



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Programa de doctorado en Biociencias y Ciencias Agroalimentarias

RESPUESTAS BIOLÓGICAS A CONTAMINANTES DEL ENTORNO DE DOÑANA. INTEGRACIÓN DE METODOLOGÍAS ÓMICAS QUE EVALÚAN EL ESTRÉS AMBIENTAL EN ANIMALES DE ECOSISTEMAS ACUÁTICOS.

**Trabajo realizado por Ricardo Fernández Cisnal para optar al grado de Doctor en
Bioquímica con mención internacional.**

Directores

Dr. Juan López Barea

Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Universidad de Córdoba

Dra. Nieves Abril Díaz

Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

TITULO: *Respuestas biológicas a contaminantes del entorno de Doñana.
Integración de metodologías ómicas que evalúan el estrés ambiental en
animales de ecosistemas acuáticos*

AUTOR: *Ricardo Fernández Cisnal*

© Edita: UCOPress. 2016
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

D. JUAN LÓPEZ BAREA, Dr. en Ciencias Biológicas y Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba, D. M^a NIEVES ABRIL DÍAZ,, Dra. en Ciencias Biológicas y Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba

INFORMAN:

Que el trabajo **“Respuestas biológicas a contaminantes del entorno de Doñana. Integración de metodologías ómicas que evalúan el estrés ambiental en animales de ecosistemas acuáticos.”** realizado bajo nuestra dirección, se considera ya finalizado y puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba.

Córdoba, 28 Julio de 2016.



Fdo: Juan López Barea



Fdo: Nieves Abril Díaz



TÍTULO DE LA TESIS: “Respuestas biológicas a contaminantes del entorno de Doñana. Integración de metodologías ómicas que evalúan el estrés ambiental en animales de ecosistemas acuáticos”

DOCTORANDO/A: RICARDO FERNÁNDEZ CISNAL

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

Juan López Barea, Catedrático de Universidad del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba y M^a Nieves Abril Díaz, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba

INFORMAN:

Que el trabajo titulado “Respuestas biológicas a contaminantes del entorno de Doñana. Integración de metodologías ómicas que evalúan el estrés ambiental en animales de ecosistemas acuáticos” ha sido realizado bajo su dirección por D. Ricardo Fernández Ciscal en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba y que reúne todos los requisitos exigidos para obtener el título de Doctor. Asimismo, hacen constar que en el desarrollo del trabajo realizado por el doctorando se han conseguido resultados que cubren todos los objetivos marcados para evaluar las respuestas biológicas a la contaminación en el entorno de Doñana utilizando el *P. clarkii* como organismo bioindicador: (i) Ha estudiado la bioacumulación de metales en tejidos de *P. clarkii* capturados en distintas zonas contaminadas del PND. (ii) Ha evaluado el daño oxidativo a biomoléculas cuantificando peroxidación lipídica y carbonilación lipídica. (iii) Se han cuantificado e identificado proteínas con distinto grado de oxidación reversible. (iv) Se ha estudiado la respuesta a la contaminación a nivel proteómico. (v) Ha identificado y caracterizado los cambios a nivel metabólico causados por la contaminación.

Parte de los resultados obtenidos en esta tesis ha dado lugar a la publicación en una revista internacional de reconocido prestigio:

Fernández-Ciscal, R.; Alhama, J.; Abril, N.; Pueyo, C.; Lopez-Barea, J., Redox proteomics as biomarker for assessing the biological effects of contaminants in crayfish from Donana National Park. *Sci Total Environ* 2014, 490, 121-33

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 28 de Julio de 2016

Firma del/de los director/es

Fdo.: Juan López Barea

Fdo.: M^aNieves Abril Diaz

Agradecimientos

Quisiera expresar mi gratitud a todas las personas e instituciones que han colaborado en la realización de este trabajo.

En primer lugar, a Juan por haber confiado en mi y haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo y a Nieves por adoptarme como doctorando y ser la principal culpable de esta tesis. Gracias por la oportunidad, paciencia y apoyo.

A Pepe Alhama, por enseñarme desde el primer día, dentro y fuera del laboratorio.

A Carmen Pueyo y su grupo, Pepa, Carmina, Juan, por su ayuda, sus consejos y el cariño que me han brindado siempre.

A mis maestros, los gurus de la proteómica, Edu y Carlos. Y a todos los que han compartido estos años en el Departamento Amalia, Julia, Jose Luis, Noelia, Esther. Teresa, M^o Carmen. Gracias.

A Jose Luis Gomez Ariza y a todo el grupo de la Universidad de Huelva, especialmente a Miguel Angel por su inestimable ayuda con la metabolómica.

David Sheehan por permitirme una muy productiva estancia en su laboratorio.

A todo el personal de la UCO que ha colaborado en este trabajo y, especialmente, al de la Unidad de Proteómica del SCAI.

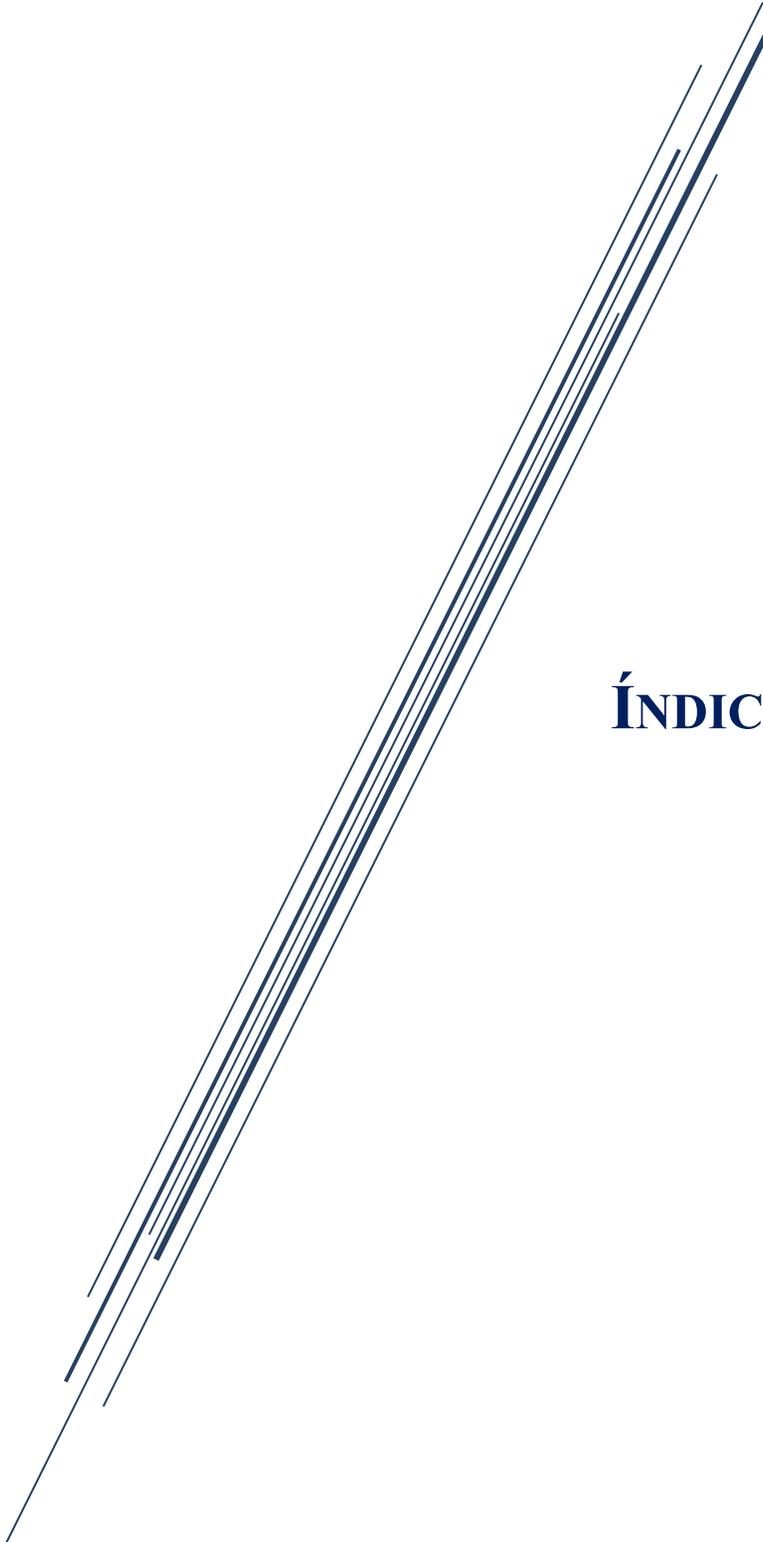
A mi Familia y a Bea.

GRACIAS.

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba y financiado por fondos de Ministerio de Ciencia e Innovación (CTM2009-12858-C02-02), Junta de Andalucía (P08-CVI-03829) y programa propio de la Universidad de Córdoba.

*Parece que obtuvimos mejores
resultados que el Dr. Upper¹*

1. Upper, D., The unsuccessful self-treatment of a case of "writer's block".
Journal of Applied Behavior Analysis 1974, 7, (3), 497.



ÍNDICE

○ INDICE	i
○ ABREVIATURAS	vii
○ RESUMEN/ABSTRACT	1
○ Resumen	3
○ Abstract	7
○ INTRODUCCIÓN GENERAL	11
○ CONTAMINACIÓN AMBIENTAL	13
○ Contaminantes orgánicos.	15
○ Metales.	17
○ EVALUACIÓN DE LA CALIDAD AMBIENTAL: BIOINDICADORES Y BIOMARCADORES	17
○ Indicadores de contaminación ambiental	17
○ Bioindicadores	18
○ Biomarcadores	19
○ Biomarcadores convencionales	21
○ Estrés oxidativo, daños a biomoléculas y sistemas antioxidantes	21
○ Estrés oxidativo asociado a la exposición a metales	28
○ Destoxificación de xenobióticos	29
○ Otros biomarcadores de contaminación	32
○ LAS METODOLOGÍAS ÓMICAS EN ESTUDIOS MEDIOAMBIENTALES	33
○ EL PARQUE NACIONAL DE DOÑANA	66
○ Contaminación en Doñana	40
○ PROCAMBARUS CLARKII COMO ORGANISMO BIOINDICADOR DE GRAN IMPORTANCIA ECOLÓGICA. SU USO PARA EVALUAR LA CALIDAD AMBIENTAL DE DOÑANA	44
○ PROTEÓMICA	46
○ Estrategias convencionales: la electroforesis bidimensional	47
○ Proteómica de segunda generación: marcaje de proteínas con fluoróforos (2D-DIGE)	48
○ Espectrometría de masas para la identificación de proteínas	50
○ Secuenciación de péptidos mediante espectrometría de masas	54
○ Identificación de proteínas en bases de datos a partir de los datos MS	55
○ PROTEÓMICA REDOX	58
○ Oxidación reversible de grupos tiólicos	59
○ Cuantificación de disulfuros proteicos oxidados como biomarcador de exposición a contaminación	61
○ CARBONILACIÓN DE PROTEÍNAS	62
○ La carbonilación proteica como biomarcador de exposición a contaminación	64
○ METALÓMICA	65
○ METABOLÓMICA	66
○ Técnicas analíticas para la búsqueda de biomarcadores en metabolómica	66
○ Plataformas de análisis metabólico	68
○ Análisis de datos metabolómicos	69
○ Estudios metabolómicos aplicados a la toxicología medioambiental en ecosistemas acuáticos	69
○ REFERENCIAS	70
○ ANTECEDENTES, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	83
○ Antecedentes y justificación	85
○ Hipotesis de partida	86
○ Objetivos	87
○ Obejetives	88

○ ZONAS Y MÉTODOS DE MUESTREO	89
○ Zonas de muestreo	91
○ Captura de animales	93
○ Extracción y procesamiento de órganos	94
○ CAPÍTULO 1 PRESENCIA DE METALES EN GLÁNDULA DIGESTIVA Y BRANQUIAS DE <i>P. CLARKII</i>	97
○ 1.1.RESUMEN	99
○ 1.2.DETERMINACIÓN DE METALES EN GLÁNDULA DIGESTIVA Y BRANQUIAS COMO MEDIDA DEL GRADO DE CONTAMINACIÓN DE <i>P. CLARKII</i> Y LAS ZONAS DE CAPTURA	101
○ 1.3.MATERIALES Y MÉTODOS	103
○ 1.4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN	105
○ 1.4.1.Concentración de elementos en tejidos de <i>P. clarki</i>	105
○ 1.4.2. Concentración de elementos en sedimentos	110
○ 1.5. CONCLUSIONES	113
○ 1.6. REFERENCIAS	115
○ CAPÍTULO 2 PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS EN GLÁNDULA DIGESTIVA Y BRANQUIAS DE <i>P. CLARKII</i>	117
○ 2.1. RESUMEN	119
○ 2.2. NIVELES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA COMO MEDIDA DEL ESTRÉS OXIDATIVO GENERADO EN CANGREJOS <i>P. CLARKII</i> DE ZONAS CONTAMINADAS	121
○ 2.3. MATERIALES Y MÉTODOS	125
○ 2.3.1. Muestras utilizadas.	125
○ 2.3.2. Preparación de muestras para la cuantificación de MDA	125
○ 2.3.3.Determinación de niveles de MDA en glándula digestiva y branquias de <i>P. clarkii</i>	125
○ 2.3.4. Análisis de los datos.	126
○ 2.4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN	126
○ 2.4.1.Determinación de los niveles de peroxidación lipídica en glándula digestiva y branquias	126
○ 2.5.CONCLUSIONES	128
○ 2.1.REFERENCIAS	129
○ CAPÍTULO 3 CAMBIOS CAUSADOS POR CONTAMINACIÓN EN LOS PERFILES DE CARBONILACIÓN PROTEICA DE <i>P. CLARKII</i>	131
○ 3.1.RESUMEN	133
○ 3.2.INTRODUCCIÓN	135
○ 3.3.MATERIALES Y MÉTODOS	137
○ 3.3.1. Muestras utilizadas.	137
○ 3.3.2. Extracción y aislamiento de proteínas para la determinación carbonilos.	137
○ 3.3.3. Derivatización, separación electroforética e inmunodetección de carbonilos proteicos	138
○ 3.3.4.Análisis estadístico	139
○ 3.4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN	140
○ 3.4.1.Cambios en los perfiles de abundancia proteica en glándula digestiva y branquias de cangrejos <i>P. clarki</i> procedentes de zonas con diferentes niveles de contaminación	140

○ 3.4.2.Cuantificación de la tasa de carbonilación en glándula digestiva y branquias de cangrejos <i>P. clarkii</i> procedentes de zonas con diferentes niveles de contaminación	142
○ 3.5.CONCLUSIONES	143
○ 3.6.REFERENCIAS	145
○ CAPÍTULO 4 PROTEÓMICA REDOX COMO BIOMARCADOR DE CONTAMINACIÓN EN <i>P. CLARKII</i>	147
○ 4.1.RESUMEN	149
○ 4.2.INTRODUCCIÓN	151
○ 4.3.MATERIALES Y MÉTODOS	155
○ 4.3.1. Muestras utilizadas	155
○ 4.3.2.Marcaje fluorescente de tioles nativos oxidados reversiblemente en proteínas de glándula digestiva de <i>P. Clarkii</i>	155
○ 4.3.3. Separación de las proteínas marcadas con IAF mediante 2-DE-PAGE	156
○ 4.3.4. Análisis de conglomerados o cluster	157
○ 4.3.5. Identificación de proteínas por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF	157
○ 4.3.6. Análisis estadístico de los datos.	158
○ 4.4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN	159
○ 4.4.1.Utilidad de la proteómica redox como biomarcador de contaminación en ecosistemas acuáticos de Doñana	159
○ 4.4.2.El marcaje diferencial permite en algunos casos identificar diferencialmente las proteínas nativas y las oxidadas	170
○ 4.4.3Identificación de residuos Cys con tioles sensibles a oxidación	172
○ 4.4.4.Funciones biológicas de las proteínas identificadas con niveles de oxidación diferencial entre las muestras estudiadas	173
○ 4.5.CONCLUSIONES	181
○ 4.6.REFERENCIAS	182
○ CAPÍTULO 5 ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LA RESPUESTA DE <i>P. CLARKII</i> A CONTAMINACIÓN AMBIENTAL	185
○ 5.1.RESUMEN	187
○ 5.2.INTRODUCCIÓN	189
○ 5.3.MATERIALES Y MÉTODOS	191
○ 5.3.1. Muestras utilizadas.	191
○ 5.3.2. Preparación de muestras para proteómica.	191
○ 5.3.3. Marcaje fluorescente de proteínas.	192
○ 5.3.4. Separación de proteínas mediante 2DE-DIGE	193
○ 5.3.5. Digitalización y análisis de imágenes	194
○ 5.3.6. Identificación de proteínas mediante MALDI-TOF-TOF-MS	195
○ 5.4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN	197
○ 5.4.1. Consideraciones generales sobre la metodología utilizada	197
○ 5.4.2.Expresión diferencial de proteínas en cangrejos <i>P.clarkii</i> capturados en cada una de las zonas de estudio.	198
○ 5.4.3. Validación de los resultados 2D-DIGE por western blot.	203
○ 5.4.4. Significado biológico de proteínas expresadas diferencialmente	204
○ 5.5.CONCLUSIONES	221

○ 5.6.REFERENCIAS	222
○ CAPÍTULO 6 ANÁLISIS METABOLÓMICO DE LA RESPUESTA DE <i>P. CLARKII</i> A CONTAMINACIÓN AMBIENTAL	225
○ 6.1. RESUMEN	227
○ 6.2. INTRODUCCIÓN	229
○ 6.3. MATERIALES Y MÉTODOS	230
○ 6.3.1.Muestras utilizadas.	230
○ 6.3.2.Preparación de muestras para análisis metabólico	231
○ 6.3.3.Análisis metabólico mediante DI-ESI-QqQ-TOF-MS	232
○ 6.3.4.Análisis estadístico de resultados e identificación de metabolitos	233
○ 6.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	230
○ 6.4.1.Preparación de muestras para análisis metabólico	234
○ 6.4.2.Análisis metabólico mediante DI-ESI-QqQ-TOF-MS	235
○ 6.4.3.Metabolitos con abundancia diferente en glándula digestiva de cangrejos <i>p. Clarkii</i> capturados en zonas contaminadas.	239
○ 6.4.4.Análisis funcional de los metabolitos con niveles alterados en glándula digestiva de <i>p. Clarkii</i> , posibles biomarcadores de exposición a contaminación.	242
○ 6.4.5.Metabolitos con abundancia diferente en branquias de cangrejos <i>P. clarkii</i> capturados en zonas contaminadas.	258
○ 6.5.CONCLUSIONES	260
○ 6.6.REFERENCIAS	261
○ CONCLUSIONES GENERALES/GENERAL CONCLUSIONS	265
○ Conclusiones generales	267
○ General conclusions	269
○ Anexo	271



ABREVIATURAS

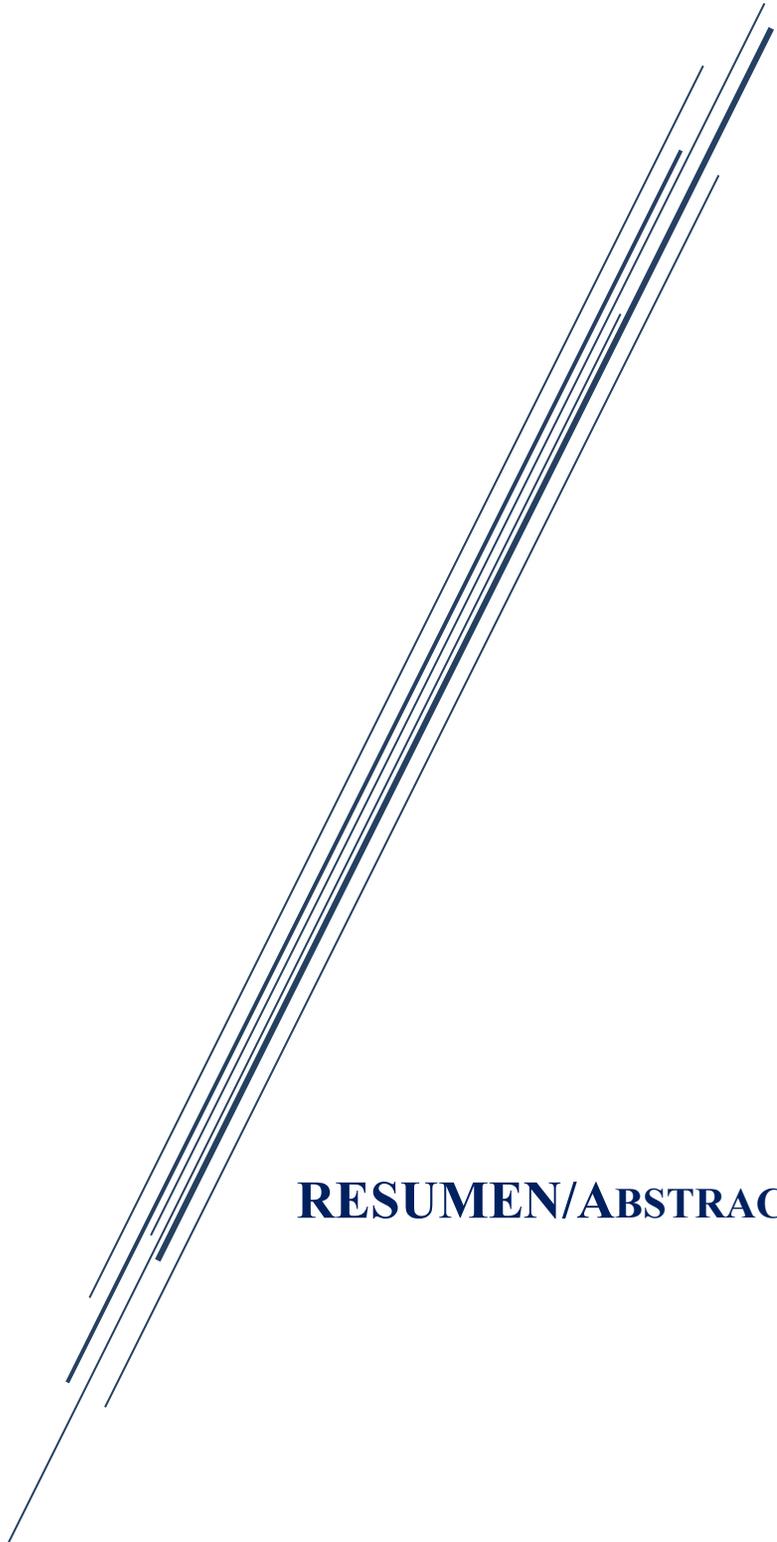
Abreviaturas

2-DE	<i>Two dimensional electrophoresis.</i> Electroforesis bidimensional
3-HAO	<i>3-Hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase.</i> 3-hidroxiantranilato 3,4-dioxigenasa
4-HNE	<i>4-hydroxynonenal.</i> 4-hidroxinonenal
ACh	<i>Acetylcoline.</i> Acetilcolina
AChE	<i>Acetylcholinesterase.</i> Acetilcolienesterasa
ACT	<i>Actin.</i> Actina
AEBSF	<i>4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride</i>
AGAT	<i>Arginine-Glycine Amidinotransferase.</i> Arginina-glicina amidinotransferasa
ALDO	<i>Aldolase (Fructose biphosphate aldolase)</i> Aldolasa Fructosa bifosfato aldolasa.
AMP	<i>Adenosine monophosphate.</i> Adenosín monofosfato
ARK	<i>Arginine Kinase.</i> Arginina quinasa
ATP	<i>Adenosine triphosphate,</i> Adenosin trifosfato
BHMT	<i>Betaine-homocysteine S-methyltransferase.</i> Betaína-homocisteína metiltransferasa
BHT	<i>Butylated hydroxytoluene.</i> Butilhidroxitolueno
BPH	<i>Benzo(a)pyrene hydroxylase.</i> Benzo(a)pireno hidroxilasa
BSA	<i>Bovine serum albumin.</i> Seroalbunima bovina
BVA	<i>Biological Variation Analysis</i>
CE	<i>Capillary electrophoresis.</i> Electroforesis capilar
CHAPS	<i>3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate.</i> (3-[(3-Colamidopropil)- dimetilamonio]-propano sulfonato)
CHCA	<i>α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid.</i> Acido α -ciano-4-hidroxicinámico
CHH	<i>Crustacean Hyperglycemic Hormone.</i> Hormona hiperglicémica de crustáceos
CK	<i>Creatine kinase.</i> Creatina quinasa
COX	<i>Cytochrome c oxidase.</i> Citocromo c oxidasa
CPT1	<i>Carnitine palmitoyltransferase.</i> Carnitina palimitotransferasa
Cy2	<i>Cyanine 2.</i> Cianina 2
Cy3	<i>Cyanine 3.</i> Cianina 3
Cy5	<i>Cyanine 5.</i> Cianina 5
CYP	<i>Cytochrome P.</i> Citocromo P
DA	<i>Dopamina.</i> Dopamina
DDBJ	<i>DNA Databank of Japan</i>
DDT	<i>Dithiothreitol.</i> Ditiotreitól
DHB	<i>Dihydroxybenzoic acid.</i> Acido dihidrobenzoico
DIA	<i>Differential In-gel Analysis</i>
DIGE	<i>Difference Gel Electrophoresis</i>

DIMS	<i>Direct-infusion mass spectrometry</i> . Espectrometría de masas por infusión directa
DNMTs	<i>DNA methyltransferase</i> . Metiltransferasas de ADN
DNP	<i>2,4-Dinitrophenol</i> . 2,4-dinitrofenol
DNPH	<i>2,4-Dinitrophenylhydrazine</i> . 2,4-dinitrofenilhidrazina
DTT	<i>Dithiothreitol</i> . Ditiotreititol
EBI	<i>European Bioinformatics Institute</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> . Ácido etilendiaminotetraacético
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
EROD	<i>7-ethoxyresorufin-O-demethylase</i> . 7-etoxiresorufina-O-desetilasa
ESI	<i>Electrospray ionization</i> . Ionización por electroespray
ETFA	<i>Electron-transfer-flavoprotein, alpha polypeptide</i> .
FA	<i>Fatty acid</i> . Ácidos grasos
FAA	<i>Free amino acids</i> . Aminoácidos libres
FABP	<i>Fatty acid-binding protein</i> . Proteína de unión a ácidos grasos
FAD	<i>Flavin adenine dinucleotide</i> . Flavín adenín dinucleótido
FER	<i>Ferritin</i> . Ferritina
FH	<i>Fumarase (Fumarate hydratase)</i> . Fumarasa (Fumarato deshidratasa)
FT ICR-MS	<i>Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry</i>
GC-MS	<i>Gas chromatography-mass spectrometry</i> . Espectrometría de masas por cromatografía de gases
GLDC	<i>Glycine decarboxylase</i> . Glicina descarboxilasa
GPx	<i>Glutathione peroxidase</i> . Glutación peroxidasa
GR	<i>Glutathione reductase</i> . Glutación reductasa
GSH	<i>Reduced Glutathion</i> . Glutación reducido
GSTs	<i>Glutathione S-transferase</i> . Glutación-S-transferasas
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HPLC	High performance liquid chromatography
HSP	<i>Heat-Shock Protein</i> . Proteína de choque térmico
IAF	<i>Iodoacetamide-Fluorescein</i> . Iodoacetamida-fluoresceína
IAM	<i>Iodoacetamide</i> . Iodoacetamida
ICAT	<i>Isotope-coded affinity tag</i>
ICP-MS	<i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i> . Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente
IDH	<i>Isocitrate dehydrogenase</i> . Isocitrato deshidrogenasa
IEF	<i>Isoelectric focusin</i> . Isoelectroenfoque
IGFs	<i>Insulin growth factors</i> . Factor de crecimiento insulínico
IL-6	<i>Interleukin-6</i> . Interleucina-6
IPG	<i>Immobilized pH gradient</i> . Gradientes de pH inmovilizados

iTRAQ	<i>Isobaric tags for relative and absolute quantitation.</i>
LC	<i>Liquid chromatography.</i> Cromatografía líquida
LC/ESI-MS/MS	<i>Liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry.</i> Espectrometría de masas de ionización por electro spray acoplado a cromatografía líquida
LC-MS	<i>Liquid chromatography mass spectrometry</i>
LP	Lucio del Palacio
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption</i>
MAPEG	<i>Membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism</i>
MAT	Arrozalez del Matochal
MDA	<i>Malonedialdehyde.</i> Malondialdehído
<u>MKK4</u>	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 4</i>
MT	<i>Metallothionein.</i> Metalotioneína
MTs	<i>Microtubules.</i> Microtubulos
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate.</i> Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NDK	<i>Nucleoside-diphosphate kinases.</i> Nucleosido difosfato quinasa
NEM	<i>Ethylmaleimide.</i> Etilmaleimida
Nrf2	Nuclear factor2. Fractor nuclear 2
PAHs	<i>Polycyclic aromatic hydrocarbons.</i> Hidrocarburos aromaticos policiclicos
PAR	Arroyo del Partido
PBS	<i>Phosphate Buffered Salin.</i> Tampón fosfato salino
PC	<i>Phosphatidylcholine.</i> Fosfatidilcolina
PCA	<i>Principal components analysis.</i> Análisis de componentes principales
PCBs	<i>Polychlorinated biphenyl.</i> Bifenilos policlorados
PCDDs	<i>Polychlorinated dibenzo-p-dioxins.</i> Policlorodibenzo-p-dioxinas
PCDFs	<i>Polychlorinated dibenzofurans.</i> Policlorodibenzofuranos
PDI	<i>Protein disulfide isomerase.</i> Proteína disulfuro isomerasa
pI	<i>Isoelectric poin.</i> Punto isoelectrico
PKC	<i>Protein Kinase C,</i> Proteína quinasa C
PLS-DA	<i>Partial least squares Discriminant Analysis.</i> Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales
PMF	<i>Peptide Mass Fingerprinting.</i> Huella peptidica
PMSF	<i>PhenylMethylSulphonyl Fluoride.</i> Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PND	Parque Nacional de Doñana (DNP Doñana National Park)
POP	<i>Persistent organic pollutants.</i> Contaminantes organicos persistentes
PP2A	<i>Protein phosphatase.</i> Proteína fosfatasa 2
PPH	<i>Phosphopyruvate hydratase.</i> Fosfopiruvato hidratasa

