn-containing biomolecules; C, As-containing biomolecules; D, Cd-binding biomolecules. In all the cases chromatograms traced for the diverse elements in liver *Mus musculus* extract are included for comparison. Chromatographic conditions: column, Superdex™-75 (10 × 300 × 13μm); mobile phase, ammonium acetate 20 mmol $L^{-1}$ (pH 7.4); flow rate, 0.7 ml $min^{-1}$; injection volume, 20 μl.

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2011

View Article Online

Published on 25 November 2010. Downloaded on 04/09/2014 13:08:44.

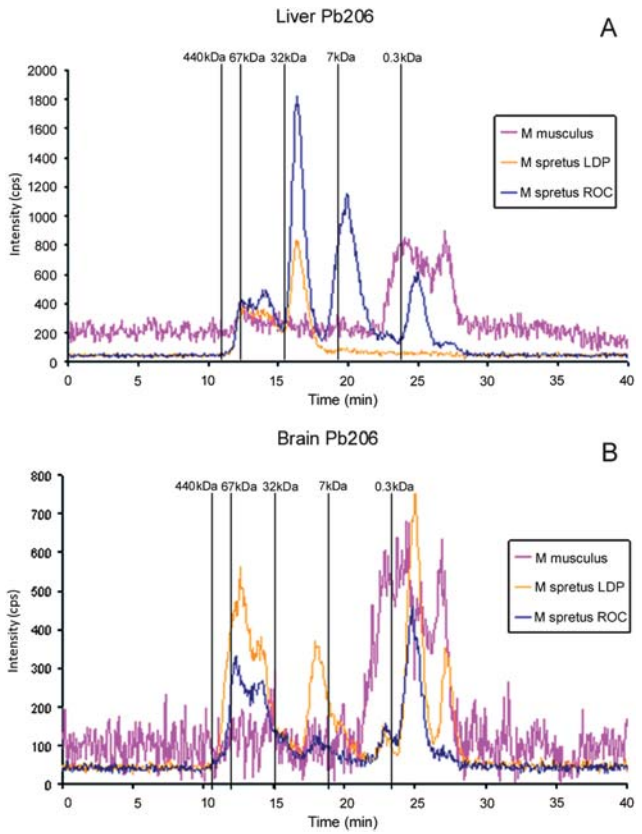



**Fig. 5** Molecular mass distribution of Pb–biomolecule complexes in liver (A) and brain (B) *Mus spretus* extracts from LDP and ROC by SEC-ICP-MS. Chromatograms from *Mus musculus* are included for comparison. Chromatographic conditions: column, Superdex™-75 (10 × 300 × 13μm); mobile phase, ammonium acetate 20 mmol $L^{-1}$ (pH 7.4); flow rate, 0.7 ml $min^{-1}$; injection volume, 20 μl.

(Fig. 5A) peaks close to 7 and 32 kDa are observed in the ROC sample, analogously to those traced by Cu, Zn and Cd, although with lower intensity. Samples from the non-contaminated LDP do not show the Pb-peak at about 7 kDa. All these peaks are absent in the liver extract from *Mus musculus*. In brain the intensity of the peaks decreases drastically possibly due to the blood brain barrier, and the noisy chromatograms obtained make the results few comparable.

In brain the intensity of the peaks traced by the different elements are lower than in liver which can be attributed again to the blood brain barrier, Fig. 6. It can be highlighted that signals (Cu, Zn, As, Cd) from *Mus spretus* captured in LDP (non-polluted site) are higher than in ROC, which behaviour is opposite to liver. In these extracts the peaks traced by Cu and Zn at about 32 kDa in liver chromatograms are not detected, and Cu-, Zn- and Cd-peak match very well with that of metallothionein I standard. Metal profiles for *Mus musculus* brain extract are similar in location and intensity to those of *Mus spretus* from LDP with the exception of the Cd peak which is absent in *M. musculus*.

Therefore, these results show important differences in the presence of metallo metabolites in the liver and brain of *Mus spretus* when the bioindicator is subjected to situations with different degrees of environmental stress (ROC contaminated and LDP non-contaminated, respectively). The extracts of liver from ROC show a significant presence of molecules linked to Cu, Zn and in a lower proportion to Cd, with molecular mass similar to metallothioneins. But similar signals of these elements in brain are lower and the response from the reference area in which pollution is absent is somewhat larger than ROC values. These facts indicate a lower response of brain to environmental stress than liver that is more active in the metabolism and more sensible to the presence of contaminants, the activity of the blood brain barrier can also motivate these differences. On the other hand, a slight shift in the retention time of Cu-, Zn- and Cd-peaks from brain to liver extracts in relation to the reference provides by metallotionein-I standard (about 7 kDa, retention time 19.1 min) can be observed. So that, the Cu-, Zn- and Cd-peaks obtained from liver extract (Fig. 4A, 4B and 4D) show a small shift to retention times higher than 19.1 min, corresponding to a molecular mass slightly lower than 7 KDa. However, analogous peaks of these elements in brain extract match perfectly with the standard of molecular mass 7 KDa. This fact suggests small molecular mass differences between Cu-, Zn- and Cd-peaks that can be attributable to the already established evidence that mammalian organisms contain predominantly in brain metallothionein MT-3 with molecular mass about 7 KDa[45] whereas in liver MT-2 and MT-1 with lower molecular mass, about 6.1 KDa[45] and 6.0 KDa,[45] respectively, are the predominant forms. Further, studies are necessary to identify the different forms of metallothioneins present in liver and brain extracts.

### Experimental exposure of *Mus musculus* to Cd

To have complementary information about the metabolic effects of contaminants in mice a preliminary exposition exposure of *Mus musculus* to Cd (as $CdCl_2$ aqueous solution) was performed. Cadmium solution was daily subcutaneously injected to a population of 30 mice. Three groups (A, B and C) of 10 mice each were sacrificed at 2, 6 and 10 days using as control group mice that were given ultrapure water. The Cd-specific chromatograms that were obtained for the analysis of the liver extracts are shown in Fig. 7. The control group, Fig. 7A, only shows very low intensity peaks at about 11 min and 15 min as well as a third one at about 23 min, which can be related with the retention times of three standards: bovine serum albumin (BSA), superoxide dismutase (SOD) and reduced glutathione (GSH). The Cd-specific chromatogram of liver extracts given the lowest dose show one additional Cd-peak compared to the control group, Fig. 7B. In this latter chromatogram, the peak with a retention time of 15.6 min matched the retention time of the SOD standard. The peak that eluted at 19.1 min had a retention time similar to that of the metallothionein I standard. This last peak increased considerably with the Cd dose that was administrated to mice (Fig. 7C and D). When other elements such as Zn and Cu are used as tracers (results not shown) the chromatograms also confirm the appearance and growing of a peak at 19.1 min, although the intensity is 80% fold lower than that of Cd.

## Conclusions

The application of size characterization of metal species to free-living *Mus spretus* provides a useful demonstration of the

View Article Online

Published on 25 November 2010. Downloaded on 04/09/2014 13:08:44.

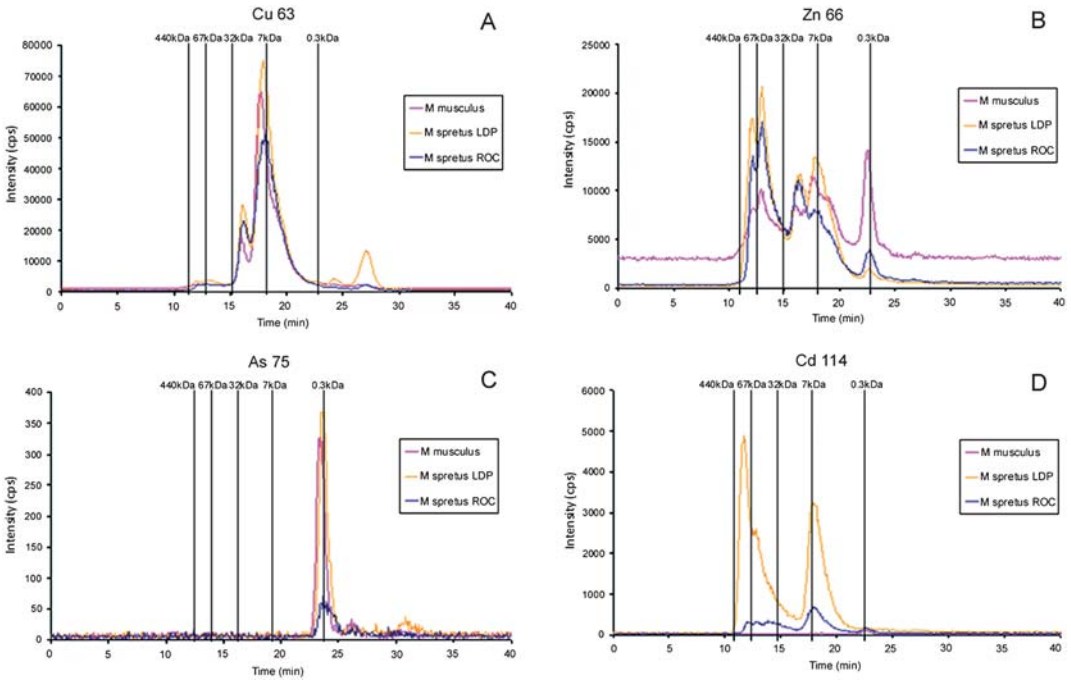



**Fig. 6** Molecular mass distribution of metal–biomolecules complexes in brain *Mus spretus* extracts from LDP and ROC by SEC-ICP-MS. A, Cu-containing biomolecules; B, Zn-containing biomolecules; C, As-containing biomolecules; D, Cd-binding biomolecules. In all the cases chromatograms traced for the diverse elements in liver *Mus musculus* extract are included for comparison. Chromatographic conditions: column, Superdex™-75 (10 × 300 × 13μm); mobile phase, ammonium acetate 20 mmol $L^{-1}$ (pH 7.4); flow rate, 0.7 ml $min^{-1}$; injection volume, 20 μl.

bioinduction of Cu- and Zn-binding proteins in liver of this mouse by the influence of contaminants. The detection of intense Cu and Zn peaks in liver extracts from mice collected from the contaminated site can be attributed to the presence of metallothioneins. In contrast, these peaks were almost absent in liver extracts from animals collected from non-contaminated area (LDP). Toxic metals such as Cd and Pb also show similar responses in liver extract although the intensity of the peaks is

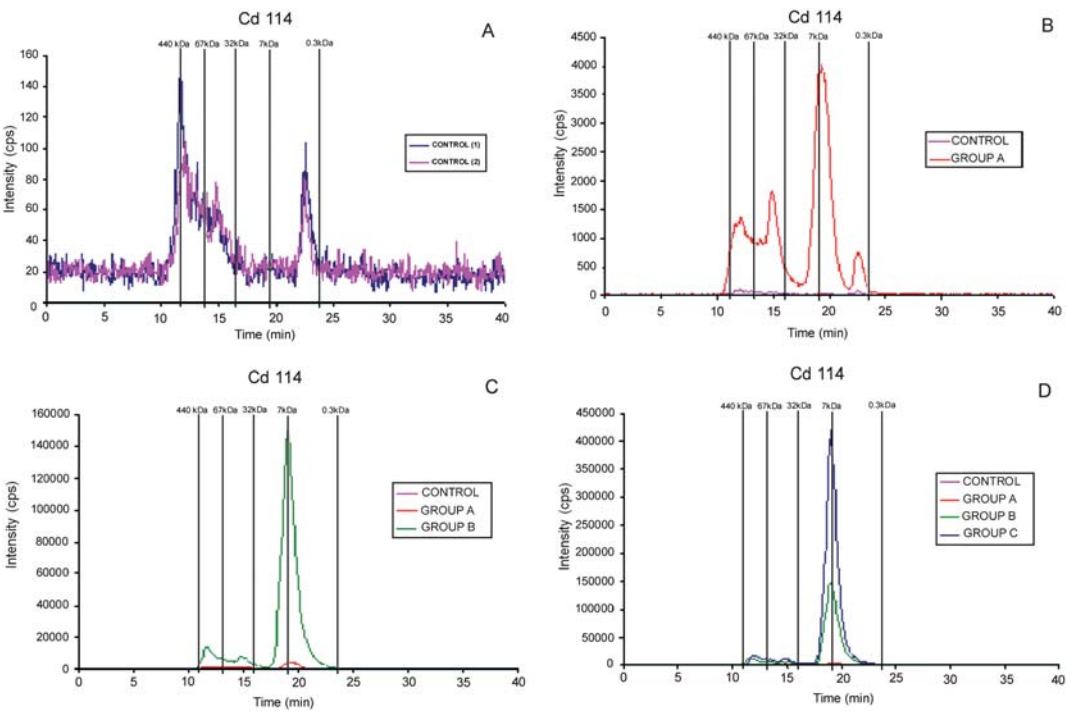



**Fig. 7** SEC-ICP-MS chromatograms ($Cd^{114}$) for liver cytosolic extracts of *Mus Musculus* after daily subcutaneous administration of Cd aqueous solution. Number of days of *in vivo* administration: A, control group; B, 2 days; C, 6 days; D, 10 days. Chromatographic conditions: column, Superdex™-75 (10 × 300 × 13 μm); mobile phase, ammonium acetate 20 mmol $L^{-1}$ (pH 7.4); flow rate, 0.7 ml $min^{-1}$; injection volume, 20 μl.

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2011

View Article Online

Published on 25 November 2010. Downloaded on 04/09/2014 13:08:44.

lower due to the low presence of these elements in the tissue. However, in brain the intensity of peaks traced by copper and zinc is lower and in these samples the signals from ROC are lower than LDP, although the differences are not remarkable. This reduced presence of metal-containing biomolecules in brain extract can be related to the blood brain barrier activity. These facts reveal a differential response of *Mus spretus* to the presence of contaminants in liver and brain that determines clear variations in the presence of metal-containing species. In addition, the small shift in the retention times of Cu-, Zn and Cd-metallothionein molecules from liver with respect to those in brain suggest the predominant presence of MT-1 and MT-3 in the corresponding extracts, respectively.

The stress caused in *Mus musculus* by the exposure to inorganic Cd has also been demonstrated by the proposed method and the impressive increases of Cd-peak in liver extract show the protection mechanism developed by the organism, since the peak can be related with a standard of metallothionein.

Therefore, the application for the first time of this metallomic approach to the bioindicator *Mus spretus* has provided promising results in the assessment of environmental stress caused by the presence of contaminants. The method can be more powerful than the evaluation of conventional chemical biomarkers, because more general information about the metallo-metabolites involved in the organism response is achieved, and the simultaneous alteration of different metal species implicated in the metabolism is obtained. However, further research has to be developed to purify SEC peaks with other complementary chromatographic separation and unequivocal identification of metal species by mass spectrometry.

## Acknowledgements

This work was supported by the project CTM2009-12858-C02-01 y CTM2009-12858-C02-02 from the Ministerio de Ciencia e Innovación, and the projects P08-CVI-03829 P08-RNM-00523, P08-FQM-03554 and P09-FQM-4659 from Consejería de Innovación Ciencia y Empresa (Junta de Andalucía). M.González-Fernández and M. Angel García Sevillano thank the Ministerio de Ciencia e Innovación for a predoctoral scholarship. R. Jara-Biedma thank the Consejería de Innovación Ciencia y Empresa (Junta de Andalucía) for a predoctoral scholarship.

## References

1 N. Nelson, *EMBO J.*, 1999, **18**, 4361–4371.
2 D. P. Giedroc and A. I. Arunkumar, *Dalton Trans.*, 2007, 3107–3120.
3 W. Zheng, M. Aschner and J. F. Ghersi-Egea, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2003, **192**, 1–11.
4 W. Maret, *Metallomics*, 2010, 2.
5 K. Nogawa, E. Kobayashi, Y. Okubo and Y. Suwazono, *BioMetals*, 2004, **17**(5), 581–567.
6 G. Kazantzis, *BioMetals*, 2004, **17**(5), 493–498.
7 O. Barbier, G. Jacquillet, M. Tauc, M. Cougnon and P. Poujeol, *Nephron Physiol.*, 2005, **99**, 105–110.
8 A. Bernard, *BioMetals*, 2004, **17**, 519–523.
9 J. G. Hengstler, U. Bolm-Audorff, A. Faldum, K. Janssen, M. Reifenrath, W. Gotte, D. Jung, O. Mayer-Popken, J. Fuchs, S. Gebhard, H. G. Bienfait, K. Schlink, C. Dietrich, D. Faust, B. Epe and F. Oesch, *Carcinogenesis*, 2003, **24**, 63–73.
10 M. P. Waalkes, S. Rehm, C. W. Riggs, R. M. Bare, D. E. Devor, L. A. Poirier, M. L. Wenk, J. R. Henneman and M. S. Balaschak, *Cancer Res.*, 1988, **48**(16), 4656–4663.
11 T. Jin, M. Nordberg, W. Frech, X. Dumont, A. Bernard, T. T. Ye, Q. Kong, Z. Wang, P. Li, N. G. Lundstrom, Y. Li and G. F. Nordberg, *BioMetals*, 2002, **15**(4), 397–410.
12 J. P. Buchet and R. Lauwerys, *Arch. Toxicol.*, 1985, **57**, 125–129.
13 H. V. Aposhian, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1997, **37**, 397–419.
14 A. J. Percy and J. Gailer, *Bioinorg. Chem. Appl.*, 2008, ID 539082.
15 F. C. Knowles and A. A. Benson, *Trends Biochem. Sci.*, 1983, **8**, 178–180.
16 J. S. Edmonds and K. A. Francesconi, *Nature*, 1981, **289**, 602–604.
17 J. S. Edmonds and K. A. Francesconi, *Experientia*, 1987, **43**, 553–557.
18 J. J. Fadrowski, A. Navas-Acien, M. Tellez-Plaza, E. Guallar, V. M. Weaver and S. L. Furth, *Arch. Intern. Med.*, 2010, **170**, 75–82.
19 A. Antilla, P. Keikkila, E. Pukkala, E. Nykyri, T. Kauppinen, S. Hernberg and K. Hemminki, *Scand J Work Environ Health*, 1995, **21**, 460–469.
20 H. Fu and P. Boffetta, *Occup. Environ. Med.*, 1995, **52**, 73–81.
21 M. Loghman-Adham, *Environ. Health Perspect.*, 1997, **105**, 928–938.
22 L. Gerhardsson, D. R. Chettle, V. Englyst, G. F. Nordberg, H. Nyhlin, M. C. Scott, A. C. Todd and O. Vesterberg, *Br J Ind Med*, 1992, **49**, 186–192.
23 H. Sies, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1986, **25**, 1058–1071.
24 J. López-Barea, *Arch. Toxicol.*, 1995, (Suppl17), 57–79.
25 R. Montes-Nieto, C. A. Fuentes-Almagro, D. Bonilla-Valverde, M. J. Prieto-Álamo, J. Jurado, M. Carrascal, J. L. Gómez-Ariza, J. López-Barea and C. Pueyo, *Proteomics*, 2007, **7**, 4376–4387.
26 J. López-Barea and J. L. Gómez-Ariza, *Proteomics*, 2006, **6**(s1), S51–62.
27 V. Funes, J. Alhama, J. I. Navas, J. López-Barea and J. Peinado, *Environ. Pollut.*, 2006, **139**, 214–223.
28 A. Visoque-Fernándeza, E. Eduardo Alves de Almeida and J. López-Barea, *Sci. Total Environ.*, 2009, **407**, 1784–1797.
29 M. Rodríguez-Ortega, B. E. Grøsvik, A. Rodríguez-Ariza, A. Goksøyr and J. López-Barea, *Proteomics*, 2003, **3**, 1535–1543.
30 J. Ruíz-Laguna, C. García-Alfonso, J. Peinado, S. Moreno, L. A. Ieradi, M. Cristaldi and J. López-Barea, *Biomarkers*, 2001, **6**, 146–160.
31 A. C. Nunes, M. L. Mathias and A. M. Crespo, *Environ. Pollut.*, 2001, **113**, 87–93.
32 D. Bonilla-Valverde, J. Ruiz-Laguna, A. Muñoz, J. Ballesteros, F. Lorenzo, J. L. Gómez-Ariza and J. López-Barea, *Toxicology*, 2004, **197**, 122–138.
33 J. Ruiz-Laguna, N. Abril, T. Garcia-Barrera, J. L. Gomez-Ariza, J. Lopez-Barea and C. Pueyo, *Environ. Sci. Technol.*, 2006, **40**, 3646–3652.
34 M. González-Fernández, T. García-Barrera, J. Jurado, M. J. Prieto-Álamo, C. Pueyo, J. López-Barea and J. L. Gómez-Ariza, *Pure Appl. Chem.*, 2008, **80**(12), 2609–2626.
35 H. Haraguchi, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, **19**, 5–14.
36 J. Szpunar, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, **378**, 54–56.
37 J. L. Gomez-Ariza, T. Garcia-Barrera, F. Lorenzo, V. Bernal, M. J. Villegas and V. Oliveira, *Anal. Chim. Acta*, 2004, **524**, 15–22.
38 A. Sanz-Medel, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, **381**, 1–2.
39 D. W. Koppenaal and G. M. Hieftje, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2007, **22**, 855.
40 S. Mounicou, J. Szpunar and R. Lobinski, *Chem. Soc. Rev.*, 2009, **38**, 1119–1138.
41 A. Sainz, J. A. Grande and M. L. de la Torre, *Environ. Int.*, 2002, **30**, 557–566.
42 M. González-Fernández, T. García-Barrera, A. Arias-Borrego, D. Bonilla-Valverde, J. López-Barea, C. Pueyo and J. L. Gómez-Ariza, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, **390**, 17–28.
43 P. A. Gallagher, X. Wei, J. A. Shoemaker, C. A. Brockhoff and J. T. Creed, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1999, **14**, 1829–1834.
44 S. McSheehy, J. Szpunar, R. Lobinski, V. Haldys, J. Tortajada and J. S. Edmonds, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 2370–2378.
45 http://www.uniprot.org/.

JOURNAL OF INTEGRATED OMICS
A METHODOLOGICAL JOURNAL
HTTP://WWW.JIOMICS.COM

ORIGINAL ARTICLE | DOI: 10.5584/jiomics.v3i2.128

# Inorganic mass spectrometry-based metallomics for environmental monitoring of terrestrial ecosystems affected by metal pollution using *Mus spretus* as bioindicator

M.A. García-Sevillano[1,2,3], T. García-Barrera*[1,2,3], J.L. Gómez-Ariza*[1,2,3]

[1]Department of Chemistry and Materials Science, Faculty of Experimental Sciences, University of Huelva, Campus de El Carmen, 21007-Huelva, Spain. [2]Research Center on Health and Environment (CYSMA). University of Huelva. Spain. [3]International Campus of Excellence on Agrofood (ceiA3). University of Huelva. Spain.

**Received:** 01 February 2013 **Accepted:** 30 May 2013 **Available Online**: 18 July 2013

ABSTRACT

A metallomic approach based on the use of size-exclusion chromatography coupled to inductively coupled plasma-mass spectrometry (SEC-ICP-MS) has been used to characterize the biological response in liver, brain, kidneys, lungs and plasma of the free-living mouse *Mus spretus* in polluted areas located in Doñana National Park (southwest Spain) and the surroundings, mainly affected by agriculture, mining and industry activities, which are responsible for the presence of metallic contaminants. It is remarkable the high presence of Cu, Zn, Cd, As, Pb and Ni in the cytosolic extracts of different organs and plasma, especially in contaminated areas. In liver extracts, high intensity peaks traced by Cu, Zn, Pb and Cd at 7 kDa (matching with metallothionein I standard) are triggered by the presence of contaminants. In kidney, similar Cu and Cd-peaks at 7 kDa were observed but the equivalent Zn-peak was depleted by the competitive interactions of Cu-Cd-Zn for the active sites of these molecules. In addition, peaks traced by Cu and Zn at about 32 kDa in liver extract match with superoxide dismutase standard (Cu,Zn-SOD), which increase in accordance to contamination. An analogous behavior was observed for a Zn,Cu-peak at about 67 kDa that can be related with the bovine serum albumin standard (Cu,Zn-BSA) or other carrier protein such as transferrin (Cu-Tf) present in liver and plasma. Finally, low molecular mass arsenic metabolites were detected in mice captured in MAT site affected by mine waste.

**Keywords:** *Mus spretus*; SEC-ICP-MS; metal pollution; Doñana National Park; Bioindicators; metallomics.

## Abbreviations

**AsB**: Arsenobetaine; **AsC**: Arsenocholine; **BSA**: Bovine serum albumin; **DMA$^V$**: Dimethylarsinate; **DNP**: Doñana National Park; **GSH**: Reduced glutathione; **HPLC**: High-performance liquid chromatography; **ICP-MS**: Inductively coupled plasma-mass spectrometry; **ICP-AES**: Inductively coupled plasma- atomic emission spectrometry; **LC**: Liquid chromatography; **MMA$^V$**: Methylarsonate; **MS**: Mass spectrometry; **MT**: Metallothionein; **PEEK**: Polyether ether ketone; **PMSF**: Phenylmethanesulfonyl fluoride; **PTFE**: Polytetrafluoroethylene; **SEC**: Size exclusion chromatography; **SOD**: Superoxide Dismutase; **TCEP**: Tris-(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride; **Tf**: Transferrin.

## 1. Introduction

The use of free-living organisms as bioindicators of terrestrial ecosystems has been proposed in numerous papers [1-4]. The interest in monitoring the exposure and associated response to heavy metals on living organisms has increased in the last years, since they can reflect the effect of pollutants on cellular metabolism, trafficking and global homeostasis [5]. In addition, the metabolism of trace elements can not be considered in isolation since different elements and their species act jointly in the cells, tissues or organs, and consequently, it is important to consider their possible synergistic or antagonist interactions [6]. Studies of small mammals, mainly rodents, have been used as bioindicators in numerous environmental studies because they can provide useful information to assess the risk of metals to humans. To this

***Corresponding author:** J.L. Gómez Ariza (ariza@dqcm.uhu.es); T. García-Barrera (tamara@dqcm.uhu.es). José Luis Gómez Ariza, Tamara García Barrera. Department of Chemistry and Materials Sciences. Faculty of Experimental Sciences. University of Huelva. Campus de El Carmen. E21071 Huelva. Phone: +34 959 219962. Fax: +34 959 219942.

end, the aboriginal species *Mus spretus* has been frequently used as bioindicator in the southwest Spain, especially in Doñana National Park (DNP). This important ecological area has a biodiversity unique in Europe, Doñana contains a great variety of ecosystems and shelters wildlife including thousands of European and African migratory bird, fallow deer, Spanish red deer, wild boar, European badger, Egyptian mongoose, and endangered species such as the Spanish Imperial Eagle and Iberian Lynx. However, the Park is affected by agricultural, mining and industrial activities [7,8] which makes necessary the regular monitoring of environment quality based in the analysis of pollutants and the biological responses to them. The application of proteomics for this purpose using the mouse *Mus spretus* as bioindicator has represented a reliable option [9], especially by the demonstrated genetic homology of this mouse with the classical inbred laboratory mouse *Mus musculus* that has been already sequenced. This fact allows the use of databases from *Mus musculus* for the identification of proteins and metalloproteins of *Mus spretus* [5,9] as well as for transcriptomics studies [10], avoiding the cumbersome work associated to *de novo* sequencing. On the other hand, the use of massive information methods, the *-omics*, is a promising alternative to the assessment of metal pollution by using biomarkers in environmental contamination [11,12]. Metallomics is one of the most recent *-omic* [13] which uses metals or metalloids, that are present in one third of biomolecules in cells, as heteroatomic markers or tags to track these molecules in complex biological matrices [14].

