

# Universidad de Huelva

Departamento de Química y Ciencia de los Materiales



**Estudio de interacciones metal-biomolécula en organismos  
modelos *Mus musculus*/*Mus spretus*. Diagnóstico de problemas  
ambientales**

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

**Rocío Jara Biedma**

Fecha de lectura: 27 de enero de 2014

Bajo la dirección de los doctores:

Jose Luíz Gómez Ariza  
Tamara García Barrera

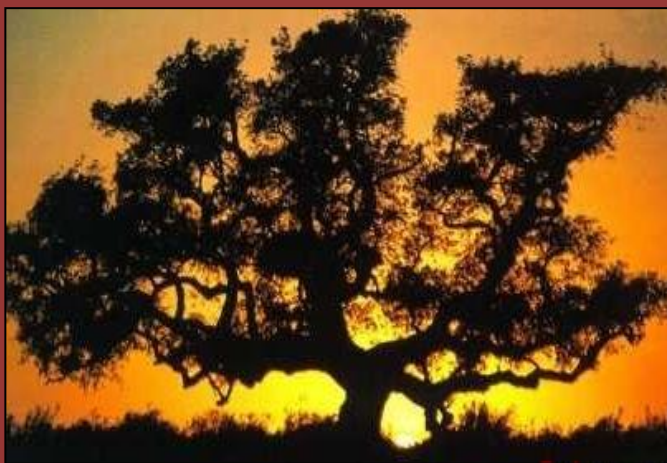
**Huelva, 2014**



**ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES METAL-  
BIOMOLÉCULA EN ORGANISMOS  
MODELOS *Mus musculus*/*Mus spretus*.  
DIAGNÓISIS DE PROBLEMAS AMBIENTALES**

**TESIS DOCTORAL**

**Rocío Jara Biedma**



**UNIVERSIDAD DE HUELVA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA Y CIENCIA DE LOS MATERIALES**  
**“PROFESOR JOSÉ CARLOS VÍLCHEZ MARTÍN”**



**Universidad  
de Huelva**

**Estudio de interacciones metal-biomolécula en organismos  
modelos *Mus musculus*/*Mus spretus*. Diagnóstico de problemas  
ambientales**

**PROGRAMA DE DOCTORADO:  
TÉCNICAS INSTRUMENTALES EN QUÍMICA**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR POR:**

**Rocío Jara Biedma**

**Bajo la dirección de los directores:**

**Jose Luís Gómez Ariza**

**Tamara García Barrera**

**Huelva, 2014**



**ESTUDIO DE INTERACCIONES METAL-BIOMOLECULA  
EN ORGANISMOS MODELOS MUS MUSCULUS/MUS SPRETUS.  
DIAGNOSIS DE PROBLEMAS AMBIENTALES**

Directores:

*Fdo. Jose Luís Gómez Ariza*

Catedrático de Universidad

*Fdo. Tamara García Barrera*

Profesora Titular de Universidad



**Universidad  
de Huelva**

**UNIVERSIDAD DE HUELVA  
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA Y  
CIENCIA DE LOS MATERIALES  
“PROFESOR JOSÉ CARLOS VÍLCHEZ MARTÍN”**

Trabajo presentado para optar al Grado de Doctor por:

*Fdo. Rocío Jara Biedma*

Licenciada en Ciencias Químicas



**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 DE INTERACCIONES METAL-BIOMOLECULA EN ORGANISMOS MODELOS *MUS MUSCULUS/MUS SPRETUS*. DIAGNOSIS DE PROBLEMAS AMBIENTALES”, realizado por Dña. Rocío Jara Biedma, 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, 26 de Noviembre de 2013

Fdo. Jose Luis Gómez Ariza



## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis Directores de Tesis, Jose Luís 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, así como por la dedicación, constancia y esfuerzo que habéis puesto en todo momento para la finalización de esta investigación.

Agradezco al Ministerio de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo de la Junta de Andalucía por la concesión de una beca de personal investigador en formación con cargo al proyecto CVI-08-3829 así como a la directora de dicho proyecto, Carmen Pueyo de la Cuesta, ya que sin este medio de financiación no hubiera sido posible la realización de esta Tesis Doctoral.

A su vez quisiera agradecer al Prof. Juan López Barea, Prof. Carmen Pueyo de la Cuesta y Prof. Nieves Abril Díaz de la Universidad de Córdoba, su aportación a esta tesis desde un punto de vista transcriptómico y proteómico, sus valiosos consejos y sugerencias han ofrecido una colaboración siempre enriquecedora y gratificante. A Ricardo Fernández Cissal y Amalia Fernández Vioque por su inestimable colaboración, ayuda y orientación en el muestreo de ratones *Mus spretus* en el Parque Nacional de Doñana.

Agradecer al grupo de investigación del Prof. Manuel Callejón Monchón, Rut Fernández Torres y Mercedes Villar Navarro de la Universidad de Sevilla, por su activa implicación y ayuda en los proyectos compartidos.

También quisiera agradecer a Dra. Heidi Goenaga Infante por darme la oportunidad de permanecer en su grupo de investigación durante 4 meses donde he podido desarrollar mis conocimientos científicos, por su atención y hospitalidad así como sus valiosas sugerencias y discusiones científicas. A todos mis compañeros de LGC, en especial a Susana Cuello Núñez, Ana Pardos Pardos y Raquel Larios Ardila, por todo el cariño, atención y ayuda que me habéis brindado desde el primer día que llegué a LGC,

haciéndome sentir como si estuviera en casa. Gracias a vosotras, mi estancia en Londres ha sido inolvidable. De manera especial, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a Susana por su activa implicación y ayuda desinteresada en el proyecto que compartimos transmitiéndome todos sus conocimientos en la técnica FFF (Field-Flow Fractionation), por la asombrosa capacidad de trabajo, fuerza y entusiasmo que ha puesto durante mi estancia en LGC y lo más importante, por llegar a ser una gran amiga.

Como no podía ser menos, quiero dar las gracias todos mis compañeros de laboratorio que estuvieron y a los que están: Jose Manuel Manso, Rocío Castilla, Miguel Ángel García, Raúl González, Amanda Gago, Macarena González, Jesica Vélez, Fernando Moreno y Verónica Gómez, con los he compartido tantas horas durante estos años, por su ayuda y consejos, por hacer más amenas las horas de trabajo y sobre todo por las risas y ánimos en los momentos bajos.

También quiero expresar mi más sincera gratitud a todas mis amigas por ofrecerme esa verdadera amistad de tantos años, por ser un apoyo indispensable animándome a seguir adelante y por interesarse siempre por esta tesis, aunque llegara a convertirse en mi monotema.

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, Aurelio y Ana María, gracias por guiarme en todos mis caminos, por esforzaros tanto, 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 vida tan importantes que me habéis inculcado como el amor desinteresado, el espíritu de trabajo, esfuerzo y sacrificio así como el respeto a los demás. A mis abuelos y hermanos que siempre han creído en mí, por el apoyo incondicional, palabras de ánimo y consejos que he recibido durante el desarrollo de esta tesis. A Manolo, eres una de las personas más maravillosas que he conocido. Verdaderamente tú, has vivido lo que no ha vivido nadie con esta tesis. Gracias por tolerar mis momentos de enfado y nerviosismo; por la comprensión y paciencia que has mostrado en todo momento. Gracias por confiar en mí y por el apoyo incondicional en la realización de esta tesis.

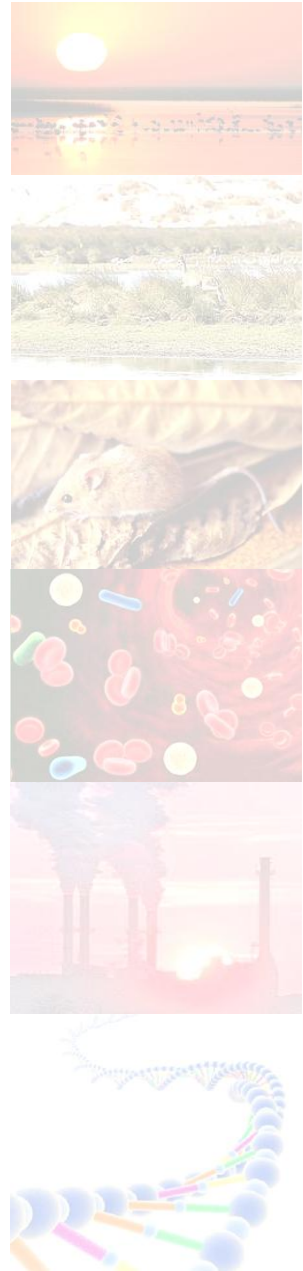
*A mis padres, hermanos y abuelos*



***“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado.  
Un esfuerzo total es una victoria completa”***

Mahatma Gandhi





# ÍNDICE



**ÍNDICE**

<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>vii</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>xiii</b>
<b>RESUMEN/SUMMARY.....</b>	<b>1</b>
<b>OBJETIVOS/OBJETIVES.....</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>17</b>
<b>1. La problemática de la contaminación ambiental y su diagnosis.....</b>	<b>19</b>
<b>2. Técnicas de análisis masivo: Metalómica.....</b>	<b>29</b>
<b>3. Bioindicadores de contaminación ambiental (<i>Mus musculus/ Mus spretus</i>).....</b>	<b>39</b>
<b>4. Biomarcadores.....</b>	<b>45</b>
4.1. Enzimas de biotransformación como biomarcadores.....	48
4.2. Estrés oxidativo: Biomarcadores de daño oxidativo.....	52
4.3. Otros biomarcadores de contaminación ambiental: las metalotioneínas.	55
<b>5. Situación ambiental del Parque Nacional de Doñana.....</b>	<b>61</b>
5.1. Doñana como enclave natural.....	61
5.2. Contaminación del Parque Nacional de Doñana.....	69
<b>6. Técnicas analíticas para el estudio de respuestas biológicas.....</b>	<b>71</b>
6.1. Acoplamiento multidimensional de técnicas analíticas para el análisis de biomoléculas en especiación bioquímica.....	73
6.1.1. Detección específica elemental de metalobiomoléculas mediante ICP-MS.....	75
6.1.2. Análisis de especies de elementos traza en sistemas biológicos mediante acoplamiento de técnicas cromatográficas ortogonales de alta resolución. HPLC-ICP-MS.....	78



6.1.3. Análisis de especies de elementos traza en sistemas biológicos mediante acoplamiento de CE-ICP MS.....	80
6.1.4. Análisis de metalobiomoléculas mediante electroforesis en gel con detección LA-ICP-MS.....	80
6.1.5. Identificación de metaloespecies por espectrometría de masas molecular.....	83
<b>PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>87</b>
<b>1. Instrumentación Analítica.....</b>	<b>89</b>
1.1. Instrumentación empleada para la preparación de muestra.....	89
1.2. Instrumentación empleada las separaciones cromatográficas.....	90
1.3. Espectrómetro de masas atómico.....	91
1.4. Espectrómetro de masas molecular.....	94
<b>2. Reactivos y disoluciones patrón.....</b>	<b>95</b>
<b>3. Procedimientos experimentales.....</b>	<b>96</b>
3.1. Zonas de muestreo de ratones silvestres ( <i>Mus spretus</i> ), suelos y sedimentos.....	96
3.2. Experimentos de exposición con ratones de laboratorio <i>Mus musculus</i> .	99
3.2.1. Experimento de exposición a cadmio.....	100
3.2.2. Experimento de exposición a mercurio.....	101
3.2.3. Experimento de exposición a arsénico.....	102
3.3. Manipulación de los animales de experimentación y tratamiento de los órganos. Preparación de extractos citosólicos.....	104
3.4. Determinación del contenido total de metales en los extractos citosólicos de hígado y riñón de <i>Mus spretus</i> .....	106
3.5. Determinación del contenido total de metales en suelos y sedimentos..	106
3.6. Determinación del contenido total de proteínas en extractos citosólicos de hígado y riñón de ratón.....	107
3.7. Análisis de los extractos citosólicos mediante cromatografía de	109



exclusión de tamaño.....	
3.8. Purificación de metalomoléculas en las fracciones citosólicas de <i>Mus musculus</i> y <i>Mus spretus</i> mediante sistemas cromatográficos ortogonales.....	113
3.8.1. Cromatografía en fase reversa de las fracciones citosólicas de hígado de <i>Mus musculus</i> .....	113
3.8.2. Cromatografía de intercambio aniónico aplicada a las fracciones citosólicas de hígado y riñón de <i>Mus spretus</i> .....	114
3.9. Identificación de las fracciones de metalotioneina de hígado de <i>Mus musculus</i> mediante nESI-qTOF-MS.....	115
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>117</b>
1. Estudio de la contaminación ambiental en el Parque Nacional de Doñana y alrededores mediante análisis de especies metálicas en tejidos de organismos bioindicadores <i>Mus musculus</i> / <i>Mus spretus</i> .....	119
2. Evolución de los complejos metálicos de las isoformas de metalotioneina en células hepáticas de <i>Mus musculus</i> durante experiencias de exposición a cadmio.....	153
<b>CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.....</b>	<b>171</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>181</b>





## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo biogeoquímico de metales pesados.....	21
<b>Figura 2.</b> Relación entre el análisis de especiación, la metalómica y sus áreas específicas de bioanálisis.....	25
<b>Figura 3.</b> Esquema del incremento de la complejidad molecular en metalómica.....	27
<b>Figura 4.</b> Estrategias principales desarrolladas en metalómica y metaloproteómica .....	29
<b>Figura 5.</b> Ciencias -ómicas como herramientas de investigación de la biología molecular para analizar de forma global todo el conjunto de moléculas presentes en una muestra biológica desde el ADN, pasando por transcripción génica y traducción de proteínas hasta la función biológica llevada a cabo por los metabolitos. Muchos de estos pasos son mediados por especies metálicas.....	33
<b>Figura 6.</b> Acoplamiento analítico multidimensional (MMA) utilizado en metalómica.....	36
<b>Figura 7.</b> Técnicas analíticas usadas en metalómica y su relación con otras ómicas.....	39
<b>Figura 8.</b> Ratón silvestre <i>Mus spretus</i> .....	42
<b>Figura 9.</b> Ratón de laboratorio <i>Mus musculus</i> .....	44
<b>Figura 10.</b> Esquema representativo de las respuestas en batería de los biomarcadores pertenecientes a distintos niveles de organización debido a la exposición a sustancias tóxicas.....	48
<b>Figura 11.</b> Estructura tridimensional de MT-1 con 7 átomos de cadmio de <i>Mus musculus</i> . A: corresponde a la estructura de dominio $\alpha$ . B: corresponde a la estructura de dominio $\beta$ . Estas estructuras pertenecen a la base de datos “MMDB” con la identificación 12319 y 12320 para las estructuras $\alpha$ y $\beta$ respectivamente. En ambos casos se aprecian los iones de cadmio en el centro de las estructuras.....	58
<b>Figura 12.</b> Situación geográfica del Parque Nacional de Doñana.....	62
<b>Figura 13.</b> Duna móvil del Parque Nacional de Doñana.....	63
<b>Figura 14.</b> Vera o zona ecotonal de Doñana.....	64



<b>Figura 15.</b> Pinar de pino piñonero ( <i>Pinus pinea</i> ) (izquierda) y un bosque de alcornoques ( <i>Quercus suber</i> ) (derecha) del Parque Nacional de Doñana.....	65
<b>Figura 16.</b> Águila Imperial Ibérica ( <i>Aquila adalberti</i> ) y Lince Ibérico ( <i>Lynx pardina</i> ).....	66
<b>Figura 17.</b> Marismas del Parque Nacional de Doñana .....	68
<b>Figura 18.</b> Rotura del muro de contención de la balsa minera de Aznalcóllar.....	70
<b>Figura 19.</b> Áreas objetivo y especies de interés en especiación química .....	72
<b>Figura 20.</b> Acoplamiento de técnicas analíticas para el estudio de biomoléculas..	74
<b>Figura 21.</b> Diagrama esquemático del ICP-MS.....	76
<b>Figura 22.</b> Acoplamiento entre técnicas cromatográficas de alta resolución (HPLC) o electroforesis capilar (CE) a ICP-MS provisto de tres tipos de analizadores de masas: cuadrupolo, sector magnético y tiempo de vuelo.....	79
<b>Figura 23.</b> Principales modos de adquisición de datos en electroforesis en gel mediante LA- ICP- MS para el análisis de metalomoléculas en muestras biológicas. a) Escaneo de cada carril, b) Irradiación de cada spot, c) Modo imagen.....	82
<b>Figura 24.</b> Fotografía de la fuente nanospray (izquierda); Imagen del capilar próximo al orificio de entrada al espectrómetro de masas (derecha)....	84
<b>Figura 25.</b> Esquema del funcionamiento del espectrómetro de masas MALDI-TOF.....	86
<b>Figura 26.</b> Zonas de muestreo en el Parque Nacional de Doñana y alrededores...	98
<b>Figura 27.</b> Trampa Sherman y ratón capturado dentro de ella.....	99
<b>Figura 28.</b> Ratones <i>Mus musculus</i> en jaulas metabólicas durante los experimentos de exposición.....	100
<b>Figura 29.</b> Experimento de exposición a cadmio en ratones de laboratorio <i>Mus musculus</i> .....	101
<b>Figura 30.</b> Experimento de exposición a mercurio en ratones de laboratorio <i>Mus musculus</i> .....	102



<b>Figura 31.</b> Cánula gástrica usada para la administración oral del arsénico.....	103
<b>Figura 32.</b> Experimento de exposición a arsenico en ratones de laboratorio <i>Mus musculus</i> .....	103
<b>Figura 33.</b> Diagrama esquemático de SEC-HPLC-UV-ICP-ORS-MS usado en este estudio.....	109
<b>Figura 34.</b> Tiempos de retención de los calibrantes de la columna Superdex Peptide y su correpondiente curva de calibración.....	111
<b>Figura 35.</b> Tiempos de retención de los calibrantes de la columna Superdex 75 y su correpondiente curva de calibración.....	111





## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Principales tipos de contaminantes mediambientales y sus fuentes.....	20
<b>Tabla 2.</b> Comparación fisiológica entre <i>Mus musculus</i> / <i>Mus spretus</i> .....	43
<b>Tabla 3.</b> Ejemplo de biomarcadores, repuestas, nivel de organización al que pertenecen, aparición en el tiempo y niveles de detección.....	47
<b>Tabla 4.</b> Diferentes isótopos de los elementos objeto de estudio, sus abundancias relativas y las principales interferencias que afectan a cada uno de ellos..	92
<b>Tabla 5.</b> Coordenadas UTM de las zonas de muestreo estudiadas y número y sexo de los ratones <i>Mus spretus</i> capturados en estas.....	98
<b>Tabla 6.</b> Recuperación y límite de detección obtenidos para cada metal en el análisis de suelos y sedimentos del Parque Nacional de Doñana y alrededores.....	107
<b>Tabla 7.</b> Preparación de la curva de calibrado mediante el método Bradford.....	108
<b>Tabla 8.</b> Condiciones experimentales usadas para SEC e ICP-MS.....	110
<b>Tabla 9.</b> Condiciones experimentales utilizadas en SEC preparativa.....	112
<b>Tabla 10.</b> Condiciones experimentales usadas para eliminar sales.....	112
<b>Tabla 11.</b> Condiciones experimentales óptimas para el análisis mediante RPC.....	114
<b>Tabla 12.</b> Condiciones experimentales usadas en cromatografía de intercambio aniónico.....	115
<b>Tabla 13.</b> Condiciones experimentales usadas para nESI-qQTOF-MS.....	115



**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>OCDE</b>	Organismo para la Cooperación y el Desarrollo Económico
<b>PCBs</b>	Compuestos bifenilos policlorados
<b>PAHs</b>	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
<b>AAS</b>	Espectroscopia de absorción atómica
<b>ICP-MS</b>	Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente
<b>DPASV</b>	Voltamperometría anódica de pulso diferencial
<b>XRF</b>	Fluorescencia de Rayos X
<b>ICP-OES</b>	Espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente
<b>ICP-AES</b>	Espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente
<b>PIXE</b>	Emisión de rayos X inducida por partículas
<b>GC-ECD</b>	Cromatografía gaseosa con detector de captura electrónica
<b>GC-FID</b>	Cromatografía gaseosa con detector de ionización de llamas
<b>2-DE</b>	Electroforesis Bidimensional
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución
<b>CE</b>	Electroforesis capilar
<b>GC</b>	Cromatografía de gases
<b>INAA</b>	Análisis instrumental por activación con neutrones
<b>ESI</b>	Fuente de ionización por electrospray
<b>MALDI</b>	Fuente de ionización-desorción láser asistida por matriz
<b>Q-TOF</b>	Cuadrupolo-tiempo de vuelo
<b>QqQ</b>	Triple cuadrupolo
<b>IT</b>	Trampa iónica
<b>Q-Trap</b>	Cuadrupolo-trampa de iones
<b>QqQTOF</b>	Triple cuadrupolo tiempo de vuelo
<b>MAA</b>	Procedimientos analíticos multidimensionales
<b>SEC</b>	Cromatografía de exclusión de tamaño



<b>RPC</b>	Cromatografía en fase reversa
<b>IEC</b>	Cromatografía de intercambio iónico
<b>HILIC</b>	Cromatografía de interacción hidrofílica
<b>IMAC</b>	Cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados
<b>AEC</b>	Cromatografía de intercambio aniónico
<b>Q</b>	Analizador de masas cuadrupolo
<b>TOF</b>	Analizador de masas tiempo de vuelo
<b>SF</b>	Analizador de masas de sector magnético
<b>MC</b>	Analizador de masas multicolector
<b>GE</b>	Electroforesis en gel
<b>LA</b>	Ablación láser
<b>FTIRC</b>	Resonancia de ion ciclotrón con transformada de Fourier
<b>MS</b>	Espectrometría de masas
<b>nHPLC</b>	Nano cromatografía líquida de alta resolución
<b>IEF</b>	Isoelectroenfoque
<b>BN</b>	Blue Native
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>PAGE</b>	Electroforesis en geles de poliacrilamida
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
<b>XRF SR</b>	Fluorescencia de rayos X inducida por radiación de sincrotrón
<b>XAS</b>	Espectrometría de absorción de rayos X
<b>Cys</b>	Cisteína
<b>CYP</b>	Citocromo P450
<b>NADPH</b>	Nicotín Adenín Dinucleótido (fosfato) reducido
<b>UDP</b>	Uridín Difosfato
<b>Ah</b>	Hidrocarburo de Aril
<b>GSTs</b>	Glutación-S-transferasas
<b>GSH</b>	Glutación reducido



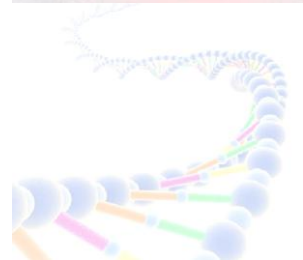
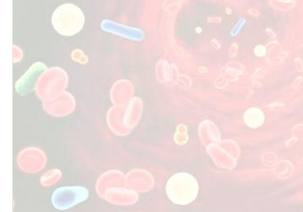
<b>PAPSO</b>	Fosfoadenosín fosfosulfato
<b>EROs</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>His</b>	Histidina
<b>Trp</b>	Triptófano
<b>Pro</b>	Prolactina
<b>Cys</b>	Cisteína
<b>LOOH</b>	Lipohidroperóxidos
<b>SOD</b>	Superoxido dismutasa
<b>CAT</b>	Catalasa
<b>GSHPx</b>	Glutación peroxidasa
<b>MTs</b>	Metalotioneínas
<b>isoMT</b>	Isoformas de MT
<b>IUPAC-IUB</b>	International Union of Pure and Applied Chemistry and International Union of Biochemistry
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>ARE</b>	Elementos de respuesta antioxidantes
<b>MRE</b>	Elementos de respuesta metálica
<b>S</b>	Sur
<b>N</b>	Norte
<b>SO</b>	Suroeste
<b>NO</b>	Noroeste
<b>PND</b>	Parque Nacional de Doñana
<b>NE</b>	Noreste
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>CZE</b>	Electroforesis Capilar de Zona
<b>AFC</b>	Cromatografía de Afinidad
<b>UV/Vis</b>	Ultravioleta/Visible
<b>nESI</b>	Nanoelectrospray
<b>CID</b>	Disociación inducida por colisión

## INDICE

---



<b>Cps</b>	Cuentas por segundo
<b>LDP</b>	El Lucio del Palacio
<b>ROC</b>	Arroyo La Rocina
<b>PAR</b>	El Partido
<b>AJO</b>	El Ajolí
<b>MAT</b>	El Matochal
<b>TCEP</b>	Hidrocioruro de tris-(2-carboxietil)fosfina



# RESUMEN/SUMMARY





La presencia creciente de una gran variedad de contaminantes químicos en el medio ambiente supone un riesgo para la salud de los organismos presentes en ellos y los correspondientes ecosistemas. La monitorización medioambiental convencional de los ecosistemas se lleva a cabo mediante análisis químico de elementos traza tóxicos (por ejemplo, Cd, As, Pb, Hg, etc), contaminantes orgánicos (plaguicidas, PCBs, PAHs), contaminantes emergentes (disruptores endocrinos, productos farmacéuticos, productos para el cuidado de la salud y detergentes) y, recientemente, las nanopartículas. Sin embargo, los análisis químicos tradicionales no permitan conocer si los niveles de contaminantes químicos presentes en el medio ambiente provocan efectos sobre los organismos, especialmente considerando su acción conjunta, y si suponen una amenaza real para los ecosistemas. Todo esto ha provocado el desarrollo de una serie de metodologías que evalúan respuestas biológicas asociadas a la contaminación en organismos vivos usados como bioindicadores de contaminación ambiental, ya que estos reflejan el efecto de los contaminantes sobre el metabolismo celular y la homeostasis global. Entre estas metodologías se encuentran el uso de biomarcadores, parámetros biológicos medidos en los organismos expuestos (bioindicadores) los cuales indican, al alterarse sus niveles, la exposición a contaminantes, sus efectos biológicos o los riesgos de su presencia en los ecosistemas. La evaluación de biomarcadores en organismos vivos puede ayudar a diagnosticar el impacto y riesgo de los contaminantes en los organismos, poblaciones o ecosistemas.

El presente estudio considera la evaluación y seguimiento de la contaminación ambiental del Parque Nacional de Doñana y sus alrededores (situado en la zona suroeste de España). Este entorno natural que fue declarado Reserva de la Biosfera, es un mosaico de ecosistemas con un grado de biodiversidad único en Europa. Sin embargo, está amenazado por diversos factores concurrentes, como las actividades agrícolas desarrolladas en su entorno, la influencia de zonas industriales próximas (Polo Químico de Huelva) y los riesgos derivados de la actividad minera, como demostró el vertido de las Minas de Aznalcollar en 1998. El presente trabajo se ha llevado a cabo en 5 zonas diferentes del Parque Nacional de Doñana y alrededores: Lucio del Palacio (LDP), situado en el interior del Parque, considerada zona no contaminada y utilizada como control y otras 4 zonas situadas en el entorno del Parque, La Rocina (ROC), El Partido (PAR), El Ajolí (AJO) y El Matochal (MAT), con diferentes niveles de contaminación dependiendo de su proximidad a zonas de actividad agrícola, minera o industrial. Se ha

usado como especie bioindicadora el ratón de vida libre *Mus spretus*, que es una especie muy prolífica en estas zonas. Se ha demostrado experimentalmente que el ratón de vida libre *Mus spretus* es genéticamente homólogo al ratón de laboratorio *Mus musculus*, ya secuenciado, lo que permite utilizar información proteómica y metalómica de *Mus musculus* para identificar proteínas expresadas en el *Mus spretus*.

El estudio de la contaminación ambiental del Parque Nacional de Doñana y alrededores se ha llevado a cabo mediante el análisis de biomarcadores relacionados con el estrés ambiental, concretamente metalobiomoléculas, utilizando *Mus spretus* capturado en las cinco zonas de estudio previamente mencionadas. Para ello se ha desarrollado un procedimiento metalómico basado en el acoplamiento de la cromatografía de exclusión de tamaño con detección elemental ICP-MS, el cual se ha aplicado a los extractos citosólicos de diferentes órganos de este ratón (cerebro, hígado y riñón) con objeto de identificar posibles cambios de expresión de metalobiomoléculas como consecuencia de la contaminación ambiental.

A su vez, se han llevado a cabo separadamente experimentos de exposición a Cd, As y Hg en *Mus musculus*, con objeto de obtener información de la respuesta biológica de estos organismos modelo, es decir, cambios de expresión de metalobiomoléculas como consecuencia de la exposición a estos contaminantes, y posteriormente comparar estos resultados con aquellos obtenidos en *Mus spretus*. Para ello, una vez finalizados cada uno de los experimentos de exposición, se analizaron los correspondientes extractos citosólicos de los diferentes órganos de *Mus musculus* (cerebro, hígado y riñón) usando el mismo procedimiento metalómico mencionado anteriormente. El estudio metalómico comparativo de la respuesta biológica de *Mus musculus* sometido a experiencias de exposición y *Mus spretus* procedente de las zonas de estudio, muestra la sobreexpresión predominante de una fracción que contiene Cd, Cu y Zn, correspondiente a la presencia de metalotioneína, y otra fracción que contiene Cu y Zn correspondiente a la superóxido dismutasa, ambas presentes en hígado y riñón de *Mus spretus* en las zonas contaminadas ROC y MAT. La presencia de As en estas zonas contaminadas provoca la presencia de especies arsenicales metiladas como MMA y DMA en el hígado y riñón de *Mus spretus*. Estos resultados indican la interacción de estos metales tóxicos que abundan en las zonas contaminadas con los organismos de vida libre que habitan en ellas. La ausencia de respuesta biológica de *Mus spretus* en relación a la presencia de Hg confirma la baja incidencia medioambiental de dicho

elemento en las áreas consideradas. Los resultados en cerebro no muestran diferencias significativas entre los perfiles de *Mus spretus* en zonas contaminadas y no contaminadas, posiblemente debido a la actividad de la barrera hematoencefálica que protege dicho órgano.

La aplicación de este procedimiento metalómico a las especies *Mus spretus* /*Mus musculus*, constituye una buena aproximación analítica para el estudio de la biodisponibilidad y el impacto medioambiental de los metales en los organismos vivos, utilizando la medida de la respuesta biológica de estos frente al estrés medioambiental.

Por otro lado, en relación a lo anterior, se ha llevado a cabo el estudio de los complejos metálicos de las metalotioneinas (MT) que se forman en las células hepáticas de *Mus musculus* sometido a experiencias de exposición a cadmio. Dicho experimento se ha llevado a cabo mediante inyección subcutánea de dosis crecientes de cadmio (en forma de  $\text{CdCl}_2$ ) desde 0,1 a 1 mg/Kg/día durante un total de 10 días. Se consideran tres subgrupos de ratones, A, B y C, correspondientes a subcolonias separadas y sacrificadas los días 2, 6 y 10 de exposición, respectivamente. Por otro lado, se utilizó un grupo control al que se le inyectó subcutáneamente 100  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura diariamente, durante los 10 días del experimento. Los extractos de hígado de *Mus musculus* de los dos grupos más expuesto, B y C, fueron analizados usando un procedimiento metalómico basado en el uso de un sistema cromatográfico bidimensional, SEC-RPC, acoplado a un sistema de detección elemental como ICP-MS, y en paralelo con un sistema de detección molecular nESI-qTOF-MS, con objeto de aislar, purificar e identificar los complejos metálicos de las metalotioneinas formados durante el experimento de exposición.

Los resultados nos permite establecer cambios estequiométricos de los complejos de Cd, Cu y Zn con las isoformas I y II de la metalotioneina a lo largo de la exposición a cadmio, observándose a mitad del experimento la presencia de isoformas parcialmente coordinadas con átomos de Cd (número de átomos de Cd inferior a 7), coexistiendo en la misma molécula con átomos de Cu y Zn. Sin embargo, al progresar la exposición a Cd dichas isoformas evolucionan a especies en las que el Cd ocupa todas las posiciones de coordinación de las MTs ( $\text{Cd}_7\text{MT}$ ). A su vez, los resultados muestran una mayor afinidad del Cd por la MT I que por la MT II ya que se ha podido observar señales correspondientes a los complejos de MT II con un número de átomos de cadmio inferior



al observado para los complejos de MT I. Todos estos resultados proporcionan información sobre evolución de la estequiometría de metales unidos a diferentes isoformas de metalotioneína y la interacción cooperativa entre metales y biomoléculas en las células, como la sustitución de cobre o zinc por cadmio, en hígado de *Mus musculus* a lo largo de la exposición a dosis crecientes de este elemento. El estudio en profundidad de estos complejos metálicos pueden ayudar a esclarecer el papel biológico de las MTs, y los resultados obtenidos se pueden extrapolar a la especie de vida libre, como el *Mus spretus*, para evaluar la respuesta biológica relacionada con las MTs a largo plazo. De esta forma, se puede evaluar de forma integrada, el impacto de la contaminación ambiental en ecosistemas amenazados.

The increasing presence of a variety of chemical contaminants in the environment has a risk to the health of organisms and ecosystems. 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, traditional chemical analysis do not allow to know if the levels of chemical contaminants in the environment cause effects on organisms, and can threat to ecosystems. All these facts have led to the development of a number of methodologies to assess biological responses associated with contamination in living organisms used as bioindicators of environmental pollution, since they reflect the effect of contaminants on cellular metabolism and global homeostasis. These methodologies include the use of biomarkers, which are biological parameters measured in bioindicator organisms show by the alteration of their levels, the occurrence of pollutants and their biological effects or risks. The assessment of biomarkers in living organisms (bioindicators) can help diagnose the impact and risk of contaminants at certain levels on organisms, populations or ecosystems.

This study focuses the assessment and monitoring of environmental pollution of Doñana National Park and surroundings (South West Spain). This natural environment was declared Biosphere Reserve, and is a mosaic of ecosystems with a degree of biodiversity unique in Europe. However, it is threatened by various harmful factors, such as neighboring agricultural, industrial (Chemical Pole of Huelva) and mining activities, as well as the toxic mud spillage from Aznalcollar mine that reached the northeastern boundary of the Park in 1998. The present study was performed in 5 different areas of Doñana National Park and surrounding: one of them located at the center of the Park, Lucio Palacio (LDP), considered as non contaminated area (according to the previous results) which has been used as control and the other four areas, La Rocina (ROC), El Partido (PAR), El Ajolí (AJO) and El Matochal (MAT), located in the surroundings of the Park with different levels of pollution due to their proximity to contamination sources. The free-living mouse *Mus spretus* has been used as a bioindicator because it is a very prolific species in these areas. It has been experimentally demonstrated that *Mus spretus* is genetically homologous to the sequenced mouse *Mus musculus* (classical inbred laboratory species), allowing the use

of proteomics and metallomics information of *Mus musculus* to identify proteins over-/down-expressed by *Mus spretus*.

The study to assess the environmental pollution of Doñana National Park and surroundings was performed by analysis of biomarkers related to environmental stress, specifically metallobiomolecules, in *Mus spretus* captured in the five selected areas previously mentioned. For that reason, a metallomic procedure based on the coupling of size exclusion chromatography (SEC) with elemental detection system ICP-MS has been developed and the cytosolic extracts from different organs (brain, liver and kidney) of this mouse were analyzed in order to identify possible changes in metallobiomolecules expression as a result of environmental pollution.

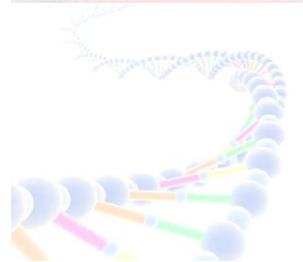
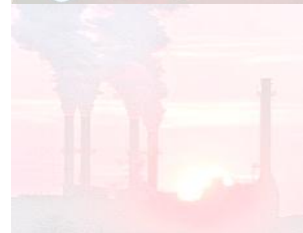
Additionally, exposure experiments of *Mus musculus* to different toxic metals (Cd, As and Hg), under controlled laboratory conditions, have been performed to obtain information about the biological response of this species (evaluated by change in metallobiomolecules expression) as a result of exposure to these pollutants, for later comparison with those in *Mus spretus*. For this purpose, after each experiment the corresponding cytosolic extracts from different organs (brain, liver and kidney) of *Mus musculus* were analyzed using the same metallomic procedure mentioned previously. The comparative metallomic study of the biological response of *Mus musculus* under exposure experiments and *Mus spretus* from the areas under study shows predominantly the up-regulation of a fraction containing Cd, Zn and Cu corresponding to the metallothionein, as well as another fraction containing Cu, Zn, corresponding to superoxide dismutase in liver and kidney of *Mus spretus* from contaminated areas, MAT and ROC. The abundance of As in these contaminated areas provokes the presence of methylated arsenic species as MMA and DMA in liver and kidney of *Mus spretus*. These results denote the interplay of these toxic metals on free-living organisms from contaminated areas. The absence of response in relation to the presence of Hg confirms the low environmental incidence of this element in the area considered. Brain results show no significant differences between the profiles of *Mus spretus* from contaminated and uncontaminated areas, possibly due to the blood brain barrier activity.

The application of this metallomic procedure to *Mus spretus* / *Mus musculus* species is a good analytical approach to assess the bioavailability and environmental

impact of metals in living organisms, by evaluating their biological response under environmental stress.

On the other hand, the study of metal complexes of metallothioneins (MTs) which are formed in the liver cells of *Mus musculus* under cadmium exposure has been performed. Exposure experiments were performed by subcutaneous injection (100  $\mu\text{L}$ ) of increasing doses of 0.1 to 1 mg Cd (in the form of  $\text{CdCl}_2$ ) 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  $\mu\text{L}$  of ultrapure water per day for 10 days. Liver extracts of the two most exposed groups, B and C, were analyzed using a developed metallomic procedure based on the use of a two-dimensional chromatography, SEC followed by RPC, combined in parallel with inductively coupled plasma octopole reaction cell mass spectrometry (ICP-ORS-MS) and nanospray ionization time-of-flight mass spectrometry (nESI-qTOF-MS) to isolate, purify and identify the metallothionein metal complexes formed along cadmium exposure experiment. The results allow us to appreciate changes in the stoichiometry of Cd, Cu and Zn complexes with MT isoforms I and II along cadmium exposure. Half of the experiment, these isoforms partially metallated with Cd atoms (number of Cd atoms less than 7) that coexist with Cu and Zn atoms were observed. However, the last days of exposure experiment, completely metallated MT isoforms with Cd atoms ( $\text{Cd}_7\text{MT}$ ) were observed. Additionally, the results show that affinity of Cd for MT I are higher than that for MT II, so that signals corresponding to MT II complexes with a number of cadmium atoms lower than those observed for MT complexes I have been observed. These results provide information about metal-binding stoichiometry of MT and cooperation of metal binding, such as the substitution of copper or zinc by cadmium, in *Mus musculus* liver along cadmium exposure. In-depth study of these metal complexes may help to elucidate the biological role of MTs and additionally the results can be extrapolated to the free-living species *Mus spretus* to evaluate the biological response of MTs during long term environmental pollution and the impact of environmental pollution in threatened ecosystems.





# OBJETIVOS/OBJETIVES





El presente trabajo tiene como objetivo general la evaluación y seguimiento de la contaminación ambiental del Parque Nacional de Doñana y alrededores mediante el estudio de biomarcadores relacionados con el estrés ambiental, concretamente metal-biomoléculas, usando como bioindicador el ratón de vida libre *Mus spretus*, ampliamente distribuido en el Parque. El desarrollo de dicho objetivo engloba:

1. Seguimiento y evaluación de la contaminación ambiental en 5 zonas del Parque Nacional de Doñana y alrededores: una de ellas situada en el interior del mismo, Lucio del Palacio (LDP) considerada zona no contaminada (de acuerdo con resultados anteriores). Esta área se va a utilizar como control. Asimismo, se utilizarán otras 4 zonas situadas en el entorno del Parque, La Rocina (ROC), El Partido (PAR), El Ajolí (AJO) y El Matochal (MAT), con diferentes niveles de contaminación debido a su proximidad a zonas de actividad agrícola, minera e industrial. Para ello se llevará a cabo el estudio de metalobiomoléculas en diferentes órganos de la especie bioindicadora, *Mus spretus*, procedente de las 5 zonas mencionadas, utilizando un procedimiento metalómico basado en el acoplamiento de un sistema cromatográfico de exclusión de tamaño (SEC) con un sistema de detección elemental, ICP-MS.
2. Estudio de la respuesta biológica del organismo modelo *Mus musculus* sometido a experiencias de exposición a diferentes metales tóxicos (Cd, As y Hg) en condiciones de laboratorio controladas, con objeto de identificar posibles cambios de expresión de metalobiomoléculas como consecuencia de la exposición a estos contaminantes. Para ellos se usará el procedimiento metalómico propuesto en el apartado 1.
3. Desarrollo de procedimientos metalómicos para el aislamiento y purificación de las fracciones SEC-ICP-MS correspondientes a los extractos citosólicos de los diversos órganos de los animales en estudio. Se utilizará para ello procedimientos cromatográficos ortogonales mediante el acoplamiento de SEC a cromatografía en fase reversa, RPC, o de intercambio aniónico, AEC.
4. Estudio de la respuesta de las metalotioneinas (MT) como biomarcadores de contaminación, en el organismos modelo *Mus musculus* sometido a experiencias de exposición a cadmio, con objeto de obtener información sobre los mecanismos implicados en la detoxificación de metales por la acción de las metalotioneinas,



así como estudiar los diferentes complejos metálicos de estas a lo largo del experimento de exposición a cadmio. Para ello se va a desarrollar un procedimiento metalómico mediante el uso de un sistema cromatográfico bidimensional, SEC-RPC, acoplado a un sistema de detección elemental como ICP-MS, en paralelo con un sistema de detección molecular como nESI-qTOF-MS para el aislamiento, purificación y posterior identificación de los complejos metálicos de la metalotioneína formados durante el experimento de exposición.

5. Estudio metalómico comparativo de la respuesta biológica de *Mus musculus* y *Mus spretus* bajo la acción de contaminantes metálicos. Para ello 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, considerando la homología genética que existe entre ambas especies. Estos estudios comparativos nos pueden ayudar a comprender mejor los complejos mecanismo 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.