P-SH	<i>Protein sulfhydryl groups.</i> Sulfidrilos proteicos
PTMs	<i>Post translational modification.</i> Modificaciones postraduccionales
PTP1B	<i>Protein-tyrosine phosphatase .</i> Proteína tirosina fosfatasa
PUFA	<i>Polyunsaturated fatty acids.</i> Acidos grasos poliinsaturados
PVDF	Polyvinylidene fluoride. Polifluoruro de vinilideno
Qq-TOF	<i>Quadrupole time-of-flight mass spectrometer</i>
qRT-PCR	<i>Quantitative RT-PCR.</i> RT-PCR cuantitativa
RE	Reticulo endoplasmatico
RMN	Resonancia magnetica nuclear
RNS	<i>Reactive Nitogen Species.</i> Especies reactivas de Nitrogeno
ROC	Arroyo de la Rocina
RONS	<i>Reactive Oxygen/Nitogen Species.</i> Especies reactivas de Oxigeno/nitrogeno
ROS	<i>Reactive Oxygen Species.</i> Especies reactivas de oxigeno
SAH	<i>S-Adenosyl-homocysteine.</i> S-adenosilhomocisteina
SAM	<i>S-adenosylmeteionine.</i> S-adenosilmeteonina
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis.</i> Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sulfato sódico
SOD	<i>Superoxide dismutase.</i> Superoxido dismutasa
TBA	<i>Thiobarbituric acid.</i> Acido tiobarbiturico
TBARS	<i>Thiobarbituric acid reactive substances.</i> Sustancias reactivas al acido tiobarbiturico
TBP	<i>Tributylphosphine.</i> Tributilfosfina
TCA	<i>Tricarboxylic acid (cycle).</i> Acidos tricarboxílicos (ciclo de)
TFA	<i>Trifluoroacetic acid .</i> Acido trifluoroacético
TGA	<i>Triglyceride.</i> Triacilglicerido
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor.</i> Factor de necrosis tumoral
TOF	<i>Time of flying.</i> Tiempo de vuelo
TRIS	<i>Tris-(hydroxymethyl)aminomethane.</i> Tris-(Hidroximetil) Aminometano.
TUBA	<i>Tubulin.</i> Tubulina
TUBA	<i>α-tubuline.</i> α -tubulina
TUBB	<i>β-tubuline.</i> β -tubulina
VIP	<i>Variable importance projection.</i> Variable Influencia sobre la proyección



RESUMEN/ABSTRACT

La contaminación ambiental es uno de los mayores retos a los que se enfrenta el mundo actual. A medida que el impacto de las actividades humanas y los problemas de salud ambiental se convierten en globales en escala y extensión, la necesidad de identificar y hacer frente a los riesgos para la salud asociados a la contaminación se vuelve más urgente. Sin embargo, para realizar una actuación eficaz hay que comprender no sólo la magnitud del problema, sino también sus causas y los procesos subyacentes, pues solo así puede esa intervención enfocarse a donde más se necesita y donde puede ser más efectiva.

El parque Nacional de Doñana (PND), fundado en 1969 y declarado Patrimonio de la Humanidad en 1981, es un ecosistema de marismas, arroyos y dunas de arena situado en la desembocadura del río Guadalquivir (SO de España), que alberga millones de aves migratorias y especies en peligro de extinción. Las marismas del PND se alimentan de los arroyos de la Rocina, el Partido y el Guadiamar y del río Guadalquivir. A pesar de ser un espacio protegido, el PND se ve amenazado por la presencia de áreas de agricultura intensiva localizadas en sus inmediaciones y por los polígonos industriales ubicados en la ría de Huelva (40 km al Oeste). Es, por tanto, esencial el desarrollo de nuevas herramientas para una evaluación preventiva de la salud ecológica del PND

Las respuestas a nivel molecular o celular en organismos centinela que habitan zonas contaminadas pueden dar información completa y biológicamente relevante del posible impacto de mezclas complejas de contaminantes tóxicos en la integridad del ecosistema. Ventajas importantes de esta aproximación son la capacidad de las especies bioindicadoras elegidas para detectar la aparición temprana diversas condiciones de estrés, y su utilidad para monitorizar la progresión o la regresión de esa perturbación ambiental a distintos niveles de organización biológica. Los biomarcadores "convencionales", como la medida de cambios de actividad de enzimas antioxidantes o biotransformadoras, tienen un sesgo importante para evaluar la contaminación, pues se centran solo en algunas respuestas biológicas, excluyendo otras cuya relación con la contaminación es aún desconocida. En contraposición, las tecnologías *ómicas* se están convirtiendo en una poderosa estrategia en estudios medioambientales. Las *ómicas* difieren de la investigación tradicional dirigida por hipótesis en que son aproximaciones para el descubrimiento de nuevas respuestas. En este sentido, la Proteómica Ambiental identifica las relaciones

entre los cambios de expresión de proteínas y la contaminación. La determinación de cambios en los perfiles proteicos puede proporcionar una muy valiosa información sobre los mecanismos de respuesta a la exposición a un contaminante o cualquier otro factor de estrés ambiental. La metabolómica es otro método eficaz para evaluar el estado de salud de los organismos basado en la identificación de metabolitos de bajo Mr, cuya producción y niveles varían con el estado fisiológico, patológico o de desarrollo de células, tejidos, órganos o el organismo completo.

Este trabajo se ha propuesto desarrollar algunas de estas nuevas herramientas analíticas para evaluar la salud ambiental de los ecosistemas que rodean al PND, para dar respuesta a la preocupación social originada por la supuesta presencia de contaminantes en el corazón del Parque. Se utilizó *Procambarus clarkii* como especie bioindicadora. Este crustáceo decápodo (cangrejo rojo) fue introducido en 1973 en la cuenca baja del Guadalquivir (SO España), donde su población alcanzó alta densidad. Su largo ciclo de vida, amplia distribución geográfica y sedentarismo, hacen de esta especie un buen bioindicador para evaluar los efectos de los contaminantes, tanto en condiciones controladas como en entornos reales.

Considerando las distintas actividades antropogénicas que amenazan al PND y las vías por las que los contaminantes pueden acceder a él, se capturaron ejemplares de *P. clarkii* en puntos clave de varios de los arroyos que alimentan los acuíferos del PND, y que traen aguas desde zonas urbanas o donde se practican labores de agricultura intensiva situadas en los alrededores. Al NE, las capturas se hicieron en la zona del Matochal (MAT) en las marismas entre el Guadiamar y el Guadalquivir, donde están los campos que producen la mayor parte del arroz de nuestro país. Hacia el NO, se capturaron animales en los arroyos del Partido (PAR) y la Rocina (ROC), donde se cultivan cítricos y fresas y se usan grandes cantidades de agroquímicos. Como referencia se capturaron animales en una laguna del interior del Parque (LP), en principio, alejada de las fuentes de contaminación.

Hay una enorme deficiencia de conocimiento acerca de cómo la contaminación por agroquímicos está afectando la calidad medioambiental del Parque, pues este tipo de contaminación es difusa y difícil de evaluar. La agricultura convencional utiliza gran cantidad de productos agroquímicos (fertilizantes, herbicidas, insecticidas, pesticidas) que

pueden causar la entrada inadvertida de metales pesados en el medio ambiente. Los metales son muy tóxicos para la vida acuática, ya que persisten en el ambiente y se acumulan en los organismos, por lo que se magnifican sus efectos a través de la cadena alimentaria. Varios estudios han demostrado que las especies reactivas de oxígeno y el estrés oxidativo juegan un papel clave en la toxicidad y carcinogenicidad de los metales, pues la exposición a metales afecta a los orgánulos y componentes celulares, como la membrana celular, mitocondria, lisosomas, retículo endoplasmático, el núcleo y algunas enzimas implicadas en el metabolismo, la desintoxicación y reparación del daño al DNA.

Se usó la metodología ICP-MS para analizar el contenido de metales en tejidos de *P. clarkii* y los sedimentos de las zonas donde viven y que pueden ingerir, encontrándose una correlación directa entre los niveles de metales de la glándula digestiva y branquias y de los sedimentos. También se analizaron los daños oxidativos de lípidos y proteínas (carbonilación) y se midieron los niveles de tioles reversiblemente oxidados en residuos Cys proteicos, como indicadores de alteraciones en rutas de señalización controladas por el estatus redox celular. La acumulación de metales esenciales o tóxicos en los animales iba en paralelo con la cantidad de daños observados en lípidos y proteínas, y con una importante desregulación del estado de oxidación de tioles de muchas proteínas implicadas en estrés del retículo endoplásmico, defensa enzimática antioxidante, desbalance de la respiración mitocondrial, disminución de la tasa glucolítica y en un cambio metabólico que dirige la glucosa hacia la ruta de las pentosas fosfato, para generar poder reductor necesario para que funcionen las enzimas antioxidantes y el metabolismo de la glucosa.

Para profundizar en el conocimiento de las alteraciones metabólicas causadas por la contaminación ambiental en los tejidos de *P. clarkii*, se llevó a cabo un estudio mediante proteómica cuantitativa (2DE-DIGE) para identificar cambios en los niveles de expresión de proteínas que pudieran dar nueva información sobre los mecanismos de toxicidad que se generan tras la exposición a contaminantes. Los cangrejos de zonas contaminadas presentaron alteraciones en los niveles de proteínas implicadas en el estrés oxidativo, procesos inflamatorios y de regulación epigenética de la expresión génica. En estos cangrejos se detectó un cambio metabólico dirigido hacia la glucólisis aerobia, para generar ATP y NADPH en una situación de estrés oxidativo que altera la integridad

mitocondrial. Estas proteínas diferencialmente expresadas podrían servir como biomarcadores de exposición, además de permitir identificar los procesos metabólicos y fisiológicos alterados por los contaminantes presentes en PND y sus alrededores.

Por último, para obtener información más completa sobre la respuesta bioquímica de *P. clarkii* a la exposición crónica a contaminantes ambientales, se usó la metabolómica como un método eficaz para evaluar el estado de salud de los organismos. Los resultados del estudio metabolómico mediante espectrometría QqQ-TOF-MS, corroboran y complementan los datos proteómicos. Los metabolitos cuyos niveles se vieron alterados por contaminación indicaban estrés oxidativo, disfunción metabólica y dislipidemia.

Los estudios a gran escala utilizando *ómicas* se han aplicado con éxito para explorar las diferencias en la abundancia de metabolitos y proteínas y de modificaciones post-traduccionales que pueden sufrir éstas. Integrados con los datos bioquímicos, los resultados presentados en esta tesis dan un nuevo punto de vista sobre los procesos celulares que ocurren en células de organismos expuestos a contaminantes ambientales. La integración de las distintas aproximaciones omicas empleadas permite establecer que la exposición crónica de cangrejos de río *P. clarkii* a la contaminación provoca cambios en muchas funciones fisiológicas relacionadas con la defensa contra el estrés oxidativo, tales como el estrés del retículo endoplasmático, la inflamación y la respuesta inmune, y cambios en el metabolismo energético para adaptarse a una situación en la que la función mitocondrial se ve comprometida por el daño oxidativo en lípidos y membranas biológicas.

Environmental pollution is one of the greatest challenges that the world is facing today. As the impact of human activities and issues of environmental health become global in scale and extent, the need to recognize and to address health risks associated with environmental pollution becomes more urgent. Effective action, however, requires an understanding not only of the magnitude of the problem, but also its causes and the underlying processes, so that actions can be targeted where they are most needed and likely to have greatest effect.

Doñana National Park (DNP), established in 1969 and declared a World Heritage Site in 1981, is an area of marsh, shallow streams and sand dunes located at the mouth of the Guadalquivir River (SW Spain), and shelters millions of migratory birds and endangered species. DNP marshes are fed by the Rocina, Partido and Guadiamar streams and by Guadalquivir River. Despite being a protected space, DNP is threatened by areas of intense agriculture located nearby, and by industrial settlements located at Huelva Estuary (40 km West). The development of new time and cost effective tools for predictive evaluation of DNP ecological health is hence, essential.

Responses at molecular or cellular levels in resident organisms can provide complete and biologically relevant information on the potential impact of complex mixtures of toxic pollutants on the ecosystem. An important advantage of this approach is the ability of the selected bioindicator species to detect the early occurrence of stress conditions and its use to monitor the progression or regression of environment disturbance at several levels of biological organization. “Conventional” biomarkers, such as the activity of biotransforming or antioxidative enzymes, are quite biased for pollution assessment because they concentrate in few biological responses but exclude others whose relationship with pollution is still unknown. By contrast, direct *omic* approaches are becoming a powerful strategy in environmental studies. Omics differs from traditional hypothesis-driven research because it is a discovery-driven approach. Environmental Proteomics studies the relationship between pollution and protein expression changes. Proteome-associated profiling can provide a greater insight into the mechanism of a response to chemical contaminant exposure or to diverse environmental stressors. Metabolomics is also an effective approach to assess the health status of organisms via identification of low Mr metabolites, whose production and levels vary with the

physiological, developmental, or pathological state of cells, tissues, organs or whole organisms.

This study aimed to develop some new analytical tools to assess the environmental health of the ecosystems surrounding DNP to give response to the social concern raised by the putative presence of contaminants at the DNP core. We have used *Procambarus clarkii* as the bioindicator species. This decapod crustacean (red crayfish) was introduced in 1973 into the lower Guadalquivir Basin (SW Spain), where it reached dense populations. Its long life-cycle, wide distribution, and sedentary lifestyle make it a good bioindicator species to assess the effects of contaminants, under controlled conditions and in real environments.

Given the different human activities that threaten DNP and the paths followed by contaminants to access it, *P. clarkii* specimens were captured at key points of several streams that feed DNP aquifers, coming from the urban and/or intensive agriculture areas located nearby. To the NE, the marshes between the Guadiamar stream and Guadalquivir River (Matochal area, MAT) are responsible for most of the rice produced in Spain. To the NW, near the Partido (PAR) and the Rocina (ROC) streams, strawberry and citrus are cultured using large amounts of agrochemicals. Reference animals were captured in a lagoon inside the Park (LP), supposedly away from any contamination source.

The most serious gap in the knowledge about environmental quality within Doñana is related to agrochemical pollution, as this type of contamination is diffuse and difficult to assess. Conventional agriculture is based upon a high input of agrochemicals (fertilizers, herbicides, insecticides, pesticides) that may cause the inadvertent addition of heavy metals to the environment. Metals are highly toxic for human and aquatic life, as they persist in the environment and progressively accumulate into the organisms, so their effects biomagnifies through the food chain. Several studies have demonstrated that production of reactive oxygen species and oxidative stress play a key role in the toxicity and carcinogenicity of metals, since metal exposure affects cellular components such as plasma membrane, mitochondria, lysosomes, endoplasmic reticulum, nuclei, and some enzymes involved in metabolism, detoxification, and repair of DNA damage.

We analyzed by ICP-MS the metal contents in *P. clarkii* tissues and in the sediments where they dwell. Metal levels in *P. clarkii* digestive gland and gills reflect

sediment contents. We also analyzed the oxidative damage to *P. clarkii* lipids and proteins (carbonylation) and measured the level of reversibly oxidized thiols in protein Cys residues as an indicator of redox-driven signaling pathways alterations. Accumulation of essential and toxic metals was paralleled by clear signs of oxidative stress to lipids and proteins and by significant deregulation of many proteins involved in endoplasmic reticulum stress; antioxidative defense; mitochondrial respiratory imbalance, reduced glycolysis and a metabolic shift that diverts glucose into the pentose phosphate pathway to generate reducing power for antioxidant enzymes, and for glucose metabolism.

To gain a deep insight into the metabolic alterations caused by environmental pollution in *P. clarkii* we used quantitative 2DE-DIGE proteomics to identify changes in the expression levels of proteins that might potentially provide new insights into toxicity mechanisms that are generated following exposure to contaminants. Polluted crayfish had altered levels of proteins involved in oxidative stress and epigenetic and inflammatory processes. They showed also a metabolic shift to enhanced aerobic glycolysis, to generate ATP and NADPH in an oxidative stress situation that altered mitochondrial integrity. The deregulated proteins may be useful as pollution biomarkers, and can also give insight about the metabolic pathways and/or physiological processes affected by pollutants in DNP and its surrounding areas.

Finally, to acquire deeper information on *P. clarkii* response to chronic exposure to environmental pollutants, we used metabolomics as an effective approach to assess the health status of organisms. The QqQ-TOF-MS metabolomic results corroborated and completed the proteomic data. Several metabolites were discovered as potential pollution biomarkers, indicating oxidative stress, metabolic dysfunction, and dyslipidemia.

Large-scale studies in the field of omics have been successfully applied to explore the differences in protein and metabolite abundance and post-translational modification of protein. Combined with biochemical data, the results presented in this Thesis provides a “fresh” view for the cellular processes that occur in organisms under environmental pressure. This integrative approach allows to establish that chronic exposure of *P. clarkii* crayfish to pollution causes changes in many physiological functions related to defense against oxidative stress, such as endoplasmic reticulum stress,

inflammation and immune response, as well as alterations in energy metabolism to adapt to a situation in which the mitochondrial function is compromised by oxidative damage to lipids and biological membranes.



INTRODUCCIÓN
GENERAL

Contaminación ambiental

Se entiende por contaminación la presencia en el medio ambiente de uno o más contaminantes o cualquier mezcla de ellos con capacidad para degradar su calidad y perjudicar la flora, fauna, y/o el bienestar humano. Entre los distintos tipos de contaminantes, los químicos (aniones inorgánicos, metales pesados y compuestos orgánicos) constituyen el grupo más importante, debido a su gran número y omnipresencia en el medio ambiente. Se fabrican en la actualidad más de 140.000 compuestos químicos diferentes, un tercio de los cuales son considerados perjudiciales para la salud, en el sentido de que se sabe, o se sospecha, que pueden causar cáncer, mutaciones, defectos al nacimiento o son tóxicos en general. La producción global de compuestos químicos es de unos 30 millones de Tm al año, calculándose que se triplicará para mediados de siglo (Fig. 1). Con todo, estos compuestos químicos son solo una pequeña parte de los contaminantes que cada año entran en los ecosistemas: 130 millones de Tm de nitrógeno y fósforo a consecuencia de la producción de alimentos o el ineficiente manejo de desechos; 400 millones de Tm de residuos peligrosos; 13 billones de Tm de combustible fósiles; 30 millones de Tm de residuos minerales; 35 billones de Tm de carbón y 75 billones de Tm de suelo superficial, la capa orgánica del suelo que se elimina de las zonas donde se desarrollan proyectos mineros ¹.

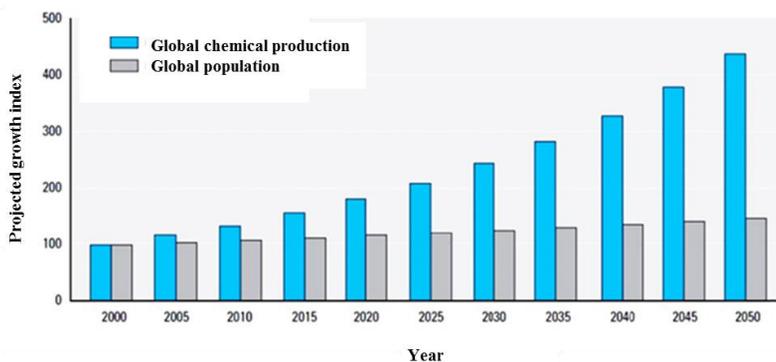


Figure 1. Projected growth in worldwide chemical production and global population through 2050

La contaminación se ha convertido en el más serio de los problemas medioambientales, suponiendo una enorme amenaza para la salud de personas y ecosistemas. Son numerosos los estudios que relacionan contaminación y desórdenes perinatales, mortalidad infantil, problemas respiratorios, alergia, tumores, enfermedades cardiovasculares, incremento de estrés oxidativo, disfunción endotelial, desórdenes mentales y un largo etcétera de enfermedades ligadas a la exposición a una cantidad creciente de compuestos en la atmósfera, en las aguas y los suelos, especialmente en áreas industriales y urbanas. Se estima que la contaminación se convertirá en la principal causa de mortalidad prematura en el mundo en torno al año 2050 (Fig. 2)².

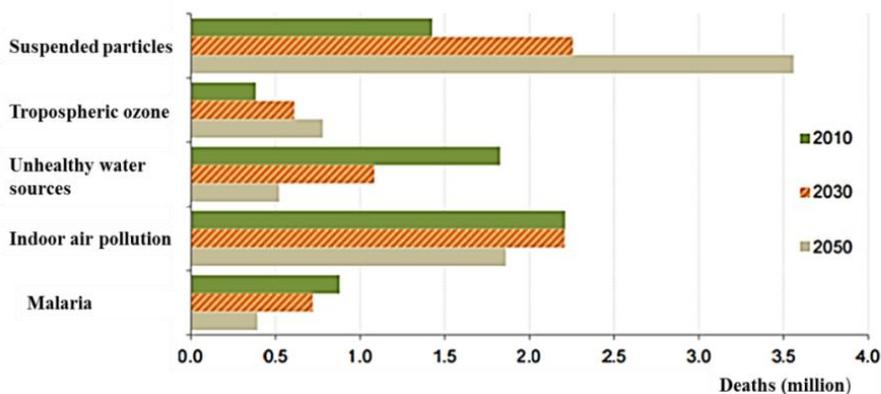


Figure 2. Global premature deaths from selected environmental risks: Baseline, 2010 to 2050.

La entrada de contaminantes a los ecosistemas suele ocurrir por una liberación no intencional: accidentes, catástrofes, aguas residuales, efluentes industriales, uso de biocidas, etc. En general, solo somos conscientes de los riesgos cuando se producen grandes catástrofes que causan la muerte de numerosos seres vivos. Sin embargo, aunque menos visible, es mucho más importante la entrada continua de contaminantes debido a los residuos urbanos e industriales, introducción de nuevos plaguicidas y fertilizantes en la agricultura intensiva, aumento y concentración de población en ciudades, regulación de cauces, actividades mineras, etc.

Algunos de compuestos liberados al medio son degradados químicamente o por microorganismos, pero otros permanecen en suelos y agua y pueden entrar en los organismos expuestos a ellos y ser transferidos a los próximos niveles tróficos³,

apareciendo sus efectos dañino, en ocasiones, mucho tiempo después. Por esta razón, el seguimiento medioambiental se está convirtiendo en algo de vital importancia para detectar dónde ocurre la contaminación, los contaminantes implicados, sus fuentes y para evaluar sus efectos sobre los seres vivos.

La Tabla 1 se resume los principales tipos de contaminantes ambientales, que se comentan brevemente a continuación.

Pollutant type	Source
Organic pollutants	
PCBs	Industry
Aromatic hydrocarbons	Industry, petroleum related activities
Pesticides	Agricultural activities
Sewage water	Urban areas, farms
Detergents	Industry, urban
Sediments	Industry, mining, urban
Inorganic pollutants	
Metals	Industry, mining
Organometalic compounds	Pantings
Radionucleids	Nuclear power plants
Asbests	Industry

Table 1 . Main types of pollutants in the environment

Contaminantes orgánicos.

Son resistentes a degradación medioambiental y persisten en el ambiente (se denominan *persistent organic pollutants, POP*), por lo que se acumulan en los organismos, principalmente en tejidos ricos en lípidos, resultan difícilmente excretables y acaban ejerciendo graves efectos nocivos sobre la salud de humanos y ecosistemas.

Los *policlorobifenilos (PCB)* son contaminantes orgánicos polihalogenados estables a temperaturas elevadas, no inflamables, de baja conductividad eléctrica y resistentes a ácidos, bases y oxidación ⁴. Por estas propiedades se han usado como dieléctricos, fluidos lubricantes, de transferencia de calor, hidráulicos, retardantes de llama, y también como plastificantes en pinturas ⁵. Los PCB se encuentran entre los

contaminantes más persistentes en el medio debido a su gran estabilidad y su muy lenta biodegradabilidad (su vida media oscila entre los 10 y 15 años), por lo que actualmente su empleo está muy restringido, sobre todo en sistemas abiertos, donde no puede controlarse su dispersión.

Dioxinas y *furanos* son los nombres vulgares de dos grupos de sustancias organocloradas, las policlorodibenzo-p-dioxinas (PCDD) y los policlorodibenzofuranos (PCDF), entre los que incluyen algunos de los compuestos más tóxicos conocidos en la actualidad. Son productos secundarios generados durante la síntesis de otros compuestos. Tienen elevada persistencia y son fácilmente bioacumulables ^{4 6}.

Los *hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH)* (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) son compuestos con varios anillos bencénicos, poco solubles en agua y fácilmente acumulables en tejidos grasos, que se generan por combustión incompleta de derivados del petróleo. Muchos PAH, como el benzo(a)pireno y el benzo(a)antraceno se convierten en potentes mutágenos y carcinógenos cuando actúan sobre ellos enzimas biotransformadoras como los citocromos ⁷.