Metalloproteins have many different functions in cells, such as enzymatic activity, transport, storage, and signal transduction. Essential elements such as Cu, Zn, Fe, Mn and Se are integral constituents of numerous proteins where they have structural or catalytic roles, as is the case of transferrin [15], serum albumin [16], chaperones [16] and metallothioneins (MTs) [17], among many others. Deficiency or excess of these elements in mammalian organisms can result in metabolic dyshomeostasis which in turn can eventually lead to oxidative stress and toxicity that can ultimately cause disease and even death [18,19]. Carrier or transport proteins are involved in the movement of ion, small molecule, or macromolecules, such as other proteins, across biological membranes [20]. Storage proteins are biological reserves of metal ion and amino acids, used by organisms, as is the case of ferriti for iron, and finally, MTs are an example of signal transduction proteins [21]. For this reason, metallomics provides a good alternative to deep insight into the fate of elements in exposed organisms to metal pollution, and gives information about metals trafficking, interactions and homeostasis.

Metal ions and element species present in living systems are usually present in biological fluids and tissues at low picograms or nanograms per ml or mg concentrations. For this reason, the use of small mammals as bioindicators to evaluate terrestrial ecosystems requires analytical techniques that combine a high resolution separation technique with a sensitive elemental or molecular specific detector [22]. In this sense, the great potential of inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) for trace metals analysis has been highlighted in recent reviews since it provides great sensitivity, selectivity and precision, and allows the simultaneous detection of multiple heteroatoms in metalloproteins [23,24]. In addition, the use of ICP-MS requires small amount of sample, a very important advantage when working with micro-mammals. On the other hand, the drawback of polyatomic and/or isobaric interferences in the plasma as well as matrix effects can be minimized by the use of high resolution double focusing spectrometers [24] or collision and dynamic reaction cells (ICP-(ORC)-MS) in quadrupole analyzers [25].

In the present work, a metallomic analytical approach that consisted of high performance liquid chromatography (HPLC) based in size exclusion chromatography (SEC) coupled to ICP-MS has been used to characterize metal containing species (< 70 kDa) in liver, kidney, brain, lungs and plasma of *Mus spretus* captured in Doñana National Park (southwest Spain) and surroundings. For this purpose, Terrestrial ecosystems of this Park affected by differential contamination from mine, industrial and agricultural activities have been considered. The different size exclusion chromatographic profiles traced by the metals have been used to assess environmental contamination and the interactive relationships between metabolically active metals is discussed to explain the mice response against polluted sceneries.

## 2. Material and Methods

### 2.1. *Standard solutions and reagents*

For total element determination tissues and plasma, nitric acid (65 mass %), hydrochloric acid (30 mass %), hydrofluoric acid (40 mass %) and hydrogen peroxide (30 mass %) of Suprapur® grade (Merck, Darmstadt, Germany) were used for mineralization of the samples.

All reagents used for sample preparation of cytosolic extracts from the different organs were of the highest available purity. Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) and tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP) (BioUltra grade, >98%) were obtained from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). Helium used as collision gas in a ICP-ORC-MS system, was of high-purity grade (>99.999%).

Standards used for mass calibration of the analytical SEC column of mass range 70-3 kDa were as follows: ferritin (440 kDa) (purity 95%), bovine serum albumin (67 kDa) (purity 96%), superoxide dismutase containing Cu and Zn (32 kDa) (purity > 70%), metallothionein I containing Cd, Cu and Zn (7 kDa) (purity > 95%) and arsenobetaine (179 Da) (purity > 98%). All these reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). On the other hand, the standards used for mass calibration of the analytical SEC column of mass range <10kDa were: bovine serum albumin (67 kDa) (purity 96 %), metallothionein I containing Cd, Cu and Zn

(7 kDa) (purity > 95 %), vitamin $B_{12}$ (1.35 kDa) (purity > 96 %) and reduced glutathione (307 Da) (purity 98–100 %). All these reagents were purchased from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany). Standard stock solutions with a concentration of 10 mg $mL^{-1}$ were prepared by dissolving the respective compound in 20 mM of ammonium acetate at pH 7.4 purchased from Merck (Darmstadt, Germany). The mobile phase solution used in SEC was 20 mM of ammonium acetate (Suprapure grade), which was prepared daily with ultrapure water (18 MΩcm) from a Milli-Q system (Millipore, Watford, UK) and the pH adjusted to pH 7.4 with ammonia solution, this later prepared by dilution of 20% (w/v) ammonia solution (Suprapur, Merck) with ultrapure water.

2.2. *Apparatus*

A cryogenic homogenizer SPEX SamplePrep (Freezer/Mills 6770) was used to prepare the homogenates. Homogenized tissues were subsequently disrupted with a glass/teflon homogenizer. The extraction was followed by ultracentrifugation with an ultracentrifuge Beckman model L9-90 K (rotor 70 Ti). Polycarbonate bottles of 10 ml with cap assembly (Beckman Coulter) were used for this purpose. A microwave oven (CEM Matthews, NC, USA, model MARS) was used for the mineralization of extracts.

Trace metals and metal-linked biomolecules were analyzed with an inductively coupled plasma mass spectrometer Agilent 7500ce (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) equipped with an octopole collision/reaction cell. Chromatographic separations were performed using a Model 1100 HPLC pump with detector UV (Agilent, Wilmington, DE, USA) as the delivery system. ICP-MS measurement conditions (Table 1) for collision (He) mode were optimized using a 2% (v/v) $HNO_3$ aqueous solution of $^{59}Co$, $^{7}Li$, $^{89}Y$ and $^{205}Tl$ (1 mg $L^{-1}$). The flow of collision gas was fixed at 3.7 mL $min^{-1}$ for He in order to avoid or reduce the polyatomic interferences. Before the SEC-ICP-MS with Superdex-Peptide column the extracts were filtered through Iso-Disc poly(vinylidene difluoride) filters (25-mm diameter, 0.2-μm pore size) to avoid column overloading or clogging and ultrafiltered and preconcentrated (10 times) with AMICON 30K (Millipore) by centrifugation at 10.000 g for 30 min to 4ºC.

2.3. *Sampling area and animals*

Free-living mice (*Mus spretus*) were collected during the autumn 2009 in three sampling areas from Doñana National Park (DNP), southwest Spain. Three areas were considered concerning their differential contamination (Fig. 1): (i) the control was the sampling point located at "Lucio del Palacio" (LDP- green spot) that is a non-contaminated area in the core of the Park; (ii) "La Rocina Stream" (ROC- red spot) with strawberry, citrus fruit and grape fields in the surroundings, that is in addition affected by diffused pollution from the petrochemical and chemical activities from the industrial

**Table 1.** Operating conditions for ICP-MS and SEC

| | | |
|---|---|---|
| *SEC conditions* | | |
| Column | Superdex™-75 (10x300 x13μm) | Superdex™-Peptide (10x300x13μm) |
| Resolution range | 3-70 kDa | <10 kDa |
| Mobile phase | Ammonium acetate 20 mmol $L^{-1}$ (pH 7.4) | |
| Flow rate | 0.7 mL $min^{-1}$ | |
| Injection volumen | 20 μL | |
| UV. Visible wavelength | 254 nm | |
| *ICP-MS conditions* | | |
| Foward power | 1500 W | |
| Plasma gas flow rate | 15.0 L $min^{-1}$ | |
| Auxiliary gas flow rate | 1.0 L $min^{-1}$ | |
| Carrier gas flow rate | 0.9 L $min^{-1}$ | |
| Sampling depth | 8 mm | |
| Sampling and skimmer cones | Ni | |
| He flow | 3.7 mL $min^{-1}$ | |
| $Q_{oct}$ | -18 V | |
| $Q_p$ | -16 V | |
| Dwell time | 0.3 per isotope | |
| Isotopes monitored | $^{63}Cu$, $^{65}Cu$, $^{64}Zn$, $^{66}Zn$, $^{75}As$, $^{57}Fe$, $^{103}Rh$, $^{114}Cd$, $^{60}Ni$, $^{207}Pb$, $^{208}Pb$. | |

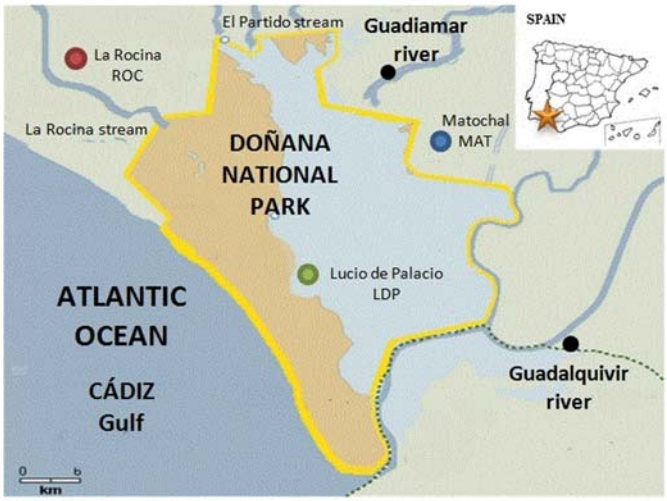



**Figure 1.** Sampling area in Doñana National Park and surroundings (SW Spain). Localization of sampling point: (i) "Lucio del Palacio" (LDP, green spot) non-contaminated site (control); (ii) "La Rocina" stream (ROC, red spot) and (iii) "Matochal" (MAT, blue spot) contaminated sites.

belt of Huelva, as well as by acid waters and metals from north-west mining metallurgical activities of Riotinto village (Huelva); and (iii) "el Matochal" (MAT- blue spot) site next to Guadiamar river that is affected by rice growing fields and suffered the input of metals transported by the Guadiamar river during the rupture of Aznalcollar mine tailing pond in 1998 [26]. A total of 68 *Mus Spretus* mice were caught with Sherman live-traps baited with a hazelnut cream over bread, which were mounted during the evenings and checked the next morning. Adult animals were taken alive to a laboratory at Doñana Biological Reserve, and site/date of capture, sex, weight and external measurements were recorded. In this study, 10 mice of each sampling area were caught. For each mouse, measurements of body size were recorded as body length to the nearest 0.5 mm (calculated by subtracting tail length from total length) and body weight measured to the nearest 0.1 g. On the basis of body weight and colour pattern all mice were considered as adults and they were used in this study. Then, mice were transported to the University of Huelva in other cleaned live-traps and they were sacrificed two hours later for plasma and organs extraction in a laboratory equipped for the manipulation of animals.

Mice were individually anesthetized by isoflurane inhalation and exsanguinated by cardiac puncture, dissected using a ceramic scalpel and finally, the organs were transferred rapidly to dry ice. Individual organs were excised, weighed in Eppendorf vials, cleaned with 0.9% NaCl solution, frozen in liquid nitrogen and stored at -80 ºC, until they were used for sample preparation. Plasma collection was carried out by centrifugation (4000rpm, 30 min, 4ºC) after addition of heparin (ANTICLOT) as an anticoagulant. Mice were handled according to the norms stipulated by the European Community. The investigation was performed after approval by the Ethical Committee of the University of Huelva (Spain).

### 2.4. *Analytical procedures*

#### *2.4.1. Sample preparation*

Livers, brain and plasma from 10 different male mice were treated following a procedure described elsewhere [5]. Briefly, individual organs were disrupted by cryogenic homogenization in a 6770 freezer/mill apparatus (2 min at rate 15) from Spex SamplePrep (Metuchen, NJ, USA). For SEC analysis, three pools of three individual homogenized organs were exactly weighed (0.500 g). After that the metal-biomolecules were extracted with a solution (3 ml of extractant solution per gram of cryhomogenized organs) containing 20 mM of ammonium acetate buffer solution at pH 7.4, 1 mM of tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) and 1 mM of phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF) using a glass/teflon homogenizer in a cold chamber at a constant temperature of 4ºC. Then the extracts were centrifuged at 120,000 g for 1 h at 4 ºC. Extracts were stored under nitrogen atmosphere to avoid oxidation by air and at -80 ºC until analysis.

#### *2.4.2. Determination of total metals concentration in the tissues and plasma of Mus spretus mice*

For this purpose, five pools of two individual homogenized organs each were exactly weighed (0.100 g) in 5-ml microwave vessels and 500 µL of a mixture containing nitric acid and hydrogen peroxide (4:1 v/v) was added. After 10 min, the PTFE vessels were closed and introduced into the microwave oven. The mineralization was carried out at 400 W from room temperature, ramped to 160ºC for 15 min and hold for 40 min at this temperature. Then the solutions were made up to 2 ml and metals analyzed by ICP-MS. Rhodium was added as internal standard (1µg $mL^{-1}$). In the case of plasma, 100 µL of each mouse was weighed in 5-ml microwave vessels and the mineralization was carried out following the same conditions previously described for tissues digestion. For multielemental determination two replicates from each pool of two organs were carried out. For plasma, two replicates from each mouse specimen were carried out.

#### *2.4.3. Analysis of cytosolic extracts and plasma of Mus spretus mice using SEC-ICP-MS*

The SEC-ICP-MS online coupling was performed by connecting the outlet of the chromatographic column to the Micromist nebulizer inlet (GlasExpansion, Switzerland) of the ICP-MS by means of a 30cm PEEK tubing (0.17 i.d. mm). The quality control of the SEC-ICP-MS system was performed as described elsewhere [12] to overcome problems related to contamination, loss and stability of species. The retention times of the mass calibration standards used for the Superdex-75 column are the following: ferritin 12.0 min, bovine serum albumin (BSA) 13.5 min, superoxide dismutase containing Cu and Zn (Cu,Zn-SOD) 15.6 min, metallothionein I containing Cd, Cu and Zn (Cd,Cu,Zn-

MT1) 19.1 min, and reduced glutathione (GSH) 23.6 min. On the other hand, for the Superdex-Peptide column standards and retention times were: bovine serum albumin (BSA) 11.2 min, metallothionein I containing Cd, Cu and Zn (Cd,Cu,Zn-MT1) 14.6 min, vitamin $B_{12}$ 19.3 min and reduced glutathione (GSH) 24.4 min.

## 3. Results and Discussion

The three sites considered in this study (Fig. 1) were selected by the differential presence of toxic metals. In the stream "La Rocina" (ROC) the presence of remarkable concentrations of nitrate, probably from agricultural sources, has been previously reported [27], and in this area metal levels in pore waters are also high, which suggests a transport of contaminants from the Iberian Pyrite Belt [28]. In addition, in 1998, a part of a 360 ha tailings dam of Aznalcóllar pyrite mine, located 60 km North of DNP, were released to Guadiamar stream, a tributary of Guadalquivir River, that were estimated at four cubic hectometers of acidic water and two cubic hectometers of mud. The high toxic metals content of this mud –35% Fe, 0.8% Zn, 0.8% Pb, 0.5% As, 0.2% Cu, 0.05% Sb, 0.006% Co, 0.005% Tl, 0.005% Bi, 0.0025% Cd, 0.0025% Ag, 0.0015% Hg, 0.001% Se—threatened DNP and the Guadalquivir Estuary [26]. This fact explains the high concentrations of non-essential elements (such as Cd and Hg) in tissues of shrews that can be associated to the pollution from mine activities [29], and high levels of Cu, Zn, Mn, Cd and As in soils and sediments [5].

Biological response of free-living mice *Mus spretus* to contamination at the above described site was studied in organs with high metabolic activity such as liver, brain and kidneys. In addition, plasma has been evaluated using the same procedure. The changes in the levels of metal–biomolecules caused by pollutants were traced by SEC-ICP-MS. The most interesting results were observed in relation to Cu, Zn, Fe and toxic elements such as Cd, As, Ni and Pb.

### 3.1. *Total metals concentration in the tissues and plasma of Mus spretus mice*

The presence of metals in the different organs and plasma of Mus spretus from the three sampling sites previously described (Fig 1) was evaluated. Recovery experiments were performed by spiking the extracts with 1, 5, 10, or 50 ìg L−1 of metals depending on the relative concentration of each one in the extracts; the results are also shown in Table 2 that confirm quantitative recoveries in all the cases. ICP-MS detection limits are also given in this table.

It is remarkable the higher presence of iron, copper and zinc in all organs studied and plasma. In contrast, the levels of arsenic, cadmium, lead and nickel were considerably lower. The lowest concentration of toxic metals was found in brain, lungs and plasma. The highest concentrations of metals such as iron, copper, zinc, arsenic, cadmium and lead have been found in mice captured in MAT, a contaminated area affected by metal pollution in soils and sediments [5], as a consequence of the breakdown of the dams from Aznalcóllar mines and their release from the rice growing fields. ROC presents an intermediate metal contamination between LDP and MAT (table 2). This fact can be explained by metallic contaminants from the Iberian Pyrite Belt and agricultural activities. In addition, the highest concentration of iron in plasma from mice captured in ROC could be related with the high content of this element in the Iberian Pyrite Belt [28], which is a site affected by the acid mine drainage. Numerous transport protein of iron can be found in plasma of mammals, such as transferrin, myoglobin and hemoglobin. On the other hand, the higher copper concentration in lungs from mice captured in LDP and MAT could be related with several agricultural activities developed around, which use pesticides and herbicides containing this element (table 2). The major concentration of arsenic in kidneys from mice sampled in MAT and ROC in comparison with mice captured in LDP could be explained by the proximity of the former to the Guadiamar river, affected by rice growing fields (pesticides and herbicides) that also suffered the input of metals transported by the river during the rupture of Aznalcollar mine tailing pond in 1998 [26],. The concentrations of arsenic in mice kidneys from ROC are also high, probably due to air pollution, since this site is nearest to the industry. In contrast, in ROC lower concentrations of this element in soils and sediments were found [5]. In addition, similar concentration of arsenic was found in lungs from mice captured in both areas (table 2). Finally, it is remarkable the higher concentration of cadmium in kidneys from mice sampled in LDP in comparison with ROC, which are in good agreement with a work previously published work [5].

### 3.2. *Size characterization of Cu, Zn, Cd, As, Ni and Pb-biomolecules in liver extracts from Mus spretus captured in contaminated and non-contaminated areas*

The study of accumulation and effects of heavy metals in living organisms is very important in connection with global environmental pollution. The induction of Cd and Zn-metallothioneins in *Mus musculus* mice exposed to industrial particles with high content of metals has been reported, and strong interactions between Cu–Zn–Cd-Pb have been confirmed [30]. Antagonistic interactions have been established between several heavy metals, particularly between Cd and Zn. In this sense, Cd replaces Zn from several proteins [31] and high amounts of Cd in the diet leads to deficiency of zinc in living organism [32]. In our study, we can observe potential interactions between these metals in liver of free-living mice from Doñana National Park and surroundings, especially in mice captured in MAT, specially Cu and Cd in the fraction of 7 kDa associated with MTs (Fig. 2).

It is remarkable the high intensities of the peaks traced by Cu, Zn and Cd at 7 kDa in the liver cytosolic extract, that match with the retention time of metallothionein I standard (Fig. 2). The intensity of a MT-Cu-peak from the contami-

**Table 2.** Concentration of elements (μg g-1) in the different organs and plasma of the mice

| | | Fe ($\mu g.g^{-1}$) | Cu ($\mu g.g^{-1}$) | Zn ($\mu g.g^{-1}$) | As ($\mu g.g^{-1}$) | Cd ($\mu g.g^{-1}$) | Ni ($\mu g.g^{-1}$) | Pb ($\mu g.g^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **LIVER** | *Mus Spretus* LDP | 8.57 ±0.201 | 0.369 ±0.0371 | 4.80 ±0.103 | 0.00161 ±0.000221 | 0.0921 ±0.000247 | 0.0242 ±0.00281 | <LOD |
| | *Mus Spretus* MAT | 14.9 ±0.181 | 1.328 ±0.0674 | 10.658 ±0.199 | 0.00512 ±0.00138 | 0.00321 ±0.000522 | 0.0751 ±0.00493 | 0.00714 ±0.00152 |
| | *Mus Spretus* ROC | 10.3 ±0.220 | 1.45 ±0.0552 | 10.3 ±0.208 | 0.00421 ±0.00181 | 0.00143 ±0.000321 | 0.0315 ±0.00373 | 0.00601 ±0.00211 |
| **BRAIN** | *Mus Spretus* LDP | 1.94 ±0.0912 | 0.487 ±0.0211 | 2.94 ±0.0663 | 0.00102 ±0.000221 | 0.00112 ±0.000441 | <LOD | <LOD |
| | *Mus Spretus* MAT | 2.96 ±0.111 | 0.578 ±0.0382 | 2.96 ±0.0881 | 0.00622 ±0.00171 | 0.00944 ±0.00152 | <LOD | 0.00162 ±0.000511 |
| | *Mus Spretus* ROC | 2.01 ±0.0792 | 0.492 ±0.0873 | 2.93 ±0.102 | 0.00221 ±0.000822 | 0.00243 ±0.000741 | <LOD | <LOD |
| **KIDNEYS** | *Mus Spretus* LDP | 5.51 ±0.207 | 0.268 ±0.0232 | 3.38 ±0.111 | 0.00192 ±0.000311 | 0.0277 ±0.00342 | 0.00284 ±0.000742 | <LOD |
| | *Mus Spretus* MAT | 10.4 ±0.214 | 0.406 ±0.0214 | 5.15 ±0.104 | 0.00332 ±0.00123 | 0.0324 ±0.0111 | 0.0122 ±0.00212 | <LOD |
| | *Mus Spretus* ROC | 5.37 ±0.0812 | 0.467 ±0.0161 | 3.46 ±0.0972 | 0.00484 ±0.000942 | 0.0151 ±0.00922 | 0.00312 ±0.00121 | <LOD |
| **LUNGS** | *Mus Spretus* LDP | 10.7 ±0.524 | 0.158 ±0.0213 | 0.296 ±0.0252 | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD |
| | *Mus Spretus* MAT | 13.6 ±0.705 | 0.201 ±0.0584 | 0.554 ±0.00612 | 0.0221 ±0.00182 | 0.00232 ±0.000914 | <LOD | <LOD |
| | *Mus Spretus* ROC | 9.048 ±0.458 | 0.147 ±0.0351 | 0.321 ±0.00344 | 0.0121 ±0.00122 | 0.00124 ±0.000522 | <LOD | <LOD |
| **PLASMA** | *Mus Spretus* LDP | 4.69 ±0.251 | 0.223 ±0.0380 | 1.641 ±0.0512 | <LOD | <LOD | <LOD | <LOD |
| | *Mus Spretus* MAT | 5.25 ±0.321 | 1.14 ±0.0842 | 2.18 ±0.0634 | 0.00241 ±0.000724 | 0.00154 ±0.000422 | <LOD | 0.00122 ±0.000341 |
| | *Mus Spretus* ROC | 10.5 ±0.503 | 0.553 ±0.0341 | 1.89 ±0.0607 | 0.0013 ±0.000411 | <LOD | <LOD | <LOD |
| **LOD ($\mu g.L^{-1}$)** | | **0.0471** | **0.0384** | **0.494** | **0.0272** | **0.00911** | **0.0244** | **0.0322** |
| **Recovery (%)** | | **117** | **105** | **121** | **99** | **102** | **113** | **97** |

LOD: Limit of Detection

nated area MAT is clearly higher than that from other sites, such as ROC and LDP. In addition, the presence of significant peaks of MT-Cd (Fig. 2) and MT-Pb (Fig. 3) in the same sampling site are also remarkable. In contrast, the intensity of this peak traced by Zn for mice captured in MAT presents lower intensity. Metallothioneins (MTs) are synthesized by mammals in response to heavy metal stress [33,34]. Detoxification of heavy metals and scavenging of free radicals are also reported as important actions of MT which are present in mammalian tissues in two major isoforms, MT-1 and MT -2. [35-37]. Due to the relative concentrations of Cd/Cu and Zn in MAT discussed before, is possible to suppose that cadmium and copper can replace the zinc binding to MTs, because these elements have greater affinity for sulfhydryl groups of cysteine present in these proteins [30]. For this reason, up-regulation of MTs triggered in liver by the presence of toxic elements such as Cd and high levels of Cu can be considered as biomarkers of free-living organisms exposure to environmental pollution, in particular to toxic metals.

Another peak traced by Cu, which matches with the retention time of superoxide dismutase (SOD) at about 32 kDa, shows higher intensity for samples from MAT and LDP (Fig. 2). This fraction has been purified and identified by mass

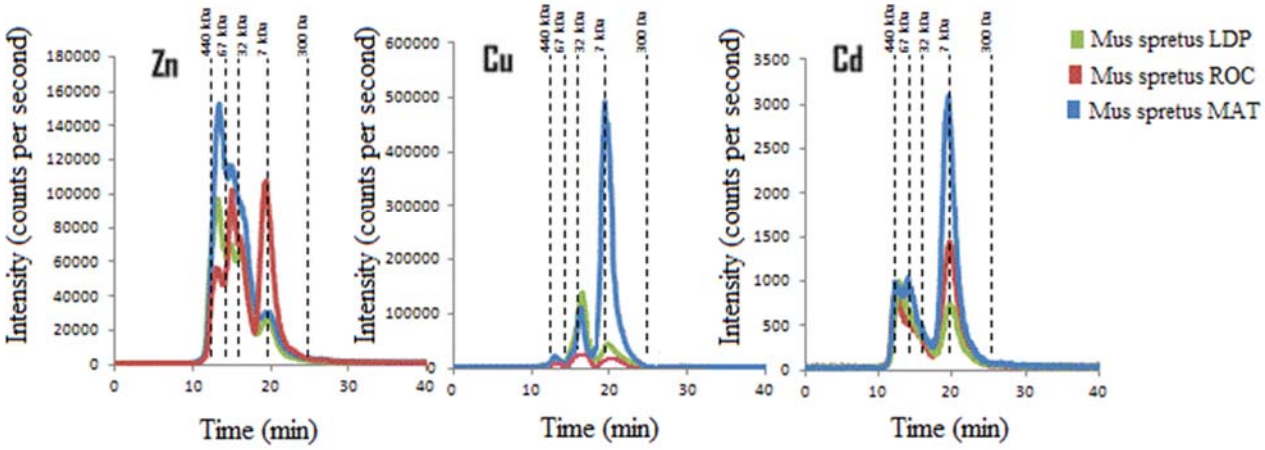



**Figure 2.** Zn, Cu and Cd-biomolecules complexes in liver of *Mus spretus* from different environmental areas assessed by molecular mass distribution with SEC-ICP-MS. Chromatographic conditions: column, Superdex™-75 (10x300x1.3 µm); mobile phase, ammonium acetate 20 mmol $L^{-1}$ (pH 7.4); flow rate 0.7 ml $min^{-1}$; injection volume, 20 µL

spectrometry in a previous work [5] demonstrating that peak intensity of the copper can be attributed unequivocally to the enzyme superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD), a biomarker used in numerous studies to assess environmental stress [1,8]. In Fig. 2 shows two signals traced by Zn that matches with standards of bovine serum albumin (Zn-BSA) and superoxide dismutase (Cu,Zn-SOD) at about 67 kDa and 32 kDa, respectively. The presence of pollutants in sites such as MAT and ROC enhances the intensity of these peaks, but in the non-polluted LDP the intensity decreases. It is remarkable the results obtained in samples from ROC where despite the significant presence of contaminants, the intensity of putative peaks matching with Zn-BSA and Zn-SOD decreases, which can be explained by zinc homeostasis and Cu, Zn and Cd interactions [30,31].