The general objective of this study is the assessment and monitoring of environmental pollution of Doñana National Park and surroundings by studying biomarkers related to environmental stress, specifically metal-biomolecules, using as bioindicator the mice *Mus spretus*, a free-living mouse widespread in the Park. The development of this objective includes:

1. Monitoring and evaluation of environmental pollution in five sampling areas from Doñana National Park and surroundings: one of them located at the center of the Park, Lucio Palacio (LDP), considered a noncontaminated area (according to previous results), which will be used as control and other four areas, La Rocina (ROC), El Partido (PAR), El Ajolí (AJO) and El Matochal (MAT), located in the surroundings of the Park with different levels of pollution due to its proximity to areas with agricultural, mining and industrial activity. For this reason, the study of metallo-biomolecules in different organs of the bioindicator species *Mus spretus* from the five areas mentioned, will be performed by using a metallomic procedure based on the coupling of size exclusion chromatography (SEC) with elemental detection system, ICP-MS.
2. Study of the biological response of model organism *Mus musculus* under exposure experiences to different toxic metals (Cd, As and Hg), in controlled laboratory conditions to identify possible changes in metallo-biomolecules expression as a result of exposure to these pollutants. For this purpose, the metallomic procedure proposed in paragraph 1 will be used.
3. Development of a metallomic procedure for the isolation and purification of the SEC-ICP-MS fractions of cytosolic extracts from different organs of the animals under study. For that, orthogonal chromatographic procedures by coupling SEC to reversed phase chromatography, RPC, or anion exchange AEC will be used.
4. Study of the response of metallothioneins (MTs) as biomarkers of pollution, in model organisms *Mus musculus* under cadmium exposure experiments, to obtain information on the mechanisms involved in metal detoxification by metallothioneins and to study the different metal complexes of these proteins along cadmium exposure experiment. To achieve this, a metallomic procedure based on two-dimensional chromatography, SEC followed by RPC, combined in parallel with inductively coupled plasma octopole reaction cell mass spectrometry



(ICP-ORS-MS) and nanospray ionization time-of-flight mass spectrometry (nESI-qTOF-MS), will be developed for the isolation, purification and subsequent identification of the metallothionein metal complexes formed during cadmium exposure experiment.

5. Comparative metallomic study of *Mus musculus* and *Mus spretus* response under the action of metal contaminants. For this purpose, the results obtained in exposure experiments of *Mus musculus* and those obtained for *Mus spretus* from the study areas will be compared in order to validate the biological response of these free-living organisms under environmental pollution conditions, considering the genetic homology between both species. These comparative studies can help us better understand complex molecular mechanisms, such as metal homeostatic control and metal traffic among the organs in living organisms which inhabit natural areas threatened by pollution.



# INTRODUCCIÓN





## 1. LA PROBLEMÁTICA DE LA CONTAMINACIÓN AMBIENTAL Y SU DIAGNOSIS

La contaminación constituye la base de los problemas medioambientales y supone la mayor amenaza para la salud y el bienestar de personas y ecosistemas. La actividad humana relacionada con el desarrollo y la tecnología desde la Revolución Industrial, ha convertido a la contaminación en un episodio prácticamente inevitable asociado a la vida del hombre en la Tierra [1]. Entre estas actividades antropogénicas pueden citarse las de transformación (química, metalúrgica, petrolera, etc.), las extractivas como la minería, y las agroquímicas como la agricultura. Además, hay que tener en cuenta las grandes catástrofes medioambientales, como los vertidos accidentales al mar o los ríos y los desastres ecológicos. Todas estas actividades alteran el equilibrio natural de un ecosistema, ya que liberan sustancias tóxicas minerales (metales pesados y sus compuestos, materiales radiactivos, etc.) u orgánicas (xenobióticos: plaguicidas y fertilizantes, dioxinas, hidrocarburos, etc.), en cantidades que causan efectos adversos en el hombre, en los animales y/o vegetales expuestos a dosis que sobrepasen los niveles aceptables en la naturaleza. De esta manera afecta a la supervivencia de los organismos, perturba la estructura y función de los ecosistemas naturales, modificando el número de especies (por introducción de especies exóticas o eliminación de las nativas), y la diversidad de ecosistemas y hábitats naturales [2-5].

Se estima en 6 millones los compuestos químicos que se han sintetizado y utilizado durante toda la historia humana, la mayoría de ellos en el siglo pasado. En nuestros días, según la OCDE, cada año se añaden unos 1500 compuestos a los más de 100000 en uso [6].

La entrada de contaminantes en los ecosistemas [7] puede ser: 1) accidental, tras episodios que provocan el vertido de sustancias al medio ambiente; ó 2) provocada, como liberación de residuos por la actividad humana (industria, minería, agricultura, ganadería, residuos urbanos, etc.) [8,9].

Los compuestos liberados en el 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 pueden persistir en el suelo o el agua, como es el caso de los metales pesados y los plaguicidas. Los contaminantes liposolubles distribuidos en el aire, agua y suelo pueden alcanzar a



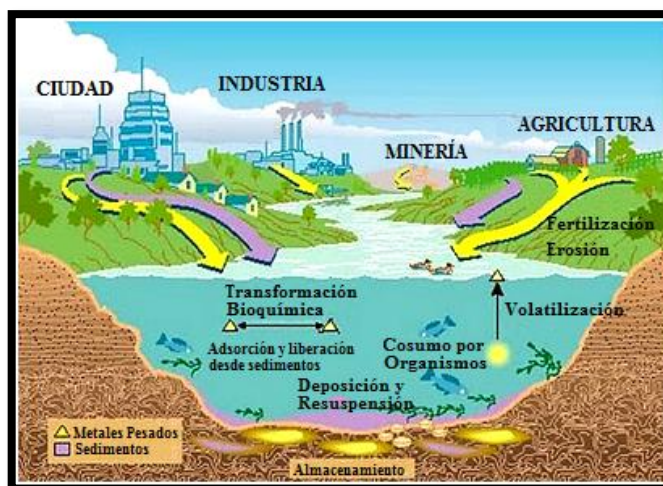
los organismos expuestos a ellos y a menos que sean metabolizados, persisten en los tejidos acumulándose a través de las cadenas tróficas [10-11].

La tabla 1 muestra los tipos principales de contaminantes y sus fuentes.

**Tabla 1.** Principales tipos de contaminantes medioambientales y sus fuentes.

Tipo de contaminante	Fuente
<b>Contaminantes inorgánicos</b>	
Metales	Industria, minería
Compuestos organometálicos	Puertos, pinturas
Radionucleidos	Centrales nucleares
Asbestos	Industria
<b>Contaminantes orgánicos</b>	
Bifenilos policlorados	Industria
Hidrocarburos aromáticos policíclicos	Industria, actividades petrolíferas
Plaguicidas	Agricultura
Aguas fecales	Zonas urbanas, granjas
Detergentes	Industria, zonas urbanas
Sedimentos	Industria, minería, zonas urbanas

Entre los contaminantes potencialmente más tóxicos para el medio ambiente se encuentran los metales pesados como As, Cd, Cu, Cr, Hg, Ni y Pb. Dichos metales forman parte de los ciclos biogeoquímicos que determinan su presencia y concentración en los distintos componentes de los ecosistema (agua, aire, suelo y biota). Las actividades humanas como la minería, los procesos industriales y la agricultura, alteran estos ciclos y modifican la concentración y posterior distribución al resto de compartimentos ambientales [12]. La figura 1 representa de manera esquemática la circulación de metales pesados a través de los diferentes compartimentos medioambientales.



**Figura 1.** Ciclo biogeoquímico de metales pesados.

La elevada toxicidad de los metales pesados radica en su alta persistencia, rápida acumulación en los organismos vivos, formación de asociaciones químicas complejas y en su capacidad de reacción [13-15]. Sus efectos tóxicos no se detectan fácilmente a corto plazo. 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; 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.

A nivel celular los metales pesados generan especies reactivas del oxígeno que promueven estrés oxidativo y daño de biomoléculas, alterando el estado de algunas proteínas e induciendo enzimas antioxidantes [16-19].

Todo esto hace necesario realizar seguimientos periódico de diferentes contaminantes en los ecosistemas, con objeto de evaluar su calidad medioambiental.

La monitorización de contaminantes en el medio ambiente proporciona información de los efectos tóxicos, si existen, y ayuda a conocer las áreas de impacto y lugares donde la concentración es aparente. También es útil conocer la tendencia de estos contaminantes a lo largo del tiempo, ya que los datos recogidos nos permiten relacionar una sustancia tóxica particular con sus posibles problemas medioambientales.

Generalmente, los estudios para evaluar la contaminación ambiental de entornos naturales amenazados se han basado en el análisis químico de elementos traza tóxicos



como Cd, As, Pb, Hg y otros, así como contaminantes orgánicos entre los que se pueden citar los plaguicidas, PCBs y PAHs principalmente, ya que son sustancias altamente persistentes que mantienen sus efectos perjudiciales a largo plazo y predominan en entornos naturales contaminados por actividades antropogénicas tales como la agricultura, la minería, la industria y los vertidos accidentales [20-22]. Dichos 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 estos en peligro así como a todos los organismos que lo habitan.

Los estudios previos realizados en zonas amenazadas describen métodos de análisis basados en distintos tipos de técnicas y aplicados a muestras de diversa naturaleza, centrándose principalmente en el análisis de las concentraciones totales de los contaminantes. Numerosos trabajos se han centrado en el análisis de metales pesados en muestras de agua en diversos ecosistemas acuáticos, usando absorción atómica de llama (AAS) [23-27], espectrometría de emisión por arco [28], espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) [29] o voltamperometría anódica de pulso diferencial (DPASV) [26]. Otros autores proponen el análisis de metales pesados en muestras de sedimentos mediante fluorescencia de Rayos X (XRF) [30].

Diversos estudios de monitorización de la contaminación ambiental han comprobado la presencia de metales pesados en suelos, sedimentos, plantas y tejidos de animales usando técnicas de extracción de metales como la digestión ácida y técnicas de detección como la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) [31-32] o espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) [31,33-37]. La espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-AES) también se ha usado para medir metales en aguas subterráneas como consecuencia de desastres accidentales [38]. Otra de las técnicas atómicas usadas para analizar metales pesados en sedimentos es la Emisión de rayos X inducida por partículas (PIXE) [39].

Numerosos estudios han comprobado la presencia de pesticidas organoclorados y otros contaminantes orgánicos en muestras de sedimentos y biota de entornos naturales en peligro mediante el uso de sistemas de extracción seguido por cromatografía gaseosa con detector de captura electrónica (GC-ECD) [40-42] o detector de ionización de llamas (GC-FID) [43,44].

Sin embargo, a la hora de monitorizar un ecosistema, el análisis de las concentraciones totales de metales o contaminantes orgánicos en agua, sedimentos, suelos o biota sólo nos da información de la mayor o menor presencia de los mismos en cada tipo de muestra, pero no nos proporciona una información directa sobre su disponibilidad y efectos biológicos en los organismos. Una alternativa mejor para evaluar la contaminación de un ecosistema, sería determinar los contaminantes en la zona de estudio, buscar una especie bioindicadora y evaluar su respuesta a través de diversos biomarcadores [45-47]. Las respuestas de los organismos a las situaciones de estrés provocadas por las perturbaciones ambientales y la contaminación se usan en la actualidad como biomarcadores convencionales, siendo los más sensibles y tempranos los moleculares [17]. El estudio de la respuesta biológica proporciona un sistema de detección integrado para evaluar la biodisponibilidad, bioacumulación y efectos ecotoxicológicos de los contaminantes sobre los organismos [48].

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 las proteínas. Por ello el uso de técnicas de análisis masivo (las -ómicas) constituyen una alternativa prometedora para la diagnosis de problemas medioambientales. Entre ellas se encuentra la proteómica que considera el análisis masivo de proteínas en organismos bioindicadores, ya que la expresión proteica se altera bajo la acción de los contaminantes [49,50] o la transcriptómica que estudia la alteración en el número de transcritos relacionados con la presencia de sustancias tóxicas [51,52].

Además, hay que tener en cuenta la importancia de los metales en los organismos, los cuales participan en una amplia variedad de procesos biológicos de los sistemas vivos. Aproximadamente un tercio de las proteínas necesitan la presencia de un metal como cofactor para desarrollar su función [53-55]. Estos metales son responsables de las propiedades catalíticas o estructurales de las proteínas y su presencia en moléculas está determinada en muchos casos por el genoma [54]. Como ejemplo puede citarse la síntesis de genes y proteínas catalizada por metaloenzimas que contienen zinc y otros metales. Sin embargo, aún se desconocen muchos de los mecanismos por los cuales el metal se almacena o incorpora como cofactor en una célula [56].



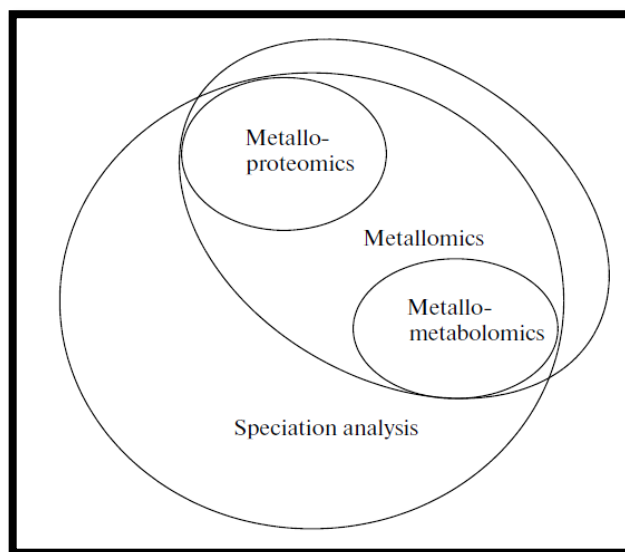
Por otro lado, la presencia de metales tóxicos, como Cd, Pb y As en los tejidos de los organismos puede bloquear los grupos funcionales de las proteínas, desplazar y/o sustituir metales esenciales, inducir cambios conformacionales en estas y desnaturalizar o inactivar enzimas, además de provocar estrés oxidativo en los organismos [57-59]. Por tanto, es necesario conocer la función, asimilación, transporte y almacenamiento de los metales esenciales 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 por medio del conocimiento de su genoma y las proteínas que se expresan a partir del mismo, proteoma, sino también por la distribución de los metales y metaloides entre diferentes especies y compartimentos celulares, metaloma [53,60-62]. Este último término se refiere a la totalidad de las especies metálicas individuales en una célula, y comprende el contenido del elemento libre y el conjunto de sus complejos con biomoléculas, en especial proteínas, metaloproteoma [63-65].

Por todo esto, la metalómica constituye la metodología adecuada para el estudio de la totalidad de especies metálicas y metaloides que se encuentran dentro de un organismo, célula o tejido [60,62,66-70], pudiendo hablarse de metaloproteómica cuando se consideran los procesos o funciones relacionados con metales asociados a proteínas [63-65]. Estas herramientas son fundamentales a la hora de llevar a cabo el seguimiento de metales pesados en organismos vivos utilizando diferentes biomoléculas relacionadas con el estrés ambiental (biomarcadores) como metaloproteínas, enzimas redox y metabolitos [71], lo que va a constituir la base para el conocimiento del funcionamiento celular, de los tejidos e incluso del organismo.

Sin embargo, ninguna de estas dos disciplinas relaciona las metaloproteínas, el contenido de metales y sus variaciones en la célula con el metabolismo. Esta aproximación metodológica es propia de la metabolómica, que considera el análisis de moléculas pequeñas o metabolitos relacionados con el funcionamiento de los organismos, asociando sus concentraciones y las variaciones que experimentan como consecuencia de cambios fisiológicos y genéticos [72]. Dentro de esta disciplina, la metalometabolómica [73], estudia los metabolitos que presentan un metal o metaloide en su estructura.

Estas ómicas emergentes que tienen en común el análisis de especies metálicas bien unidas a proteínas (metaloproteómica) o a metabolitos (metalometabolómica), son

áreas específicas de la metalómica que tienen como origen la especiación química como muestra la figura 2.



**Figura 2.** Relación entre el análisis de especiación, la metalómica y sus áreas específicas de bioanálisis [74].

Como se ha mencionado anteriormente, una alternativa en los estudios medioambientales relacionados con la contaminación es el uso de organismos bioindicadores. Estos animales no suelen estar secuenciados, lo que dificulta la aplicación de procedimientos proteómicos clásicos, basados en el uso de la electroforesis 2-DE seguida de digestión con tripsina e identificación de las proteínas mediante MALDI-TOF-MS utilizando bases de datos para la identificación de los péptidos. Esta ausencia de animales modelo secuenciados para los estudios de proteínas y/o metaloproteínas representa una gran limitación, ya que obliga a realizar secuenciaciones “de novo”, lo que resulta inviable, dado el gran número de proteínas implicadas y la inversión de tiempo y costes necesarios.

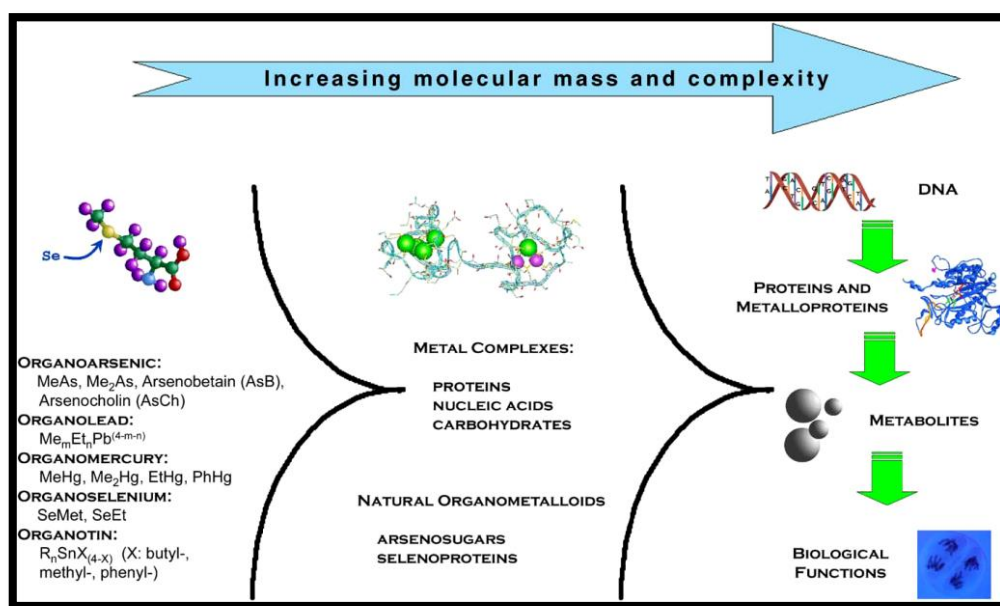
En el Parque Nacional de Doñana, situado al suroeste de España, se ha utilizado extensamente el ratón de campo *Mus spretus* en estudios medioambientales [75-77], del que se ha demostrado su analogía genética con el ratón de laboratorio ya secuenciado *Mus musculus* [18], haciendo posible el uso de las bases de datos genéticos de éste organismo modelo para llevar a cabo estudios proteómicos del *Mus spretus* en la monitorización de ecosistemas terrestres [77].

Los buenos resultados obtenidos con la integración de aproximaciones transcriptómicas y proteómicas en la pareja de bioindicadores *Mus musculus* / *Mus spretus* para estudios medioambientales permite proponer la integración entre -ómicas, transcriptómica, (metalo) proteómica y más recientemente, metabolómica y metalómica, para la evaluación de la contaminación ambiental [78].

La integración de todas estas ómicas constituye una herramienta eficaz para establecer mecanismos de regulación y complejas rutas metabólicas en los organismos vivos, y además permite diagnosticar cambios importantes a nivel celular y/o biológico provocado por la presencia de contaminantes en el medio ambiente, sin necesidad de disponer de un conocimiento previo sobre toxicidad de estos [79-82]. No obstante, hay que tener en cuenta que el metabolismo de los elementos traza no puede considerarse de forma aislada ya que diferentes elementos y sus especies actúan de forma conjunta en las células, tejidos u órganos, y en consecuencia, es importante tener en cuenta su posible sinergia o antagonismo de interacciones [83]. De esta forma, puesto que los seres vivos están expuestos a un medio ambiente complejo en el cual los diferentes elementos y sus especies están presentes conjuntamente, dichas interacciones hacen imprescindible el desarrollo de métodos analíticos que permitan la especiación simultánea de los elementos, considerando los efectos sinérgicos y antagonistas entre ellos, y por tanto integrando también el metabolismo de los organismos en estudio.

Los procedimientos analíticos de especiación química se han ido desarrollando durante los últimos 20 años y se utilizan de forma rutinaria en relación a temas medioambientales, salud o alimentos. Estas metodologías 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), con un detector atómico como el plasma de acoplamiento inductivo con detector de masas (ICP-MS). 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, además permite la detección simultánea de múltiples heteroátomos [84,85]. Por estas razones, el ICP-MS ha remplazado prácticamente a otras técnicas como ICP-OES, XRF y el análisis instrumental por activación con neutrones (INAA), que se han usado anteriormente para la determinación multielemental de elementos trazas.

Sin embargo, para analizar especies metálicas en sistemas biológicos [63,86], como sucede en los estudios metalómicos, la complejidad de las moléculas se incrementa notablemente, como muestra la figura 3, 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 convencional.



**Figura 3.** Esquema del incremento de la complejidad molecular en metalómica [67].

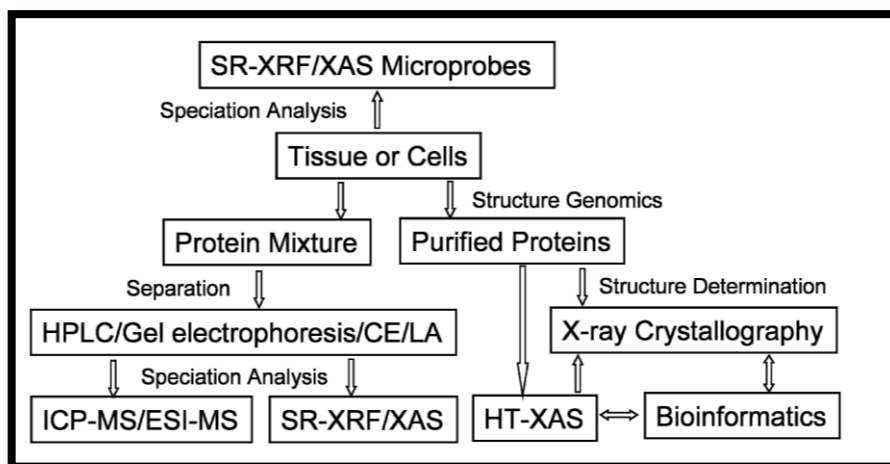
Por ello, para poder conocer la composición química y estructura de las biomoléculas es necesario el uso de técnicas moleculares complementarias como es la espectrometría de masas, ya que el uso del ICP-MS como detector elemental destruye cualquier información molecular sobre la naturaleza química de las especies previamente separadas. El uso de detectores moleculares precisa de una gran pureza en la muestra, y teniendo en cuenta que la mayoría de las metaloespecies de interés se encuentran en los sistemas biológicos a niveles de concentraciones muy bajas, implica una exhaustiva y compleja etapa de separación.

Existen tres estrategias fundamentales para el desarrollo y aplicación de técnicas metalómicas y metaloproteómicas como muestra la figura 4. 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), combinada con un espectrómetro de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) como detector atómico y un espectrómetro de masas

de ionización por electrospray (ESI) o de ionización-desorción láser asistida por matriz (MALDI) como detector molecular. El desarrollo reciente de los espectrómetros de masas de alta resolución tales como los sistemas híbridos cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF) [78], cuadrupolo-trampa iónica (Q-IT), triple cuadrupolo tiempo de vuelo (QqQTOF) o el Orbitrap [62] permiten una identificación inequívoca de biomoléculas [55], lo que representa 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, atómico y molecular, aportan resultados que permiten la caracterización estructural y funcional de las metaloproteínas [87,88]. 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 segunda estrategia implica el uso de espectroscopia de absorción de rayos X, que permite un análisis directo de los metales asociados a proteínas y proteomas, así como el estudio de la distribución de los mismos en tejidos y células [90].

La tercera estrategia emplea la bioinformática y el análisis computacional. Con la publicación de secuencias de genomas completos se ha construido una gran base de datos de secuencias primarias de proteínas, y esto ha permitido el desarrollo de herramientas de predicción de metaloproteínas a partir de las secuencias conocidas. Así es posible predecir la capacidad de unión a metales a partir de la secuencia de aminoácidos teniendo en cuenta la presencia de secuencias consenso conocidas en las regiones de unión a metales [90].



**Figura 4.** Estrategías principales desarrolladas en metalómica y metaloproteómica [91].

## 2. TÉCNICAS DE ANÁLISIS MASIVO: METALÓMICA

Uno de los principios importantes de la Biología Molecular moderna relaciona los genes, como componentes celulares que contienen la información, y las proteínas, responsables de las funciones biológicas. Sin embargo, un gen codifica varias especies proteicas [92] y la cantidad de una proteína en un momento dado varía en función de diversas modificaciones post-traduccionales o por la formación de agregados con otras proteínas, debido a cambios ambientales o del estado fisiológico [93]. Toda esta complejidad presente en los procesos celulares, tales como rutas metabólicas y mecanismos de regulación, hacen que el estudio del funcionamiento de los seres vivos sea un reto para la Biología Molecular, haciendo necesario el uso de nuevas herramientas que permitan obtener una información masiva de todas las moléculas, procesos y reacciones que se producen en la célula en un momento determinado.

Durante la última década, los progresos realizados en la secuenciación del genoma humano [94,95] han llevado al perfeccionamiento y desarrollo de nuevas técnicas en el campo del bioanálisis. Estas herramientas han permitido el estudio en profundidad de procesos celulares y moleculares, y el conocimiento progresivo de los sistemas biológicos a nivel molecular. Sin embargo, los organismos no operan como compartimentos moleculares aislados, y para entenderlos hay que integrar esas piezas moleculares en sistemas. Así se puede lograr una visión global de los procesos biológicos [96]. Esto ha dado origen a lo que se denomina genéricamente como técnicas “ómicas” [96,97], que se basan en el análisis de la totalidad de una determinada clase de componentes en un organismo vivo, utilizando para ello, junto a nuevos desarrollos

metodológicos e instrumentales, la bioinformática y las técnicas rápidas y automatizadas para integrar la información de forma coherente. Una de las ómicas más establecidas es la genómica, que ha permitido la secuenciación del genoma humano [94,95], y el estudio de manera integral del funcionamiento, contenido, evolución y origen de los diversos genomas, los cuales contienen la información de la totalidad de las secuencias primarias de las proteínas que pueden ser (pero no necesariamente) expresadas. El estudio de las proteínas constituye la base de la proteómica, que considera el conjunto de proteínas en una célula, tejido u organismo, su localización, estructura, estabilidad e interacción [50, 98-100], y muy relacionada con ella, la transcriptómica que establece la conexión entre las secuencias genómicas y las proteínas codificadas, utilizando la información contenida en el conjunto de moléculas de ARNm o transcritos producidos en una célula o una población de células [101].

Más recientemente, la metabolómica ha hecho posible obtener la información a nivel de moléculas pequeñas o metabolitos, que determinan el funcionamiento del ser vivo y cuya concentración varía como consecuencia de cambios fisiológicos [72].

Sin embargo, las reacciones químicas que pueden catalizar las proteínas son en general de muy amplio espectro y las diferencias entre las cadenas polipeptídicas justifican solo una pequeña parte de la gran diversidad funcional de las proteínas. Esta gran diversidad de función puede ser en gran medida explicada por la capacidad de las proteínas para incorporar en sus sitios activos diferentes cofactores o grupos protéticos, como moléculas orgánicas pequeñas, átomos metálicos o clústeres formados por iones metálicos y no metálicos.

Por tanto, la función de muchas metaloproteínas depende precisamente de su interacción con un metal, por lo general los de transición, tales como Cu, Fe, Zn y Mo. Un ejemplo son las enzimas, la mitad de las cuales aproximadamente, debe su actividad a la presencia de un átomo metálico. Estas metaloproteínas se han estudiado desde la década de los 50, cuando se apreció la presencia de un átomo de hierro en la estructura de la mioglobina de esperma de ballena [102]. Un estudio bioinformático reciente realizado con un conjunto de estructuras correspondiente a 1371 enzimas diferentes, estima que el 47% de las mismas requieren de la unión a algún metal, de las cuales el 41% lo incorpora a su centro catalítico [103].

Entre los metales asociados a las proteínas pueden destacarse el zinc y el hierro que son utilizados por todos los organismos y participan en numerosas vías metabólicas [104, 105]. El número de proteínas que utilizan hierro o zinc es elevado, por ejemplo más de 300 familias de proteínas requieren el zinc para su correcto funcionamiento [106]. En general los metales son utilizados por muchas proteínas en forma de iones metálicos (como el cobre, manganeso y níquel) o como complejos metal-cofactor (como es el caso del cobalto en la vitamina B12) [107]. Algunas familias de proteínas son estrictamente dependientes de determinado metal para su función, como lo demuestra la dependencia de la citocromo c oxidasa por el cobre, o la ureasa por el níquel. Sin embargo, otras familias de proteínas tienen formas dependientes e independientes o han evolucionado hasta permitir el uso de metales alternativos, así la glyoxalasa 1 se une al níquel en *E. Coli*, pero en humanos y levaduras se une a iones de zinc [108].

Hay proteínas, como las metalotioneinas, que se expresan como mecanismo de defensa de un organismo frente al estrés provocado por metales pesados, y otras que actúan en los organismos como transportadoras de nutrientes esenciales o contaminantes (como la albúmina y la transferrina) [62].

La actividad de los iones metálicos intracelulares es controlada por varias familias de proteínas, ya sea mediante desintoxicación, protección o participando en el ciclo celular en procesos de proliferación y apoptosis [109]. Las bases moleculares de muchos de los procesos bioquímicos que dependen de metales constituyen un reto para los científicos. Los mecanismos por los que un metal es detectado, almacenado o incorporado como cofactor en las células aún se desconocen [56]. Su comprensión requiere no sólo la identificación de las proteínas implicadas, y la caracterización de sus complejos con metales, sino también la caracterización del conjunto de moléculas no proteináceas (productos de reacciones bioquímicas o enzimáticas), de tamaño relativamente pequeño, alguna de las cuales suministran los metales a las metaloproteínas [110]. No obstante, las aproximaciones analíticas convencionales usadas en proteómica y metabolómica suelen ignorar la existencia de complejos metálicos con proteínas y metabolitos, lo que ha motivado el desarrollo de una nueva ómica, la metalómica [62], complementaria con la genómica y proteómica, que combina estudios analíticos, inorgánicos y bioquímicos, con el objetivo final de dilucidar la absorción de metales, su tráfico, acumulación y metabolismo en los sistemas

biológicos. La metalómica estudia el “*metaloma*”, así como las interacciones y conexiones funcionales de iones metálicos y sus especies con genes, proteínas, metabolitos y otras biomoléculas dentro de un organismo [62, 66].

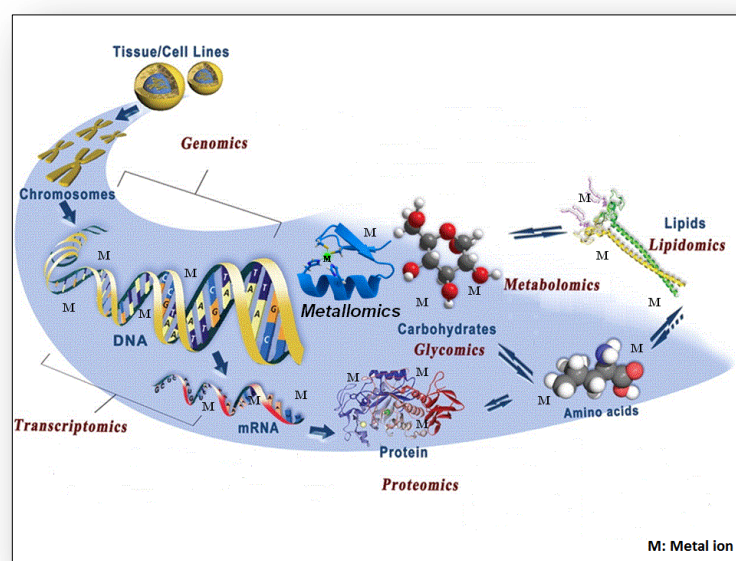
El término “*metaloma*” fue definido por Williams en 2001 [56,111], como la distribución de los elementos, concentraciones de equilibrio de iones metálicos libres o el contenido de elementos en un compartimento celular, célula u organismo [56]. Este término se extiende a totalidad de las especies metálicas y metaloides presentes en una célula o tejido, su identificación, cuantificación y localización [60, 62]. Los metales y metaloides que forman parte del metaloma o que se incorporan al mismo desde fuera como xenobióticos son conocidos; no obstante sufren modificaciones por interacción de ligandos orgánicos de baja o alta masa molecular hasta convertirse en moléculas con una función biológica definida, y por tanto se puede hablar de especiación en organismos [64, 112]. Principalmente estamos considerando elementos esenciales y de vital importancia, que son necesarios para el correcto funcionamiento del organismo. Los iones metálicos presentes en estos, se encuentran principalmente como compuestos de coordinación con biomoléculas, actuando como ligandos, tanto en moléculas de bajo peso molecular (ácidos orgánico y aminoácidos), como en aquellas de alto peso molecular (proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos). En el caso de los metaloides, es típico encontrarlos unidos a fragmentos orgánicos de una molécula mediante enlace covalente, por ejemplo, aminoácidos que contienen selenio o arsenolípidos. Por tanto el estudio sobre los mecanismos de absorción de metales / metaloides, su tráfico y función en los procesos biológicos complejos, nos ayudará a comprender los mecanismos moleculares que subyacen a los efectos beneficiosos o tóxicos ejercidos por estos, y aún más, explicar su impacto en los organismos.

Por tanto, junto a conceptos como el de genoma y proteoma hay que añadir también el del metaloma cuando se estudian los procesos bioquímicos que se desarrollan en el interior de una célula [115].

Además hay que considerar otros términos relacionados con la metalómica que han sido propuestos para designar los estudios relacionados con el comportamiento de los metales traza en los sistemas vivos, como la metalometabolómica (asociado a la función de los metales en los procesos metabólicos), ionómica [113] (metales, metaloides y especies no metálicas presentes en el organismo) y metaloproteómica, en

la cual la presencia del metal (heteroátomo) permite el seguimiento de los procesos en los que están involucradas estas proteínas [114]. Este heteroátomo puede estar presente en la proteína de forma natural o introducido como marcador en la misma.

La integración de todas estas ómicas permite conocer mejor los mecanismos de regulación, las rutas metabólicas complejas y las interacciones de las estructuras celulares, con los procesos que se producen en su interior [79,80, 82,116]. La figura 5 muestra de manera esquemática las diversas tecnologías «ómicas» y su relación con los sistemas biológicos en función del grado de información celular que se obtiene.



**Figura 5.** Ciencias «ómicas» como herramientas de investigación de la biología molecular para analizar de forma global todo el conjunto de moléculas presentes en una muestra biológica, desde el ADN pasando por transcripción génica y traducción de proteínas, hasta la función biológica llevada a cabo por los metabolitos. Muchos de estos pasos son mediados por especies metálicas.

La metalómica ha adquirido un gran interés en los últimos años, no obstante el uso de este término ha llegado a ser excesivo en algunos casos, por lo que es importante precisar lo que un estudio metalómico implica:

- Estudio centrado en el papel de los metales y/o metaloides (por ejemplo, As, Se, Sb) en un contexto biológico. La ampliación de este término para no metales que también son importantes biológicamente, como azufre o fósforo, es incorrecta.



- b) Correlación de la concentración de un elemento o sus especies con el genoma. Esta correlación puede ser estadística (un enriquecimiento de un elemento coincide con la presencia de un gen particular), estructural (la secuencia de una metaloproteína es trazable a un gen) o funcional (la presencia de un bioligando es el resultado de un mecanismo de codificación de un gen).
- c) Enfoque sistemático, integral o global.

La metodología para el análisis bio-inorgánico en el campo de la metalómica ha 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 gran resolución, aplicable tanto a la caracterización elemental como a la caracterización molecular de las especies administradas y/o formadas en el medio biológico [64, 117]. Mediante esta combinación de técnicas ha sido posible solucionar los principales problemas que entrañan estos análisis: concentraciones muy bajas de los complejos formados, matrices muy complejas, transformación de especies durante el tratamiento y manipulación de las muestras, ruptura de los complejos metal-biomolécula, etc. Se requieren además métodos de preparación de la muestra eficaces, pero poco agresivos, con capacidad para purificar y preconcentrar las especies de interés sin romper los complejos que forman los metales con las mismas.

La metodología analítica desarrollada en metalómica guarda analogía con la metodología proteómica [118], empleándose fundamentalmente técnicas de separación al tratarse de muestras complejas, como son la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la electroforesis capilar (CE). Habitualmente se combinan distintas separaciones cromatográficas complementarias, que originan sistemas cromatográficos multidimensionales los cuales proporcionan una mayor pureza de la muestra previa a su identificación. Entre estas técnicas cromatográficas pueden destacarse la cromatografía de exclusión de tamaño (SEC), de fase reversa (RPC), de intercambio iónico (IEC), de interacción hidrofílica (HILIC) y de afinidad con iones metálicos inmovilizados (IMAC).

La cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) [119] es adecuada para el fraccionamiento de proteínas permitiendo recuperaciones elevadas de estas moléculas y preservando la unión entre los metales y sus proteínas asociadas. Sin embargo, la

resolución obtenida no es buena, y cada una de las fracciones recogidas de una columna SEC puede contener un número indeterminado de proteínas, si se trata de muestras biológicas de elevada complejidad. A pesar de esto, puede ser muy útil para reducir el contenido de sales de las muestras, para resolver mezclas simples o como fraccionamiento previo a otras separaciones. No obstante, los acoplamientos de separaciones cromatográficas más utilizados permiten aumentar la resolución de dichas separaciones, especialmente cuando se utilizan dispositivos cromatográficos ortogonales, como se ha observado en la combinación de IEC con RPC [120]. Otros acoplamientos frecuentemente usados como complemento a la separación SEC son la cromatografía de intercambio aniónico (AEC) para el análisis de metaloproteínas [121] y la cromatografía HILIC para el análisis de metabolitos que contienen metales [122].

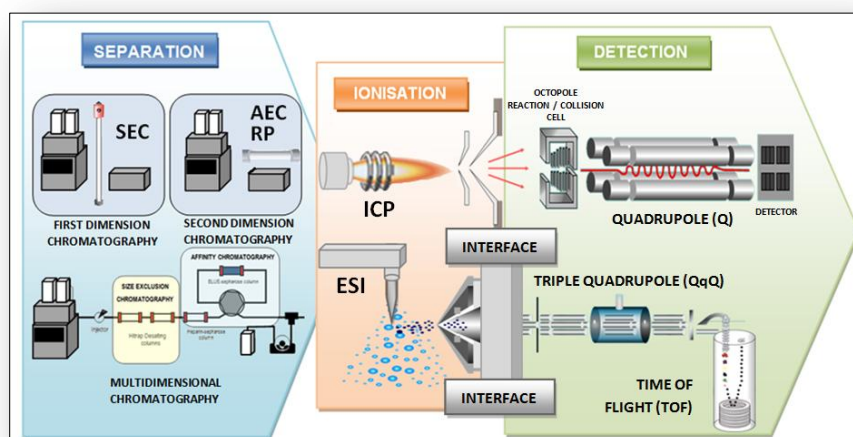
En los últimos años el empleo del ICP-MS como detector elemental selectivo y su acoplamiento a las técnicas de separación cromatográficas [123] ha supuesto un gran avance en metalómica, principalmente debido a su elevada sensibilidad, amplio rango lineal y carácter multielemental [123,124], aportando información cuantitativa tanto de metales o metaloides unidos a biomoléculas, como de otros no-metales de gran importancia biológica (azufre o fósforo) [64]. Entre los analizadores de masas frecuentemente usados están el cuadrupolo (Q), tiempo de vuelo (TOF), sector magnético (SF) o multicolector (MC). En caso de muestras sólidas, como tejidos biológicos o los spots procedentes de la electroforesis en gel (GE), la ablación láser LA-ICP-MS, proporciona una herramienta idónea [125], ya que ofrece una tecnología rápida y bastante robusta. Esta técnica se ha usado con éxito para el análisis de selenoproteínas con una sensibilidad de 6 pg/mm [126, 127].

A pesar de las ventajas del ICP-MS como detector atómico, este sistema instrumental destruye cualquier información sobre la estructura molecular de las especies separadas, por ello se requiere el uso combinado de sistemas de detección complementarios, atómico (para la detección del metal en la biomolécula) y molecular, como es la espectrometría de masas orgánicas (para obtener información sobre la estructura y composición química de las biomoléculas) [87, 88]. La espectrometría de masas molecular con técnicas de ionización suaves, como ESI o MALDI ofrece un potencial analítico considerable en la determinación estructural de los complejos metálicos de interés en metaloproteómica, ya que en muchos casos permiten que la estructura de las proteínas y los enlaces metal-biomolécula se conserven [64]. Los



espectrómetro de masas de alta resolución tales como los sistemas híbridos cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF), triple cuadrupolo (qQq), triple cuadrupolo tiempo vuelo (QqQTOF), trampa de iones (IT), cuadrupolo-trampa (QTrap) o resonancia de ion ciclotrón con transformada de Fourier (FTIRC), proporcionan una caracterización de biomoléculas muy precisa. Además, la espectrometría de masas de alta resolución combinada con la espectrometría de masas en tándem ( $MS^n$ ) constituye una herramienta indispensable para la elucidación estructural de metaloproteínas. Los sistemas de espectrometría de masas en tándem frecuentemente usados para el análisis de biomoléculas son ESI-Q-TOF-MS [128] and MALDI-TOF-MS [128, 129]. Para el análisis cuantitativo de metalomoléculas, el espectrómetro de masas qQq es de gran utilidad, dada la posibilidad de desarrollar métodos de análisis cuantitativo de alta sensibilidad y selectividad tras la identificación de las moléculas.

Por tanto, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) multidimensional, acoplada a un doble sistema de detección complementario, atómico y molecular, constituye una herramienta poderosa para el estudio de metaloproteínas en sistemas biológicos. La figura 6 muestra el esquema representativo de un acoplamiento cromatográfico multidimensional doblemente combinado con detección ICP-MS y ESI-QqQ-TOF.



**Figura 6.** Acoplamiento analítico multidimensional (MMA) utilizado en metalómica.

Recientemente, se han realizado con éxito separaciones bidimensionales de biomoléculas presentes en el extracto proteico de fracciones citosólicas del hígado del ratón de laboratorio *Mus musculus* expuesto a diferentes concentraciones de cadmio. Para ello se ha utilizado una combinación de SEC y RPC con acoplamiento a un sistema de detección atómico, ICP-MS, y molecular, *n*ESI-qTOF-MS [130], encontrándose diferentes estequiometrias de cadmio unido a una determinada proteína. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de realizar separaciones con gran poder de resolución.

Otra opción es el uso de *n*HPLC previo a la elucidación estructural de los complejos metal-proteína formados. En este sentido el acoplamiento *n*HPLC-ICP-MS es de gran ayuda para la detección específica y cuantificación de las biomoléculas con metales, cuya estructura se determina en paralelo mediante *n*HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> [64]. La baja concentración de los complejos metal-biomoléculas en las muestras biológicas hace necesario el empleo de procedimientos de preconcentración previos al análisis. Entre los métodos más utilizados cabe destacar la evaporación de disolventes a vacío mediante liofilización o “*speed-vac*”, la ultrafiltración con tamices moleculares o la concentración en cabeza de columna previa a la separación cromatográfica [118]. La focalización o preconcentración de las fracciones en línea se puede realizar mediante cromatografía IEC o mediante RPC, con elevados factores de preconcentración y baja manipulación de la muestra.

Con frecuencia, las fracciones cromatográficas concentradas presentan un elevado contenido salino, que es incompatible con ESI-MS, por lo que las fracciones deben ser desaladas mediante diálisis, ultrafiltración o microcolumnas de extracción en fase sólida [71, 131].