Los *plaguicidas* se usan ampliamente para combatir los parásitos de cultivos, ganado, animales domésticos, del hombre y del ecosistema en general. El enorme beneficio de estos compuestos sobre la abundancia y calidad de cultivos y ganados contrasta con los problemas de carácter medioambiental derivados de su uso. Los *plaguicidas organoclorados* se caracterizan por su baja solubilidad en agua y su gran liposolubilidad. Son muy persistentes y bioacumulables, más que el resto de los plaguicidas. Ello llevó a su prohibición hace ya más de 40 años en los países desarrollados, aunque se siguen usando para el control de la malaria y de la enfermedad causada por el virus Zika, en países tropicales productores de buena parte de los alimentos que se consumen en otros lugares del mundo. Otro importante grupo son los *organofosforados*, derivados de los ácidos fosfórico y tiosfosfórico. Aunque algunos tienen alta toxicidad, se consideran en conjunto más aceptables que los halogenados desde el punto de vista medioambiental, por su corta vida y escasa bioacumulación⁸. Los *carbamatos*, derivados del ácido carbámico, se suelen usar si los organofosforados no son efectivos. Al igual que los organofosforados, no son muy persistentes en el medio ambiente ni muy bioacumulables, por lo que su uso está autorizado ⁸.

Metales

Entre los contaminantes potencialmente más tóxicos para el medio ambiente se encuentran los metales pesados como cadmio (Cd), cobre (Cu), cromo (Cr), mercurio ⁹, manganeso (Mn), níquel (Ni), plomo (Pb) y metaloides como arsénico (As). Dichos elementos forman parte de los ciclos biogeoquímicos, que determinan su presencia y concentración en agua, aire, suelo y biota. Las actividades de origen antropogénico (minería, procesos industriales, agricultura, transporte), los vertidos accidentales y procesos naturales como la actividad volcánica, la meteorización química y la ventilación oceánica, alteran estos ciclos y modifican la concentración de los metales, que se distribuyen por todos los niveles de los ecosistemas, poniendo en peligro a éstos y a todos los organismos que los habitan.

La elevada toxicidad de los metales radica en su alta persistencia, rápida acumulación en los organismos vivos, formación de asociaciones químicas complejas y reactividad ^{10, 11}. A nivel celular, los metales pesados generan, entre otros daños, especies reactivas del oxígeno que provocan estrés oxidativo y daños a biomoléculas, llegando a comprometer seriamente la homeostasis celular y desencadenando diversos mecanismos compensatorios a nivel molecular que pueden servir para medir su presencia en el medio y el grado de exposición del organismo ¹²⁻²¹.

Evaluación de la calidad ambiental: Bioindicadores y biomarcadores

Indicadores de contaminación ambiental

El impacto de los contaminantes en los ecosistemas se puede evaluar mediante diferentes metodologías. Tradicionalmente se ha utilizado la valoración físico-química de la presencia del contaminante en el medio, estableciéndose umbrales de concentración para algunas sustancias tóxicas como indicadores de calidad ambiental. Pero los efectos de la entrada de contaminantes a un ecosistema pueden persistir mucho después de que los parámetros físico-químicos hayan vuelto a la normalidad (los ecosistemas necesitan tiempo para recuperarse). La información obtenida a través de los análisis químicos no es

suficiente para conocer la contaminación de un ecosistema, pues estos análisis precisan: (i) que se conozca previamente cuáles son los contaminantes presentes, (ii) sólo detectan los contaminantes que se encuentran a concentraciones superiores a los límites de detección de cada técnica, (iii) no informan de posibles interferencias y, sobre todo, (iv) no informan sobre los efectos biológicos de los contaminantes ²⁰. Esta información se consigue gracias a la biomonitorización, mediante el análisis en un organismo vivo, de una serie de parámetros biológicos cuya alteración respecto a las condiciones naturales indica una perturbación del ecosistema, informando así tanto de la presencia (de hecho, algunos procesos de contaminación se detectan mejor por un seguimiento biológico ²²) como del efecto de los contaminantes en los seres vivos ⁵.

Bioindicadores

Un bioindicador es un organismo o un conjunto de ellos que responden a la variación de un determinado factor abiótico o biótico del ecosistema, de tal manera que la respuesta queda reflejada en el cambio de valor de una o más variables; estas variables o características, se denominan biomarcadores. Los bioindicadores deben ser organismos muy sensibles a su ambiente, que cambian aspectos de su forma o de sus funciones biológicas y que desaparecen o, por el contrario, prosperan ante la contaminación de su medio. Un bioindicador ideal debe tener amplia distribución; ser una especie no protegida, con progenie relativamente abundante, que permita una captura/recolección fácil; ser sésil o vivir en territorio restringido y ser bien conocido a nivel bioquímico y fisiológico ²³.

Los bioindicadores biológicos pueden medir la salud de un ecosistema actuando como indicadores ecológicos, permitiendo medir parámetros que describen la estructura y funcionamiento de los ecosistemas ²⁴. También pueden dar información sobre las condiciones ambientales de su hábitat con su presencia/ausencia o cambios de conducta. Pero muchas veces los contaminantes causan alteraciones sin efectos visibles externos que requieren el uso de biomarcadores, cuyos niveles proporcionan información sobre la exposición, la posible interacción de los contaminantes (antagonismos, sinergias, efectos aditivos) y las transformaciones de las sustancias al ingresar en los organismos ^{5, 8, 20}.

Biomarcadores

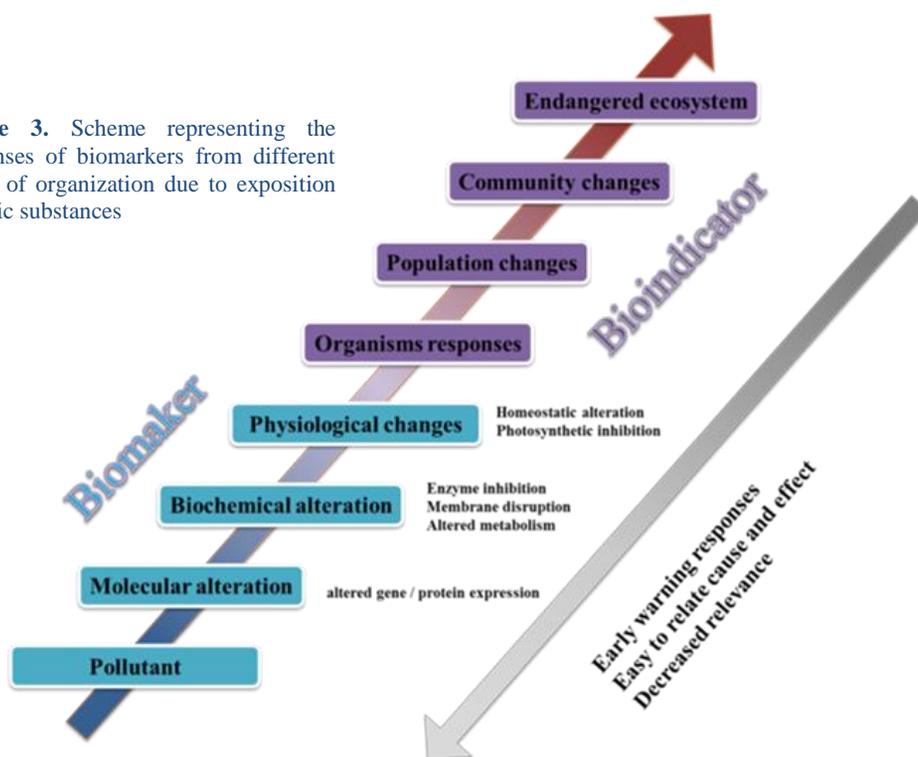
Los biomarcadores se definen como *parámetros medidos en fluidos biológicos, células, tejidos o animales que indican en términos bioquímicos, celulares, fisiológicos o energéticos la presencia de contaminantes, sus efectos biológicos o los riesgos de su presencia en los ecosistemas*^{7, 20}. Son numerosos y diversos los parámetros que se han venido usando como bioindicadores: bioacumulación de contaminantes, tasas de respiración y otros parámetros fisiológicos, alteraciones en el comportamiento, la calidad de la cáscara del huevo, el blanqueamiento del coral, etc. La Tabla 2 resume algunos biomarcadores habituales de contaminación correspondientes a diferentes niveles de organización y sus capacidades de detección. Entre ellos, los **biomarcadores moleculares** y **celulares** son los de mayor significado toxicológico, los más sensibles y los primeros que se alteran, por lo que sirven como alertas tempranas ante los efectos ambientales de los contaminantes y avisan antes de que el ecosistema sufra daños irreversibles.

Table 2: Some conventional biomarkers

Biomarker	Biological response	Organization level	Response time	Usability
DNA damage	Adduct formation	Molecular	Early	Low
Monooxygenases	Induction	Molecular	Early	Moderate
Metabolites	Xenobiotics	Molecular	Early	Low
Antioxidant enzymes	Defense against oxidative stress	Molecular	Early	Moderate
Cholinesterase	Inhibition	Molecular	Early	Moderate
Heme synthesis	Abnormal porphyrins	Molecular	Medium	Moderate
Chromosomal aberrations	Abnormal DNA	Subcellular	Medium / late	High
Immunocompetence	Phagocytosis	Cell	Medium / late	Moderate
Cell transformation	Necrosis / neoplasia	Cell / tissue	Late	High
Condition index	Variation in increase rates	Organism	Late	High
DNA damage	Adducts formation	Organism	Late	High

La Fig.3 muestra los tipos de biomarcadores moleculares pertenecientes a distintos niveles de organización y tiempos de respuesta biológica a la exposición a sustancias tóxicas.

Figure 3. Scheme representing the responses of biomarkers from different levels of organization due to exposition to toxic substances



Un biomarcador ideal debería ser específico para un compuesto químico o un reducido número de ellos, detectable en pequeñas cantidades mediante técnicas baratas y de fácil manejo, asociado a una exposición anterior y con buen valor predictivo para un estado de alteración específico ²⁵. Aunque algunos biomarcadores son bastante específicos, tales como la inhibición de la enzima δ -aminolevulínico deshidratasa por Pb ²⁰, la mayoría son inespecíficos, pudiendo dar lugar a resultados falsos. Por ello es preciso emplear una batería de biomarcadores, cuyos resultados se complementen, cuando se pretende dar una respuesta integrada a episodios de estrés ambiental ⁵. Los biomarcadores son usados en programas de biomonitorización, cuyos objetivos pueden ser la vigilancia de zonas afectadas o libres de contaminación, la evaluación de riesgos en vertidos peligrosos en zonas de descarga frecuente o la comprobación de la efectividad de las medidas adoptadas tras un episodio de contaminación. El éxito de un estudio de

biomonitorización ambiental requiere un cuidadoso diseño y un plan de ejecución que incluya los pasos indicados en la Fig. 4.

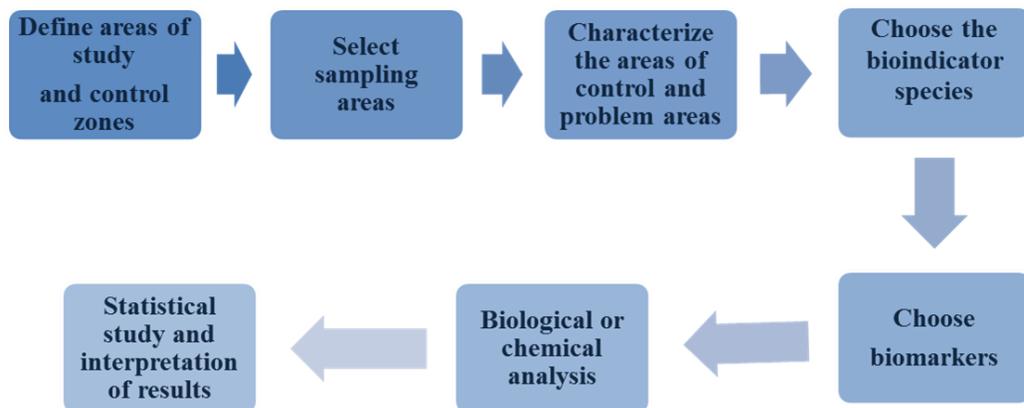


Figure 4. Schematic representation of the different biomonitoring stages

Biomarcadores convencionales

Los biomarcadores moleculares o celulares 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 de que los ecosistemas sufran daños irreversibles. Tradicionalmente se han venido utilizando como biomarcadores moleculares aquellos que detectan la inducción de sistemas antioxidativos o biotransformadores, la expresión de sus correspondientes genes, los niveles de biomoléculas dañadas o el aumento de actividad de los mecanismos de reparación.

Estrés oxidativo, daños a biomoléculas y sistemas antioxidantes

Los organismos aerobios han desarrollado mecanismos para utilizar O_2 como aceptor final de electrones en la respiración celular, un sistema de producción de energía altamente eficiente que genera hasta a36 moléculas de ATP por molécula de glucosa oxidada. Esta ruta metabólica supuso una gran ventaja evolutiva para los organismos aerobios, pero trajo, como efecto colateral, la producción intracelular de radicales libres y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno ROS/N (Tabla 3) debido a que pequeñas cantidades de O_2 (~5%) pueden ser metabolizadas por otras vías, catalizadas

enzimáticamente o no, que implican etapas secuenciales de reducción monovalente del oxígeno (Fig. 5) ^{26, 27}.

Table 3. Some free radicals and their generation mechanisms

Free Radical		Most common reaction that causes
•O ²⁻	Superoxide radical	$\text{NADPH} + 2 \text{O}_2 \rightarrow \text{NADPH} + \text{H}^+ + 2 \text{•O}^{2-}$
•OH-	Hydroxyl radical	$\text{•UQ} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{UQ} + \text{•OH} + \text{•OH}^-$
RO ² •	Peroxyl radical	$\text{LH} + \text{RO}_2 \cdot \rightarrow \text{L} \cdot + \text{H}_2\text{O}$
RO•	Alkoxy or phenoxy radical	$\text{R} \cdot + \text{O}_2 \rightarrow \text{RO} \cdot$
L•	Radical lipid peroxide	$\text{L O}^{2 \cdot} + \text{LH} \rightarrow \text{LOOH} + \text{L} \cdot$
•NO ₂	Nitric oxide radical	$\text{•OH} + \text{NO}^{2-} \rightarrow \text{OH}^- + \text{•NO}_2$

Entre estas ROS/N, inestables y en la mayoría de los casos con un electrón desapareado (radicales libres), destacan por su alta reactividad química los radicales anión superóxido (O₂^{•-}); hidroxilo (OH[•]), peroxilo (RO₂[•]) y alcoxilo (RO[•]) y otros derivados como el peroxinitrito (ONOO⁻) y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

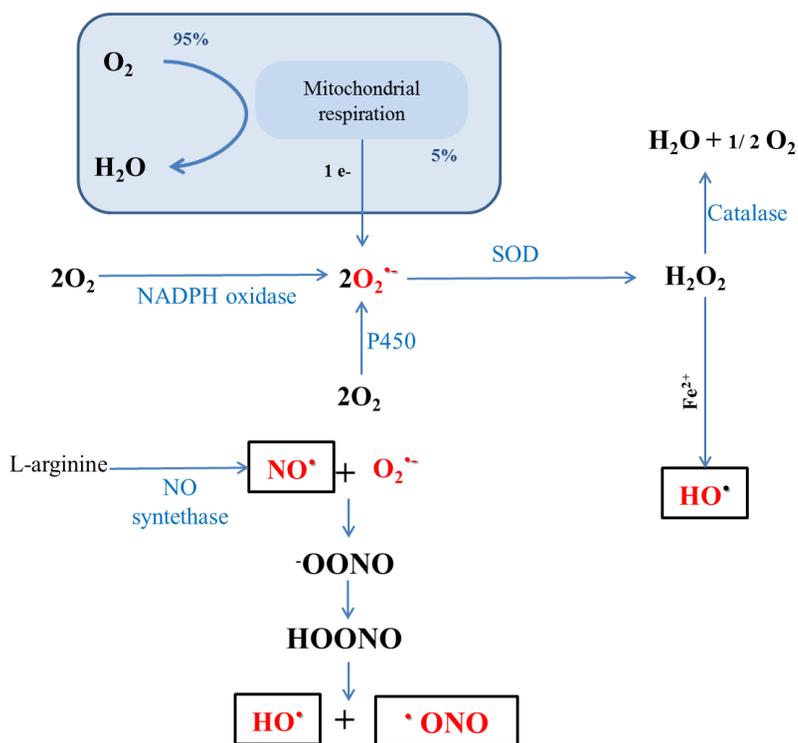


Figure 5. Generation of reactive oxygen and nitrogen species by mono-electronic reduction of O_2 . Approximately 95% of the oxygen consumed in mitochondria is converted to water while 5% undergoes one electron reduction to superoxide, origin of several other ROS/N. Redox enzymes are denoted in blue.

Numerosas reacciones químicas conllevan la producción de $O_2^{\bullet -}$, como la oxidación de pequeñas moléculas endógenas (semitquinonas, flavinas, tioles, catecolaminas) y de metales de transición; actuación de oxidasas y deshidrogenasas (NADPH-citocromo P_{450} reductasa, NADH oxidasa, xantina oxidasa) y las implicadas en las cadenas de transporte electrónico del retículo endoplásmico (sistema de monooxigenasas) y de las mitocondrias. Asimismo, se produce $O_2^{\bullet -}$ durante el metabolismo de algunos xenobióticos, como quinonas (benzo(a)pireno), bifenilos (paraquat) en procesos de ciclado redox^{28,29}.

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es la forma menos reactiva de todas las ROS, pero participa en numerosas reacciones que dan lugar a la generación de radicales libres. Además, el H_2O_2 atraviesa con suma facilidad las membranas biológicas, pudiendo dar lugar a reacciones de oxidación en puntos de la célula alejados de su lugar de producción. Se puede formar por dismutación espontánea o enzimática (catalizada por la superóxido dismutasa) del anión superóxido, o por reducción dielectrónica directa del O_2 catalizada por diversas enzimas (ácido graso oxidasa, aminoácido oxidasas, etc.)³⁰. Por el contrario, el radical hidroxilo (OH^\bullet) es una de las especies químicas más reactivas que se conocen. Su vida media es muy corta, reaccionando solo cerca de su lugar de formación, pero lo hace con la mayoría de biomoléculas. Su origen está en la lisis del agua o del H_2O_2 por radiaciones ionizantes o mediante la reducción de éste por iones de metales de transición (reacción de Fenton, Fig. 6)²⁸.

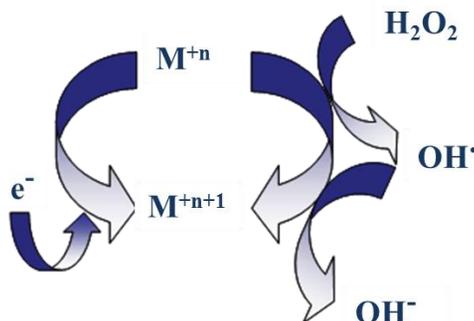


Figure 6. Schematic diagram illustrating the metal-mediated formation of free radicals in the Fenton's reaction.

La generación de ROS/N es algo normal en la célula donde participan en funciones fisiológicas como la fagocitosis, útil para la defensa contra agentes invasores, o en diversas cascadas de señalización celular^{31 16}. Sin embargo, y especialmente cuando están en exceso, también pueden dar lugar a reacciones de oxidación indeseadas contra las cuales los organismos han desarrollado defensas antioxidantes^{18 16}.

El sistema antioxidante está constituido por múltiples líneas de defensa celulares frente a las ROS. En el nivel de *defensas antioxidantes enzimáticas* encontramos enzimas como las superóxido dismutasas, catalasas o glutatión peroxidasas. Las *superóxido dismutasas* (SOD) dismutan el anión superóxido: $2 \text{O}_2^{\bullet-} + 2 \text{H}^+ \leftrightarrow \text{H}_2\text{O}_2 +$

O₂. En eucariotas hay isoenzimas con Cu y Zn (CuZn-SOD) de localización citosólica inhibibles por cianuro, y otras que contienen Mn (Mn-SOD), localizadas en la matriz mitocondrial e insensibles al cianuro³⁰. La actividad SOD es inducible en diversos organismos tanto por contaminantes como por la exposición a altas concentraciones de O₂^{20,26}. La *catalasa* (CAT), con un grupo hemo en su sitio activo, está presente en todos los organismos aerobios de eucariotas²⁸. Dismuta el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno: $2 \text{H}_2\text{O}_2 \leftrightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. La catalasa es más efectiva en situaciones de exceso de ROS, cuando el contenido de glutatión está limitado, mientras que a niveles bajos de ROS actúan mejor el sistema glutatión peroxidasa³² y el de las peroxirredoxinas, que controlan los niveles del H₂O₂ mediando de este modo en la transducción de señales³³. Las *glutatión-peroxidasas* catalizan la reducción de peróxidos orgánicos y de hidrógeno, usando GSH: $\text{R-OOH} + 2 \text{GSH} \leftrightarrow \text{R-OH} + \text{GSSG} + \text{H}_2\text{O}$. Estas enzimas juegan un papel importante en la protección de la célula frente al daño oxidativo evitando la peroxidación lipídica³⁴.

Diversas moléculas actúan como *defensas antioxidantes no enzimáticas*. Son moléculas de origen no proteico capaces de neutralizar las ROS/N, ya sea por su carácter reductor, por su capacidad de secuestrar metales que intervienen en su formación o por actuar como cofactores de antioxidantes enzimáticos. Entre ellos destacan el *glutatión reducido* (GSH), los *carotenoides* y *flavonoides*, la *taurina* y los *ácidos úrico, ascórbico* (vitamina C) y el *alfa-tocoferol* (vitamina E), entre otros³⁵.

Los *sistemas enzimáticos auxiliares* se encargan de mantener niveles adecuados de NADPH y GSH. Entre las que regeneran NADPH destacan la *glucosa-6-P deshidrogenasa* y la *6-P-gluconato deshidrogenasa*, implicadas en la ruta de las pentosas fosfato³⁶. También la isocitrato deshidrogenasa, que produce NADH en el ciclo de Krebs, contribuye a producir NADPH mediante el sistema de interconversión de dinucleótidos de piridina³⁷. Relacionadas con el GSH están la *glutatión sintasa*, encargada de su síntesis y la *glutatión reductasa*, que reduce GSSG a GSH. La *NADPH-quinona oxidoreductasa* o *diaforasa* cataliza la reducción divalente de quinonas a hidroquinonas, evitando así la producción de anión superóxido y el consumo exagerado de NADPH³⁸. En este grupo se incluyen los sistemas de transporte de GSSG y de reparación de daños en el DNA³⁶.

La actuación conjunta de estos sistemas antioxidantes evitan que las ROS causen daños oxidativos a los componentes de la célula ¹⁶ y, como consecuencia, muerte celular y diversos estados patológicos ³⁹. El ataque oxidativo a lípidos se denomina *peroxidación lipídica*, y comienza cuando un radical libre ataca a un carbono de la cadena alifática de un ácido graso, haciendo que se desprenda un átomo de hidrógeno y se forme un radical alquílico: $L_1H + OH^\bullet \leftrightarrow L_1^\bullet + H_2O$. Este radical reacciona seguidamente con O_2 generando un radical peróxido: $L_1^\bullet + O_2 \leftrightarrow L_1OO^\bullet$. Los radicales peróxido pueden reaccionar, a su vez, con cadenas laterales de ácidos grasos adyacentes, formando un radical alquílico y un peróxido lipídico: $L_1OO^\bullet + L_2H \leftrightarrow L_1OOH + L_2^\bullet$ y desencadenando una reacción en cadena ⁴⁰. Si los lipohidroperóxidos (L_1OOH) formados no se eliminan, pueden dar lugar a otros radicales (LO^\bullet) lo suficientemente reactivos como para atacar otras biomoléculas ²⁶ y causar enfermedades como anemia hemolítica, distrofia muscular o cirrosis hepática.

Las proteínas absorben ~70% de las ROS, lo que provoca cambios covalentes en las cadenas laterales de sus aminoácidos. La oxidación de proteínas puede ser directa o indirecta y acabar causando roturas de anillos en residuos de His ⁴¹ y Trp o del enlace peptídico a nivel de Pro. Las modificaciones directas consisten en nitrosilaciones, carboxilaciones, formación de puentes disulfuro y glutationilación. Las modificaciones indirectas ocurren debido a la interacción de las proteínas con productos de la peroxidación lipídica. La carbonilación de proteínas se usa, a menudo, para evaluar el grado de oxidación proteica en la célula ⁴², como veremos en el Capítulo 3. La formación de puentes disulfuro entre los grupos tiólicos ($-SH$) de los residuos de Cys de las proteínas o de éstos con otros tioles de bajo peso molecular como el glutatión reducido (GSH), puede conducir a la inactivación temporal de enzimas ²⁸ y a la alteración del estado redox intracelular (Fig. 8)⁴³⁻⁵⁰.

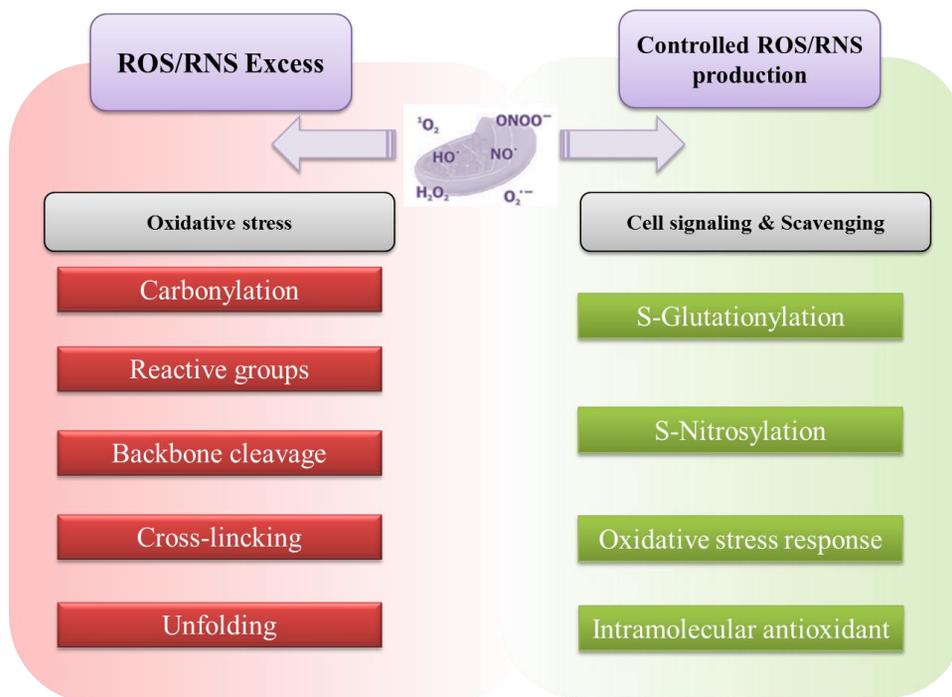


Figure 8. Total contribution of protein modifications to oxidative status in cells. If the ROS/N supply is limited, protein modifications mean intracellular communication and eventually the start of a real oxidative stress response. A ROS/N excess, not countered by scavenger species, causes protein carbonylations, the formation of reactive groups, backbone cleavage, protein unfolding, and loss of function. A severe ROS imbalance inside the cell leads an alteration of cellular function and even to cellular death.

El DNA también es susceptible de daño oxidativo^{27,51}. Este daño incluye roturas de cadena doble y sencilla, deleciones, cambio de bases, aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas. Todas ellas pueden conducir a la aparición de mutaciones. El radical hidroxilo, procedente del metabolismo celular o producido en situaciones de estrés oxidativo, es un intermediario importante.. El número de productos formados como consecuencia del ataque a las bases del DNA por radicales libres supera la veintena. El más estudiado es la 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-oxodG) formada por el ataque del radical hidroxilo al nucleótido dG y que es causa una transversión GC→TA cuando el DNA dañado se replica. Los niveles de 8-oxodG son habitualmente usados como biomarcador de contaminación y estrés oxidativo^{52,53}.

Estrés oxidativo asociado a la exposición a metales

La elevada toxicidad de los metales pesados radica en su elevada persistencia en el medio, su notable acumulación en los organismos vivos y su capacidad de reacción y formación de especies químicas más complejas^{54, 55, 56}. Metales pesados como Cd, Cu, Cr, Hg, Mn, Ni, Pb y metaloides como arsénico As se encuentran entre los contaminantes potencialmente más tóxicos para el medio ambiente.