Finally, it is interesting to observe the presence of arsenic and nickel in liver extracts (Fig. 3). SEC-ICP-MS shows the presence of low molecular mass biomolecules of As, that are less abundant in MAT, and also some small Ni containing compounds, highly abundant in the same site. The high concentration of arsenic in soils and sediments analyzed in previous works [5] led us to conclude that arsenic species to can be bonded to thiol groups of proteins [38] in mice captured in MAT. In addition, the concentration of arsenic found in lung in this area could be related with volatile arsenic species inhaled (table 2). Arsenic and its compounds, especially the trioxide, are used in the production of pesticide, treated wood products, herbicide, and insecticide that maybe are

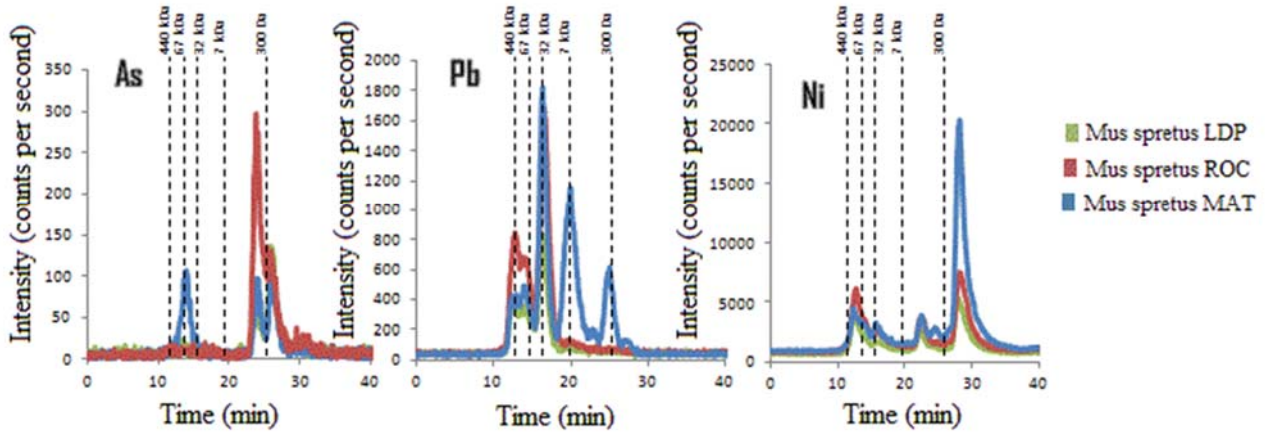



**Figure 3.** As, Pb and Ni-biomolecules complexes in liver of *Mus spretus* from different environmental areas assessed by molecular mass distribution with SEC-ICP-MS. Chromatographic conditions: column, Superdex™-75 (10x300x1.3 µm); mobile phase, ammonium acetate 20 mmol $L^{-1}$ (pH 7.4); flow rate 0.7 ml $min^{-1}$; injection volume, 20 µL.

used in the rice and grape fields of MAT and ROC, respectively. When the biomethylation of inorganic arsenic is saturated in liver, the trivalent inorganic arsenic (the most abundant arsenic species in the terrestrial ecosystems) is chemically more reactive than pentavalent species and binds many carrier proteins, such as albumin and transferrin (Tf) (67kDa) [39]. On the other hand, the presence of low molecular mass nickel metabolites and nickel containing metalloproteins is remarkable in liver cytosolic extracts from mice captured in MAT. This element is rarely found in the terrestrial ecosystems; therefore this fact can be explained by the presence of this metal in the leachates from the breakdown of the ponds of Aznalcollar mines in 1998.

### 3.3. *Size characterization of Cu, Zn, Cd and As -biomolecules in brain extracts from Mus spretus captured in contaminated and non-contaminated areas*

In the case of brain the coupling SEC-ICP-MS was again used to obtain the Cu, Zn, Cd and As-traced peaks in the cytosolic fractions of M. spretus (Fig. 4). These chromatograms show a remarkable intensity of the peaks traced by Cu, Zn, and Cd at 7 kDa as in the case of liver extracts discussed before, which match well with the retention time of metallothionein, although the most abundant MT isoform in brain is MT-3 [35-37]. In MAT the intensities of the 7 kDa peak traced by Cd, Cu and Zn presents higher intensity than ROC and LDP, respectively. In the case of Cu tracing in MAT is not visible in Figure 4, unless it parallels exactly the ROC tracing. On the other hand, the presence of small arsenic-containing metabolites is significantly higher in brain of mice captured in the polluted areas (Fig. 4) that follows the range MAT>ROC>LDP. The presence of this toxic element in the brain can be explained because experiments performed with rats as model organisms have revealed that As can cross the blood brain barrier (BBB) producing an increasing presence of reactive oxygen species (ROS) as well as oxidative stress [40].

### 3.4. *Size characterization of Cu, Zn, Cd and As -biomolecules in plasma from Mus spretus captured in contaminated and non-contaminated areas*

The most interesting results obtained by the analysis of plasma samples by SEC-ICP-MS are related with Cu, Zn, Cd and As-biomolecules (Fig. 5). In the chromatogram traced by Cu we can observe a peak of about 67 kDa of high intensity. This peak is can be related with the transport proteins Cu/Zn-BSA and Cu-Tf of 67 kDa and 79kDa, respectively. The same 67 KDa-matched peak is also traced by Zn which agrees with this hypothesis (Fig. 5). Higher intensities of both metals were detected in plasma from mice captured in MAT which agrees with the increased presence of these metals in the sampling area both in soils and sediments [5]. The profile traced by Cd presents differences between mice captured in MAT with those captured in LDP and ROC (Fig. 5),

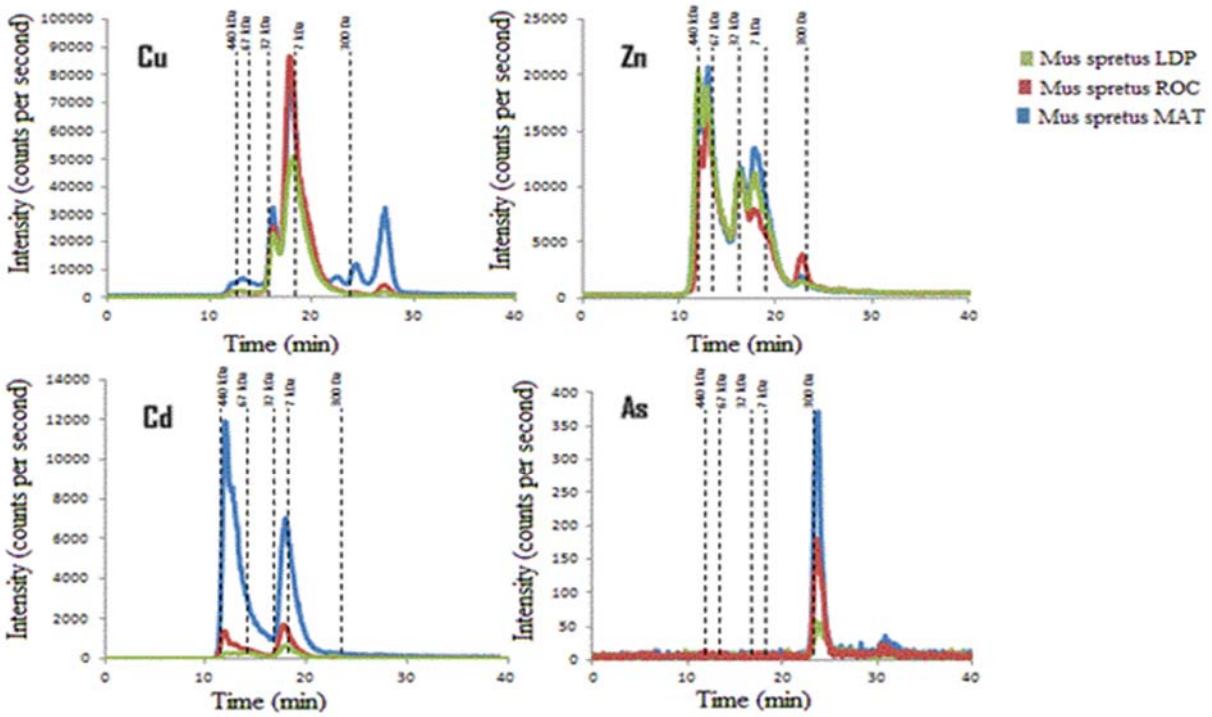



**Figure 4.** Cu, Zn, Cd and As-biomolecules complexes in brain of *Mus spretus* from different environmental areas assessed by molecular mass distribution with SEC-ICP-MS. Chromatographic conditions: column, Superdex™-75 (10x300x1.3 µm); mobile phase, ammonium acetate 20 mmol $L^{-1}$ (pH 7.4); flow rate 0.7 ml $min^{-1}$; injection volume, 50 µL.

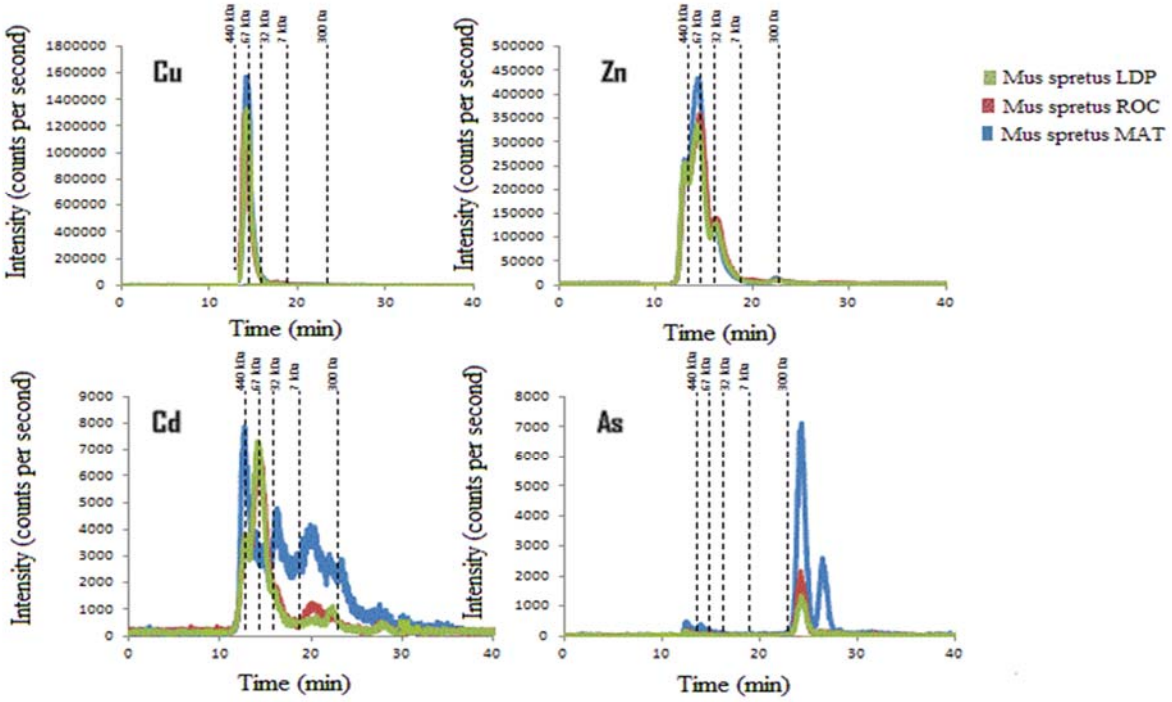



**Figure 5.** Cu, Zn, Cd and As-biomolecules complexes in plasma of *Mus spretus* from different environmental areas assessed by molecular mass distribution with SEC-ICP-MS. Chromatographic conditions: column, Superdex™-75 (10x300x1.3 μm); mobile phase, ammonium acetate 20 mmol $L^{-1}$ (pH 7.4); flow rate 0.7 ml $min^{-1}$; injection volume, 50 μL.

and the chromatograms show several peaks that can be explained by the high affinity of this element for thiol groups of proteins as stated by other authors [41]. Finally, in the chromatogram obtained for As-biomolecules (Fig. 5) is also observed the high intensity obtained in plasma samples from mice captured in MAT that confirm the assertion of Suzuki et al [41] about the potential use of arsenic presence in blood and plasma as biomarker of exposure to this element.

### 3.5. *Size characterization of Cu, Cd and As-biomolecules in kidneys extracts from Mus spretus captured in contaminated and non-contaminated areas*

In order to evaluate potential interactions between Cu and Cd, the cytosolic extracts of kidneys were ultrafiltered using microcentrifugal filters with a cut-off mass of 30kDa and directly analyzed by SEC-ICP-MS using a Superdex-Peptide column (with mass range <10kDa). The results obtained shown different expression profiles for Cu, Cd and As-biomolecules in kidneys ultrafiltered extracts from mice captured in the different areas of study (Fig. 6). As previously discussed in liver (Fig. 2), potential interactions between Cu and Cd are observed in kidney from mice captured in MAT and ROC in the fraction of 7 kDa related with MTs. In MAT, the higher presence of cadmium in the ecosystem and the greater affinity of this element for MTs explain the high intensity of the cadmium peak about 7 kDa against the lower intensity of copper in the same peak (Fig. 6).

On the other hand, the presence of low-molecular-mass As species in kidney cytosolic extracts analyzed by SEC-ICP-MS (column Superdex-Peptide) can be seen in Fig. 6. The higher intensity of the signal was obtained from ROC, in which total As concentration in kidney organs is also the highest (Table 2). High concentrations of arsenic in kidneys have been explained by other authors by the diet [42], while in contrast, the major concentration of arsenic in plasma, liver and brain could be related with the inhalation of this element [43] arsenic. In addition, inorganic arsenic exposure in humans, by the inhalation route, has been shown to be strongly associated with lung cancer [44], while ingestion of inorganic arsenic in humans has been linked to a form of skin cancer and also to bladder and kidney cancer [45].

## 4. Concluding Remarks

The importance of monitoring the exposure and studying the effects of heavy metals in living organisms has increased in the last decades. Studies of small mammals, mainly free-living mice (Mus spretus), have been used as bioindicators in numerous environmental studies because they can provide useful information for assessment of risk of metals to humans. The use of SEC-ICP-MS coupling is a good choice to

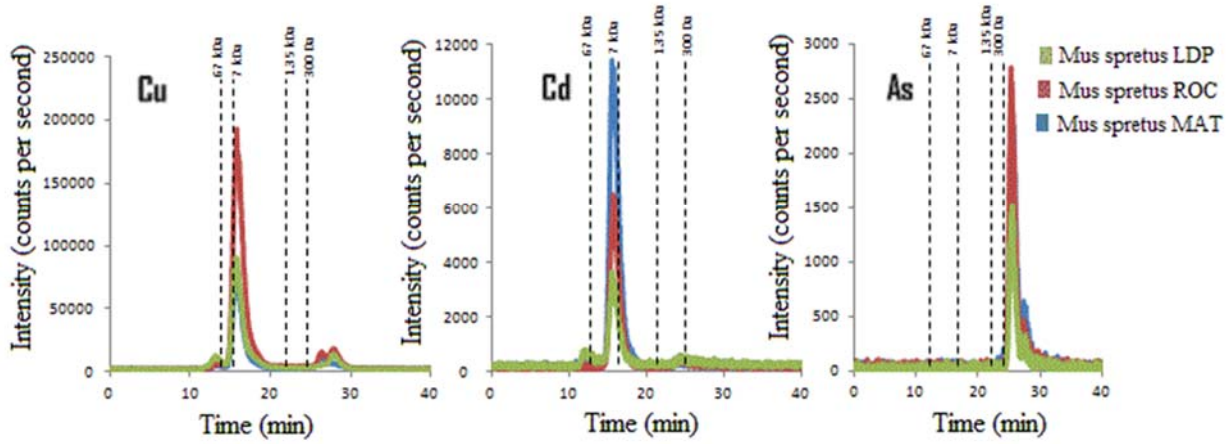



**Figure 6.** Cu, Cd and As-biomolecules complexes in kidneys of *Mus spretus* from different environmental areas assessed by molecular mass distribution with SEC-ICP-MS. Chromatographic conditions: column, Superdex™-Peptide (10x300x1.3 μm); mobile phase, ammonium acetate 20 mmol $L^{-1}$ (pH 7.4); flow rate 0.7 ml $min^{-1}$; injection volume, 20 μL.

assess changes in the profiles of metal-binding biomolecules in environmental bioindicators (e.g. Mus spretus) caused by metal pollution. The study of liver, brain, kidneys, lungs and plasma from mice captured in contaminated and non-contaminated areas in Doñana National Park (southwest Spain) and the surroundings reveals differences in the expression of Cu, Zn, Cd, As, Pb and Ni-biomolecules that can be related with contamination episodes. These results, confirm the potential metallomics for environmental issues assessment and the characterization of metal interactions in organisms exposed to contamination. Future works are necessary to identify by organic mass spectrometry the metal-biomolecules traced by SEC-ICP-MS as well as the identification and quantification of the arsenic containing peaks by HPLC-MS. In addition, the use of micro-mammals as bioindicators to evaluate terrestrial ecosystems requires analytical techniques with sensitive elemental or molecular specific detectors. In this sense, the potential of inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) joining great sensitivity, selectivity, precision and multiple heteroatoms detection of metalloproteins makes essential its use in this type of environmental studies. On the other hand, the intensities of SEC-ICP-MS signals from metal-containing biomolecules show a complex metal-profile that cannot be well resolved, and for this reason, multidimensional chromatographic approaches will be used to overcome this problem in further studies, such as ionic exchange chromatography and, finally, the altered metalloproteins will be identified using organic mass spectrometry.

## Acknowledgements

This work was supported by the project CTM2009-12858-C02-01 from the Ministerio de Ciencia e Innovación, and the projects P08-FQM-3554 and P09-FQM-4659 from Consejería de Innovación Ciencia y Empresa (Junta de Andalucía). M. Angel García Sevillano thanks the Ministerio de Educación for a predoctoral scholarship.

## References

[1] D. Bonilla-Valverde, J. Ruiz-Laguna, A. Muñoz, J. Ballesteros, F. Lorenzo, J.L. Gómez-Ariza, J. López-Barea, Toxicology 197 (2004) 123–138. DOI: 10.1016/j.tox.2003.12.010

[2] B. Sure, Aquatic Ecology 35(2) (2001) 245-255. DOI: 10.1023/A:1011422310314

[3] R. Montes Nieto, T. García-Barrera, J.L. Gómez-Ariza, J. López-Barea, Environmental Pollution 158 (2010) 401-408. DOI: 10.1016/j.envpol.2009.09.005

[4] A. Romero-Ruiz, J. Alhama, J. Blasco, J.L. Gómez-Ariza, J. López-Barea, Environmental Pollution 156 (2008) 1340–1347. DOI:10.1016/j.envpol.2008.02.02

[5] M. A. García-Sevillano, M. González-Fernández, R. Jara-Biedma, T. García-Barrera, J. López-Barea, C. Pueyo and J. L. Gómez-Ariza, Analytical and Bioanalytical Chemistry 404 (2012) 1967-1981. DOI: 10.1007/s00216-012-6274-2

[6] T. García-Barrera, J.L. Gómez-Ariza, M. González-Fernández, F. Moreno, M.A. García-Sevillano, V. Gómez-Jacinto, Analytical and Bioanalytical Chemistry 403(8) (2012) 2237-2253. DOI:10.1007/s00216-012-5776-2

[7] V. Funes, J. Alhama, J. López-Barea, J. Peinado, Journal of Environmental Pollution 139 (2006) 214-223. DOI: 10.1016/j.envpol.2005.05.016

[8] A. Vioque-Fernández, E. Alves de Almeida, J. López-Barea, Science of the Total Environment 407 (2009) 1784-1797. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2008.11.051

[9] R. Montes-Nieto, C.A. Fuentes-Almagro, D. Bonilla-Valverde, M.J. Prieto-Álamo, J. Jurado, M. Carrascal, J.L. Gómez-Ariza, J. López-Barea, C. Pueyo, Proteomics 7 (2007) 4376–4387. DOI: 10.1002/pmic.200700409

[10] J. Ruiz-Laguna, N. Abril, T. Garcia-Barrera, J.L. Gómez-Ariza, J. López-Barea, C. Pueyo, Environmental Sciences & Technologies 40 (2006) 3646-3652. DOI: 10.1021/es060056e

[11] J. López-Barea, J.L. Gómez-Ariza, Proteomics 6 (2006) 51-62. DOI: 10.1002/pmic.200500374

[12] M. González-Fernandez, T. García-Barrera, J. Jurado, M.J. Prieto-Álamo, J. López-Barea, C. Pueyo, J.L. Gómez-Ariza, Pure Applied Chemistry 80 (2008) 2609-2626. DOI: 10.1351/pac200880122609

[13] S. Mounicou, J. Szpunar, R. Lobinski, Chemical Society Reviews 38 (2009) 1119–1138. DOI: 10.1039/b713633c

[14] A. Sanz-Medel, Analytical and Bioanalytical Chemistry 390 (2008) 1–2. DOI: 10.1007/s00216-007-1705-1

[15] R.R. Crichton, M. Charloteaux-Wauters, European Journal of Biochemistry 164(3) (1987) 485-506. DOI: 10.1111/j.1432-1033

[16] J.R. Prohaska, American Journal Clinical Nutrition 88(3) (2008) 826–829.

[17] A. Sigel, H. Sigel, R.K.O. Sigel,Editors, ,Metal Ions in Life Sciences, Volume 5, Metallothioneins and Related Chelators (2009) The Royal Society of Chemistry (RSC),Cambridge 536 Hard cover, 266 (1-3), 55-56.

[18] D.P. Giedroc, A.I. Arunkumar, Dalton Transactions 2007, 3107–3120. DOI:10.1039/B706769K

[19] W. Zheng, M. Aschner, J. F. Ghersi-Egea, Toxicology Applied Pharmacology 192 (2003) 1–11. DOI: 10.1016/S0041-008X (03)00251-5

[20] D. Sadava et al. Life, the Science of Biology, 9th Edition. Macmillan Publishers, 2009.

[21] T. Kimura, N. Itoh, Journal of Health Science, 54 (3) (2008) 251-260.

[22] J. Bettmer, M. Montes Bayón, J. Ruiz Encinar, M.L. Fernández Sánchez, M.R. Fernández de la Campa, A. Sanz Medel, Journal of Proteomics 72 (2009) 989-1005. DOI: 10.1016/j.jprot.2009.05.003.

[23] 23. S. Mounico, J. Szpuna, R. Lobinsk, European Journal of Mass Spectrometry 16(3) (2010 243-253. DOI: 10.1255/ejems.1059.

[24] J.M. Marchante-Gayón, C. Sariego Muñíz, J.I. García Alonso, A. Sanz-Medel, Analytical Chimica Acta 400 (1999) 307–320. DOI:

[25] S.D. Tanner, V.I. Baranov, D.R. Bandura, Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 57(9) (2002) 1361-1452. DOI: S0584-8547(02)00069-1

[26] J.O. Grimalt, M. Ferrer, E. Macpherson, Science of the Total Environment 242 (1999) 3-11.

[27] G. Tortosa, D. Correa, A.J. Sánchez-Raya, A. Delgado, M.A. Sánchez-Monedero, E.J. Bedmar, Ecological Engineer 37 (2001) 539–548.

[28] A. Tovar-Sanchez, M.A. Huerta-Diaz, J.J. Negro, M.A. Bravo, S.A. Sañudo-Wilhelmy, Journal Environmental Manag 78 (2006) 286-293.

[29] A. Sánchez-Chardi, C.A. Oliveira Ribeiro, J. Nadal, Chemosphere 76 (2009) 387–394.

[30] S. Teodorova, R. Metcheva, M. Topashka-Ancheva, Environmental Research 91 (2003) 85–94.

[31] H.M. Perry, E.F. Perry, J.E. Putifoy, J.N. Erlanger, Trace Subst. Environ. Health 7 (1973) 281–288.

[32] A.W. Voors, M.S. Shuman, P.M. Galagher, Trace Subst. Environ. Health 6 (1972) 215–222.

[33] M. J. Stillman, C. F. Shaw and K. T. Suzuki, VCH, New York, 1992.

[34] J.F. Riodan, B.L. Valee, Methods in Enzymology, vol. 205, Academic Press, New York, 1991.

[35] M. Sato, K.T. Suzuki, Biomedical Research on Trace Element, 6 (1995) 13.

[36] Y. Uchida, Neurosignals 3 (1994) 211-215. DOI: 10.1159/000109547

[37] C.J. Quaife, S.D. Findley, J.C. Erickson, G.J. Froelick, E.J. Kelly, B.P. Zambrowicz, R.D. Palmiter, Biochemistry 33 (1994) 7250.

[38] Aposhian, H.V., Aposhian, M.M., Chemical Research in Toxicology, 19 (2006) 1-15. DOI: 10.1021/tx050106d

[39] M.G. Bogdana, A. Samgayo-Reyest, H.V. Aposhian, Toxicology 93 (1994) 175-193. DOI: 10.1016/0300-483X(94) 90077-

[40] F. Piao, N. Ma, Y. Hiraku, M. Murata, S. Oikawa, F. Cheng, L. Zhong, T. Yamauchi, S. Kawanishi, K. Yokoyama, Journal of Occupational Health 47 (2005) 445–449. DOI:10.1539/joh.47.445

[41] A.Y. Aoki, K.T. Suzuki, Journal of Biochemical Toxicology 2 (1) (2006) 67–71, DOI: 10.1002/jbt.2570020107

[42] 42. E.M. Kenyo, L.M. Del Raz, Toxicological Sciences 85 (1) (2005) 468-475. DOI: 10.1093/toxsci/kfi107

[43] S.W. Burchiel, L.A. Mitchell, F.T. Laver, X. Sun, J.D. McDonald, L.G. Hudson, K.J. Liu, Toxicology & Applied Pharmacology, 241 (2009) 253-259. DOI: 10.1016/j.taap.2009.09.019.

[44] H.J. Lubi, L.E. Moor, J.F. Fraumeni, K.P. Canto, Health Perspectives 116(12) (2008) 1661–1665. DOI: 10.1289/ehp.1151

[45] C.J. Chen, C.W. Chen, M.M. Wu, T.L. Kuo, British Journal of Cancer 66 (1992) 888-892.

# Section II
# Analysis

CHAPTER 6

# *Current Analytical Strategies and Techniques Related to Selenoproteins in Foods*

MIGUEL ÁNGEL GARCÍA-SEVILLANO[a], MACARENA GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ[a], TAMARA GARCÍA-BARRERA[a], AND JOSÉ LUIS GÓMEZ-ARIZA*[a]

[a]Department of Chemistry and Materials Science, Faculty of Experimental Sciences, University of Huelva, Av. Fuerzas Armadas s/n, 21007, Huelva, Spain
*E-mail: ariza@uhu.es

## 6.1 Introduction

Selenium (Se) is an essential trace element of fundamental importance for health due to its contribution in physiological functions by the bioactivity of selenium metabolites (mainly selenium amino acids) but also selenoproteins, since more than 30 mammalian selenoproteins or selenoenzymes are vital for the basic functions of life. Although the function of many metalloproteins has not been determined yet, their role in antioxidant defense, thyroid homeostasis and regulation of redox status can be mentioned. Many authors have suggested that Se is a potent protective agent for neurons and myocytes through selenoprotein expression in the brain, as well as for skeletal and cardiac muscles.

Food and Nutritional Components in Focus No. 9
Selenium: Chemistry, Analysis, Function and Effects
Edited by Victor R. Preedy
© The Royal Society of Chemistry 2015
Published by the Royal Society of Chemistry, www.rsc.org

The main source of selenium in human beings is the diet; however, in several regions of the world the content of selenium in diet has been estimated to be insufficient for the correct functions of selenoproteins. The beneficial effects of selenium on human health are strongly dependent on the chemical forms and concentration of the element. Therefore, suitable analytical methods for selenium and selenoproteins speciation are necessary, considering that these species have to be analyzed in complex biological matrices, which requires well-designed extraction procedures for chemical species.

The speciation of heteroelement-containing proteins requires detection, identification and quantification of these biomolecules in biological samples, and particularly in food. Hyphenated techniques based on the coupling of chromatographic separation with inductively coupled plasma spectrometry (ICP-MS) and its combination with organic mass spectrometry (normally, ESI-QqQ-MS and MALDI-TOF-MS), besides isotopic dilution analysis (IDA), allow the characterization and quantification of selenium species and selenoproteins. Additionally, two-dimensional gel electrophoresis (2D-GE) can be used for this purpose.