Otras de las técnicas de separación usada en metalómica es la electroforesis en gel mono- (IEF, BN o SDS) o bi-dimensional (IEF-SDS). Estas técnicas se consideran más adecuadas para la separación de proteínas, con mejor poder de resolución y reproducibilidad que las técnicas de separación líquidas [125, 132]. La 2-DE está integrada por dos separaciones electroforéticas ortogonales, la primera mediante isoelectroenfoque (IEF) y la segunda mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). La combinación de estas dos técnicas electroforéticas presenta un alto grado de resolución y puede utilizarse a escala

micropreparativa. Es así posible la separación e identificación de hasta centenares, e incluso miles de proteínas, por lo que es ampliamente utilizada en proteómica, siendo en principio, una buena alternativa en metaloproteómica [133, 134].

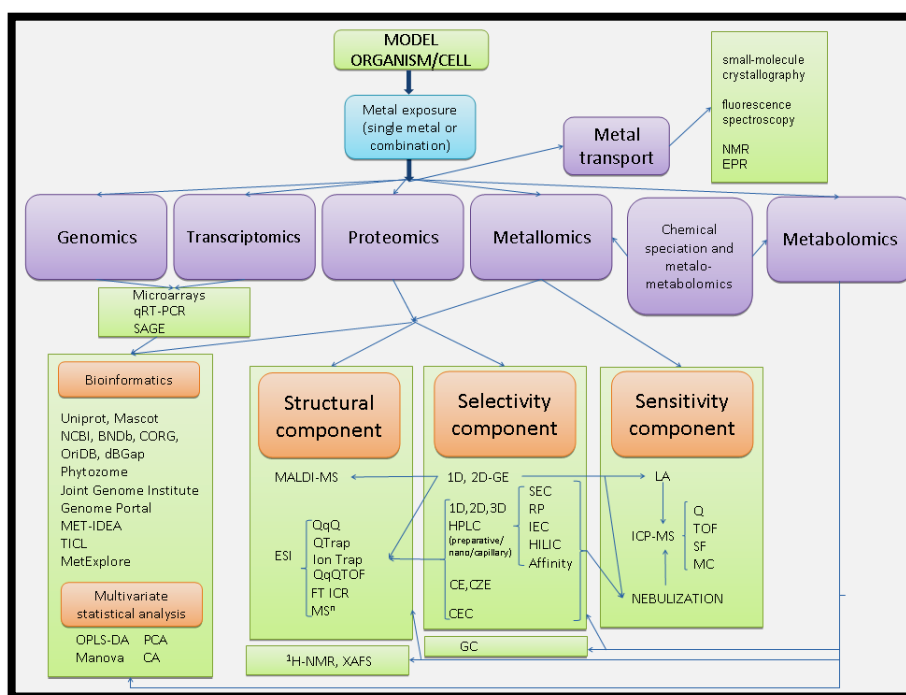
No obstante, es necesario el uso de reactivos que no afecten a la integridad del enlace metal-proteína, por ello algunos reactivos habitualmente utilizados para IEF o SDS-PAGE, como son la tiourea o los agentes reductores, deben restringirse o utilizarse con precaución [135]. Después de la separación de proteínas por SDS-PAGE se lleva a cabo una digestión trípica en gel de las bandas o manchas seleccionadas antes de ser introducidas en el sistema de detección. Recientemente, este procedimiento se ha aplicado al estudio de selenoproteínas en células [136] o al análisis de metaloproteínas en riñón de rata mediante electroforesis en gel 2D no desnaturizante [137].

En general, los procedimientos mencionados han de mantener la integridad de los complejos originales metal-biomolécula. Por ello, se requiere el empleo de inhibidores de proteasas, el control riguroso de las condiciones experimentales de pH, temperatura, salinidad, tiempo de almacenamiento de las muestras y la revisión cuidadosa de los efectos de los reactivos utilizados en el procedimiento analítico para evitar la ruptura de los complejos, la transformación de las especies y la desnaturalización o agregación de proteínas [138].

Por otra parte, existe un interés creciente en el uso de técnicas analíticas nucleares para el estudio de metaloproteínas [117]. El análisis de activación de neutrones, XRF y técnicas de trazadores isotópicos ha facilitado significativamente la identificación y caracterización de metaloproteínas [139,140]. La distribución de metales y su localización en células individuales o compartimientos celulares también pueden ser estudiadas por fluorescencia de rayos X inducida por radiación de sincrotrón, XRF SR, utilizando análisis con microsonda [141,142]. Para la caracterización estructural de metaloproteínas, se han propuesto la espectrometría Mössbauer y la de absorción de rayos X (XAS) ya que permiten caracterizar la estructura de iones metálicos asociados a estos entornos moleculares [143,144].

El análisis bioinformático computacional constituye un enfoque complementario a los métodos experimentales que puede predecir la capacidad de unión de metales a proteínas, teniendo en cuenta la presencia de secuencias consenso conocidas en las regiones de unión a metales o conociendo el dominio de unión de metales en un genoma

[145]. 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. La figura 7 muestra las técnicas analíticas usadas en metalómica y su relación con otras ómicas.



**Figura 7.** Técnicas analíticas usadas en metalómica y su relación con otras ómicas.

### 3. BIOINDICADORES DE CONTAMINACIÓN AMBIENTAL (*MUS MUSCULUS*/*MUS SPRETUS*)

La información obtenida a través de los análisis químicos tradicionales no suele ser suficiente para evaluar la contaminación de un ecosistema ya que estos procedimientos sólo detectan los contaminantes presentes en concentraciones superiores a los límites de detección de cada técnica, pero no proporcionan información sobre sus efectos biológicos y por tanto sobre sus efectos tóxicos reales [17]. Además hay que tener en cuenta que los contaminantes normalmente no se encuentran en la Naturaleza de forma aislada, sino formando parte de mezclas complejas, cuyo impacto biológico no se puede estimar adecuadamente sólo a partir de análisis químicos. La alternativa a esta aproximación experimental es la biomonitorización de ecosistemas mediante el análisis de una serie de parámetros biológicos que informan acerca de la presencia y efecto de los contaminantes en los seres vivos [146].

Los bioindicadores son especies usadas como centinelas en la biomonitorización para detectar la presencia de contaminantes en el medio ambiente, estimar sus efectos y predecir los riesgos derivados de su presencia [17,146, 147].

Los indicadores biológicos que se pueden medir para conocer el estado de un ecosistema son:

- 1) Los biomarcadores, parámetros biológicos medidos en los organismos bioindicadores, que indican, al alterarse sus niveles, la exposición de estos a contaminantes, sus efectos biológicos o los riesgos que pueden acarrear su presencia en los ecosistemas [17,146, 148].
- 2) Los bioindicadores, organismos que dan información sobre las condiciones ambientales de su hábitat, mediante la presencia, ausencia o cambios en su conducta.
- 3) Los indicadores ecológicos, parámetros que describen la estructura y funcionamiento de los ecosistemas [149]

Un estudio de biomonitorización debe comenzar definiendo los contaminantes implicados, seleccionando los sitios de muestreo (problema y referencia), la especie bioindicadora, los biomarcadores y estableciendo el diseño del muestreo, además de los análisis químicos, biológicos, estadísticos e interpretación de resultados. Los bioindicadores ideales deben tener amplia distribución geográfica, ser de fácil muestreo, vivir en un territorio restringido, y ser bien conocidos a nivel bioquímico y fisiológico [150]. Además, deben ser especies no protegidas para causar el menor daño posible a las poblaciones existentes.

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 [151]. De esta manera, se ha encontrado una relación directa entre la exposición a metales pesados [152, 153], pesticidas [154], radiactividad [155] y daño genético provocado en estos roedores que viven en libertad.

El grupo 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 [19,71, 75, 77, 156, 157], biométricos y citogenéticos [75,158] en ratones de vida libre, *Mus spretus*.

Varias especies de roedores tales como *M. spretus*, *Crucidura russula* y *Apodemus sylvaticus* son los más comunes en esta área protegida [159], sin embargo la especie *M. 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 [160]. La primera aproximación al uso de *Mus spretus* como bioindicador en Doñana se realizó en la década de los 90 [161, 162] para evaluar el efecto de la contaminación producida por el Polo Industrial de Huelva. 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 fueron 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 [19,75,77]. Con estos estudios se demostró que este bioindicador acumula un amplio espectro de agentes contaminantes presentes en el ecosistema en el que habita. Estos resultados han establecido el uso del *Mus spretus* como un organismo modelo muy útil para la evaluación de la calidad mediambiental de los ecosistemas.

El ratón silvestre *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. La figura 8 muestra una fotografía del mismo.



**Figura 8.** Ratón silvestre *Mus spretus*.

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 hídricos le permite ocupar ambientes inaccesibles para otras especies de roedores [163]. Muestra preferencia por los espacios abiertos, áreas de matorral bajo mediterráneo, ambientes rocosos con vegetación herbácea y cultivos de secano. Este pequeño animal se alimenta de plantas, semillas e insectos [164] 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 [165]. De esta manera se transfieren los contaminantes a una multitud de especies, algunas de ellas en peligro de extinción como el lince (*Lynx pardina*) [152,164]. 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 estudio. En su lugar, se utiliza como organismo modelo el ratón de laboratorio *Mus musculus*, que ha sido secuenciado y presenta una estrecha homología genética con el ratón de vida libre *Mus spretus* [18,166]. 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 aborígen 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 ha demostrado que las secuencias genéticas de ambas especies siguen siendo muy parecidas. Esto facilita los estudios proteómicos 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 [77].

Los ratones de laboratorio *Mus musculus* que se utilizan para investigaciones científicas suelen ser albinos. El rasgo anatómico más característico para diferenciarlos de otras especies como el ratón de vida libre *Mus spretus*, además de la coloración, es la longitud de la cola, ya que en el caso de *Mus musculus* la longitud de la cola es superior a la longitud de la cabeza más el cuerpo, sin embargo en el ratón moruno (*Mus spretus*) la longitud de la cola no supera a la del cuerpo. La tabla 2 muestra las diferencias fisiológicas que se existe entre cada especie *Mus musculus*/*Mus spretus*.

	<i>Mus musculus</i>	<i>Mus spretus</i>
<b>FAMILIA</b>	Múridos	
<b>GÉNERO</b>	<i>Mus</i>	
<b>ESPECIE</b>	<i>Mus musculus</i>	<i>Mus spretus</i>
<b>LONGITUD CABEZA Y CUERPO</b>	Entre 7,30 y 10,15 cm	Entre 10 y 12 cm
<b>LONGITUD COLA</b>	De 6,80 a 9,85 cm	De 5 a 7,5 cm
<b>PESO</b>	De 12,5 a 29 g	De 7,5 a 20 g
<b>ESTATUS DE LA ESPECIE</b>	No amenazada	

**Tabla 2.** Comparación fisiológica entre *Mus musculus*/*Mus spretus*.

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, entorno físico, 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 [167]. La figura 9 muestra la fotografía del ratón de laboratorio *Mus musculus*.



**Figura 9.** Ratón de laboratorio *Mus musculus*

Estos ratones 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 considera en conjunto, lo hacen un modelo único para la biología, biomedicina y genética experimental. De esas características cabe resaltar:

- 1) Son mamíferos euterios, por tanto poseen un genoma muy similar al de los seres humanos.
- 2) Tienen un sistema inmune similar al de los seres humanos.
- 3) Las hembras producen un gran número de óvulos, los cuales al ser fecundados son muy resistentes.
- 4) Debido a que soportan bien la consanguinidad, es posible obtener (por medio de cruas repetidas entre individuos emparentados) líneas de individuos genéticamente idénticos, virtualmente homocigotos para todos sus loci.

- 5) El ratón 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.
- 6) Se ha conseguido el desarrollo de técnicas de mutagénesis dirigida que producen alteraciones heredables del genoma que por el momento, no es posible en ninguna otra especie de laboratorio.

En la actualidad se utilizan ratones que se han manipulado genéticamente. Los modelos de ratón transgénico y “*knock-out*” son particularmente útiles para estudiar problemas biológicos complejos, ya que se puede analizar la acción de un gen o una proteína en particular.

#### **4. BIOMARCADORES**

Como se ha comentado previamente, el impacto de los contaminantes en los ecosistemas se evalúa por diferentes metodologías; por una parte mediante estimación físico-química estableciendo umbrales de concentración para algunas sustancias tóxicas o indicadoras de calidad ambiental, y por otra mediante análisis de diversos parámetros biológicos (biomarcadores), cuya alteración respecto a las condiciones naturales indica una perturbación del ecosistema. Es decir, la biomonitorización es una solución económica e integral que informa de la presencia y efecto de diversos factores ambientales (contaminantes) [146].

Los biomarcadores son parámetros biológicos medidos en los organismos bioindicadores, que indican, al alterarse sus niveles, la exposición a estos contaminantes, sus efectos biológicos o los riesgos de su presencia en los ecosistemas [17,147,148]. Estos parámetros se usan en programas de biomonitorización con los siguientes objetivos:

- 1) Vigilancia a largo plazo de zonas afectadas o libres de contaminación.
- 2) Evaluación de riesgos en zonas de descarga contaminante frecuente.
- 3) Implementación de medidas reguladoras y estándares ambientales.
- 4) Comprobación de la efectividad de las medidas correctoras tras cualquier episodio de contaminación.



Los indicadores más sensibles y que primero se alteran en un ecosistema son los biomarcadores, por lo que sirven como alertas tempranas ante los efectos ambientales de los contaminantes [17,147,168]. Los biomarcadores se clasifican en tres grupos: de exposición, de efecto y de susceptibilidad [169, 170]. Los de **exposición** se determinan en fluidos corporales o tejidos y engloban cualquier sustancia o metabolito derivado de ella o producto de su reacción con una molécula biológica [169]. Los de **efecto** indican los cambios bioquímicos dentro de un organismo como resultado de la exposición a xenobióticos. Incluyen alteraciones bioquímicas, fisiológicas o de otro tipo dentro de los tejidos o fluidos corporales de un organismo. Los de **susceptibilidad** se refieren a las aptitudes inherentes o adquiridas específicamente por ciertos organismos a la exposición a xenobióticos [170,171]. Pueden además ser marcadores genéticos que incluyen alteraciones en la estructura cromosómica, tales como polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción o polimorfismos de actividades enzimáticas.

Para Gradjean [172] y colaboradores el biomarcador ideal sería aquel en el que:

- La recogida de muestras sea fácil, se realice de forma ética y cuyo posterior análisis sea sencillo y reproducible.
- Sea específico para un tipo particular de exposición.
- Refleje un cambio que sea subclínico y reversible para poder intervenir

En las últimas dos décadas se han adoptado una variedad de biomarcadores en diversos programas de monitorización, nacionales e internacionales en Norteamérica, Europa, Australia y Nueva Zelanda [173]. En España, en el año 2000 se propusieron una serie de biomarcadores para su incorporación en los programas de monitorización de la calidad de las costas de la Península Ibérica [174].

Para conocer el estado de contaminación de un ecosistema que más se aproxime a la realidad conviene utilizar una batería de biomarcadores cuyos resultados se complementen para dar una respuesta integrada a episodios de estrés ambiental. Los biomarcadores pueden pertenecer a distintos niveles de organización: molecular, celular, histológico, fisiológico, de organismo, de población, de comunidad o de ecosistema. La tabla 3 muestra algunos ejemplos de biomarcadores pertenecientes a distintos niveles de organización y los tipos y tiempos de repuestas biológicas a que dan lugar.

Biomarcador	Respuesta Biológica	Nivel de organización	Aparición <sup>1</sup>	Nivel de detección
<b>Daño al ADN</b>	Formación de Aductos	Molecular	Temprana	Bajo
<b>Metabolitos</b>	Xenobióticos	Molecular	Temprana	Bajo
<b>Enzimas antioxidantes</b>	Defensa contra estrés oxidativo	Molecular	Temprana	Moderado
<b>Colinesterasa</b>	Inhibición enzimática	Molecular	Temprana	Moderado
<b>Biosíntesis de hemo</b>	Porfirinas anormales	Molecular	Media	Moderado
<b>Otras actividades /relación AMP:ATP/relación RNA:DNA</b>	Disfunción metabólica	Molecular	Temprana	Moderado
<b>Aberraciones cromosómicas</b>	ADN anormal	Subcelular	Media/tardía	Alto
<b>Estabilidad lisosomas/ Necrosis/Genotoxicidad</b>	Homeostasis mortalidad individual	Subcelular	Tardía	Alto
<b>Inmunosupresión /Tumores</b>	Homeostasis mortalidad Individual	Celular	Tardía	Alto
<b>Inmunocompetencia</b>	Fagocitosis	Celular	Media/tardía	Moderado
<b>Transformación celular</b>	Necrosis/neoplasia	Celular/tisular	Tardía	Alto
<b>Fecundidad/Comportamiento</b>	Cambios en la reproducción	Organismo	Tardía	Alto
<b>Índices de condición</b>	Variación en tasas de crecimiento	Organismo	Tardía	Alto
<b>Mortalidad individuos</b>	Cambios en la Población	Población	Tardía	Alto
<b>Diversidad</b>	Disminución de la diversidad	Comunidad	Tardía	Alto

<sup>1</sup>Temprana: de horas a días; media: de días a semanas; tardía: de semanas a meses/años.

**Tabla 3.** Ejemplo de biomarcadores, aparición en el tiempo y tipo de repuesta, nivel de organización biológica al que pertenecen y sus niveles de detección.



Los biomarcadores de nivel molecular o celular 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 [17,147, 168]. La figura 10 muestra los tipos y tiempos de respuestas biológicas a que dan lugar los biomarcadores pertenecientes a distintos niveles de organización como consecuencia de la exposición a sustancias tóxicas, como son los metales.



**Figura 10.** Esquema representativo de las respuestas en batería de los biomarcadores pertenecientes a distintos niveles de organización debido a la exposición a sustancias tóxicas.

### 4.1. Enzimas de biotransformación como biomarcadores

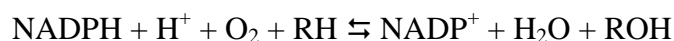
Los organismos están continuamente expuestos a compuestos, naturales o sintéticos (xenobióticos), que pueden ser absorbidos del medio ambiente por inhalación, ingestión o contacto dérmico. El metabolismo de los xenobióticos se produce en todos los órganos y tejidos, pero el hígado es el órgano detoxificador por excelencia. Las alteraciones en las actividades de enzimas de biotransformación suelen ser los biomarcadores más sensibles [175]. La biotransformación de xenobióticos por los sistemas enzimáticos celulares convierte los contaminantes lipofílicos en otros más polares y fácilmente excretables. La biotransformación depende de la edad, dieta, estrés a que esté sometido el organismo, especificidad de tejido u órgano, dosis del compuesto o grado de inducción o inhibición de las enzimas responsables [168]. En relación a esto pueden citarse diversas reacciones. Las de **fase I** introducen en el xenobiótico grupos

polares por oxidación, reducción, hidrólisis o hidratación, originando un metabolito más hidrofílico. En la **fase II**, el grupo polar del metabolito es conjugado con moléculas endógenas, también muy polares, como glutatión, aminoácidos, ácido glucurónico, grupos sulfato, metilo o acetilo.

Las enzimas biotransformadoras de xenobióticos forman parte de las rutas metabólicas de los organismos y no son específicas para los sustratos sobre los que actúan, ni para la función de detoxificación. Por ello, en ocasiones se generan metabolitos más electrofílicos / tóxicos que los de partida, este fenómeno se conoce como activación metabólica [176, 177].

- **Enzimas de fase I**

Muchas reacciones de fase I son de monooxigenación. En ellas, un átomo de oxígeno del O<sub>2</sub> es transferido al sustrato y el otro reducido a H<sub>2</sub>O. Muchas monooxigenasas son sistemas acoplados de transporte de electrones con dos enzimas (citocromo y flavoproteína oxidoreductasa) [178]. Los más abundantes y diversos dependen de citocromos P450, donde el poder reductor suele provenir del NADPH. La reacción es la siguiente:



Los citocromos P450 pertenecen a una superfamilia con multitud de isoenzimas [168]. Son hemoproteínas cuyo grupo prostético es una Fe-protoporfirina IX (hemo) y una cadena de entre 45 y 60 kDa [179]. El Fe se coordina a los 4 N del anillo tetrapirrólico de la porfirina, su quinto ligando es el S de una Cys, y el sustrato ocupa su sexta posición. Los electrones del NADPH son transferidos al citocromo P450 por una flavoproteína, NADPH-citP450 reductasa, cada una rodeada por 10 a 30 moléculas de P450 [178, 179].

Las distintas isoenzimas P450 actúan sobre muchos sustratos endógenos (esteroides, hormonas esteroideas, vitaminas liposolubles, prostaglandinas, ácidos grasos, etc.) y exógenos (3-metilcolantreno, fenobarbital, PAHs, PCBs) [168]. Catalizan las siguientes reacciones: *N*-oxidaciones, *S*- y *P*-oxidaciones, hidroxilaciones aromáticas, alifáticas y



heterocíclicas, epoxidaciones, *O*-, *N*- y *S*-desalquilaciones, desulfuraciones, desaminaciones y deshalogenaciones oxidativas. Las tres principales familias que se inducen por xenobióticos son CYP1, CYP2 y CYP3 [178].

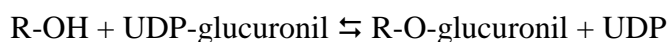
Las *flavín monooxigenasas* también son enzimas de fase I. Catalizan la oxidación de compuestos nitrogenados y sulfurados [168] por lo que son capaces de transformar algunos de los sustratos sobre los que actúan los citocromos P450 [180].

El sistema del *citocromo b5* (citocromo *b5* y NADH-cit *b5* reductasa) y las *epóxido hidrolasas* son otras importantes enzimas de fase I. Activan las monooxigenasas del citocromo P450 y catalizan la conversión de epóxidos (productos de los P450) en dihidrodioles menos reactivos [168].

- **Enzimas de fase II**

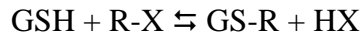
Los niveles de las enzimas de fase II también pueden afectarse por la exposición a contaminantes [181]. El mecanismo de inducción para la mayoría de enzimas de fase II es probablemente regulado por el receptor Ah. Bajo su control se encuentran un conjunto de genes que se conoce como batería génica Ah [182], entre los que se encuentran los genes de las enzimas UDP glucuroniltransferasa, NAD(P)H quinona reductasa y glutatión-S-transferasa [168].

Las UDP-glucuronosiltransferasas conjugan metabolitos hidroxilados en fase I, con ácido glucurónico en su forma activada (UDP-glucuronil), según la reacción:



Generalmente la conjugación disminuye la toxicidad de los xenobióticos, aunque en el caso del acetilaminofluoreno se ve incrementada [168].

Las glutatión-S-transferasas (GSTs) conjugan el glutatión ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly) reducido (GSH) con diferentes moléculas electrofílicas hidrofóbicas, según la reacción:

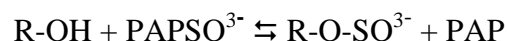


R es un radical alifático, aromático o heterocíclico, y X halógeno, sulfato, nitrito o epóxido.

Pueden distinguirse dos superfamilias con diferente estructura, actividad, distribución celular y actividad biológica: GST microsomales, unidas al retículo endoplásmico y GST citosólicas [183].

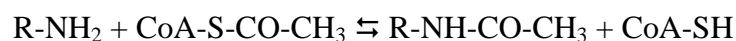
Las citosólicas son homo- o heterodiméricas de ~28 kDa cada subunidad [184]. Las cuales actúan sobre tóxicos derivados del daño oxidativo a lípidos y ácidos nucleicos, e intermediarios en la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos [185, 186]. Además, participan en la biotransformación de fármacos, carcinógenos y plaguicidas [187].

Las *sulfotransferasas* conjugan xenobióticos activados en la fase I con sulfato, en forma de 5'-fosfoadenosin-3'-fosfosulfato (PAPSO<sup>3-</sup>), según la siguiente reacción:



Ocasionalmente, esta conjugación aumenta la toxicidad de los sustratos [168].

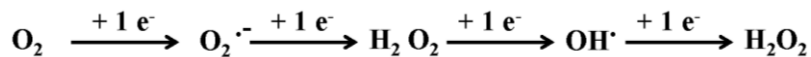
Las *N-acetiltransferasas* conjugan xenobióticos con grupos amino a grupos acetilos procedentes de la acetil-CoA [168], según la reacción:





## 4.2. Estrés oxidativo: Biomarcadores de daño oxidativo

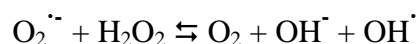
Los organismos aerobios usan  $O_2$  como aceptor final de electrones en la cadena respiratoria para obtener energía más eficientemente, y en la fagocitosis, pues a partir del  $O_2$  se generan **especies reactivas de oxígeno (EROs)** que atacan a los agentes invasores. Sin embargo, también dañan ácidos nucleicos, proteínas, glúcidos y lípidos [188]. En ocasiones las defensas celulares frente a las EROs no son lo suficiente eficaces y se produce *estrés oxidativo* [189]. Las EROs se forman por reacciones endógenas o inducidas por bifenilos, aminas aromáticas y metales, durante la reducción unielectrónica del  $O_2$  [16, 177]:



Muchas reacciones producen radical anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) [16, 188,189]:

- 1) Oxidación de moléculas endógenas (semiquinonas, flavinas, tioles, catecolaminas) y metales.
- 2) Actividad de oxidasas y deshidrogenasas (NADPH-P450 reductasa, NADH oxidasa, xantina oxidasa) y cadenas de transporte electrónico.
- 3) Metabolismo de algunos xenobióticos, quinonas nitroaromáticas, bifenilos y metales de transición.
- 4) Ciclado redox.

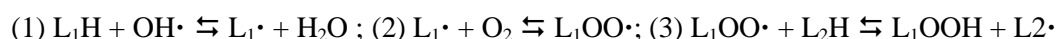
El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) se forma por dismutación espontánea o enzimática (superóxido dismutasa) del  $O_2^{\cdot -}$ , o por reducción dielectrónica directa del  $O_2$ , catalizada por la ácido graso oxidasa, aminoácido oxidasas, etc [188]. La especie más reactiva es el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), formado a partir de  $O_2^{\cdot -}$  y  $H_2O_2$  en la reacción de Fenton [188] catalizada por iones metálicos:



Las EROs desarrollan también funciones fisiológicas como en el caso de la fagocitosis, útiles para la defensa contra agentes invasores [189,190]. También otras células no fagocitarias producen EROs para desarrollar funciones de señalización [191]. A pesar del papel fisiológico que desempeñan algunas especies activadas de oxígeno, también pueden dar lugar a reacciones de oxidación indeseadas, contra las cuales los organismos han desarrollado defensas antioxidantes [192]. Las EROs no causan daño oxidativo en condiciones normales, es decir, cuando existe un equilibrio entre sustancias prooxidantes y antioxidantes. Sin embargo, cuando tal equilibrio se rompe a favor de las sustancias prooxidantes se produce el estrés oxidativo [16, 193]. Al ser sustancias muy tóxicas dañan todo tipo de biomoléculas: ácidos nucleicos, proteínas, glúcidos y lípidos [188].

Las proteínas sufren roturas de los anillos en los residuos de His y Trp, o del enlace peptídico a nivel de las Pro, formación de puentes disulfuro o disulfuros mixtos en los residuos de Cys que puede conducir a la inactivación temporal de enzimas [194]. La formación de disulfuros mixtos entre proteínas y GSH altera el estado redox intracelular entre las formas reducidas y oxidadas del glutatión.

Las EROs provocan numerosos daños en el ADN, rotura de cadenas, alteración de bases, aberraciones cromosómicas e intercambios entre cromátidas hermanas, que pueden provocar mutaciones [16, 177]. El radical hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ) ataca los ácidos grasos poliinsaturados, integrantes de los fosfolípidos de las membranas, en una reacción de peroxidación lipídica [189, 195]:



Si los lipohidroperóxidos formados (LOOH) no se eliminan, generan (en reacciones catalizadas por metales) otros radicales ( $\text{LO}\cdot$ ), que pueden atacar otras biomoléculas, como ácidos nucleicos y proteínas [189]. Los niveles de peroxidación lipídica pueden medirse directamente, siguiendo el contenido de lipohidroperóxidos, o indirectamente, por los niveles de malondialdehído. Este compuesto es un producto de la descomposición de los lipohidroperóxidos, que forma un complejo coloreado y fluorescente con el ácido tiobarbitúrico [195, 196]. Los sistemas antioxidativos eliminan EROs para evitar daños en los organismos [16,188,189]. Puesto que muchos

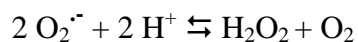


contaminantes ambientales incrementan la producción de EROs, estos sistemas tienen gran importancia en la defensa de los organismos contra la contaminación ambiental.

El sistema de defensa antioxidativo incluye:

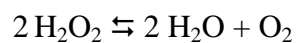
- 1) Enzimas oxidativas que detoxifican directamente las EROs.

Las **superoxido dismutasas** (SOD) son metaloenzimas que catalizan la dismutación del radical anión superóxido, en la reacción:



En eucariotas, se distinguen las isoenzimas que poseen Cu y Zn (Cu/Zn-SOD), de localización citosolicas, que se inhiben por la acción del cianuro, y la Mn-SOD, de la matriz mitocondrial, que no se inhibe por el cianuro [197]. La SOD es inducible por contaminantes y alto nivel de  $\text{O}_2$  [17] y representa la principal defensa contra el estrés oxidativo en los organismos, por eso se ha usado en numerosos estudios como biomarcador de contaminación por metales pesados y estrés oxidativo [71, 157, 198, 199].

La **catalasa** (CAT) posee un grupo hemo en su sitio activo, y está presente en todos los organismos aerobios estudiados, eucariotas y procariotas [188]. En eucariotas, se localiza principalmente en los peroxisomas. Cataliza la dismutación del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno:



La catalasa es más efectiva en niveles de alto estrés oxidativo, mientras que a niveles bajos de estrés actúa mejor el sistema glutatión peroxidasa [200].

La **glutatión peroxidasa** (GSHPx) es una enzima citosólica dependiente de Se que cataliza la reducción de peróxidos orgánicos y peróxido de hidrógeno, usando GSH como donador de electrones:





Esta enzima juega un papel importante en la protección de la célula frente al daño oxidativo evitando la peroxidación lipídica [201].

- 2) Defensas no enzimáticas capaces de detoxificar EROs interrumpiendo la cadena de reacciones que las generan:

La **vitamina E** ( $\alpha$ -tocoferol), presente en las membranas celulares combate la peroxidación lipídica en estas al reaccionar con los radicales lipídicos y romper la cadena de peroxidación lipídica.

La **vitamina C** (ascorbato) es un antioxidante que reduce la semiquinona del  $\alpha$ -tocoferol [188]. Sólo se usa como biomarcador en plantas y animales que lo pueden sintetizar [175].

- 3) Sistemas auxiliares (glucosa-6-Pdeshidrogenasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa, glutatión reductasa) que regeneran poder reductor, NADPH y GSH, que se consume durante la detoxificación de las EROs [188].

La **glutatión sintetasa** y **glutatión reductasa** son responsables de la síntesis y reducción del glutatión [17]. La **glucosa-6-P deshidrogenasa** y la **6-fosfogluconato deshidrogenasa**, forman parte de la ruta de las pentosas fosfato y producen NADPH [16]. La **NADPH-quinona oxidoreductasa** cataliza la reducción divalente de quinonas a hidroquinonas, evitando así la producción masiva de anión superóxido y el consumo excesivo de NADPH [202].

### 4.3. Otros biomarcadores de contaminación ambiental: las metalotioneinas

Las metalotioneinas (MTs) son metaloproteínas que se caracterizan por su pequeño tamaño (alrededor de 7 KDa) y una secuencia de 61 o 62 aminoácidos con un contenido elevado de cisteínas que representa entre un 20 y 30 % de los residuos de aminoácidos totales (un total de 20 cisteínas) [203,204]. Se caracterizan por la presencia de aminoácidos pequeños como glicina o alanina, lo que hace su estructura más flexible y permite la formación de plegamientos, que con otra composición de aminoácidos en la cadena no sería termodinámicamente favorable. En general, no contienen aminoácidos

aromáticos o voluminosos como tirosina, triptófano, fenilalanina o leucina que en otras proteínas se encargan de dar estabilidad estructural, ya que en las MTs esta propiedad es aportada por los enlaces metal-tiolato. Los complejos metal-MT no contienen grupos tioles libres y los iones metálicos se unen formando complejos tiolados con una geometría tetraédrica para los metales divalentes o trigonal, digonal o tetraédrica en el caso del Cu [205, 206].

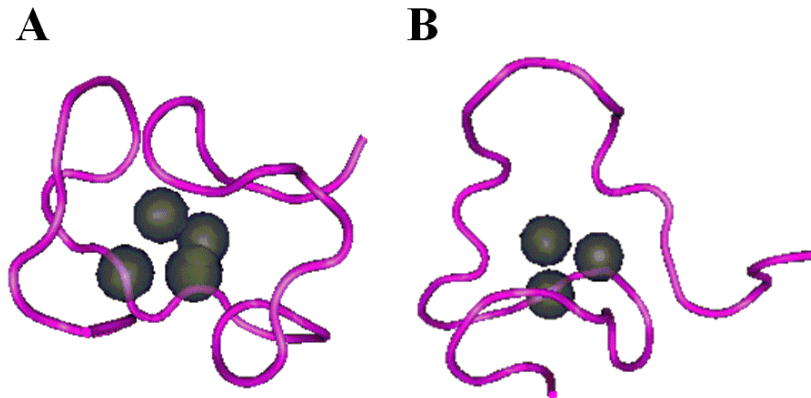
Los primeros investigadores que aislaron metalotioneinas fueron Margoshes y Vallee en 1957 a partir de muestras de corteza renal de caballos que habían sido tratados con cadmio [207]. El nombre de “Metalotioneina” se propuso por el elevado e inusual contenidos de metales y sulfuros de estas moléculas [208]. A partir de entonces, se han aislado miembros de la familia de las MTs en un amplio rango de organismos, entre ellos en animales, plantas, hongos y bacterias [203]. Hasta el 2011, se han registrado más de 4900 secuencias de nucleótidos en la base de datos de nucleótidos de NCBI como metalotioneinas. Del análisis de estas secuencias es posible apreciar que se encuentran en organismos de todos los géneros eucariotas, y además en forma polimórfica, así como en más de 300 secuencias bacterianas conocidas.

La diversidad encontrada en las secuencias descritas como MT, implica a su vez diversidad en las estructuras tridimensionales de los correspondientes complejos metal-MT, propiedades moleculares y funciones biológicas. En total, sólo 44 estructuras de complejos metal-MT se encuentran depositadas en la base de datos Protein Data Bank (PDB). De ellas, 16 pertenecen a organismos vertebrados y todas adoptan plegamientos muy similares. Las MTs de esta familia, al igual que todas las demás, presentan dos componentes claramente diferenciados en cuanto a su naturaleza química. Un componente polipeptídico y otro metálico. Frecuentemente se utiliza el término “tioneina” en referencia a la proteína en ausencia de metales (apotioneina).

La clasificación tradicional de las MTs se basa esencialmente en sus características estructurales. De esta forma, la **Clase I** incluye todas las formas de MT en vertebrados y también de otros fila con estructura primaria muy similar a la MT de caballo [209]. En la **Clase II** se encuentran los polipéptidos que tienen poca homología con las secuencias de aminoácidos de las MTs de mamíferos. Finalmente, la **Clase III** definida como atípica, está constituida por una familia de péptidos de cadena corta, con

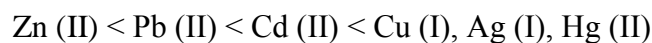
capacidad para unir iones metálicos formando complejos estables intracelulares. La presencia en algunas especies de varias isoformas de MT, con pequeñas diferencias en su estructura primaria, aunque suficientes para diferenciarlas en términos de carga total de proteína, es una muestra de polimorfismo genético [209]. La nomenclatura adoptada para las isoformas de MT (isoMT) está basada en las recomendaciones de la IUPAC-IUB (Nomenclature of Multiple Forms of Enzymes), siendo numeradas de acuerdo con la secuencia de elución de las resinas de intercambio iónico (MT-1, MT-2, MT-3, etc.). La familias de MTs de la **Clase I** presentan varias subfamilias de las cuales cuatro pertenecen a las MTs de mamíferos: MT1, MT2, MT3 y MT4. Las MT1 y MT2 están bien caracterizadas desde el punto de vista bioquímico y han sido ampliamente estudiadas desde su descubrimiento. En 1975 fueron aisladas por primera vez estas dos isoformas en el ratón [210].

Se considera que la estructura tridimensional de los complejos metal-MTs son termodinámicamente muy estables, aunque muestran cierta labilidad cinética que permite el reajuste que implica el intercambio de iones metálicos de su estructura [211]. Para las uniones a metales divalentes se han propuesto dos conformaciones de enlace con los grupos tioles, en ambos casos con los iones metálicos adoptando esferas de coordinación tetraédrica, siendo la unidad básica para esta coordinación  $M_3Cy_9$ . En esta unidad básica coexisten tres iones metálicos y tres sulfuros formando un anillo de seis miembros. El resto de los grupos tioles se coordinan a un ion metálico cada uno y cada metal se une a dos de estos residuos de cisteína terminales. Estos anillos han sido encontrados en el dominio beta ( $\beta$ ) de las MTs de mamífero. La conformación alternativa es la formada por el núcleo  $M_4Cy_{11}$  encontrada en el dominio alfa ( $\alpha$ ) de MTs de mamíferos [212, 213]. La figura 11 muestra la estructura tridimensional de los dominios  $\alpha$  (A) y  $\beta$  (B) de la MT-1 con 7 átomos de Cd de ratón *Mus musculus*.



**Figura 11.** Estructura tridimensional de MT-1 con 7 átomos de cadmio de *Mus musculus*. A: corresponde a la estructura de dominio  $\alpha$ . B: corresponde a la estructura de dominio  $\beta$ . Estas estructuras pertenecen a la base de datos “MMDB” con la identificación 12319 y 12320 para las estructuras  $\alpha$  y  $\beta$  respectivamente. En ambos casos se aprecian los iones de cadmio en el centro de las estructuras.

El espectro de metales que pueden unirse a las MTs es bastante amplio y la afinidad con que se unen depende del átomo metálico. En condiciones fisiológicas las MTs suelen coordinar Zn y/o Cu. No obstante, si existe una elevada concentración de otros metales pesados en el medio, como Cd o Hg, estos pueden desplazar a los anteriores. Se puede establecer una escala de afinidad entre MTs y metales [209]:



El contenido metálico puede variar según el tejido, la situación fisiológica y las condiciones ambientales. Es frecuente que MT1 y MT2 contengan siete equivalentes de metal divalente [214]. No obstante son capaces de unir hasta 12 metales monovalentes [215] y bajo ciertas circunstancias se puede incrementar el contenido de metales divalentes [216]. La unión a metales es reversible de manera que bajo determinadas condiciones, como un descenso de pH o variaciones en el estado redox, se pueden desplazar los átomos metálicos de la molécula de MT obteniéndose así la apotioneína. Normalmente, las MT1 y MT2 al ser aisladas de tejidos biológicos, contienen siete átomos de Zn por molécula, aunque también pueden poseer ciertas cantidades de Cu.

Las MT1 y MT2 se encuentran en prácticamente todos los tejidos del organismo como hígado, riñón, intestino, testículos, pulmón, corazón y cerebro [217, 218], sin embargo no se expresan en todas las células. Por ejemplo en el hígado se expresan en los hepatocitos pero no en las células de kupffer y en el riñón se encuentran principalmente en el túbulo proximal de la nefrona [219]. Por el contrario, la MT3 y MT4 tienen una distribución más restringida, expresándose fundamentalmente en el sistema nervioso central (SNC) [220, 221] y epitelio escamoso estratificado [222]. En cuanto a su localización subcelular, la MT1 y MT2 son proteínas esencialmente citoplasmáticas [223] aunque también se ha detectado su presencia en fracciones mitocondriales y lisosomales [224] así como en núcleos celulares [225].

Las MTs de mamífero se han relacionado con actividades antiinflamatorias, antiapoptóticas, antioxidantes, proliferativas y angiogénicas, así como también se han visto involucradas en la resistencia a la quimioterapia [226]. En humanos han sido relacionadas con una amplia variedad de enfermedades y condiciones patológicas incluyendo la diabetes [227], las enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer [228] y el cáncer [226].

Sin embargo, entre todas las funciones que desempeñan las metalotioneínas, las más estudiadas son la participación en la homeostasis de iones metálicos fisiológicos, la detoxificación de metales tóxicos y la protección ante el estrés oxidativo [229-231]. De hecho, numerosos estudios corroboran estas propiedades. Así los estudios llevados a cabo por Feng et al. [232] y Maret et al. [233] establecen que las MTs contribuyen al mantenimiento de la homeostasis de los iones metálicos, y también mediante el transporte de los iones  $\text{Cu}^+$  y  $\text{Zn}^{2+}$  a las apoenzimas. Maret et al. [234] realizaron experimentos de adición de MTs en su forma apo, es decir, libre de iones metálicos, a enzimas que habían sido inhibidas por la presencia de Zn, de manera que se restituía la actividad enzimática de éstas, por lo que concluyeron que las MTs actuaban como agentes quelatantes eliminando el Zn de las enzimas inhibidas. Pulido et al. [235] demostraron la implicación de las MTs en los mecanismos de detoxificación de metales a partir del análisis de metales en muestras de riñones humanos donde detectaron cantidades significativas de  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Hg}^{2+}$ . Por otra parte, mediante experimentos desarrollados con ratones mutantes por delección de los genes de MT se ha demostrado la incapacidad del organismo para desarrollarse correctamente cuando recibía una dieta



tanto con déficit como con exceso de zinc [236]. Este estudio demuestra que las MTs son importantes en la protección de un organismo ante condiciones extremas de presencia de zinc, pudiendo actuar como fuente de este metal en condiciones de déficit, y como depósito en condiciones de exceso.

También resulta de gran importancia el control de la toxicidad por cobre mediante la formación de compuestos coordinados Cu-MT. De esta forma, las MTs secuestran el Cu libre, y debido a las propiedades de sus grupos tioles actúan como agentes reductores para generar protección contra el estrés oxidativo ocasionado [237]. En el caso de la detoxificación de iones de cadmio, existen resultados que indican que la función de las MTs estaría relacionada con la acumulación de cadmio en los riñones, pero a su vez con la reducción significativa de sus efectos tóxicos, ya que se ha visto que ratones mutantes por delección de MT son hipersensibles al cadmio, aunque solo acumulen el 7% comparado con la cepa salvaje [238].

El elevado contenido de grupos tioles que presentan las MTs las convierten en moléculas ideales para interactuar e inhibir las especies reactivas del oxígeno (ROS). Los genes de las MTs son inducidos por las ROS mediante la interacción de éstas con los elementos de respuesta antioxidantes (ARE) [237]. Los iones metálicos son una fuente significativa de inducción de ROS, sin embargo, los complejos metal-MT son capaces de inhibir la producción de radicales libres, protegiendo de esta manera a las células del estrés oxidativo.