Tanto los metales esenciales (Fe, Cu, Zn) como los no esenciales y tóxicos (Cd, Cr, As) pueden ejercer funciones pro- o anti-oxidantes. Mientras las antioxidantes estarían esencialmente asociadas a las de las enzimas antioxidantes de las que forman parte, sus acciones pro-oxidantes se producen por generación de ROS (Fe, Cu, Cr, V), por reacción con grupos tiólicos (Hg, Ni, Pb y Cd) o por otros mecanismos, como el desplazamiento de metales fisiológicos de sitios activos de enzimas^{57, 59-61}.

Hierro: En forma de hemoproteínas o centros sulfoférricos, el Fe es el metal de transición más abundante en la célula. Se ha descrito que el Fe de la hemoglobina puede contrarrestar los efectos tóxicos del Pb al evitar competitivamente la unión del Pb a sitios activos de enzimas como la ácido δ -aminolevulínico deshidratasa y la ferroquelatasa⁵⁷. Sin embargo, el Fe tiene una flexibilidad inusual para servir tanto de donador como de aceptor de e^- . Esta propiedad, que lo hace ser un elemento esencial, también es responsable de su toxicidad, pues cataliza reacciones que generan radicales libres.

Cobre: Actúa como cofactor de diversas proteínas y enzimas necesarias para la maduración y ensamblaje de enzimas en diferentes orgánulos celulares (ceruloplasmina y tirosinasa en el aparato de Golgi o citocromo *c* oxidasa en las mitocondrias). La absorción del Cu se produce de manera controlada a través de transportadores específicos de la membrana plasmática^{62,63}, pues su presencia en exceso en la célula conlleva generación de ROS y desplazamiento de iones metálicos esenciales de sitios activos de algunas enzimas, que pierden su estructura tridimensional y su función⁶⁴. Por ello, su ingesta, distribución, utilización y excreción son procesos estrictamente regulados en el organismo⁵⁷

Zinc: Es esencial como ion catalítico, estructural y regulador del crecimiento y el desarrollo de microorganismos, plantas y animales. Como cofactor de la SOD, actúa

protegiendo las estructuras biológicas de daños causados por radicales libres, ayudando a mantener niveles adecuados de esta enzima y de otras como las metalotioneínas, favoreciendo la excreción de metales como Pb, As, etc., y suprimiendo el efecto tóxico del Hg. Se le atribuye asimismo una función antioxidante propia por su capacidad de bloquear sitios cargados negativamente, lo que impide la peroxidación lipídica ⁶⁵. A pesar de sus efectos positivos, niveles elevados de Zn causan desplazamiento de metales esenciales como el Se de sitios activos de enzimas que ven su función fisiológica alterada (57 y ref. que cita)

Cadmio: Es uno de los metales pesados más tóxicos que existen y casi imposible de excretar, pese a lo cual se usa ampliamente en industrias diversas. El Cd tiene la capacidad de unirse a aminoácidos como Cys, Glu, His o Asp y de desplazar de los sitios activos enzimáticos a metales esenciales como Fe y Zn, causando deficiencia de estos metales e inhibiendo la capacidad secuestradora de metales de las metalotioneínas ⁶⁶.

Cromo: Algunas especies de Cr son fuertes oxidantes capaces de reaccionar con agentes reductores como los grupos tiólicos o el ascorbato dando lugar a ROS. El Cr está catalogado como carcinógeno en humanos ¹⁵.

Arsénico: Metaloides tóxicos y carcinogénicos que reaccionan con grupos sulfhidrilos causando mal funcionamiento de enzimas implicadas en múltiples procesos celulares. El As es biometilado generando derivados que, en ocasiones, son mucho más tóxicos y responsables de la carcinogenicidad de este metaloide ⁵⁷.

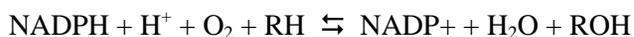
Destoxificación de xenobióticos

Los contaminantes orgánicos acumulados en las células pueden sufrir procesos bioquímicos denominados en conjunto *biotransformación*, que pretenden hacerlos más polares y facilitar su excreción ⁷. Los procesos de biotransformación se producen en todos los tejidos y órganos, aunque el hígado (y su equivalente en decápodos, la glándula digestiva) es el órgano destoxicador por excelencia. Las alteraciones de las actividades de las enzimas detoxificadoras suelen ser los biomarcadores de efecto más sensibles ⁶⁷. No obstante, las enzimas que participan en la biotransformación generan, en ocasiones, metabolitos más tóxicos y reactivos que los de partida, un fenómeno conocido como bioactivación ⁶⁸.

Durante la biotransformación se producen varias clases de reacciones. Las denominadas *reacciones de fase I* introducen en el xenobiótico grupos polares (como -OH) mediante oxidación, reducción, hidrólisis o hidratación, aumentando su hidrofiliidad y preparándolo así para entrar en reacciones posteriores. Durante las *reacciones de fase II*, el grupo polar del xenobiótico se conjuga con una molécula endógena muy polar, como GSH, aminoácidos, ácido glucurónico o grupos sulfato, metilo (-CH₃) o acetilo (-CH₃-CHO). Los productos de conjugación con GSH, a veces, continúan su metabolismo, sufriendo hidrólisis y dando derivados de N-acetil cisteína ("ácido mercaptúrico"). Estas reacciones se consideran a veces como la "*fase III*" del metabolismo.⁷

Enzimas de fase I

Citocromos P₄₅₀: Muchas reacciones de fase I están catalizadas por sistemas de monooxigenasas (MO), que transfieren un átomo de O del O₂ al sustrato, mientras que el otro es reducido a agua. Muchas MO son sistemas acoplados de transporte de e⁻ con 2 enzimas (citocromo y flavoproteína oxidorreductasa)⁶⁹. Los más abundantes y diversos dependen de citocromos P₄₅₀, donde el poder reductor suele provenir del NADPH.



Los citocromos P₄₅₀ (CYP) son hemoproteínas de entre 45 y 60 kDa y cuyo grupo prostético es una Fe-protoporfirina IX (hemo)⁷⁰. Son las MO más importantes por su abundancia, diversidad y funciones fisiológicas, localizados en el retículo endoplásmico y, en menor medida, en las mitocondrias. Forman una superfamilia con multitud de isozimas que actúan sobre una gran variedad de compuestos lipofílicos. Los citocromos P₄₅₀ están presentes en todos los eucariotas y algunos procariotas, y muchos metabolizan sustratos endógenos como ácidos grasos y otros lípidos y hormonas⁷¹. Los genes CYP se clasifican en la actualidad en familias y subfamilias. Se estima que los humanos tienen 57 genes P₄₅₀ y 58 pseudogenes, distribuidos en 18 familias, mientras que en ratón los números se elevan a 102 genes y casi 90 pseudogenes. Los CYP de una misma familia suelen catalizar pasos subsecuentes de una misma ruta o similares reacciones sobre sustratos diferentes. Las tres principales familias que participan en el metabolismo de xenobióticos son CYP1, CYP2 y CYP3⁶⁹. La isoenzima CYP1A1 es una de las más

importantes, y sin duda la más estudiada. Actúa sobre gran variedad de metabolitos y es inducible por varios xenobióticos, como PAH y PCB^{72,73}. A esta isoenzima están ligadas dos actividades usadas como biomarcadores de exposición: la 7-etoxirresorrufina-O-desetilasa (EROD) y la benzo(a)pireno hidroxilasa (BPH).

En vertebrados su actividad es mucho mayor en el hígado que en el resto de órganos y tejidos⁸. En crustáceos, el sitio principal de monooxigenación dependiente de P₄₅₀ es la glándula digestiva, siendo CYP2 y CYP3 los P₄₅₀ más abundantes⁷⁴. La inducción de CYP1 en crustáceos es muy discutida, aunque algunos estudios indican que PAH, 3- metilcolantreno y fenitrotión pero no inductores tipo fenobarbital, podrían hacerlo^{75,76}.

Otras enzimas de fase I: Las *flavín monooxigenasas*, catalizan la oxidación de compuestos nitrogenados y sulfurados³; las *epóxido hidrolasas* catalizan la conversión de epóxidos a dihidrodioles, menos reactivos³ y las *carboxilesterasas* catalizan la hidrólisis de compuestos apolares, generando productos más polares que serán excretados o serán sometidos a biotransformaciones de fase II⁷⁷.

Enzimas de fase II

Glutación S-transferasas: Conjugan glutatión reducido (GSH, tripeptido γ -Glu-Cys-Gly) con diversas moléculas electrofílicas hidrofóbicas, participando en la biotransformación de fármacos, contaminantes y carcinógenos. También participan en la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos; algunas tienen actividad peroxidasa y actúan sobre compuestos tóxicos derivados de daños oxidativos a lípidos⁷⁸. Se distinguen tres familias estructuralmente diferentes (Fig. 9): las GST citosólicas, las GST mitocondriales (clase Kappa) y las GST microsomales, ahora denominadas MAPEG (membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism)⁷⁹⁻⁸¹. La superfamilia de GST citosólicas es la más estudiada y comprende más de una docena de genes divididos en 7 clases -alpha, mu, omega, pi, sigma, theta y zeta, que difieren por especificidad de sustrato, afinidad química, estructura, secuencia de aminoácidos y comportamientos cinético⁸². Importantes sustratos de estas enzimas son epóxidos de PAH derivados de la acción catalítica de los citocromos P₄₅₀ así como numerosos subproductos de estrés oxidativo.

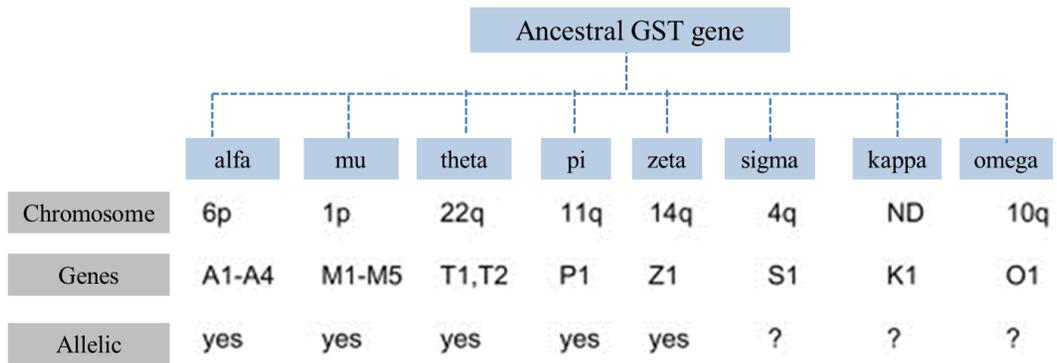


Figure 9. The glutathione-S-transferase supergene family in humans

Otras enzimas de fase II: Las *UDP-glucuronosiltransferasas* conjugan ácido glucurónico en forma activada (UDP-glucuronil) a metabolitos hidroxilados, a veces contribuyendo a su bioactivación; este es el caso del acetylaminofluoreno por acción de estas enzimas en N-hidroxiglucurónico, un potente mutágeno y carcinógeno⁷. Las *sulfotransferasas* conjugan xenobióticos activados en la fase I con grupos sulfato, en forma 5'-fosfoadenosin-3'-fosfosulfato (PAPS₃⁻); en muy raras ocasiones, la conjugación con sulfato puede incrementar la toxicidad de los sustratos⁸³. Las *N-acetiltransferasas* conjugan xenobióticos con grupos amino con acetilos del acetyl-CoA⁸³.

Otros biomarcadores de contaminación

Las *esterasas* son enzimas hidrolíticas inhibidas por pesticidas organofosforados, carbamatos o piretroides, que bloquean un residuo de Ser de su sitio activo e inactivan la enzima. Las más usadas como biomarcadores de exposición son la *acetilcolinesterasa* (AChE), que hidroliza el neurotransmisor sináptico acetilcolina; la *carboxilesterasa*, que actúa sobre una amplia variedad de sustratos endógenos y exógenos incluyendo toxinas medioambientales y medicamentos; y la *butirilcolinesterasa*, que libera ácidos grasos dañados de triacilgliceroles, fosfolípidos y esfingolípidos^{84,85}.

Las *metalotioneínas* (MT) son metaloproteínas que se caracterizan por su pequeño tamaño (alrededor de 7 KD y una secuencia de 61 o 62 aminoácidos) que contienen entre un 20 y 30 % de Cys y aminoácidos pequeños como Gly o Ala, que hacen su estructura más flexible y fácilmente plegable⁸⁶. Las MT participan en la respuesta

celular frente a numerosas formas de estrés, siendo inducidas en muchos organismos por la exposición a metales. La biosíntesis de MT puede incrementarse también por ciertas hormonas, citoquinas, factores de crecimiento, promotores de tumores y muchos agentes químicos y físicos que puedan provocar estrés ⁸⁹.

Las denominadas *heat-shock proteins* (HSP) constituyen un sistema de defensa celular que protege al organismo ante temperaturas elevadas, luz ultravioleta, condiciones oxidativas, anoxia, metales pesados y xenobióticos ⁹⁰. Debido a este amplio rango de respuesta a factores de estrés, las HSP han sido frecuentemente propuestas como biomarcadores de exposición a contaminantes.

Las metodologías ómicas en estudios medioambientales

Los biomarcadores convencionales han contribuido mucho a la determinación del estado de salud de los ecosistemas y al conocimiento de los efectos biológicos de los contaminantes. Pero su uso de estos biomarcadores exige el conocimiento de los contaminantes presentes en el medio y de sus mecanismos de toxicidad. Con este tipo de biomarcadores sólo se abordan, pues, procesos ya conocidos y generalmente muy bien establecidos, y se excluyen del análisis otros muchos cambios que puedan experimentar los seres vivos a consecuencia de su exposición al contaminante. Además, estos estudios se restringen a la detección de compuestos individuales, o a lo sumo, a un grupo de mezclas de tóxicos. Esto plantea un problema a la hora de pretender tener un conocimiento real del estado de la contaminación en un entorno, pues en muchas ocasiones, los organismos están expuestos a complejas mezclas de contaminantes (metales, PCB, PCDD, PCDF...), por ejemplo, las mezclas de pesticidas y fertilizantes que suelen afectar a los organismos que habitan ecosistemas agrícolas e industriales. Es razonable asumir que la toxicidad de las mezclas se aproxima a la suma de las toxicidades de sus componentes individuales aunque también es muy probable que haya efectos sinérgicos ⁹¹.

Los inconvenientes asociados al uso de biomarcadores convencionales, especialmente el hecho de presentar cierto sesgo en la información que proporcionan, han impulsado la introducción de las metodologías ómicas en estudios medioambientales ⁹²⁻¹⁰³. Las metodologías ómicas han surgido a partir de los progresos realizados en la

secuenciación genética de organismos ¹⁰⁴, de los desarrollos metodológicos que han permitido la secuenciación del genoma humano en el año 2003 ^{41, 105} y de los grandes avances registrados durante las últimas décadas en el conocimiento de los genes y sus funciones. Todas estas metodologías ómicas están relacionadas con el estudio de la totalidad de algún tipo concreto de biomolécula (transcritos, proteínas/metaloproteínas, metabolitos, etc.) de un organismo. De esta forma se puede llegar a conocer y descifrar los mecanismos de acción de los contaminantes y de su toxicidad ^{95, 98-102, 106, 107}.

Hay cuatro grandes tipos de metodologías ómicas. La *genómica estructural*, o simplemente genómica, se centra en el análisis de la secuencia génica y en el análisis de polimorfismos. Los otros tres grandes bloques se consideran *genómica funcional*, en tanto que pretenden clarificar la función de los genes mediante la cuantificación de su expresión en una célula o tejido, en un momento o situación, a nivel de transcritos (*transcriptómica*); de proteínas (*proteómica*) o de metabolitos (*metabolómica*). Las respuestas a condiciones de estrés son reguladas, generalmente, a nivel transcripcional. Por ello, se considera que estamos ya en la era post-genómica, en la que sólo la aplicación de enfoques de genómica funcional, tales como la transcriptómica o la proteómica, permite una evaluación integral de las respuestas biológicas a la exposición de la contaminación, y la identificación de nuevas biomoléculas que pueden ser utilizadas como biomarcadores.

La transcriptómica cuantifica los niveles de transcritos presentes en una célula o tejido en determinadas condiciones fisiológicas o ambientales. Esta metodología constituye una enorme contribución a la ecotoxicología, pero también lleva implícitos una serie de dificultades y carencias ^{103, 106}. Un tema crítico es la falta de secuencias génicas en bases de datos públicas para organismos de interés medioambiental.

Los niveles de expresión de proteínas resultan del equilibrio entre la transcripción, la traducción y la degradación de proteínas en células, incluyendo las diferentes etapas de la maduración de transcritos y proteínas y la modificación post-traducciona que éstas experimentan. Como metodología ómica, la proteómica proporciona una evaluación amplia e integral de los mecanismos tóxicos y defensivos provocados por los contaminantes a nivel de proteínas sin necesidad de ningún conocimiento previo de su mecanismo de toxicidad. Antes bien, permite identificar

proteínas que se alteran de manera significativa en un organismo después de exposición a la contaminación, lo que contribuye a revelar el mecanismo de toxicidad. Una vez caracterizadas, estas proteínas se pueden utilizar como nuevos biomarcadores en la monitorización biológica de ecosistemas terrestres o acuáticos^{93, 94, 102, 108-113}. Se profundizará en esta metodología más adelante, ya que es una de las técnicas utilizadas en este trabajo.

Cada una de estas *ómicas* ofrece una perspectiva diferente de los procesos que subyacen al inicio y progresión de una enfermedad o situación de estrés celular, al tiempo que proporcionan pistas para predecir, prevenir o tratar esa disfunción. En conjunto, todas ellas constituyen una típica cascada (Fig. 10) en la que la información génica fluye desde los genes, que nos dicen “lo que puede suceder”, hasta los metabolitos (“lo que ha sucedido”), pasando por los transcritos (“lo que parece que va a suceder”) y las proteínas que ellos codifican (“lo que hace que suceda”).

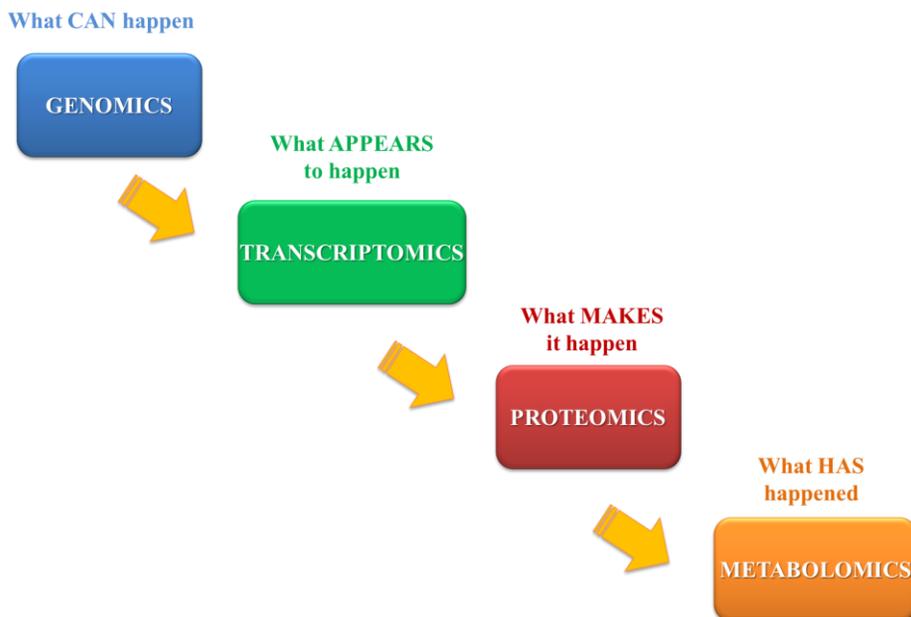


Figure 10. Schematic representation of the *omics* cascade.

Es evidente que la monitorización de problemas ambientales requiere la combinación de diferentes enfoques para resumir las múltiples variables y factores que contribuyen al comportamiento del ecosistema y que, por lo comentado anteriormente, los biomarcadores convencionales no son suficientes. El análisis integrado de las numerosas

redes y retroalimentaciones que existen entre los diversos niveles *ómicos* es la mejor y casi única aproximación para realmente definir un fenotipo y sus cambios causados por estrés. Solo de esta manera integrada se puede disponer de una herramienta eficaz para establecer mecanismos de regulación y complejas rutas metabólicas en los organismos vivos, y que, además, permita 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 éstos. Por ello se han propuesto nuevos enfoques basados en las tecnologías *ómicas* como la proteómica^{92, 101, 109-111, 113-120} y transcriptómica^{95, 97, 98, 100, 102, 103, 106} y la metabolómica^{98, 99, 102, 107, 121-131} para monitorizar la contaminación de los ecosistemas, y lograr así obtener información básica sobre las cuestiones ambientales y el diagnóstico de las posibles amenazas causadas por la contaminación. Esta información básica será de utilidad en la identificación de biomarcadores apropiados para la estimación del riesgo, y potencialmente, para el desarrollo de estrategias efectivas para la protección del medio ambiente, la salud de las poblaciones humanas y de los ecosistemas en general^{92, 95, 97, 98, 132, 133}.

El Parque Nacional de Doñana

El Espacio Natural de Doñana está considerado como una de las zonas naturales protegidas más importantes de Europa, al ser una encrucijada clave en las rutas migratorias de aves entre el continente africano y el europeo, además de suponer el último refugio para numerosas especies en peligro de extinción. Situado al Norte del Estuario del Guadalquivir (SO de España) entre las provincias de Huelva, Sevilla y Cádiz, con una superficie que supera las 120 000 Ha, Doñana está formado por un espectacular paisaje de tierras llanas, en el que destacan dos principales ecosistemas (Fig. 11), los bosques de pino y el matorral mediterráneo, que crecen en un suelo básicamente arenoso y la inmensa marisma, terrenos inundables formados por arcillas impermeables con un régimen hídrico muy estacional.



Figure 11. Doñana, pinewoods and marshes.

Dentro del Espacio Natural de Doñana, la zona más importante y protegida es el Parque Nacional de Doñana (PND). Desde tiempos inmemoriales estas tierras fueron conocidas por su riqueza natural y utilizadas como cazadero de la nobleza, siendo a mediados del siglo XX cuando se considera seriamente su protección. El Parque Nacional se creó en 1969 y, luego, ha ido siendo ampliado hasta ocupar las 54.252 Ha actuales. Ha sido declarado Reserva de la Biosfera por la UNESCO y Patrimonio de la Humanidad, entre otros numerosos reconocimientos y hoy se considera una joya natural insustituible. La Zona de Protección, de otras casi 54.000 Ha, actuaría amortiguando las presiones medioambientales que, desde el exterior, pudieran afectar al Parque Nacional (Fig. 12).

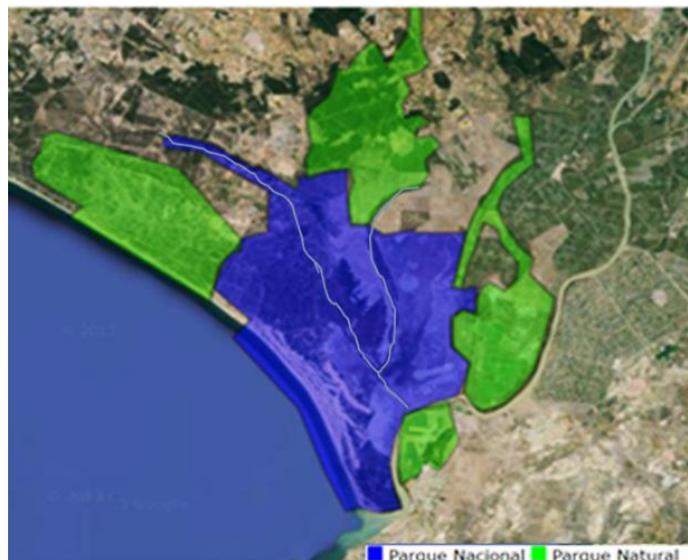


Figure 12. Limits of the Doñana National and Natural Park



Figure 13. Doñana birds. From left, white-headed duck (*Oxyura leucocephala*), flamingo (*Phoenicopterus roseus*), avocet (*Recurvirostra avosetta*), kingfisher (*Alcedo atthis*) and slender-billed gull (*Larus genei*).

Doñana es un santuario para la vida salvaje con más de 800 especies de plantas y 400 de animales ¹³⁴. Entre los vertebrados destacan las aves (con más de 300 especies), entre ellas algunas de gran interés por su delicada situación como el águila imperial, la malvasía, la cerceta pardilla, el calamón o la gaviota picofina (Fig. 13). Hay además 33 especies de mamíferos, 12 de peces y 30 de reptiles y anfibios. Y el casi extinto lince ibérico. Doñana alberga esta gran variedad biológica por la diversidad de sus ecosistemas, playas, dunas vivas, cotos o arenas estabilizadas, marismas y *veras*. Los cotos, el paisaje más característico del PND, son un espeso matorral donde aparecen zonas aisladas de alcornoques, madroños, sabinas y acebuches (Fig. 14). La vera es uno de los biotopos más ricos y productivos de Doñana, cuyos alcornoques son utilizados por colonias de aves para nidificar. La marisma, el ecosistema más sobresaliente del PND, destaca por su escaso relieve, la naturaleza arcillosa del suelo y su acentuada estacionalidad hídrica, inundada por aguas de origen pluvial, fluvial y mareal ¹³⁵.



Figure 14. Doñana plant species. Strawberry tree (*Arbutus unedo*), juniper (*Juniperus phoenicea*) and wild olive (*Olea europaea* var. *sylvestris*)

Tradicionalmente, los aportes de agua de la marisma procedían de la lluvia, los arroyos y el desbordamiento periódico del Guadalquivir (Fig. 15) y la cuenca alcanzaba cerca de 3.000 km²¹³⁶. Su sistema hidrológico más importante estaba constituido por los arroyos La Rocina, El Partido, Madre de la Marisma y Brazo de la Torre, que reunían aportes fluviales del NO y NE¹³⁵. La construcción de varios muros eliminó los aportes del Guadiamar y del Guadalquivir, lo que redujo a la mitad la superficie de la cuenca.

Tras el vertido de Aznalcóllar se activaron planes para la regeneración hídrica de Doñana (Plan Doñana 2005) cuyo objetivo era devolver a la marisma un funcionamiento hídrico más natural, mejorando los aportes de la Rocina y el Partido, restaurando los aportes del Guadiamar, Guadalquivir y otros de forma que la marisma menos aislada, pudiera intercambiar aguas con las áreas colindantes, que penetraría por los caños naturales para desbordarse lentamente¹³⁷ (Fig. 15). Pero esta intervención eliminó barreras que habían aislado hasta entonces el Parque de los contaminantes procedentes de zonas agrícolas cercanas y arrastrados por los ríos Guadiamar y Guadalquivir, lo que dejó a Doñana más vulnerable a la contaminación derivada de las actividades humanas en sus alrededores.