### 6.1.1 Selenoproteins in Food

Selenium is found predominantly in organic forms in plants, food and feed, such as selenium amino acids, which incorporate the element specifically into selenoproteins as selenocysteine, using the active sites of glutathione peroxidases and iodothyronine deiodinases, or unspecifically in selenomethionine, at methionine position, since selenium can substitute sulfur in the protein due to their chemical similarity. These latter proteins with selenium are not considered as selenoproteins, and are called "selenium-containing proteins" to stress the lack of selenium-bonding specificity.

A wide array of selenoproteins present in food can be mentioned, which includes glutathione peroxidases (GPx1–GPx6), thioredoxin reductases (TrxR1–TrxR3), iodothyronine deiodinases (ID1–ID3), selenophosphate synthetase 2 (SPS2), 15 kDa Sel (Sel15), SelH, SelI, SelK, SelM, SelN, SelP, SelR, SelS, SelT, SelV, SelW, as well as the 15 kDa Sel (Fep15), SelJ and SelU found in fish (Table 6.1).

## 6.2 The Role of ICP-MS in Selenoproteins Speciation

ICP-MS is the detection technique more usually used at present for the analysis of selenium in food (Ruiz-Encinar *et al.*, 2003). This instrumental system has important benefits associated to high sensitivity and selectivity for multielemental analysis, detection limits in the range of parts per trillion, and capability for isotopic analysis. The potential of this technique in metalloproteins analysis has been highlighted in a recent review (Bettmer *et al.*, 2009). The main drawback of ICP-MS techniques is related to the presence of polyatomic and/or isobaric interferences from argon plasma and matrix

**Table 6.1** Selenoproteins and their functions.

| Selenoprotein | Abbreviation | Function |
|---|---|---|
| Cytosolic glutathione peroxidase | GPx1 | Antioxidant defense |
| Gastrointestinal glutathione peroxidase | GPx2 | Antioxidant defense |
| Extracellular glutathione peroxidase | GPx3 | Maintenance of cellular redox status |
| Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase | GPx4 | Detoxification of lipid hydroperoxides |
| Epididymal glutathione peroxidase | GPx5 | Antioxidant protection during spermiogenesis and sperm maturation |
| Olfactory glutathione peroxidase | GPx6 | Antioxidant defense |
| Thioredoxin reductase Type I | TrxR1 | Part of the thioredoxin system. Antioxidant defense, redox regulation, cell signaling |
| Thioredoxin reductase Type II | TrxR2 | Part of the thioredoxin system. Antioxidant defense, redox regulation, cell signaling |
| Thioredoxin reductase Type III | TrxR3 | Part of the thioredoxin system. Antioxidant defense, redox regulation, cell signaling |
| Iodothyronine deiodinase Type I | ID1 | Conversion of $T_4$ to $T_3$ and $T_4$ to reverse T3 |
| Iodothyronine deiodinase Type II | ID2 | Conversion of $T_4$ to $T_3$ |
| Iodothyronine deiodinase Type III | ID3 | Conversion $T_4$ to reverse $T_3$ |
| Selenophosphate synthetase | SPS2 | Synthesis of selenophosphate |
| 15 kDa selenoprotein | Sel15 | Role in cell apoptosis and mediation of chemopreventive effects of Se |
| Selenoprotein H | SelH | Not fully known, possible upregulation of genes involved in glutathione synthesis |
| Selenoprotein I | SelI | Studies with *Escherichia coli* showed specific ethanolaminephosphotransferase activity |
| Selenoprotein J | SelJ | Structural role |
| Selenoprotein K | SelK | Possible antioxidant protection in cardiomyocytes |
| Selenoprotein M | SelM | Distantly related to Sel15. May be involved in cancer etiology |
| Selenoprotein N | SelN | It is linked with rigid spine syndrome |
| Selenoprotein P | SelP | Involved in Se transport, antioxidant defense |
| Selenoprotein R | SelR | Reduction of oxidized methionine residues in damaged proteins |
| Selenoprotein S | SelS | Cellular redox balance. Possible influence of inflammatory response |
| Selenoprotein T | SelT | Role in regulation of $Ca^{2+}$ homeostasis and neuroendocrine secretion |
| Selenoprotein U | SelU | Unknown |
| Selenoprotein V | SelV | Possible role in redox regulation |
| Selenoprotein W | SelW | Antioxidant protection |
| Fish 15 kDa selenoprotein | Fep 15 | Fish homolog of Sep15 |

effects. The use of a double-focusing high-resolution spectrometer is a good alternative to overcome spectral interferences in ICP-MS instrumentation, although quadrupole analyzers in combination with collision and dynamic reaction cells are more frequently used in routine analysis laboratories for this purpose. In this case an optimized flow of collision/reaction gas is introduced into the collision/reaction cell to reduce polyatomic interferences from plasma.

ICP-MS spectral interferences from isobaric elements and polyatomic species in the plasma arising from the sample matrix can be considerably removed during the chromatographic or electrophoretic separation required for speciation analysis. Unfortunately, there are spectral interferences that could not be eliminated by the chromatographic separation and it is necessary to use mathematical corrections, although it requires the monitorization of additional isotopes. In recent years, other analyzers, such as multicollector (MC), time-of-flight and triple quad (QqQ) present numerous applications in this field with the common objective of reducing and/or removing spectral interferences that are not possible with the use of collision/reaction cells (Goenaga-Infante *et al.*, 2002).

Samples can be introduced into the ICP-MS by direct nebulization or by direct hyphenation to separation systems that introduce the HPLC outflow in the nebulizer device, other separation systems such as capillary electrokinetic chromatography (CEC) and capillary electrophoresis (CE) can also be used for this purpose. Alternatively, laser ablation (LA) can introduce metal-containing biomolecules from living organism tissues or gel electrophoresis (GE) spots into ICP-MS.

## 6.3 Sample Preparation Procedures for Selenoproteins Speciation

Sample preparation could be considered a critical step in the analysis of selenoproteins, including sample matrix manipulations to make it suitable for analysis (Mesko *et al.*, 2011).

### 6.3.1 Conventional Sample Preparation Procedures for Selenoproteins Speciation

Sample preparation is crucial to isolate target analytes from the matrix. The main problems arise from analyte losses or contamination during sampling. In general, conventional sample preparation for selenoproteins speciation from biological matrices involves several steps:

(a) Cell disruption or lysis, or partial degradation of sample matrix for later extraction of the analyte using mechanical treatments in presence of liquid nitrogen (García-Sevillano *et al.*, 2012).
(b) Analyte extraction and solubilization assisted by different reagents, mainly suitable buffer solutions, *e.g.* Tris buffer or ammonium acetate (García-Sevillano *et al.*, 2012).

(c) Reduction of disulfide bonds to avoid the formation of protein disulfide bridges. For this purpose, free thiol-containing reducing agents such as dithiothreitol (DTT), dithioerythritol (DTE), reduced glutathione (GSH) and β-mercaptoethanol have been used. However, recently these reagents have been replaced for nonchelating mild-reducing compounds, such as tributylphosphine (TBP) or tris-carboxyethylphosphine (TCEP) (García-Sevillano *et al.*, 2012).
(d) Inhibition of proteases action to conserve selenoprotein molecule integrity, for this purpose proteases inhibitors without chelating properties, such as phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), have been proposed (García-Sevillano *et al.*, 2012).

Optionally, when metal proteins are embedded into cell membranes the addition of detergents, such as SDS or CHAPS, is necessary, since these reagents release metal-binding proteins from the membrane preventing hydrophobic interactions (Mester and Sturgeon, 2003).

## 6.3.2 New Trends in Extraction Procedures for Selenoproteins from Food Matrices

### *6.3.2.1 Enzymatic Extraction*

Recently, enzymes have been proposed to promote matrix degradation or selectively release the analytes present in food samples, *e.g.* selenoaminoacids (Montes-Bayón *et al.*, 2002; Mester and Sturgeon, 2003). Since enzymes can catalyze specific and recognized processes, no additional side effects in the sample are expected.

Examples of this treatment are: (a) extraction of selenium labile species from garlic using aqueous solution of enzyme-deactivating hydroxylamine hydrochloride (Larsen *et al.*, 2006); and (b) the joint use of cellulase, chitinase and glucanase to extract cell-wall-bound species completed by a proteolytic attack, in a sequential extraction procedure that also involves leaching with water and extraction with HCl to release the residual organic bound species, and final extraction with sulfite solution and $CS_2$ to complete the mass balance by the recovery of $Se^0$ and $Se^{2-}$, respectively (Mounicou *et al.*, 2009).

### *6.3.2.2 Protein Precipitation and Ultrafiltration*

A good alternative in sample preparation for selenium speciation is to separate low from high molecular weight selenocompounds, using simple techniques based on size exclusion chromatography, protein precipitation or ultrafiltration with membranes of 10 kDa cut-off.

Jayasinghe and Caruso (2011) proposed the precipitation of proteins from crude protein mixture and enrichment of proteins of interest under nondenaturing conditions, using ammonium sulfate as precipitating agent. These authors have demonstrated the feasibility of fractional precipitation with ammonium sulfate for achieving matrix reduction and sample concentration

simultaneously, in selenoproteomics studies. In addition, other authors proposed the use of trichloroacetic acid (TCA)–acetone or chloroform–methanol mixtures for this purpose, although it causes protein denaturation.

Ultrafiltration by offline use of membrane under centrifugal force allows separation of compounds according to the molecular mass. This approach is suitable for separation of salts and other low molecular weight solutes from high molecular weight species. Solutes with greater molecular weight or size are retained by the membrane and concentrated. Ultrafiltration offers a fast way to promote the separation with minimal denaturation of molecules compared to precipitation methods (Nuevo-Ordoñez *et al.*, 2010).

#### *6.3.2.3 Ultrasound Sonication*

The most common sonicators used in analytical applications are power bath and probe-type devices, which favor the penetration of the extractant into the sample, increasing the extraction efficiency. Thus, extraction with ultrasound probe and separation by 2D-GE were used for the characterization of Se-containing proteins in selenium-rich yeast. After centrifugation, the total Se content in the supernatant was measured by ICP-MS and water-soluble selenium-containing proteins were separated by 2D-GE for later characterization by consecutive use of nano-HPLC-ICP-MS and nano-high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry (nHPLC-ESI-MS). Another example is the extraction of selenium-rich yeast by ultrasonic probe with water containing DTT (antioxidant) and PMSF (protease activity inhibitor) in an ice bath. The efficiency of different extraction approaches were evaluated by total selenium analysis using SEC-ICP-MS. The extraction procedure preserves the protein integrity along the extraction and purification steps, for further separation by 2D-GE, mapping by nano-HPLC-ICP-MS and identification of selenium-containing peptides by nano-HPLC-ESI-MS (Tastet *et al.*, 2008).

### 6.3.3 Cleanup Procedures

The presence of different compounds in the matrix, such as hydrocarbons, polysaccharides, lipids, amino acids and proteins, limits the use of HPLC-ICP-MS in the speciation of selenium in biological samples, since it results in complex chromatograms and coelution of chemical components. For this reason, clean-up of samples is usually necessary.

Lyophilization, centrifugation, ultrafiltration, gel filtration, gel permeation, chromatography (GPC), solid-phase extraction (SPE) and column chromatography are some techniques used for cleanup and purification of extracts. For biological samples, the most common approaches for pretreatment prior to analysis deal with the use of $C_{18}$ cartridges or ion-exchange resins. For example, anion-exchange resins (in the acetate form) have been used for removing inorganic selenium species from extracts of the metal hyperaccumulating plant *Brassica juncea* (Montes-Bayón *et al.*, 2002). On the other hand, online low-pressure size-exclusion gel filtration (Hitrap Desalting columns) allows

a finer resolution of chemical species for subsequent separation steps, since it could act as a cleanup step for the elimination of high molecular mass biopolymers (polysaccharides, proteins) and other compounds that might be absorbed onto the chromatographic stationary phase or coeluted with selenoproteins during speciation analysis.

Reversed phases ($C_{18}$ and $C_4$) have been used for concentration and purification of peptides, proteins and oligonucleotides after tryptic digestion in a buffer with high concentration of salts that assures enzyme stability. These phases are loaded at the end of 10 μL pipettes (ZipTip pipettes) that are used for peptide and protein desalting and concentration before the identification by mass spectrometry using MALDI-TOF/TOF-MS or DI-nESI-QqQ-TOF-MS (García-Sevillano *et al.*, 2012).

### 6.3.4 Stability of Selenoproteins during Storage

Suitable storage procedures to preserve the information contained in the species are a key requirement in the whole analytical process. Several drawbacks can be considered, especially species degradation, related to their chemical nature and external factors such as temperature that affects reaction rates and, consequently, species interconversion. In this way, selenoproteins, especially GPx and SelP, are readily degraded because of selenocysteine instability. The selenium atom in selenocysteine is more prone to oxidation than in selenomethionine (Mester and Sturgeon, 2003).

Sample stabilization can be performed by drying, especially freeze-drying for biological samples. Shock freezing under liquid nitrogen seems to be the safest technique to prevent species changes and can be performed at the sampling site (Mesko *et al.*, 2011).

Degradation of SeCys from the selenoproteins occurs during storage of sample at 4 °C as a function of time. Note that the selenium mass balance before and after storage shows the possibility of formation and losses of volatile species that are not observed in the chromatograms. However, storage at −20 °C prevents selenoproteins degradation for more than one year (Mester and Sturgeon, 2003).

Another factor affecting selenoproteins stability is oxidation; Palacios *et al.* (2006) indicate that protein is most affected by loss of selenium is GPx, whereas the SelP peak remains constant. The degradation was much less pronounced in the presence of a reducing agent such as DTT, which prevents the oxidation of SeCys present in GPx.

## 6.4 Current Analytical Strategies and Hyphenated Techniques for Selenoproteins Speciation in Foods

Different problems arise in the study of metallic species in biological systems since they are usually unknown and present a great variability of size and type of bond between metal and biomolecule. In addition, usually there

are not standards available for these analyses. The need for the determination of individual chemical species of selenium in biological samples and in particular in food has driven the development of new analytical procedures designed for this purpose, which have deepened knowledge about selenium-species toxicity, mobility, and bioavailability.

The analytical speciation methods for selenoproteins identification and quantification include three main instrumental components: (i) a separation technique (*e.g.*, LC, CE, 2DE and 2D-PAGE) that contributes to the isolation of selenoproteins from the matrix and their time-resolved introduction into the detector—*selectivity component*; (ii) a high-sensitivity element detector, ICP-MS, for element quantification, mainly using isotopic dilution techniques—*sensitivity component*; and (iii) a molecule-specific detector, based on mass spectrometry: triple quadrupole (QqQ), ion-trap (IT), time-of-flight (TOF), or high resolution analyzers such as QqQ-TOF and Orbitrap—*structural component*. These basic components are integrated in different instrumental arrangements depending on the problem to be addressed.

### 6.4.1 Separation and Detections Techniques for Selenoproteins Based on Liquid Chromatography

Several modes of chromatographic separations can be used for species discrimination at the analytical, preparative, capillary or nanoscale, and usually two or three orthogonal systems can be offline combined to increase metal–biomolecules resolution, such as size-exclusion chromatography (SEC), reverse-phase (RP), ion-exchange chromatography (IEC), hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) and affinity chromatography (AF). However, as noted before, the combination with organic mass spectrometry is mandatory to study unknown species in biochemical issues, using generally electrospray ionization (ESI) or matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) as ionization source for selenoproteins ionization. The use of ESI-MS is more suitable than MALDI-MS for tandem mass spectrometry and online couplings with separation techniques (HPLC, CE). However, MALDI-TOF-MS is recommended for matrices with low complexity, normally after 2D-GE separations, for spot characterization.

Size exclusion has been widely applied as first chromatographic dimension (SEC), followed by purification by other complementary liquid chromatographic devices in multidimensional schemes. This allows a first fractionation of selenocompounds by SEC followed by separation of collected fractions by other type of liquid chromatography, such as reverse-phase or ion-exchange chromatography. These multidimensional separation schemes has been applied to increase the resolution of the separation and remove matrix components that can influence selenocompounds characterization

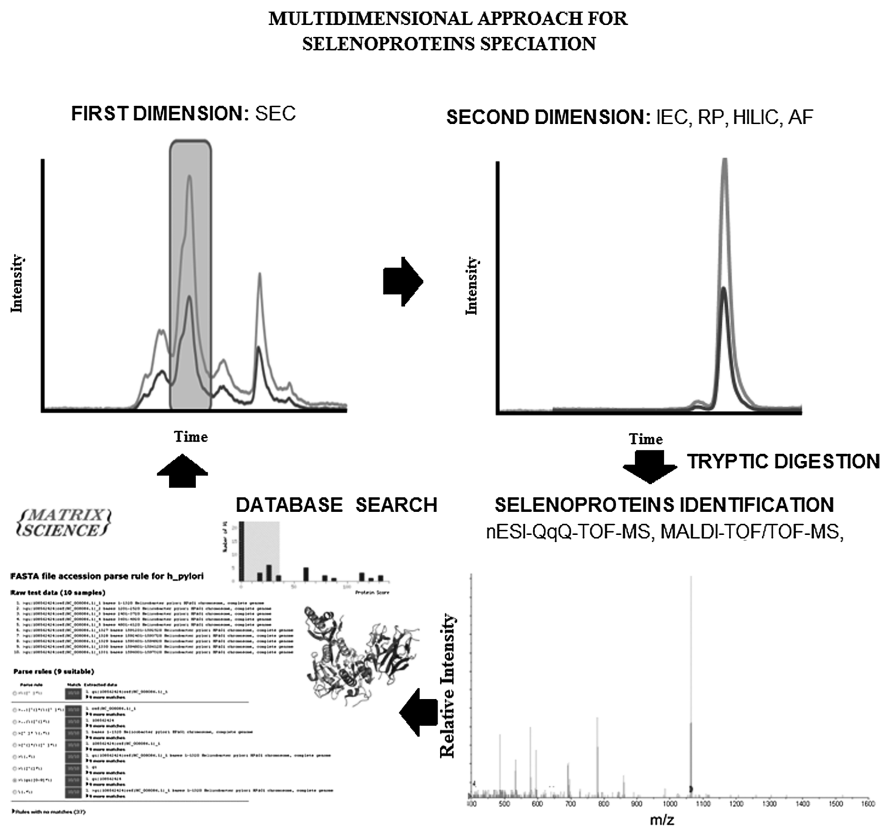



**Figure 6.1** Workflow normally used in selenoproteins speciation based on LC.

by tandem mass spectrometry (Figure 6.1). This workflow has been applied to the identification of selenocompounds in yeast (Ruiz-Encinar *et al.*, 2003), and other foods (Moreno *et al.*, 2004) (Table 6.2).

In general, RP chromatography can produce additional problems when coupled to ICP-MS, mainly due to destabilization of plasma by organic solvents and gradient elution. To overcome this problem a response factor can be calculated on the base of organic phase gradient (Pröfrock and Prange, 2009). The use of micro- and nanoflow nebulizers with flow rates ranged from 200 nL $min^{-1}$ to 4 μL $min^{-1}$ allows the use of mobile phases with high organic content (Szpunar, 2005). Other alternatives are the introduction of oxygen to avoid clogging of sampling and skimmer cones by carbon deposition, and the use of inert Pt cones instead of the conventional ones made in Ni. Finally, recent advances in sample introduction, such as ultrasonic nebulizer/membrane desolvator ($U6000AT^+$, CETAC Technologies) provide enhanced desolvation of both aqueous and organic samples, reducing interferences and carbon deposition in the ICP-MS, and lowering the analyte detection limits.

**Table 6.2** Examples of applications of different chromatographic liquid mechanisms for selenoproteins separation.

| Species | Liquid chromatography mode | Column | Matrix | Detector | References |
|---|---|---|---|---|---|
| Selenoproteins | Ion-exchange chromatography | Mono Q 5/5 FPLC (50 × 5 mm) | Human serum | ICP-MS | Hinojosa-Reyes *et al.* (2003) |
| SelP, Se-albumin, p-GSH-Px and soluble compounds | Size-exclusion and affinity chromatography | Hitrap Desalting column Hitrap Heparin Sepharose, Hitrap blue-Sepharose | Human serum | ICP-MS | García-Sevillano *et al.* (2013) |
| Se-albumin and selenoproteins | Multiaffinity removal column | Kit provided by Agilent technology | Human serum | UV | Palacios *et al.* (2006) |
| SeMet, selenized, hemoglobin selenoprotein P and other soluble compounds | Size-exclusion chromatography | Superdex G-75 HR 10/30 (70–3 kDa) | Cow serum | ICP-MS | Palacios *et al.* (2005) |
| Selenoproteins | Size-exclusion chromatography | Superdex peptide 10/30 (14–0.18 kDa) | Onion leaves | UV/ICP-MS | Wrobel *et al.* (2004) |
| Selenoproteins | Size-exclusion chromatography | Superdex 75 HR 10/30 (70–3 kDa) | Plants (Indian mustard) | ICP-MS | Mounicou *et al.* (2004) |
| Selenoproteins | Size-exclusion chromatography Ion exchange chromatography | 300 and 1 kDa (Biosep-SEC-2000) and 7 and 0.1 kDa (Superdex Peptide HR 10/30 Hamilton PRP-X200 column | Fish (tuna and trout), shellfish (krill, oyster and mussel), vegetal tissues (white clover and wheat flour) and selenized yeast | ICP-MS | Moreno *et al.* (2004) |
| Selenoproteins | Size-exclusion chromatography | Superdex G-75 HR 10/30 | Cow blood | ICP-MS | Palacios *et al.* (2005) |
| Selenoproteins | 2D size-exclusion ion-paring reversed phase chromatography | Superdex-200 column Hamilton PRP X-100 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) C8 Altima/Alltech (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) | Whole milk | ICP-MS | Bierla *et al.* (2008) |

### 6.4.2 Electrophoretic Techniques

Gel electrophoresis (GE) (native and SDS-PAGE) in a one- or two-dimensional format is a powerful tool for selenoprotein and Se-containing proteins separation providing better resolution than HPLC. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) is the most common separation method for this purpose. In this case, secondary protein structure is denaturized, and consequently its application is restricted to trace elements covalently bound to proteins, as is the case of selenoproteins, which do not lose the element during analysis. The Se-containing bands in 1DGE or spots in 2D GE can be traced by laser-ablation inductively coupled plasma-MS (LA-ICP-MS) (Fan *et al.*, 2002) (Figure 6.2). Additionally, matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS) or electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) can be used for unknown selenoproteins identification.

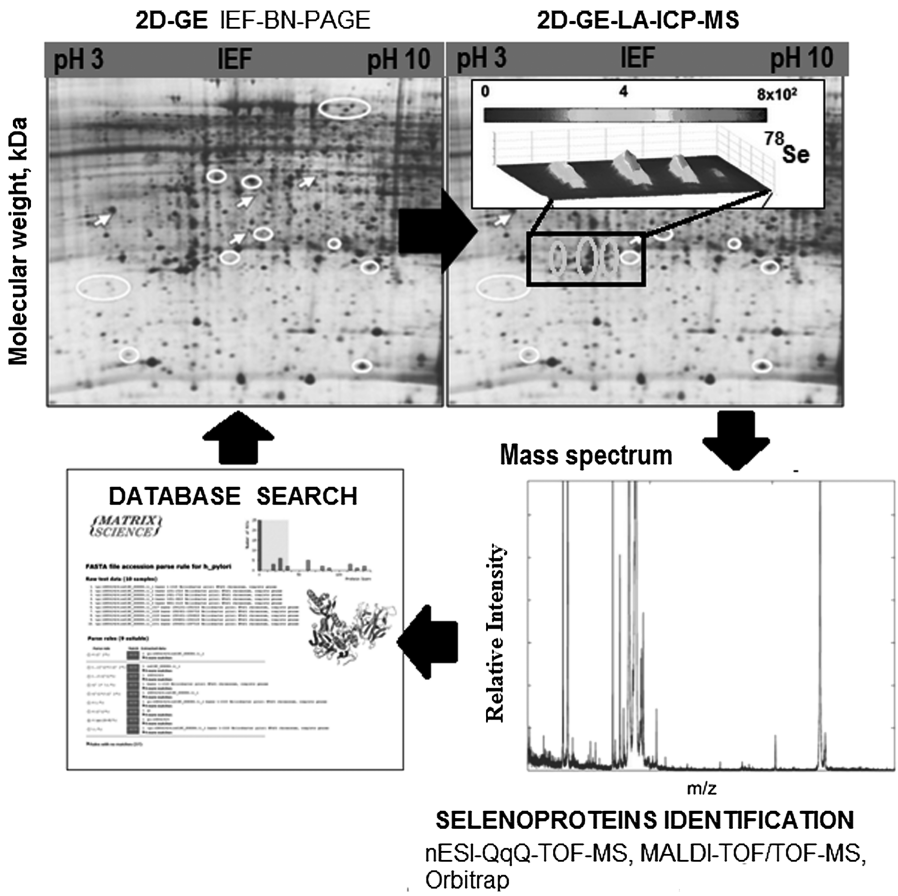



**Figure 6.2** Workflow normally used in selenoproteins speciation based on 2D-GE.

### 6.4.3 Isotopic Dilution Analysis in Selenoproteins Quantification

Recently quantifications of selenoproteins in complex samples have been performed by isotope dilution analysis (IDA) using the multi-isotopic capability of ICP-MS. This approach has been used in many applications due to the methodological simplicity that only requires an isotopically enriched standard. In order to apply isotope dilution analysis in elemental speciation, a previous separation of the species is necessary prior to their analysis in the ICP-MS system.

For the application of IDA to selenoproteins speciation, new quantitation forms have been described: (i) postcolumn isotope dilution (species-unspecific mode, SUID), when the standard of a chemical species is not available. This procedure allows the accurate determination of elemental species even if the structure of the compounds is unknown and multiple isotopically enriched species are available for the evaluation and correction of species interconversion. However, this mode of spiking can only be applied when the ionization efficiency of the element is independent of the chemical form in which the element reaches the ion source; (ii) species-specific spiking mode (SSID), when standards for the species are available. This quantification procedure requires the use of a spike solution containing the species to be analyzed in an isotopically labeled form, similarly to the classical organic isotope dilution technique (Rodríguez-González *et al.*, 2005). In biological samples, several species occur at the same time, which can produce species degradation and interconversion that are corrected by the cited procedure (Rodríguez-González *et al.*, 2005). Despite the advantages of SSID mode its use is limited by the reduced number of selenium isotopically labeled species available.

When SUID is applied, the quantification of selenium-containing proteins and selenium-metabolites in the different chromatographic peaks is carried out by postcolumn species-unspecific isotopic dilution analysis as described by Sariego-Muñíz *et al.* (2001) for the analysis of selenium species in plasma and serum samples. The approach is based on the conversion of the intensity of selenium isotopes and polyatomic interferences in a mass-flow chromatogram for quantification. In addition, dead-time correction of ICP-MS detector has to be optimized using the procedure described by Vanhaecke *et al.* (1998), and mathematical treatments to correct polyatomic interferences usually present in plasma serum, such as $BrH^+$, as well as $SeH^+$. Mass bias corrections are applied using the $^{78}Se/^{74}Se$ and $^{80}Se/^{74}Se$ isotope ratios calculated (exponential mode) as previously described by Ruiz-Encinar *et al.* (2001). Finally, an online dilution equation has to be applied to each point of the chromatogram and the amount of selenium in each chromatographic peak can be calculated using suitable software.

The use of enriched stable isotopes as metabolic tracers with an ICP-MS detector has been extended rapidly in the last years, especially in human nutrition studies. Selenium isotopically enriched species has also been applied to discriminate between endogenous and supplemented selenium in lactating rats. Isotope pattern deconvolution (IPD) quantitative data of endogenous and exogenous essential (or toxic) elements has been used to

discriminate the fate of endogenous and supplemented selenium and their catabolism species in rat serum and urine, by using ICP-MS equipped with a collision/reaction cell coupled to HPLC. In this case, two different enriched isotopes are necessary, a metabolic tracer ($^{77}$Se) and a quantitation tracer ($^{74}$Se) (González-Iglesias *et al.*, 2009).