La síntesis de MTs puede ser inducida por una gran variedad de estímulos, entre los que se incluyen ciertos metales, hormonas, citoquinas, toxinas, factores de crecimiento y el estrés [229], siendo los metales los inductores más potentes. La inducción de MT por metales traza se utiliza como biomarcador para evaluar la contaminación ambiental tanto por metales no esenciales (Cd, Hg), como metales esenciales (Cu) pero potencialmente tóxicos [239,240].

La inducción de la síntesis de MT requiere la participación de unas secuencias específicas de ADN, denominadas MRE (elementos de respuesta al metal), y se cree que son los sitios de unión de unos factores de transcripción encargados de la regulación de los metales. Los MREs están presentes en múltiples copias, en la región promotora

de los genes [204]. La síntesis se inicia con la unión de los metales a inhibidores de los factores de transcripción, de forma que, tras la unión, dichos factores de transcripción quedan libres para unirse al promotor del gen y producir la síntesis de MTs que se unirán al exceso de metal [241]. La expresión de las MTs puede verse alterada por cambios en la estructura del gen, como amplificación y metilación, y por la diferenciación y desarrollo celular.

Se ha investigado ampliamente la inducción de metalotioneínas (MTs) como una medida de respuesta a la exposición a metales en organismos marinos, tanto en condiciones silvestres [242-247] como condiciones experimentales [248-250], y en organismos terrestres como ratones, tanto en condiciones experimentales [130, 199, 251-255] como en condiciones silvestres, aunque este último tipo de interacción es más escasa [71, 156, 157, 198, 199, 256-258].

## **5. SITUACIÓN AMBIENTAL DEL PARQUE NACIONAL DE DOÑANA**

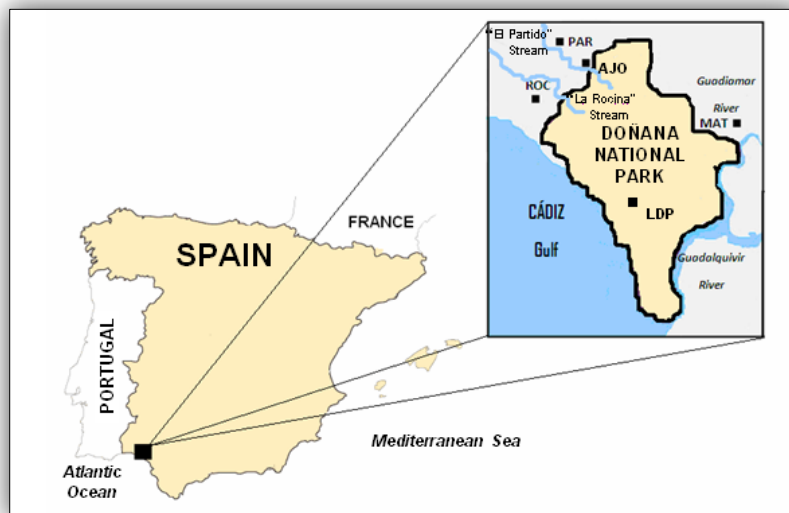
### **5.1. Doñana como enclave natural**

La Reserva Natural de Doñana, un espacio protegido de más de 100.000 ha, está situada al Norte del Estuario del Guadalquivir, al suroeste (SO) de España, entre las provincias de Huelva, Sevilla y Cádiz (figura 12) [259]. En reconocimiento de su importancia cultural, científica y paisajística, e intentando abarcar los diferentes ambientes naturales que la componen, para su mejor preservación, se crea mediante el Decreto 2412/1969 de 16 de octubre de 1969, 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 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 más de 50.000 ha. También hay que considerar la existencia de más de 20.000 ha consideradas como Zona de Protección del Parque Nacional de Doñana.



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 y varias especies acuáticas y terrestres de la fauna española. 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 [260].

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, desempeñando el papel de monumento natural [260].



**Figura 12.** Situación geográfica del Parque Nacional de Doñana [156].

El PND situado sobre el acuífero Almonte-Marismas, del río Tinto al Guadalquivir, ocupa 2.500 Km<sup>2</sup> en las provincias de Huelva y Sevilla. 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 [261]. Como consecuencia de ello Doñana se ve amenazada por actividades urbanas, agrícolas, industriales y mineras [24].

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 delicada situación, entre ellas

están la malvasía, la cerceta pardilla, el calamón o la gaviota picofina. Hay además 29 especies de mamíferos, como 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 [262, 263]. El gran número de especies de aves constituye, probablemente, la mayor riqueza del Parque Nacional y le confiere una alta relevancia internacional. Doñana es una de las reservas naturales más grandes de Europa y uno de los enclaves ecológicos más importantes a nivel mundial donde sobreviven muchas especies en peligro de extinción. 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. Además, se distingue la Vera que es considerada una zona de transición entre los cotos y la marisma [262, 264].

- Dunas móviles

El Parque Nacional de Doñana tiene uno de los pocos sistemas de dunas móviles existentes en la Península Ibérica. Las dunas móviles son arenas movidas por el viento que, al desplazarse, van cubriendo la vegetación que se interpone en su camino (figura 13). Estas dunas abarcan en Doñana 25 km de longitud y poseen una anchura de 3,5 km, situándose en el suroeste del Parque Nacional, entre el océano Atlántico y la marisma [265]. Una peculiaridad de las dunas móviles es que, con frecuencia, rodean bosquetes de pinos, llamados corrales, y pudiendo enterrarlos de forma que cuando las dunas siguen su camino arrastradas por el viento, van dejando un paisaje de troncos secos y defoliados.



**Figura 13.** Duna móvil del Parque Nacional de Doñana.



- La Vera

La Vera constituye una franja de entre 200 a 1.500 m de anchura, siendo el límite entre las áreas de arcillas y arenas, creando una zona de transición entre el coto (bosque mediterráneo asentado sobre dunas fósiles) y la marisma (figura 14). Al constituir un ecotono (límite natural entre dos ecosistemas distintos) presenta una gran riqueza ecológica. La vegetación está formada, fundamentalmente, por pastos abiertos junto a zonas de matorral, confiriendo a este enclave características excepcionales, donde se asientan habitualmente grandes colonias de aves, principalmente garzas, espátulas y garcillas [262, 264].



**Figura 14.** Vera o zona ecotonal de Doñana.

- Los Cotos

Están constituidos por bosque mediterráneo, fundamentalmente matorral, con diferentes especies florales en función de la disponibilidad de agua. Los cotos están asentados sobre dunas fósiles, razón por la cual muestran un paisaje ondulante. Así, la zona de cotos más húmeda (monte negro), está dominada por el brezo blanco (*Erica arborea*). Las áreas más áridas (monte blanco) tienen tomillo (*Thymus vulgaris*), lavanda (*Lavandula stoechas*), jaras (*Cistus sp.*) y romero (*Rosmarinus officinalis*) como especies características. Además de estos matorrales, tanto en el monte blanco como en el monte negro, se encuentran varias especies comunes a ambos, como son los madroños (*Arbutus unedo*), enebros sabina (*Juniperus sp.*), aligustres (*Forestiera durangensis*) y alcornoques (*Quercus suber*). Los alcornoques constituyen los restos de bosques antiguos y son muy característicos del Parque porque forman el lugar preferido de anidamiento de diversas especies de aves coloniales, como las espátulas, cigüeñas, garzas, martinets y otras. La zona de cotos localizada



cerca de la costa está dominada por pinos piñoneros (*Pinus pinea*) de más de 300 años de edad. La figura 15 muestra la fotografías tomadas en el Parque Nacional de Doñana de un pinar de pino piñonero (*Pinus pinea*) (izquierda) y un bosque de alcornoques (*Quercus suber*) (derecha) entre los que se encuentran acebuches (*Olea europae var sylvestris*), madroños (*Arbutus unedo*) y otras especies, como labiérnagos (*Phyllirea angustifolia*) y mirtos (*Myrtus communis*). Bajo estos árboles se extiende un denso tapiz de helecho común (*Pteridium aquilinum*) que incrementa la sensación de humedad y frescor, además el suelo es oscuro y acumula abundante materia orgánica.



**Figura 15.** Pinar de pino piñonero (*Pinus pinea*) (izquierda) y bosque de alcornoques (*Quercus suber*) (derecha) del Parque Nacional de Doñana

Especies animales muy abundantes en este ecosistema son el conejo (*Oryctolagus cuniculus*) y la perdiz roja (*Alectoris rufa*), que constituyen especies presa con un alto índice de apetencia para los predadores. Además, los cotos también están habitados por otras especies como el ratón moruno (*M. spretus*), la musaraña gris (*Crucidura russula*), el ratón de campo (*Apodemus sylvaticus*), el meloncillo (*Herpestres ichneumon*), el tejón (*Meles meles*), el jabalí (*Sus scrofa*), el ciervo (*Cervus elaphus*), el lirón careto (*Eliomys quercinus*), el águila culebrera (*Circaetus gallicus*) y el milano real (*Milvus milvus*), como exponentes interesantes. Se pueden encontrar también varias especies en grave peligro de extinción, que habitan de forma exclusiva en la Península Ibérica, como el Águila Imperial Ibérica (*Aquila adalberti*) (figura 16), la Cerceta Pardilla (*Anas strepera*), la Malvasía Cabeciblanca (*Oxyura leucocephala*), la Gaviota de Audouin (*Larus audouinii*) o el Lince Ibérico (*Lynx pardina*) (figura 16), entre otras [262, 264].



**Figura 16.** Águila Imperial Ibérica (*Aquila adalberti*) y Lince Ibérico (*Lynx pardina*).

- La marisma

La marisma, de una extensión aproximada de 30.000 ha, constituye un cuerpo de agua somera en invierno que, progresivamente, se va secando en primavera-verano [264]. La marisma, destaca por su escaso relieve, la naturaleza arcillosa del suelo y su acentuada estacionalidad hídrica, inundada por aguas de origen pluvial, fluvial y mareal [266].

Dentro de este ecosistema se encuentran diversos biotopos:

1) La **marisma baja** está formada por aquellos lugares ligeramente por debajo de la altitud media, que en años de lluvias normales concentran una importante cantidad de agua, lo que hace que disminuya su salinidad y pueda crecer una vegetación palustre basada en la castañuela (*Scirpus maritimus*) y el bayunco (*Scirpus littoralis*) [267].

2) La **marisma alta** permanece durante casi todo el año como una estepa arcillosa y compacta, encharcándose sólo durante el invierno [267].

3) **Los lucios** son el nombre local que se da a aquellos lugares más profundos que permanecen encharcados durante periodos más prolongados. En ellos, la alta salinidad impide casi por completo el crecimiento de la vegetación, a excepción de bayuncos, candilejo (*Juncus subulatus*) y castañuelas en los bordes. Durante la sequía estival, estas láminas de agua quedan muy reducidas o completamente secas, mostrando un fondo cuarteado de limos arcillosos grises, cubiertos a veces de costras salinas blanquecinas [267].



4) Los **caños** son lo que antaño fueran cauces de arroyos, brazos y afluentes del río Guadiamar. Constituyen el mayor curso de agua salina, pudiendo estar comunicado directamente con el mar, siendo entonces un caño principal o caño madre; a su vez, puede estar abierto al mar por uno o varios puntos. Cuando un caño secundario es estrecho, de corto recorrido y tiene difícil comunicación con canales mayores, se le denomina **zumajo** [267].

5) Las **vetas** y **vetones** son terrenos que se elevan por encima del nivel medio, formando pequeñas islas que raramente se inundan. Son lugares de descanso y refugio para la fauna durante las grandes inundaciones, y también área de nidificación [267].

6) Los **ojos de la marisma** son pequeñas depresiones circulares que nunca se secan; fuentes naturales por las que aflora agua dulce. Aunque la procedencia de esta agua no está suficientemente estudiada, parece evidente que se corresponde con el drenaje de paleocauces localizados en la zona más superficial de las marismas, estos ojos conectan con el sector del acuífero libre. Aparecen frecuentemente en zonas no muy interiores de la marisma y muchas veces en puntos cercanos a su borde [267, 268].

Todas estas áreas juntas son el lugar de descanso e invernada de aproximadamente 150 especies de aves entre las que se encuentran la Espátula (*Platalea leucorodia*), Garza Imperial (*Ardea purpurea*), Avetorillo (*Ixobrychus minutus*), Martinete (*Nycticorax nycticorax*), Cigüeña Blanca (*Ciconia ciconia*) y Ánsar Común (*Anser anser*). Otras especies, aproximadamente 125, eligen esta área para criar, por ejemplo las fochas (*Fulica cristata* y *F. atra*), Ánade Azulón (*Anas platyrhynchos*), Malvasía Cabeciblanca (*Oxyura leucocephala*) y Cerceta Pardilla (*Marmaronetta angustirostris*) [262]. La figura 17 muestra la fotografía que corresponde a la marisma del Parque Nacional de Doñana.



**Figura 17.** Marisma del Parque Nacional de Doñana.

Tradicionalmente, los aportes de agua de la marisma procedían de la lluvia, los arroyos del noroeste (NO) (Rocina y Partido) o del noreste (NE) (Guadamar) y el desbordamiento del Guadalquivir. Su sistema hidrológico más importante era la Rocina-Madre de la Marisma-Brazo de la Torre, que reunía aportes fluviales del NO y NE [266]. La construcción de varios muros eliminó los aportes tóxicos del Guadamar en 1998, sobre todo el caño Travieso, y aisló la marisma por el sur (S) de los aportes del Guadalquivir, restringiendo la entrada de agua a los aportes de La Rocina y El Partido, y las lluvias. Tras el vertido de Aznalcóllar se activaron planes que se venían elaborando para la regeneración hídrica de Doñana, que se plasmaron en el Plan Doñana 2005. Cuyo objetivo era devolver a la marisma un funcionamiento hídrico más natural, al mejorar los aportes por la Rocina y el Partido y restaurar la marisma al norte (N) de los muros de la Confederación y la FAO (Food and Agriculture Organization), recuperar los caños Travieso y Guadamar, eliminar los diques de Entremuros, regenerar el funcionamiento del Brazo de la Torre y recuperar los intercambios con el Guadalquivir [269]. Todas estas actuaciones pretenden una marisma con menos intervención, menos aislada, que osmóticamente intercambie aguas con las áreas colindantes, penetrando por los caños naturales para desbordarse lentamente, donde el régimen de aguas corrientes vuelva a tener protagonismo, y las aguas estabilizadas sean la excepción. Una marisma en que el agua fluya desde el inicio del invierno al fin de la primavera de forma lenta y suave, tras inundar otros terrenos de marisma. Al mismo tiempo se intenta restaurar los aportes de agua superficial y eliminar las barreras que aislaban la marisma de los contaminantes procedentes de zonas agrícolas cercanas y los ríos Guadamar y Guadalquivir. Pero también deja Doñana más vulnerable a la contaminación derivada de las actividades humanas de sus alrededores. De hecho, tras la amenaza que supuso el

accidente de las minas de pirita en Aznalcóllar, en abril de 1998, se ha monitorizado la posible contaminación por metales del PND. Estas evaluaciones pusieron de manifiesto la amenaza que supone la práctica agrícola (arroz, cítricos y fresas) en el entorno de Doñana y el uso de plaguicidas ligado a ésta [75, 270].

## 5.2. Contaminación 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 realizan varios cultivos, al NE 35.000 ha de marisma se dedican al cultivo de arroz y en las arenas estabilizadas del NO 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 valores altos de nutrientes ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ ) y metales (Al y Cr) en niveles que pueden deberse al uso de fertilizantes [271], y niveles de plaguicidas en Doñana y alrededores [270]. Además, las prácticas agropecuarias muy extendidas en la zona, dado el gran número de cabezas de ganado y hectáreas de regadío, probablemente sean el origen de la gran cantidad de compuestos nitrogenados presentes en las aguas subterráneas [261].

También destacan las numerosas almazaras, industrias de procesado de uva y vegetales e industrias cárnicas y lácteas. Los efluentes de estas industrias amenazan al Partido [25], y el curso bajo del Guadiamar [266, 272]. Además, las aguas residuales de muchos municipios se vertían sobre el acuífero sin depurar, afectando al Guadiamar y al Partido [25, 273] aunque ya se han construido varias estaciones depuradoras de aguas residuales. Otra fuente potencial de contaminación está a 45 Km al NO 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 llevados por vía eólica [24, 266].

Al N de Doñana, se explotaban desde 1979 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 aguas abajo [25]. En Abril de



1998 se produjo la rotura del muro de cierre de la balsa de residuos mineros de Aznalcóllar. La brecha abierta alcanzó más de 50 m y un desplazamiento del muro próximo a los 60 m (figura 18).



**Figura 18.** 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  $2 \text{ Hm}^3$  de lodos tóxicos y  $4 \text{ Hm}^3$  de aguas ácidas al cauce del río Guadiamar [75, 262]. 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,  $\text{FeS}_2$ , Pb, Au, Zn, Cu y As [262].

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 [274].

En un primer momento se retiraron 37 toneladas de peces muertos, 40 toneladas de anfibios, 20 de aves y 8 de mamíferos [274]. Obviamente, tanto la flora como la fauna fue completamente arrasada debido, por un lado, a la elevada contaminación química del agua, ya mencionada, a los que había que añadir valores de oxígeno disuelto mayores a 1 g/l y de  $\text{pH} \approx 3$ , y por otro a la acción mecánica de la riada [262].

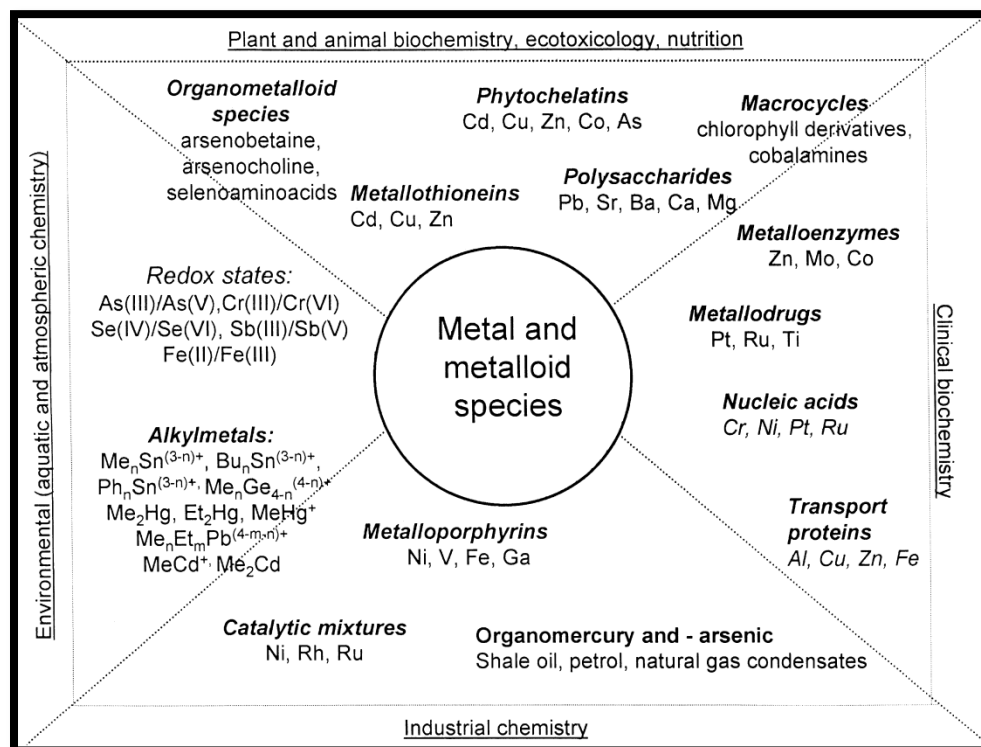
Las labores de extracción de lodo del canal principal y de la cuenca de inundación afectaron también a las características geomorfológicas, hidrológicas y geoquímicas del sistema fluvial [275-278]. De este modo, la fauna y flora colonizadora del río se encontró con un hábitat profundamente alterado y 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 [274].

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 [279]. 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.

## **6. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL ESTUDIO DE RESPUESTAS BIOLÓGICAS**

El estudio de los mecanismos moleculares que se producen como respuesta de los organismos vivos a la exposición a ciertos contaminantes como son los metales pesados, así como los efectos biológicos y tóxicos de estos, depende críticamente de las técnicas analíticas capaces de proporcionar información sobre las formas químicas en las que los elementos están presentes en dichos organismos. Los estudios de especiación han sido una de las áreas de mayor desarrollo de la química analítica hacia finales del siglo 20 [280- 282]. Las áreas objeto de estudio y las especies químicas de interés se resumen en la figura 19.



**Figura 19.** Áreas de estudio y especies de interés en especiación química [283].

El análisis de especies de metales endógenos en los sistemas biológicos posee una gran importancia ya que estas sustancias están involucradas en los procesos celulares que determinan el correcto funcionamiento de los organismos. Existe una gran variedad de ligandos en coordinación con metales traza, entre ellos pueden citarse los ligandos orgánicos pequeños (por ejemplo, citrato, tartrato, oxalato, o fitato, aminoácidos, oligopéptidos), las moléculas quelantes macrocíclicas (por ejemplo, porfirinas), o las macromoléculas (por ejemplo, polipéptidos, proteínas, fragmento de restricción de ADN, polisacáridos). Algunos metaloides (As, Se) son conocidos por ser metabolizados por los organismos vivos incorporándose covalentemente a estructuras moleculares (por ejemplo, arsenoazúcares y selenoproteínas). En este contexto, el análisis de una determinada especie y la seguridad de que ésta llegue al detector bien separada de otras especies del elemento de interés es de vital importancia. De hecho, dos metaloproteínas que difieren por un sólo aminoácido pueden tener diferentes propiedades para unirse a los metales y por lo tanto, pueden desempeñar diferentes funciones bioquímicas.

Las concentraciones de muchos elementos traza endógenos en sistemas biológicos están a unos niveles de concentración muy bajos (del orden de ng/g), y por lo general se distribuyen entre varias especies, en la que la contribución del metal (metaloides) a la estructura total es muy pequeña en términos de masa. Este hecho, sumado a la

complejidad de la matriz, constituye un gran problema para el análisis de especies de elementos traza. El problema más importante, sin embargo, es la identificación de las especies, ya que la mayoría de los analitos especialmente aquellos a niveles traza y ultratrazo, no han sido todavía descubiertos, y además no se poseen, generalmente, los patrones necesarios para su análisis.

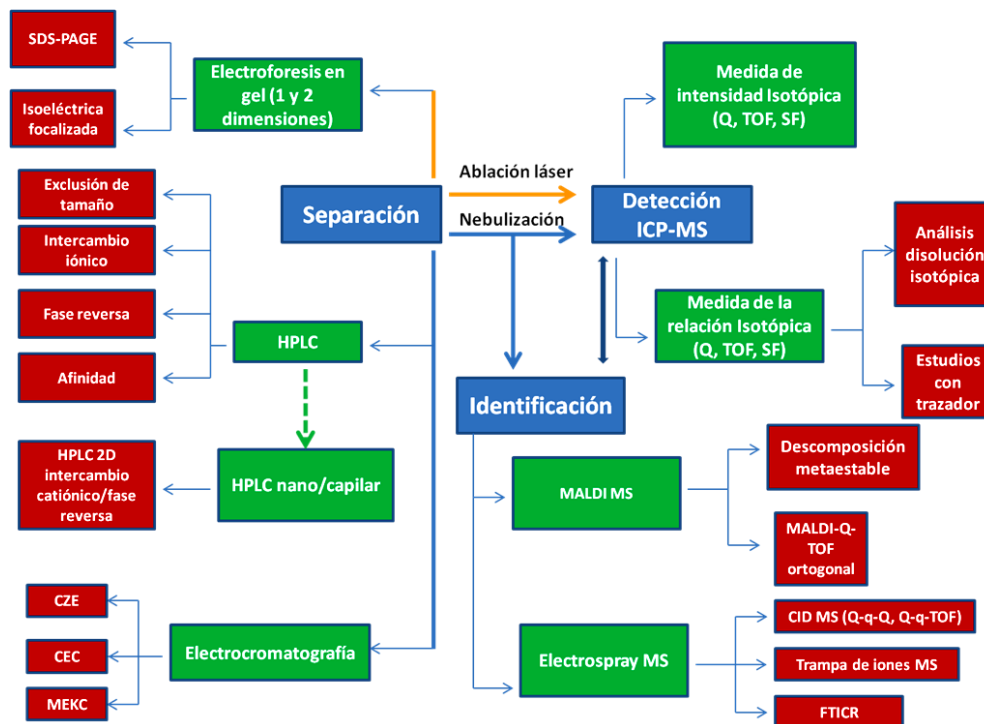
El objetivo principal de la especiación química en muestras biológicas se centra en conocer la presencia de las diversas formas químicas de un elemento dado, definidas por su composición isotópica, estado de oxidación, complejo y/o estructura molecular en un organismo vivo [53]. Desde un punto de vista científico, el análisis de biomoléculas en especiación química implica la detección de especies elementales desconocidas en tejidos de organismos vivos, su identificación y/o caracterización estructural y además el uso de la información adquirida para entender los mecanismos que rigen las transformaciones de elementos traza en los sistemas biológicos. La combinación de técnicas analíticas constituye una herramienta eficaz para analizar cualitativa y cuantitativamente las especies formadas por elementos traza en los sistemas biológicos.

### **6.1. Acoplamiento multidimensional de técnicas analíticas para el análisis de biomoléculas en especiación bioquímica**

La baja sensibilidad de los métodos instrumentales clásicos utilizados en bioinorgánica para el estudio de las especies de elementos traza, tales como resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopia electrónica, vibración o espectroscopia de dicroísmo circular y los recientes avances en las técnicas de aislamiento y purificación, tales como HPLC, CZE y electrocromatografía capilar, unido a las numerosas ventajas que ofrece el ICP-MS, ha sido el origen de una nueva generación de metodologías analíticas basadas en el acoplamiento de técnicas de separación de alto rendimiento con detectores atómicos y moleculares [280, 284- 286]. Las técnicas acopladas, usadas por primera vez en la década de 1970 por Van Loon [287] y Suzuki [288], constaban en su diseño más simple, del acoplamiento de una técnica de separación (cromatografía, electroforesis capilar de zona, electrocromatografía o electroforesis en gel) con un detector elemental específico y sensible, desde la AAS al ICP MS. Los acoplamientos instrumentales se consiguen mediante un nebulizador (para las técnicas de columna) o la ablación con láser (o desorción por láser) para las técnicas de separación planares.



El papel de estas técnicas acopladas para el análisis de especies químicas en medicina y biología ha sido ampliamente descrito durante la última década [63, 284, 289- 294]. Sin embargo, una sola técnica de separación rara vez ofrece una separación eficiente para resolver todas las especies del analito de interés, especialmente en presencia de una matriz compleja. Además la identificación de la mayoría de especies de interés biológico es un proceso complicado debido a la falta de patrones comerciales. Este inconveniente fue el origen de protocolos de separación / aislamiento basados en el uso consecutivo de dos o más técnicas, con mecanismos de separación ortogonales (complementarios) 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 HPLC-ICP-MS. Esta técnica se ha convertido en una herramienta indispensable para la caracterización funcional y estructural de los complejos formados entre elementos traza y macromoléculas en sistemas biológicos. Uno de los inconvenientes a tener en cuenta al usar estas técnicas es el control de la estabilidad de las especies de interés a lo largo de la etapa de separación, fundamentalmente al adaptar procedimientos clásicos de proteómica, donde el metal no se utiliza de “guía” en el análisis, a procedimientos de metalómica. Ello ha sido objeto de numerosas investigaciones [138]. La figura 20 representa de manera esquemática la combinación de técnicas frecuentemente usadas en especiación química.



**Figura 20.** Acoplamiento de técnicas analíticas para el estudio de biomoléculas [112].

El desarrollo de procedimientos analíticos de especiación adecuados para una determinada finalidad depende de tres factores [283]:

- 1) La sensibilidad del detector cromatográfico. Los elementos traza presentes en una muestra se fraccionan en diferentes especies por lo que en un momento dado, sólo una fracción pequeña de su concentración total llega al detector. Por consiguiente, en la mayoría de los casos se requieren límites de detección en torno a los femtogramos para asegurar un análisis preciso de las especies de elementos traza en los fluidos corporales o tejidos homogenizados. Esto se resuelve gracias al uso del ICP-MS e ICP-MS de alta resolución.
- 2) La adecuada separación entre diferentes especies del elemento. Las técnicas cromatográficas utilizadas deben garantizar que la señal corresponda a una especie en particular. Dado que los tejidos biológicos son mezclas muy complejas que contienen numerosos compuestos diferentes, es necesario el uso complementario de técnicas de separación sucesivas con diferentes mecanismos de separación y elevado poder de resolución.
- 3) La identificación estructural de las especies metálicas aisladas requiere el uso de técnicas espectroscópicas moleculares como ESI-MS o MALDI-MS.

El acoplamiento de técnicas de separación con ICP-MS como detector elemental puede realizarse en línea, como es el caso de la cromatografía en columna o electroforesis capilar (CE) o en modo discontinuo mediante ablación láser (LA) cuando la separación de las especies se realiza mediante isoelectroenfoque (IEF), electroforesis en gel 1D con dodecilsulfato sódico (SDS) o 2D [68].

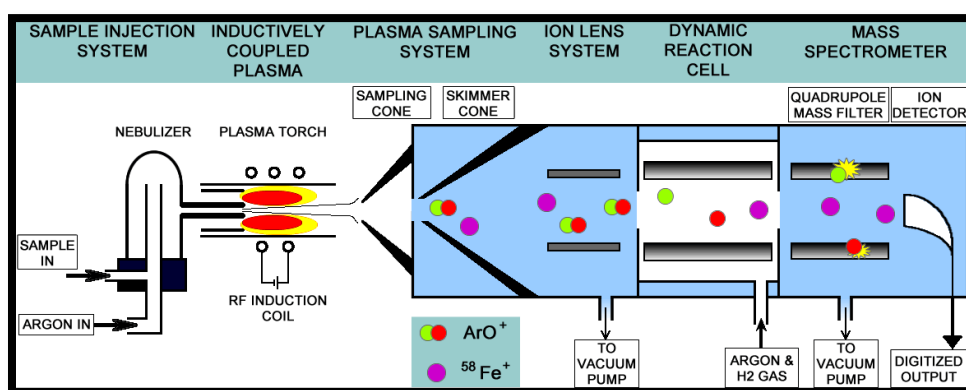
#### **6.1.1. Detección específica elemental de metalobiomoléculas mediante ICP-MS**

La detección mediante ICP-MS se basa en la conversión de todas las formas de un elemento presente en una muestra, en iones que son separados en un analizador de masas y posteriormente detectados (figura 21). Entre los analizadores de masas más utilizados cabe citar el de cuadrupolo (Q), tiempo de vuelo (TOF), sector magnético (SF) o multicolector (MC). La técnica ofrece muchas ventajas, como límites de detección a nivel de femtogramos que son prácticamente independiente de la forma química y de la presencia de componentes de la matriz, permitiendo llevar a cabo un análisis multiisotópico (incluyendo no metales como S, Se y P) en un amplio rango



lineal. Estos límites de detección del orden de femtogramos que ofrece ICP-MS pueden parecer innecesariamente bajos. Sin embargo, pueden llegar a ser insuficientes cuando el elemento presente a niveles de ng/mL se reparte en una serie de especies, o cuando la cantidad real de muestra a analizar es del orden de varios nanolitros, como es el caso de la CZE. Hay que tener en cuenta que la sensibilidad del ICP-MS es proporcional al número de átomos en la biomolécula.

La ventaja indiscutible del ICP-MS es su capacidad para discriminar (con resolución isotópica) entre especies que contienen metales y especies sin metal en los extractos que han sido previamente separados por HPLC, electroforesis capilar o mediante ablación láser de los spots del gel 2-D. El ICP-MS es prácticamente la única técnica capaz de hacer frente a las bajas concentraciones de elementos traza en materiales biológicos.



**Figura 21.** Diagrama esquemático del ICP-MS.

Entre las ventajas principales que presenta el ICP-MS en relación a su uso en metalómica podemos destacar [295]:

- 1) La presencia de una celda de colisión / reacción y el dispositivo de sector magnético, que permite eliminar gran parte de las interferencias espectrales, posibilitando la medida de elementos como fósforo y azufre y mejorando las medidas de las relaciones isotópicas de elementos esenciales tales como selenio, cromo, vanadio y hierro.
- 2) El desarrollo de interfases que permiten la introducción de los efluentes de columnas capilares (di 300  $\mu\text{m}$ ) y nanocapilares (di <150  $\mu\text{m}$ ) a través de inyección directa o mediante un nebulizador, llegándose a unos límites de detección del orden de los femtogramos en condiciones de plasma seco.

- 3) Escaneo de geles 2-D para el análisis de spots que contienen metales mediante ablación láser ICP-MS, ofreciendo una alternativa más barata a otras técnicas utilizadas para el mismo propósito, como la radiación sincrotrón XRF.

En los procedimientos estándar de ICP-MS se requiere un consumo considerable de la muestra después de la digestión de la misma (aproximadamente 2 ml de solución para un análisis multielemental), lo que implica la necesidad de al menos 50-100 mg de material. Esto puede ser un problema para la detección de metales unidos a proteínas en genómica estructural. Por lo tanto, es necesario el uso de nebulizadores con micro y nanoflujos, lo que permite analizar metales en la muestra consumiendo entre 1 y 5 muestra  $\mu$ l.

La alta sensibilidad de la ICP-MS hace posible la adquisición de datos de concentración multielemental en muy poca cantidad de muestra, como es el caso de la ablación láser (LA) donde se puede realizar análisis multielemental con resolución micrométrica, como se ha demostrado recientemente en estudios de tejidos del cerebro [296, 297]. Además, esta capacidad que tiene el ICP-MS de medir simultáneamente múltiples elementos, posibilita la medida de las interacciones entre estos en los sistemas biológicos [298, 299]. Por otra parte, el ICP-MS ofrece especificidad isotópica, lo que le confiere un gran potencial para los estudios de trazadores [300, 301] y para mejorar la precisión de los análisis de cuantificación de metalomoléculas mediante el uso de técnicas de dilución isotópica [302].

Teniendo en cuenta todas estas características, la espectroscopia atómica no sólo es capaz de medir la concentración total de los elementos en una muestra biológica sino también la estequiometría de los heteroelementos en una biomolécula aislada mediante cromatografía de alta resolución, electroforesis capilar o electroforesis en gel 2-D [303].

El inconveniente que presenta el ICP-MS está en su incapacidad para caracterizar las estructuras de las metalobiomoléculas. Por lo que es imprescindible el uso de la espectrometría de masas molecular, combinada con diferentes técnicas de ionización tales como ESI [304] o MALDI [305]. Un ejemplo de este acoplamiento se ha llevado a cabo mediante el uso de CE acoplada a ICP-MS y ESI-MS para identificar isoformas de metalotioneinas [306].

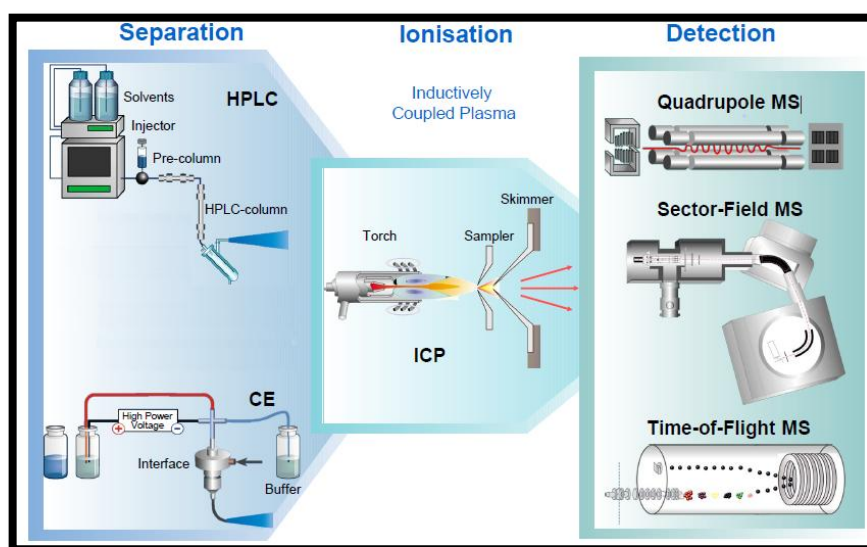
### **6.1.2. Análisis de especies de elementos traza en sistemas biológicos mediante acoplamiento de técnicas cromatográficas ortogonales de alta resolución, HPLC-ICP-MS.**

Por lo general, la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) se usa inicialmente para fraccionar los metalocompuestos de acuerdo a su masa molecular [307]. Con ello se consigue la eliminación de polímeros biológicos de masa molecular por encima de 100 kDa y la eliminación parcial de sales de los analitos. La SEC ofrece una alta resolución a la hora de separar compuestos metálicos en muestras complejas. El acoplamiento on-line SEC-ICP-MS es la técnica frecuentemente utilizada para el estudio preliminar de especies macromoleculares que contienen metales en muestras desconocidas [63, 64, 307]. Cabe señalar que el mecanismo de separación no se basa exclusivamente en el tamaño molecular ya que se ha conseguido separar pequeñas moléculas organometálicas, por ejemplo compuestos de selenio, que no difieren significativamente en su peso molecular [119]. El acoplamiento se lleva a cabo por medio de un nebulizador que funciona dentro de un rango de flujo donde la separación sea óptima. Los nebulizadores actualmente disponibles funcionan en un rango de flujo desde 0,1 a 1000  $\mu\text{l}/\text{min}$ . La presencia de sales de hasta 100 mM en el tampón de separación no supone ningún problema. Si el tampón de separación contiene disolventes orgánicos es necesario añadir oxígeno al plasma para facilitar la combustión.

A la hora de analizar moléculas que contienen metales en muestras biológicas, los elementos a niveles traza y ultratrazas son fácilmente detectados por ICP-MS pero no la parte orgánica de la molécula, que requiere el uso online de sistemas de detección basados en espectrometría ultravioleta visible (UV-VIS) para especies con grupos cromóforos (por ejemplo, proteínas) o refractometría para polisacáridos, a pesar de su limitada sensibilidad y selectividad. El interés por evitar la desnaturalización metal-ligando y lograr así una buena recuperación hace que la SEC sea una técnica de uso frecuente. Los polímeros de las fases estacionarias de las columnas de exclusión de tamaño aceptan muestras muy concentradas (por ejemplo, muestras citosólicas diluidas entre 3 y 5 veces) obteniéndose altas recuperaciones para un gran número de metaloespecies.

Uno de los inconvenientes que tiene el uso de la SEC es que la pureza de los picos 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, por ejemplo de hidrofobicidad o carga eléctrica, para poder llevar a cabo la purificación de las metalobiomoléculas, pudiéndose asociar de manera inequívoca un elemento traza en particular con una biomolécula en una fracción dada. Para ello se suele utilizar AEC o RPC acoplada a ICP-MS. La cromatografía de afinidad (AFC) se recomienda para la purificación de complejos metálicos con proteínas [308]. La figura 22 representa el típico acoplamiento de técnicas cromatográficas de alta de resolución (HPLC) con ICP-MS.



**Figura 22.** Acoplamiento entre técnicas cromatográficas de alta resolución (HPLC) o electroforesis capilar (CE) con ICP-MS provisto de tres tipos de analizadores de masas: cuadrupolo, sector magnético y tiempo de vuelo.

El acoplamiento de la SEC con la cromatografía de intercambio aniónico, intercambio catiónico, fase reversa, o electroforesis capilar de zona, se ha aplicado ampliamente para la especiación de metales unidos a metaloproteínas de cerebro humano [309] y tejidos de rata [310, 311], así como para la especiación de selenio en leche materna [312], ajo [313] y levadura [314] y especies de arsénico en algas [315, 316].



Para garantizar la pureza del analito antes de llegar al detector se han usado técnicas de separación en tres dimensiones, como ejemplo puede citarse el acoplamiento SEC-AEC-CEC para el aislamiento de especies de arsénico en algas [317] y ostras [314], así como especies de selenio en extractos acuosos de levadura selenizada [318].

### **6.1.3. Análisis de especies de elementos traza en sistemas biológicos mediante el acoplamiento CE-ICP-MS.**

La electroforesis capilar (CE) es hoy en día una poderosa herramienta de separación para el análisis de complejos en muestras biológicas. Esta técnica ofrece numerosas ventajas para el análisis de metaloespecies, como el uso de muestras de pequeño tamaño (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. Al utilizar columnas capilares de pequeño diámetro (entre 25 y 100 micras de diámetro interno) se elimina el gradiente de temperatura creado por la corriente de flujo formada dentro de la columna y, por lo tanto, elimina la difusión molecular y el ancho de banda [319]. Otro factor a tener en la 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 [320-322] o ICP-MS (figura 22) [323, 324]. La CE se utiliza principalmente para la separación de moléculas de bajo peso molecular como las metalotioneinas. La mayoría de las aplicaciones de CE-ICP-MS se centran en la caracterización de isoformas de MT [309, 325]. Las áreas de aplicación de CE-ICP-MS incluyen estudios de unión de metales con compuestos de origen biológico, por ejemplo, proteínas recombinantes [326, 327], la determinación de la estequiometría de complejos metal-proteína [303, 328, 329] y como técnica de separación de segunda o tercera dimensión de fracciones que contienen metales que han sido aisladas previamente por otras técnicas cromatográficas [330, 331].

### **6.1.4. Análisis de metalobiomoléculas mediante electroforesis en gel con detección LA-ICP-MS**

La electroforesis en gel (GE) de poliacrilamida (PAGE), monodimensional 1D (IEF, BN, o SDS) o bidimensional 2D (IEF + SDS) es la técnica más adecuada para la separación de proteínas. El inconveniente principal de esta técnica para el análisis

metalómico es la preservación de la unión metal-proteína. Muchos complejos de metales con proteínas son lábiles y pueden ser destruidos por intercambio con las impurezas metálicas del gel durante las etapas de separación y tinción. En general, el aislamiento de metaloproteínas con uniones a metales no covalentes requiere:

- 1) el uso de protocolos de separación no desnaturalizantes.
- 2) evitar la presencia de impurezas de metal en los geles.
- 3) evitar tinción o el uso de reactivos de tinción ultrapura (por ejemplo, en la electroforesis Blue Native) [332].