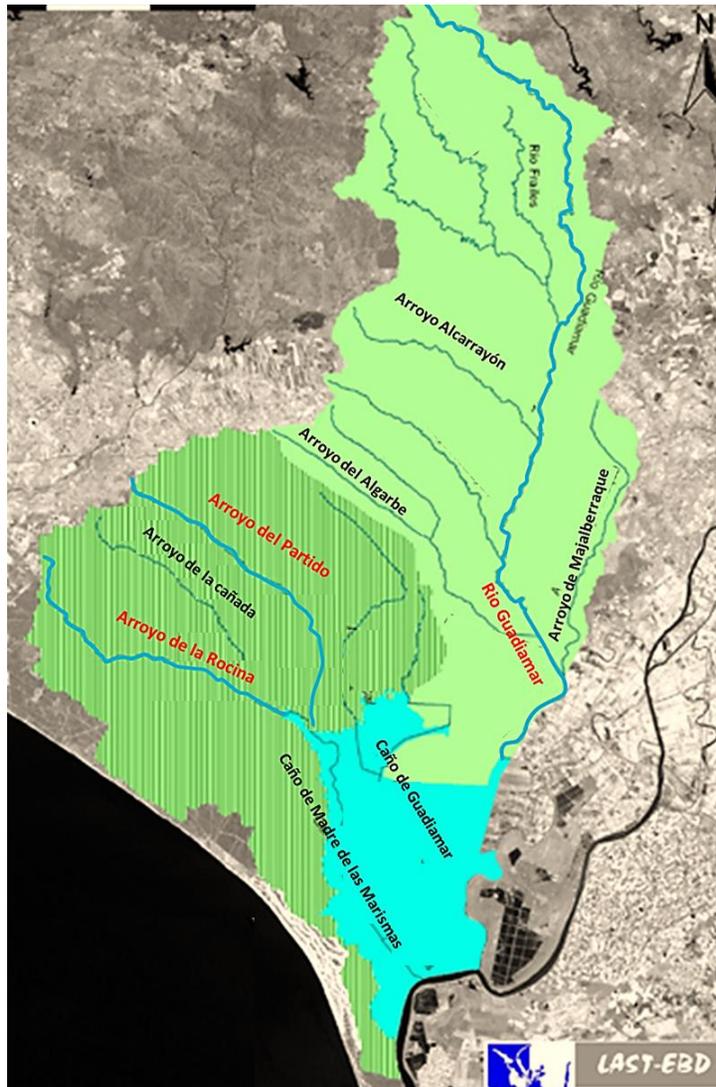


Figure 15. Water contributions to the DNP (Laboratorio de Sistemas de Información Geográfica y Teledetección de la Estación Biológica de Doñana, CSIC.)

Contaminación en Doñana

El área de influencia socio-económica del PND comprende 31 municipios y cerca de 300.000 habitantes, extendiéndose 11.160 km². Ciudades como Almonte, con aproximadamente 30.000 habitantes, o la aldea de El Rocío, que recibe cada primavera más de un millón de romeros, ejercen una gran presión sobre el Parque. Además, la zona se ve influenciada por el crecimiento urbanístico de Sevilla (>1.000.000 de habitantes a menos de 15 km al Este de Doñana) y Huelva (cerca de 300.000 habitantes, a unos 20 km

al Oeste) y los polos industriales de esta zona ¹³⁸. Aparte de la contaminación derivada de los núcleos urbanos, toda la superficie que rodea al Parque tiene una intensa actividad agrícola, que desde principios del siglo XX ha ido reemplazando los ecosistemas naturales, sobre todo en las zonas cercanas al Guadalquivir y otros arroyos cuyas aguas acaban entrando a Doñana (Fig. 16).

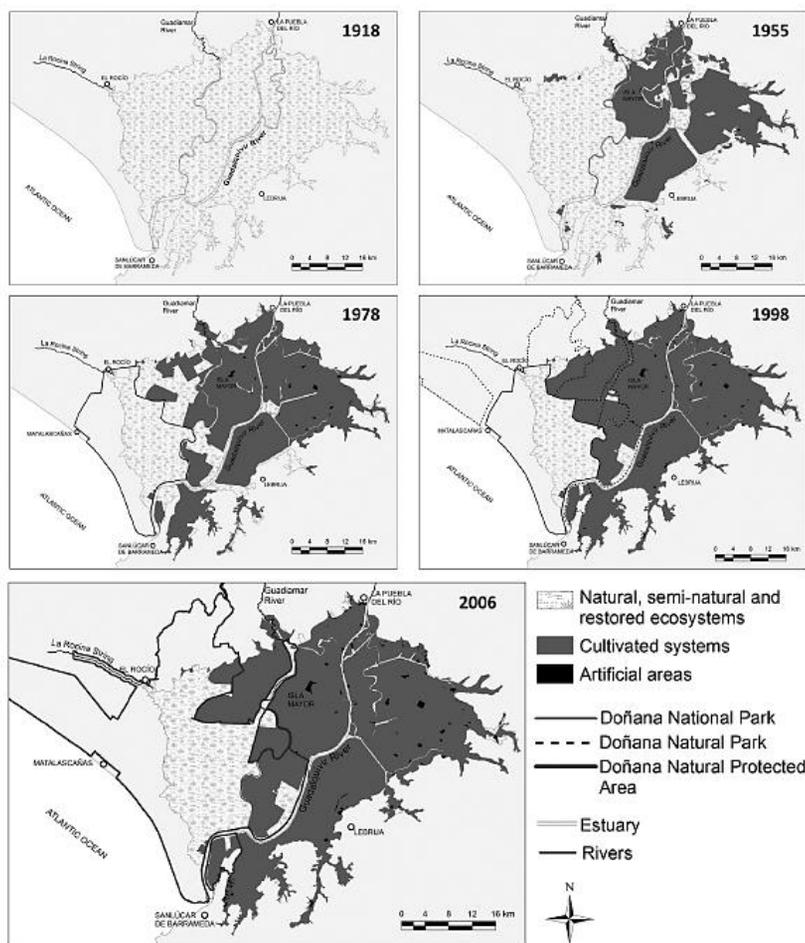


Figure 16. Maps showing the primary land-use changes during 1918–2006 in the Doñana marshes and estuary, showing the three main categories of land uses ¹³⁹.

Las actividades agrícolas son un motor importante en la economía de la zona, pero afectan a Doñana dado que obligan a la extracción de agua subterránea para regadíos, usan las aguas superficiales para los extensos arrozales asentados en la zona y acaban causando una gran contaminación de tierras y aguas por fertilizantes y plaguicidas. Además de arrozales, que ocupan 35.000 Ha de marisma al NE (Fig.17.E), cerca de Doñana hay varios cultivos, como el de fresas y cítricos, al NO (Fig.17.B y C). Estas

actividades son responsables de que se hayan encontrado en los arroyos de Rocina y Partido valores altos de nutrientes (amonio, nitritos, nitratos y fosfatos, entre otros) y metales (Al y Cr), que deben atribuirse al uso de fertilizantes ¹⁴⁰ y plaguicidas ¹¹⁴. También las prácticas agropecuarias están muy extendidas en la zona, y sin duda el gran número de cabezas de ganado y hectáreas de regadío explican la gran abundancia de compuestos nitrogenados presentes en las aguas subterráneas ¹⁴¹. Las numerosas almazaras, industrias de procesado de uva y vegetales e industrias cárnicas y lácteas son también causas adicionales de contaminación. Los efluentes de estas industrias amenazan al arroyo del Partido ¹⁴² y al curso bajo del Guadimar ^{135, 143}. Además, las aguas residuales de muchos municipios se vierten sin depurar sobre el acuífero, afectando al río Guadimar y al arroyo del Partido ^{142, 144} aunque ya se están construyendo varias estaciones depuradoras de aguas residuales.

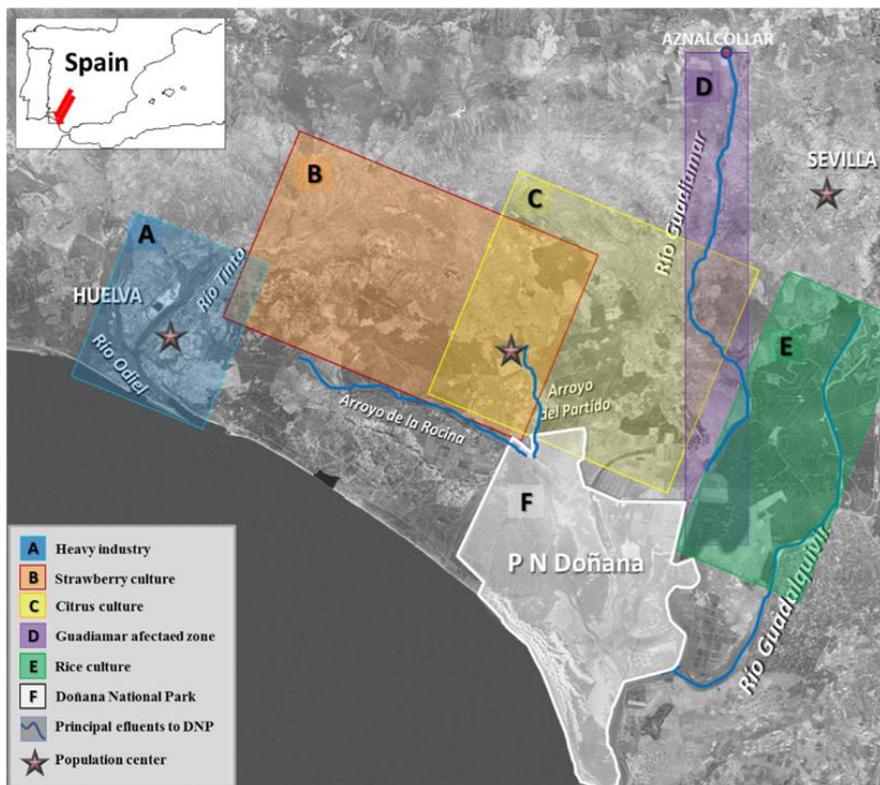


Figure 17. Surroundings of the PND, threats and possible sources of contamination. (A) Industrial Pole of Huelva. (B) Strawberry fields (C) Intensive cultivation of citrus and strawberry, area of Almonte and Villamanrique (D) Course of the Guadimar and area affected by the spill produced by the break raft of Aznalcollar mine (E) Production area of rice in the marshes of the Guadalquivir.

Otra fuente potencial de contaminación está a 45 Km al NO del PND, a orillas de los ríos Odiel y Tinto y es la zona industrial de Huelva (Fig.17.A). 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 los vientos ^{135, 145}.

Al norte de Doñana se explotan, desde 1979, las minas de pirita de Aznalcóllar, cuyos subproductos se almacenan en una balsa de estériles, que tras lluvias intensas, ha venido liberando metales muy móviles al río Guadiamar, que los arrastra aguas abajo ¹⁴². En abril de 1998 se rompió el muro de cierre de esta balsa de residuos (Fig.18). lo que supuso la liberación de residuos mineros fluidificados y la incorporación de aproximadamente 2 Hm³ de lodos tóxicos y 4 Hm³ de aguas ácidas al cauce del río Guadiamar ^{146, 147}. El lodo vertido contenía Fe (34-37%), S (35-40%), Zn (0,8%), Pb (0,8%), As (0,5%), Cu (0,2%), Sb (0,05%), Co (0,006%), Ta (0,005%), Bi (0,005%), Cd (0,003%), Ag (0,003%), Hg (0,002%) y Se (0,001%). Las aguas ácidas contenían básicamente pirita, FeS₂, Pb, Au, Zn, Cu y As ¹⁴⁷.

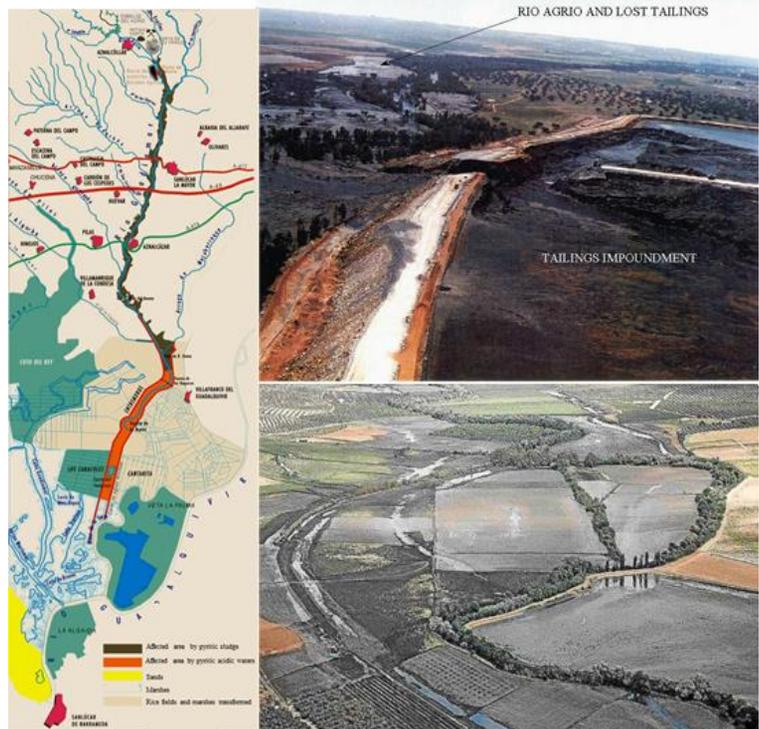


Figure 18. Overview of the areas affected by the spill of Aznalcollar. Photograph of Dam Breach (Eptisa, 1988)

El vertido afectó a cerca de 70 Km de cauce lineal y 500 m de anchura media en ambos márgenes del río Guadiamar, desde la mina hasta Entremuros, en el límite del PND (Fig.17.D y Fig.18). La superficie contaminada fue de 4.286 Ha pertenecientes a terrenos de nueve municipios de la provincia de Sevilla. Tanto la flora como la fauna fue arrasada debido a la alta contaminación química del agua, a los elevados valores de oxígeno disuelto (> 1 g/l), al pH altamente ácido y a la propia acción mecánica de la riada¹⁴⁷. Las inmediatas labores de regeneración de la zona hicieron disminuir de manera significativa los niveles de contaminación en los primeros años tras la catástrofe, pero, luego, este descenso se ha ralentizado, pudiéndose encontrar aun altos niveles de contaminantes que, debido a la lenta dinámica de las aguas subterráneas, se prevé que persistan durante años^{148, 148, 149}.

Es evidente que el área de Doñana es un espacio muy complejo donde coexisten algunos de los más preciados valores medioambientales con el desarrollo económico y social de las poblaciones circundantes. 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.

***Procambarus clarkii* como organismo bioindicador de gran importancia ecológica. Su uso para evaluar la calidad ambiental de Doñana**

El estudio de los factores de estrés medioambiental se realiza, generalmente, usando organismos bioindicadores, que reflejan la respuesta biológica a la presencia de contaminantes. Dado que los contaminantes liberados acabarán por llegar a ríos y océanos como repositorio final, hemos centrado este estudio en la monitorización de los ecosistemas acuáticos del Parque de Doñana, usando *Procambarus clarkii* (Fig. 19) como bioindicador. Los invertebrados han sido propuestos frecuentemente para el estudio de medios acuáticos, ya que pueden indicar cambios en el medioambiente por medio de respuestas a distintos niveles de organización, desde el nivel de individuo hasta la comunidad. La ventaja del uso de invertebrados en la monitorización biológica se basa en sus características demográficas, esto es, su abundancia y amplia distribución.



Figure 19. *Procambarus clarkii*, the red swamp crayfish

El decápodo *P. clarkii* (cangrejo de río americano o cangrejo rojo) es una especie prolífica, con ciclo de vida largo, amplia distribución geográfica y estilo de vida sedentario, que soporta amplio rango de condiciones medioambientales. Se encuentra normalmente en aguas no demasiado frías, como ríos de curso lento, marismas, estanques, sistemas de riego y campos de arroz, pero puede vivir incluso en aguas muy contaminadas, lo que hace a esta especie un buen bioindicador para evaluar los efectos de la contaminación ambiental^{85, 94, 95, 100, 111, 114, 131, 150-155}. Al ser presa de otros animales es clave para la transferencia de energía y de contaminantes entre niveles tróficos¹⁵⁶.

Procambarus clarkii fue introducido desde Luisiana (USA) a los arrozales de la Marisma Alta del Guadalquivir y Bajo Guadalquivir en 1974¹⁵⁷ y colonizó rápidamente de los sistemas acuáticos en las cercanías, dada la ausencia de depredadores naturales, incluyendo Doñana¹⁵⁸, donde los pescadores lo distribuyeron para conseguir zonas de almacenamiento en época invernal cuando los arrozales están secos. Hoy *P. clarkii* está ampliamente distribuido en el PND, a pesar de los métodos de erradicación, infructuosos por su gran productividad y adaptación a los sistemas fluctuantes de la marisma y los arrozales¹⁵⁵. A pesar de los problemas ecológicos que suele provocar la introducción de una especie no autóctona, *P. clarkii* ocupa una posición clave en las redes tróficas de Doñana ya que es alimento de algunas especies protegidas y es un importante recurso económico.

En los últimos años los cangrejos del género *Procambarus* han venido usándose como especie bioindicadora en distintos estudios, tanto en el PND^{114, 131, 159-162} como en otros ecosistemas^{152, 163-165}, y en la búsqueda de biomarcadores moleculares de

contaminación en exposiciones controladas a distintos tipos de contaminantes presentes en el medio ambiente, especialmente a metales pesados, insecticidas y pesticidas (ver como ejemplo, ^{153, 166-168 169 94, 170, 171 172}).

Proteómica

Los grandes proyectos de secuenciación de genomas han generado una enorme cantidad de información genómica y la necesidad de descifrarla ha estimulado ampliamente el estudio masivo de las proteínas ¹⁷³. El término proteoma, se usó por primera vez en 1996 para describir el conjunto de proteínas que se expresan a partir de un genoma en cierto momento y determinadas circunstancias. El crecimiento del número de proyectos orientados a estudiar proteomas de forma sistemática ha dado lugar a la aparición del concepto *Proteómica*, que describe la ciencia o conjunto de tecnologías que estudian el proteoma ¹⁷³.

El proteoma es muy dinámico, pues sus componentes varían entre organismos, tejidos, células u orgánulos y debido a cambios externos (situaciones de estrés, administración de drogas, efectores o señales bioquímicas) o internos (estado fisiológico o patológico). Todos estos factores aumentan considerablemente la complejidad del proteoma, debido a la activación o supresión de la expresión génica, alteración de las interacciones entre proteínas, o cambios en sus modificaciones post-traduccionales ¹⁷³. El objetivo principal en proteómica es identificar esas variaciones. Interesa conocer las diferencias en los niveles de proteínas cuando un organismo está sometido a determinadas condiciones ambientales, por ejemplo, o en la expresión de determinadas proteínas al comparar un tejido sano con otro enfermo. En los experimentos de Proteómica hay dos tipos de aproximaciones: i) Identificar todas las proteínas de una muestra, cuando se quiere conocer la expresión global de proteínas en un organismo o tejido en unas determinadas circunstancias; ii) Comparar dos o más muestras (o situaciones experimentales) para encontrar diferencias en la abundancia de proteínas atribuibles a esas situaciones experimentales diferentes. Y se pueden seguir dos posibles estrategias. La estrategia convencional consistente en separar todas las proteínas de la muestra (por electroforesis en dos dimensiones, en general, usando o no marcadores fluorescentes u otro tipo de etiqueta) e identificar aquellas de interés por espectrometría de masas. En la

estrategia a gran escala (*shot-gun*), la muestra es tratada con una enzima proteolítica y los péptidos resultantes se separan por HPLC acoplada a un sistema de espectrometría de masas. Esto permite la identificación de todas las proteínas presentes en la mezcla.

Estrategias convencionales: la electroforesis bidimensional

La electroforesis bidimensional (2-DE) es una técnica de alta resolución para separar mezclas de proteínas muy complejas. Su gran poder de resolución radica en la separación ortogonal de las proteínas al aplicar dos métodos físicos distintos. Una primera dimensión separa las proteínas en un gel de acrilamida con gradiente de pH por su punto isoeléctrico (isoelectroenfoque, *isoelectric focusing* IEF). En la segunda dimensión las proteínas son separadas por su masa molecular mediante electroforesis en poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE)^{174, 175} (Fig. 20).

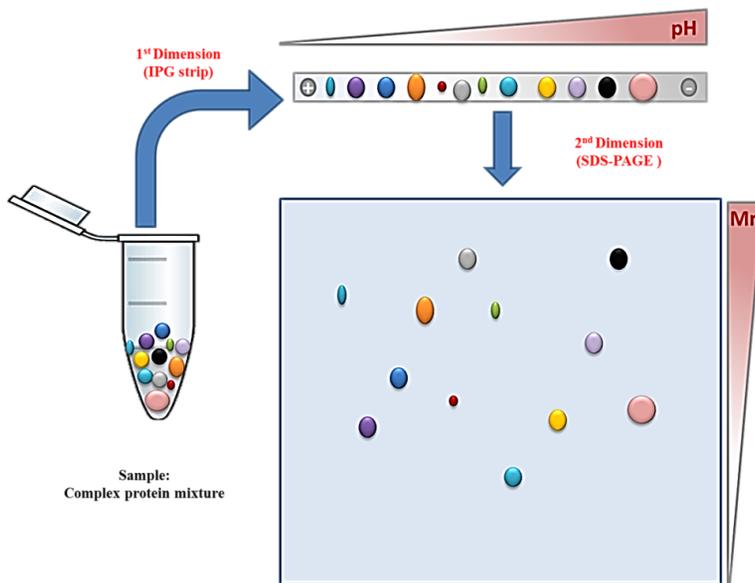


Figure 20. General scheme of a two-dimensional electrophoresis

Tras realizar la segunda dimensión hay que teñir los geles para visualizar las proteínas. Los métodos tradicionales (Coomassie brilliant blue, plata) han sido sustituidos por compuestos fluorescentes como el SYPRO[®] Ruby que tienen una gran sensibilidad y un rango dinámico lineal de hasta tres órdenes de magnitud, óptimos para estudios cuantitativos^{176, 177}.

Proteómica de segunda generación: Marcaje de proteínas con fluoróforos (2D-DIGE)

En el proceso de evolución de la metodología 2-DE ha surgido una nueva tecnología que saca todo el provecho de la 2-DE y de la tinción con fluoróforos, denominada DIGE (Difference Gel Electrophoresis), que busca corregir los problemas de reproducibilidad, detección de manchas y posterior análisis de la 2-DE convencional. La técnica DIGE consiste en el marcaje previo a la electroforesis de las muestras que se van a comparar con un sistema de tres fluoróforos (Cy2, Cy3, Cy5), que se cargan mezcladas en un mismo gel porque pueden ser posteriormente analizadas de manera individual con un programa informático adecuado (Fig. 21). La incorporación de un estándar interno (mezcla o pool de todas las muestras analizadas en los geles), marcado con un tercer fluoróforo y tratado igual que si fuese otra muestra y la posibilidad de comparar directamente en el mismo gel las muestras (normalización) permite minimizar el problema de reproducibilidad o variación entre geles comparado con las técnicas de 2D convencionales, además de reducir el número de geles necesarios por experimento.

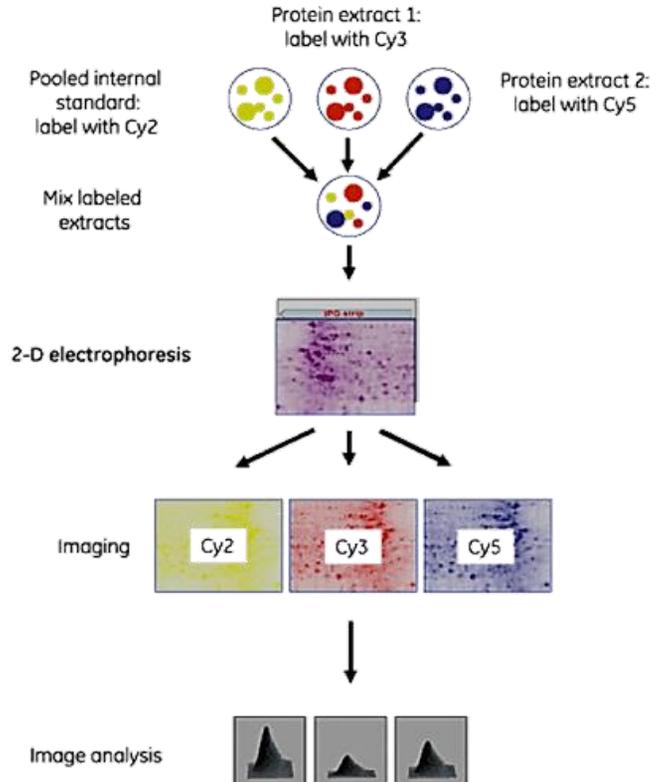


Figure 21. Scheme of a DIGE experiment

Los tres fluoróforos tienen una masa muy similar y llevan un grupo N-hidroxisuccinimidil-éster, mediante el cual se unen covalentemente al grupo amino de los residuos de Lys (Fig. 22). Los fluoróforos están diseñados, y el proceso se realiza, para conseguir un marcaje mínimo de las proteínas (*minimal dye for minimal labelling*). Esto asegura que las proteínas se marquen con una sola molécula de fluoróforo¹⁷⁸ y que sólo un 20% de las moléculas de una proteína en particular resulten modificadas.

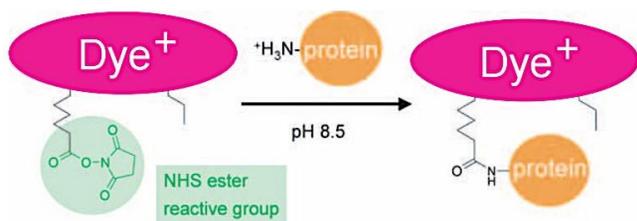


Figure 22. Schematic of the minimal labeling reaction. CyDye DIGE Fluor minimal dye containing NHS ester active group covalently binds to the lysine residue of a protein via an amide linkage (GE Healthcare).

De esta manera se asegura que el marcaje no afecte a la movilidad de las proteínas en el gel, ni interfiera en la identificación por espectrometría de masas¹⁷⁹. La excitación de los fluoróforos, con una longitud de onda diferente para cada uno (Fig. 23), permite la captación de la imagen del patrón de proteínas. Luego, mediante un software adecuado se pueden comparar las imágenes bidimensionales del proteoma de cada una de las muestras analizadas y cuantificar la intensidad de la fluorescencia de cada mancha.

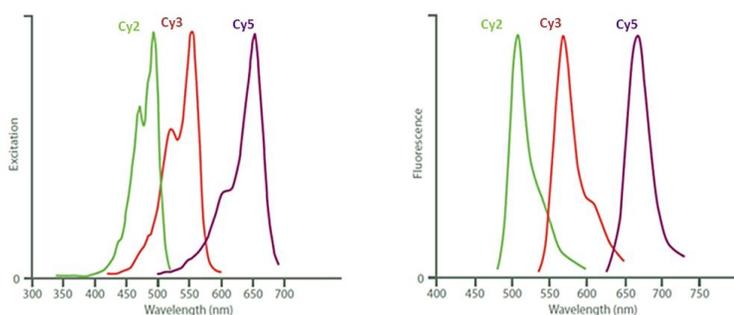


Figure 23. Excitation (left) and emission (right) spectra of Cy2, Cy3 and Cy5

Fluorophore	Excitation Peak (nm)	Emission Peak (nm)
Cyanine, Cy2	492	510
Indocarbocyanine, Cy3	550	570
Indodicarbocyanine, Cy5	650	670

Espectrometría de masas para la identificación de proteínas

La espectrometría de masas (MS) permite medir las masas de átomos o moléculas. Esta potente herramienta analítica se usa para identificar y cuantificar compuestos y materiales desconocidos y para elucidar las estructuras y las propiedades químicas de una molécula. Por su gran capacidad de análisis (alto rendimiento), precisión y sensibilidad en la determinación de masas moleculares de las proteínas, la MS es la tecnología clave para la identificación de proteínas señaladas como interesantes tras el análisis proteómico. El espectrómetro de masas convierte los componentes de una muestra en iones volátiles (con carga eléctrica) y los separa por su relación masa/carga. Un espectrómetro de masas posee tres tipos de componentes: fuente de ionización, analizador y detector.

Fuentes de ionización en espectrometría de masas

MALDI: En la desorción de iones asistida por láser (MALDI: *Matrix-assisted laser desorption-ionization*) (Fig. 24), las muestras son coprecipitadas con una matriz usada para inmovilizar la muestra en un soporte metálico y que permite ionizar la muestra, el sólido resultante sobre el soporte se irradia con pulsos de láser¹⁸⁰. La matriz usual está compuesta de una molécula orgánica pequeña con absorbancia dentro de la longitud de onda del láser que se esté usando. Matrices de ácido α -ciano-4-hidroxicinnámico (CHCA) o de ácido dihidrobenzoico (DHB) son las más usadas para trabajar con biomoléculas.