### 6.4.4 Speciation Methods to Evaluate Selenium Status in Human

Some forms of dietary Se are beneficial for human health, reducing the risk for diseases such as cancer. Several chromatographic methods have been proposed for their study, mainly based on size exclusion chromatography (Palacios *et al.*, 2006) (SEC), anion-exchange chromatography (Hinojosa-Reyes *et al.*, 2003) (AEC) and affinity chromatography (Hinojosa-Reyes *et al.*, 2003) (AFC). SEC does not provide precise quantitative results for selenoproteins because the low chromatographic resolution that provokes overlapping between high-abundance selenium-containing proteins (Palacios *et al.*, 2006). On the other hand, AEC provides good analyte recovery, although chromatographic resolution is not acceptable either (Hinojosa-Reyes *et al.*, 2003). Finally, when AFC is used, the weakly retained eGPx is eluted beside nontarget components present in the matrix, which cause difficulties for the accurate quantification of the different selenium species that usually are quantified together (Hinojosa-Reyes *et al.*, 2003). Moreover, the high concentration of $Cl^-$ and $Br^-$ in biological fluids, such as plasma and serum (~3.5 g $L^{-1}$ and ~3.5 mg $L^{-1}$, respectively) (Jitaru *et al.*, 2010) should be considered, which coelute with eGPx and Se metabolites with this procedure. To avoid this drawback AEC has been recently online coupled to AFC for the analysis of selenium-containing proteins alleviating the spectral interferences of $Cl^-$ and $Br^-$, and making possible the use of ICP-ORS-MS (Jitaru *et al.*, 2008).

This analytical approach has been improved using species-unspecific isotope dilution (SUID)-ICP-ORS-qMS online coupled to 2D/SEC-AF-HPLC and 3D/SEC-AF-AEC-HPLC, which involve the use of five columns in one run with the aid of column-switching valves. Using this chromatographic arrangement, the spectral interference produced by bromide and chloride is removed and the total chromatographic runtime is less than 35 min. Consequently, a reliable speciation method for the analysis of eGPx, SeP, SeAlb and inorganic selenium compounds has been obtained for the first time (Figure 6.3) (García-Sevillano *et al.*, 2013).

## 6.5 Selected Cases Studies

### 6.5.1 Selenoproteins in Meat

The effect of organic selenium was investigated in chicken (*Gallus gallus*, broilers) studying changes in the expression of catalase (CAT) and phospholipid hydroperoxidase 4 (Se-GPx4) genes. This study showed that liver GPx4 mRNA levels could be down regulated by an excess of Se (Zoidis *et al.*, 2010).

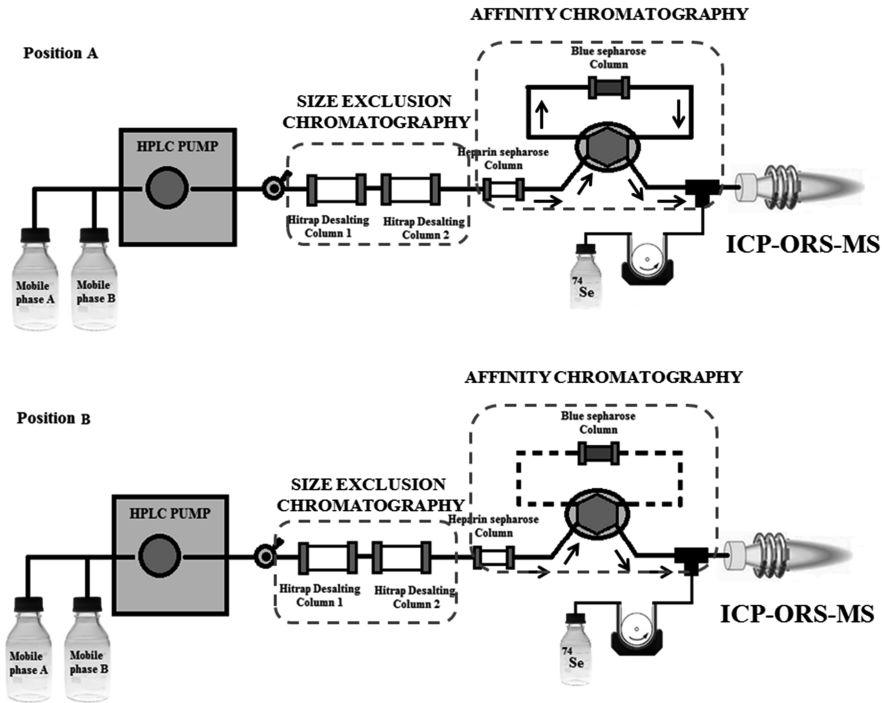



**Figure 6.3** Chromatographic arrangement used for selenoproteins and selenometabolites speciation in human serum based on an online multidimensional approach using 2D/SEC-AF-SUID-ICP-ORS-qMS.

### 6.5.2 Selenoproteins in Seafood

Selenium is an essential element for fish, since it is a component of several antioxidant enzymes as glutathione peroxidase. Fish can accumulate selenium directly from the aquatic environment by the epidermis, but the main incorporation pathway is by feeding zoo- and phytoplankton through the food chain. Recent studies in carps (*Carassius auratus gibelio*), fed with inorganic and organic selenium, as selenite and selenomethionine, respectively, have shown the beneficial effect of selenium in animals grown, the increase of glutathione peroxides activity and the total selenium concentration accumulated into the muscle (Wang *et al.*, 2007).

In another study, Se species present in water-soluble fractions of proteins from lyophilized biological samples, such as fish (tuna and trout), shellfish (krill, oyster and mussel), vegetal tissues (white clover and wheat flour) and selenized yeast were evaluated. The water-soluble fractions obtained with and without 4% (w/v) sodium dodecyl sulfate were analyzed by SEC-ICP-MS and UV spectrophotometers (Moreno *et al.*, 2004). Two different columns with effective separation ranges between 300 and 1 kDa were used. The enzymatic digests of both water-soluble fractions and nonsoluble residues were

analyzed by CEC-ICP-MS. The presence of high molecular weight selenoproteins (150–50 kDa) in the samples studied, except for fish and white clover with proteins <30 kDa, was demonstrated, and low molecular weight (<5 kDa) compounds were also found. The information obtained from the SEC-UV and SEC-ICP-MS chromatograms relating to fractions with high selenium to protein concentration ratios was very useful. These protein fractions could be suitable for further purification studies focused on amino acid sequence determination (Moreno *et al.*, 2004).

### 6.5.3 Selenoproteins in Milk

Bovine milk contains many nutrients necessary to meet the requirements of the newborn calf, including necessary trace elements such as selenium, zinc and copper, which are contained in proteins. In bovine milk GPx3 is the only identified selenoprotein so far, but many other protein-associated trace elements participate in the defense against oxidation and thereby maintain the quality of milk.

The coupling SEC-ICP-MS has been used to obtain the selenium–biomolecule profile in bovine whey and plasma, and consequently to study the effects of selenium supplementation on the distribution of selenium in these fluids (Hoac *et al.*, 2007). Fractionation of bovine whey by SEC-ICP-MS resulted in three main selenium fractions, associated to β-lactoglobulin, α-lactalbumin and selenomethionine or selenium compounds, equivalent to two-thirds of the selenium presents in the two protein fractions. Using this approach the selenium content and selenium profiles in milk and whey were compared (Hoac *et al.*, 2007). Using the same approach, bovine blood plasma was separated into six major selenium peaks with apparent molecular weights of >600, 195, 66, 11 and <2 kDa (two peaks). In addition, it was observed a 66 kDa peak and other less than 2 kDa peaks coeluting with bovine serum albumin and selenomethionine, respectively. A peak at 195 kDa can be related to selenoprotein P, but some SelP might also be in the void volume peak, and a peak at 11 kDa can not be related with any known selenium compound. The albumin fraction contributed approximately to 30% of the selenium in the sample.

In another experiment, the effect of selenium used as dietary supplement in yogurt has been evaluated. For this purpose, different concentrations of inorganic Se (ranging from 0.2 to 5000 μg per g) have been added to milk before the fermentation process. Biotransformation of inorganic Se into organic species has been carefully evaluated by IE, RP, or SEC, coupled to ICP-MS. The results showed that yogurt fermentation in the presence of up to 2 μg per g of Se(IV) produces a complete incorporation of this element into proteins, as has been demonstrated applying a dialysis procedure. Analysis by SEC-ICP-MS showed that most of the Se molecules have a molecular mass in the range of 30–70 kDa. Species determination after enzymatic hydrolysis has allowed the identification of Se-cystine using two different chromatographic systems (Alzate *et al.*, 2007).

### 6.5.4 Selenoproteins in Vegetables

The ability of several plants to accumulate and transform inorganic forms of selenium into bioactive organic compounds has important implications for human nutrition and health. Se-enriched *Allium* group vegetables such as garlic, onion and ramps have been the subject of several studies in the recent years. Recently, Goenaga *et al.* reported for the first time, the application of species-specific double-isotope dilution analysis by LC-ICP-MS to the accurate quantification of glutamylselenomethylselenocysteine in garlic sample extracts (Goenaga-Infante *et al.*, 2005).

The application of LA-ICP-MS proved to be a useful tool for the analysis of selenium-containing proteins in sunflower and allowed the identification of this element in a single protein spot after sample fractionation by gel electrophoresis. The study considers a method for the identification of selenium-containing proteins in an extract of sunflower leaves, which is based on the separation of the proteins by two-dimensional gel electrophoresis, followed by detection of selenium *via* laser-ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). In this work, selenium was identified in 9.6% of the analyzed spots, indicating its random incorporation into the primary structure of the proteins (Oseas da Silva and Zezzi Arruda, 2012).

On the other hand, the high content of selenium in Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) makes this seed a healthy food suitable as antifree-radical protector. Selenium was found to be distributed into the different nut protein fractions. The water-extracted fraction, which represented 17.7% of the nut protein, was the richest in selenium with 153 ppm. Analysis by HPLC-MS showed that selenium was linked by a covalent bond to two amino acids, selenomethionine and selenocystine. The selenomethionine represented a little less than 1% of the total amount of methionine. Extraction of proteins in three steps, water, salt solution, and NaOH solution, led to obtaining three protein families: albumin, globulin, and glutelin. The albumin family contained the most important part of selenium (153 ppm) and represented 17.7 g for 100 g of nut. The presence of glutelins was also remarkable, with 56 ppm of selenium and 3 g of proteins per 100 g of nut, similarly to globulins, with 63 ppm of selenium and 6 g of protein per 100 g of nut (Chunhieng *et al.*, 2004).

### 6.5.5 Selenoproteins in Food Supplements

#### *6.5.5.1 Yeast*

Yeast grown in selenium-rich media is the most popular supplement of organic Se for human and animals. Particular attention has been paid to sample preparation with regard to the fractionation of selenium into different classes of chemical species, the high-resolution fractionation of selenium from yeast water extracts by SEC and the characterization of

water-soluble protein fraction by MALDI followed by TOF-MS and ESI-Q-TOF-MS. Selenium-specific ICP-MS detection allows molecular mass spectrometry to be focused on the selenium-containing fractions and is crucial for a successful analysis (Ruiz-Encinar *et al.*, 2003).

A proteomics approach based on 2D-GE followed by HPLC-electrospray Orbitrap MS/MS was developed to investigate the replacement and the degree of the Se/S substitution in methionine and cysteine in Se-rich yeast (Bierla *et al.*, 2013). In this work, capillary HPLC-inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), employed in parallel to cap HPLC-ESI MS, indicated the virtual independence of the ESI-MS response of the peptide structure, and hence, the use of ESI-MS data to determine the SeCys/Cys and SeMet/Met substitution ratios. These ratios were determined in a large number of peptides resulting from the tryptic digestion of 19 Se-containing proteins, which were traced in the gel by LA-ICP MS imaging. The average Se/S substitution in methionine was 42.9 ± 3.5 and was protein dependent with ratios ranging from 5 to 160 for individual peptides. The substitution of sulfur in cysteine (14.1 ± 4.8%) in the cysteine-containing peptides was relatively similar (ratios from 9 to 23). Taking into account the cysteine/methionine average ratio (2:1) in the yeast protein fraction, the study concluded that 10–15% of selenium present in Se-enriched yeast is in the form of selenocysteine (Bierla *et al.*, 2013).

### *6.5.5.2 Rice*

The accumulation of selenium (Se) in protein fractions of albumin, globulin, prolamin and glutelin extracted from Se-enriched brown rice was studied, and the molecular weight distribution of Se-containing proteins established. In this study, the amount of total Se (T-Se) and protein-bound Se (PBSe) in brown rice was significantly increased after germination with 10–60 μmol $L^{-1}$ of sodium selenite. Except for prolamin, the amount of all the other three protein fractions decreased significantly with the increase of germination time. Low Se concentrations had promoting effects on degradation of albumin and globulin, while no significant effects were observed on prolamin and glutelin. The accumulation of T-Se and PB-Se were in the order albumin > glutelin > globulin > prolamin. SDS-PAGE analysis showed that Se was distributed in all the proteins with molecular weights from 13.6 to 121.4 kDa; however, 84.34% of the Se was present in proteins with molecular weights less than 36.3 kDa (Liu *et al.*, 2011).

Additionally, selenium distribution in Se-enriched rice and optimization of extraction for Se-containing proteins were studied by other authors (Fang *et al.*, 2010). This work was complemented by Se-availability studies in the Se-containing protein product simulating an *in vitro* gastrointestinal digestion. The results showed that Se was predominantly present as organic Se, whereas inorganic Se comprised only 2.85% of the total Se. The glutelin fraction contained the largest amount of Se, approximately 31.3% of the total Se in the rice gain. This rice protein product with high molecular

weight Se-containing protein can readily be digested to low molecular weight peptides including selenomethionine (52.3% of the total Se in the protein extract) (Fang *et al.*, 2010).

### *6.5.5.3 Wheat*

A method has been developed for a rapid and precise location of selenium-containing proteins in large 2D-GE of wheat. The sample was divided into four aliquots that were analyzed in parallel by 1D isoelectric focusing electrophoresis (IEF)-LA-ICP-MS, 1D-SDS PAGE-LA-ICP-MS, and, in duplicate, by 2D IEF-PAGE. On the basis of 1D electropherograms, areas supposed to contain the largest concentrations of Se were subjected to LA-ICP-MS imaging to locate precisely the position of Se-containing proteins that were then identified in parallel from 2D gel by ESI-Orbitrap-MS/MS. The method was applied to the identification and semiquantitative determination of selenium-storage proteins in wheat. MS evidence is presented for the Se–S substitution in plants not only in methionine but also in cysteine (Bianga *et al.*, 2013).

### *6.5.5.4 Mushroom*

Using various chromatographic techniques (size exclusion, anion exchange, and cation exchange) combined with several detectors (neutron activation analysis and atomic fluorescence spectrometry); an attempt was made to characterize selenium compounds in some edible, selenium-accumulating mushrooms (*Albatrellus pes-caprae* and *Boletus edulis*). The mushrooms contained mostly low molecular weight (6 kDa) selenium compounds. After proteolysis, only a small fraction of the extractable selenium could be identified as selenite (3.0–9.2%, *Albatrellus pes-caprae*), selenocystine (minor, *Albatrellus pes-caprae*; 7.5%, *Boletus edulis*), or selenomethionine (1.0%, *Boletus edulis*), although most of the bulk has not been elucidated yet (Šlejkovec *et al.*, 2000).

In the same way, selenium species from Se-containing proteins in mushrooms (*Agaricus bisporus* and *Lentinula edodes*) were investigated with size-exclusion liquid chromatography coupled to UV and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Different protein extraction protocols were investigated. Presumably, protein-bound selenoamino acids were released using enzymes (proteinase K, protease XIV and trypsin). The selenium speciation of the proteolytic extract of water-soluble proteins fraction was carried out by using RP-ion-pairing-(IP)-HPLC coupled online to ICP-MS for selenium specific detection. The presence of selenocystine, selenomethionine, methylselenocysteine and inorganic selenium were established in both samples using retention time standards and standard additions to the sample. This investigation was aimed to study the selenium-containing proteins fraction in two different mushroom species (Gergely *et al.*, 2006).

## Summary Points

- Selenium and selenoproteins play a key role for basic functions of life ensuring human health.
- Current analytical strategies and techniques are necessary to characterize selenoproteins in foods.
- Hyphenated analytical techniques based on the coupling of chromatographic separation with inductively coupled plasma spectrometry (ICP-MS) followed by organic mass spectrometry are basic tools to identify and quantify selenium species and selenoproteins.
- Sample preparation is a crucial step for Se speciation in food, in which cell and tissues disaggregation, analyte extraction, protein disulfide bridges prevention and proteases inhibition are key points of these treatments.
- Specific sample-preparation procedures based on enzymatic extraction, protein precipitation, ultrafiltration and sonication have been recently proposed.
- Selenoproteins analysis based on these analytical techniques are crucial for different types of food, such as meat, seafood, milk, vegetables and food supplements (yeast, rice, wheat, mushroom, and others).

## Key Facts of Selenium in Foods

1. Selenium is an essential element for human health involved in antioxidant defense, thyroid homeostasis and regulation of redox status, preventing cancer risk and thyroid disorders among others diseases.
2. Selenium is a potent protective agent for neurons as well as for skeletal and cardiac muscles.
3. The main source of selenium for human is diet. The chemical form of this element is crucial to assure its action, selenoproteins playing key roles in the basic functions of life.
4. Identification of selenoproteins and selenoaminoacids has to be performed in daily foods such as meat, seafood, milk, vegetables and food supplements.

## Key Facts of Selenium Analysis in Foods

1. Selenium-containing proteins and selenoaminoacids analysis require instrumental coupling of chromatographic instruments with sensitive atomic devices (especially ICP-MS).
2. Molecular mass spectrometry allows identification of unknown selenium biomolecules.
3. Sample preparation, including selenium species preservation until analysis, species extraction from food matrices and sample extracts cleanup, is a very critical step in selenium speciation.

4. Quantification of selenoproteins in complex samples can be performed using isotope dilution analysis (IDA) using the multi-isotopic capability of ICP-MS.
5. Analysis of selenoproteins and selenoaminoacids in human serum (containing significant amounts of $Br^-$ and $Cl^-$) to determine selenium status in this fluid can be performed by online combination of multichromatographic couplings, which involve up to five columns and ICP-MS detection.

## Definitions of Words and Terms

**Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS).** This is a type of mass spectrometry able to detect metals and several nonmetals at concentrations as low as one part in $10^{12}$ (part per trillion).
**Laser ablation (LA).** This is a form of direct introduction of elements from solid samples in the ICP-MS. LA can be used for analysis of single spots from 2D-gel electrophoresis, tissue samples from food, animals, and mineral or archeological samples, *etc*.
**Speciation analysis.** Speciation analysis is the identification and quantification of the different chemical forms of an element in a sample.
**Isotopic dilution analysis (IDA).** IDA is a quantification method of analysis based on the use of an isotopically enriched form of the analyte directly added to the sample and the measure isotopes ratio signals.
**Mass spectrometry (MS).** This is an analytical technique that produces spectra of the masses of atoms or molecules from a sample or material.
**Two dimensional-gel electrophoresis (2D-GE).** 2D-GE is a form of gel electrophoresis commonly used to analyze proteins using a combination of separation by isoelectric point followed by a second perpendicular separation in the gel plate by the molecular mass.
**Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI).** MALDI this is a soft ionization technique used in mass spectrometry, allowing the analysis of large molecules. Ionization energy is transferred from laser source to molecules by an excess of matrix with UV absorption properties in which the analytes are embedded. MALDI produces few multiply charged ions.
**Electrospray ionization (ESI).** This is another soft ionization technique used in mass spectrometry producing multiply charged ions very suitable for the analysis of proteins and their associated polypeptide fragments.

## List of Abbreviations

| | |
|---|---|
| **AF** | Affinity chromatography |
| **CE** | Capillary electrophoresis |
| **CEC** | Capillary electrokinetic chromatography |

| | |
|---|---|
| **CZE** | Capillary zone electrophoresis |
| **CHAPS** | 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate |
| **CRMs** | Certified reference materials |
| **Cys** | Cystine |
| **DIMS** | Direct infusion mass spectrometry |
| **DTE** | Dithioerythritol |
| **DTT** | Dithiothreitol |
| **eGPx** | Extracellular glutathione peroxidase |
| **ESI** | Electrospray ionization |
| **GE** | Gel electrophoresis |
| **GPE** | Gel permeation electrophoresis |
| **GPx** | Glutathione peroxidase |
| **GSH** | Reduced glutathione |
| **HILIC** | Hydrophilic interaction liquid chromatography |
| **HPLC** | High-performance liquid chromatography |
| **ICP-MS** | Inductively coupled plasma-mass spectrometry |
| **ID** | Iodothyronine deiodinase |
| **IDA** | Isotopic dilution analysis |
| **IEC** | Ionic exchange chromatography |
| **IPD** | Isotope pattern deconvolution |
| **IT** | Ion trap |
| **LA** | Laser ablation |
| **LC-MS/MS** | Liquid chromatography-tandem mass spectrometry |
| **MALDI-TOF** | Matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight |
| **MC** | Multicollector |
| **ORS** | Octopole reaction systems |
| **PMSF** | Phenylmethanesulfonyl fluoride |
| **Q** | Quadrupole |
| **QTrap** | Quadrupole trap |
| **RP** | Reverse phase |
| **SDS-PAGE** | Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis |
| **SeAlb** | Selenoalbumin |
| **SEC** | Size-exclusion chromatography |
| **SelP** | Selenoprotein P |
| **SeMet** | Selenomethionine |
| **SF** | Sector field |
| **SeCys** | Selenocysteine |
| **SPE** | Solid-phase extraction |
| **SSID** | Species-specific isotopic dilution |
| **SUID** | Species-unspecific isotopic dilution |
| **TBP** | Tributylphosphine |
| **TCA** | Tricarboxylic acid cycle |
| **TCEP** | Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride |
| **TrxR** | Thioredoxin reductase |

## References

Alzate, A., Cañas, B., Pérez-Munguía, S., Hernández-Mendoza, H., Pérez-Conde, C., Gutiérrez, A. M. and Cámara, C., 2007. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 9776.

Bettmer, J., Montes Bayón, M., Ruiz Encinar, J., Fernández Sánchez, M. L., Fernández de la Campa, M. R. and Sanz Medel, A., 2009. *Journal of Proteomics*. 72: 989.

Bianga, J., Govasmark, E. and Szpunar, J., 2013. *Analytical Chemistry*. 85: 2037.

Bierla, K., Szpunar, J. and Lobinski, R., 2008. *Analytica Chimica Acta*. 624: 195.

Bierla, K., Bianga, J., Ouerdane, L., Szpunar, J., Yiannikouris, A. and Lobinski, R., 2013. *Journal of Proteomics*. 87: 26.

Chunhieng, T., Petritis, K., Elfakir, C., Brochier, J., Goli, T. and Montet, D., 2004. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 4318.

Fan, T. W., Pruskowski, E. and Shuttewoth, S., 2002. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 17: 1621.

Fang, Y., Catron, B., Zhang, Y., Zhao, L., Caruso, J. A. and Hu, Q., 2010. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58: 9731.

García-Sevillano, M. A., González-Fernández, M., Jara-Biedma, R., García-Barrera, T., López-Barea, J., Pueyo, C. and Gómez-Ariza, J. L., 2012. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 404: 1967.

García-Sevillano, M. A., García-Barrera, T. and Gómez-Ariza, J. L., 2013. *Journal of Chromatography A*. 1318: 171.

Gergely, V., Kubachka, K. M., Mounicou, S., Fodor, P. and Caruso, J. A., 2006. *Journal of Chromatography A*. 1101: 94.

Goenaga-Infante, H., Van Campenhout, K., Blustand, R. and Adams, F. C., 2002. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 17: 79.

Goenaga-Infante, H., O'Connor, G., Rayman, M., Wahlen, R., Spallholz, J. E., Hearn, J. and Catterick, T., 2005. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 20: 864.

González-Iglesias, H., Fernández-Sánchez, M. L., Rodríguez-Castrillón, J. A., García-Alonso, J. I., López-Sastre, J. and Sanz-Medel, A., 2009. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 24: 460.

Hinojosa-Reyes, L., Marchante-Gayón, J. M., García-Alonso, J. I. and Sanz-Medel, A., 2003. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 18: 1210.

Hoac, T., Lundh, T., Purup, S., Onning, G., Sejrsen, K. and Akesson, B., 2007. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 4237.

Jayasinghe, S. B. and Caruso, J. A., 2011. *International Journal of Mass Spectrometry*. 307: 16.

Jitaru, P., Prete, M., Cozzi, G., Turetta, C., Cairns, W., Seraglia, R., Traldi, P., Cecson, P. and Barbante, C., 2008. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 23: 402.

Jitaru, P., Cozzi, G., Seraglia, R., Traldi, P., Cescon, P. and Barbante, C., 2010. *Analytical Methods*. 2: 1382.

Larsen, E. H., Lobinski, R., Burger-Mayer, K., Hansen, M., Ruziuk, R., Mazurowska, L., *et al.*, 2006. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 385: 1098.

Liu, K., Chen, F., Zhao, Y., Gu, Z. and Yang, H., 2011. *Food Chemistry*. 127: 1526.

Mesko, M. F., Hartwig, C. A., Bizzi, C. A., Pereira, J. S. F., Mello, P. A. and Flores, E. M. M., 2011. *International Journal of Mass Spectrometry*. 307: 123.

Mester, Z. and Sturgeon, R. (ed.), 2003. *Sample Preparation for Trace Element Analysis*. Elsevier, Amsterdam.

Montes-Bayón, M., Yanes, E. G., Leon, C. P., Jayasimhulu, K., Stalcup, A., Shann, J. and Caruso, J. A., 2002. *Analytical Chemistry*. 74: 107.

Moreno, P., Quijano, M. A., Gutiérrez, A. M., Pérez-Conde, M. C. and Cámara, C., 2004. *Analytica Chimica Acta*. 524: 315.

Mounicou, S., Dernovics, M., Bierla, K. and Szpunar, J., 2009. *Talanta*. 77: 1877.

Nuevo-Ordoñez, Y., Montes-Bayón, M., Blanco-Gonzalez, E. and Sanz-Medel, A., 2010. *Analytical Chemistry*. 82: 2387.

Oseas da Silva, M. A. and Zezzi Arruda, M. A., 2012. *Microchimica Acta*. 176: 131.

Palacios, O., Ruiz Encinar, J., Bertin, G. and Lobinski, R., 2005. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 383: 516.

Palacios, O., Encinar, J. R., Schaumlöffel, D. and Lobinski, R., 2006. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 384: 1276.

Pröfrock, D. and Prange, A., 2009. *Journal of Chromatography A*. 1216: 6706.

Rodríguez-González, P., Marchante-Gayón, J. M., García Alonso, J. I. and Sanz-Medel, A., 2005. *Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy*. 60: 151.

Ruiz-Encinar, J., Śliwka-Kaszyńska, M., Połatajko, A., Vacchina, V. and Szpunar, J., 2003. *Analytica Chimica Acta*. 500: 171.

Ruiz-Encinar, J., García-Alonso, J. I., Sanz-Medel, A., Main, S. and Turner, P. J., 2001. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 16: 315.

Sariego-Muñíz, C., Marchante-Gayón, J. M., García-Alonso, J. I. and Sanz-Medel, A., 2001. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 16: 587.

Šlejkovec, Z., van Elteren, J. T., Woroniecka, U. D., Kroon, K. J., Falnoga, I. and Byrne, A. R., 2000. *Biological Trace Element Research*. 75: 139.