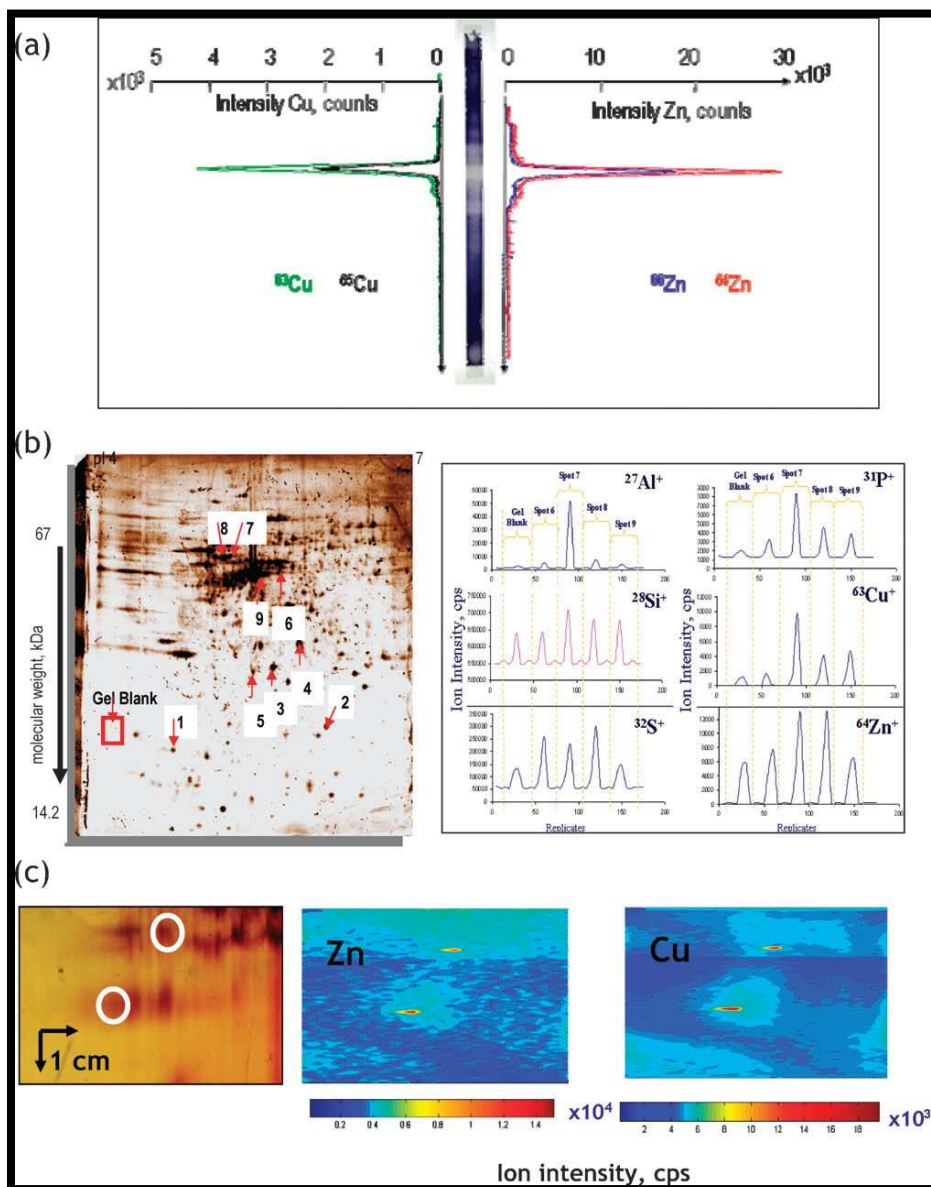
Las técnicas principales para la detección de geles son la autorradiografía con el uso de marcadores isotópicos radiactivos para la detección del heteroátomo en las estructuras proteica, la radiación sincrotrón XRF y la emisión de rayos-X inducida por protón (PIXE). No obstante, el acoplamiento LA-ICP-MS ofrece una alternativa muy interesante para el análisis de metales y metaloides en los spots de proteínas del gel. 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 se analizan 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 analito del gel [333, 334].

El acoplamiento LA-ICP-MS puede realizarse, principalmente, de tres modos diferentes que se presentan en la figura 23:

- 1) Barrido de toda la tira electroforética (en el caso de la electroforesis 1D) (figura 23 a). De esta forma, las metaloproteínas no necesitan ser visualizadas por tinción, por lo tanto se reduce al mínimo el riesgo de pérdida de metal [89].
- 2) Irradiación de cada spot con el láser (en el caso de la electroforesis 2D) (figura 23 b). Una desventaja de esta técnica es que los spots de proteínas deben ser visibles con el fin de ser irradiados [335].



3) Modo de imagen (figura 23 c). La alta estabilidad y precisión de LA-ICP-MS hacen posible escanear un gel para obtener un mapa de localización de los elementos. Los tiempos de análisis en este modo son muy largos. El escaneado de un gel de 5 cm<sup>2</sup> con 100 μm de resolución tarda alrededor de 15 horas, pero la técnica permite la identificación de áreas con aumento de las concentraciones de metales independientemente de la presencia de spots de proteínas más intensos. Puesto que de este modo es posible escanear las metaloproteínas, no necesitan ser visualizadas previamente por tinción [62].



**Figura 23.** Principales modos de adquisición de datos en electroforesis en gel mediante LA-ICP – MS para el análisis de metalomoléculas en muestras biológicas. a) Escaneo de cada tira, b) Irradiación de cada spot, c) Modo imagen [62].

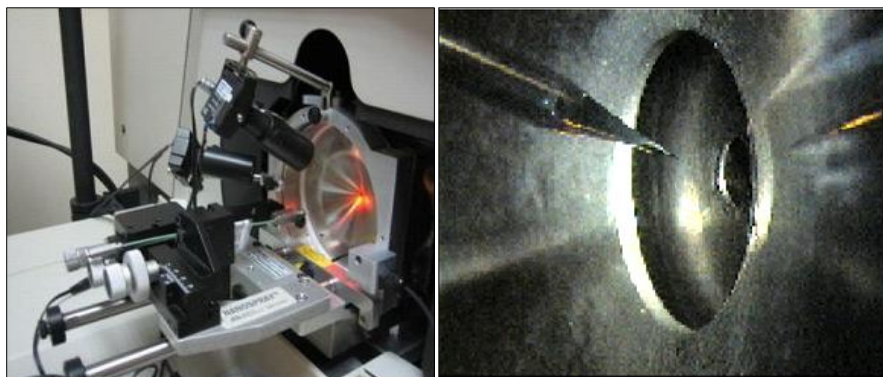
### 6.1.5. Identificación de metaloespecies por espectrometría de masas molecular

La espectrometría de masas proporciona medidas muy precisas de la masa molecular y carga de proteínas o péptidos en una muestra. Las medidas de masas de las proteínas intactas pueden proporcionar información rápida y valiosa sobre el perfil proteico de una muestra, aunque a la hora de identificar una proteína no es práctico basarse únicamente en su relación  $m/z$ , ya que existen múltiples factores (especialmente modificaciones cotransduccionales o postransduccionales) que pueden variar la masa molecular real de una proteína respecto a la masa teórica de la base de datos. Además, cuanto mayor es la masa de una proteína, menor es la exactitud de la medida para analizadores que trabajan a potencia de resolución constante. Por ello, se han desarrollado estrategias complementarias para la identificación de proteínas, como la “huella dactilar peptídica”.

Para el análisis de proteínas por espectrometría de masas, se utilizan dos técnicas principales de ionización suaves, ESI y MALDI, con las que la probabilidad de destrucción de las proteínas se reduce considerablemente y que además poseen una elevada sensibilidad, lo que permite el análisis de las biomoléculas a niveles de femtomol.

La ESI se utiliza en sistemas de detección para el análisis de proteínas on-line dentro de un rango de masas 500 - 3000  $m/z$ , las cuales han sido previamente separadas por CE o LC. La ESI puede ser utilizada para masas incluso superiores a 3.000 Da [336]. 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 estequiometría de complejos metálicos [337].

La fuente nano-electrospray (n-ESI), utilizada en el trabajo experimental de esta Tesis, es una variante de la fuente ESI que trabaja a un flujo más pequeño. Esta variante desarrollada por Wilm y Mann en 1995 [338] es el sistema más sensible para este tipo de moléculas y 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 24).



**Figura 24.** Fotografía de la fuente nano-electrospray (izquierda); Imagen del capilar próximo al orificio de entrada al espectrómetro de masas (derecha)

La diferencia de diseño más importante entre las fuentes ESI y n-ESI reside en el diámetro interno del capilar que contiene la muestra: en ESI el capilar tiene un diámetro interno de 500  $\mu\text{m}$ , mientras que en n-ESI se utilizan capilares con un diámetro interno de salida de 1 o 2  $\mu\text{m}$ . Por otro lado, en n-ESI la carga de muestra se lleva a cabo con un volumen de inyección de 0,2-2  $\mu\text{L}$ , introducida directamente en la aguja donde se produce el aerosol. Los flujos que se utilizan se encuentran entre 20-40  $\text{nl}/\text{min}$  lo que implica un consumo mínimo de muestra y una mayor eficiencia en la ionización en el número de iones sometidos al análisis de masas (los iones se producen con más eficiencia a medida que el tamaño medio de las microgotas del spray disminuye). En n-ESI 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 formados en n-ESI permite la introducción de una fracción mayor de los iones hacia el interior del espectrómetro de masas.

En relación a una fuente ESI, la n-ESI presenta mayor tolerancia a la composición y el pH de las matrices analizadas y permite 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 completa de cualquier contaminación cruzada, escasas posibilidades de pérdida de muestra, y la capacidad de escoger y cambiar el disolvente a voluntad, aún durante el análisis [339].

Como analizador de masas se recomienda el uso de TOF-MS ya que se consigue una exactitud 5-10  $\text{mg}/\text{g}$  en la medida de la masa molecular ( $M_r$ ) lo que permite la determinación de la fórmula empírica de metaloespecies con el  $M_r < 500$ . La información estructural puede ser adquirida por la disociación inducida por colisión

(CID) de un ion seleccionado por un filtro de masa cuadrupolar seguido de la medida del ion producto mediante un analizador de masas cuadrupolar o un TOF. Para completar la caracterización de las metalomoléculas suele ser necesario el uso de otros procedimientos analíticos, como la acidificación post-columna para disociar los complejos formados por los bioligandos, o la digestión enzimática antes de la secuenciación de aminoácidos mediante espectrometría de masas en tándem como ESI- MS / MS [340, 341]. Tras la adquisición de los datos, éstos son comparados con las bases de datos de secuenciación de modo automático [342] o interpretados manualmente [343, 344].

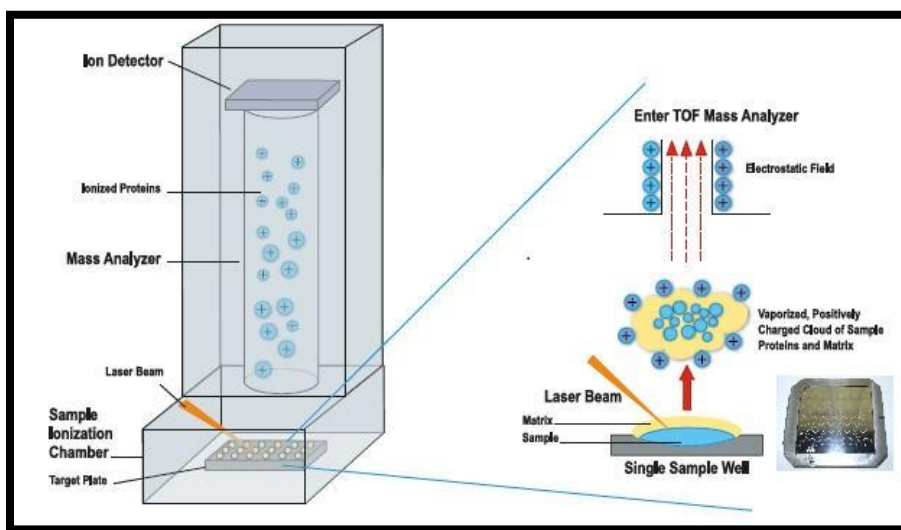
El inconveniente del uso de ESI-MS es la influencia en la señal de los iones concomitantes generados por los componentes de la matriz, los cuales suprimen la ionización de las especies de interés. Por lo tanto, es necesaria la purificación previa de las especies por cromatografía líquida multidimensional antes de ser introducidas en la fuente de iones con el fin de evitar la llegada simultánea del ion del analito y los iones más abundantes de otras especies [345, 346].

La fuente MALDI es otra de las técnicas de ionización suave más utilizadas para análisis de proteínas. Esta fuente de ionización suele asociarse a un analizador de tiempo de vuelo (TOF) en el que los iones se separan en función de su relación masa-carga tras ser acelerados en un campo eléctrico, o a un analizador TOF/TOF que 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 ión y sus iones fragmento, que son acelerados a un potencial mayor y separados en el segundo TOF.

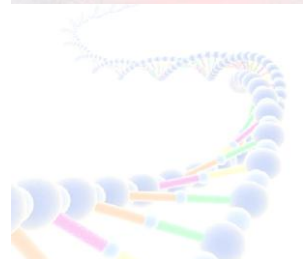
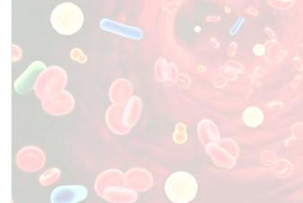
En MALDI, la muestra se mezcla con un exceso de la matriz inductora de la ionización sobre una superficie de metal de tal forma que ambas co-cristalizan cuando se evapora el solvente (figura 25). Esta preparación es sometida a pulsos cortos de radiación láser en una celda de vacío lo que provoca que 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 25).



La fuente MALDI es más tolerante que la fuente ESI para una mayor masa de muestra y frente a contenidos mayores de sales, tampones y otras sustancias. La fuente MALDI acoplada con un analizador TOF / TOF se ha utilizado para la identificación y caracterización de isoformas de MTs en líneas celulares de próstata [347]. El sistema MALDI-MS también se ha utilizado para el estudio de complejos de cadmio con metalotioneinas en hongos después de la exposición a cadmio [348]. Se ha comprobado que el dispositivo MALDI-TOF constituye una técnica adecuada para los estudios de interacción de metalotioneinas con otras moléculas, principalmente metales y medicamentos [349].



**Figura 25.** Esquema del funcionamiento del dispositivo de análisis de masas MALDI-TOF-MS.



# PARTE EXPERIMENTAL





## 1. INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA

### 1.1. Instrumentación empleada para la preparación de muestra

La preparación de extractos citosólicos a partir de los diferentes órganos de ratón se lleva a cabo mediante homogenización criogénica con un criohomogeneizador modelo SPEX SamplePrep Freezer/ Mill 6770 (Metuchen, Nueva Jersey, EE.UU.). Estos órganos criohomogenizados se extraen con un homogenizador teflón-vidrio. Los extractos citosólicos se someten a ultracentrifugación 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).

La preparación de suelos y sedimentos se ha llevado a cabo mediante trituración de los mismo en mortero de ágata seguido por tamizado con malla de 2 mm y 0.63  $\mu\text{m}$ .

La determinación de metales totales en extractos citosólicos, suelos y sedimentos se lleva a cabo mediante mineralización de las muestras en reactor cerrado de teflón modelo MARSXpress utilizando un horno de microondas modelo MARS (CEM corporation, Matthews, Carolina del Norte, Estados Unidos). El extracto resultante de las muestras de suelos y sedimentos se filtra a través de filtros Iso-Disc poly-(vinylidene difluoride) (PVDF) de 25 mm de diámetro y 0,45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro (Sigma Aldrich), antes de su análisis mediante ICP-MS. Para filtrar los extractos citosólicos antes de su análisis mediante SEC-ICP-MS se emplean filtros análogos pero de 0,2  $\mu\text{m}$ .

Las fracciones de extractos citosólicos aisladas mediante SEC se liofilizan con un equipo VirTis Bechtol (SP Scientific, Gardiner, Nueva York, Estados Unidos) a -50 °C 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).

La determinación del contenido de proteínas en las fracciones citosólicas de los ratones *Mus spretus* se ha llevado a cabo mediante el método de Bradford usando un espectrómetro UV/Vis modelo Thermo Spectronic Helios  $\gamma$  (Thermo Scientific, Barcelona).



### 1.2 Instrumentación empleada las separaciones cromatográficas

La separación cromatográfica por exclusión de tamaño se ha llevado a cabo con diferentes columnas en función del rango de fraccionamiento y sus dimensiones. El uso de columnas analíticas (debido a su menor tamaño) es adecuado para el estudio preliminar de los extractos citosólicos. Posteriormente para el fraccionamiento y aislamiento de las fracciones de interés se usan columnas preparativas de mayor tamaño.

Las columnas utilizadas son las siguientes:

#### 1) Rango efectivo de separación de 3-70 KDa

- Analítica → Superdex<sup>TM</sup> 75 10/300 GL (10 x 300 mm x 13  $\mu$ m)
- Preparativa → Hiload 26/60 Superdex 75 prep grade (26 x 600 mm x 34  $\mu$ m)

Estas columnas se han usado para separar moléculas de peso molecular intermedio unidas a diferentes metales como Cd, Hg, Zn o Cu.

#### 2) Rango efectivo de separación < 10 KDa

- Analítica → Superdex<sup>TM</sup> Peptide 10/300 GL (10 x 300 mm x 13  $\mu$ m)
- Preparativa → Hiload 26/60 Superdex 30 prep grade (26 x 600 mm x 34  $\mu$ m)

Estas columnas se han usado para separar moléculas de bajo peso molecular como son los arsenocompuestos.

Todas estas columnas fueron suministradas por GE Healthcare (Uppsala, Suecia). La fase estacionaria consta de moléculas de dextrano unidas covalentemente a agarosa fuertemente enlazada.

En las fracciones aisladas mediante SEC, se elimina la presencia de sales mediante columnas “Hitrap desalting” (1,6 x 2,5 cm) (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) con un rango de fraccionamiento de 1000-5000 Da y fase estacionaria Sephadex G25, formada por entrecruzamientos de dextrano.



En la segunda dimensión cromatográfica se han usado las siguientes columnas:

- Cromatografía en fase reversa → Spherisorb ODS 2 (25 cm x 4,6 mm x 5  $\mu$ m) (Waters, Milford, MA, USA). La fase estacionaria está formada por grupos octadecilsilano enlazados químicamente con micropartículas de gel de sílice.

Esta columna se ha usado en el presente estudio para la separación de isoformas de metalotioneína en extractos citosólicos de ratón expuesto a cadmio.

- Cromatografía de intercambio aniónico → Hamilton PRP X-100 (250 x 4,6 mm x 5  $\mu$ m) (Hamilton, Reno, NV, USA). La fase estacionaria utiliza un relleno de poliestireno-divinilbenceno que posee grupos de amonio cuaternario como intercambiador aniónico.

Para llevar a cabo la SEC a escala preparativa se ha utilizado un cromatógrafo líquido de baja presión (AKTA-Prime System, Amersham Biosciences). El sistema AKTA-Prime, está equipado con un colector de fracciones, válvula de inyección y doble sistema de detección, ultravioleta-visible y de conductividad. En este último caso también se ha usado con columnas de eliminación de contenido salino. La adquisición y tratamiento de datos se ha realizado con el programa del equipo (Primeview 5.0, Amersham Biosciences).

Para las separaciones cromatográficas a escala analítica se ha empleado un cromatógrafo líquido de alta presión HPLC 1100 Series de Agilent (Wilmington, DE, EE.UU.), equipado con un detector UV, válvula de inyección modelo 7725i Rheodyne (Supelco, Bellefonte, PA, EE.UU.) y bomba cuaternaria.

### **1.3. Espectrómetro de masas atómico**

La detección de metales totales y metales unidos a biomoléculas en los extractos citosólicos de tejidos de ratón se ha realizado con un espectrómetro de masas atómicas ICP-MS Agilent 7500ce (Agilent Technologies, Tokio, Japón), equipado con celda de colisión/reacción de tipo octapolo (ORC), lo permite reducir significativamente las interferencias poliatómicas formadas a partir de la matriz de la muestra, reactivos utilizados para la preparación de la muestra o gases del plasma. Las interferencias poliatómicas más comunes se resumen en la tabla 4.



Isótopo	Abundancia	Interferencia
<sup>75</sup> As	100	<sup>40</sup> Ar <sup>35</sup> Cl <sup>+</sup> , <sup>59</sup> Co <sup>16</sup> O <sup>+</sup> , <sup>36</sup> Ar <sup>38</sup> Ar <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>38</sup> Ar <sup>37</sup> Cl <sup>+</sup> , <sup>36</sup> Ar <sup>39</sup> K, <sup>43</sup> Ca <sup>16</sup> O <sub>2</sub> , <sup>23</sup> Na <sup>12</sup> C <sup>40</sup> Ar, <sup>12</sup> C <sup>31</sup> P <sup>16</sup> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>
<sup>114</sup> Cd	28.7	<sup>98</sup> Mo <sup>16</sup> O <sup>+</sup> , <sup>98</sup> Ru <sup>16</sup> O <sup>+</sup>
<sup>59</sup> Co	100	<sup>43</sup> Ca <sup>16</sup> O <sup>+</sup> , <sup>42</sup> Ca <sup>16</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>24</sup> Mg <sup>35</sup> Cl <sup>+</sup> , <sup>36</sup> Ar <sup>23</sup> Na <sup>+</sup> , <sup>40</sup> Ar <sup>18</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>40</sup> Ar <sup>19</sup> F <sup>+</sup>
<sup>53</sup> Cr	9.51	<sup>37</sup> Cl <sup>16</sup> O <sup>+</sup> , <sup>38</sup> Ar <sup>15</sup> N <sup>+</sup> , <sup>38</sup> Ar <sup>14</sup> N <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>36</sup> Ar <sup>17</sup> O <sup>+</sup> , <sup>36</sup> Ar <sup>16</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>35</sup> Cl <sup>17</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>35</sup> Cl <sup>18</sup> O <sup>+</sup> , <sup>36</sup> S <sup>17</sup> O <sup>+</sup> , <sup>40</sup> Ar <sup>13</sup> C <sup>+</sup>
<sup>63</sup> Cu	69.1	<sup>31</sup> P <sup>16</sup> O <sub>2</sub> <sup>+</sup> , <sup>40</sup> Ar <sup>23</sup> Na <sup>+</sup> , <sup>47</sup> Ti <sup>16</sup> O <sup>+</sup> , <sup>23</sup> Na <sup>40</sup> Ca <sup>+</sup> , <sup>46</sup> Ca <sup>16</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>36</sup> Ar <sup>12</sup> C <sup>14</sup> N <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>14</sup> N <sup>12</sup> C <sup>37</sup> Cl <sup>+</sup> , <sup>16</sup> O <sup>12</sup> C <sup>35</sup> Cl <sup>+</sup>
<sup>65</sup> Cu	30,9	<sup>49</sup> Ti <sup>16</sup> O <sup>+</sup> , <sup>32</sup> S <sup>16</sup> O <sub>2</sub> <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>40</sup> Ar <sup>25</sup> Mg <sup>+</sup> , <sup>40</sup> Ca <sup>16</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>36</sup> Ar <sup>14</sup> N <sub>2</sub> <sup>1</sup> H <sup>+</sup>
<sup>56</sup> Fe	91.66	<sup>40</sup> Ar <sup>16</sup> O <sup>+</sup> , <sup>40</sup> Ca <sup>16</sup> O <sup>+</sup> , <sup>40</sup> Ar <sup>15</sup> N <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>38</sup> Ar <sup>18</sup> O <sup>+</sup> , <sup>38</sup> Ar <sup>17</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>37</sup> Cl <sup>18</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup>
<sup>57</sup> Fe	2.19	<sup>40</sup> Ar <sup>16</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>40</sup> Ca <sup>16</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>40</sup> Ar <sup>17</sup> O <sup>+</sup> , <sup>38</sup> Ar <sup>18</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>38</sup> Ar <sup>19</sup> F <sup>+</sup>
<sup>200</sup> Hg	23.130	<sup>184</sup> W <sup>16</sup> O <sup>+</sup> , <sup>186</sup> W <sup>14</sup> N <sup>+</sup> , <sup>160</sup> Gd <sup>40</sup> Ar <sup>+</sup> , <sup>199</sup> Hg <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>183</sup> W <sup>17</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>188</sup> Os <sup>12</sup> C <sup>+</sup> , <sup>160</sup> Dy <sup>40</sup> Ar <sup>+</sup> , <sup>186</sup> Os <sup>14</sup> N <sup>+</sup> , <sup>187</sup> Re <sup>13</sup> C <sup>+</sup> , <sup>181</sup> Ta <sup>19</sup> OH <sup>+</sup> , <sup>185</sup> Re <sup>15</sup> N <sup>+</sup>
<sup>202</sup> Hg	29.800	<sup>185</sup> Re <sup>17</sup> OH <sup>+</sup> , <sup>186</sup> W <sup>16</sup> O <sup>+</sup> , <sup>190</sup> Os <sup>12</sup> C <sup>+</sup> , <sup>162</sup> Dy <sup>40</sup> Ar <sup>+</sup> , <sup>201</sup> Hg <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>188</sup> Os <sup>14</sup> N <sup>+</sup> , <sup>186</sup> Os <sup>16</sup> O <sup>+</sup> , <sup>187</sup> Re <sup>15</sup> N <sup>+</sup> , <sup>189</sup> Os <sup>13</sup> C <sup>+</sup> , <sup>162</sup> Er <sup>40</sup> Ar <sup>+</sup> , <sup>166</sup> Er <sup>36</sup> Ar <sup>+</sup>
<sup>55</sup> Mn	100	<sup>40</sup> Ar <sup>14</sup> N <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>39</sup> K <sup>16</sup> O <sup>+</sup> , <sup>37</sup> Cl <sup>18</sup> O <sup>+</sup> , <sup>40</sup> Ar <sup>15</sup> N <sup>+</sup> , <sup>38</sup> Ar <sup>17</sup> O <sup>+</sup> , <sup>36</sup> Ar <sup>18</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>38</sup> Ar <sup>16</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>37</sup> Cl <sup>17</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>23</sup> Na <sup>32</sup> S <sup>+</sup> , <sup>36</sup> Ar <sup>19</sup> F <sup>+</sup>
<sup>60</sup> Ni	26.16	<sup>44</sup> Ca <sup>16</sup> O <sup>+</sup> , <sup>23</sup> Na <sup>37</sup> Cl <sup>+</sup> , <sup>43</sup> Ca <sup>16</sup> O <sup>1</sup> H <sup>+</sup>
<sup>208</sup> Pb	52.4	<sup>192</sup> Pt <sup>16</sup> O <sup>+</sup>
<sup>80</sup> Se	49.960	<sup>40</sup> Ca <sub>2</sub> , <sup>32</sup> S <sup>16</sup> O <sub>3</sub> , <sup>80</sup> Kr, <sup>40</sup> Ar <sup>40</sup> Ar <sup>+</sup> , <sup>40</sup> Ca <sup>40</sup> Ar <sup>+</sup> , <sup>63</sup> Cu <sup>17</sup> OH <sup>+</sup> , <sup>79</sup> Br <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>64</sup> Zn <sup>16</sup> O <sup>+</sup> , <sup>66</sup> Zn <sup>14</sup> N <sup>+</sup> , <sup>68</sup> Zn <sup>12</sup> C <sup>+</sup> , <sup>64</sup> Ni <sup>16</sup> O <sup>+</sup> , <sup>65</sup> Cu <sup>15</sup> N <sup>+</sup> , <sup>159</sup> Tb <sup>2+</sup> , <sup>160</sup> Gd <sup>2+</sup> , <sup>160</sup> Dy <sup>2+</sup>
<sup>82</sup> Se	8.840	<sup>82</sup> Ar <sub>2</sub> H <sub>2</sub> , <sup>34</sup> S <sup>16</sup> O <sub>3</sub> , <sup>12</sup> C <sup>35</sup> Cl <sub>2</sub> , <sup>82</sup> Kr, <sup>81</sup> Br <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>65</sup> Cu <sup>17</sup> OH <sup>+</sup> , <sup>66</sup> Zn <sup>16</sup> O <sup>+</sup> , <sup>70</sup> Ge <sup>12</sup> C <sup>+</sup> , <sup>68</sup> Zn <sup>14</sup> N <sup>+</sup> , <sup>69</sup> Ga <sup>13</sup> C <sup>+</sup> , <sup>42</sup> Ca <sup>40</sup> Ar <sup>+</sup> , <sup>70</sup> Zn <sup>12</sup> C <sup>+</sup> , <sup>63</sup> Cu <sup>19</sup> OH <sup>+</sup> , <sup>164</sup> Dy <sup>2+</sup> , <sup>163</sup> Dy <sup>2+</sup> , <sup>164</sup> Er <sup>2+</sup>
<sup>64</sup> Zn	48.89	<sup>32</sup> S <sup>16</sup> O <sub>2</sub> <sup>+</sup> , <sup>48</sup> Ti <sup>16</sup> O <sup>+</sup> , <sup>31</sup> P <sup>16</sup> O <sub>2</sub> <sup>1</sup> H <sup>+</sup> , <sup>48</sup> Ca <sup>16</sup> O <sup>+</sup> , <sup>32</sup> S <sub>2</sub> <sup>+</sup> , <sup>31</sup> P <sup>16</sup> O <sup>17</sup> O <sup>+</sup> , <sup>34</sup> S <sup>16</sup> O <sub>2</sub> <sup>+</sup> , <sup>36</sup> Ar <sup>14</sup> N <sub>2</sub> <sup>+</sup>
<sup>66</sup> Zn	27.81	<sup>50</sup> Ti <sup>16</sup> O <sup>+</sup> , <sup>34</sup> S <sup>16</sup> O <sub>2</sub> <sup>+</sup> , <sup>33</sup> S <sup>16</sup> O <sup>21</sup> H <sup>+</sup> , <sup>32</sup> S <sup>16</sup> O <sup>18</sup> O <sup>+</sup> , <sup>32</sup> S <sup>17</sup> O <sub>2</sub> <sup>+</sup> , <sup>33</sup> S <sup>16</sup> O <sup>17</sup> O <sup>+</sup> , <sup>32</sup> S <sup>34</sup> S <sup>+</sup> , <sup>33</sup> S <sub>2</sub> <sup>+</sup>

**Tabla 4.** Diferentes isótopos de los elementos objeto de estudio, sus abundancias relativas y las principales interferencias que afectan a cada uno de ellos.

Como gas de reacción se ha usado hidrógeno, adecuado para eliminar las interferencias de Fe y Se.

Como gas de colisión se ha usado helio, que al ser un gas inerte no reacciona con la matriz de la muestra y no origina nuevas interferencias. Este gas elimina múltiples interferencias y puede ser aplicado a todas las matrices y a todas las muestras utilizando condiciones analíticas comunes.

La introducción de la muestra en la corriente de gas del plasma se ha llevado a cabo mediante el uso de un nebulizador MicroMist de Glass Expansion (Melbourne, Australia) que permite un caudal líquido de 0,05 a 0,8 ml/min y un caudal gaseoso entre 0,7 y 1 L/min. Este sistema mejora considerablemente la relación señal/ruido, minimiza el gasto de argón y tienen una elevada tolerancia a las sales disueltas. Otra ventaja de este nebulizador es su fácil acoplamiento con el sistema HPLC. Sin embargo, este nebulizador presenta algunas desventajas ligadas a su pobre resistencia al ácido fluorhídrico porque está fabricado con vidrio, se obtura fácilmente por acumulación de micropartículas o sólidos disueltos y su precio es elevado.

Antes de cada análisis el ICP-MS se calibraba en modo estándar con una disolución de calibración de 1 µg /L de Li, Y, Co, Ce y Tl en 2% HNO<sub>3</sub>, seguido de una optimización en modo He, y otra en modo H<sub>2</sub>, en función del gas usado para el estudio. De esta manera se ajustan los parámetros más importantes del equipo de los cuales depende la sensibilidad de éste como son la posición de la antorcha, flujo de gas y posición de las lentes extractoras.

La monitorización de la señal se lleva a cabo mediante los isótopos <sup>7</sup>Li, <sup>89</sup>Y y <sup>205</sup>Tl, que permite cubrir todo el rango de masas que mide el equipo.

Los valores típicos de sensibilidad obtenidos para una disolución de 1 µg /L de Li, Y, Tl y Ce, en modo estándar (sin celda colisión/reacción) son para <sup>7</sup>Li > 4000 cps (cuentas por segundo), <sup>89</sup>Y > 8000 cps y <sup>205</sup>Tl > 5000 cps, siendo la RSD menor del 10% en los tres casos. El nivel de óxidos (MO<sup>+</sup>) se mide a partir de la relación CeO/Ce, ya que el <sup>140</sup>Ce se une al oxígeno (O<sub>2</sub>) formando un enlace muy fuerte, siendo CeO muy estable en el plasma. Por tanto esta relación nos informa sobre la presencia de óxidos generados en el plasma, debiendo ser inferior al 2%. La reducción de dobles cargas M<sup>2+</sup> se optimiza a un porcentaje inferior al 2,5% teniendo en cuenta la relación Ce<sup>2+</sup> /Ce<sup>+</sup>.



Los valores de sensibilidad obtenidos para el modo He son superiores a 2000 cps para  $^{59}\text{Co}$ , siendo la RSD inferior al 10%. Los valores de sensibilidad obtenidos en modo  $\text{H}_2$  son para  $^{89}\text{Y}$  superiores a 2000 cps, con una RSD inferior al 10%.

La optimización del flujo del gas de reacción/colisión para la determinación de elementos totales, se llevó a cabo mediante la preparación de una muestra (extracto citosólico de tejido de ratón) dividida en dos alícuotas de 5 mL previamente mineralizadas. A una de las alícuotas se le añaden los elementos de interés a una concentración de 10  $\mu\text{g/L}$ , y a la otra se le añade un volumen igual de agua Milli-Q obteniendo así la misma dilución en ambas alícuotas, y por tanto la misma matriz. Utilizando estas disoluciones se realizan medidas con el ICP-MS aplicando de forma automática una rampa de flujo de gas de reacción/colisión. La gráfica de sensibilidad (cps) de los distintos isótopos de interés, utilizando una muestra fortificada con 10  $\mu\text{g/L}$  de dichos isótopos, se compara con las señales obtenidas de las muestras no fortificadas y la señal correspondiente a la concentración equivalente al ruido de fondo (BEC), frente al flujo de gas de colisión/reacción (mL /min). El flujo de gas óptimo se selecciona de manera que la sensibilidad de los isótopos, tanto en la disolución fortificada como no fortificada, sea máxima y al mismo tiempo que la BEC sea mínima.

### 1.4. Espectrómetro de masas molecular

La caracterización de los complejos de las isoformas de la metalotioneína con diferentes metales se ha llevado a cabo en un espectrómetro de masas con analizador de cuadrupolo - tiempo de vuelo modelo QSTAR XL Hybrid system (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA), equipado con fuente de ionización nanospray (nESI).

Las fracciones de proteínas purificadas mediante RPC se introdujeron en la fuente de ionización mediante capilares PROXEON (NanoES, Pronata, Dinamarca). Antes de cada análisis, el instrumento se calibraba diariamente con renina ( $M_w$  879.97 Da; Applied Biosystems/PE Sciex, Foster City, CA, USA). El tratamiento de datos se hizo mediante el software del equipo, Analyst QS software.

## 2. REACTIVOS Y DISOLUCIONES PATRÓN

Todas las disoluciones acuosas se preparan en agua ultrapura (18,2 MΩ) obtenida mediante un sistema Milli-Q Gradient de Millipore (Watford, Reino Unido) y todos los reactivos utilizados son de la mayor pureza disponible.

Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), L-Glutatión reducido (GSH), benzonasa (Ultrapure grade), hidrocloreto de tris-(2-carboxietil)fosfina (TCEP) (BioUltra grade, > 98%). Trizma base utilizado en la preparación de extractos citosólicos, así como el dihidrógeno fosfato sódico empleado en la preparación de la fase móvil utilizada en AEC para la separación de arsenocompuestos, fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).

Los experimentos de exposición se llevaron a cabo usando cloruro de cadmio, cloruro de mercurio y arsenato sódico, todos suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania),

El acetato amónico (Suprapure grade) para la preparación de la fase móvil en SEC y RPC, amoniaco (Suprapur grade) y ácido clorhídrico para ajustar el pH de las disoluciones, fueron suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania). El metanol usado en la preparación de la fase móvil de RPC fue suministrado por Tecknokroma (Sant Cugat del Vallés, Barcelona, España).

Las fases móviles para SEC, RPC 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:

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 B<sub>12</sub> (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) y la arsenobetaína que fue suministrada por Merck (Darmstadt, Alemania).



Tanto la metalotioneina I como la II (Enzo Life Sciences, Madrid), ambas aisladas de hígado de conejo, conteniendo un 9% de Cd y Zn, se usaron para calibrar la columna RPC y así poder identificar los tiempos de retención de cada una de ellas.

Los patrones de arsenito ( $\text{As}^{\text{III}}$ ) y arsenato ( $\text{As}^{\text{V}}$ ) sódico, ácido monometil (MMA), dimetil (DMA), trimetil arsénico (TMA), óxido trimetilarsina (TMAO) y arsenobetaina (AsB), que se usaron en la calibración de la columna de AEC para la determinación de arsenocompuestos, fueron suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania).

El ajuste del ICP-MS se realizó con una disolución de Li, Y, Tl y Ce al 2% en  $\text{HNO}_3$  suministrada por Agilent Technologies (California, Estados Unidos), empleando una concentración de  $1 \mu\text{g}/\text{L}$ .

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).

Para la determinación de metales totales en extractos citosólicos, suelos y sedimentos, se utilizó una disolución primaria multipatrón-2A que contenía todos los elementos de interés ( $10 \text{ mg/mL}$  en 2%  $\text{HNO}_3$ , Agilent Technologies, California, Estados Unidos), a partir de la cual se prepararon las disoluciones para las rectas de calibrado.

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).

### 3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

#### 3.1. Zonas de muestreo de ratones silvestres (*Mus spretus*), suelos y sedimentos

El muestreo de ratones de vida libre *Mus spretus* se realizó en dos periodos de tiempo distintos:

- a) El primer periodo se llevó a cabo entre noviembre y diciembre de 2009 en dos áreas del Parque Nacional de Doñana, al suroeste de España (trabajo desarrollado en el artículo *J. Anal. At. Spectrom.*, 26 (2011) 141-149 que integra esta Tesis) [157]. El Lucio del Palacio (LDP) (punto verde de la figura 26), se encuentra en el corazón de la Reserva Biológica de Doñana, y se



considera zona no contaminada de acuerdo con resultados anteriores [31]; (b) La Rocina (ROC) (punto amarillo de la figura 26), 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 Río Tinto, al noroeste de la provincia de Huelva.

- b) El segundo periodo de muestreo se sitúa entre noviembre y diciembre de 2010, considerando 5 áreas en el entorno del Parque Nacional de Doñana (estudio recogido en el artículo *Current Analytical Chemistry* 9 (2013) 229-243 que integra esta Tesis) [198]. Además de las dos áreas mencionadas anteriormente, LDP y ROC, se muestreó en El Partido (PAR) (punto lila de la figura 26) y El Ajolí (AJO) (punto naranja de la figura 26) 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 de la figura 26), situado próximo al Río Guadiamar, que 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 [262]. La figura 26 muestra el mapa de la Reserva biológica de Doñana con las zonas donde se realizó el muestreo. De manera más específica, la tabla 5 muestra las coordenadas UTM de cada zona de muestreo y el número de ratones machos y hembras capturados.

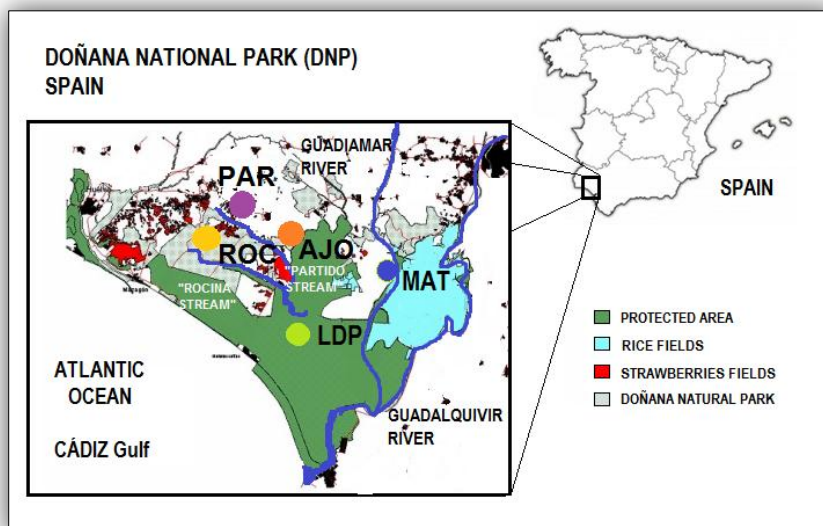


Figura 26. Zonas de muestreo en el Parque Nacional de Doñana y alrededores.

Area (códigos)	Coordenadas UTM		Ratones (muestreo 2010)		Ratones (muestreo 2009)	
	X	Y	Macho	Hembra	Macho	Hembra
Lucio del Palacio (LDP)	193800	4099515	8	4	18	15
La Rocina (ROC)	178653	4119937	7	5	7	4
El Ajolí (AJO)	192352	4124977	9	8		
El Matochal (MAT)	208681	4102207	7	6		
El Partido (PAR)	191173	4124977	8	9		

Tabla 5. Coordenadas UTM de las zonas de muestreo estudiadas y número y sexo de los ratones *Mus spretus* capturados en estas.

La captura de los ratones se llevó a cabo con trampas de animal vivo Sherman (figura 27), 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 o ratas. 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 el tratamiento de muestra.



**Figura 27.** Trampa Sherman y ratón capturado en su interior.

Por otra parte, se muestreó 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 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.

### **3.2. Experimentos de exposición con ratones de laboratorio *Mus musculus***

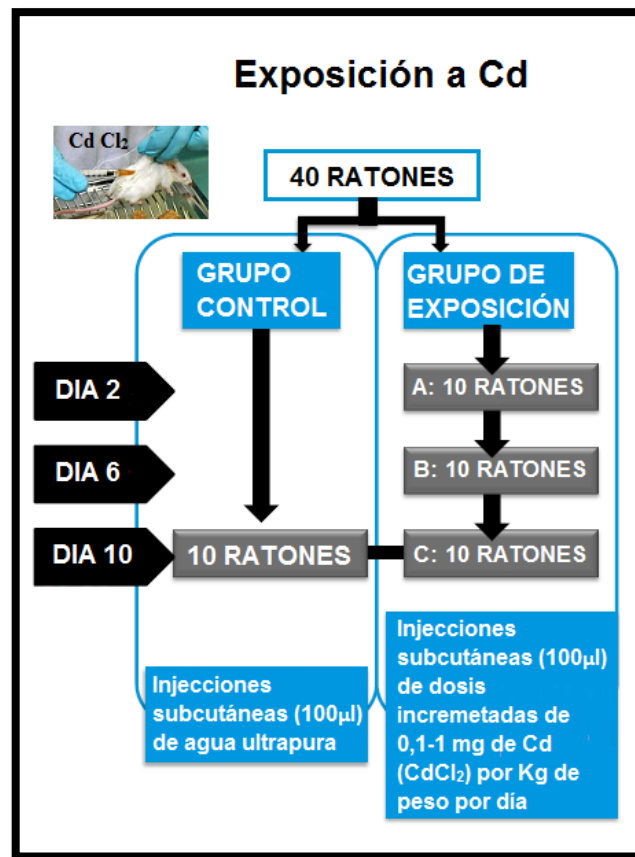
Para los experimentos de exposición a diferentes metales se utilizaron ratones machos de 7 semanas y de 20 a 28 gramos de peso de la especie modelo *M. musculus*, variedad BALB/cByJ, suministrados por Charles River (Barcelona, España). Estos ratones se mantuvieron en jaulas metabólicas acondicionadas durante todo el experimento (figura 28) sometiéndolos a ciclos de luz/oscuridad cada 12/ 24 horas. Se les administró una dieta estándar y agua “*ad libitum*” a lo largo de todo el experimento y durante una semana antes, para lograr su aclimatación antes de la experiencia. Se utilizó pienso con la siguiente composición: 11,9% agua, 16,1% proteínas, 3,1% aceites, 60% de extracto libre de nitrógeno (incluyendo almidón, azúcares, fibras, etc) y 5,1% minerales. La concentración de cada elemento en el pienso fue la siguiente (los límites recomendados para cada uno de estos elementos se indican en paréntesis): 70 mg/ kg Mn (40–100 mg kg<sup>-1</sup>), 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 (<1,000 µg /kg), 51 µg/ kg Cd (< 250 µg /kg), 160 µg /kg Se (< 600 µg /kg).