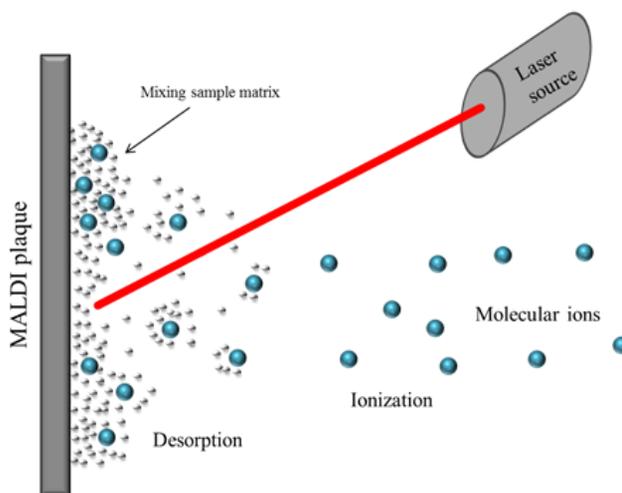


Figure 24. Operating scheme of MALDI ionization source.

Electrospray: La fuente de ionización electrospray (ESI, *electrospray ionization*) usa una aguja para bombear flujos muy bajos de una disolución del analito. A su punta se aplica un voltaje muy alto para que el fluido se disperse en pequeñas gotas, que se evaporan y da carga a las moléculas de analito. Para estabilizar el spray se suele usar un gas inerte. <tras ionizar y estabilizar el spray, las moléculas de analito se transfieren al espectrómetro de masas con muy alta eficiencia (Fig. 25) ¹⁸¹.

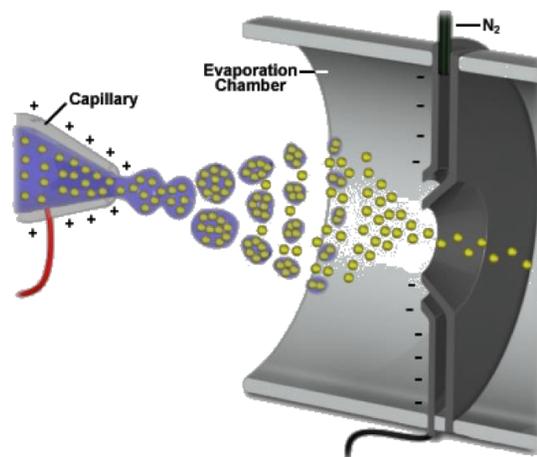


Figure 25. Operating scheme of an ionization source ESI. (www.magnet.fsu.edu)

Analizador y detector para espectrometría de masas

En esencia, los espectrómetros de masas miden la relación masa-carga (m/z) de analitos como proteínas o fragmentos peptídicos. Tres principios básicos muy diferentes permiten realizar la separación según masas: en base al tiempo de vuelo (*time of flight*) por campos eléctricos cuadrupolo generados por cilindros metálicos (Quadrupole-MS) y separación por selección de iones desde una trampa magnética (*ion trap*) tridimensional (IT-MS o FTIC-MS). Para la secuenciación de péptidos se llevan a cabo dos pasos de espectrometría de masas en tándem (MS/MS) que se pueden realizar empleando el mismo principio de separación o una combinación entre los tres anteriores.

Además de las diferentes fuentes de ionización utilizadas con más frecuencia en espectrometría de masas molecular, los espectrómetros de masas pueden tener uno o más analizadores, dependiendo de la finalidad para la que son utilizados. En este caso, los instrumentos formados por dos o más analizadores de masas acoplados entre sí son conocidos como espectrómetros de masas en tándem. En la Fig. 26 pueden observarse los analizadores más comunes en espectrometría de masas.

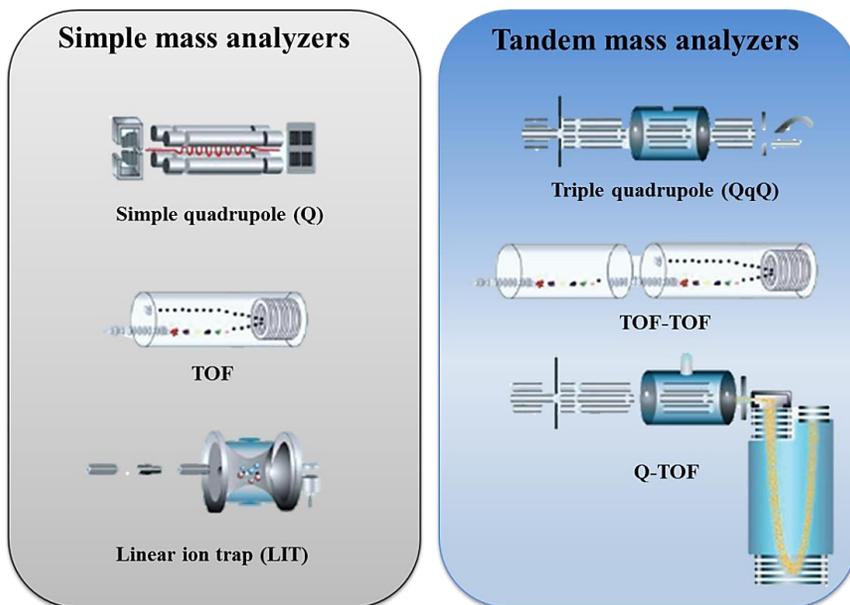


Figure 26. Common analyzers used in molecular mass spectrometry.

Tanto MALDI como ESI se pueden acoplar a cualquiera de los tres métodos de separación. El hecho de que la fuente MALDI produzca pequeños pulsos de iones en el vacío y que la fuente ESI genere iones de forma continua a presión atmosférica ha hecho que la primera se acople normalmente a analizadores tipo TOF mientras que la segunda se acople a cuadrupolos y trampas iónicas.

Espectrómetro de masas tipo MALDI-TOF: La Fig.27 muestra un esquema del instrumento resultante de acoplar MALDI y TOF en un espectrómetro de masas. Las muestras se depositan en un soporte metálico capaz de dar cabida de uno a varios cientos de spots de analito. Éstos se irradian con pulsos de láser para generar pequeñas nubes de iones, que se aceleran a una determinada energía cinética fija y viajan a través del tubo de vuelo. Los más pequeños alcanzan mayor velocidad y llegan al detector antes que los mayores produciendo el espectro de tiempo de vuelo. Se requieren cientos de pulsos láser para producir el espectro final. El rendimiento en un MALDI-TOF moderno es de pocas ppm en cuanto a exactitud de masas y necesita pocos femtomoles de material peptídico en la placa MALDI para producir una buena señal.

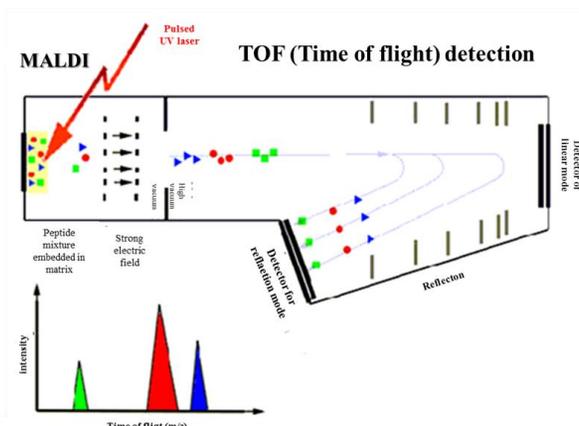


Figure 27. Outline of a mass spectrometer MALDI-TOF

Para utilizar estos espectrómetros de masas como método general de secuenciación se suelen acoplar en tándem a un segundo tubo de vuelo, generando un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF, en el que los iones pasan desde la placa MALDI y son acelerados en el primer tubo de vuelo, donde además se seleccionan los iones de interés antes que pasen a la celda de colisión llena de un gas inerte; en esta celda se fragmentan antes de entrar en el segundo tubo de vuelo que se usa en el modo de detección antes descrito ¹⁸².

Espectrómetro de masas tipo cuadrupolo: El cuadrupolo es un filtro de masas constituido por cuatro cilindros metálicos en los que se aplica un campo eléctrico oscilante que sólo deja pasar a través de ellos las masas que hemos seleccionado que son las que finalmente llegan al detector donde se obtiene el espectro de masas (Fig. 28). Estos espectrómetros tienen una altísima exactitud en la detección de masa y permiten medidas cuantitativas.

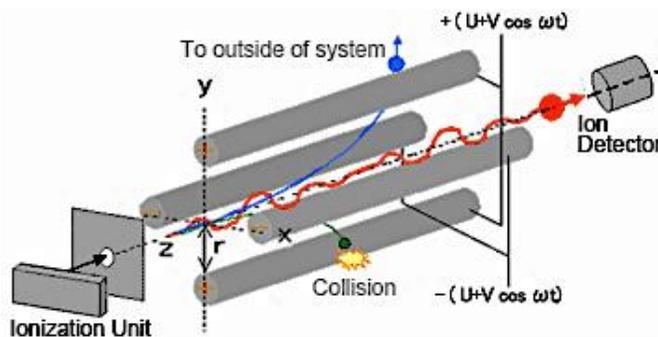


Figure 28. Mode of operation of a quadrupole mass spectrometer.

Espectrómetro de masas tipo trampa iónica: En este caso los iones generados en la fuente iónica son “atrapados”, durante cierto tiempo, en un campo de radiofrecuencia dentro de un anillo toroidal situado entre dos electrodos hiperbólicos. La trampa se genera aplicando simultáneamente una corriente continua y un potencial de radiofrecuencia, de tal forma que los iones generados quedan confinados en del anillo toroidal. Los iones son extraídos a voluntad aplicando corrientes de radiofrecuencia variable hasta valores de resonancia y expulsados individualmente a través del anillo de salida para ser detectados y generar un espectro de masas. Las trampas iónicas tienen usos similares a los cuadrupolos siendo muy usada en la técnica masas-masas, pues permiten extraer iones individuales (parentales) que luego pueden ser fragmentados para análisis estructural (iones hijos). Para un experimento MS/MS típico, se expulsan de la trampa todas las especies producidas en la fuente de ionización que no interesan y las especies que quedan se fragmentan para analizar luego sus productos. La tecnología FT ICR-MS (*Fourier transform ion cyclotron-MS*), captura los iones con una combinación de campos eléctricos y magnéticos muy fuertes.

Secuenciación de péptidos mediante espectrometría de masas

La introducción en la espectrometría de masas de técnicas de ionización suave ha permitido la generación de iones de péptidos intactos que pueden ser seleccionados y activados para detectar sus fragmentos. Mediante los pasos de espectrometría de masas en tándem antes descritos, un ion en particular se aísla y se le imparte energía con un gas inerte (nitrógeno, argón o helio) en una celda de colisión. Esto fragmenta el péptido en varios lugares (sobre todo el enlace peptídico) generándose un “espectro de fragmentación”. Los fragmentos peptídicos más comunes observados en colisiones de baja energía son **a**, **b** e **y**'' (Fig. 29). Los iones **b** (como los **a** y los **c**) contienen el extremo N-terminal y los iones **y**'' (como los **x** y los **z**) contienen el extremo C-terminal. Los fragmentos **a**, procedentes de los **b**, se dan con mucha menor frecuencia y abundancia frente a estos iones **b**. Frecuentemente se observan parejas **a-b** en el espectro de fragmentación, separadas por 28 unidades de masa, la del grupo carbonilo, C=O ¹⁸³. En los instrumentos cuadrupolo o Q-TOF predominan los iones de la serie **y**, mientras que en instrumentos tipo trampa iónica hay iones tanto de la serie **b** como de la **y** (Fig. 29). Cada fragmento peptídico de una serie difiere de su vecino en un solo aminoácido. En principio

es posible determinar la secuencia aminoacídica fácilmente, considerando sólo la diferencia de masas entre picos vecinos de una serie.

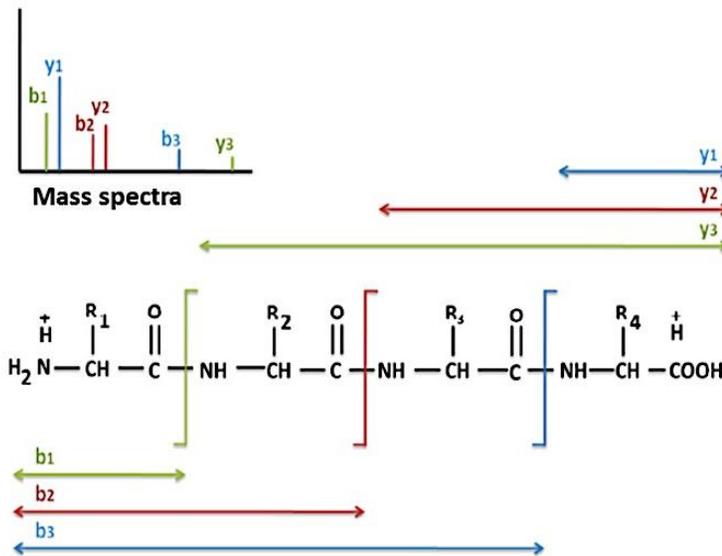


Figure 29. Fragmentation scheme of a theoretical peptide corresponding to the b / y series and the theoretical mass spectrum for these series.

Identificación de proteínas en bases de datos a partir de los datos MS

La última fase en un experimento de proteómica es la identificación de la proteína secuenciada, para lo cual se utilizan diversas estrategias dependiendo del tipo de espectrometría utilizada.

Identificación por huella peptídica de masa (“Peptide Mass Fingerprinting”, PMF).

Los espectrómetros de masas permiten determinar la masa de las moléculas (Mw) midiendo la relación masa/carga (m/z) de los iones analizados con gran *exactitud* (diferencia entre el valor medido y el valor real o teórico), *resolución* (capacidad para separar dos masas próximas, definida como $R = M/\Delta M$, donde M es la masa de un pico y el ΔM es la diferencia de masa entre dos picos de intensidad parecida adyacentes perfectamente separados o que solapan menos de 10%) y *sensibilidad* (cantidad mínima detectada). En esta metodología, la proteína analizada se digiere completamente usando una proteasa específica (como la tripsina). Los péptidos resultantes de la digestión se extraen y se mide su Mw en un espectrómetro de masas con la máxima exactitud y resolución posibles. El espectro de masas de la digestión es una relación de las Mw de

cada uno de los péptidos producidos, que conforma un patrón característico para dicha cadena polipeptídica (huella peptídica o PMF, *peptide mass fingerprinting*). Con este patrón experimental en forma de espectro se puede determinar si en las bases de datos de secuencias de proteínas existe alguna proteína que al ser digerida teóricamente (*in silico*) con la misma proteasa produce un conjunto de péptidos con las mismas Mw que las medidas experimentalmente. Esta búsqueda en bases de datos se hace a través de diferentes motores de búsqueda que incorporan algoritmos capaces de hacer la comparación entre las masas teóricas y las experimentales de los péptidos resultantes de digerir las proteínas (por ej., SwissProt), asignándole una puntuación a cada proteína en función de las coincidencias y ordenando los resultados de acuerdo a esta puntuación. Si el número de coincidencias de alguna de las proteínas anotadas es suficiente para que no se deban al azar, podemos considerar la proteína identificada. Los cuatro motores más empleados para la identificación, son: Protein Prospector (UCSF), ProFound (Universidad Rockefeller), Mascot (Matrix Science) y Aldente (GeneBio). Aunque en principio, la lógica de todos es la misma, existen diferencias en la valoración de cómo se empareja la secuencia de un determinado péptido con la señal (valor m/z) detectada en el espectrómetro, haciendo que los resultados varíen ligeramente. En todos ellos, y fruto del modelo estadístico que cada uno emplea, el resultado es en una lista ordenada por puntuación de los diferentes candidatos que, tras repetir el proceso de forma teórica, obtendrían una huella similar a la proporcionada por el espectrómetro. En la actualidad, Mascot es el más empleado y se basa en el sistema de puntuación Mowse¹⁸⁴. Con esta metodología se pueden identificar sólo proteínas que estén secuenciadas y formen parte de las bases de datos y tiene el inconveniente de que la selección como buena de la proteína que tiene un número mayor de péptidos identificados puede inducir a error

Identificación por espectrometría de masas en tándem (MS/MS): Esta aproximación permite obtener los espectros de fragmentación tras dos fases de espectrometría consecutivas (MS/MS). De modo general, la/s proteína/s son digeridas enzimáticamente y los péptidos resultantes son separados por uno o más pasos de cromatografía líquida y analizados por MS/MS. En un primer análisis por MS se determina el valor m/z de los péptidos y algunos de estos péptidos son seleccionados de forma individual, aislados y fragmentados. Los fragmentos generados se separan y analizan en un segundo análisis por MS, obteniéndose el espectro de fragmentación o MS/MS de cada péptido, el cual

proporciona información tanto de la masa del péptido precursor como de su secuencia de aminoácidos.

Una vez obtenidos los espectros, se realiza una búsqueda en bases de datos de proteínas, contrastando los espectros de fragmentación experimentales con otros teóricos de los péptidos y, luego, el conjunto de secuencias peptídicas se usa para deducir que proteínas están presentes en la muestra analizada. Cada entrada en la base de datos se digiere *in silico* de modo equivalente a como se realizó la digestión de nuestras proteínas y se calculan las masas de los péptidos teóricos según las condiciones de la digestión, deduciéndose para cada péptido su espectro de fragmentación teórica. Mediante algoritmos, se calcula una puntuación para decidir qué secuencia de péptido de las bases de datos coincide en mayor medida con el espectro experimental. Los motores de búsqueda que identifican péptidos a partir de sus fragmentos iónicos son un poco más complejos que los descritos para huella peptídica. Es esencial recordar que esta metodología identifica péptidos individuales para cada espectro MS/MS, no proteínas. En este caso, los motores de búsqueda no se limitan a comparar espectros de fragmentación teóricos y experimentales, sino que además incorporan una funcionalidad extra de inferencia de proteínas¹⁸⁵ para poder agrupar los péptidos identificados con las proteínas con las que se asocian.

Las ventajas de esta aproximación son, entre otras, una mayor capacidad de discriminación y la posibilidad de analizar mezclas de proteínas. Supone una ventaja fundamental frente a la huella peptídica ya que en este caso obtenemos información de la estructura primaria del péptido. Se puede estudiar cada péptido y elucidar su secuencia y por eso puede utilizarse como una técnica confirmatoria de los resultados obtenidos de la identificación de la huella peptídica. Esta técnica es, además, aplicable tanto a muestras procedentes de gel como libres de él, es decir, mezclas de proteínas en solución.

Proteómica redox

Distintos tipos de contaminantes, como los metales o los compuestos orgánicos oxidativos, generan ROS/N que inducen estrés oxidativo^{20, 186}. Si este daño oxidativo es excesivo, deriva en distintas patologías y muerte celular^{39, 187-189}. Posiblemente por de su abundancia, en los sistemas biológicos, las proteínas son las principales dianas de los agentes oxidantes y entran en reacciones redox que, a veces, son parte de su función normal (regulando así su localización, estructura y función) y otras veces, resultan irreversiblemente dañadas y pierdan su función (Fig. 30)^{187, 190-194}. Ya que modifican estructura y función de las proteínas, estas modificaciones post-traduccionales oxidativas/nitrosativas contribuyen a la diversidad del proteoma y la proteómica redox es la mejor aproximación para su identificación¹⁹⁵.

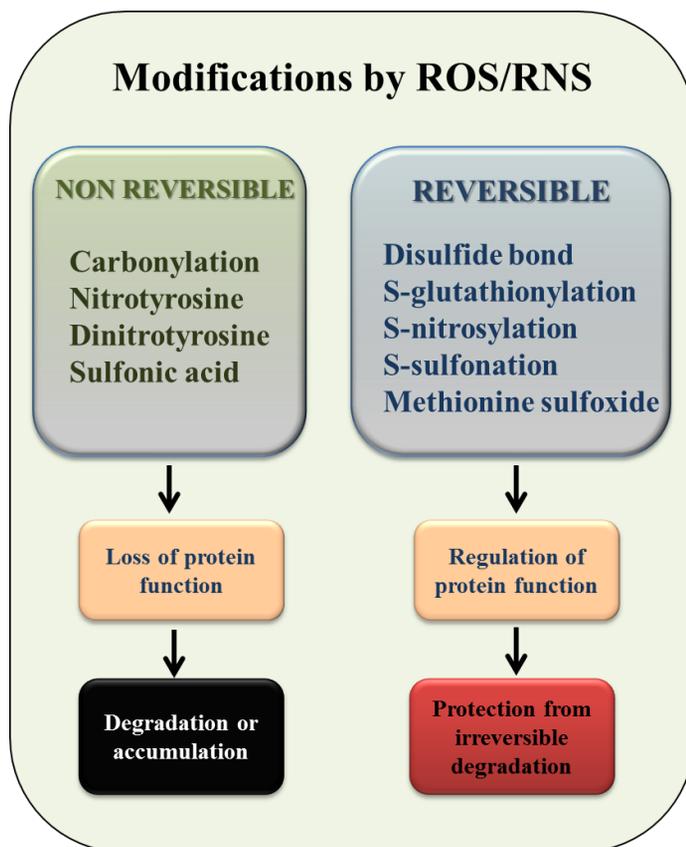


Figure 30. Oxidative modifications of proteins.

Oxidación reversible de grupos tiólicos

La regulación redox es un mecanismo modulador de las funciones celulares de todas las células y organismos vivos que, además, se ve implicado en muchas enfermedades y procesos patológicos¹⁹⁶. La oxidación de tioles proteicos ha emergido como un mecanismo muy importante por el cual los sistemas redox celulares controlan los procesos de señalización celular^(revisado en 187, 195, 197, 198).

La cisteína (Cys) es un residuo clave implicado en la catálisis, en el tráfico y plegamiento de proteínas y en la regulación y señalización redox. Sin embargo las propiedades electrofílicas de su grupo tiólico hacen que sea vulnerable a muchos electrófilos, especialmente ROS/N, sufriendo modificaciones que alteran la estructura de la proteína, su función o su papel en la señalización redox. Aunque los residuos Cys son escasos, representan 1-3% del total de los residuos proteicos y sus grupos tiol (10-30 mM) son más abundantes que el glutatión (1-10 mM)¹⁹⁹⁻²⁰¹. Los grupos tiol de las Cys participan en el ciclo de S-tiolación/destiolación, oxidándose a disulfuros mixtos, lo que conlleva un descenso paralelo en los niveles de ROS, que son posteriormente reducidos por tiorredoxina, glutarredoxina y/o la proteína disulfuroisomerasa (Fig. 31)²⁰². La S-tiolación protege a los tioles proteicos de oxidaciones irreversibles y reprogramaciones celulares durante el estrés oxidativo²⁰³.

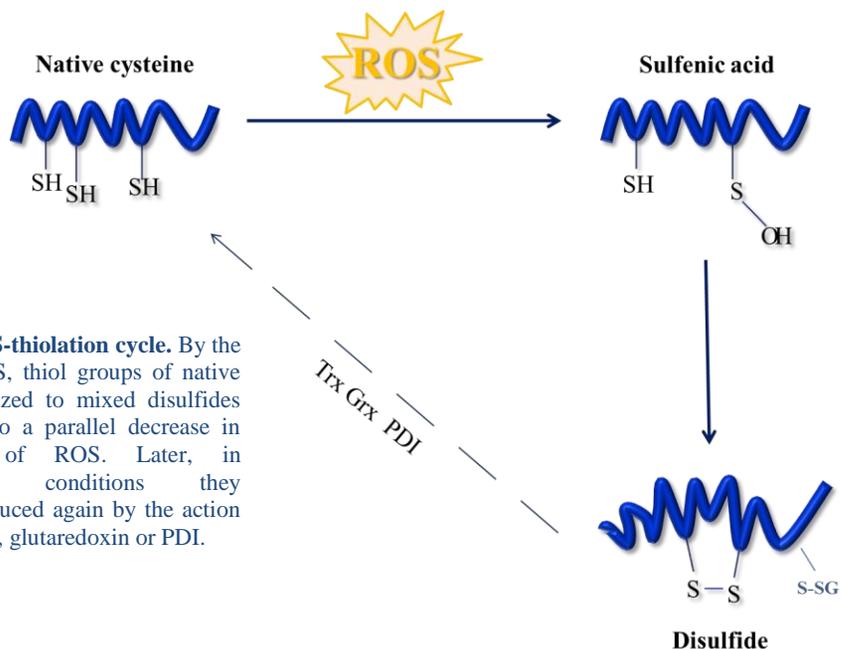


Figure 31 S-thiolation cycle. By the action of ROS, thiol groups of native Cys are oxidized to mixed disulfides which leads to a parallel decrease in the levels of ROS. Later, in physiological conditions they regenerate reduced again by the action of thioredoxin, glutaredoxin or PDI.

Los restos tiólicos de las Cys son muy sensibles a las reacciones redox de modo que pueden funcionar como sensores redox. Los tioles protéicos (P-SH) pueden interactuar con gran variedad de oxidantes para formar, en muchos casos, modificaciones covalentes reversibles (Fig. 32). Este mecanismo covalente reversible, que incluye la formación de enlaces disulfuro, es el mecanismo más importante por el cual se puede controlar la función proteica ^(revisado en 47, 195, 198, 204). Para esto, es esencial que la oxidación tenga lugar en grupos -SH concretos de proteínas específicas ²⁰⁵.

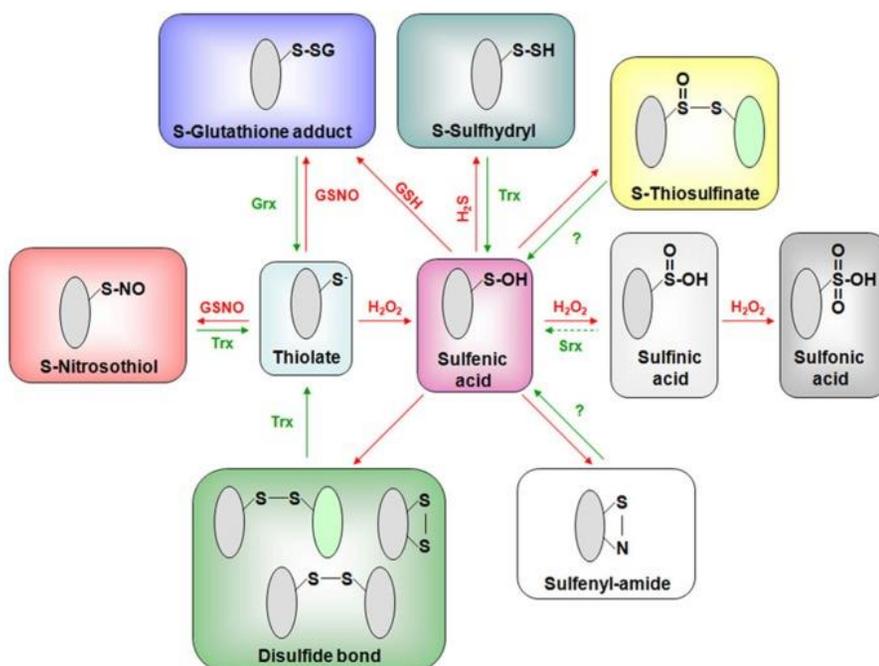


Figure 32. Major oxidative modifications of cysteinyl residues and their reduction pathways ²⁰⁹.

En principio, todos los grupos P-SH son susceptibles de oxidación por ROS. Sin embargo, el entorno de algunos de ellos disminuye su pKa, lo que les permite estar, a pH fisiológico, en forma de ion tiolato (P-S⁻), mucho más reactiva ²⁰⁶. Los tioles pueden formar productos de sulfoxidación como ácidos sulfénico ²⁰⁷, sulfínico (SO₂H) o sulfónico (SO₃H), y como diferentes tipos de disulfuros, inter- o intramoleculares (P-S-S-P) o disulfuros mixtos proteína-glutación (P-S-S-G) ²⁰⁸. El anión tiolato (S⁻) puede, además, oxidarse a sulfénico, que es relativamente reactivo. Los oxidantes fuertes oxidarán el ion tiolato a sulfínico o sulfónico.