Szpunar, J., 2005. *Analyst*. 130: 442.

Tastet, L., Schaumloffel, D., Bouyssiere, B. and Lobinski, R., 2008. *Talanta*. 75: 1140.

Vanhaecke, F., Wannemacker, G., Moens, L., Dams, R., Latcoczy, C., Prohaska, T. and Stingerer, G., 1998. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 13: 567.

Wang, Y., Han, J., Li, W. and Xu, Z., 2007. *Animal Feed Science and Technology*. 134: 243.

Wrobel, K., Wrobel, K., Kannamukarath, S. S., Caruso, J. A., Wysocka, I. A., Bulska, E., Swiatek, J. and Wierzbicka, M., 2004. *Food Chemistry*. 86: 617.

Zoidis, E., Pappas, A. C., Georgiou, C. A., Komaitis, E. and Feggeros, K., 2010. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry & Molecular Biology*. 155: 294.

# Metallomics and Metabolomics of Plants Under Environmental Stress Caused by Metals

**J. L. Gómez Ariza, T. García-Barrera, M. A. García-Sevillano, M. González-Fernández and V. Gómez-Jacinto**

**Abstract** The role of metals in living organisms is considered on the basis of abundance of metalloproteins and metallometabolites and the occurrence of environmental hazards caused by metals lixiviation and mobility from soils, industrial and mining wastes, which contribute to plant uptake, and can finally get to man from seed and vegetal foods. Intake by plants of toxic metals such as mercury, arsenic, and cadmium, and the transformation that suffers in the organism, as well as the alteration of metabolism represents a valuable appraisal of organism's behavior under the presence of deleterious metals as well as their traffic along the components of cell and tissues, and the interaction with essential elements. Recent analytical approaches to obtain massive information from complex living organisms, such as metallomics to characterize the entirety metal biomolecules in an organism (metallome) and metabolomics to decipher the whole molecules with mass less than 1,000 Da, are the new generation of analytical techniques for assessment plant and other organisms' metal stress, as well as the study of metal pollution remediation driven by plants (hyperaccumulators), preparation of plant-based essential enriched food, and other useful applications. Metallomics techniques are based on hyphenated analytical units combining chromatographic components, high sensitivity element detectors (mainly ICP-MS) for metal species detection, and tandem mass spectrometry for chemical species

J. L. Gómez Ariza (✉) · T. García-Barrera · M. A. García-Sevillano · M.González-Fernández · V. Gómez-Jacinto
Department of Chemistry and CC.MM, Faculty of Experimental Science, University of Huelva, Campus de El Carmen, 21007 Huelva, Spain
e-mail: ariza@dqcm.uhu.es

J. L. Gómez Ariza · T. García-Barrera · M. A. García-Sevillano · M.González-Fernández · V. Gómez-Jacinto
Campus of Excellence International ceiA3, University of Huelva, Huelva, Spain

J. L. Gómez Ariza · T. García-Barrera · M. A. García-Sevillano · M.González-Fernández · V. Gómez-Jacinto
Research Center of Health and Environment (CYSMA), University of Huelva, Campus de El Carmen, 21007 Huelva, Spain

D. K. Gupta et al. (eds.), *Heavy Metal Stress in Plants*,
DOI: 10.1007/978-3-642-38469-1_10, © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

identification, integrating a three-dimensional analytical platform. Metabolomics mainly uses high resolution mass spectrometry as QqQ-TOF-MS or Orbitrap. Therefore, Integration of these omics provides results with high-added value representing a new angle to study overall response of plants under the action of metals. A great variety of examples can be pointed out in relation to plant exposure experiments to metals, use of plant as bioindicator for environmental monitoring of metal pollution, preparation of essential elements of functional foods based on microalgae under biotechnological production, behavior of heavy metal hyperaccumulator plants, and many other cases.

**Keywords** Plant metallomics · Plant metabolomics · Toxic metals · Metals interactions · Environmental stress

## Contents

1 Introduction ..... 174
2 Metal Toxicity in Plants ..... 176
2.1 Mercury ..... 177
2.2 Cadmium ..... 178
2.3 Arsenic ..... 180
2.4 Selenium ..... 180
3 Metal Interactions in Plants ..... 181
3.1 Selenium–Arsenic Effects on Plants ..... 181
3.2 Sulfur and Selenium Antagonism ..... 182
4 Metallomic and Metabolomic Techniques for Study of Plants Under Metal Stress ..... 182
4.1 Collection of Plants ..... 183
4.2 Metal Chemical Speciation and Metallomics in Plant ..... 184
4.3 Metabolomics in Plant ..... 189
5 Case Studies of Plant Under Metal Stress ..... 191
5.1 Experiments Exposure ..... 191
5.2 Plants as Bioindicators in Environmental Monitoring of Metal Pollution ..... 193
5.3 Algae as Functional Food ..... 194
6 Concluding Remarks ..... 195
References ..... 196

## 1 Introduction

Metals serve essential roles for living organisms and their singularity against other metabolites provides them a special value as unique interphase between chemistry and biology. The availability of these elements, and their unique chemistries, has served as a driving force for the evolution of life on Earth (Thiele and Gitlin 2008). This fact may explain the existence of extremophile organisms such as red alga *Galdieria sulphuraria* and heavy metals hyperaccumulating plants (Rascio and

Navari-lzzo 2011) and the organism diversity under different geochemical conditions (Raymond and Segre 2006).

A systematic view of transition metal metabolism in living organisms requires understanding of how organisms sense, adapt, and use these metals (Thiele and Gitlin 2008), as well as their traffic and interactions in cells and tissues, considering transport by biological fluids and crossing biological barriers. Metal ions manifest their importance in far more than ~50 % of proteins discovered so far (Martinez-Fabregas et al. 2011) and metalloproteins represent ~30 % of proteins in known genomes (Lu 2010; Waldron and Robinson 2009). These biomolecules utilize the unique properties of metals in conjunction with the cellular macromolecular assembly to perform important life-sustaining processes (Waldron and Robinson 2009), supported on three basic mechanisms: affinity, allostery, and access (Waldron et al. 2009). Innumerable metal-responsive events, including elaborate switches in protein trafficking, are controlled by largely uncharted metal sensors, considering that metal-biomolecule interactions occur in cell native environments integrated by highly concentrated viscous solutions in a complex interplay with numerous other molecules (Gierasch and Rershenson 2009).

Metals are important components of minerals in the earth's crust, although those with technological importance such as Cu, Zn, rare earth metals, and others occur, generally, at low concentration. This fact has motivated historical development of mining activities and consequently metal pollution episodes, besides other sources such as industrial and urban activities that also contribute to anomalous metal presence in soils, waters, vegetation, and finally man. Some metals have damaging effects on plants and may become a health hazard to man and animals. As a consequence, it has been reported the progressive increase in global metal intake with an average of 213 kg per capita in 2008, an increase of about 2.8 times that in 1950 (Haferburg and Kothe 2010). In soils contaminated by metals, plant cover decreases and soil regeneration is generally slow, leading to erosion, change in soil composition, and as a consequence, ground and surface water contamination. The anomalous presence of toxic metals in soil affects fundamental microbiological-driven cycles of matter including decomposition and formation of organic matter (Nriagu 1996; Vivas et al. 2008). In addition, the relevant ecotoxicological risk caused by metals affects natural microbial populations, leading to disruption of vital ecological processes with important environmental consequences, such as increase in $N_2O$ greenhouse gas (Dickinson and Cicerone 1986) and global climate change (Soboley and Begonia 2008). Metal lixiviation and mobility from contaminated soils and mine wastes are strongly dependent on metal chemical forms and their linkage to mineral phases of soil, which affect the final presence of metal-species in soil runoff and waters, and finally plant uptake and metal accumulation in seeds used for feeding (Zhanga et al. 2011; Signes-Pastor et al. 2008). The current interest in assessing the presence of inorganic arsenic in rice and other cereals, as well as foods prepared from them (Sun et al. 2009; Cubbada et al. 2010), the study of soil phytoremediation plants, and the biotechnological production of plants and algae enriched in essential elements (Gomez-Jacinto et al. 2010; 2012a, b), show the importance of

metal-species and metal-biomolecules characterization in plants and plant-soil systems. Every metal and plant interacts in a specific way, which depends on several factors such as type of soil, growth conditions, and the presence of other ions. Therefore, metal uptake by plant can be related to all these intertwined processes and suitable analytical methodologies are necessary for their characterization on the basis of metal speciation and further characterization of unknown biomolecules bound to metals (metallomics) (Mounicou et al. 2009; Gomez-Ariza et al. 2005) as well as their consequences on plant metabolism (metabolomics) (Fiehn et al. 2000).

## 2 Metal Toxicity in Plants

Phytotoxic effects of heavy metals in plants have been checked that follow the order:

$$\text{Cd} > \text{Co} > \text{Hg} > \text{Mn} > \text{Pb} > \text{Cr}$$

The higher the concentration of heavy metal in the soil, the greater was the toxic effect on the plant (Ghani 2010). However, other elements are essential macronutrients such as nitrogen (N), potassium (K), calcium (Ca), magnesium (Mg), phosphorous (P), sulfur (S), and silicon (Si), or micronutrients chlorine (Cl), iron (Fe), boron (B), manganese (Mn), sodium (Na), zinc (Zn), copper (Cu), nickel (Ni), and molybdenum (Mo) (Del-Courso 2012), although they become toxic at high concentrations (Azevedo and Lea 2005). Another point is the dependence of metal toxicity with the oxidation state, e.g., Cr(VI) is the most toxic form of chromium, while Cr(III) is less toxic, less soluble, and predominantly bound to organic matter in soil and aquatic environments.

Essential trace elements such as Fe, Zn, Mn, and Cu act as cofactors of a variety of enzymes and proteins (Palmer and Guerinot 2009; Morrissey and Guerinot 2009), while toxic, nonessential, elements such as Cd, Pb, Cr, Hg, and As enter plants using the transporters involved in the essential nutrients uptake (Milner and Kochian 2008; Verbuggen et al. 2009). Once inside the cell, toxic/nonessential elements can displace and interfere with the function of essential metals. Therefore, organisms have acquired genetic and biochemical mechanisms to sense, transport, and maintain essential metals within a nontoxic physiological range (metal homeostasis) while detoxifying nonessential metals. Plants have evolved several mechanisms to prevent the toxic action of metals; these include reduction of uptake into the root cells by change in the kinetic properties of transporters and exudation of complexing agents into the rhizosphere. Once metals have entered the plants they induce the synthesis of phytochelatins (containing glutathione peptides) and proteins containing high percentage of cysteine (metallothioneins), which are able to bind to metal ions. Ultimately, the metals are stored in the vacuoles for plant protection. In addition, several well-known metabolic changes

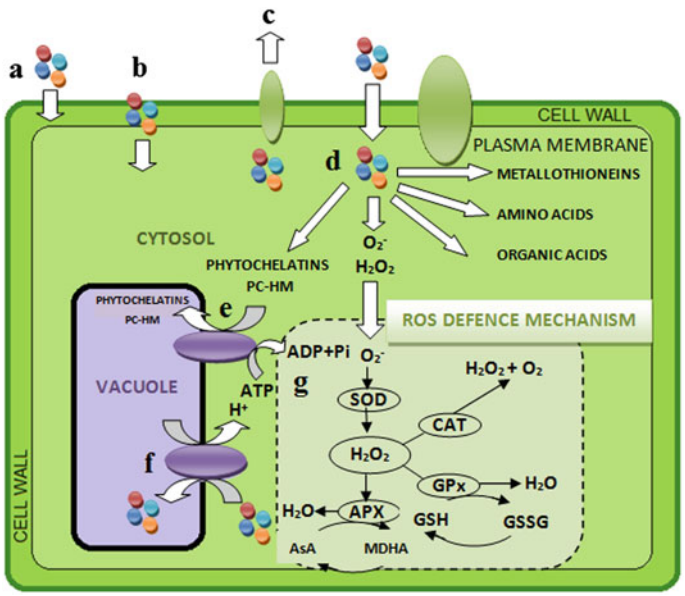



**Fig. 1** Response to heavy metal toxicity in higher plants: *a* metal ion binding to the cell wall and root exudates; *b* reduction of metal influx across the plasma membrane; *c* membrane efflux pumping into the apoplast; *d* metal chelation in the cytosol by ligands (phytochelatins and metallothioneins, organic acids, and amino acids; *e* transport of metal-ligand complexes through the tonoplast and accumulation in the vacuole; *f* sequestration in the vacuole by tonoplast transporters; *g* induction of ROS and oxidative stress defense mechanisms

are caused by the presence of unusual metals in plants cells, mainly the formation of reactive oxygen species (ROS), which trigger enzymatic and nonenzymatic defense mechanisms for ROS scavenging (Azevedo and Lea 2005), Fig. 1.

## *2.1 Mercury*

Mercury (Hg) pollution is a ubiquitous problem resulting both from natural events and anthropogenic activities. Hg is a unique metal due to its existence in different forms, e.g., HgS, $Hg^{2+}$, $Hg^0$, and methyl-Hg. However, in agricultural soil, ionic form ($Hg^{2+}$) is predominant (Han et al. 2006). Hg-contaminated soil is believed to contribute to human health risks and major environmental problems. The dynamics between the amount of Hg existing in soil and uptake by plants is not linear and depends on several variables (e.g., cation-exchange capacity, soil pH, soil aeration, and plant species). The uptake can be reduced when the pH of soil is high and/or there is abundance of lime and salts (Patra and Sharma 2000; Patra et al. 2004). Another factor affecting the level of Hg accumulation in plant is Hg chemical species and plant variety (Lenka et al. 1992). In connection to this at least

45 plant families have hyperaccumulator plant species (Reeves and Baker 2000). Most of Hg accumulated in plants remains in roots, and only a small proportion can be translocated to the shoots (Wang 2004); from mercury trapped in roots about 80 % is bound to cell wall (Wang and Greger 2004). This can be explained because: (i) Hg ion is easy to interact with anionic compounds (e.g., sulfate, carbonate, and phosphate) and form insoluble precipitates, which limit symplastic mobility of $Hg^{2+}$, and (ii) Hg ion bound to root cell walls has high cationic exchange capacity (Chen et al. 2009). Possible mechanisms of mercury phytotoxicity can be explained by change in cell membrane permeability, reaction with sulfydryl (SH) groups, affinity to phosphate groups, replacement of essential ions, and ability to disrupt functions involving critical or nonprotected proteins (Patra et al. 2004; Patra and Sharma 2000). At the cellular level, Hg affects the antioxidant defense system, by interfering with the modulation of the nonenzymatic antioxidants glutathione (GSH) and nonprotein thiols (NPSH) and the enzymatic antioxidants superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), and glutathione reductase (GR) (Sparks 2005; Ortega-Villasante et al. 2005; Israr et al. 2006). Exposure to Hg can also inhibit photosynthesis, transpiration rate, water uptake, and chlorophyll synthesis. Both organic and inorganic Hgs have been showed to cause loss of potassium, magnesium, and manganese and accumulation of iron in the plant (Boening 2000). These metal losses explain the changes in cell membrane permeability that compromise its integrity. $Hg^{2+}$ is one of the forms of Hg that can affect the plasma membrane, which can explain the toxicity provoked in the aerial part of plants. However, other authors assert that damage in the roots explains the toxicity observed in the shoots.

## 2.2 Cadmium

Cadmium is toxic to plant cells at low concentrations, when leaf concentrations greater than 5–10 μg Cd $g^{-1}$ denote harmful effect to most plants (White and Brown 2010). The uptake of Cd from the soil seems to occur mainly via $Ca^{2+}$, $Fe^{2+}$, $Mn^{2+}$, and $Zn^{2+}$ transporters. Cadmium accumulates in the topsoil, in close relationship with the organic fraction; its availability for plants is greater in acid soils (Tudoreanu and Phillips 2004; Kirkham 2006) and its solubility increases by root exudates. It occurs in the soil solution predominantly as $Cd^{2+}$, but also as Cd-chelates (Tudoreanu and Phillips 2004; Kirkham 2006; Verbruggen et al. 2009). Low $Cd^{2+}$ concentrations in the soil solution in combination with a low diffusion coefficient for $Cd^{2+}$ in aqueous solution suggests that transpiration-driven mass flow of the soil solution will dominate in delivering of $Cd^{2+}$ to plant roots (Lux et al. 2011). The rates of metal accumulation in plant cells are mainly governed by physiological requirements. As the first barrier blocks heavy metal entrance into

cells, the cell wall is identified as a pivotal site for heavy metal storage in plants, and deposition in the cell wall is considered a crucial mechanism for heavy metal tolerance (Vazquez et al. 2006). Several examples may be mentioned: (a) the study of Cd localization in *F. angustifolia* under electron microscope showed that copper and cadmium only accumulated in the root tip section, cooper mostly in the cell walls of the cortex layer and cadmium in the inner compartments of the cortex cells; therefore, in this specie root cap plays a protecting role against metal uptake (Arduini et al. 1994); (b) in maize and pea, Cd accumulated at similar rates, but in maize plants higher Cd levels were found with cell wall fraction and pea accumulated more Cd in the soluble fraction (Lozano-Rodriguez et al. 1997); (c) Van Belleghem et al. (2007) reported that in root cortex of *Arabidopsis thaliana*, Cd was associated with phosphorus in the apoplast and to sulfur in the symplast, suggesting phosphate and phytochelatin sequestration, respectively. These authors observed an extensive symplastic and apoplastic Cd sequestration in the root parenchyma, combined with retranslocation via phloem, which confirms the prevent strategy of *A. thaliana* against contamination; (d) in *A. wardii* Cd bioaccumulates in the roots with a factor >1 and traslocates with a factor <1, therefore, *A. wardii* is a potentially suitable species for phytostabilization for revaluing degraded areas (Zhang et al. 2012).

Cadmium concentrations are often (but not always) greater in roots than in shoots, suggesting that Cd transport to the xylem is restricted in most plants, and is lower in seeds, fruits, and tubers, for which it is supposed that Cd is not readily translocated in the phloem (Lux et al. 2011). However, it has also been hypothesized that Cd accumulation in developing fruits could occur via phloem-mediated transport, implicating a systemic diffusion of heavy metals into the plant body as it has been shown in Micro-Tom tomato roots after 75 days of growth, where Cd was mainly translocated to the upper parts of the plants, with high concentrations in the fruits (Gratao et al. 2008). Shoot Cd concentrations are determined largely by Cd entry to the root, sequestration within root vacuoles, translocation into the xylem and phloem, and dilution within the shoot through growth (Lux et al. 2011). Root-to-shoot Cd translocation in *Solanum torvum* was found to be lower than that in the eggplant *S. melongena*, but grafting *S. melongena* onto *S. torvum* rootstock could effectively reduce Cd concentration in eggplant fruits (Yamaguchi et al. 2011). Therefore, variation in Cd concentrations in grains depends partially on the ability of plants to control movement of Cd to seeds (Tanaka et al. 2007). For example, in rice, the concentration of Cd in grains is governed somewhat by its uptake and transport from roots to shoots, and to a greater extent, by the transport of Cd from shoots to grain. In a study performed by Liu et al. (2007), it was found that about 0.73 % of the total Cd taken up by six rice cultivars was transferred to the grain. Similarly, tobacco plants trend to translocate Cd quite efficiently to the leaves which makes tobacco smoke an important Cd source for smokers (Lugon-Moulin et al. 2004).

## 2.3 Arsenic

As (V) and As (III) are the more predominant phytoavailable forms of As in soil solution. The arsenic tolerance has been identified in a number of plant species (Meharg 1994; Sharples et al. 2000). Arsenate and phosphate are chemically similar and arsenate acts analogously to phosphate, thereby being transported into the cell via the phosphate transporters (Meharg and Macnair 1992). Both inorganic forms of As are highly toxic as As(V) interferes with phosphate metabolism (such as phosphorylation and ATP synthesis) and As(III) binds to vicinal sulfhydryl groups of proteins affecting their structures or catalytic function (Tripathi et al. 2007; Su et al. 2010).

Arsenate is readily reduced to As(III) in plant, which is detoxified by complexation with either thiol-rich peptides such as reduced glutathione (GSH) and phytochelatins (PCs) or vacuolar sequestration (Su et al. 2010) or a combination of both. The As also undergoes transformation within plant cells to other less phytotoxic As species (Meharg 1994). In phytoplankton and macro algae, As is converted to arsenite, dimethylarsinic acid (DMA), and monomethylarsonic acid (MMA). Such methylated forms of As are then metabolized to organophospholipids and arsenosugars (Phillips 1990). However, only in terrestrial plants the presence of arsenate and arsenite has been documented (Meharg 1994; Van den Broeck et al. 1998; Koch et al. 2000). In microalgae have been demonstrated the accumulation of As(V), with bioconcentration factors ranging from 200 to 4,000 (Maeda et al. 1985), which is very toxic for these organisms. The toxicity of inorganic forms of arsenic has been studied in *Chlorella sp*. and *Monoraphidium arcuatum*, which tolerate the presence of As(III), but only *Chlorella* sp. can survive in the presence of high levels of As(V) (Levy et al. 2005). The increasing concentration of phosphate in the medium enhances the resistance to arsenic due to a competition mechanism between the species for cellular uptake (Levy et al. 2005). At longer exposure times, As(III) is methylated to monomethylarsonic acid, dimethyl arsonic acid, trimethylated species, and also transformed into phosphate arsenoriboside (Levy et al. 2005; Murray et al. 2003).

## 2.4 Selenium

Selenium is an essential micronutrient for many animals, bacteria, and some green algae. The essentiality of Se as a micronutrient in land plants has not been conclusively demonstrated. Some plants have the ability not only to grow in the presence of elevated levels of selenium, but also to accumulate its species up to thousands of mg $kg^{-1}$ dry mass, without showing symptoms of toxicity and they could be applied for phytoremediation of polluted soil (Terry et al. 2000). On the other hand, the ability of several plants to accumulate and transform inorganic forms of selenium into bioactive organic compounds has important implications

for human nutrition and health (Ellis and Salt 2003; Zayed et al. 1998). A member of the Brassicaceae family, Indian mustard (*Brassica juncea*), is one of the most studied plants in terms of Se accumulation because of its fast-growing cycle and high biomass (Kahakachchi et al. 2004; Montes-Bayon et al. 2002; Mounicou et al. 2006). The resistance to excessive Se concentration has been related to the formation of organoselenium compounds that cannot be incorporated into proteins and also the ability of these plants to convert selenium into volatile species (Terry et al. 2000).

Selenium is taken up into plant roots from the soil solution predominantly as selenate, yet selenite and organic Se compounds are also taken up readily (Virpaksha et al. 1966). The rate and form of Se uptake depends on the concentration and chemical form of Se in the soil solution, the presence of sulfate and phosphate, and the soil pH, which compete with Se uptake (Hurd-Karrer 1937; Bell et al. 1992). One of the accumulation mechanisms for selenium tolerant plants is the formation of organic compounds of this element that cannot be incorporated into proteins, thereby avoiding toxicity. In plant Se (VI) is reduced to Se (IV), which in turn is reduced to selenide, involving reduced glutathione. The selenide is then transformed to selenoamino acids, such as SeCys and SeMet that are converted to Se-methylselenocysteine and $\gamma$-glutamyl-Se-methylselenocysteine. Some plants can take up high quantities of Se from soil and then transform it through several biochemical steps into volatile species, mainly dimethylselenide, in a phytovolatilization process. In microalgae, selenium can be incorporated into enzymes in the form of selenoamino acids, especially, SeMet, as functional groups of glutathione peroxidase, which can eliminate hydrogen peroxide preventing the damage of cellular membranes (Mattoo and Edelman 1987). However, the excess of selenium in the culture medium produces toxic effects, especially in relation to inorganic sulfur assimilation mechanisms that cause damage in the growth.

## 3 Metal Interactions in Plants

### *3.1 Selenium–Arsenic Effects on Plants*

It is expected that both Se and As coexist in contaminated soils and may affect the function of plants antagonistically or synergistically. In plants, several experiments conclude that selenite co-exposure prevents against arsenate toxicity. The identification of one of these peptides as Se-cysteinylserine glutathione in *Thunbergia alata* suggests that selenium might compete with arsenic for free-SH groups, present in phytochelatins (Bluemlein et al. 2009). However, the arsenic-treated algae *Desmodesmus quadricauda* supplemented with selenium exhibit impaired growth and greater damage to membranes, evidenced by marked elevation of the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) content, indicating a synergistic interaction between these elements. Thus, possible explanation for the synergistic

interaction between arsenic and selenium observed in *D. quadricauda* is that the elevated uptake of both elements upon their interaction and impaired antioxidant system add toxicity to these elements.

### *3.2 Sulfur and Selenium Antagonism*

Sulfur is in the same periodic group as selenium; they are chalcogen elements, and therefore they are chemically very similar. For this reason, selenate can be metabolized by several enzymes that reduce sulfate when it is supplied to the plant, whether under toxic or nontoxic conditions (Shrift 1954). Therefore, selenium in the form of selenate appears to involve an interference with the normal sulfur metabolism of plants. In addition, sulfate and other sulfur metabolites as sulfur amino acids can antagonize selenate toxicity through a competitive mechanism in green plants (Hurd-Karrer 1938) *Desulfovibrio desulfuricans* (Post-Gate 1949), yeast (Post-Gate 1952) and microalgae (Fels and Cheldelin 1949).

Analysis of *Chlorella vulgaris* cells for selenium indicated that sulfate prevents the absorption of its selenium analog and that they compete during the absorption process into the cell. Similar relations have been found between L-methionine and its analog selenium-methionine (Shrift 1954). The results suggest that seleno-aminoacid pattern of algae exposed to sub-lethal selenium concentrations depends on the stage of the algae growth. In addition, exposure experiments of selenium in algae suggest that when exposed to sub-lethal, but higher than trace concentrations of this element, the algal cells tend to substitute part of sulfur present by this element. Thus, under overloading conditions, selenium appears to use the sulfur enzymatic system, while under normal levels, selenium-specific enzyme systems seem to be in operation, at least in bacterial systems (Stadtman 1980). On the other hand, when *Chlorella* grows under low levels of sulfur in presence of selenite, the main metabolite in the algae is SeMet (Gomez-Jacinto et al. 2012a, b).

## 4 Metallomic and Metabolomic Techniques for Study of Plants Under Metal Stress

The principal concern in relation to stress caused by metal in plants is connected with mechanisms responsible for the mobilization of low solubility metals from soil, translocation within the plant, and sequestering metal ions in cytosol or in cellular compartments for metal elimination. Consequently, the identification and quantification of low molecular metal-containing metabolites and metalloproteins is of interest in studies of: (a) uptake and bioavailability of essential elements, considering transfer of these elements into grains and/or other edible plant tissues; (b) metal hyperaccumulation in order to be used for phytoremediation; (c) plant

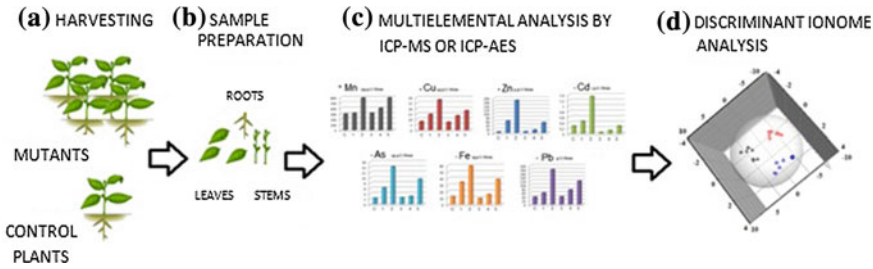



**Fig. 2** Schematic representation of a high-throughput ionomics experiment: **a** mutants and wild-type plants grown to the same size under standardized conditions and harvested at the same time; **b** sampling of equivalent amounts and parts of plant tissues; **c** multielement analysis of digested samples; **d** data collection and analysis to correlate changes in ionome with genome modification

defense mechanisms against heavy metal stress including volatilization, formation of metal inorganic insoluble forms, or induction of phytochelatins.