**Figura 28.** Ratones *Mus musculus* en jaulas metabólicas durante los experimentos de exposición.

### 3.2.1. Experimento de exposición a cadmio

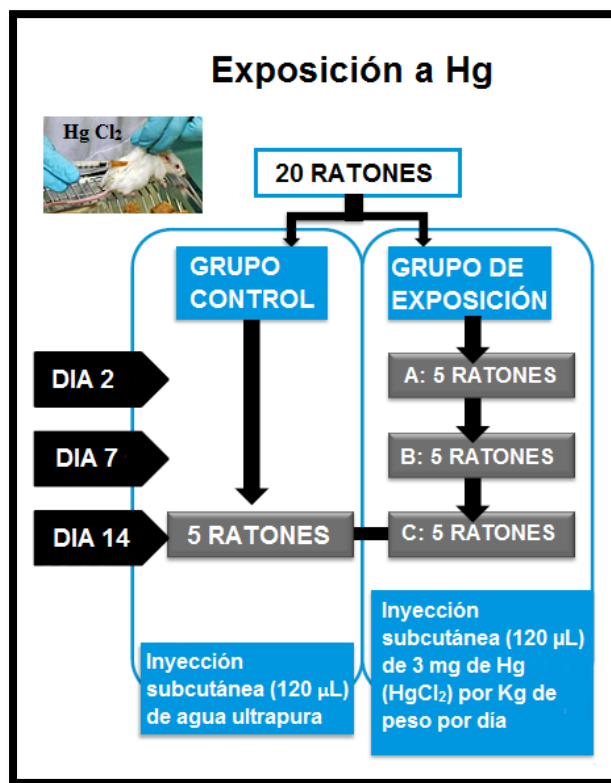
Se utilizaron un total de 40 ratones *Mus musculus*, que se dividieron en dos grupos: grupo de exposición y grupo control. Treinta ratones fueron expuestos a cadmio mediante inyección subcutánea (100  $\mu$ L) utilizando dosis crecientes de 0,1 a 1 mg/Kg/día de cadmio, en forma de CdCl<sub>2</sub>, durante un total de 10 días. Los ratones se distribuyeron en tres subgrupos de 10 ratones (A, B y C), separados de la colonia y sacrificados los días 2, 6 y 10 del experimento, respectivamente. Por otro lado, se tomaron 10 ratones como grupo control a los que se les inyectó subcutáneamente 100  $\mu$ L de agua ultrapura al día durante los 10 días del experimento. La figura 29 muestra el esquema del experimento de exposición.



**Figura 29.** Experimento de exposición a cadmio en ratones de laboratorio *Mus musculus*.

### 3.2.2. Experimento de exposición a mercurio

Se utilizaron 20 ratones *Mus musculus* divididos en dos grupos: (a) grupo de exposición formado por 15 ratones expuestos a mercurio mediante inyecciones subcutáneas (120 µL) empleando una dosis de 3 mg de Hg (HgCl<sub>2</sub>) 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 del experimento, respectivamente. Para el grupo control se utilizaron 5 ratones a los que se les inyectó subcutáneamente 120 µL de agua ultrapura al día durante los 14 días del experimento. La figura 30 muestra el esquema del experimento de exposición.



**Figura 30.** Experimento de exposición a mercurio en ratones de laboratorio *Mus musculus*.

### 3.2.3. Experimento de exposición a arsénico

Se utilizaron 20 ratones *Mus musculus*, a los que se sometieron a exposición a arsénico mediante administración oral (100  $\mu$ L) de una dosis de 4,3 mg de As ( $Na_3AsO_4$ ) por kg de peso corporal por día durante 7 días. Se consideraron tres subgrupos de 5 ratones cada uno (A, B y C), separados y sacrificados los días 2, 4 y 7 del experimento, respectivamente. En el grupo control se utilizaron 5 ratones a los que se les administró oralmente 100  $\mu$ L de agua ultrapura al día durante los 7 días del experimento. La administración oral llevó a cabo con una cánula gástrica como la que se muestra en la figura 31. La figura 32 muestra el esquema del experimento de exposición.



Figura 31. Cánula gástrica usada para la administración oral del arsénico.

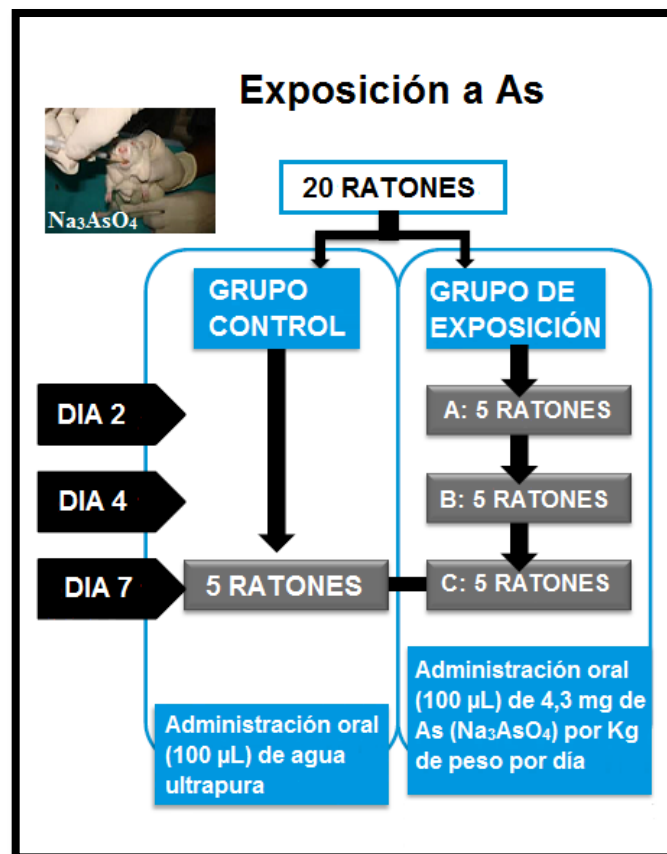
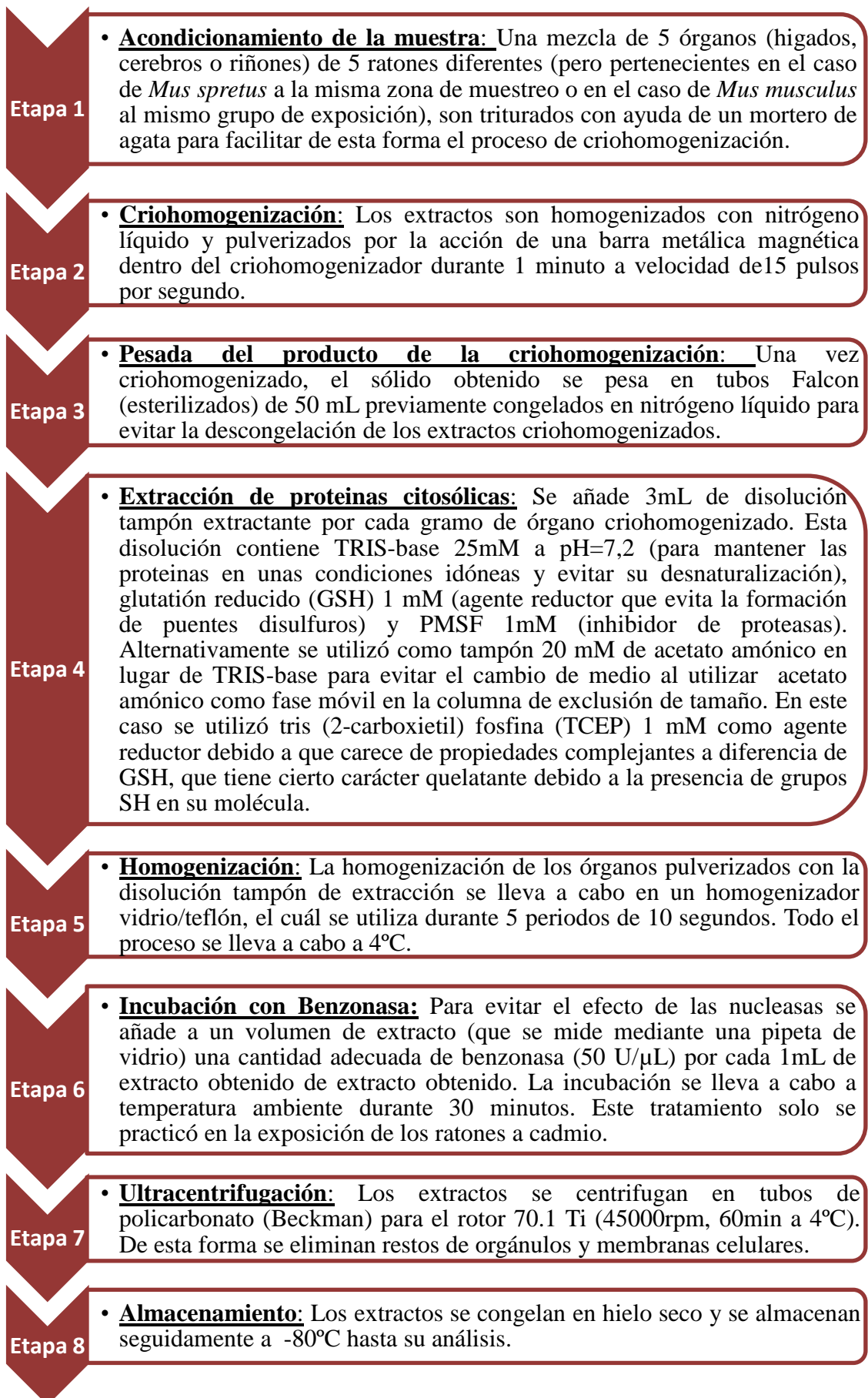


Figura 32. Experimento de exposición a arsénico en ratones de laboratorio *Mus musculus*



### **3.3. Manipulación de los animales de experimentación y tratamiento de los órganos. Preparación de extractos citosólicos.**

Tanto los ratones *Mus spretus* capturados en el Parque Nacional y su entorno como los ratones *Mus musculus* sometidos a las experiencias de exposición fueron anestesiados por inhalación individual de isoflurano, extrayendo la sangre mediante punción cardiaca. Posteriormente se diseccionaron utilizando un bisturí de cerámica transfiriendo los órganos rápidamente a hielo seco. De forma individual se extrajeron el hígado, cerebro y riñón de cada animal y se pesaron en viales Eppendorf, se limpiaron con una solución de NaCl al 0,9%, y posteriormente se congelaron en nitrógeno líquido para su almacenamiento a -80 ° C hasta su estudio. 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 (España). El procedimiento de preparación de extractos citosólicos optimizado en este estudio consta de una serie de etapas que se describen a continuación:





### 3.4. Determinación del contenido total de metales en los extractos citosólicos de hígado y riñón de *Mus spretus*

Para la determinación del contenido total de metales en los extractos de hígado y riñón de *Mus spretus* se pesaron exactamente 0.250 g del extracto en reactores de teflón MiniExpress de 5 mL del microondas MARS (CEM). Posteriormente se añaden 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 lleva a cabo el ataque en horno de microondas. La muestra se mineraliza a una potencia de 400 W y una rampa de temperatura que va desde temperatura ambiente a 160 ° C durante 15 min, manteniendo esta temperatura durante 40 min. A continuación, los extractos mineralizados se trasvasan a matraces aforados de 2 ml donde se enrasan con agua ultrapura. Estas disoluciones se filtran con filtros hidrófilos PVDF 0,45 µm antes de su análisis mediante ICP-MS. El análisis se llevó a cabo mediante adición de rodio (Rh) como patrón interno a una concentración de 1 µg/ ml. Todos los análisis se realizaron con tres repeticiones.

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 de Li, Y, Ce y Tl, al 2% en ácido nítrico. Tras la optimización de los parámetros se comprueba la calibración de las masas, la resolución espectral y los porcentajes de óxidos e iones doblemente cargados. A su vez se optimizan los flujos de gas de colisión/ reacción usando el método expuesto en el apartado 1.3. Las condiciones operacionales óptimas para el análisis del contenido total de metales en los extractos citosólicos de hígado y riñón se resumen en la tabla 8.

### 3.5. Determinación del contenido total de metales en suelos y sedimentos

Las muestras 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.

Se pesan 0,250 g de cada muestra tamizada en reactores de teflón Express (CEM) 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 180°C en 10 minutos y se mantuvo a esta temperatura durante 50 minutos. Después de la digestión se añaden 6 mL de ácido bórico para neutralizar el exceso de ácido fluorhídrico. Posteriormente, las muestras mineralizadas se enrasan a 25 mL mediante adición de agua ultrapura, y se filtran con filtros hidrófilos PVDF 0,45  $\mu\text{m}$  antes de su análisis mediante ICP-MS. El análisis se llevó a cabo mediante adición de rodio (Rh) como patrón interno a una concentración de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Todos los análisis se realizaron con tres repeticiones. Las condiciones óptimas de medida son las mismas que se resumen en la tabla 8. La viabilidad del método de digestión se comprueba mediante ensayos de recuperación con la adición a las muestras de 1, 5, 50 y 100  $\mu\text{g}/\text{L}$  de los elementos de interés dependiendo de la concentración relativa de cada metal en las muestras. Los resultados obtenidos en los ensayos de recuperación y los límites de detección de cada metal se muestran en la tabla 6.

	Cu	Zn	As	Cd
Recuperación (%)	89	121	105	99
LDO ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0.118	1.023	0.031	0.002

**Tabla 6.** Recuperación y límite de detección obtenidos para cada metal en el análisis de suelos y sedimentos del Parque Nacional de Doñana y alrededores.

### 3.6. Determinación del contenido total de proteínas en extractos citosólicos de hígado y riñón de ratón

El contenido total de proteínas en los extractos citosólicos de hígado y riñón de *Mus spretus* se llevó a cabo por el método bradford basado en el cambio de color del colorante Coomassie brilliant blue G-250 en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas. Se preparó una curva de calibrado con BSA como proteína patrón y reactivo Bradford (Bio-Rad, Múnich, Alemania) que contiene Comassie Blue G-250, ácido fosfórico y metanol para el desarrollo del color. La preparación de la curva de calibrado se llevó a cabo como se indica en la tabla 7.



	B	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>μL NaOH (1 M)</b>	50	50	50	50	50	50	50	50	50
<b>μL H<sub>2</sub>O</b>	20	18	16	14	12	10	8	5	0
<b>μL BSA (1 mg mL<sup>-1</sup>)</b>	0	2	4	6	8	10	12	15	20
<b>mL Bradford</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1

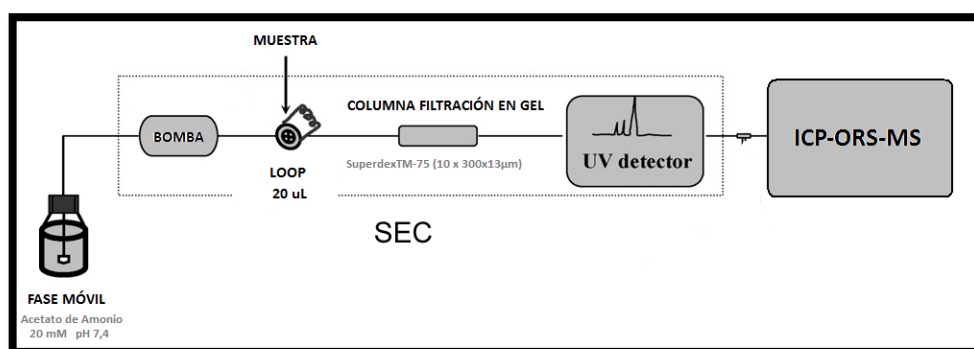
**Tabla 7.** Preparación de la curva de calibrado mediante el método Bradford

Los reactivos se añadieron en el orden que aparece en la tabla: (a) 50 μL de Na OH (1M) para romper la estructura cuaternaria de las proteínas y favorecer la reacción entre éstas y el reactivo Bradford; (b) agua ultrapura; (c) disolución de BSA de 1 mg mL<sup>-1</sup>, estos últimos en volumen adecuado según cada caso hasta completar el mismo volumen final, (d) el reactivo de Bradford. La mezcla se agita en un vortex para su homogeneización y se incuba a temperatura ambiente en oscuridad durante 10 minutos (La unión colorante-proteína es un proceso muy rápido y el complejo permanece estable durante un tiempo relativamente largo, aproximadamente una hora). A continuación se mide la absorbancia a 595 nm de todos los puntos frente a un blanco para obtener la curva de calibrado.

Los extractos citosólicos de hígado y riñón de ratón se diluyen entre 1/20 y 1/50 con agua y posteriormente se analizan con el procedimiento descrito, utilizando 20 μL de estas diluciones, 50 μL de NaOH 1M y 1mL de reactivo Bradford. La absorbancia se mide a 595 nm. Las correspondientes concentraciones se obtienen por interpolación de éstas en la curva de calibrado.

### 3.7. Análisis de los extractos citosólicos mediante cromatografía de exclusión de tamaño

En primer lugar, los extractos se filtraron con filtros Iso-Disc PVDF (diámetro 25mm, 0,2  $\mu\text{m}$  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 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 30cm de tubo PEEK (0.17i.d.) (Figura 33).



**Figura 33.** Diagrama esquemático del acoplamiento SEC-HPLC-UV-ICP-ORS-MS usado en este estudio

La sintonía del ICP-MS se realizó añadiendo Li, Y, Ce y Tl ( $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) a la fase móvil (acetato de amonio 20 mM a pH 7,4) usando un flujo de  $0,7 \text{ mL min}^{-1}$ . La fase móvil se preparó diariamente ajustando el pH con una mezcla  $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$  ultrapura 1:1. Las condiciones operacionales usadas en este acoplamiento se encuentran resumidas en la tabla 8.

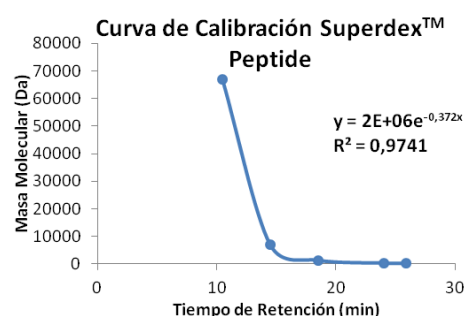


<i>Condiciones experimentales SEC analítica</i>	
Columna	Superdex <sup>TM</sup> -Peptide y Superdex <sup>TM</sup> -75 (300 x 10mm x13µm)
Rango de Resolución	<10 kDa y 3-70 kDa, respectivamente
Fase Movil	Acetato de amonio 20 mmol L-1 (pH 7.4)
Flujo	0.7 mL min-1
Volumen de Inyección	20 µL
Visible wavelength	254 nm
<i>Condiciones experimentales ICP-ORS-MS</i>	
Foward power	1500 W
Flujo Plasma gas	15.0 L min-1
Flujo Auxiliary gas	1.0 L min-1
Flujo Carrier gas	0.9 L min-1
Profundidad de muestreo	8 mm
Conos Sampling and skimmer	Ni
Flujo He	3.9 mL min-1
Flujo H <sub>2</sub>	3.5 mL min-1
Qoct	-18 V
Qp	-16 V
Tiempo de análisis	0.3 por isótopo
Isótopos monitorizados	Usando He como gas de colisión: <sup>53</sup> Cr, <sup>55</sup> Mn, <sup>63</sup> Cu, <sup>65</sup> Cu, <sup>64</sup> Zn, <sup>66</sup> Zn, <sup>75</sup> As, <sup>57</sup> Fe, <sup>103</sup> Rh, <sup>114</sup> Cd. Usando hidrógeno como gas de reacción: <sup>56</sup> Fe, <sup>80</sup> Se.

**Tabla 8.** Condiciones experimentales usadas para SEC e ICP-MS.

Los tiempos de retención correspondientes a los calibrantes de masa molecular usados para la columna Superdex Peptide (< 10 kDa) y su curva de calibración obtenida con las condiciones cromatográficas descritas previamente se muestra en la figura 34.

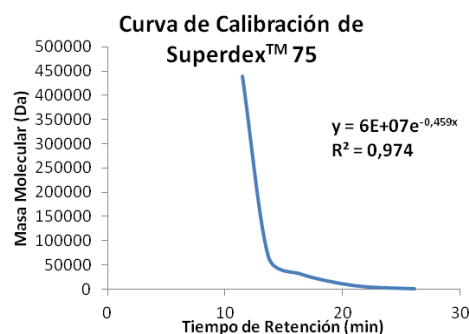
Proteínas	Masa molecular (kDa)	Tiempo de retención (min)	Metal monitorizado
Albúmina de suero bovino (BSA)	67	10.5	Cu y Zn
Metalotioneína	7	14.5	Cu, Zn y Cd
Vitamina B <sub>12</sub>	1.35	18.5	Co
Glutatión reducido	0.307	24.0	Cu y Zn
Arsenobetaina	0.179	25.9	As



**Figura 34.** Tiempos de retención de los calibrantes para la columna Superdex Peptide y su correspondiente curva de calibración

Por otro lado, los tiempos de retención correspondientes a los calibrantes de masa molecular empleados para la columna Superdex 75 (3-70 kDa) y su curva de calibración usando las condiciones cromatográficas descritas previamente se muestra en la figura 35.

Proteínas	Masa molecular (kDa)	Tiempo de retención (min)	Metal monitorizado
Ferritina	440	11.5	Fe
Albúmina de suero bovino (BSA)	67	13.7	Cu y Zn
Superóxido dismutasa (SOD)	32	16.3	Cu y Zn
Metalotioneína	7	21.0	Cu, Zn y Cd
Glutatión reducido	0.303	26.1	Cu y Zn



**Figura 35.** Tiempos de retención de los calibrantes para la columna Superdex 75 y su correspondiente curva de calibración.

Tras la calibración de las columnas de exclusión cromatográfica se analizaron los diferentes extractos citosólicos. La fracción correspondiente al rango de masa molecular 100-300 Da obtenida con la columna Superdex™ Peptide 10/300 GL se aisló mediante SEC preparativa usando Hiload 26/60 Superdex 30 prep grade [198]. Por otro lado, la fracción correspondiente a la masa molecular aproximada de 7 KDa obtenida con la columna Superdex™ 75 10/300 GL se aisló mediante SEC preparativa usando Hiload 26/60 Superdex 75 prep grade [130]. La SEC a escala preparativa utiliza un cromatógrafo líquido de baja presión, AKTA-Prime. Las condiciones utilizadas se muestran en la tabla 9.



<i>Condiciones experimentales SEC preparativa</i>	
Columnas	Hiload 26/60 Superdex 30 Prep y Hiload 26/60 Superdex 75 (600 x 26mm x 34µm )
Rango de Resolución	<10 kDa y 3-70 KDa respectivamente
Fase Móvil	Acetato de Amonio 20 mmol L-1 (pH 7.4)
Flujo	2 mL min-1
Volumen de Inyección	2 mL
Longitud de Onda UV	254 nm

**Tabla 9.** Condiciones experimentales utilizadas en SEC preparativa.

La reducción del contenido salino en las fracciones de hígado de ratón de masa molecular en torno a 7 kDa, aisladas con SEC preparativa [130], se lleva a cabo en columnas “Hitrap desalting” con las condiciones que se muestran en la tabla 10.

<i>Condiciones experimentales para eliminación de sales</i>	
Columna	Hitrap Desalting (250x160 mm ID)
Rango de Resolución	1000-5000 Da
Fase Movil	Agua milli-Q pH 8,0
Flujo	4 mL min-1
Volumen de Inyección	500 µL
Longitud de Onda UV	254 nm
Conductividad	mS

**Tabla 10.** Condiciones experimentales utilizadas para eliminar sales.

Una vez eliminadas las sales en estas fracciones, se liofilizan y posteriormente se disuelven en 200 µL de agua ultrapura antes de su análisis por RPC.

Las fracciones de hígado y riñón de ratón con un rango de masa molecular 100-300 Da aisladas mediante SEC preparativa [198], se liofilizan para su posterior redisolución en 500  $\mu$ L de agua ultrapura. Posteriormente se centrifugan a 10000g a 4°C durante 10 min y se almacenan a -80°C hasta su análisis por AEC.

### **3.8. Purificación de metalomoléculas en las fracciones citosólicas de *Mus musculus* y *Mus spretus* mediante sistemas cromatográficos ortogonales**

#### **3.8.1. Cromatografía en fase reversa de las fracciones citosólicas de hígado de *Mus musculus***

Las fracciones de 7 KDa (aislada por SEC preparativa) que se relacionan con la presencia de metalotioneinas en hígado de *Mus musculus* se sometieron a una segunda separación cromatográfica mediante RPC. Para ello las condiciones experimentales se optimizaron previamente con patrones de metalotioneina I y II de conejo que contenían Cd y Zn, cuya masa molecular aproximada era de 7 KDa. Cada fracción citosólica se analizó mediante el acoplamiento RPC-ICP-MS para detectar los tiempos de retención de las diferentes fracciones resultantes que posteriormente se recogieron siguiendo la señal proporcionada por un detector UV. Las condiciones óptimas utilizadas para la separación RPC se muestran en la tabla 11.



<i>Condiciones experimentales RPC-HPLC</i>											
Columna	Spherisorb ODS 2 (25cm×4.6mm×5µm)										
Fase Móvil	A: 30 mM Acetato de Amonio en 1% (v/v) metanol (pH 7.4) B: 30 mM Acetato de Amonio en metanol (pH 7.4)										
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Tiempo/min</th> <th>Buffer B (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>15</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>25</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	Tiempo/min	Buffer B (%)	0	0	15	30	25	30	30	0
Tiempo/min	Buffer B (%)										
0	0										
15	30										
25	30										
30	0										
Flujo	1 ml min <sup>-1</sup>										
Volumen de Inyección	25 µl										
Longitud de onda UV	254 nm										

**Tabla 11.** Condiciones experimentales óptimas para el análisis mediante RPC

### **3.8.2. Cromatografía de intercambio aniónico aplicada a las fracciones citosólicas de hígado y riñón de *Mus spretus***

Las fracciones de masa molecular del rango de 100-300 Da (aislada por SEC preparativa) atribuidas a la presencia de arsenocompuestos en hígado y riñón de *Mus spretus* se sometieron a una segunda separación cromatográfica mediante AEC. Para ello las condiciones experimentales se optimizaron previamente con los siguientes patrones: arsenito y arsenato sódico, monometilarsénio (MMA), dimetilarsénico (DMA) y arsenobetaina. Las fracciones citosólica fueron analizadas mediante AEC-ICP-MS usando las condiciones experimentales descritas en la tabla 12.

<i>Condiciones experimentales AEC</i>	
Columna	Hamilton PRP X-100 (250 x 4.6 mm x 5µm)
Fase Movil	Dihidrógeno fosfato de sodio 30 mM (pH 6)
Flow rate	1 mL min <sup>-1</sup>
Injection volumen	20 µL
Longitud de onda UV	254 nm

**Tabla 12.** Condiciones experimentales utilizadas en cromatografía de intercambio aniónico.

### 3.9. Identificación de las fracciones de metalotioneína de hígado de *Mus musculus* mediante nESI-qTOF-MS

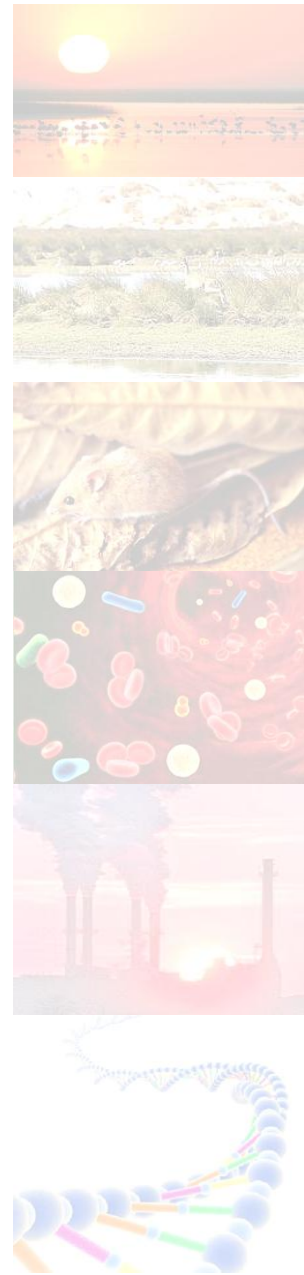
Las fracciones de metalotioneínas de hígado de *Mus musculus* purificadas por RPC fueron analizadas mediante nESI-qTOF-MS con objeto de identificar las diferentes isoformas de éstas. Antes del análisis se calibró el analizador de masas TOF con renina. Los parámetros experimentales para el análisis fueron optimizados con los patrones de metalotioneína I y II. Estos se muestran en la tabla 13.

<i>Condiciones experimentales nESI-qQTOF-MS</i>	
Modo de Adquisición	positivo
Rango <i>m/z</i>	1000-1500
Potencial Ion-spray	800 V
Voltaje electromultiplicador	2200 V
Gas de cortina	0,8 L min <sup>-1</sup>
Potencial declustering	60 V

**Tabla 13.** Condiciones experimentales usadas para nESI-qQTOF-MS.

Tras obtener el espectro de masas, se identifica la masa de cada isoforma de metalotioneína con diferentes metales procedentes del hígado de *Mus musculus* comparando la masa experimental obtenida, con la masa teórica que se calcula a partir de la masa teórica de cada isoforma sin metal o apoforma (obtenida a partir de bases de datos) teniendo en cuenta la masa teórica de cada metal que está coordinado a ésta [130].





# RESULTADOS Y DISCUSIÓN





## Resultados y discusión

Los artículos publicados en revistas científicas han sido retirados de este apartado de la tesis debido a las restricciones relativas a los derechos de autor. Dichos artículos han sido sustituidos por las referencias bibliográficas de más abajo, además si la UHU tiene suscripción a la versión electrónica de las revistas se añade un enlace que será de acceso restringido a miembros de la UHU.

Referencias bibliográficas:

- 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.*, 26 (2011) 141-149. DOI: 10.1039/C0JA00127A

Enlace del artículo en la revista:

<http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2011/JA/c0ja00127a#!divAbstract>

- González Fernández, M., García Sevillano, M.A., Jara Biedma, R., Navarro Roldán, F., García Barrera, T., López Barea, J., Pueyo, C., Gómez Ariza, J.I.: "Use of Metallomics in Environmental Pollution Assessment using Mice *Mus musculus*/*Mus spretus* as Bioindicators *Current Analytical Chemistry* 9 (2013) 229-243. DOI: 10.2174/157341113805218901

Enlace del artículo en la revista:

<http://www.scopus.com/record/display.url?eid=2-s2.0-84875305764&origin=SingleRecordEmailAlert&txGid=D00138D841EED14591750D5C2578D94A.euC1gMODexYIPkQec4u1Q%3A5>

- Jara Biedma, R.,, González Domínguez, R., García Barrera, T., López Barea, J., Pueyo, C., Gómez Ariza, J.L.: "Evolution of metallotionein isoforms complexes in hepatic cells of *Mus musculus* along cadmium exposure". *Biometals*"26 (2013) 639–650. DOI: 10.1007/s10534-013-9636

Enlace al texto completo del artículo (solo para miembros de la UHU):

[http://download.springer.com/static/pdf/339/art%253A10.1007%252Fs10534-013-9636-0.pdf?auth66=1403088824\\_82b82e7d60c0c2c5098b01ecc6472faa&ext=.pdf](http://download.springer.com/static/pdf/339/art%253A10.1007%252Fs10534-013-9636-0.pdf?auth66=1403088824_82b82e7d60c0c2c5098b01ecc6472faa&ext=.pdf)

## 1.

### **Estudio de la contaminación ambiental en el Parque Nacional de Doñana y alrededores mediante análisis de especies metálicas en tejidos de organismos bioindicadores *Mus musculus/Mus spretus***

**Artículo 1:** 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 (2011) 141-149.

**Artículo 2:** Use of Metallomics in Environmental Pollution Assessment using Mice *Mus musculus/Mus spretus* as Bioindicators *Current Analytical Chemistry* 9 (2013) 229-243.



La monitorización de contaminantes en el medio ambiente proporciona, por un lado, información sobre los posibles efectos tóxicos de estos xenobióticos, y por otro, y por otro lado nos ayuda a conocer áreas de impacto y lugares donde la concentración 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 ha desarrollado un procedimiento metalómico 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 posteriormente comparar los resultados obtenidos con la especie de laboratorio *Mus musculus* sometido a experiencias de exposición a contaminantes. 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 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 o metabolitos en *Mus spretus* como consecuencia de la exposición a los contaminantes mencionados.

Con este objetivo se llevaron a cabo muestreos de ratones *Mus spretus* en cinco áreas del Parque Nacional de Doñana y alrededores: una de ellas considerada zona no contaminada, Lucio del Palacio (LDP) y las cuatro restantes, La Rocina (ROC), El Partido (PAR), El Ajolí (AJO) y El Matochal (MT) con diferentes niveles de contaminación debido a su proximidad a zonas de actividad agrícola, minera e industrial. Los resultados del muestreo de LDP y ROC entre Noviembre y Diciembre de 2009 y los resultados del muestreo entre Noviembre y Diciembre de 2010 en los cinco puntos ya mencionados, han sido publicados en el artículo 1 y 2 respectivamente, de este apartado. A su vez, como se ha mencionado anteriormente, se ha sometido al ratón de laboratorio *Mus musculus* a experimentos de exposición a diferentes concentraciones de arsénico, cadmio y mercurio, con objeto de identificar cambios de expresión de metalobiomoléculas durante la exposición. Posteriormente se sustituyó el GSH, que aún posee propiedades complejantes suaves debido a la presencia del grupo SH en su



molécula, por TCEP que siendo un reactivo reductor carece completamente de propiedades complejantes. Estas diferencias operacionales respecto a la preparación de los extractos citosólicos se han recogido en los artículos asociados a este capítulo.

El análisis metalómico de los extractos citosólicos se ha realizado mediante el acoplamiento SEC a ICP-MS que proporciona los correspondientes perfiles metal-biomolécula. Para ello se han utilizado columnas analíticas Superdex<sup>TM</sup> 75 (3-70 KDa) y Superdex<sup>TM</sup> Peptide (< 10 KDa). La fracción de hígado y riñón tanto de *Mus musculus* como *Mus spretus* que contenía especies de arsénico con una masa molecular de 100-300 Da se aisló mediante SEC preparativa usando la columna Hiload 26/60 Superdex 30 prep grade, con objeto de identificar dichas especies. Para ello la fracción se purificó mediante una segunda dimensión cromatográfica basada en el uso de la cromatografía de intercambio aniónico, AEC, utilizando una columna Hamilton PRP X-100.

Los resultados muestran claras diferencias entre hígado, riñón y cerebro de *Mus spretus* cuando éste está sometido a diferentes grados de contaminación ambiental. En hígado y riñón, los resultados más interesantes se han obtenido considerando los perfiles de biomoléculas unidas a metales esenciales como Cu y Zn y otros de carácter tóxicos como As, Cd, Hg y Pb. Los perfiles obtenidos a partir de los extractos de hígado de *Mus spretus* de los distintos puntos de muestreo, muestran varias biomoléculas características unidas a estos metales, en especial al Cu y Zn en zonas contaminadas. En ROC, MAT y PAR destaca la presencia de un pico de gran intensidad que contiene Cu, Zn y Cd con una masa molecular aproximada de 7 kDa coincidiendo con el tiempo de retención del patrón de metalotioneina I. Los perfiles de riñón también muestran el mismo pico de 7 kDa, aunque la intensidad es más pequeña que en el hígado. Además, hay que destacar la presencia de dos picos que contiene mayoritariamente Zn y en menor cantidad Cu con una masa molecular aproximada de 67 kDa y 32 kDa, que coinciden con el tiempo de retención de los patrones Cu,Zn-BSA y Cu,Zn-SOD respectivamente, cuya intensidad es mayor en riñón que en hígado. Por último aparece una fracción entre 100 y 300 Da que contiene As con mayor intensidad en riñón que en hígado cuya purificación mediante AEC mostró dos picos de As que coincidían con los patrones de MMA y DDA. En zonas no contaminadas, los perfiles de estas metalobiomoléculas se reducen de manera considerable, probablemente debido a la ausencia de contaminantes que provoquen su sobreexpresión.

Los perfiles obtenidos en cerebro de *Mus spretus* de ROC muestran la presencia de un pico con que contiene Cu y Zn y en menor cantidad Cd con una masa molecular aproximada de 7KDa que coincide con el tiempo de retención del patrón de metalotioneina. Los perfiles no muestran diferencias significativas entre zonas contaminadas y no contaminadas esto indica una menor respuesta del cerebro al estrés ambiental con respecto al hígado y riñón como consecuencia de la barrera hematoencefálica que lo protege.

Los resultados obtenidos en los experimentos de exposición a As, Cd y Hg en *Mus musculus* muestran una respuesta biológica comparable a la obtenida en *Mus spretus* en las diferentes áreas de estudio. El experimento de exposición a Cd en *Mus musculus* se llevó a cabo mediante inyección subcutánea de dosis crecientes de 0,1 mg/Kg/día de cadmio (en forma de CdCl<sub>2</sub>), hasta alcanzar una dosis final de 1 mg/Kg/día al décimo día de exposición. La colonia de ratones expuesto se dividió en tres subgrupos A, B y C, correspondientes subcolonias en las que se interrumpió el proceso de exposición a los 2, 6 y 10 días, respectivamente, siendo separados del resto para su sacrificio y estudio metalómico. Los resultados obtenidos en hígado y riñón muestran la sobreexpresión de dos biomoléculas a lo largo del experimento de exposición, con masa molecular de 7 y 32 KDa, las cuales contienen Cd, Cu y Zn. Estas muestran tiempos de retención coincidentes con los patrones de MT y SOD, respectivamente. La inducción de estas biomoléculas demuestra el mecanismo de protección del hígado y riñón a la exposición de Cd. Además, estos resultados muestran respuestas similares entre el ratón de laboratorio sometido a exposición a Cd y el ratón de vida libre *Mus spretus* procedente de áreas con una presencia marcada de cadmio como ROC y MAT, lo que constituye una buena prueba de la utilidad de las experiencias de exposición para interpretar la respuesta de los organismos de vida libre a la contaminación por este elemento.

La experiencia de exposición a Hg se llevó a cabo por inyección subcutánea de una dosis constante de 3 mg/Kg/día de Hg (en forma de HgCl<sub>2</sub>) durante 14 días. También en esta experiencia se dividió la colonia de ratones en tres subgrupos A, B y C, correspondientes a las subcolonias en las que se interrumpió el proceso de exposición a los 2, 7 y 14 días, respectivamente, siendo separados del resto para su sacrificio y estudio metalómico. Los resultados obtenidos en hígado y riñón son en este caso diferentes. El perfil de metalobiomoléculas en el hígado muestra un pico predominante



trazado por Cu, Zn y Hg (en la señal del ICP-MS) con una masa molecular de 32 KDa, que coincide con el tiempo de retención del patrón de la SOD. El cromatograma de Cu correspondiente a este pico muestra una disminución de la intensidad a lo largo de la exposición, mientras que el cromatograma trazado por Hg, a este tiempo de retención, muestra un pico cuya intensidad aumenta con la exposición. En riñón, el perfil muestra un pico de gran intensidad trazado por Cu, Zn y Hg que corresponde a una molécula de masa 7 KDa, cuyo tiempo de retención coincide con el de la MT. Los perfiles de Cu y Hg muestran que este pico se incrementa drásticamente durante la exposición. Estos resultados sugieren una competencia del Hg con el Cu por el sitio activo de SOD en el hígado y un tiempo de residencia corto de Hg en el hígado, siendo transportado a los riñones donde se excreta. Esta hipótesis puede explicar la gran intensidad del pico de Hg como Hg-MT en riñón.

Por último, la exposición a As se llevó a cabo mediante administración oral de una dosis de 4,3 mg por kg de peso corporal por día de As, en la forma  $\text{Na}_3\text{AsO}_4$ , durante un período total de 7 días. Los tres subgrupos corresponden a los días de exposición 2, 4 y 7, respectivamente. Los resultados muestran una clara tendencia del As a acumularse en los riñones. Los perfiles del riñón muestran dos picos de As con masa molecular baja, entre 100 y 300 Da, los cuales se incrementan durante la exposición. La purificación de estos picos mediante AEC demuestra su relación con las especies MMA y DMA, por coincidencia de los tiempos de retención con los correspondientes patrones. El comportamiento de estos picos en el hígado es el inverso decreciendo en intensidad durante el experimento de exposición. Este hecho sugiere el tráfico de este elemento hacia los riñones para su excreción. La respuesta biológica de *Mus musculus* con respecto a la exposición a As es comparable con la obtenida para *Mus spretus* procedente de las zonas más contaminadas de ROC y MAT.

El uso de organismos de vida libre como especies bioindicadoras como es el caso de *Mus spretus*, proporciona información sobre el efecto de los contaminantes en el metabolismo de estos. La metalómica constituye una herramienta eficaz para identificar cambios de expresión en moléculas de importancia biológica, como metaloproteínas y otras metaloespecies como enzimas redox y metabolitos, como consecuencia de la contaminación ambiental. El procedimiento metalómico aplicado en este estudio proporciona resultados prometedores para llevar a cabo el seguimiento del efecto de metales pesados en organismos bioindicadores como *Mus spretus*. A su vez,

los resultados obtenidos en los experimentos de exposición a dichos metales con *Mus musculus*, demuestran que estos pueden usarse para el estudio de la respuesta biológica de *Mus spretus* procedentes de áreas con diferentes grado de contaminación, debido a la homología genética entre ambas especies.



## 2.

### **Evolución de los complejos metálicos de las isoformas de metalotioneína en células hepáticas de *Mus musculus* durante experiencias de exposición a cadmio**

**Artículo 3:** Evolution of metallotionein isoforms complexes in hepatic cells of *Mus musculus* along cadmium exposure *Biometals* 26 (2013) 639–650.