Algunas de estas formas de oxidación, como los disulfuros, los ácidos sulfénicos, y en algunos casos, los sulfínicos, son reversibles y por tanto, son adecuados para participar en la regulación redox de las células ²⁰⁸. En cambio, los ácidos sulfónicos son formas de oxidación irreversibles que requieren la síntesis *de novo* de la proteína para restaurar su función. Aunque la formación de ácidos sulfénicos pueden ser la forma inicial de la oxidación de tioles en muchas proteínas, los P-S-S-G (proteína-glutatión) son probablemente el intermediario más estable en los procesos de señalización redox ^{210, 211}.

Los avances en las técnicas proteómicas han dado lugar al aumento del número de estudios que evalúan el estado redox de P-SH en células sometidas a estrés oxidativo y al desarrollo métodos para la detección, cuantificación e identificación de grupos tioles de proteínas sensibles a la oxidación han sido revisados ^{44, 48, 187, 189, 198, 199, 212-223}. En ellos se combina el marcaje específico de los tioles proteicos y la separación por electroforesis bidimensional (2-DE). El uso de N-etilmaleimida (NEM) o iodoacetamida (IAM) impide la oxidación de los tioles nativos reducidos durante el procedimiento de extracción de la proteína, que, posteriormente, se pueden reducir y marcar con 5-iodoacetamidafluoresceína (IAF). Este método detecta sólo los disulfuros nativos, i.e., disulfuros intra/ intermoleculares en proteínas (PS–SP) y disulfuros mixtos entre proteína y GSH (PS–SG) ^{217, 224-227}.

Las Cys de las proteínas pueden ser identificadas por espectrometría de masas (MS), obteniéndose información sobre el estado tiol-disulfuro de los péptidos o la evidencia de la oxidación reversible de un residuo específico de Cys ^{218-220, 228}. Sin embargo, se desconoce la identidad y el significado fisiológico de la mayoría de los cambios en los tioles proteicos ²¹⁹.

Cuantificación de disulfuros proteicos oxidados como biomarcador de exposición a contaminación

Las modificaciones redox de las proteínas resultan de primordial interés en toxicología ambiental. Las proteínas pueden absorber la mayor parte de ROS y los tioles proteicos, una de las principales dianas del estrés oxidativo ²²⁹, son de especial interés debido a su potencial para modular y señalar muchas rutas bioquímicas ²³⁰. El estudio de los daños oxidativos a las proteínas puede proporcionar información básica de los mecanismos de toxicidad implicados incluso en condiciones sub-estrés. En este sentido,

la cuantificación de tioles oxidados ha demostrado ser un potente indicador de estrés oxidativo en organismos acuáticos expuestos a diferentes agentes prooxidantes^{229, 231, 232}. En los últimos años muchos estudios han usado la cuantificación de tioles oxidados como marcador de oxidación en experimentos de exposición de animales acuáticos a diferentes sustancias contaminantes^{233 234 235 236 237, 238}. Aunque en menor número, se ha utilizado la cuantificación y caracterización de los tioles oxidados en estudios con organismos de vida libre para biomonitorizar ecosistemas y buscar biomarcadores de contaminación^{239 111, 199}.

Carbonilación de proteínas

Las proteínas sufren también modificaciones por oxidación que las inactivan y hacen que su destino final sea la degradación. Un ejemplo de este tipo de modificaciones irreversibles es la carbonilación, una de las más dañinas y se considera como una de las principales características de los trastornos relacionados con el estrés oxidativo⁴².

La carbonilación de proteínas se define como una modificación post-traducciona (PTM), de carácter irreversible, que genera en la proteína un resto carbonilo reactivo, aldehído, cetona, o lactama⁴². Estos carbonilos reactivos pueden surgir en diferentes sitios y a través de diferentes mecanismos, que pueden ser directos, por oxidación o amidación de aminoácidos, o de manera indirecta, por formación de aductos con productos originados por peroxidación lipídica o glicación/glicoxidación²⁴⁰. La carbonilación por oxidación directa se produce por ataque de radicales hidroxilo²⁴¹⁻²⁴³, que oxidan las cadenas laterales de ciertos aminoácidos (Fig. 33). Los productos más comunes son los semialdehídos glutámico y aminoadípico, derivados de Arg y Lys, respectivamente²⁴⁴ y la quinurenina y formil N-quinurenina, y sus análogos hidroxilados, generados al oxidarse el Trp. También se forman grupos carbonilos de forma directa por la ruta de alfa-amidación que conlleva la ruptura oxidativa del enlace peptídico^{245, 246}.

Otra vía importante de carbonilación protéica es la mediada por productos generados durante la peroxidación lipídica, como 4-hidroxinonenal (4-HNE), 2-propenal (acroleína) o malondialdehído (MDA) (Fig. 33). Éstos son, en general, fuertes electrófilos que pueden reaccionar con los grupos nucleofílicos de las cadenas laterales de His, Cys o Lys, para formar bases de Schiff o aductos de Michael²⁴⁷⁻²⁴⁹. Asimismo, es posible la introducción de carbonilos en proteínas por adición de derivados de carbonilos reactivos

(cetoaminas, cetoaldehídos y deoxiosonas), producidos por reacción de azúcares reductores, o sus productos de oxidación, con el grupo amino de los residuos de Lys o Arg; estos mecanismos de glicación y glicoxidación generan distintos tipos de aductos (Fig.33) ^{240, 250}.

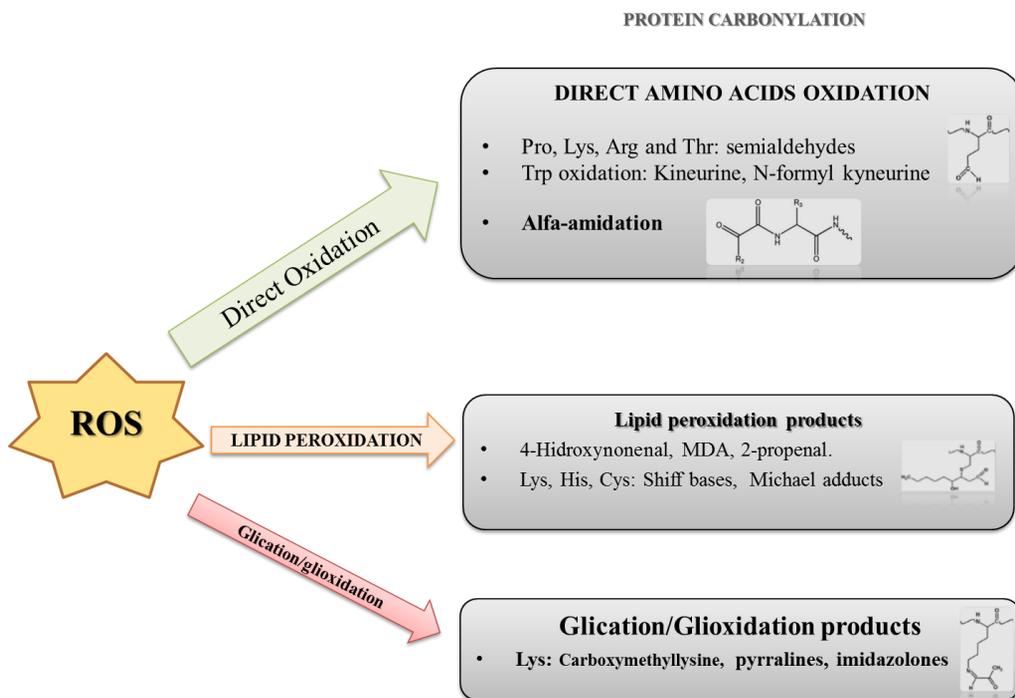


Figure 33. Carbonyl groups (C=O) can modify proteins through direct oxidation of the amino acid side chain or by inducing oxidative cleavage of the peptide bond. Indirect oxidation can occur when carbonyl groups of a previously oxidized lipid or oxidized carbohydrate react with Cys, His and Lys residues, inducing lipoxidation and glycooxidation, respectively.

Las proteínas carboniladas no pueden ser reparadas por los mecanismos enzimáticos celulares, lo cual provoca que tiendan a agregarse, debido al aumento de la hidrofobicidad general de sus residuos. Estas proteínas carboniladas deben ser eliminadas por la maquinaria del proteosoma para mantener la homeostasis celular, ya que su acumulación acaba induciendo muerte celular ⁴².

Detección de proteínas carboniladas

Los métodos bioquímicos y analíticos usados para identificar y cuantificar los carbonilos reactivos pueden clasificarse en tres categorías ⁴²: (i) técnicas bioquímicas e inmunológicas, como el *immunobloting* o ELISA, que proporcionan información global sobre la modificación de las proteínas y los niveles de carbonilación; (ii) ensayos espectrométricos y cromatográficos para determinar los niveles totales de proteínas carboniladas; y (iii) recientemente, se viene utilizando espectrometría de masas, que permite la identificación de las proteínas modificadas, así como la localización de los sitios de modificación.

El método más comúnmente usado para cuantificar grupos carbonilo está basado en el uso de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), que reacciona con los carbonilos formando la 2,4-dinitrofenilhidrazona, mucho más estable. El grupo dinitrofenil puede ser detectado y cuantificado espectrofotométricamente ^{251, 252}, aunque la forma más común para detectar el grupo es mediante anticuerpos anti-DNP, lo que se conoce como técnica “*oxyblot*”. Esta técnica, en combinación con proteómica basada el gel para separar las proteínas y espectrometría de masas para su identificación, es hoy la técnica de elección para la cuantificación de carbonilaciones. Recientemente se ha desarrollado también un protocolo con una aproximación “*shot-gun*” centrada en el estudio de los péptidos mediante LC-MS; este método emplea etiquetas isobáricas que permiten cuantificar el grado de carbonilación e incluso “mapear” los aminoácidos modificados ²⁵³.

La carbonilación proteica como biomarcador de exposición a contaminación

Los niveles de carbonilación de proteínas son reconocidos como un marcador universal de estrés oxidativo y han sido vinculados a diversos trastornos y patologías, envejecimiento y muerte celular ^{212, 254, 255}. Asimismo, permiten determinar daños tisulares y/o trastornos metabólicos provocados por contaminación ²⁵⁶. Distintos estudios han propuesto la determinación de niveles de carbonilación como un biomarcador molecular de estrés oxidativo. En organismos acuáticos, la carbonilación de proteínas se analizó por primera vez en *Mytilus edulis*, estudio que señaló a la glándula digestiva como el principal sitio de carbonilación en respuesta al estrés oxidativo producido por metales pesados como Cd y Zn ²⁵⁷. Este estudio demostró que las dianas de carbonilación son

proteínas específicas, poniendo en valor esta PTM como biomarcador específico y sensible de estrés oxidativo. Posteriormente se ha usado la carbonilación de proteínas como biomarcador en organismos acuáticos del efecto a la exposición de diferentes metales pesados como Cr^{258, 259}, Cd²⁶⁰, As²⁶¹ o incluso para la biomonitorización de zonas expuestas a altas concentraciones de metales (Cu) y PAHS²⁶². Asimismo, la cuantificación de la carbonilación de proteínas ha sido a menudo usada en organismos acuáticos para evaluar el estrés oxidativo inducido por plaguicidas²⁶³⁻²⁶⁵ y contaminantes emergentes, como nanopartículas^{266, 267} o drogas de abuso²⁶⁸.

Metalómica

El estudio de los mecanismos de absorción de metales/metaloides, su tráfico y función en los procesos biológicos complejos, resulta de sumo interés para comprender los mecanismos moleculares que subyacen a los efectos beneficiosos o tóxicos ejercidos por estos, y aún más, para 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 célula²⁷⁵. El “metaloma” se refiere a la medida de los elementos (especies metálicas y metaloides) presentes en una célula o tejido, su identificación, cuantificación localización y especiación²⁶⁹⁻²⁷⁴. Los iones metálicos presentes en la célula están principalmente ligados (enlaces de coordinación) a biomoléculas tanto de bajo (ácidos orgánico y aminoácidos), como de alto peso molecular (proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos). Los metaloides suelen estar unidos por enlace covalente a biomoléculas, como es el caso de las selenoproteínas o los arsenolípidos.

Los procedimientos analíticos de especiación química se han ido desarrollando en los últimos 20 años y se usan de forma rutinaria en temas medioambientales, de salud o alimentarios. Estas metodologías requieren el acoplamiento de una técnica de separación como la cromatografía líquida (HPLC), electroforesis capilar (CE) o cromatografía de gases⁵⁸, con un detector atómico como el plasma de acoplamiento inductivo con detector de masas (ICP-MS). El ICP-MS en este campo es una herramienta muy valiosa que proporciona gran sensibilidad, selectividad y precisión facilitando el

análisis de metalobiomoléculas a muy baja concentración en matrices biológicas complejas²⁷⁶.

Metabolómica

El metaboloma es el conjunto de compuestos de baja masa molecular (típicamente <1.000Da) presentes en los sistemas biológicos²⁷⁷. La metabolómica es el análisis (identificación y cuantificación) del metaboloma en una célula bajo determinadas condiciones endógenas (fisiológica) o exógenas (exposición)²⁷⁸. Los enfoques metabolómicos se han desarrollado en muchas áreas de la investigación bioanalítica, incluyendo la toxicología²⁷⁹, debido a la posibilidad de detectar la respuesta metabólica a la exposición química a fin de encontrar biomarcadores sobre el estado fisiológico real de los organismos vivos. Por ello, la metabolómica juega un papel clave para entender los resultados de los procesos biológicos complejos, así como para la diagnosis de cambios importantes a nivel celular y biológico relacionados con el medio ambiente, los alimentos y la salud¹²⁷.

La metabolómica ambiental es un procedimiento emergente para estudiar los perfiles metabólicos de los sistemas biológicos expuestos a estrés medioambiental y poder caracterizar las interacciones de los xenobióticos con los seres vivos^{280, 281}. Cuando se emplea de forma integrada con otras *ómicas*, como transcriptómica y proteómica, permite evaluar el impacto bioquímico de los xenobióticos y los aspectos toxicológicos asociados²⁸¹.

Técnicas analíticas para la búsqueda de biomarcadores en metabolómica

La búsqueda e identificación de metabolitos útiles como biomarcadores requiere el uso de técnicas analíticas que tengan un amplio rango de aplicabilidad, además de muy elevada selectividad, especificidad y sensibilidad. En metabolómica se puede seguir un enfoque dirigido, basado en una hipótesis establecida previamente, en el que se mide y cuantifica un conjunto pequeño y bien definido de metabolitos conocidos²⁸², o rutas metabólicas generales²⁸³. Este tipo de análisis se viene desarrollando desde hace décadas por lo que existen numerosos métodos para cuantificar metabolitos como azúcares, aminoácidos, esteroides o ácidos grasos, entre otros²⁸⁴⁻²⁸⁶. Los análisis no-dirigidos son

globales en su alcance y tienen el objetivo de medir simultáneamente la mayor cantidad posible de metabolitos a partir de muestras biológicas sin ninguna discriminación, excepto las inherentes a la metodología y la limitación que supone la identificación de los metabolitos a partir de conjuntos de datos extremadamente complejos^{287, 294}.

Las principales técnicas analíticas que se emplean para los estudios metabolómicos se basan en la resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrometría de masas (MS). La primera tiene carácter no destructivo y permite reutilizar la muestra para otros análisis, además la preparación de la muestra es muy simple, por lo que es una técnica fácilmente reproducible. Sin embargo, la MS presenta ventajas frente a la RMN, como su mayor sensibilidad y la posibilidad de aplicarse a muestras complejas en la que los distintos analitos se encuentren en un amplio rango de concentraciones. Además, MS es también una técnica importante para la identificación molecular de metabolitos desconocidos, especialmente a través del uso de experimentos en tándem MS/MS^{99, 288-290}.

La metabolómica debe hacer frente a la gran complejidad química y física de los metabolitos, entre los que hay compuestos muy polares y otros muy hidrófobos, que tienen masas muy diversas (de 50 a 1000 Da) en la mayoría de las matrices biológicas. Dada esta heterogeneidad, deben considerarse numerosos factores que van desde la cuidadosa preparación de muestra, la elección de las metodologías y herramientas de análisis, el análisis de los datos y, por último, la interpretación biológica de los resultados, en un esquema de trabajo (*workflow*) que debe estar perfectamente definido (Fig.34). La espectrometría de masas de ionización por electro-espray acoplado a cromatografía líquida (LC/ESI-MS) es la combinación de más comúnmente utilizada en la metabolómica no-dirigida, usando principalmente como analizador QqQ-TOF de alta resolución, ya que proporciona una mayor sensibilidad y especificidad molecular.

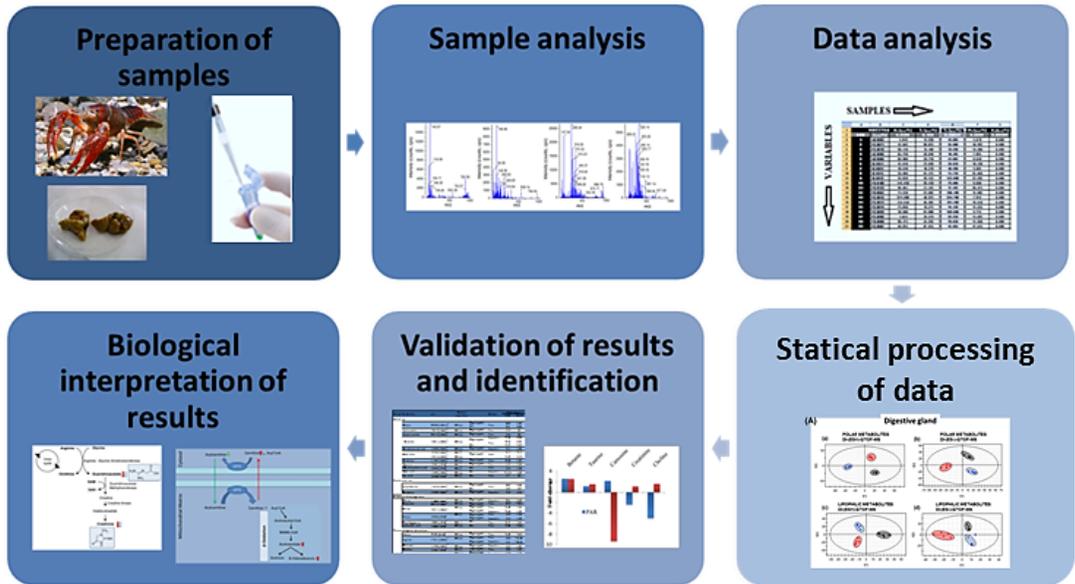


Figure 34. Workflow for a Metabolomic “non-target” analysis.

Estudios metabolómicos aplicados a la toxicología medioambiental en ecosistemas acuáticos

Aunque la metabolómica es un campo relativamente reciente, ha sido usada como una potente herramienta en el estudio de los mecanismos de toxicidad de muy diversas sustancias consideradas como contaminantes medioambientales. Existen en la bibliografía diversos estudios sobre el metaboloma de organismos acuáticos expuestos a tóxicos²⁹⁵⁻²⁹⁸. El desarrollo de las técnicas metabolómicas ha permitido también, en los últimos años, su uso para la biomonitorización ambiental de ecosistemas acuáticos, usándose en organismos de vida libre como bioindicadores como bivalvos, peces o cangrejos^{299, 300-307}.

Referencias

- Cribb, J., *Poisoned Planet: How constant exposure to man-made chemicals is putting your life at risk*. Allen & Unwin Sidney Australia, 2014.
- OCDE, *OECD Environmental Outlook to 2050: The Consequences of Inaction* - ISBN 978-92-64-122161 In 2012.
- Hodgson, E., *Introduction to Toxicology*. In *A Textbook of Modern Toxicology*, John Wiley & Sons, Inc.: 2004; pp 1-12.
- Orozco Barrenetxea C, P. S. A., González Delgado MN, Rodríguez Vidal F, Alfayate; JM, B., *Contaminación Ambiental. Una visión desde la química*. 2003.
- Livingstone, D. R., *Biotechnology and pollution monitoring: Use of molecular biomarkers in the aquatic environment*. *J Chem Technol Biotechnol* 1993, 57, (3), 195-211.
- Wilson, J.; Berntsen, H. F.; Zimmer, K. E.; Verhaegen, S.; Frizzell, C.; Ropstad, E.; Connolly, L., *Do persistent organic pollutants interact with the stress response? Individual compounds, and their mixtures, interaction with the glucocorticoid receptor*. *Toxicol. Lett.* 2016, 241, 121-132.
- Timbrell, J., *Principles of biochemical toxicology*. 3rd ed.; Taylor & Francis: London; New York, 2000; p ix, 394 p.
- Walker, C. H.; Sibly, R. M.; Hopkin, S. P.; Peakall, D. B., *Principles of ecotoxicology*. 4th ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, 2012; p xxv, 360 p.
- Carmona, U.; Zhang, L.; Li, L.; Munchgesang, W.; Pippel, E.; Knez, M., *Tuning, inhibiting and restoring the enzyme mimetic activities of Pt-apoferritin*. *Chem Commun (Camb)* 2014, 50, (6), 701-3.
- Purves, D., *CHAPTER 1 - TRACE-ELEMENT CONTAMINANTS*. In *Trace Element Contamination of the Environment*, Elsevier: 1977; pp 9-27.
- Förstner, U.; Wittmann, G. T. W., *Metal Pollution in the Aquatic Environment*. 2nd ed.; Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 1981; p 488.
- Tchounwou, P. B.; C.G., Y.; A.K., P.; D.J., S., *Heavy Metals Toxicity and the Environment*. *EXS*. 2012, 101, 133*164.
- Sharma, B.; Singh, S.; Siddiqi, N. J., *Biomedical implications of heavy metals induced imbalances in redox systems*. *Biomed Res Int* 2014, 2014, 640754.
- Marth, E.; Jelovcan, S.; Kleinhapfl, B.; Gutsch, A.; Barth, S., *The effect of heavy metals on the immune system at low concentrations*. *International journal of occupational medicine and environmental health* 2001, 14, (4), 375-86.
- Jaishankar, M.; Tseten, T.; Anbalagan, N.; Mathew, B. B.; Beeregowda, K. N., *Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals*. *Interdiscip Toxicol* 2014, 7, (2), 60-72.
- Pruchniak, M. P.; Arazna, M.; Demkow, U., *Biochemistry of Oxidative Stress*. *Adv Exp Med Biol* 2016, 878, 9-19.
- Krengel, U.; Tornroth-Horsefield, S., *Biochemistry. Coping with oxidative stress*. *Science* 2015, 347, (6218), 125-6.
- Halliwell, B., *Biochemistry of oxidative stress*. *Biochem Soc Trans* 2007, 35, (Pt 5), 1147-50.
- Bast, A.; Goris, R. J., *Oxidative stress. Biochemistry and human disease*. *Pharm Weekbl Sci* 1989, 11, (6), 199-206.
- López-Barea, J., *Biomarkers in Ecotoxicology: an Overview*. In *Toxicology in Transition*, Degen, G.; Seiler, J.; Bentley, P., Eds. Springer Berlin Heidelberg: 1995; Vol. 17, pp 57-79.
- Ruiz-Laguna, J.; Abril, N.; Garcia-Barrera, T.; Gomez-Ariza, J. L.; Lopez-Barea, J.; Pueyo, C., *Absolute transcript expression signatures of Cyp and Gst genes in Mus spretus to detect environmental contamination*. *Environ Sci Technol* 2006, 40, (11), 3646-52.
- Rueda, J.; Camacho, A.; Mezquita, F.; Hernández, R.; Roca, J., *Effect of Episodic and Regular Sewage Discharges on the Water Chemistry and Macroinvertebrate Fauna of a Mediterranean Stream*. *Water, Air, & Soil Pollution* 2002, 140, (1-4), 425-444.
- Lowe, W. R.; Kendall, R. J., *Sentinel species and sentinel bioassay*. Lewis Publishers: Boca Ratón., 1990.
- den Besten, P. J.; Munawar, M.; Suter, G., *Ecotoxicological testing of marine and freshwater ecosystems: Emerging techniques, trends and strategies*. *Integrated Environmental Assessment and Management* 2007, 3, (2), 305-306.
- Grandjean, P.; Brown, S. S.; Reavey, P.; Young, D. S., *Biomarkers of chemical exposure: state of the art*. *Clin Chem* 1994, 40, (7 Pt 2), 1360-2.
- Winston, G. W.; Di giulio, R. T., *Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms*. *Aquatic Toxicol* 1991, 19, 137.161.
- Lopez-Barea, J.; Pueyo, C., *Mutagen content and metabolic activation of promutagens by molluscs as biomarkers of marine pollution*. *Mutat Res* 1998, 399, (1), 3-15.
- Kruk, I., *Environmental Toxicology and Chemistry of Oxygen Species*. Berlin, Springer-Verlag 1998.
- Winston, G. W.; Di Giulio, R. T., *Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms*. *Aquat. Toxicol.* 1991, 19, (2), 137-161.