There is a close relationship between genome and many metalloproteins which latterly participate in the synthesis of a number of metabolites through tightly controlled cycles, forming a cascade of processes that goes from genes to metabolites, which are the last molecules of the lifecycles that make those organisms work. Therefore, information about plant genome can provide correlations with the metalloproteome and ultimately with the metabolome and metallometabolome. An example for such interactions can be the search for genes conferring metal resistance to an organism, e.g., hyperaccumulating plants using molecular cloning by complementation and screening on a metal-rich toxic medium (Vacchina et al. 2003). Another example of correlation between genetic information and metals concentration in plant is the effect of presence or absence of a particular gene on the increase or decrease of metal presence in tissue(s) from this organism (Fig. 2): mutants and wild-type of a plant are grown under standardized conditions and are harvested at the same time for multielemental analysis of equivalent parts of plant tissues. Later statistical treatment of results provides a classification of changes in the genome (Lahner et al. 2003; Rea 2003). To date 30 higher plants and 16 algal genomes are currently available for use in these kinds of studies. Therefore, integration of genomic, proteomics, metallomics, and metabolomics is now the challenge for researchers involved in assessment of living organisms under metal stress, and in particular for plants (Gonzalez-Fernandez et al. 2008, 2009).

## *4.1 Collection of Plants*

There is no detailed information about this topic in the literature, but even so it is critical to find reliable results for future environmental and health assessment studies. Generally, to ensure sample representativeness, plant tissues might be

randomly collected from a number of specimens and stored in refrigerated containers for preservation. In several studies plant leaves, stems, and roots are harvested separately. After harvesting, the roots must be washed carefully with tap water and stored fresh to avoid possible interferences from soil. Other studies washed root samples carefully with tap water to remove any adhering soil particles and then rinsed with distilled water. Plant stems and leaves have to be separated from ground parts and thoroughly rinsed with distilled water and blotted with tissue paper. The plants are removed using nitrile gloves, digging the sand out around the roots, and gently pulling all of the plants up from the sand while trying to retain as much of the root biomass as possible. All plants are blotted dry and stored (−20 or −80 °C) in trace clean amber glass or plastic jars until analysis.

When samples are harvested for a metabolomics experiment (irrespective of the biological source of tissue), it is important to quench metabolism as quickly as possible. A number of procedures have been proposed, the simplest and most effective appears to be snap freezing in liquid nitrogen. The use of liquid nitrogen during the blending step prevents the loss of volatiles and the degradation of labile compounds. Frozen plant tissue samples can be stored at −80 °C until extraction or freeze-dried for longer storage as long as samples are kept in a dry environment to avoid any water absorption which would activate enzymatic reactions and/or cause degradation of chemically labile metabolites, such as phosphorylated compounds. In summary, the collection of plants is closely related to the type of tissue or compartment to be studied and the purpose of this.

## *4.2 Metal Chemical Speciation and Metallomics in Plant*

Conventional speciation approaches are focused on low-molecular-mass organometallic compounds from anthropogenic origin or formed in living organisms as a consequence of metal or metalloid metabolism, in some cases as defense mechanism against toxic elements. Table 1 shows the most common species in speciation studies.

One important point in relation to speciation is that standards for methods setup and quantification are usually available or can be easily synthesized (i.e., arsenobetaine, selenite, methylmercury, etc.). However, endogenous and exogenous metal ions or metallic species in biological systems establish a different perspective since they are usually unknown and present a great variability in size and type of bonding between metal and biomolecule, and, generally, there are no standards available. This new approximation to speciation is called metallomics and requires a different methodological approach: (a) speciation is based on two-dimensional systems in which the discrimination between specie is achieved with a separation device such as high-performance liquid chromatography (HPLC), capillary electrophoresis (CE), or gas chromatography (GC) which is coupled to a sensitive atomic spectroscope atomic fluorescence spectroscopy (AFS) or inductively coupled mass spectrometry (ICP-MS) to detect the metal present in the

**Table 1** Common metal species in speciation studies

| Elements | Species | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Hg | $Hg^{2+}$ | $(CH_3)Hg+$ | $(CH_3)_2Hg$ | | |
| As | As(III) | As(V) | $CH_3AsO(O^-)_2$ | $(CH_3)_2AsO(O^-)$ | $(CH_3)_3As^+CH_2COO^-$ |
| Se | Se(IV) | Se(VI) | $CH_3Se(CH_2)_2CH(NH_2)COOH$ | $HSeCH_2CH(NH_2)COOH$ | |
| Sn | $(C_4H_{11})Sn^{3+}$ | $(C_4H_{11})_2Sn^{2+}$ | $(C_4H_{11})_3Sn^+$ | | |

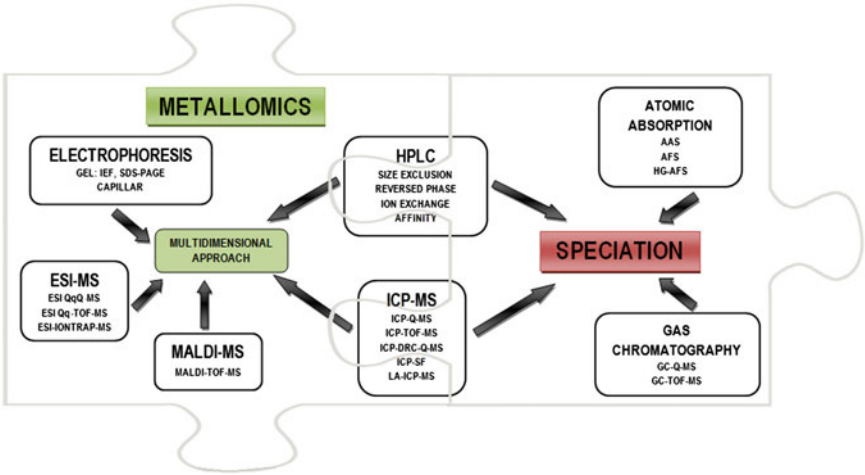



**Fig. 3** Comparison of metal analytical speciation and metallomic approaches

species moiety; (b) in metallomics and metal-metabolomics a third instrumental dimension is necessary (organic mass spectrometry) because unknown molecules need to be appropriately identified and characterized (Fig. 3).

The use of ICP-MS is critical in speciation and metallomics since it allows: (i) multiisotopic metal analysis (including nonmetals such as S, P, Se), (ii) high sensitivity, (iii) tolerance to matrix, and (iv) large linearity range. Several analyzers can be used in ICP-MS detection such as quadrupole (Q), time of flight (TOF), sector field (SF), or multicollector (MC). Sample introduction can be performed by nebulization of HPLC outflow, capillary electrokinetic chromatography (CEC), or CE, capillary zone electrophoresis (CZE). Alternatively, laser ablation (LA) of living organism tissues or gel electrophoresis (GE) spots can be used for this purpose. Several modes of chromatographic separations can be used for species discrimination at preparative, capillary, or nanoscale, and usually two or three orthogonal systems can be combined offline to increase metal-biomolecules resolution, such as size exclusion chromatography (SEC), reverse phase (RP), ion exchange chromatography (IEC), hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC), and affinity chromatography. However, as commented before, the combination with organic mass spectrometry is mandatory for unknown species in biochemical issues, especially electrospray ionization (ESI) or matrix-assisted laser desorption (MALDI). The use of ESI-MS is more suitable than MALDI-MS for tandem mass spectrometry and online couplings with separation techniques (HPLC, CE). However, MALDI-TOF-MS is recommended for matrices with low complexity. Moreover, ESI-MS is sensitive to concentration and both covalent and noncovalent bonds are preserved, while MALDI-MS is mass sensitive and only covalent bonds are preserved. Several mass analyzers can be used to obtain structural information about species such as triple quadrupole

(QqQ), triple quadrupole time of flight (QqQTOF), ion trap (IT), quadrupole trap (QTrap), or Fourier transform ion cyclotron resonance (FT-IRC).

### 4.2.1 Sample Treatment in Metallomics

A critical step in metallomic of plant is sample preparation. Among the pretreatment steps sampling and storage are key requirements in order to preserve the species information during the whole analytical process. Sample preparation could be understood as any manipulation that modifies the sample matrix in order to make it more suitable for analysis (Mounicou et al. 2009; Mesko et al. 2011; Pei and Gailer 2009; Zeini-Johromi and Gailer 2010; Gomez-Ariza et al. 2011).

Sample preparation for metallomic from tissues or biological fluid requires several steps: (a) cell disruption or lysis, or a partial degradation of sample matrix for later extraction of the analyte using mechanical treatments in presence of liquid nitrogen (Garcia-Sivillano et al. 2012); (b) analyte extraction and solubilization assisted by different reagents, mainly buffer with ion strength suitable to the type of protein present in the sample (Canas et al. 2007), e.g., Tris buffer and ammonium acetate, this is later more suitable for sample analysis with ESI-MS because of its greater volatility (Garcia-Sivillano et al. 2012); (c) reduction of disulfide bonds to promote protein denaturation (Canas et al. 2007; Wrobel et al. 2003), for this purpose, free thiol-containing reducing agents such as dithiothreitol (DTT), dithioerythritol (DTE), reduced glutathione (GSH), and $\beta$-mercaptoethanol are used, however, these reagents have chelating properties and are being replaced by others, such as tributylphosphine (TBP) and tris-carboxyethylphosphine (TCEP) with milder reducing properties and without chelating properties (Garcia-Sivillano et al. 2012); (d) inhibition by means of a proteases inhibitor without chelating properties, such as phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (Garcia-Sivillano et al. 2012).

Optionally, when element speciation is required addition of detergents is necessary, such as SDS or CHAPS, since the element is incorporated or strongly complexed by the biomolecules and detergents disrupt the cell membranes, breaking lipid–protein interaction and, consequently, solubilizing the metal-binding proteins and preventing hydrophobic interactions (Szpunar et al. 2003; Chassaigne et al. 2004).

### 4.2.2 Metallomics Workflow

Two main workflows are normally used in metallomic, the first of them based on two- or three-dimensional liquid chromatographic separation of metal-biomolecules with ICP-MS detection; in parallel these molecules are identified by ESI or nanoESI high resolution mass spectrometry, such as QqQ-TOF or Orbitrap (Fig. 4a). The second workflow is based on the use of two-dimensional (2D) gel electrophoresis followed, generally, by MALDI-TOF/TOF for characterization (Fig. 4b); also, in this case ICP-MS is used for heteroatom detection.

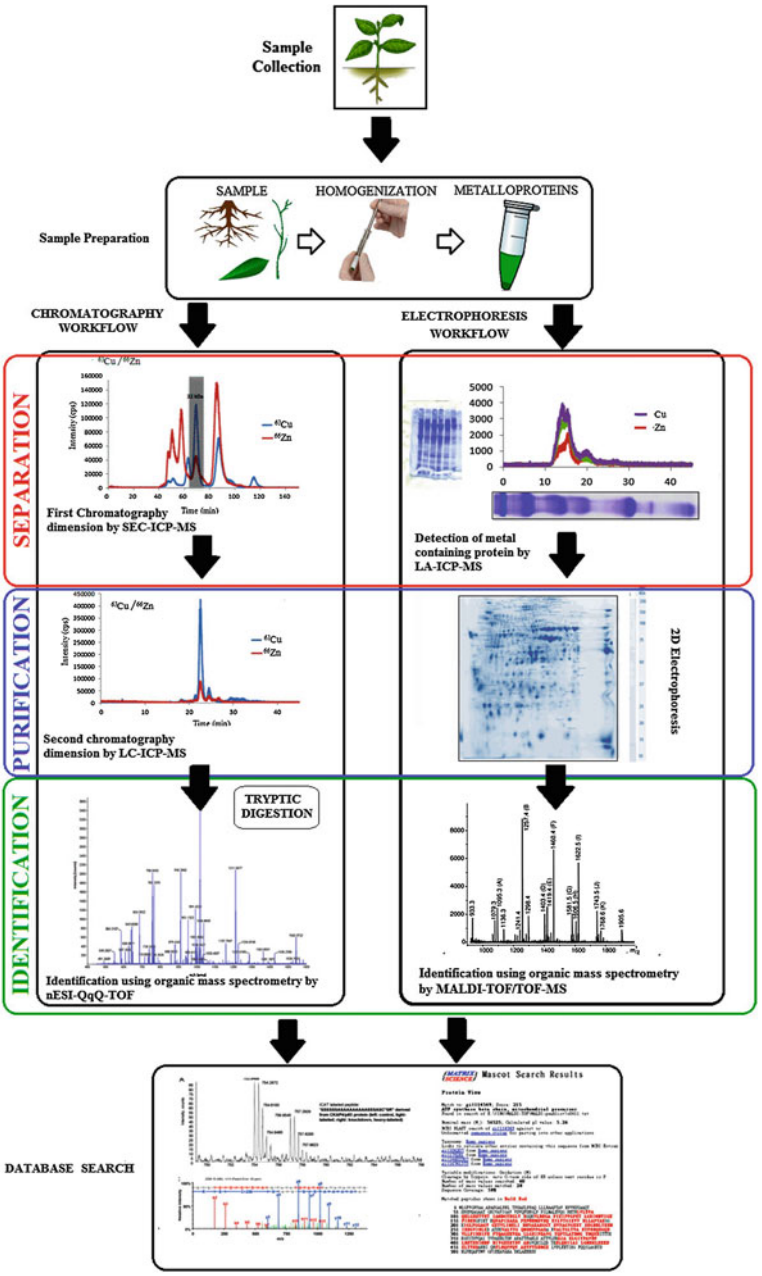



**Fig. 4** Metallomics workflow for plant experiments

## *4.3 Metabolomics in Plant*

In metabolomics we consider molecules with molecular mass less than 1000 Da, which are the study of all the chemicals that have a low molecular weight (typically <1000 Da) (Bowen and Northen 2010). Metabolites are the intermediates and end products of cellular functions, and their levels can be viewed as the response of biological systems to environmental or genetic manipulation. When working with plant metabolites, it is important to consider that plant metabolism is highly dependent on the time of the day and the quantity and quality of light the plant is exposed to during its growth. Metabolite levels can be altered quite dramatically between day and night processes known as diurnal fluctuation (Urbanczyk-Wochniak et al. 2005). Moreover, the choice of tissue or compartment to analyze is also important, considering that plants have three major organ groups: roots, stems, and leaves.

The metabolome is very diverse including lipid soluble chemicals that are normally found in membranes, polar chemicals from aqueous parts of the cell, acid, and basic ions, comprising stable structures and those that oxidize under slight mistreatment. Currently, there is no method to extract all metabolites and analyze them; mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy are major analytical tools for metabolomic studies. However, metabolomics requires analytical techniques with high sensitivity and ability for molecules identification that in addition are accessible by most laboratories, as mass spectrometry. A number of studies propose the use of sample direct infusion to mass spectrometer (DIMS) without any previous separation. This makes analysis simpler and faster and the traditional isobaric interferences affecting direct infusion are overcome with the use of high mass resolution analyzers, such as hybrid systems triple quadrupole time of flight (QqQ-TOF) or Orbitrap. These advances in technology make it necessary to improve bioinformatics and data handling methods. There are a number of bioinformatics tools currently being used, and a number in development. These tools are used to align chromatographic data and to discriminate components in large datasets.

### 4.3.1 Metabolomics Workflow for Plant Experiments

The experimental metabolomic workflow comprises several well-established steps summarized in Fig. 5. As important as the choice of analytical technique is the selection of suitable sample pre-analysis procedures, involving collection of plants and sample treatment. Moreover, data analysis requires sophisticated techniques, in which multivariate statistical analysis and bioinformatics tools play fundamental roles.

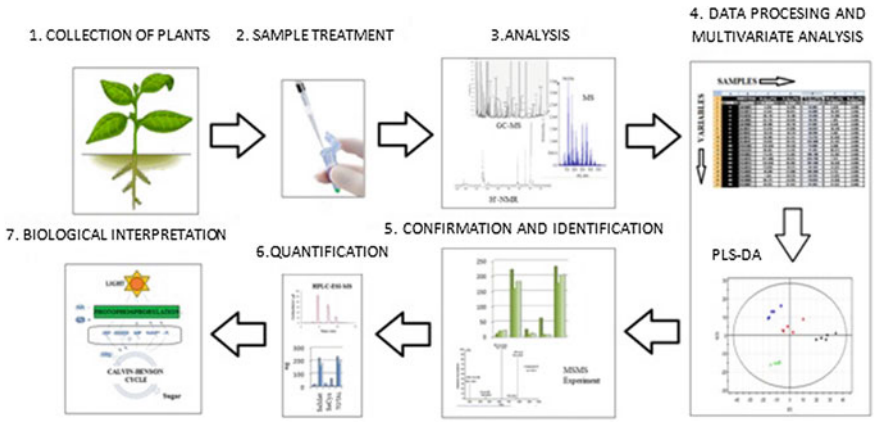



**Fig. 5** Metabolomics workflow for plant experiments

### 4.3.2 Sample Treatment for Metabolomic Studies

A crucial step in metabolite analyses is the complete extraction of low-molecular-mass metabolites prior to their separation and detection. Careful and accurate sample preparation must be carried out in order to guarantee high quality results. To obtain comprehensive and reproducible metabolomic profiles, metabolite extraction have to be nonselective, simple, and fast (Vuckovic 2012). Plant tissues and cells are inherently resistant to extraction because of the presence of cell wall and surface structures, such as cuticles, and usually need to be ground to powder prior to extraction with a mixture of solvents of varying hydrophilicity/hydrophobicity. These extraction procedures allow separation of the small molecules (metabolites) from the macromolecules, such as proteins, polysaccharides, and nucleic acids (DNA and RNA). Sample homogenization before extraction increases the precision of the analytical method since only systemic contaminants exhibit a homogeneous distribution among the plant tissues. Due to the presence of strong fiber materials such as lignin, tissue material normally requires a preliminary pretreatment such as cutting, blending, and sizing. A number of extraction techniques have been proposed in plant metabolomics, such as solid–liquid extraction (SLE), liquid–liquid extraction (LLE), ultrasonic liquid extraction (ULE), Soxhlet extraction (SE), and pressurized liquid extraction (PLE).

### 4.3.3 Data Processing and Multivariate Analysis

Following their acquisition by a given analytical tool, the metabolic fingerprints are compared using multivariate statistical analyses, with the aim to reduce the complexity of the data sets and highlight the analytical information about biological relevance. In metabolomic experiments based on mass spectrometry in

which complex spectrum or chromatograms are obtained, sophisticated methods are needed for extracting information from data and further analysis (Katajamaa and Oresic 2007). Then data must be subjected to multivariate statistical analysis, such as principal component analysis or discriminant analysis, for the comparison of sample classes. Finally, discriminant metabolites between samples can be identified by tandem mass spectrometry and the use of metabolomic databases (Neumann and Bocker 2010), providing a starting point for biological interpretation of results.

## 5 Case Studies of Plant Under Metal Stress

### *5.1 Experiments Exposure*

Plants have defense mechanisms against different types of environmental stress so that they can adapt to unfavorable surroundings. The discovery of biomarkers allows understanding the defense metabolism of plants, considering that synthesis of specific metabolites is one of the usual defense mechanisms. In connection to this, metallomics and metabolomics have been used to decipher the overall strategy of plants against stress.

Although speciation or metallomic techniques can be employed in the study of metal homeostasis, as well as metal distribution, translocation and trafficking among cell compartments, tissues, and organs, as stated in previous headings, in order to elucidate the mechanisms of action of metals is necessary for deep insight into the global metabolism of organisms. In this sense, metabolomics highlights as the most sensitive level of organization to understand the result of a complex biological behavior, considering that in the metabolome both gene and protein expression converge as external factors (Nicholson et al. 1999). Therefore, the use of metabolomics to study metal toxicity has gained importance in recent years, as has been recently reviewed (Booth et al. 2011).

In controlled exposure experiments the concentration and bioavailability of xenobiotics, exposure conditions, and duration of experience are important parameters, which can be selected on the basis of experiment purpose. In these experiences, metabolic alterations can be directly attributed to the stressor, which although not a real situation, is a good starting point for further correlations to complex environmental issues. Cadmium is considered as one of the most phytotoxic nonessential heavy metals released into the environment, so the analysis of plant response to Cd has been extensively explored by proteomic and metabolomic approaches, as recently reviewed (Villiers et al. 2011). In plants, cadmium toxicity is associated with morphological, physiological, and biochemical defects such as alteration of photosynthetic processes or enzyme inhibitions leading to growth inhibition and chlorosis. Thus, metabolomics has demonstrated the important role of antioxidant defenses and detoxification processes in the mechanisms of plant

resistance to cadmium stress (Sarry et al. 2006; Sun et al. 2010; Ahsan et al. 2012), as well as perturbations in energy metabolism (Liu et al. 2011). On the other hand, metabolic consequences of stress induced by heavy metals in plants have been studied using NMR V-based metabolic fingerprinting (Bailey et al. 2003) and metabolite profiling (Le Lay et al. 2006). Metabolic fingerprinting using NMR spectroscopy combined with multivariate statistics analysis has been used to discriminate between control- and cadmium-treated *Silene cucubalus* cell cultures. Compounds that showed an increase in cadmium-treated cells were identified as malic acid and acetate, while glutamate and branched chain amino acids decreased. In addition, metabolite profiling (with NMR) of *Arabidopsis* cells exposed to cesium stress showed that metabolite changes in carbohydrate metabolism and glycolytic fluxes, and depends on potassium levels in the cell (Le Lay et al. 2006).

Heavy metal-transport proteins play crucial roles in the heavy metals uptake and tolerance of plants. Plant heavy metal-transport proteins related to metal uptake can transport essential heavy metals, but also toxic elements into cytoplasm, when essential elements are absent, or as a consequence of competitive reactions among ions. Metal-efflux proteins are a group of detoxification proteins that efflux excess of metals or toxic heavy metals from cytoplasm, or move them into vacuoles (Verbuggen et al. 2009). For example, iron (Fe) is a key component of hemeproteins (e.g., cytochromes, catalase, and Fe–S proteins such as ferredoxin) and a range of other enzymes. Cu is an integral component of certain electron transfer proteins in photosynthesis (e.g., plastocyanin) and plant respiration (e.g., cytochrome c oxidase), and is also involved in lignification (e.g., the oxidase enzyme Laccases), while manganese is a less redox active element involved in photosynthesis (e.g., in $O_2$ evolution). Uptake of phytotoxic amounts of metal in higher plants or algae can result in inhibition of several enzymes, and upregulation of others. In connection to this, two predominant mechanisms of enzyme inhibition can be cited: (a) binding of the metal to sulfydryl groups involved in the catalytic action or structural integrity of enzymes and (ii) substitution of an essential element by a toxic one in metalloproteins caused by the deficiency of the key-essential element associated to the protein. Toxic metal accumulation in the cellular compartment of the enzyme is a prerequisite for enzyme inhibition in vivo. Upregulation of some enzymes is considered to play a significant role in the stress metabolism, induced by metal phytotoxicity. In relation to this can be cited several examples: upregulation of peroxidase related to oxidative reactions at the biomembrane, stimulation of enzymes from intermediary metabolism to compensate metal-sensitive photosynthetic reactions, induction of enzymes, and metal-specific changes in isoperoxidase pattern for diagnostic of phytotoxicity of soils contaminated by several metals.

A metallomic approach was performed to evaluate the influence of cadmium on zinc hyperaccumulation, mineral nutrient uptake, and content of metal-binding proteins in *A. halleri*. The experiments were carried out using plants subjected to long-term cadmium exposure (40 days) at concentrations of 45 and 225 μM $Cd^{2+}$. Inductively coupled plasma-mass spectrometry, size exclusion chromatography

coupled with plasma-mass spectrometry, and laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry used for ablation of polyacrylamide gels were employed to assess the content of investigated elements *A. halleri* as well as to identify metal-binding proteins. *A. halleri* is able to translocate cadmium to the aerial parts in high amounts (translocation index >1). The Zn content in plants decreased significantly with the increase of cadmium concentration in the growth medium. Different positive and negative correlations between Cd content and mineral nutrients were evidenced in this study. In addition, more than 10 low-molecular-weight (<100 kDa) Cd-binding proteins in Cd-treated plants were identified using organic mass spectrometry. These proteins are unlikely to be phytochelatins or metallothioneins. Possibly, low-molecular-weight Cd-binding proteins can be involved in cadmium resistance in *A. halleri* (Przedpelska-Wasowicz et al. 2012). These metalloproteins could be used as environmental biomarkers of Cd pollution.

## 5.2 Plants as Bioindicators in Environmental Monitoring of Metal Pollution

Environmental metabolomics has been extensively employed in controlled exposure experiences at the laboratory for assessment of metal toxicity, which has allowed the elucidation of the mode of action (MOA) of diverse metals in many different species, including animals, plants, or microorganisms. Knowledge of the MOA is very valuable information for extrapolating toxicity data from controlled laboratory situations to real environmental studies, and for the comparison of metabolic responses between species. In environmental monitoring studies based on metabolomics, plants collected from the field are subject to considerable inter-individual metabolic variability as a result of their interaction with their uncontrolled environment (Viant 2008). However, despite the variability of metabolomic results in environmental issues it is necessary to validate the response of potential biomarkers in heavily contaminated sites (Kammenga et al. 2000).

Environmental metabolomics was proposed for the elucidation for metal tolerance mechanism in metal accumulator plants, used for phytoremediation of contaminated soils (Jahangir et al. 2008). This study showed that the effects of copper and iron on plant metabolism were larger than those of manganese, and that metabolomic changes varied not only according to the type of metal but also according to its concentration.

Research on metal-chelating compounds in organisms responsible for the metal homeostasis of the cell showed that different chemical compounds can be involved in this process including amino acids (e.g., histidine, nicotianamine), organic acids such as malate and citric acid, phytochelatins, and metallothioneins (Szpunar 2005). Braude et al. (1980), mentioned that cadmium shows a tendency to accumulate in a protein fraction within soybean cell. This is particularly interesting, as

most of the proteins regulating metal homeostasis of the plant cell are also involved in detoxification, regulation of the cell cycle, proliferation, and apoptosis.

However, to better understand plant response to environmental stress caused by metal ions, it is necessary to localize, identify, and quantify metal-containing macromolecules. This task is particularly challenging from the analytical point of view, and the use of instrumental hyphenated techniques for biological systems such as size exclusion chromatography coupled with plasma-mass spectrometry (SEC-ICP-MS) or laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry (LA-ICP-MS) can be regarded as a valuable methodological alternative (Garcia et al. 2006).

## 5.3 Algae as Functional Food

The essential character of selenium in biological functions has driven the preparation of functional or enriched food in this element different matrixes such as yeast, garlic onions, and others. Recently, the microalgae *C. sorokiniana* has been studied as a candidate of functional food for selenium, for this purpose the culture conditions of algae were optimized for selenium bioaccumulation in a medium rich in $Na_2SeO_4$ (Gomez-Jacinto et al. 2010), in order to obtain a suitable approach for the biotechnological production of this product. Se concentration (as $Na_2SeO_4$) in the culture medium until 100 μg $ml^{-1}$ allows the growth of algae colonies during long periods of time, until 300 h, but higher concentrations cause the collapse of the colony. The bioaccumulation process causes a concentration of Se in algae of the order of 3 μg $g^{-1}$ in about 100 h. A metallomic analytical approach based in the coupling high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry (HPLC-ICP-MS), which uses two chromatographic switched columns (C-18 and chiral columns) with ICP-MS detection, has been applied to characterize the different Se metabolites, including chiral forms, in both the algae and culture media. The results reveal that selenate present in the culture is biotransformed in selenocysteine (SeCys2), selenomethyl-selenocysteine (SeMeSeCys), and mainly selenomethionine (SeMet) by the algae, although appreciable concentration of Se(VI) is also present in cell. When algae are cultured under sulfur (S) deficiency conditions, the accumulation of Se in the cell is enhanced owing to the great chemical similarity between S and Se that promotes the substitution of S by Se in the cell metabolism. Therefore, SeMet concentration in the algae increases from about 7 to 15 μg $g^{-1}$ and Se(VI) from 15 to 25 μg $g^{-1}$, after 500 h of exposure. However, tests to assure the algae Se species bioavailability by mammals and finally by humans are still under study (Gomez-Jacinto et al. 2010).