El desarrollo de procedimientos analíticos para el estudio de la biodisponibilidad y el impacto medioambiental de los metales en los organismos vivos ofrece un desafío permanente tanto para la química analítica ambiental como para la toxicología clínica. Los metales con efectos tóxicos para el medioambiente como As, Cd o Hg, presenta una gran afinidad por los grupos funcionales con importancia biológica como los grupos tiol, selenol o amino entre otros. Entre los metales tóxicos que se acaban de mencionar, el cadmio es quizás uno de los más característicos, poseyendo un alto nivel de impacto medioambiental debido a su alta persistencia. De ahí la importancia del análisis de metalotioneínas unidas a cadmio, ya que estas proteínas forman complejos muy estables con este elemento participando en diversos procesos de detoxificación de metales bajo situaciones de exposición a los mismos. La metalómica constituye una buena alternativa para el estudio de metalotioneínas unidas a metales en organismos vivos, mediante el uso de sistemas cromatográficos multidimensionales acoplados a un sistema de detección elemental como el ICP-MS, generalmente utilizado en paralelo con un sistema de detección molecular, como el ESI-MS.

En el trabajo que da soporte a este apartado se ha desarrollado un procedimiento metalómico basado en el uso de un sistema cromatográfico bidimensional, SEC seguido de RPC, combinado con un doble sistema de detección: ICP-MS como detector elemental y nESI-qTOF-MS como detector molecular, para el estudio de complejos de Cd, Cu y Zn con isoformas de metalotioneína que se producen en hígado de *Mus musculus* durante experimentos de exposición a dicho elemento. La experiencia de exposición del *Mus musculus* se llevó a cabo mediante inyección subcutánea de dosis crecientes de Cd (en forma de CdCl<sub>2</sub>) desde 0,1 a 1 mg/Kg/día a lo largo de 10 días. Se consideran tres subgrupos de ratones, A, B y C, los cuales fueron separados y sacrificados a los 2, 6 y 10 días de exposición, respectivamente. Por otro lado, se utilizó un grupo control al que se le inyectó subcutáneamente 100 µL de agua ultrapura al día durante los 10 días del experimento. Una vez preparados los extractos citosólicos de hígado de los distintos grupos de exposición y el control, se estudiaron mediante SEC-ICP-MS para la obtención de los perfiles metal-biomolécula usando una columna analítica Superdex<sup>TM</sup> 75 (3-70 KDa). La fracción correspondiente a los dos grupos más expuestos a cadmio, B y C que contenía Cd, Cu y Zn en una biomolécula con masa molecular aproximada de 7 KDa, se aisló mediante SEC preparativa usando una columna Hiload 26/60 Superdex 75 prep, con objeto de identificar dichas



biomoléculas. Esta fracción se sometió a una segunda separación cromatográfica por intercambio aniónico, AEC-ICP-MS, utilizando una columna Spherisorb ODS2. Los perfiles trazados por los metales correspondían a las isoformas I y II de la metalotioneína generadas en los grupos de exposición B y C. Finalmente se aislaron las fracciones correspondientes a MT I y II en los grupos de exposición B y C, las cuales contenían Cd, Cu y Zn, para su posterior identificación mediante nESI-QTOF-MS.

Los cromatogramas SEC-ICP-MS de Cu y Zn correspondientes a los extractos de hígado de *Mus musculus* muestran varias biomoléculas unidas a Cu y Zn en el grupo control dentro del rango de peso molecular entre 30-70 KDa. Cabe destacar la presencia de un pico que contiene Cu y Zn con una masas molecular aproximada de 32 KDa coincidiendo con el tiempo de retención del patrón Cu,Zn-SOD. La intensidad de este pico se incrementa suavemente durante la exposición. Los cromatogramas SEC-ICP-MS de Cd en estos extractos revelan la presencia de un pico trazado por Cd, Cu y Zn de masa molecular aproximada de 7 kDa, coincidiendo con el tiempo de retención del patrón MT. La intensidad de este pico aumentaba claramente con la dosis de CdCl<sub>2</sub>. Posteriormente, el pico fue aislado mediante SEC preparativa en los dos grupos más expuestos B y C. La separación cromatográfica mediante AEC de estas dos fracciones de MTs reveló la presencia de dos picos que contenían Cd, Cu y Zn en cada una de ellas. Estos picos tenían el mismo tiempo de retención que los patrones de MT1 y MT2 usados para la calibración de la columna. Finalmente, se separaron cada uno de estos picos correspondientes a las fracciones B y C para su posterior identificación por nESI-QTOF-MS. Los resultados obtenidos de los espectros de masas de cada uno de estos pico de MT muestran un cambio en la estequiometría del cadmio unido a metalotioneína entre los dos grupos más expuestos B y C, observándose un máximo de 4 átomos de cadmio unido a MT2 en el grupo B, mientras que en el grupo C es posible observar la MT2 con todos sus puntos potenciales de unión ligados a metales, Cd<sub>7</sub>MT2. Lo mismo ocurre con la MT1, aunque el número de átomos de cadmio que se coordinan a ésta es mayor que el caso de MT2, demostrándose así que el Cd se une preferentemente a la MT1. En el grupo B es posible observa hasta 6 átomos de cadmio unido a la MT1, sin embargo en el grupo C se observa la forma con todos los puntos de coordinación unidos a Cd, Cd<sub>7</sub>MT1. Todos estos resultados proporcionan información sobre evolución la estequiometría de los metales unidos a diferentes isoformas de metalotioneína y la acción cooperativa de los diversos metales en su unión a esta molécula. Un ejemplo es

la sustitución de cobre o zinc por cadmio, en hígado de *Mus musculus* a lo largo de la exposición a dosis crecientes de cadmio.

El procedimiento metalómico desarrollado en este trabajo constituye una herramienta útil para la identificación de cambios estequiométricos producidos en complejos metálicos de isoformas de la metalotioneína en hígado de *Mus musculus*, cuando este bioindicador es sometido a exposición de dosis crecientes de Cd, y proporciona, además una clara demostración de los mecanismos de bioinducción y detoxificación en los que participan las metalotioneínas en el hígado de *Mus musculus*, durante estas experiencias de exposición.



Los resultados obtenidos en el presente estudio nos permiten alcanzar las siguientes conclusiones:

1. La aplicación del procedimiento metalómico desarrollado mediante el acoplamiento de la cromatografía de exclusión de tamaño con un sistema de detección atómica ICP-MS, para la caracterización de especies metálicas en ratones de vida libre *Mus spretus*, proporciona una herramienta analítica útil para la evaluación de la respuesta biológica a contaminantes en organismos que habitan entornos naturales amenazados como el Parque Nacional de Doñana y sus alrededores. Los perfiles obtenidos a partir de los extractos de hígado de *Mus spretus* de los distintos puntos de muestreo seleccionados, muestran varias biomoléculas unidas a diferentes metales, destacando en todas ellas la importante presencia de Cu y Zn. De esta manera, la aplicación de este procedimiento muestra la sobreexpresión de proteínas relacionadas con el estrés ambiental causado por metales, como las metalotioneinas que contienen Cd, Cu y Zn, presentes en órganos de intensa actividad metabólica como hígado y riñón de *Mus spretus*, bioindicador capturado en zonas contaminadas, ROC y MAT. De la misma manera, se aprecia la sobreexpresión de otras biomoléculas que contienen Cu y Zn, las cuales se relacionan con el estrés oxidativo como la Cu, Zn-BSA y Cu, Zn-SOD. La presencia de otros metales tóxicos como As en estas zonas contaminadas (ROC y MAT) origina la presencia de metabolitos de baja masa molecular (100-300 Da) que contienen As, cuyo aislamiento mediante SEC preparativa y posterior purificación mediante AEC confirmaron la presencia de especies de arsenicales metiladas, como MMA y DMA, en el riñón de *Mus spretus*. La presencia de estas especies era menos intensa en el hígado de estos ratones. En zonas no contaminadas, como LDP, los perfiles de todas estas metalobiomoléculas en hígado y riñón se reducen de manera considerable, probablemente debido a la ausencia de contaminantes que provoquen su sobreexpresión.

Sin embargo, en el cerebro la intensidad de los picos marcados por Cu y Zn es menor que los observados en hígado y riñón, no observándose diferencias significativas entre los perfiles de cerebro de *Mus spretus* en zonas contaminadas y no contaminadas. Este hecho muestra claras diferencias en las respuestas biológicas en hígado y riñón de *Mus spretus* respecto a cerebro, posiblemente debido a la actividad de la barrera hematoencefálica que lo protege.



2. Los experimentos de exposición del ratón de laboratorio *Mus musculus* a Cd, As y Hg permiten obtener los perfiles metal-biomolécula que revelan la marcada sobreexpresión de la metalotioneína vinculada a Cd en hígado, inducida por inyección subcutánea de este elemento, así como la presencia de dos especies de arsénico, MMA y DMA en riñón, las cuales se con la dosis de este elemento. El comportamiento de estas dos especies, MMA y DMA, en hígado de *Mus musculus* es totalmente opuesto, disminuyendo su intensidad con respecto a la dosis de As. La exposición subcutánea de Hg provoca una reducción de la intensidad de la señal correspondiente a Cu-SOD, y un correlativo aumento de la señal correspondiente Hg-SOD en riñón de *Mus musculus* lo cual sugiere una competencia entre Hg y Cu por los sitios activos de la SOD. Como consecuencia, la exposición a Hg induce el tráfico de Cu hacia los riñones donde se produce un incremento de las señales correspondientes a Cu-MT y Hg-MT, como mecanismo de detoxificación de Hg.

3. Los perfiles SEC-ICP-MS de los experimentos de exposición de *Mus musculus* muestra una respuesta comparable de estos ratones con los de vida libre *Mus spretus*, procedentes de las zonas contaminadas ROC y MAT. Los perfiles de hígado y riñón de *Mus spretus* de estas zonas contaminadas muestran la sobreexpresión de un pico correspondiente a la metalotioneína unida a Cd, Cu y Zn, que que es comparable en intensidad al mismo pico obtenido en el grupo A del experimento de exposición a Cd en *Mus musculus*, lo que indica la interacción del Cd en los organismos de vida libre que habitan zonas contaminadas por este elemento. De la misma manera, los extractos de riñón de *Mus spretus* procedentes de estas zonas contaminadas muestran la presencia de un pico correspondiente a MMA, que es comparable en intensidad al mismo pico obtenido en los extractos de riñón de *Mus musculus* sometido a exposición oral de As (grupo C, o sea el más expuesto). Este hecho indica la considerable presencia de este elemento en los alrededores del Parque Nacional de Doñana. Un hecho destacable es la presencia significativa de As en la zona considerada no contaminada, LDP, lo que representa una señal de alarma respecto a la situación ambiental del Parque. Por último, la ausencia de respuesta biológica de *Mus spretus* en relación a la presencia de Hg, confirma la baja incidencia medioambiental que tiene este elemento en las áreas consideradas.

4. Se ha desarrollado un procedimiento metalómico basado en el uso de un sistema cromatográfico bidimensional, SEC-RPC, acoplados a un sistema de detección elemental, ICP-MS, y en paralelo con un sistema de detección molecular, nESI-qTOF-MS, para el aislamiento, purificación y posterior identificación de la fracción correspondiente a la metalotioneina de Cd, Cu y Zn procedente de los extractos de hígado de *Mus musculus* sometido a experiencias de exposición a cadmio. Los resultados obtenidos en los perfiles RPC-ICP-MS de los grupos B y C nos permiten apreciar la presencia de diferentes complejos metálicos con las isoformas I y II de la metalotioneina. Tras su identificación se ha podido establecer un cambio en la estequiometría del cadmio unido a MT-I y II en los dos grupos más expuestos, B y C, de los extractos de hígado de *Mus musculus*, de manera que al aumentar la dosis de Cd, grupo C, se saturan con Cd todos los puntos de coordinación de las isoformas I y II, alcanzándose una estequiometría  $\text{Cd}_7\text{MT}$ . Sin embargo en el grupo menos expuesto, grupo B, la estequiometría Cd:MT difiere de 7:1 ya que la molécula no satura todos los puntos de coordinación con Cd, sino las formas parcialmente metaladas con un número de átomos de Cd inferior a 7, coexistiendo con otros elementos como Cu y Zn en la molécula de MT. Por otra parte, los resultados muestran una mayor afinidad del Cd por la MT I que por la MT II, ya que se ha podido observar señales correspondientes a los complejos de MT II con 1 o 2 átomos de Cd en el grupo B, sin embargo estas señales no se observaron para los complejos de MT I con Cd del mismo grupo, observándose las correspondientes a estequiometría con 3 y 6 átomos de Cd. Todos estos resultados proporcionan información valiosa sobre evolución la estequiometría de metales unidos a diferentes isoformas de metalotioneina y las interacciones entre metales, como la sustitución de cobre o zinc por cadmio, en hígado de *Mus musculus*, a lo largo de la exposición a dosis crecientes de este último elemento.

5. El desarrollo de los procedimientos metalómicos llevados a cabo en este estudio, constituyen una herramienta útil para el estudio de la biodisponibilidad y el impacto medioambiental de los metales en los organismos vivos, mediante el estudio de diferentes biomoléculas relacionadas con el estrés ambiental como las metaloproteínas (metalotioneinas), enzimas redox (SOD) y/o metabolitos (MMA, DMA) en la especie bioindicadora, *Mus spretus*. Las experiencias de exposición a distintos metales llevadas a cabo en el organismo modelo *Mus musculus*, proporciona



información de la bioinducción de biomoléculas de importancia biológica como mecanismo de defensa frente al estrés provocado por los metales. En concreto, el experimento de exposición de Cd en *Mus musculus* da una visión general de los mecanismos implicados en la desintoxicación de metales por parte de las metalotioneinas, mostrando cambios estequiométricos de los complejos de los complejos metálicos con las isoformas de ésta proteína a lo largo de la exposición al cadmio. En investigaciones futuras, el estudio de estos complejos metálicos de las metalotioneinas pueden ayudar a esclarecer el papel biológico de estas en organismos vivos, como *Mus musculus*, y los resultados pueden ser extrapolados a su especie homóloga genéticamente, *Mus spretus*.

The results obtained in the present study allow us to obtain the following conclusions:

1. The application of a metallomic procedure based on size exclusion chromatography coupled to ICP-MS for characterization of metal species in free-living mice *Mus spretus*, provides an useful analytical approach to assess the biological response to contaminants in animals living environmentally threatened areas, as is the case of Doñana National Park (southwest Spain) and surroundings. The metal profiles obtained from liver extracts of *Mus spretus* from different sampling area show several biomolecules bound to metals, highlighting in all the cases the great contribution of Cu and Zn. The upregulation of Cu, Zn and Cd-metlothioneins in organ of intense metabolic activity, such us liver and kidney of *Mus spretus* from highly contaminated areas, such as ROC and MAT, is remarkable. Other metallobiomolecules related to oxidative stress such as Cu and Zn bovine serum albumin (Cu, Zn-BSA; 67 KDa) and Cu and Zn superoxide dismutase (Cu,Zn-SOD; 32 kDa) are also upregulated in liver and kidney by the contamination. Other toxic elements such as As, which is very abundant in areas with marked contamination, ROC and MAT, provokes the presence of low molecular mass As-molecules (100-300 Da), whose isolation by preparative SEC and subsequent purification by AEC confirmed the occurrence of methylated arsenicals, MMA and DMA, in kidneys of *Mus spretus*. The presence of these arsenic species in liver is lower. In no contaminated areas, such as LDP, the intensity of profiles from these metallobiomolecules in liver and kidney were significantly lower, probably due to the absence of contaminants that cause its upregulation.

On the other hand, in brain the intensity of peaks traced by copper and zinc is lower than those observed in liver and kidney, and the profiles show no significant differences between contaminated and no contaminated areas. These results show clear differences in biological responses of *Mus spretus* in liver and kidney with respect to the brain, when this animal is subjected to environmental stress, which can be related to the blood brain barrier activity.

2. 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. In liver the behavior of arsenic is inverse and these two peaks decrease with the doses. 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.

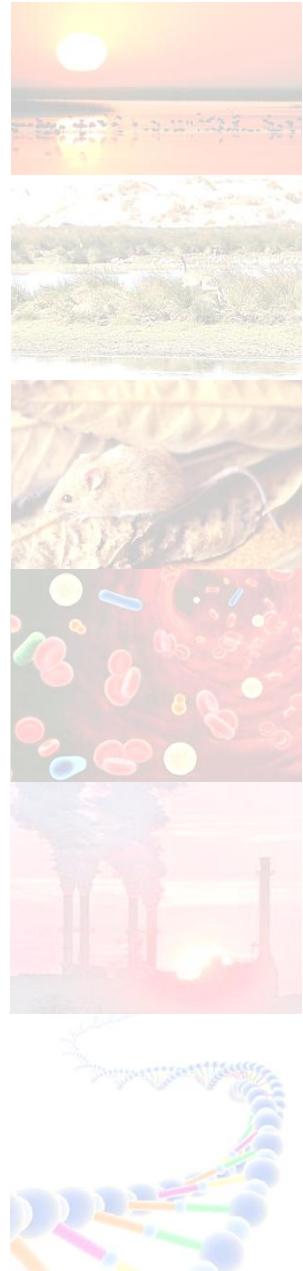
3. The SEC-ICP-MS metal profiles from exposure experiments of *Mus musculus* show a comparable biological response to that of free living mice *Mus spretus* from contaminated areas ROC y MAT. The profiles of *Mus spretus* from liver and kidney show the upregulation of Cd, Cu, Zn-MT caused by exposure to cadmium in environmental contaminated sites ROC and MAT, which is comparable in intensity to the same peak obtained in the group A of the Cd exposure experiment in *Mus musculus*. This fact denotes the interplay of this contaminant on free-living organisms from these sites. Similarly, kidney extracts of *Mus spretus* from these contaminated areas show the presence of a peak corresponding to MMA, which is comparable in intensity to the same peak obtained in the group C of As exposure experiment in *Mus musculus*. This fact can be associated to the significant presence of As in the surroundings of Doñana National Park. On the other hand, the appreciable response of mice from LDP, a theoretically non-contaminated area, to arsenic is remarkable, which claims the attention about the threats of the Park. Finally, the absence of mercury responses in *Mus spretus* reveals the lack of this element in the area considered.

4. A metallomic procedure has been developed to isolate, purify and subsequently identify the fraction corresponding to metallothionein with Cd, Cu and Zn from liver extracts of *Mus musculus* under cadmium exposure experiences. For this purpose, a two-dimensional chromatography approach [size-exclusion followed by reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC)] combined in parallel with inductively coupled plasma octopole reaction cell mass spectrometry (ICP-ORS-MS) and nanospray ionization time-of-flight mass spectrometry (nESI-qTOF-MS), has been performed. The results obtained by RPC-ICP-MS of B and C groups show different metal complexes of metallothionein isoforms I and II. The identification of

these metal complexes show a change of Cd-binding MT I and II stoichiometry between group B and C during Cd exposure, so that it is possible to observe the signals corresponding to MT I and MT II completely metallated with 7 Cd atoms, ( $\text{Cd}_7\text{MT}$ ), with increasing Cd doses, group C. However these signals are not detected in the group B. In this latter case, signals correspond to MT I and II partially metallated with Cd atoms number below 7, which coexist with copper and zinc atoms in the MT molecule, are observed. On the other hand, the results show that affinity of Cd for MT I is higher than that for MT II, so that signals corresponding to MT II complexes with 1–2 atoms of Cd atoms in group B are observed, however these signals are not detected in the signals corresponding to MT I complexes from the same group. In this latter case, signals correspond to MT I complexes with 3–6 Cd atoms are observed. These results provide information about metal-binding stoichiometry of MT and metal cooperative binding, such as the substitution of copper or zinc by cadmium in *M. musculus* liver after short term exposure to high levels of cadmium.

5. The development of metallomic procedures performed in this study are an useful tool for studying the bioavailability and environmental impact of metals in living organisms, by studying different biomolecules related to environmental stress such as metalloproteins (MT), redox enzymes (SOD) and/or metabolites (MMA, DMA) in the bioindicator organism *Mus spretus*. Exposure experiments of the model organism *Mus musculus* to different metals provide information about the bioinduction of biologically relevant biomolecules, as a protection mechanism of living organism against stress caused by metals. Specifically, the Cd exposure experiment in *Mus musculus* allow gaining insight into the mechanisms involved in metal detoxification by MTs, showing the changes in the stoichiometry of metal complexes– MTs isoforms along cadmium exposure. In future research, the study of these metal complexes of metallothioneins may help to elucidate the biological role of metallothioneins in living organisms, such as *Mus musculus*, and the results can be extrapolated to its genetically homologous species, *Mus spretus*.





# BIBLIOGRAFÍA



1. Dekov, V. M., F. Araujo, R. Van Grieken, V. Subramanian (1998). Chemical composition of sediments and suspended matter from the Cauvery and Brahmaputra rivers (India). *The Science of the Total Environment* 212, 89-105.
2. Bernal, M.P., Clemente, R., Vazquez, S., Walker, D.J. (2007) Aplicación de la Fitorremediación a los suelos contaminados por metales pesados en Aznalcóllar. *Revista Ecosistemas* 16, 67-76.
3. Calamari, D. (2002) Assessment of persistent and bioaccumulating chemicals in the aquatic environment. *Toxicology* 181-182, 183-186.
4. Marchini, S. (2002) Aquatic effects assessment: needs and tools. *Ann. Ist. Super Sanita* 38, 119-129.
5. Steinberg, C.E.W., Geyer, H.J., Kettrup, A.A.F. (1994) Evaluation of xenobiotic effects by ecological techniques. *Chemosphere* 28, 357-374.
6. Sheehan D. (1994) Environmental Biochemistry. *Biochemist* Jun/Jul, 34-37.
7. Walker, C.H., Hopkin, S.P., Sibly, R.M., Peakall, D.B. (1997) Principles of Ecotoxicology. Taylor & Francis, London.
8. Ritter, L., Solomon, K., Sibley, P., Hall, K., Keen, P., Mattu, G., Linton, B. (2002) Sources, pathways and relative risks of contaminants in surface water and groundwater: a perspective prepared for the Walkerton inquiry. *J. Toxicol. Environ. Health A* 65, 1-142.
9. Huang, X., Pedersen, T., Fischer, M., White, R., Young, T.M. (2004) Herbicide run off along highways. 2. Sorption control. *Environ. Sci. Technol.* 38, 3272-3278.
10. Hodgson, E. (2004) A Textbook of Modern Toxicology. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey.
11. Montforts, M.H. (2006) Assessment of persistency and bioaccumulation in pesticide registration frameworks within the Organization for Economic Cooperation and Development. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 2, 13-21.



12. Moreno Grau, M.A. (2003) Toxicología Ambiental. Evaluación de riesgo para la salud humana (Ed.) A. García Brage, McGraw-Hill. 384 pp.
13. Moalla, S.M., Awadallah, R.M., Rashed, M.N., Soltan, M.E. (1998) Distribution and chemical fractionation of some heavy metals in bottom sediments of lake Nasser. *Hydrobiologia* 364, 31- 40.
14. Purves, D. (1985) Trace element contamination of the environment. Elsevier, Amsterdam, Pag.260.
15. Forstner, U., Wittman, G.T.W (1981) Metal Pollution in the Aquatic environment (2nd Ed.) Springer – Verlag, Berlin, pag. 486.
16. Sies H. (1986) Biochemistry of oxidative stress. *Angew Chem. Int.* 25,1058-1071.
17. Lopez-Barea, J. (1995) Biomarkers in ecotoxicology: an overview, *Arch. Toxicol. Suppl.* 17, 57- 79.
18. Ruiz -Laguna J., Abril N., Garcia-Barrera T., Gomez-Ariza J.L., Lopez-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.
19. Ruíz-Laguna J, García-Alfonso C, Peinado J, Moreno S, Ieradi LA, Cristaldi M, Lopez-Barea J. (2001) Biochemical biomarkers of pollution in Algerian mouse (*Mus spretus*) to assess the effects of the Aznalcollar disaster on Doñana Park (Spain). *Biomarker* 6, 146–60.
20. Qadir, A., Malik, R.N., Husain, S.Z. (2008) Spatio-temporal variations in water quality of Nullah Aik-tributary of the river Chenab, Pakistan. *Environ Monit. Assess.* 140, 43–59.
21. Qadir, A., Malik, R.N. (2009) Assessment of an index of biological integrity (IBI) to quantify the quality of two tributaries of river Chenab, Sialkot, Pakistan. *Hydrobiologia* 621, 127–153.
22. Burger, J., Gochfeld, M., Sullivan, K., Irons, D. (2007) 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.* 387, 175–184.
23. Cabrera, F., Tocca, C. G., Doaz, E., Arambarri, P. (1984) Acid mine-water and agricultural pollution in a river skirting the Doñana National Park (Guadiamar river, SW Spain). *Water Research* 18, 1469-1482.
  24. Albaiges, J., Algaba, J., Arambarri, P., Cabrera, F., Baluja, G., Hernandez, L.M., Castroviejo, J. (1987) Budget of organic and inorganic pollutants in the Doñana National Park (Spain). *Science of the Total Environment* 63, 13-28.
  25. Arambarri, P., Cabrera, F., González-Quesada, R. (1996) Quality of the surface waters entering the Doñana National Park (SW Spain). *Science of the Total Environment* 191, 185-196.
  26. Gomez-Parra A., Forja J. M., Delvals T. A., Saenz I., Riba I.(2000) Early Contamination by Heavy Metals of the Guadalquivir Estuary After the Aznalcollar Mining Spill (SW Spain) *Marine Pollution Bulletin* 40, 1115-1123.
  27. Millán J., Mateo R., Taggart M.A., López-Bao J.V., Viota M., Monsalve L., Camarero P.R., Blázquez E., Jiménez B. (2008) Levels of heavy metals and metalloids in critically endangered Iberian lynx and other wild carnivores from Southern Spain. *Science of the total environment* 399,193-201.
  28. Nelson C.H., Lamothe P.J. (1993) Heavy metal anomalies in the Tinto and Odiel River and Estuary System, Spain. *Estuaries* 16, 496-511.
  29. Turner J.N., Brewer P.A., Macklin M.G. (2008) 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 . *Science of the total environment* 394, 144-161.
  30. Ruiz Munoz F., Gonzalez Regalado M.L., Muñoz J.M., Fernández Caliani J.C. (1997) Contaminación metálica en los sedimentos litorales del norte de del Golfo de Cádiz (SO de España). *Rev. Sol. Geol. España*, 10, 107-115.



31. Murillo J.M., Marañón T., Cabrera F., Lopez, R. (1999) Accumulation of heavy metals in sunflower and sorghum plants affected by the Guadiamar spill. *The Science of the Total Environment* 242, 281-292.
32. Simon M., Ortiz I., Garcia I., Fernandez E., Fernandez J., Dorronsoro C., Aguilar J. (1999) Pollution of soils by the toxic spill of a pyrite mine Aznalcollar, Spain. *The Science of the Total Environment* 242, 105-115.
33. 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*) *Environmental Monitoring and Assessment* 93, 17–29.
34. Madejón P., Murillo J.M., Marañón T., Cabrera F., López R. (2002) Bioaccumulation of As, Cd, Cu, Fe and Pb in wild grasses affected by the Aznalcollar mine spill (SW Spain). *The Science of the Total Environment* 290,105–120.
35. Madejón P.,Murillo J.M., Marañón T., Cabrera F., Soriano M.A. (2003) Trace element and nutrient accumulation in sunflower plants two years after the Aznalcollar mine spill. *The Science of the Total Environment* 307, 239–257.
36. Taggart M.A., Figuerola J., Green A.J., Mateo R., Deacon C., Osborn D., Meharg A.A. (2006) After the Aznalcollar mine spill: Arsenic, zinc, selenium, lead and copper levels in the livers and bones of five waterfowl species. *Environmental Research* 100, 349–361.
37. Gomez G., Baos R., Gomara B., Jimenez B., Benito V., Montoro R., Hiraldo F., Gonzalez M. J. (2004) 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.* 47, 521-529.
38. Manzano M., Ayora C., Domenech C., Navarrete P., Garralon A., Turrero M.J. (1999) The impact of the Aznalcollar mine tailing spill on Groundwater *The Science of the Total Environment* 242 , 189-209.

39. Martin J.E., Respaldiza M.A., Gonzalez-Labajo J. (2002) The state of the Guadiamar riverbed after the environmental disaster of 1998 analysed by TTPIXE. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 188,102–105.
40. Aurigi S., Focardi S., Hulea D., Renzoni A. (2000) Organochlorine contamination in bird's eggs from the Danube Delta. *Environmental Pollution* 109, 61-67.
41. Clark K. E. , Zhao Y., Kane C. M. (2009) Organochlorine Pesticides, PCBs, Dioxins, and Metals in Postterm Peregrine Falcon (*Falco peregrinus*) Eggs from the Mid-Atlantic States, 1993–1999. *Arch Environ Contam Toxicol* 57, 174–184.
42. Dong Y.H., Wang H., An Q., Ruiz X., Fasola M., Zhang Y.M. (2004) Residues of organochlorinated pesticides in eggs of water birds from Tai Lake in China. *Environmental Geochemistry and Health* 26, 259–268.
43. Albaiges J., Algaba J.(1987) Budget of organic and inorganic pollutants in the Doñana National Park (Spain) *The Science of the Total Environment* 63, 1-28.
44. Hernandez M., Gonzalez L.M., Oria J., Sanchez R., and Arroyo B. (2008) Influence of contamination by organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls on the breeding of the spanish imperial eagle (*Aquila Adalberti*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 433–441.
45. Walker, C.H. (1998) The Use of Biomarkers to Measure the Interactive Effects of Chemicals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 40, 65-70.
46. Mumtaz, M.M., Tully, D.B., El-Masri, H.A., De Rosa, C.T. (2002) Gene induction studies and toxicity of chemical mixtures. *Environ. Health Perspect.* 110, 947-956.
47. Adedeji O.B., Okerentugba P.O., Okonko I.O.(2012) Use of Molecular, Biochemical and Cellular Biomarkers in Monitoring Environmental and Aquatic Pollution. *Nature and Science* 10, 83-104.
48. Fossi MC. (1994) Nondestructive biomarkers in ecotoxicology. *Environ Health Perspect* 102,49–54.



49. Gygi, S.P., Aebersold, R. (2000) Mass spectrometry and proteomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4, 489-494.
50. Snape, J.R., Maund, S.J., Pickford, D.B., Hutchinson, T.H. (2004) Ecotoxicogenomics: the challenge of integrating genomics into aquatic and terrestrial ecotoxicology. *Aquat. Toxicol.* 67, 143-154.
51. Ye, R. W., Wang, T., Bedzyk, L., Croker, K. M. (2001). Applications of DNA microarrays in microbial systems. *J. Microbiol. Methods* 47, 257–272.
52. Horak, C. E., Snyder, M. (2002). Global analysis of gene expression in yeast. *Funct. Integr. Genomics* 2, 171–180.
53. 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.
54. Tainer J.A., Roberts V.A., Getzoff E.D. (1991) Metal-binding sites in proteins *Curr. Opin. Biotechnol.* 2, 582-591.
55. Bettmer J., Montes Bayon M., Ruiz Encinar J., Fernández Sánchez M.L., Fernández de la Campa M.R., Sanz Medel A.(2009) The emerging role of ICP-MS in proteomic analysis. *J. Proteomics*, 72, 989-1005.
56. Williams R.J.P. (2001) Chemical selection of elements by cells *Coord. Chem. Rev.* 216–217, 583–595
57. Hall, J. L. (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* 53, 1–11.
58. Rahman, K. (2007) Studies on free radicals, antioxidants and co-factors. *Clin. Interv. Aging* 2, 219-236.
59. Matés J.M., Pérez-Gómez C., Núñez de Castro I., Asenjo M., Mázquez J. (2002) Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34, 439-458.
60. Szpunar, J. (2004) Metallomics: a new frontier in analytical chemistry. *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 54-56.

61. Koppenaal D.W., Hieftje G.M. (2007) Metallomics - An Interdisciplinary and Evolving Field. *J. Anal. At. Spectrom.* 22, 855.
62. Mounicou S., Szpunar J., Lobinski R. (2009) Metallomics: the concept and methodology. *Chem. Soc. Rev.* 38, 1119-1138.
63. Szpunar, J. (2000) Bio-inorganic speciation analysis by hyphenated techniques. *Analyst* 125, 963–988.
64. Szpunar, J. (2005) Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics. *Analyst* 130, 442–465.
65. Bertini, I., Cavallaro, G. (2008) Metals in the “omics” world: copper homeostasis and cytochrome c oxidase assembly in a new light. *J. Biol. Inorg. Chem.* 13, 3–14.
66. Sanz-Medel A. (2008) Heteroatom(isotope)-tagged genomics and proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 390, 1-2.
67. Gomez-Ariza J.L., Garcia-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.
68. Szpunar J., Lobinski R., Prange A. (2003) Hyphenated techniques for elemental speciation in biological systems. *Appl. Spectrosc.* 57, 102A–112A.
69. A. Sanz-Medel, From metalloproteomics to heteroatom-tagged proteomics. (2005) *Anal. Bioanal. Chem.* 381, 1–2.
70. Gonzalez-Fernandez M., Garcia-Barrera T., Arias-Borrego A., Bonilla- Valverde D., Lopez-Barea J., Pueyo C., Gomez-Ariza J.L.(2008) Metal-binding molecules in the organs of *Mus musculus* by size-exclusion chromatography coupled with UV spectroscopy and ICP-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 390, 17–28.
71. García-Sevillano M.A., González-Fernández M., Jara-Biedma R., García-Barrera T., Pueyo C., López- Barea J., 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, 1967-1981.
72. Fiehn O., Kopka J., Dörmann P., Altmann T., Trethewey R.N., Willmitzer L. (2000) Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nat. Biotechnol.* 18, 1157-1161.
73. Ge R, Sun X, He QY. (2011) Overview of the metallometabolomic methodology for metal-based drug metabolism. *Curr. Drug Metab.* 12, 287-99.
74. Timerbaev A.R. (2012) Determination of Metal Species in Biological Samples: From Speciation Analysis to Metallomics. *Journal of Analytical Chemistry* 67,179–185.
75. 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, 123–138.
76. Tanzarella C., Degrassi F., Cristaldi M., Moreno S., Lascialfari A., Chiuchiarelli G., Ieradi L.A. (2001) Genotoxic damage in free living Algerian mouse (*Mus Spretus*) after the Coto Doñana ecological disaster *Environmental pollution* 115, 43-48.
77. 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.
78. Gonzalez-Fernandez M., Garcia-Barrera T., Jurado J., Prieto- Alamo M. J., Pueyo C., Lopez-Barea J., Gómez-Ariza J. L.(2008) Integrated application of transcriptomics, proteomics, and metallomics in environmental studies, *Pure Appl. Chem.* 80, 2609–2626.
79. Hegde, P. S., White, I. R., Debouck, C. (2003) Interplay of transcriptomics and proteomics. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14, 647–651.

80. Mootha VK, Bunkenborg J, Olsen JV, Hjerrild M, Wisniewski JR, Stahl E, Bolouri MS, Ray HN, Sihag S, Kamal M, Patterson N, Lander ES, Mann M. (2003) Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria. *Cell* 115, 629–640.
81. Mootha VK, Lepage P, Miller K, Bunkenborg J, Reich M, Hjerrild M, Delmonte T, Villeneuve A, Sladek R, Xu F, Mitchell GA, Morin C, Mann M, Hudson TJ, Robinson B, Rioux JD, Lander ES. (2003) Identification of a gene causing human cytochrome c oxidase deficiency by integrative genomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 605–610.
82. Alter, O., Golub, G. H. (2004). Integrative analysis of genomescale data by using pseudoinverse projection predicts novel correlation between DNA replication and RNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 16577–16582.
83. García-Barrera T., Gómez-Ariza J.L., González- Fernández M., Moreno F., García-Sevillano M.A., Gómez- Jacinto V. (2012) *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403, 2237-2253.
84. Mounicou S., Szpunar J., Lobinski R. (2010) Inductively-coupled plasma mass spectrometry in proteomics, metabolomics and metallomics studies. *European Journal of Mass Spectrometry* 16, 243-253.
85. Marchante-Gayón J.M., Sariego Muñiz C., García Alonso J.I., Sanz-Medel A. (1999) Multielemental trace analysis of biological materials using double focusing inductively coupled plasma mass spectrometry detection. *Analytical Chimica Acta* 400, 307–320.
86. Sanz-Medel A. (1998) Trace element analytical speciation in biological systems: Importance, challenges and trends. *Spectrochim. Acta B*, 53, 197-211.
87. Bettmer J. (2005) Metalloproteomics: a challenge for analytical chemists. *Anal. Bioanal. Chem.* 383, 370-371.
88. Sanz Medel A., Montes-Bayon M., Luisa Fernández S.M. (2003). Trace element speciation by ICP-MS in large biomolecules and its potential for proteomics. *Anal. Bioanal. Chem.* 377, 236-247.



89. Lobinski R., Moulin C., Ortega R. (2006) Imaging and speciation of trace elements in biological elements environment *Biochemie* 88, 1591- 1604.
90. Andreini C., Bertini I., Rosato A.(2004) A hint to search for metalloproteins in gene banks. *Bioinformatics* 20, 1373-1380.
91. Shi W., Chance M. R. (2008) Metallomics and metalloproteomics *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 3040 – 3048.
92. Dowsey, A.W., Dunn, M.J., Yang, G.Z. (2003) The role of bioinformatics in two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 3, 1567-1596.
93. Liebler, D.C. (2002) Proteomic approaches to characterize protein modifications: new tools to study the effects of environmental exposures. *Environ. Health Perspect.* 110, 3-9.
94. International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409, 860-921.
95. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, 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 AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, 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 ML, 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 YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigó R, Campbell MJ, Sjolander KV, 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 YH, 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(5507), 1304-1351.
96. Ishii, N., Tomita, M. (2009) Multi-omics data-driven systems biology of *E. coli*. In *Systems Biology and Biotechnology of Escherichia coli*. 41–57. Edited by S. Y. Lee, Dordrecht, Netherlands: Springer.
97. Kandpal, R., Saviola, B., Felton, J. (2009) The era of omics unlimited. *Biotechniques* 46, 351–355.
98. Blackstock W.P., Weir M. P. (1999) Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol.* 17, 121-127.
99. Anderson N. L., Anderson N. G. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. (1998) *Electrophoresis* 19, 1853-1861.



100. Gygi, S.P., Aebersold, R. (2000) Mass spectrometry and proteomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4, 489- 494.
101. Singh, O. V., Nagaraj, N. S. (2006) Transcriptomics, proteomics and interactomics: unique approaches to track the insights of bioremediation. *Brief. Funct. Genomic Proteomic* 4, 355–362.
102. Watson H.C. (1969) The stereochemistry of the protein Myoglobin. *Prog. Stereochem.* 4, 299-333.
103. Andreini C. , Bertini I., Cavallaro G. , Holliday G. L., Thornton J. M. (2008b) Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles. *J. Biol. Inorg. Chem.* 13, 1205-1218.
104. Frassinetti S, Bronzetti G, Caltavuturo L, Cini M, Croce CD. (2006) The role of zinc in life: a review. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 25, 597-610.
105. Zhang Y, Gladyshev V.N. (2011) Comparative genomics of trace element dependence in biology. *J. Biol. Chem.* 286, 23623-23629.
106. Coleman JE. (1992) Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 897-946.
107. Mendel RR, Smith AG, Marquet A, Warren MJ. (2007) Metal and cofactor insertion. *Nat. Prod. Rep.* 24, 963-971.
108. Sukdeo N, Clugston SL, Daub E, Honek JF. (2004) Distinct classes of glyoxalase I: metal specificity of the *Yersinia pestis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Neisseria meningitidis* enzymes. *Biochem. J.* 384, 111-117.
109. Finney LA, O'Halloran TV (2003) Transition metal speciation in the cell: Insights from the chemistry of metal ion receptors. *Science* 300, 931–936.
110. Outten CE, O'Halloran TV (2001) Femtomolar sensitivity of metallo-regulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science* 292, 2488–2492.
111. Frausto da Silva J. J. R., Williams R. J. P. (2001) *The Biological Chemistry of The Elements: The Inorganic Chemistry of Life*. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press.

112. Mounicou, S., Lobinski, R. (2008) Challenges to metallomics and analytical chemistry solutions. *Pure Appl. Chem.* 80, 2565-2575.
113. Salt, D. E. (2004) Update on Plant Ionomics *Plant Physiol.* 136, 2451–2456.
114. Sanz-Medel, A. (2004) Entering Proteomics from Trace Element Speciation Research, *International Symposium Analytical Forum* 4–8 July, Warsaw, Poland.
115. Haraguchi H. (2004) Metallomics as integrated biometal science. *J. Anal. At.Spectrom.* 19,5–14.
116. Gygi, S. P., Rochon, Y., Franza, B. R., Aebersold, R. (1999) Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* 19, 1720–1730.
117. Hu L., He B., Wang Y., Jiang G., Sun H. (2013) Metallomics in environmental and health related research: Current status and perspectives. *Chin Sci Bull* 58, 169-176.
118. Esteban-Fernández D., Moreno-Gordaliza E., Cañas B., Palacios M. A., Gómez-Gómez M. M. (2010) Analytical methodologies for metallomics studies of antitumor Pt-containing drugs. *Metallomics* 2, 19–38.
119. Casiot C., Szpunar J., Lobinski R., Potin-Gautier M. (1999) Sample preparation and HPLC separation approaches to speciation analysis of selenium in yeast by ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* 14, 645–650.
120. Rodríguez-Cea A., Fernández de la Campa M. R., Blanco González E., Andón Fernández B., Sanz-Medel A. (2003) Metal speciation analysis in eel metallothioneins by anion exchange FPLC-isotope dilution-ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* 18, 1357–13664.
121. Del Castillo Busto M.E., 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, 8218-8226.
122. Ouerdane L., Mari S., Czernic P., Lebrun M., Lobinski R. (2006) Speciation of noncovalent nickel species in plant tissue extracts by electrospray Q-TOFMS/MS



- after their isolation by 2D size exclusion-hydrophilic interaction LC (SEC-HILIC) monitored by ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* 21, 676-683.
123. Sanz-Medel A. (2010) ICP-MS for multiplex absolute determinations of proteins. *Anal. Bioanal. Chem.* 398, 1853–1859.
124. Li Y F, Chen C, Qu Y, Gao Y., Li B., Zhao Y., Chai Z. (2008) Metallomics, elementomics, and analytical techniques. *Pure Appl. Chem.* 80, 2577–2594.
125. Sussulini A, Becker JS (2011) Combination of PAGE and LA-ICP-MS as an analytical workflow in metallomics: State of the art, new quantification strategies, advantages and limitations. *Metallomics* 3, 1271–1279.
126. Claverie F, Pécheyran C, Mounicou S, Ballihaut G., Fernandez B, Alexis J., Lobinski R., Donard O.F.X. (2009) Characterization of the aerosol produced by infrared femtosecond laser ablation of polyacrylamide gels for the sensitive inductively coupled plasma mass spectrometry detection of selenoproteins. *Spectrochim Acta Part B*, 64, 649–658.
127. Ballihaut G, Claverie F, Pecheyran C, Mounicou S, Grimaud R, Lobinski R. (2007) Sensitive detection of selenoproteins in gel electrophoresis by high repetition rate femtosecond laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Chem.* 79, 6874–6880.
128. Salekdeh, G. H., Siopongco, J., Wade, L. J., Ghareyazie, B., Bennett J. (2002) Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *Proteomics* 2, 1131–1145.
129. Pergantis, S. A., Cullen, W. R., Eigendorf, G. K. (1994) Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry for the Analysis of Organoarsenic Compounds of Environmental Interest. *Biol. Mass Spectrom.* 23, 749–755.
130. Jara-Biedma R., González-Dominguez R., García-Barrera T., Lopez-Barea J., Pueyo C., Gómez-Ariza J. L. (2013) Evolution of metallotionein isoforms complexes in hepatic cells of *Mus musculus* along cadmium exposure *Biometals* 26, 639–650.

131. 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, 2779–2783.
132. Pioselli B, Munro C, Raab A, Deitrich CL, Songsrirote K, Feldmann J, Thomas-Oates J (2009) Denaturing and non-denaturing microsolution isoelectric focussing to mine the metalloproteome. *Metallomics* 1, 501–510.
133. Da Silva M. AO, Sussulini A., Arruda M. AZ. (2010) Metalloproteomics as an interdisciplinary area involving proteins and metals. *Expert Rev. Proteomics* 7, 387-400.
134. Mataveli LR, Fioramonte M, Gozzo FC, Arruda MA (2012) Improving metallomics information related to transgenic and non-transgenic soybean seeds using 2D-HPLC-ICP-MS and ESI-MS/MS. *Metallomics* 4, 373-378.
135. Mena M. L., Moreno-Gordaliza E., Moraleja I., Cañas B., Gómez-Gómez M. M. (2011) OFF GEL isoelectric focusing and polyacrylamide gel electrophoresis separation of platinum-binding proteins *J. Chromatogr. A.* 1218, 1281–1290.
136. Chassaigne H, Chery C C, Bordin G, Vanhaecke F., Rodriguez A.R. (2004) 2-Dimensional gel electrophoresis technique for yeast selenium-containing protein sample preparation and MS approaches for processing 2-D gel protein spots. *J. Anal. At. Spectrom.* 19, 85–95.
137. Becker J S, Lobinski R, Becker J S. (2009) Metal imaging in nondenaturing 2D electrophoresis gels by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) for the detection of metalloproteins. *Metallomics* 1, 312–316.
138. Gómez-Ariza JL, Zeini Jahromi E, Gonzalez-Fernández M, García-Barrera T, Gailer J (2011) Liquid Chromatography inductively coupled plasma-based spectrometry metallomics approaches to probe health relevant interactions between xenobiotics and mammalian organisms. *Metallomics* 3, 566-577.
139. Gao Y, Chen C, Chai Z F. (2007) Advanced nuclear analytical techniques for metalloproteomics. *J. Anal. At. Spectrom.* 22, 856–866.



140. Chen C, Chai Z F, Gao Y. (2010) Nuclear Analytical Techniques for Metallomics and Metalloproteomics. Cambridge: Royal Society of Chemistry.
141. Kim A M, Vogt S, O'Halloran TV, Woodruff T. K. (2010) Zinc availability regulates exit from meiosis in maturing mammalian oocytes. *Nat. Chem. Biol.* 6, 674–681.
142. Korbas M, Blechinger SR, Krone PH, Pickering IJ, George GN (2008) Localizing organomercury uptake and accumulation in zebrafish larvae at the tissue and cellular level. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 12108–12112.
143. Paulsen H, Schunemann V, Trautwein A X, Winkler H. (2005) Mössbauer studies of coordination compounds using synchrotron radiation. *Coord. Chem. Rev.* 249, 255–272.
144. Ascone I, Strange R. (2009) Biological X-ray absorption spectroscopy and metalloproteomics. *J. Synchrotron Radiat.* 16, 413–421.
145. Andreini C, Bertini I, Rosato A. (2009) Metalloproteomes: bioinformatic approach. *Acc. Chem. Res.* 42, 1471–1479.
146. Livingstone D.R., Kirchin M.A., Wiseman A. (1989) Cytochrome P-450 and oxidative metabolism in molluscs. *Xenobiotica* 19, 1041-1062.
147. Peakall D. (1994) Biomarkers: the way forward in environmental assessment. *Toxicol. Ecotoxicol. News* 1, 55-60.
148. Livingstone D.R (1993) Biotechnology and Pollution Monitoring: Use of Molecular Biomarkers in the Aquatic Environment. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 57, 195-211.
149. Van Gestel CAM, Van Brummelen TC (1996) Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology* 5, 217-225.
150. Lowe WR, Kendall RJ (1990) Sentinels species and sentinel bioassay. *Biomarkers of Environmental Contamination*. McCarthy JF, Shugart LR. Boca Raton, Lewis Publishers, 309-331.

151. Talmage, S.S., Walton, B.T. (1991) Small mammals as monitors of environmental contaminants. *Review of Environmental Contamination and Toxicology* 119, 47-108.
152. Tull-Singleton, S., Kimball, S., McBee, K. (1994) Correlative analysis of heavy metal bioconcentration and genetic damage in white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) from hazardous waste site. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 52, 667-672.
153. Ieradi, L.A., Mascanzoni, D., Mattei, T. (1991) Environmental impact of the Chernobyl accident: mutagenesis in Bank voles from Sweden. *International Journal of Radiation Biology* 59, 31-40.
154. McBee, K., Bickham, J.W. (1988) Petrolchemical related DNA damage in wild rodents detected by flow cytometry. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 40, 343-349.
155. Cristaldi, M., D'Arcangelo, E., Ieradi, L.A., Mascanzoni, D., Mattei, T., Van Axel Castelli, I. (1990) <sup>137</sup>Cs determination and mutagenicity tests in wild *Mus musculus* domesticus before and after the Chernobyl accident. *Environmental Pollution* 64, 1-9.
156. 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. (2012) Speciation of arsenic metabolites in the free-living mouse *Mus spretus* from Doñana National Park used as a bio-indicator for environmental pollution monitoring *Chemical Papers* 66, 914-924.
157. Gonzalez-Fernandez M., García-Sevillano M. A., Jara-Biedma R., García-Barrera T., Vioque A., Lopez-Barea J., Pueyo C., Gomez-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.
158. Nunes, A. C., Mathias, M. L., Crespo, A. M. (2001) Morphological and haematological parameters in the Algerian mouse (*Mus spretus*) inhabiting an area contaminated with heavy metals. *Environ. Pollut.* 113, 87-93.



159. Cagnin, M., Moreno, S., Aloise, G., Garofalo, G., Villafuerte, R., Gaona, P., Cristaldi, M. (1998) A comparative study of Spanish and Italian terrestrial small mammal coenoses of different biotopes in Mediterranean Peninsular tip regions. *Journal of Biogeography* 25, 1105-1113.
160. Camacho, J., Moreno, S. (1989) Datos sobre la distribución espacial de micromamíferos en el Parque Nacional de Doñana. *Doñana, Acta Vertebrata* 16, 239-245.
161. Ieradi, L.A., Cristaldi, M., Mascanzoni, D., Cardarelli, E., Grossi, R., Campanella, L. (1996) Genetic damage in urban mice exposed to traffic pollution. *Environmental Pollution* 92, 323–328.
162. Ieradi, L. A., Moreno, S., Bolivar, J. P., Cappai, A., DI Benedetto, A., Cristaldi, M. (1998) Free-living rodents as bioindicators of genetic risk in natural protected areas. *Environmental Pollution* 102, 265–268.
163. Palomo J., Gisbert J., Blanco J. C. (2007) Atlas y libro rojo de los mamíferos terrestres de España. Organismo Autónomo Parques Nacionales, Madrid, 464-466.
164. Moreno, S. (1998), Roedores. In Blanco J.C. (Ed.) *Mamíferos de España, vol. II* (Madrid: Editorial Planeta), 166–273.
165. 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. *PhD thesis* (Universidad Autónoma de Madrid), 249.
166. Ruiz-Laguna J., Abril N., Prieto-Álamo M.J., López-Barea J., Pueyo C.(2005) Tissue, Species, and Environmental Differences in Absolute Quantities of Murine mRNAs Coding for Alpha, Mu, Omega, Pi and Theta Glutathione S-Transferases. *Gene Expression* 12, 165-176.
167. Meraz Ríos M.A., Sánchez Torres C. (2001) *Animales modificados genéticamente: La herramienta del futuro*) Revista digital universitaria. 1, 1-24.

168. Timbrell J. (2001) Principles of Biochemical Toxicology. London. Taylor and Francis.
169. Timbrell J.A., Draper R., Waterfield C.J. (1994) Biomarkers in Toxicology. New uses for some old molecules. *Toxicol. Ecotoxicol. News* 1, 4-14.
170. Sorensen M., Autrup H., Moller P., Hertel O., Jensen SS, Vinzents P., Knudsen L.E., Loft S. (2003) Linking exposure to environmental pollutants with biological effects. *Mutat. Res.* 544, 255-271.
171. Timbrell J.A. (1998) Biomarkers in toxicology. *Toxicology* 129, 1-12.
172. Gradjean P., Brown S.S., Reavey P., Young D.S. (1994) Biomarkers of chemical exposure: state of the art. *Clin. Chem.* 40, 1360-1362.
173. Wu R.S., Siu W.H., Shin P.K. (2005) Induction, adaptation and recovery of biological responses: Implications for environmental monitoring. *Marine Pollut. Bull.* 51, 623-634.
174. Cajaraville M.P., Bebianno M.J., Blasco J., Porte C., Sarasquete C., Viarengo A. (2000) The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci. Total Environ.* 247, 295-311.
175. Van der Oost R., Beyer J., Vermeulen N.P.E. (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol* 13, 57-149.
176. Buhler, D.R., Williams, D.E. (1988). The role of biotransformation in the toxicity of chemicals. *Aquat. Toxicol.* 11, 19-28.
177. López-Barea, J., Pueyo, C. (1998) Mutagen content and metabolic activation of promutagens by molluscs as biomarkers of marine pollution. *Mutat. Res.* 399, 3-15.
178. Okey, A.B. (1990). Enzyme induction in the cytochrome P-450 system. *Pharmacol Ther* 45, 241-298.



179. Goksoyr, A. (1995) Use of cytochrome P450 1A (CYP1A) in fish as a biomarker of aquatic pollution. *Arch. Toxicol. Suppl.* 17, 80-95.
180. Hodgson E. (2004) *A Textbook of Modern Toxicology*. Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons.
181. Hayes JD, Pulford DJ. (1995) The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit.Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30, 445-600.
182. Hahn ME. (1998) The aryl hydrocarbon receptor: a comparative perspective. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 121, 23-53.
183. Frova, C. (2006) Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives. *Biomol. Eng.* 23, 149-169.
184. Ouaiissi, A., Ouaiissi, M., Sereno, D. (2002). Glutathione S transferases and related proteins from pathogenic human parasites behave as immunomodulatory factors. *Immunol. Lett.* 81, 159-164.
185. Ketterer, B.(2001) A bird's eye view of the glutathione transferase field. *Chem. Biol. Interact.* 138, 27-42.
186. Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M., Dowd, C.A. (2001) Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J.* 360, 1-16.
187. Ranganathan, S., Ciaccio, P.J., Tew, K.D. (1993) Principles of drug modulation applied to gultathione-S-transferases., in: Tew KD, P.C., Mantle Tj, Mannervik B, Hayes JD (Ed.), *Structure and Function of Glutathione Transferases*. Boca Raton, CRC Press, 249-256.
188. Kruk, I. (1998) *Environmental Toxicology and Chemistry of Oxygen Species*. Berlin, Springer-Verlag.
189. Winston, G.W., Di giulio, R.T. (1991) Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicol* 19, 137-161.

190. Fridovich I. (1989) Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J. Biol. Chem.* 264, 7761-7764.
191. Thannickal VJ, Fanburg BL (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 279, L1005-28
192. Halliwell B. (1996) Antioxidants in human health and disease. *Annu. Rev. Nutr.* 16, 33-50.
193. Kohen R, Nyska A (2002) Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol. Pathol.* 30, 620-650.
194. Rodríguez-Ariza, A., Alhama, J., Díaz-Mendez, F.M., 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.* 438, 97-107.
195. Brown, R.K., Kelly, F.J.(1996) Peroxides and others products. Free Radicals: a Practical Approach. PUNCHARD NA, Kelly FJ. Oxford, IRL Press, 119-131.
196. Gutteridge, J.M., Halliwell, B. (1990) The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem. Sci.* 15, 129-135.
197. Pedrajas, J.R., Gavilanes, F., López-Barea, J., Peinado, J. (1998) Incubation of superoxide dismutase with malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal forms new active isoforms and adducts. An evaluation of xenobiotics in fish. *Chem. Biol. Interact.* 116, 1-17.
198. González-Fernández 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 *Current Analytical Chemistry* 9, 229-243.
199. Garcia-Sevillano M.A., Jara-Biedma R., González-Fernández M., Garcia-Barrera T., Gómez-Ariza J.L. (2013) Metal interactions in mice under environmental stress *Biometals* 26, 651–666.



200. Wassmann S, Wassmann K, Nickenig G. (2004) Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension* 44, 381-386.
201. Nordberg J, Arnér ES (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 1287-312.
202. Solé, M., Porte, C., Albaigés, J. (1995) Seasonal variation in the mixed-function oxygenase system and antioxidant enzymes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environ. Toxicol. Chem.* 14, 157- 164.
203. Capdevila M, Atrian S (2011) Metallothionein protein evolution: a miniassay. *J. Biol. Inorg. Chem.* 16, 977-989.
204. Hamer DH (1986) Metallothionein. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 913-951.
205. Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM (2002) Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol. Life Sci.* 59, 627-647.
206. Capdevila M., Palacios O., Atrian S. (2010) The Zn- or Cu-Thionein Character of a Metallothionein Determines Its Metal Load When Synthesized in Physiological (Metal-Unsupplemented) Conditions. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 1-6.
207. Margoshes M., Vallee B. L. (1957) A cadmium protein from equine kidney cortex *J. Am. Chem. Soc.* 79, 4813-4814.
208. Kagi JH, Valee BL. (1960) Metallothionein: a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. *J. Biol. Chem.* 235, 3460-3465.
209. Kägi, J.H.R., Kojima, Y. (Ed) (1987) "Chemistry and Biochemistry of metallothionein. Metallothionein II." Birkhäuser Verlag, Basel.
210. Nordberg M, Nordberg GF, Piscator M. (1975) Isolation and characterization of a hepatic metallothionein from mice. *Environ. Physiol. Biochem.* 5, 396-403.
211. Romero-Isart N, Vasák M (2002) Advances in the structure and chemistry of metallothioneins. *J. Inorg. Biochem.* 88, 388-396.

212. C.A. Blindauer , O.I. Leszczyszyna (2010) Metallothioneins: unparalleled diversity in structures and functions for metal ion homeostasis and more. *Nat. Prod. Rep.* 27, 720-741.
213. Zangger K., Öz G., Otvos J.D., Armitage I. M. (1999) Three-dimensional solution structure of mouse [Cd<sub>7</sub>]-metallothionein-1 by homonuclear and heteronuclear NMR spectroscopy *Protein Science* 8, 2630–2638.
214. Nielson K.B., Atkin C.L., Winge D.R. (1985) Distinct Metal-binding Configurations in Metallothione. *The Journal of Biological Chemistry* 260, 5342-5350.
215. Bofill R., Palacios O., Capdevila M., Colsb N., González-Duarte R., Atrian S., González-Duarte P.(1999) A new insight into the Ag<sup>+</sup> and Cu<sup>+</sup> binding sites in the metallothionein β domain. *Journal of Inorganic Biochemistry* 73, 57-64.
216. Capdevila M., Cols N., Romero-Isart N., González-Duarte R., Atrian S., González-Duarte P. (1997) Recombinant synthesis of mouse Zn<sub>3</sub>-β and Zn<sub>4</sub>-α metallothionein 1 domains and characterization of their cadmium(II) binding capacity. *Cellular and Molecular Life Sciences* 53, 681-668.
217. Zelazowski A. J., Piotrowski J. K. (1977) The levels of metallothionein-like proteins in animal tissues. *Experientia* 33,1624-1625.
218. Onosaka S, Tanaka K, Cherian M G (1984) Effects of cadmium and zinc on tissue levels of metallothionein. *Environ. Health Perspect.* 54, 67–72.
219. Okabe M., Yama K., Kurasaki M., Yamasaki F., Aoyagi K., Yamanoshita O., Sato S., Okui T., Oi-Rama T., Kasai N. (1996) Direct Visualization of Copper-Metallothionein in LEC Rat Kidneys: Application of Autofluorescence Signal of Copper-Thiolate Cluster *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 44, 865-873.
220. Palmiter R D, Findley S D, Whitmore T E, Durnam DM. (1992) MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6333-6337.



221. Uchida, Y., Takio K., Titani K., Ihara Y., Tomonaga M. (1991) The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron* 7, 337-347.
222. Quaife, C.J., Findley, S.D., Erickson, J.C., Froelick, G.J., Kelly, E.J., Zambrowicz, B.P., Palmiter, R.D. (1994) Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. *Biochemistry* 33, 7250-7259.
223. Cherian M.G., Yu S., Redman C.M. (1981) Site of synthesis of metallothionein in rat liver. *Canad. J. Biochem.* 59, 301-306.
224. Riordan J.R., Richards V.(1980) Human fetal liver contains both zinc and copper rich forms of metallothionein. *J. Biol. Chem.*, 255, 5380-5383.
225. Vela, J., Hidalgo, J., González, B., Castellano, B. (1997) Induction of metallothionein in astrocytes and microglia in the spinal cord from the myelin-deficient jimpy mouse. *Brain Res.* 767, 345-355.
226. Pedersen M., Larsen A., Stoltenberg M., Penkowa M. (2009) The role of metallothionein in oncogenesis and cancer prognosis. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* 44, 29-64.
227. Shahidul Islam MD., Loots D.T.(2007) Diabetes, metallothionein, and zinc interactions: A review *BioFactors* 29, 203-212.
228. Meloni G., Sonois V., Delaine T., Guilloureau L., Gillet A., Teissié J., Faller P., Vašák M. (2008) Metal swap between Zn<sub>7</sub>-metallothionein-3 and amyloid-β-Cu protects against amyloid-β toxicity. *Nature -Chemical Biology* 4, 366-372.
229. Klaassen CD, Liu J, Choudhuri S.(1999) Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 267-294.
230. Cherian MG, Howell SB, Imura N, Klaassen CD, Koropatrick J, Lazo JS, Waalkes MP (1994) Role of metallothionein in carcinogenesis *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 126, 1-5.
231. Iszard MB, Liu J, Klaassen CD. (1995) Effect of several metallothionein inducers on oxidative stress defense mechanisms in rats. *Toxicology* 104, 25-33.

232. Feng W, Cai J, Pierce WM, Franklin RB, Maret W, Benz FW, Kang YJ (2005) Metallothionein transfers zinc to mitochondrial aconitase through a direct interaction in mouse hearts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332, 853-858.
233. Maret W., Larsen K.S., Vallee B.L. (1997) Coordination dynamics of biological zinc “clusters” in metallothioneins and in the DNA-binding domain of the transcription factor Gal4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 2233–2237.
234. Maret W, Jacob C, Vallee BL, Fischer EH (1999) Inhibitory sites in enzymes: zinc removal and reactivation by thionein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 1936-1940.
235. Pulido P, Kägi JH, Vallee BL. (1966) Isolation and some properties of human metallothionein. *Biochemistry* 5, 1768-1777.
236. Kelly EJ, Quaife CJ, Froelick GJ, Palmiter RD (1996) Metallothionein I and II protect against zinc deficiency and zinc toxicity in mice *The Journal of Nutrition* 126, 1782-1790.
237. Chiaverini N, De Ley M. (2010) Protective effect of metallothionein on oxidative stress-induced DNA damage. *Free Radic. Res.* 44, 605-613.
238. Liu J., Liu Y., Habeebu S. S., Klaassen C. D. (1998) Susceptibility of MT-Null Mice to Chronic CdCl<sub>2</sub>-Induced Nephrotoxicity Indicates That Renal Injury Is Not Mediated by the CdMT Complex *Toxicological Sciences* 46, 197–203.
239. Blalock TL, Dunn MA, Cousins RJ. (1988) Metallothionein gene expression in rats: Tissue-specific regulation by dietary copper and zinc. *J. Nutr.* 118, 222–228.
240. Saito S, Okabe M, Kurasaki M. (1998) Role of metallothionein on Zn, Cu, and Cd accumulation in rat liver after heavy metal injection. *Trace Elem. Electrolytes* 15, 58–64.
241. Palmiter RD (1994) Regulation of metallothionein genes by heavy metals appears to be mediated by a zinc-sensitive inhibitor that interacts with a constitutively active transcription factor, MTF-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91,1219-1223.
242. Goenaga Infante H., Van Campenhout K., Blust R., Adamsa F. C. (2006) Anion-exchange high performance liquid chromatography hyphenated to inductively



- coupled plasma-isotope dilution-time-of-flight mass spectrometry for speciation analysis of metal complexes with metallothionein isoforms in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) exposed to environmental metal pollution. *Journal of Chromatography A*, 1121, 184–190.
243. Serafim, M.A., Bebianno, M.J. (2001) Variation of metallothionein and metal concentrations in the digestive gland of the clam *Ruditapes decussatus*: sex and seasonal effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 544–552.
244. Bebianno, M.J., Serafim, M.A. (2003) Variation of metallothionein and metal concentrations in a natural clam population of *Ruditapes decussatus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 44, 53–56.
245. Bebianno, M.J., Cravo, A., Miguel, C., Morais, S. (2003) Metallothionein concentrations in a population of *Patella aspera*: variation with size. *Sci. Total Environ.* 301, 151–161.
246. Smaoui-Damak, W., Hamza-Chaffai, A., Bebianno, M.J., Amiard, J.C. (2004) Variation of metallothioneins in gills of the clam *Ruditapes decussatus* from the Gulf of Gabe's (Tunisia). *Comp. Biochem. Physiol. C* 139, 181–188.
247. Ivankovic, D., Pavicic, J., Erk, M., Filipovic-Marijic, V., Raspor, B. (2005) Evaluation of the *Mytilus galloprovincialis* Lam. digestive gland metallothionein as a biomarker in a long-term field study: seasonal and spatial variability. *Mar. Pollut. Bull.* 50, 1303–1313.
248. Marie V., Gonzalez P., Baudrimont M., Bourdineaud J., Boudou A. (2006) Metallothionein response to cadmium and zinc exposures compared in two freshwater bivalves, *Dreissena polymorpha* and *Corbicula fluminea*. *BioMetals* 19, 399–407.
249. Goenaga Infante H., Cuyckens F., Campenhout K., Blust R., Claeys M., Vaecka L., Adams F. C. (2004) Characterization of metal complexes with metallothioneins in the liver of the carp *Cyprinus carpio* by reversed-phase HPLC with ICP-MS and electrospray ionization (ESI)-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* 19, 159 – 166.

250. França Malteza H., Villanueva Tagle M., Fernández de la Campa M., Sanz-Medel A. (2009) Metal–metallothioneins like proteins investigation by heteroatom-tagged proteomics in two different snails as possible sentinel organisms of metal contamination in freshwater ecosystems. *Analytica Chimica Acta* 650, 234–240.
251. Wlostowski, T., Bonda, E., Krasowska, A. (2004) Photoperiod affects hepatic and renal cadmium accumulation metallothionein, and cadmium toxicity in the wild bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Ecotox. Environ. Safe.* 58, 29–36.
252. Suzuki, K., Someya, A., Komada, Y., Ogra, Y. (2002) Roles of metallothionein in copper homeostasis: responses to Cu-deficient diets in mice. *J. Inorg. Biochem.* 88, 173–182.
253. Irato, P., Albergoni, V. (2005) Interaction between copper and zinc in metal accumulation in rats with particular reference to the synthesis of induced-metallothionein. *Chem. Biol. Interact.* 155, 155–164.
254. Nakazato K., Nagamine T., Suzuki K., Kusakabe T., Moon H.D., Oikawa M., Sakai T., Arakawa K. (2008) Subcellular changes of essential metal shown by in-air micro-PIXE in oral cadmium-exposed mice *Biometals* 21, 83–91.
255. Yang M.S., Lai K.P., Cheng K.Y., Wong C.K.C. (2000) Changes in endogenous Zn and Cu distribution in different cytosolic protein fractions in mouse liver after administration of a single sublethal dose of  $\text{CdCl}_2$  *Toxicology* 154, 103–111.
256. Wlostowski, T. (1986) Detoxification of cadmium ions by metallothionein in the liver of Free-living Bank vole. *Acta Theriol.* 31, 523–535.
257. Rogival, D., VanCampenhout, K., Infante, H.G., Hearn, R., Scheirs, J., Blust, R. (2007) Induction and metal speciation of metallothionein in wood mice (*Apodemus sylvaticus*) along a metal pollution gradient. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 506–514.
258. Swiergosz-Kowalewska, R., Bednarska, A., Callaghan, A. (2007) Expression of metallothionein genes I and II in bank vole *Clethrionomys glareolus* populations exposed in situ to heavy metals. *Environ. Sci. Technol.* 41, 1032–1037.



259. Fernández, J.A. (1982) Guía de campo del Parque Nacional de Doñana. Omega, Barcelona.
260. 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. Monografía nº 18. ICONA. Madrid.
261. Porras Martín, J., Nieto López-Guerrero, P., Alvarez-Fernández, C., Fernández Uría, A., Gimeno, M. V. (1985) Calidad y Contaminación de las Aguas Subterráneas en España. Informe de Síntesis. IGME.
262. Grimalt, J.O., M. Ferrer, E. MacPherson (1999). Special issue: the mine tailing accident in Aznalcollar. *Sci. Total Environ*, 242, 3–11.
263. Formularios Oficiales Red Natura 2000. Elaboración: DGCN. MIMAM, Ministerio de Medio Ambiente.
264. Fabricio, S., Blas J., Forero M., Fernández N., Donázar J. A., Hiraldo F. (2005) Preservation of wide-ranging top predators by site-protection: Black and red kites in Doñana National Park. *Biological Conservation*, 125, 11-21.
265. Muñoz-Reinoso, J. C., De Castro F. J. (2005) Application of a statistical water-table model reveals connections between dunes and vegetation at Doñana. *Journal of Arid Environments* 60, 663-679.
266. Castroviejo, J. (1993) Mapa del Parque Nacional de Doñana. CSIC/ Agen Medio Ambiente, Sevilla.
267. Ministerios de Medio Ambiente (2006).  
<http://www.mma.es/parques/lared/donana/visita/marisma.htm>
268. IGME (Instituto Geológico y Minero de España) (2006). Dirección de Hidrogeología y Aguas Subterráneas.  
[http://aguas.igme.es/zonas\\_humedas/donana.htm](http://aguas.igme.es/zonas_humedas/donana.htm)
269. Saura, J., Bayán, B., Casas, J., Ruíz de Larramendi, A., Urdiales, C., (2001). Documento Marco para el Desarrollo del Proyecto Doñana 2005. Ministerio de Medio Ambiente, Madrid.

270. Vioque-Fernandez, A., De Almeida, E.A., Ballesteros, J., Garcia-Barrera, T., Gomez-Ariza, J.L., Lopez-Barea, J. (2007a) Doñana National Park survey using crayfish (*Procambarus clarkii*) as bioindicator: esterase inhibition and pollutant levels. *Toxicol. Lett.* 168, 260-268.
271. Tovar-Sanchez, A., Huerta-Díaz, M.A., Negro, J.J., Bravo, M.A., Sanudo-Wilhelmy, S.A. (2006) Metal contamination in interstitial waters of Doñana Park. *J. Environ. Manage.* 78, 286-293.
272. 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.
273. Manzano, M. (1999) Los humedales de Doñana y su relación con el agua subterránea, in: Pérez-Miyares, F. (Ed.), 1ª Reunión Internacional de Expertos Sobre la Regeneración Hídrica de Doñana. Ministerio de Medio Ambiente, Madrid, 161-167.
274. Consejería de Medio Ambiente (2000). Programa de Investigación del Corredor Verde del Guadiamar PICOVER 1999-2002. Consejería de Medio Ambiente, 192.
275. Gallart, F., Benito, G., Martín-Vide, J.P., Benito, A., Prió J.M.. (1999) Fluvial geomorphology and hydrology in the dispersal and fate of pyrite mud particles released by the Aznalcóllar e tailings spill. *The Science of the Total Environment* 242, 13-26.
276. Garralon, A., Gomez, P., Turrero, M.J., Sánchez, M., Melón A.M. (1999) The geochemical aspects of toxic waters retained in the Entremuros area (Spain). *Science of the Total Environment.* 242, 27-40.
277. Macklin, M.G., Hudson-Edwards, K.A., Jamieson, H.E., Brewer, P., Coulthard, T.J., Howard, A.J., Renenda V.H. (1999). Physical stability and rehabilitation of sustainable aquatic and riparian ecosystems in the Río Guadiamar, Spain, following the Aznalcóllar mine tailings dam failure. Mine, Water and Environment. *International Mine Water Association Congress*, Seville, Spain. 271-278.
278. Hudson-Edwards, K.A., Macklin, M.G., Jamieson, H.E., Brewer, P.A., Coulthard, T.J., Howard, A.J., Turner J.N. (2003) The impact of tailings dam spills and clean-up on sediment and water quality in river systems: the Ríos Agrio-Guadiamar, Aznalcóllar, Spain. *Applied Geochemistry.* 18, 221–239.



279. Oñate, J.J., Pereira, D., Suarez, F. (2003). Strategic Environmental Assessment of the Effects of European Union's Regional Development Plans in Doñana National Park (Spain). *Environ. Manage* 31, 642-655.
280. Zoorob G.K., McKiernan J.W., Caruso J.A. (1998) ICP-MS for Elemental Speciation Studies *Mikrochim. Acta* 128,145-168.
281. Lobinski R. (1997) Elemental Speciation and Coupled Techniques. *Appl. Spectrosc.* 51, 260A-278A.
282. Quevauvillier Ph. (1998) Method Performance Studies for Speciation Analysis, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
283. Lobinski R., Szpunar J. (1999) Biochemical speciation analysis by hyphenated techniques. *Analytica Chimica Acta* 400, 321–332.
284. Szpunar J., Lobinski R. (1999) Species-selective Analysis for Metal - Biomacromolecular Complexes using Hyphenated Techniques. *Pure Appl. Chem.* 71, 899-918.
285. Ellis L.A., Roberts D.J. (1997) A review - Chromatographic and hyphenated methods for elemental speciation analysis in environmental media. *J. Chromatogr.* 774 (1997) 3-19.
286. Barnes R.M. (1998) Capillary electrophoresis and inductively coupled plasma spectrometry: status report. *Fresenius J. Anal. Chem.* 361, 246-251.
287. Van Loon JC (1979) Metal Speciation by Chromatography/ Atomic Spectrometry. *Anal. Chem.* 51, 1139A-1150A.
288. Suzuki KT (1980) Direct connection of high-speed liquid chromatograph (equipped with gel permeation column) to atomic absorption spectrophotometer for metalloprotein analysis: metallothionein. *Anal. Biochem.* 102, 31-34.
289. Cornelis R, De Kimpe J (1994) Elemental speciation in biological fluids. Invited lecture. *J. Anal. At. Spectrom.* 9, 945-950.
290. Sanz Medel A (1995) Beyond total element analysis of biological systems with atomic spectrometric techniques. *Analyst* 120, 799-807.
291. Barnes RM (1996) Analytical plasma source mass spectrometry in biomedical research. *Fresenius J. Anal. Chem.* 355, 433-441.
292. Das AK, Chakraborty R, Cervera ML, de la Guardia M (1996) Metal speciation in biologicals fluids-a review. *Mikrochim Acta.* 122, 209-246.

293. Cornelis R, De Kimpe J, Zhang X (1998) Trace elements in clinical samples revisited—speciation is knocking at the door. Sample preparation, separation of the species and measurements methods. *Spectrochim. Acta, Part B* 53B, 187-196.
294. Sanz Medel A (1998) Trace element analytical speciation in biological systems: importance, challenges and trends. *Spectrochim Acta, Part B* 53B, 197-211.
295. Jakubowski N., Lobinski R., Moens L. (2004) Metallobiomolecules. The basis of life, the challenge of atomic spectroscopy. *J. Anal. At. Spectrom.* 19, 1-4.
296. Becker J. S., Zoriy M.V., Pickhardt C., Palomero-Gallagher N., Zilles K. (2005) Imaging of copper, zinc, and other elements in thin section of human brain samples (hippocampus) by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Chem.* 77, 3208-3216.
297. Becker J. S., Zoriy M., Becker J. S., Dobrowolska J., Matusch A. (2007) Imaging mass spectrometry by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry in biological tissues and proteomics. *J. Anal. At. Spectrom.* 22, 736-744.
298. Ferrarello CN, Fernandez de la Campa MR, Carrasco JF, Sanz- Medel A (2000) Speciation of metallothionein-like proteins of the mussel *Mytilus edulis* at basal levels by chromatographic separations coupled to quadrupole and double-focusing magnetic sector ICPMS. *Anal. Chem.* 72, 5874-5880.
299. Ferrarello C N, Fernandez de la Campa MR, Sario Muniz C, Sanz-Medel A (2000) Metal distribution patterns in the mussel *Mytilus edulis* cytosols using size-exclusion chromatography and double focusing ICP-MS detection. *Analyst* 125, 2223-2229.
300. Suzuki KT (1996) Simultaneous Speciation of Endogenous and Exogenous Elements by HPLC/ICP-MS with Enriched Stable Isotopes. *Tohoku J. Exp. Med.* 178, 27-35.
301. Suzuki KT, Itoh M (1997) Metabolism of selenite labelled with enriched stable isotope in the bloodstream. *J. Chromatogr., B: Biomed Appl* 692:15-22.
302. Schaumloeffel D, Prange A, Marx G, Heumann KG, Braetter P (2002) Characterization and quantification of metallothionein isoforms by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-isotope-dilution mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 372, 155-163.
303. Polec-Pawlak K., Schaumloeffel D., Szpunar J., Prange A., Lobinski R. (2002) Analysis for metal complexes with metallothionein in rat liver by capillary zone



- electrophoresis using ICP double-focusing sector-field isotope dilution MS and electrospray MS detection. *J. Anal. At. Spectrom.* 17, 908–912.
304. Chassaigne H., Vacchina V., Lobinski R. (2000) Elemental speciation analysis in biochemistry by electrospray mass spectrometry *Trends Anal. Chem.* 19, 300-113.
305. Ruiz Encinar J., Ouerdane L., Buchmann W., Tortajada J., Lobinski R., Szpunar J. (2003) Identification of water-soluble selenium containing proteins in selenized yeast by size-exclusion reversed- phase HPLC/ICPMS followed by MALDI-TOF and electrospray Q-TOF mass spectrometry. *Anal. Chem.* 75, 3765-3774.
306. Mounicou, S., Polec, K., Chassaigne, H., Potin-Gautier, M., Lobinski, R. (2000) Characterization of metal complexes with metallothioneins by capillary zone electrophoresis (CZE) with ICP-MS and electrospray (ES)-MS detection. *J. Anal. At. Spectrom.* 15, 635-642.
307. Makarov A, Szpunar J (1998) The coupling of size-exclusion HPLC with ICP-MS in bioinorganic analysis. *Analusis* 26, 44-47.
308. Szpunar J., Lobinski R. (2002) Multidimensional approaches in biochemical speciation analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* 373, 404-411.
309. Prange A, Schaumlöffel D, Brätter P, Richarz A, 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.
310. Polec K, Pérez-Calvo M, García-Arribas O, Szpunar J, Ribas- Ozonas B, Lobinski R (2000) Identification of cadmium bioinduced ligands in rat liver using parallel HPLC-ICP-MS and HPLC - electrospray MS. *J. Anal. At. Spectrom.* 15, 1363-1368.
311. Polec K, Pérez-Calvo M, Garcia-Arribas O, Szpunar J, Ribas- Ozonas B, Lobinski R (2002) Investigation of metal complexes with metallothionein in rat tissues by hyphenated techniques. *J. Inorg. Biochem.* 88, 197-206.
312. Michalke B, Schramel P (1997) Selenium speciation in human milk with special respect to quality control. *Biol. Trace. Elem. Res.* 59, 45-56.
313. McSheehy S, Yang W, Pannier F, Szpunar J, Lobinski 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.

314. 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.
315. McSheehy S, Marcinek M, Chassaigne H, Szpunar J (2000) Identification of dimethylarsinoyl-riboside derivatives in seaweed by pneumatically assisted electrospray tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 410, 71-84.
316. McSheehy S, Szpunar J (2000) Speciation of Arsenic in Edible Algae by Bi-Dimensional Size-Exclusion Anion Exchange HPLC with Dual ICP-MS and Electrospray MS/MS Detection. *J. Anal. At. Spectrom.* 15, 79-87.
317. McSheehy S, Pohl P, Lobinski R, Szpunar J (2001) Complementarity of multidimensional HPLC-ICP-MS and electrospray MS-MS for speciation analysis of arsenic in algae. *Anal. Chim. Acta* 440, 3-16.
318. 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.
319. Jorgenson, J.W., Lukacs, K.D. (1981) Free-Zone Electrophoresis in Glass-Capillaries. *Clin. Chem.* 27, 1551-1553.
320. Beattie, J.H., Richards, M.P., Self, R. (1993) Separation of metallothionein isoforms by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr.* 632, 127-135.
321. Liu, G.Q., Wang, W., Shan, X.Q. (1994) Factors influencing the separation of metallothioneins by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. B* 653, 41-46.
322. Richards, M.P., Beattie, J.H. (1993) Characterization of metallothionein isoforms comparison of capillary zone electrophoresis with reversed phase high performance liquid-chromatography. *J. Chromatogr.* 648, 459-468.
323. Lavorante, A.F., Gine, 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.



324. Kawata, T., Nakamura, S., Nakayama, A., Fukuda, H., Ebara, M., Nagamine, T., Minami, T., Sakurai, H. (2006) An improved diagnostic method for chronic hepatic disorder: Analyses of metallothionein isoforms and trace metals in the liver of patients with hepatocellular carcinoma as determined by capillary zone electrophoresis and inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 403-409.
325. Prange, A., Schaumlöffel, D. (2002) Hyphenated techniques for the characterization and quantification of metallothionein isoforms. *Anal. Bioanal. Chem.* 373, 441-453.
326. 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.
327. Polec-Pawlak K., Palacios O., Capdevilla M., Gonzalez-Duarte P., Lobinski R. (2002) Monitoring of the metal displacement from the recombinant mouse liver metallothionein Zn<sup>7</sup>-complex by capillary zone electrophoresis with electrospray MS detection. *Talanta* 57, 1011-1117.
328. Hagege A., Baldinger T., Martin-Jouet M., Zal F., Leroy M., Leize E., Dorselaer A.V. (2004) Assessment of the contribution of inductively coupled plasma mass spectrometry to metalloprotein analysis: a novel approach for studies of multiproteic complexes. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 18, 735-738.
329. Van Lierde V., Strijckmans K., Galleni M., Devreese B., Van Beeumen J., Vanhaecke F., Moens L. (2003) CE-ICP-SFMS for the Detection of S and Zn in *Aeromonas Hydrophila* Zn-B-Lactamase. *LC-GC Europe* 9, 616-625.
330. Schaumlöffel D., Ouerdane L., Bouyssiére B., Lobinski R. (2003) Speciation analysis of nickel in the latex of a hyperaccumulating tree *Sebertia acuminata* by HPLC and CZE with ICP-MS and electrospray MS-MS detection. *J. Anal. At. Spectrom.* 18, 120-127.

331. Mounicou S., McSheehy S., Szpunar J., Potin-Gautier M., Lobinski R. (2002) Analysis of selenized yeast for selenium speciation by size-exclusion chromatography and capillary zone electrophoresis with inductively coupled plasma mass spectrometric detection (SEC-CZE-ICP-MS) *J. Anal. At. Spectrom.* 17, 15-20.
332. Wittig I., Braun H.P., Schagger H. (2006) Blue Native PAGE. *Nat. Protocols* 1, 418-428.
333. 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, 2469-2467.
334. Ballihaut G., Pecheyran C., Mounicou S., Preud'homme H., Grimaud R., Lobinski R. (2007) Multimode detection (LA-ICP-MS, MALDI-MS and nanoHPLC-ESI-MS<sup>2</sup>) in 1D and 2D gel electrophoresis for selenium-containing proteins. *Trends Anal. Chem.* 26, 183-190.
335. Becker J. S., Zoriy M., Becker J. S., Pickhardt C., Przybylski M. (2004) Determination of phosphorus and metal in human brain proteins after isolation by gel electrophoresis by laser ablation inductively coupled plasma source mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* 19, 149-152.
336. Rosenberg E. (2003) The potential of organic (electrospray- and atmospheric pressure chemical ionisation) mass spectrometric techniques coupled to liquid-phase separation for speciation analysis. *J. Chromatogr. A* 1000,841-889.
337. Kaltashov I.A., Zhang M.X., Eyles S.J., Abzalimov R.R. (2006) Investigation of structure, dynamics and function of metalloproteins with electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 386, 472-481.
338. Wilm M., Mann M. (1996) Analytical Properties of the Nanoelectrospray Ion Source. *Anal. Chem.* 68, 1-8.
339. Herbert G.C., Johnstone R.A.W. (2000) *Mass Spectrometry Basic*. Ed. CRC Press LLC, Florida.



340. Mann M., Hendrickson R.C., Pandey A. (2001) Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 437-473.
341. Aebersold R., Mann M. (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422, 198-207.
342. Shevchenko A., Jensen ON, Podtelejnikov AV, Sagliocco F, Wilm M, Vorm O, Mortensen P, Shevchenko A, Boucherie H, Mann M. (1996) Linking genome and proteome by mass spectrometry: largescale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 14440-14445.
343. Biemann K. (1988) Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 16, 99-111.
344. Clauser K.R., Hall S.C., Smith D.M., Webb J.W., Andrews L.E., Tran H.M., Epstein L.B., Burlingame A. L. (1995) Rapid mass spectrometric peptide sequencing and mass matching for characterization of human melanoma proteins isolated by two dimensional PAGE. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5072-5076.
345. Dernovics M., Lobinski R. (2007) Characterization of the selenocysteine-containing metabolome in selenium-rich yeast: Part 1. Identification of new species by multi-dimensional liquid chromatography with parallel ICP-MS and electrospray Q-TOF MS/MS detection *J. Anal. At. Spectrom.* 23, 72-83.
346. Dernovics M., Garcia-Barrera T., Bierla K., Preud'homme H., Lobinski R. (2007) Standardless identification of selenocystathionine and its  $\gamma$ -glutamyl derivatives in monkeypot nuts by 3D liquid chromatography with ICP-MS detection followed by nanoHPLC-Q-TOF-MS/MS *Analyst* 132, 439-449.
347. Wang R.Y., Sens D.A., Albrecht A., Garrett S., Somji S., Sens M.A., Lu X.N. (2007) Simple method for identification of metallothionein isoforms in cultured human prostate cells by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. *Anal. Chem.* 79, 4433-4441.
348. Jaeckel P., Krauss G., Menge S., Schierhorn A., Rucknagel P., Krauss G.J. (2005) Cadmium induces a novel metallothionein and phytochelatin 2 in an aquatic fungus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333, 150-155.



349. Karotki A.V., Vasak M. (2009) Reaction of human metallothionein-3 with cisplatin and transplatin. *J. Biol. Inorg. Chem.* 14, 1129-1138.