In the same way, iodine is a critical element present in the thyroid hormones whose presence is necessary to control and quantify in biological and environmental samples. Iodine deficiency in human food or animal feed may lead to organisms malfunction, such as rate enhancement, growth, and development, carbohydrate metabolism, oxygen consumption, proteins synthesis, fetal neurological development, and so on.

The micro algae *C. vulgaris* has been studied by Burianova et al. (2005) with the purpose of being used as iodine supplement. There are thousands of micro algae that can be used for this goal but Chlorella grows very fast and it is easier to follow the iodine intake process. In another study was evaluated the characterization of iodine species accumulated by the micro algae *C. vulgaris* under iodine supplementation (Gomez-Jacinto et al. 2010). For this purpose the use of multidimensional chromatography (size exclusion and anion exchange chromatography) with ICP-MS detection has been proposed. In addition, the optimization of iodine accumulation in Chlorella was considered at laboratory scale.

## 6 Concluding Remarks

Metals have important roles in living organisms since metalloproteins represent a third of biomolecules with active tasks in cell and organism work. However, some metals have damaging effects on plants and may become a health hazard to man and animals. Metal lixiviation and mobility from contaminated soils and mine wastes are strongly dependent on metal chemical forms which are finally uptaken by plants and accumulated in seeds. The presence of inorganic arsenic in rice and other cereals, soil phytoremediation by plants, and biotechnological production of plants and algae enriched in essential elements are examples of the importance of metal species and metal biomolecules in plants.

Toxic elements such as mercury, cadmium, arsenic, and others are uptaken and transformed by plants generating a cascade of metal species, metalloproteins, and metabolites bound to them; further many metabolic changes occur as a consequence of unusual presence of toxic metals in cells and plant components. Both metallomic and metabolomic techniques are suitable to decipher biomolecular changes related to plant interactions under metal environmental stress. Other processes involving metal–plant interactions, such as biotechnological studies, metal–plant hyperaccumulation and phytoremediation, and plant defense against metals can also be assessed with these techniques.

In metal speciation and metallomics the use of ICP-MS is critical hyphenated to HPLC separation techniques used in mono or bidimensional mode; sometimes, other separation approaches such as CE or LA can be used for time-resolved metal-biomolecules introduction in the atomic detector. For identification of metal-containing molecules a third instrumental unit, generally tandem mass spectrometry, is included in the metallomics platform. In metabolomics high resolution mass spectrometry is used under direct infusion mode or coupled to chromatography for statistical classification of samples on the basis of mass spectra or chromatogram, latter MS/MS experiments of signals responsible for samples discrimination allows the identification of metabolites (with molecular mass $<1000$ Da) affected by up- downregulation of metallobiomolecules or metallic species.

Further additional points such as sample preparation and treatment are critical to get reliable results allowing suitable comparisons between different cases and episodes.

The combined application of these approaches allows useful application in the prediction of consequences related to metal exposure experiments in plants, use of plants as bioindicators for environmental monitoring of metal contamination, use of hyperaccumulator plants for bioremediation, and preparation of microalgae enriched in essential metals, among many other possible examples.

## References

Ahsan N, Nakamura T, Komatsu S (2012) Differential responses of microsomal proteins and metabolites in two contrasting cadmium (Cd)-accumulating soybean cultivars under Cd stress. Amino Acids 42:317–327

Arduini I, Goldbold DL, Omnis A (1994) Cadmium and copper uptake and distribution in Mediaterranean tree seedlings. Physiol Plant 97:111–117

Azevedo RA, Lea PJ (2005) Toxic metals in plants. Braz J Plant Physiol 17:1–190

Bailey NJ, Oven M, Holmes F, Nicholson JK, Zenk MH (2003) Metabolomic analysis of the consequence of cadmium exposure in *Silene cucubatus* cell cultures via H-1 NMR spectroscopy and chemometrics. Phytochemistry 62:851–858

Bell PF, Parker DR, Page AL (1992) Contrasting selenate sulfate interaction in selenium accumulating and nonaccumulating plant species. Soil Sci Soc Am J 56:1818–1824

Bluemlein K, Klimm E, Raab A, Feldmann J (2009) Selenite enhances arsenate toxicity in *Thunbergia alata*. Environ Chem 6:486–494

Boening DW (2000) Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. Chemosphere 40:1335–1351

Booth SC, Workentine ML, Weljie AM, Turner RJ (2011) Metabolomics and its application to studying metal toxicity. Metallomics 3:1142–1152

Bowen BP, Northen TR (2010) Dealing with the unknown: metabolomics and metabolite atlases. J Am Soc Mass Spectrom 21:1471–1476

Braude GL, Nash AM, Wolf WJ, Carr RL, Chaney RL (1980) Cadmium and lead content of soybean products. J Food Sci 45:1187–1199

Burianová I, Machát J, Niedobová E, Doucha J, Kanický V (2005) Fractionation of iodine in iodine-enriched algae *Chlorella*. Chem Listy 99:273–276

Cañas B, Pineiro C, Calvo E, Lopez-Ferrer D, Gallardo JM (2007) Trends in sample preparation for classical and second generation proteomics. J Chromatogr A 1153:235–258

Chassaigne H, Chery CC, Bordin G, Vanhaecke F, Rodriguez AR (2004) 2 Dimensional gel electrophoresis technique for yeast selenium containing proteins—sample preparation and MS approaches for processing 2-D gel protein spots. J Anal At Spectrom 19:85–95

Chen J, Yang ZM, Su Y, Han FX, Monts DL (2009) Phytoremediation of heavy metal/metalloid-contaminated soils. In: Steinberg RV (ed) Contaminated soils: environmental impact, disposal and treatment. Nova Science Publishers, New York

Cubbada F, Ciardullo S, D'Amato M, Raggi A, Aureli F, Carcea M (2010) Arsenic contamination of the environment-food chain: a survey on wheat as a test pant to investigate phytoavailable arsenic in Italian agricultural soils and as a source of inorganic arsenic in the diet. J Agric Food Chem 58:10176–10183

Dal Corso G (2012) Heavy metals toxicity in plants. In: Furini A (ed) Plants and heavy metals. Springer Briefs in Biometals

Dickinson RE, Cicerone RJ (1986) Future global warming from atmospheric trace gases. Nature 319:109–115

Ellis RD, Salt ED (2003) Plants, selenium and human health. Curr Opin Plant Biol 6:273–279

Fels IG, Cheldelin VH (1949) Selenate inhibition studies. III. The role of sulfate in selenate toxicity in yeast. Arch Biochem 22:402–405

Fiehn O, Kopka J, Dörmann P, Altmann T, Trethewey RN, Willmitzer L (2000) Metabolite profiling for plant functional genomics. Nat Biotechnol 18:1157–1161

Garcia JS, de Magalhaes CS, Arruda MAZ (2006) Trends in metal-binding and metalloprotein analysis. Talanta 69:1–15

García-Sevillano MA, González-Fernández M, Jara-Biedma R, García-Barrera T, López-Barea J, Pueyo C, Gómez-Ariza JL (2012) Biological response of free-living mouse *Mus spretus* from Doñana national park under environmental stress based on assessment of metal-binding biomolecules by SEC-ICP-MS. Anal Bioanal Chem 404:1967–1981

Ghani A (2010) Toxic effects of heavy metals on plant growth and metal accumulation in Maize (*Zea mays* L.). Iran J Toxicol 3:325–334

Gierasch LM, Gershenson A (2009) Post-reductionist protein science, or putting Humpty Dumpty back together again. Nat Chem Biol 5:774–777

González-Fernández M, García-Barrera T, Arias-Borrego A, Jurado J, Pueyo C, Lopez-Barea J, Gomez-Ariza JL (2009) Metallomics integrated with proteomics in deciphering metal-related environmental issues. Biochimie 91:1311–1317

González-Fernández M, García-Barrera T, Jurado J, Prieto-Álamo MJ, Pueyo C, López-Barea J, Gómez-Ariza JL (2008) Integrated application of transcriptomics, proteomics, and metallomics in environmental studies. Pure Appl Chem 80:2609–2626

Gómez-Ariza JL, García-Barrera T, Lorenzo F, Arias A (2005) Analytical characterization of bioactive metal species in the cellular domain (metallomics) to simplify environmental and biological proteomics. Int J Environ Anal Chem 85:255–266

Gómez-Ariza JL, Zeini-Jahromi E, González-Fernández M, García-Barrera T, Gailer J (2011) Liquid chromatography-inductively coupled plasma-based metallomic approaches to probe health-relevant interactions between xenobioticsand mammalian organisms. Metallomics 3:566–577

Gómez-Jacinto V, Arias-Borrego A, García-Barrera T, Garbayo I, Vílchez C, Gómez-Ariza JL (2010) Iodine speciation in iodine-enriched microalgae *Chlorella vulgaris*. Pure Appl Chem 82:473–481

Gómez-Jacinto V, García-Barrera T, Garbayo I, Vílchez C, Gómez-Ariza JL (2012a) Metallomic study of selenium biomolecules metabolized by the microalgae *Chlorella sorkiniana* in the biotechnological production of functional foods enriched in selenium. Pure Appl Chem 84:269–280

Gómez-Jacinto V, García-Barrera T, Garbayo I, Vílchez C, Gómez-Ariza JL (2012b) Metal-metabolomics of microalga *Chlorella sorokiniana* growing in selenium- and iodine-enriched media. Chem Listy 66:821–828

Gratão PL, Monteiro CC, Antunes AM, Peres LEP, Azevedo RA (2008) Acquired tolerance of tomato (*Lycopersicon esculentum cv. Micro-Tom*) plants to cadmium-induced stress. Ann Appl Biol 153:321–333

Haferburg G, Kothe E (2010) Metallomics: lessons for metalliferous soil remediation. Appl Microbiol Biotechnol 87:1271–1280

Han FX, Su Y, Monts DL, Waggoner AC, Plodinec JM (2006) Binding distribution, and plant uptake of mercury in a soil from Oak Ridge, Tennesse, USA. Sci Total Environ 368:753–768

Hurd-Karrer AM (1937) Selenium absorption by crop plants as related to their sulphur requirement. J Agric Res 54:601–608

Hurd-Karrer AM (1938) Relation of sulphate to selenium absorption by plants. Amer J Bot 25:666–675

Israr M, Sahi S, Datta R, Sarkar D (2006) Bioaccumulation and physiological effects of mercury in *Sesbania drummondii*. Chemosphere 65:591–598

Jahangir M, Abdel-Farid IB, Hae Choi Y, Verpoorte R (2008) Metal ion-inducing metabolite accumulation in *Brassica rapa*. J Plant Physiol 165:1429–1437

Kahakachchi C, Boakye HT, Uden PC, Tyson JF (2004) Chromatographic speciation of anionic and neutral selenium compounds in Se-accumulating *Brassica juncea* (Indian mustard) and in selenized yeast. J Chromatogr A 1054:303–312

Kammenga JE, Dallinger R, Donker MH, Köhler H, Simonsen V, Triebskorn R, Weeks JM (2000) Biomarkers in terrestrial invertebrates for ecotoxicological soil risk assessment. Rev Environ Contam Toxicol 164:93–147

Katajamaa M, Oresic M (2007) Data processing for mass spectrometry-based metabolomics. J Chromatogr A 1158:318–328

Kirkham MB (2006) Cadmium in plants on polluted soils: effects of soil factors, hyperaccumulation, and amendments. Geoderma 137:19–32

Koch I, Wang L, Ollson CA, Cullen WR, Reimer KJ (2000) The predominance of inorganic arsenic species in plants from Yellowknife, Northwest Territories, Canada. Environ Sci Tech 34:22–26

Lahner B, Gong J, Mahmoudian M, Smith EL, Abid KB, Rogers EE, Guerinot ML, Harper JF, Ward JM, McIntyre L, Schroederk JI, Salt DE (2003) Genomic scale profiling of nutrient and trace elements in *Arabidopsis thaliana*. Nat Biotechnol 21:1215–1221

Le Lay P, Isaure MP, Sarry JE, Kuhn L, Fayard B, Le Bail JL, Bastien O, Garin J, Roby C, Bourgignon J (2006) Metabolomic, proteomic and biophysical analyses of *Arabidopsis thaliana* cells exposed to a caesium stress. Influence of potassium suplí. Biochimie 88:1533–1547

Lenka M, Panda KK, Panda BB (1992) Monitoring and assessment of mercury pollution in the vicinity of a chloralkali plant—4. Bioconcentration of mercury in in situ aquatic and terrestrial plants at Ganjam India. Arch Environ Contam Toxicol 22:195–202

Levy JL, Stauber JL, Adams MS, Maher WA, Kirby JK, Jolley DF (2005) Toxicity, biotransformation, and mode of action of arsenic in two freshwater microalgae (*Chlorella* sp. and *Monoraphidium arcuatum*). Environ Toxicol Chem 10:2630–2639

Liu X, Yang C, Zhang L, Li L, Liu S, Yu J, You L, Zhou D, Xia C, Zhao J, Wu H (2011) Metabolic profiling of cadmium-induced effects in one pioneer intertidal halophyte *Suaeda salsa* by NMR-based metabolomics. Ecotoxicology 20:1422–1431

Lozano-Rodríguez E, Hernandez LE, Bonay P, Carpena-Ruiz RO (1997) Distribution of cadmium in shoots and root tissues of maize and pea plants: physiological disturbances. J Exp Bot 48:123–128

Lu Y (2010) Metal ions as matchmakers for proteins. Proc Natl Acad Sci USA 107:1811–1812

Lux A, Martinka M, Vaculík M, White PJ (2011) Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. J Exp Bot 48:123–128

Liu J, Qian M, Cai G, Yang J, Zhu Q (2007) Uptake and translocation of Cd in different rice cultivars and the relation with Cd accumulation in rice grain. J Hazard Mater 143:443–447

Lugon-Moulin N, Zhang M, Gadani F, Rossi L, Koller D, Kraus M, Wagner GJ (2004) Critical review of the science and options for reducing cadmium in tobacco (*Nicotiana tabacum L.*) and other plants. Adv Agron 83:111–180

Maeda S, Nakashima S, Takeshita T, Higashi S (1985) Bioaccumulation of arsenic by freshwater algae and the application to the removal of inorganic arsenic from an aqueous phase. 2. By *Chlorella vulgaris* isolated from arsenic-polluted environment. Separ Sci Technol 20:153–161

Martínez-Fábregas J, Rubio S, Díaz-Quintana A, Díaz-Moreno I, de la Rosa MA (2011) Proteomic tools for the analysis of transient interactions between metalloproteins. FEBS J 278:1401–1410

Mattoo AK, Edelman M (1987) Intra-membrane translocation and post-translational palmitoylation of the chloroplast 32 kDa herbicide binding protein. Proc Natl Acad Sci USA 84:1497–1501

Meharg AA, Macnair MR (1992) Suppression of the high- affinity phosphate-uptake system-a mechanism of arsenate tolerance in *Holcus lanatus L.* J Exp Bot 43:519–524

Meharg AA (1994) Integrated tolerance mechanisms-constitutive and adaptive plant-response to elevated metal concentrations in the environment. Plant Cell Environ 17:989–993
Mesko MF, Hartwig CA, Bizzi CA, Pereira JSF, Mello PA, Flores EMM (2011) Sample preparation strategies for bioinorganic analysis by inductively coupled plasma mass spectrometry. Int J Mass Spectrom 307:123–136
Milner MJ, Kochian LV (2008) Investigating heavy-metal hyperaccumulation using *Thlaspi caerulescens* as a model system. Ann Bot 102:3–13
Montes-Bayón M, Yanes EG, de León CP, Jayasimhulu K, Stalcup A, Shann J, Caruso JA (2002) Initial studies of selenium speciation in *Brassica juncea* by LC with ICP-MS and ES-MS detection: an approach for phytoremediation studies. Anal Chem 74:107–113
Morrissey J, Guerinot ML (2009) Iron uptake and transport in plants: the good, the bad, and the ionome. Chem Rev 109:4553–4567
Mounicou S, Szpunar J, Lobinski R (2009) Metallomics: the concept and methodology. Chem Soc Rev 38:1119–1138
Mounicou S, Shah M, Meija J, Caruso JA, Vonderheide AP, Shann J (2006) Localization and speciation of selenium and mercury in *Brassica juncea* – Implication for Se–Hg antagonism. J Anal At Spectrom 21:404–412
Murray L, Raab A, Feldmann J (2003) Biotransformation of arsenate to arsenosugars by *Chlorella vulgaris*. Appl Organomet Chem 17:669–674
Neumann S, Böcker S (2010) Computational mass spectrometry for metabolomics: identification of metabolites and small molecules. Anal Bioanal Chem 398:2779–2788
Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E (1999) Metabonomics: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. Xenobiotica 29:1181–1189
Nriagu JA (1996) A history of global metal pollution. Science 272:223–224
Ortega-Villasante C, Rellán-Álvarez R, del Campo FF, Carpena-Ruiz RO, Hernández LE (2005) Cellular damage induced by cadmium and mercury in *Medicago sativa*. J Exp Bot 56:2239–2251
Palmer CM, Guerinot ML (2009) Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. Nat Chem Biol 5:333–340
Patra M, Bhowmik N, Bandopadhyay B, Sharma A (2004) Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. Environ Exp Bot 52:199–223
Patra M, Sharma A (2000) Mercury toxicity in plants. Bot Rev 66:379–422
Pei KL, Gailer J (2009) Probing the interaction of arsenobetaine with blood plasma constituents in vitro: an SEC-ICP-AES study. Metallomics 1:403–408
Phillips DJH (1990) Arsenic in aquatic organisms: A review of emphasizing chemical speciation. Aqua Toxicol 16:151–186
Post Gate J (1949) Competitive inhibition of sulphate reduction by selenate. Nature 164:670–671
Post Gate J (1952) Competitive and non-competitive inhibitors of bacterial sulphate reduction. J Gen Microbiol 6:128–142
Przedpełska-Wąsowicz E, Polatajko A, Wierzbicka M (2012) The influence of cadmium stress on the content of mineral nutrients and metal-binding proteins in *Arabidopsis halleri*. Water Air Soil Pollut 223:5445–5458
Rascio N, Navari-Izzo F (2011) Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? and what makes them so interesting? Plant Sci 180:169–181
Raymond J, Segre D (2006) The effect of oxygen on biochemical networks and the evolution of complex life. Science 311:1764–1767
Rea PA (2003) Ion genomics. Nat Biotechnol 21:1149–1151
Reeves RD, Baker AJM (2000) Metal-accumulating plants. In: Raskin I, Ensley BD (eds) Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment. Wiley, New York
Sarry JE, Kuhn L, Ducruix C, Lafaye A, Junot C, Hugouvieux V, Jourdain A, Bastien O, Fievet JB, Vailhen D, Amekraz B, Moulin C, Ezan E, Garin J, Bourguignon J (2006) The early

responses of *Arabidopsis thaliana* cells to cadmium exposure explored by protein and metabolite profiling analyses. Proteomics 6:2180–2198
Sharples JM, Meharg AA, Chambers SM, Cairney JWG (2000) The symbiotic solution to arsenic contamination. Nature 404:951–952
Shrift A (1954) Sulphur selenium antagonism. I: antimetabolic action of selenate on the growth of *Chlorella vulgaris*. Amer J Bot 41:223–230
Signes-Pastor AJ, Mitra K, Sarkhel S, Hobbes M, Burlo F, de Groot WT, Carbonell-Barrachina AA (2008) Arsenic speciation in food and estimation of the dietary intake of inorganic arsenic in a rural village of West Bengal, India. J Agric Food Chem 56:9469–9474
Sobolev D, Begonia MF (2008) Effects of heavy metal contamination upon soil microbes: lead induced changes in general and denitrifying microbial communities as evidenced by molecular markers. Int J Environ Res Public Health 5:450–456
Sparks DL (2005) Toxic metals in the environment: the role of surfaces. Elements 1:193–197
Stadtman TC (1980) Selenium-dependent enzymes. Ann Rev Biochem 49:93–110
Sun GX, Williams PN, Zhu YG, Deacon C, Carey AM, Raab A, Feldmann J, Meharg AA (2009) Survey of arsenic and its speciation in rice products such as breakfast cereals, rice crackers and Japanese rice condiments. Environ Int 35:473–475
Sun X, Zhang J, Zhang H, Ni Y, Zhang Q, Chen J, Guan Y (2010) The responses of *Arabidopsis thaliana* to cadmium exposure explored via metabolite profiling. Chemosphere 78:840–845
Su YH, McGrath SP, Zhao FJ (2010) Rice is more efficient in arsenite uptake and translocation than wheat and barley. Plant Soil 328:27–34
Szpunar J, Bouyssiere B, Lobinski R (2003) Sample preparation for speciation analysis for metallobiomolecules. In: Mester Z, Sturgeon R (eds) Sample preparation for trace element analysis. Elsevier, Amsterdam
Szpunar J (2005) Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics. Analyst 130:442–465
Tanaka KFS, Fujiwara T, Yoneyama T (2007) Qualitative estimation of the contribution of the phloem in cadmium transport to grains in rice plant (*Oryza sativa L.*). Soil Sci Plant Nutr 53:72–77
Terry N, Zayed AM, de Souza MP, Tarun AS (2000) Selenium in higher plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 51:401–432
Thiele DJ, Gitlin JD (2008) Assembling the pieces. Nat Chem Biol 4:145–147
Tripathi RD, Srivastava S, Mishra S, Singh N, Tuli R, Gupta DK, Maathuis FJM (2007) Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants. Trends Biotechnol 25:158–165
Tudoreanu L, Phillips CJC (2004) Modelling cadmium uptake and accumulation in plants. Adv Agron 84:121–157
Urbanczyk-Wochniak E, Baxter C, Kolbe A, Kopka J, Sweetlove LJ, Fernie AR (2005) Profiling of diurnal patterns of metabolite and transcript abundance in potato (*Solanum tuberosum*) leaves. Planta 221:891–903
Van Belleghem F, Cuypers A, Semane B, Smeets K, Vangronsveld JD, Haen J, Valcke R (2007) Subcellular localization of cadmium in roots and leaves of *Arabidopsis thaliana*. New Phytol 17:495–508
Vacchina V, Mari S, Czernic P, Marques L, Pianelli K, Schaumloffel D, Lebrun M, Lobinski R (2003) Speciation of nickel in hyperaccumulating plant by high-performance inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray MS/MS assisted by cloning using yeast complementation. Anal Chem 75:2740–2745
Van den Broeck K, Vandecasteele C, Geuns JMC (1998) Speciation by liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry of arsenic in mung bean seedlings used as a bioindicator for arsenic contamination. Anal Chim Acta 361:101–111
Vázquez S, Goldsbrough P, Carpena RO (2006) Assessing the relative contributions of phytochelatins and the cell wall to cadmium resistance in white lupin. Physiol Plantarum 128:487–495

Verbruggen N, Hermans C, Schat H (2009) Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants. Curr Opin Plant Biol 12:364–372

Viant MR (2008) Recent developments in environmental metabolomics. Mol Bio Syst 4:980–986

Villiers F, Ducruix C, Hugouvieux V, Jarno N, Ezan E, Garin J, Junot C, Bourguignon J (2011) Investigating the plant response to cadmium exposure by proteomic and metabolomic approaches. Proteomics 11:1650–1663

Vivas A, Moreno B, del Val C, Macci C, Masciandaro G, Benitez E (2008) Metabolic and bacterial diversity in soils historically contaminated by heavy metals and hydrocarbons. J Environ Monit 10:1287–1296

Virupaksha TK, Shrift A, Tarver H (1966) Metabolism of selenomethionine in selenium accumulator and non-accumulator *Astragalus* species. Biochim Biophys Acta 130:45–55

Vuckovic D (2012) Current trends and challenges in sample preparation for global metabolomics using liquid chromatography-mass spectrometry. Anal Bioanal Chem 403:1523–1548

Waldron KJ, Rutherford JC, Ford D, Robinson NJ (2009) Metalloproteins and metal sensing. Nature 460:823–830

Waldron KJ, Robinson NJ (2009) How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? Nat Rev Microbiol 7:25–35

Wang YD (2004) Phytoremediation of mercury by terrestrial plants. Department of Botany, PhD thesis. Stockholm University, Sweden

Wang Y, Greger M (2004) Clonal differences in mercury tolerance, accumulation, and distribution in willow. J Environ Qual 33:1779–1785

White PJ, Brown PH (2010) Plant nutrition for sustainable development and global health. Ann Bot 105:1073–1080

Wrobel K, Kannamkumarath SS, Wrobel K, Caruso JA (2003) Hydrolysis of proteins with methanesulfonic acid for improved HPLC-ICP-MS determination of selenomethionine in yeast and nuts. Anal Bioanal Chem 375:133–138

Yamaguchi N, Mori S, Baba K, Kaburagi-Yada S, Arao T, Kitajima N, Hokura A, Terada Y (2011) Cadmium distribution in the root tissues of Solanaceous plants with contrasting root-to-shoot Cd translocation efficiencies. Environ Exp Bot 71:198–206

Zayed A, Lytle CM, Terry N (1998) Accumulation and volatilization of different chemical species of selenium by plants. Planta 206:284–292

Zeini Jahromi E, Gailer J (2010) Remarkable effect of mobile phase buffer on the SEC-ICP-AES derived Cu, Fe and Zn-metalloproteome pattern of rabbit blood plasma. Metallomics 2:460–468

Zhang J, Zhao QZ, Duan GL, Huang YC (2011) Influence of sulphur on arsenic accumulation and metabolism in rice seedlings. Environ Exp Bot 72:34–40

Zhang S, Li T, Huang H, Zou T, Zhang X, Yu H, Zheng Z, Wang Y (2012) Cd accumulation and phytostabilization potential of dominant plants surrounding mining tailings. Environ Sci Poll Res 19:3879–3888

AMB Análisis Medioambiental Bioanálisis

Los metales juegan un papel fundamental en los sistemas vivos, en la regulación de numerosos procesos celulares, y en otros casos por sus efectos tóxicos o nocivos sobre el metabolismo. Por lo tanto, el estudio de los cambios inducidos por metales en las vías metabólicas celulares es crucial para la comprensión de la respuesta biológica asociada a los diferentes episodios de contaminación terrestre por metales. En este contexto, la búsqueda de biomarcadores tiene un gran interés en base al uso de las tecnologías *-ómicas*, en especial la metalómica y la metabolómica, que han demostrado ser poderosas herramientas para este propósito. La presente tesis doctoral evalúa la exposición de ratones *Mus musculus* a metales tóxicos (As, Cd y Hg), así como las interacciones entre ellos y el efecto del Se en la toxicidad del Cd y Hg, teniendo en cuenta los cambios inducidos tanto en el metaloma como en el metaboloma. Para ello, en el presente estudio se han desarrollado numeroso métodos analíticos que aportan una gran novedad en este campo. Los resultados obtenidos en condiciones controladas en el laboratorio se han extrapolado a ratones de vida libre (genéticamente homólogos) capturados en el Parque Nacional de Doñana y su entorno (suroeste de España), afectado por contaminación metálica como consecuencia de las actividades agrícolas, industrial y minera que se practica en su entorno. En resumen, estos estudios nos van a permitir comprender mucho mejor los efectos de la acción de los metales en los sistemas naturales y hacer frente a su toxicidad.



CYSMA
Centro de Investigación en Salud y Medio Ambiente

ceiA3
campus de excelencia internacional agroalimentario

Universidad de Huelva