30. Fridovich, I., Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J Biol Chem* 1989, 264, (14), 7761-4.
31. Finkel, T.; Holbrook, N. J., Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000, 408, (6809), 239-47.
32. Wassmann, S.; Wassmann, K.; Nickenig, G., Modulation of Oxidant and Antioxidant Enzyme Expression and Function in Vascular Cells. *Hypertension* 2004, 44, (4), 381-386.
33. Rhee, S. G.; Chae, H. Z.; Kim, K., Peroxiredoxins: A historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radical Bio Med* 2005, 38, (12), 1543-1552.
34. Nordberg, J.; Arner, E. S., Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 2001, 31, (11), 1287-312.
35. Valko, M.; Rhodes, C. J.; Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M., Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 2006, 160, (1), 1-40.
36. Sies, H., Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 1993, 215, (2), 213-9.
37. Berg, J.; Tymoczko, J.; Stryer, L., *Biochemistry*. Freeman and Company.: New York, 2002.
38. Solé, M.; Livingstone, D. R., Components of the cytochrome P450-dependent monooxygenase system and 'NADPH-independent benzo[a]pyrene hydroxylase' activity in a wide range of marine invertebrate species. *Comp Biochem Phys C* 2005, 141, (1), 20-31.
39. Roberts, R. A.; Laskin, D. L.; Smith, C. V.; Robertson, F. M.; Allen, E. M.; Doorn, J. A.; Slikker, W., Nitrate and oxidative stress in toxicology and disease. *Toxicol Sci* 2009, 112, (1), 4-16.
40. Gutteridge, J. M.; Halliwell, B., The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci* 1990, 15, (4), 129-35.
41. Lander, E. S.; Linton, L. M.; Birren, B., et al., Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001, 409, (6822), 860-921.
42. Fedorova, M.; Bollineni, R. C.; Hoffmann, R., Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: Update of analytical strategies. *Mass Spectrom Rev* 2014, 33, (2), 79-97.
43. Shen, L.; Chen, C.; Yang, A.; Chen, Y.; Liu, Q.; Ni, J., Redox proteomics identification of specifically carbonylated proteins in the hippocampi of triple transgenic Alzheimer's disease mice at its earliest pathological stage. *J Proteomics* 2015, 123, 101-13.
44. Pisoschi, A. M.; Pop, A., The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem* 2015, 97, 55-74.
45. Cabisco, E.; Tamarit, J.; Ros, J., Protein carbonylation: Proteomics, specificity and relevance to aging. *Mass Spectrom Rev* 2014, 33, (1), 21-48.
46. Frohner, B. I.; Bernlohr, D. A., Protein carbonylation, mitochondrial dysfunction, and insulin resistance. *Adv Nutr* 2013, 4, (2), 157-63.
47. Cai, Z.; Yan, L.-J., Protein Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health. *Journal of biochemical and pharmacological research* 2013, 1, (1), 15-26.
48. Poole, L. B., The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry. *Free Radical Bio Med* 2015, 80, 148-157.
49. Wani, R.; Nagata, A.; Murray, B. W., Protein redox chemistry: post-translational cysteine modifications that regulate signal transduction and drug pharmacology. *Front Pharmacol* 2014, 5.
50. Harris, C.; Hansen, J. M., Oxidative stress, thiols, and redox profiles. *In Methods Mol Biol*, 2012, 889, 325-346.
51. Sies, H., Oxidative Stress: Introductory remarks. *Oxidative Stress*. 1985, Sies H. London, Academic Press, 1-8.
52. Alhama, J.; Ruiz-Laguna, J.; Rodriguez-Ariza, A.; Toribio, F.; Lopez-Barea, J.; Pueyo, C., Formation of 8-oxoguanine in cellular DNA of *Escherichia coli* strains defective in different antioxidant defences. *Mutagenesis* 1998, 13, (6), 589-94.
53. Rodriguez-Ariza, A.; Alhama, J.; Diaz-Mendez, F. M.; Lopez-Barea, J., Content of 8-oxodG in chromosomal DNA of *Sparus aurata* fish as biomarker of oxidative stress and environmental pollution. *Mutat Res* 1999, 438, (2), 97-107.
54. Moalla, S. M. N.; Awadallah, R. M.; Rashed, M. N.; Soltan, M. E., Distribution and chemical fractionation of some heavy metals in bottom sediments of Lake Nasser. *Hydrobiologia* 364, (1), 31-40.
55. Purves, D., Trace-element contamination of the environment. Rev. ed.; Elsevier ;Distributors for the U.S.A. and Canada, Elsevier Science Pub. Co.: Amsterdam ; New York, New York, 1985; p xi, 243 p.
56. Förstner, U.; Wittmann, G. T. W., *Metal Pollution in the Aquatic Environment*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 1981.
57. Jan, A. T.; Azam, M.; Siddiqui, K.; Ali, A.; Choi, I.; Haq, Q. M., Heavy Metals and Human Health: Mechanistic Insight into Toxicity and Counter Defense System of Antioxidants. *Int J Mol Sci* 2015, 16, (12), 592-630.
58. Stohs, S. J.; Bagchi, D., Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* 1995, 18, 321-36.
59. Gurer, H.; Ercal, N., Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Radic Biol Med* 2000, 29, (10), 927-45.
60. Stinson, T. J.; Jaw, S.; Jeffery, E. H.; Plewa, M. J., The relationship between nickel chloride-induced peroxidation and DNA strand breakage in rat liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992, 117, (1), 98-103.

61. Lund, B. O.; Miller, D. M.; Woods, J. S., Studies on Hg(II)-induced H₂O₂ formation and oxidative stress in vivo and in vitro in rat kidney mitochondria. *Biochem Pharmacol* 1993, 45, (10), 2017-24.
62. Feo, C. J.; Aller, S. G.; Unger, V. M., A structural perspective on copper uptake in eukaryotes. *Biometals* 2007, 20, (3), 705-716.
63. Kim, B.-E.; Nevitt, T.; Thiele, D. J., Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nat Chem Biol* 2008, 4, (3), 176-185.
64. O'Halloran, T. V.; Culotta, V. C., Metallochaperones, an Intracellular Shuttle Service for Metal Ions. *J. Biol. Chem* 2000, 275, (33), 25057-25060.
65. Coyle, P.; Philcox, C. J.; Carey, C. L.; Rofe, M. A., Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci.* 2002, 59, (4), 627-647.
66. Castagnetto, J. M.; Hennessy, S. W.; Roberts, V. A.; Getzoff, E. D.; Tainer, J. A.; Pique, M. E., MDB: the Metalloprotein Database and Browser at The Scripps Research Institute. *Nucleic Acids Res.* 2002, 30, (1), 379-382.
67. van der Oost, R.; Beyer, J.; Vermeulen, N. P. E., Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2003, 13, (2), 57-149.
68. Aldridge, W., Mechanisms and Concepts in Toxicology. Taylor & Francis: London, 1996.
69. Okey, A. B., Enzyme induction in the cytochrome P-450 system. *Pharmacol Ther* 1990, 45, (2), 241-98.
70. Goksoyr, A., Use of cytochrome P450 1A (CYP1A) in fish as a biomarker of aquatic pollution. *Arch Toxicol Suppl* 1995, 17, 80-95.
71. Nebert, D. W.; Gonzalez, F. J., P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annu Rev Biochem* 1987, 56, 945-93.
72. Larsen, H. E.; Celander, M.; Goksoyr, A., The cytochrome P450 system of Atlantic salmon (*Salmo salar*): II. Variations in hepatic catalytic activities and isozyme patterns during an annual reproductive cycle. *Fish Physiol Biochem* 1992, 10, (4), 291-301.
73. Whitlock, J. P., Jr., Induction of cytochrome P4501A1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999, 39, 103-25.
74. Feyereisen, R., Insect P450 enzymes. *Annu Rev Entomol* 1999, 44, 507-33.
75. James, M. O.; Boyle, S. M., Cytochromes P450 in crustacea. *Comp Biochem Phys C* 1998, 121, (1-3), 157-172.
76. Ishizuka, M.; Hoshi, H.; Minamoto, N.; Masuda, M.; Kazusaka, A.; Fujita, S., Alterations of cytochrome P450-dependent monooxygenase activities in *Eriocheir japonicus* in response to water pollution. *Environ Health Perspect* 1996, 104, (7), 774-8.
77. Stone, D.; Jepson, P.; Laskowski, R., Trends in detoxification enzymes and heavy metal accumulation in ground beetles (Coleoptera: Carabidae) inhabiting a gradient of pollution. *Comp Biochem Phys C* 2002, 132, (1), 105-112.
78. Hayes, J. D.; Flanagan, J. U.; Jowsey, I. R., GLUTATHIONE TRANSFERASES. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004, 45, (1), 51-88.
79. Wu, B.; Dong, D., Human cytosolic glutathione transferases: structure, function, and drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* 2012, 33, (12), 656-668.
80. Board, P. G.; Menon, D., Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochimica et Biophysica Acta* 2013, 1830, (5), 3267-3288.
81. Oakley, A., Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug Metab. Rev.* 2011, 43, (2), 138-51.
82. Lu, L.; Pandey, A. K.; Houseal, M. T.; Mulligan, M. K., The Genetic Architecture of Murine Glutathione Transferases. *PLoS ONE* 2016, 11, (2), e0148230.
83. Timbrell, J. A., Principles of Biochemical Toxicology, . Fourth Edition ed.; CRC Press.
84. Čolović, M. B.; Krstić, D. Z.; Lazarević-Pašti, T. D.; Bondžić, A. M.; Vasić, V. M., Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Curr Neuropharmacol.* 2013, 11, (3), 315-335.
85. Vioque-Fernández, A.; de Almeida, E. A.; López-Barea, J., Esterases as pesticide biomarkers in crayfish (*Procambarus clarkii*, Crustacea): Tissue distribution, sensitivity to model compounds and recovery from inactivation. *Comp Biochem Phys C* 2007, 145, (3), 404-412.
86. Capdevila, M.; Atrian, S., Metallothionein protein evolution: a miniassay. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2011, 16, (7), 977-89.
87. Coyle, P.; Philcox, J. C.; Carey, L. C.; Rofe, A. M., Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci* 2002, 59, (4), 627-47.
88. Capdevila, M.; Palacios, O.; Atrian, S., The zn- or cu-thionein character of a metallothionein determines its metal load when synthesized in physiological (metal-unsupplemented) conditions. *Bioinorg Chem Appl* 2010, 541829.
89. Maret, W.; Krężel, A., Cellular Zinc and Redox Buffering Capacity of Metallothionein/Thionein in Health and Disease. *Mol. Med* 2007, 13, (7-8), 371-375.
90. Lindquist, S.; Craig, E. A., The Heat-Shock Proteins. *Annu. Rev. Genet* 1988, 22, (1), 631-677.
91. Walker, C. H., The Use of Biomarkers to Measure the Interactive Effects of Chemicals. *Ecotoxicol Environ Saf* 1998, 40, 65-70.
92. Gomez-Ariza, J. L.; Gonzalez-Fernández, M.; Garcia-Barrera, T.; Lopez-Barea, J.; Pueyo, C., Integration of metallomics, proteomics and transcriptomics in environmental issues. *Chemické Listy* 2008, 102, s303-s308.

93. Vioque-Fernández, A.; Alves de Almeida, E.; López-Barea, J., Assessment of Doñana National Park contamination in *Procambarus clarkii*: Integration of conventional biomarkers and proteomic approaches. *Sci. Total Environ* 2009, 407, (5), 1784-1797.
94. Vioque-Fernández, A.; de Almeida, E. A.; Lopez-Barea, J., Biochemical and proteomic effects in *Procambarus clarkii* after chlorpyrifos or carbaryl exposure under sublethal conditions. *Biomarkers* 2009, 14, (5), 299-310.
95. Abril, N.; Ruiz-Laguna, J.; Osuna-Jimenez, I.; Vioque-Fernández, A.; Fernández-Cisnal, R.; Chicano-Gálvez, E.; Alhama, J.; Lopez-Barea, J.; Pueyo, C., Omic approaches in environmental issues. *J Toxicol Environ Health A* 2011, 74, (15-16), 1001-19.
96. Pueyo, C.; Gómez-Ariza, J.-L.; Bello-López, M.-A.; Fernández-Torrez, R.; Abril, N.; Alhama, J.; García-Barrera, T.; López-Barea, J., New methodologies for assessing the presence and ecological effects of pesticides in Doñana National Park (SW Spain). In *Pesticides in the Modern World - Trends in Pesticides Analysis*, Stoytcheva, M., Ed. InTech: Rijeka, Croatia, 2011; pp 167-196.
97. Abril, N.; Osuna-Jimenez, I.; Frenandez-Cisnal, R.; Chicano-Gálvez, E.; Prieto-Alamo, M. J.; Alhama-Carmona, J.; Gomez-Ariza, J. L.; Lopez-Barea, J.; Pueyo, C., Integrating omic technologies into environmental risk assessment. *FEBS Journal* 2012, 279, 227-227.
98. Garcia-Sevillano, M. A.; Garcia-Barrera, T.; Abril, N.; Pueyo, C.; Lopez-Barea, J.; Gomez-Ariza, J. L., Omics technologies and their applications to evaluate metal toxicity in mice *M. spretus* as a bioindicator. *J Proteomics* 2014, 104, 4-23.
99. Garcia-Sevillano, M. A.; Garcia-Barrera, T.; Navarro, F.; Abril, N.; Pueyo, C.; Lopez-Barea, J.; Gomez-Ariza, J. L., Use of metallomics and metabolomics to assess metal pollution in Donana National Park (SW Spain). *Environ Sci Technol* 2014, 48, (14), 7747-55.
100. Osuna-Jiménez, I.; Abril, N.; Vioque-Fernández, A.; Gómez-Ariza, J. L.; Prieto-Álamo, M.-J.; Pueyo, C., The environmental quality of Doñana surrounding areas affects the immune transcriptional profile of inhabitant crayfish *Procambarus clarkii*. *Fish Shellfish Immunol* 2014, 40, (1), 136-145.
101. Abril, N.; Chicano-Gálvez, E.; Michan, C.; Pueyo, C.; Lopez-Barea, J., iTRAQ analysis of hepatic proteins in free-living *Mus spretus* mice to assess the contamination status of areas surrounding Donana National Park (SW Spain). *Sci Total Environ* 2015, 523, 16-27.
102. García-Sevillano, M. A.; Abril, N.; Fernández-Cisnal, R.; García-Barrera, T.; Pueyo, C.; López-Barea, J.; Gómez-Ariza, J. L., Functional genomics and metabolomics reveal the toxicological effects of cadmium in *Mus musculus* mice. *Metabolomics* 2015, 11, 1432-1450.
103. Ruiz-Laguna, J.; Vélez, J.; Pueyo, C.; Abril, N., Global gene expression profiling using heterologous DNA microarrays to analyze alterations in the transcriptome of *Mus spretus* mice living in a heavily polluted environment. *Environ Sci Pollut Res* 2015, 1-15.
104. Fleischmann, R. D.; Adams, M. D.; White, O., et al., Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 1995, 269, (5223), 496-512.
105. Craig-Venter, J.; Adams, M. D.; Myers, E. W., et al., The sequence of the human genome. *Science* 2001, 291, (5507), 1304-51.
106. Abril, N.; Ruiz-Laguna, J.; Garcia-Sevillano, M. A.; Mata, A. M.; Gomez-Ariza, J. L.; Pueyo, C., Heterologous Microarray Analysis of Transcriptome Alterations in *Mus spretus* Mice Living in an Industrial Settlement. *Environ Sci Technol* 2014, 48, (4), 2183-92.
107. 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., Use of metallomics in environmental pollution assessment using mice *Mus musculus/Mus spretus* as bioindicators. *Curr Anal Chem* 2013, 9, 229-243.
108. Weiss, M.; Schrimpf, S.; Hengartner, M. O.; Lercher, M. J.; von Mering, C., Shotgun proteomics data from multiple organisms reveals remarkable quantitative conservation of the eukaryotic core proteome. *Proteomics* 2010, 10, (6), 1297-306.
109. Ghedira, J.; Chicano-Gálvez, E.; Fernández-Cisnal, R.; Jebali, J.; Banni, M.; Chouba, L.; Boussetta, H.; López-Barea, J.; Alhama, J., Using environmental proteomics to assess pollutant response of *Carcinus maenas* along the Tunisian coast. *Sci. Total Environ* 2016, 541, 109-118.
110. Jebali, J.; Chicano-Gálvez, E.; Fernández-Cisnal, R.; Banni, M.; Chouba, L.; Boussetta, H.; López-Barea, J.; Alhama, J., Proteomic analysis in caged Mediterranean crab (*Carcinus maenas*) and chemical contaminant exposure in Téboulba Harbour, Tunisia. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2014, 100, 15-26.
111. Fernández-Cisnal, R.; Alhama, J.; Abril, N.; Pueyo, C.; Lopez-Barea, J., Redox proteomics as biomarker for assessing the biological effects of contaminants in crayfish from Donana National Park. *Sci Total Environ* 2014, 490, 121-33.
112. Costa, P. M.; Chicano-Gálvez, E.; Caeiro, S., et al., Hepatic proteome changes in *Solea senegalensis* exposed to contaminated estuarine sediments: a laboratory and in situ survey. *Ecotoxicology* 2012, 21, (4), 1194-207.
113. Montes-Nieto, R.; Fuentes-Almagro, C. A.; Bonilla-Valverde, D.; Prieto-Alamo, M. J.; Jurado, J.; Carrascal, M.; Gomez-Ariza, J. L.; Lopez-Barea, J.; Pueyo, C., Proteomics in free-living *Mus spretus* to monitor terrestrial ecosystems. *Proteomics* 2007, 7, (23), 4376-4387.

114. Vioque-Fernández, A.; de Almeida, E. A.; Ballesteros, J.; Garcia-Barrera, T.; Gomez-Ariza, J. L.; Lopez-Barea, J., Donana National Park survey using crayfish (*Procambarus clarkii*) as bioindicator: esterase inhibition and pollutant levels. *Toxicol. Lett.* 2007, *168*, (3), 260-8.
115. Montes-Nieto, R.; Garcia-Barrera, T.; Gomez-Ariza, J. L.; Lopez-Barea, J., Environmental monitoring of Domingo Rubio stream (Huelva Estuary, SW Spain) by combining conventional biomarkers and proteomic analysis in *Carcinus maenas*. *Environ Pollut* 2010, *158*, (2), 401-8.
116. Salas-Leiton, E.; Canovas-Conesa, B.; Zerolo, R.; Lopez-Barea, J.; Canavate, J. P.; Alhama, J., Proteomics of juvenile senegal sole (*Solea senegalensis*) affected by gas bubble disease in hyperoxygenated ponds. *Mar Biotechnol* (NY) 2009, *11*, (4), 473-87.
117. Gonzalez-Fernández, M.; Garcia-Barrera, T.; Jurado, J.; Prieto-Álamo, M. J.; Pueyo, C.; Lopez-Barea, J.; Gomez-Ariza, J. L., Integrated application of Transcriptomics, Proteomics and Metallomics in environmental studies. *Pure Appl. Chem.* 2008, *12*, 2609-26.
118. Romero-Ruiz, A.; Carrascal, M.; Alhama, J.; Gomez-Ariza, J. L.; Abian, J.; Lopez-Barea, J., Utility of proteomics to assess pollutant response of clams from the Donana bank of Guadalquivir Estuary (SW Spain). *Proteomics* 2006, *6 Suppl 1*, S245-55.
119. Lopez-Barea, J.; Gomez-Ariza, J. L., Environmental proteomics and metallomics. *Proteomics* 2006, *6 Suppl 1*, S51-62.
120. Rodriguez-Ortega, M. J.; Grosvik, B. E.; Rodriguez-Ariza, A.; Goksoyr, A.; Lopez-Barea, J., Changes in protein expression profiles in bivalve molluscs (*Chamaelea gallina*) exposed to four model environmental pollutants. *Proteomics* 2003, *3*, (8), 1535-43.
121. Garcia-Sevillano, M. A.; Garcia-Barrera, T.; Navarro-Roldan, F.; Montero-Lobato, Z.; Gomez-Ariza, J. L., A combination of metallomics and metabolomics studies to evaluate the effects of metal interactions in mammals. Application to *Mus musculus* mice under arsenic/cadmium exposure. *J Proteomics* 2014, *104*, 66-79
122. Garcia-Sevillano, M. A.; Garcia-Barrera, T.; Navarro, F.; Gomez-Ariza, J. L., Cadmium toxicity in *Mus musculus* mice based on a metallomic study. Antagonistic interaction between Se and Cd in the bloodstream. *Metallomics* 2014, *6*, (3), 672-681.
123. Garcia-Sevillano, M. A.; Garcia-Barrera, T.; Navarro, F.; Gailer, J.; Gomez-Ariza, J. L., Use of elemental and molecular-mass spectrometry to assess the toxicological effects of inorganic mercury in the mouse *Mus musculus*. *Anal Bioanal Chem* 2014, *406*, (24), 5853-65.
124. Garcia-Sevillano, M. A.; Garcia-Barrera, T.; Gomez-Ariza, J. L., Application of metallomic and metabolomic approaches in exposure experiments on laboratory mice for environmental metal toxicity assessment. *Metallomics* 2014, *6*, (2), 237-48.
125. Garcia-Sevillano, M. A.; Contreras-Acuna, M.; Garcia-Barrera, T.; Navarro, F.; Gomez-Ariza, J. L., Metabolomic study in plasma, liver and kidney of mice exposed to inorganic arsenic based on mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2014, *406*, (5), 1455-69.
126. García-Sevillano, M. A.; Jara-Biedma, R.; González-Fernández, M.; García-Barrera, T.; Gómez-Ariza, J. L., Metal interactions in mice under environmental stress. *Biometals* 2013, *26*, (4), 651-666.
127. Garcia-Sevillano, M. A.; Garcia-Barrera, T.; Navarro, F.; Gomez-Ariza, J. L., Analysis of the biological response of mouse liver (*Mus musculus*) exposed to As2O3 based on integrated -omics approaches. *Metallomics* 2013, *5*, (12), 1644-55.
128. Garcia-Sevillano, M. A.; Garcia-Barrera, T.; Navarro, F.; Gomez-Ariza, J. L., Analysis of the biological response of mouse liver (*Mus musculus*) exposed to AsO based on integrated -omics approaches. *Metallomics* 2013.
129. Garcia-Sevillano, M. A.; Gonzalez-Fernández, M.; Jara-Biedma, R.; Garcia-Barrera, T.; Lopez-Barea, J.; Pueyo, C.; Gomez-Ariza, J. L., Biological response of free-living mouse *Mus spretus* from Donana National Park under environmental stress based on assessment of metal-binding biomolecules by SEC-ICP-MS. *Anal Bioanal Chem* 2012, *404*, (6-7), 1967-81.
130. Gonzalez-Fernández, M.; Garcia-Sevillano, M. A.; Jara-Biedma, R.; Garcia-Barrera, T.; Vioque, A.; Lopez-Barea, J.; Pueyo, C.; Gomez-Ariza, J. L., Size characterization of metal species in liver and brain from free-living (*Mus spretus*) and laboratory (*Mus Musculus*) mice by SEC-ICP-MS: Application to environmental contamination assessment. *J Anal At Spectrom* 2011, *26*, (1), 141-149.
131. Gago-Tinoco, A.; González-Domínguez, R.; García-Barrera, T.; Blasco-Moreno, J.; Bebianno, M. J.; Gómez-Ariza, J.-L., Metabolic signatures associated with environmental pollution by metals in Doñana National Park using *P. clarkii* as bioindicator. *Environ Sci Pollut Res* 2014, *21*, (23), 13315-13323.
132. Gonzalez-Fernández, M.; Garcia-Barrera, T.; Arias-Borrego, A.; Jurado, J.; Pueyo, C.; Lopez-Barea, J.; Gomez-Ariza, J. L., Metallomics integrated with proteomics in deciphering metal-related environmental issues. *Biochimie* 2009, *91*, (10), 1311-7.
133. Snape, J. R.; Maund, S. J.; Pickford, D. B.; Hutchinson, T. H., Ecotoxicogenomics: the challenge of integrating genomics into aquatic and terrestrial ecotoxicology. *Aquat Toxicol* 2004, *67*, (2), 143-54.
134. Grimalt, J. O.; Ferrer, M.; Macpherson, E., The mine tailing accident in Aznalcollar. *Sci. Total Environ* 1999, *242*, (1-3), 3-11.
135. Castroviejo, J., Mapa del Parque Nacional de Doñana. CSIC/ Agen Medio Ambiente: Sevilla, 1993.

136. Beltrán Miralles, M. Development of water balance model of Doñana marshes using remote sensing determination of their flood extent. 2013.
137. Saura, J.; Bayán, B.; Casas, J.; Ruíz de Larramendi, A.; Urdiales, C., Documento Marco para el Desarrollo del Proyecto Doñana 2005. In Ambiente, M. d. M., Ed. Madrid, 2001.
138. Oñate, J. J.; Pereira, D.; Suárez, F., Strategic Environmental Assessment of the Effects of European Union's Regional Development Plans in Doñana National Park (Spain). *Environmental Management* 2003, 31, (5), 0642-0655.
139. Zorrilla-Miras, P.; Palomo, I.; Gómez-Baggethun, E.; Martín-López, B.; Lomas, P. L.; Montes, C., Effects of land-use change on wetland ecosystem services: A case study in the Doñana marshes (SW Spain). *Landscape and Urban Planning* 2014, 122, (0), 160-174.
140. Tovar-Sanchez, A.; Huerta-Diaz, M. A.; Negro, J. J.; Bravo, M. A.; Sanudo-Wilhelmy, S. A., Metal contamination in interstitial waters of Donana Park. *J Environ Manage* 2006, 78, (3), 286-93.
141. Porras Martín, J. N. L.-G., Pedro; Alvarez-Fernández, Ceferino; Fernández Uría, Antonio;; Gimeno, M. V., Calidad y Contaminación de las Aguas Subterráneas en España. *Informe de Síntesis. IGME*. In 1985.
142. Arambarri, P.; Cabrera, F.; González-Quesada, R., Quality evaluation of the surface waters entering the Doñana National Park (SW Spain). *Sci. Total Environ* 1996, 191, (3), 185-196.
143. Alonso, E.; Santos, A.; Callejón, M.; Jiménez, J. C., Speciation as a screening tool for the determination of heavy metal surface water pollution in the Guadamar river basin. *Chemosphere* 2004, 56, (6), 561-570.
144. Manzano, M., Los humedales de Doñana y su relación con el agua subterránea. In 1ª Reunión Internacional de Expertos Sobre la Regeneración Hídrica de Doñana. Ministerio de Medio Ambiente, Pérez; Miyares, F. E., Eds. Madrid, 1999; pp 161-167.
145. Albaiges, J.; Algaba, J.; Arambarri, P.; Cabrera, F.; Baluja, G.; Hernández, L. M.; Castroviejo, J., Budget of organic and inorganic pollutants in the doñana national park (Spain). *Sci. Total Environ* 1987, 63, (0), 13-28.
146. Bonilla-Valverde, D.; Ruiz-Laguna, J.; Muñoz, A.; Ballesteros, J.; Lorenzo, F.; Gómez-Ariza, J. L.; López-Barea, J., Evolution of biological effects of Aznalcóllar mining spill in the Algerian mouse (*Mus spretus*) using biochemical biomarkers. *Toxicology* 2004, 197, (2), 122-137.
147. Grimalt, J. O.; Ferrer, M.; Macpherson, E., The mine tailing accident in Aznalcollar. *Sci Total Environ* 1999, 242, (1-3), 3-11.
148. Olías, M.; Moral, F.; Galván, L.; Cerón, J., Groundwater contamination evolution in the Guadamar and Agrio aquifers after the Aznalcóllar spill: assessment and environmental implications. *Environ Monit Assess* 2012, 184, (6), 3629-3641.
149. Sánchez-Chardi, A.; Ribeiro, C. A. O.; Nadal, J., Metals in liver and kidneys and the effects of chronic exposure to pyrite mine pollution in the shrew *Crocidura russula* inhabiting the protected wetland of Doñana. *Chemosphere* 2009, 76, (3), 387-394.
150. Frelon, S.; Mounicou, S.; Lobinski, R.; Gilbin, R.; Simon, O., Subcellular fractionation and chemical speciation of uranium to elucidate its fate in gills and hepatopancreas of crayfish *Procambarus clarkii*. *Chemosphere* 2013, 91, (4), 481-90.
151. Suarez-Serrano, A.; Alcaraz, C.; Ibanez, C.; Trobajo, R.; Barata, C., *Procambarus clarkii* as a bioindicator of heavy metal pollution sources in the lower Ebro River and Delta. *Ecotoxicol Environ Saf* 2010, 73, (3), 280-6.
152. Wei, K.; Yang, J., Oxidative damage of hepatopancreas induced by pollution depresses humoral immunity response in the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. *Fish Shellfish Immunol* 2015, 43, (2), 510-519.
153. Bini, G.; Santini, G.; Chelazzi, G., Pre-exposure to Cadmium or Zinc Alters the Heart Rate Response of the Crayfish *Procambarus clarkii* Towards Copper. *Bull Environ Contam Toxicol* 2015, 95, (1), 12-17.
154. Moody, M. W., Roberts, K.J., Huner, J.V., Phylogeny of commercially important seafood and description of the seafood industry. *Clin Rev Allergy* 1993, 11, 159-181.
155. Gutierrez-Yurrita, P. J., Montes, C., Environmental factors controlling the crayfish *Procambarus clarkii* activity in Doñana National Park temporary freshwater marsh, SW Spain. *Comp Biochem Physiol A* 1998, 120, 713-721.
156. Fleeger, J. W.; Carman, K. R.; Nisbet, R. M., Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Sci Total Environ* 2003, 317, (1-3), 207-33.
157. Habsburgo-Lorena, A. S., The status of the *Procambarus clarkii* population in Spain. *Freshwater Crayfish*. 1986, 6, 131-136.
158. Cruz, M. J.; Rebelo, R., Colonization of freshwater habitats by an introduced crayfish, *Procambarus clarkii*, in Southwest Iberian Peninsula. *Hydrobiologia* 2007, 575, 191- 201.
159. Osuna-Jimenez, I.; Abril, N.; Vioque-Fernández, A.; Gomez-Ariza, J. L.; Prieto-Alamo, M. J.; Pueyo, C., The environmental quality of Donana surrounding areas affects the immune transcriptional profile of inhabitant crayfish *Procambarus clarkii*. *Fish Shellfish Immunol* 2014, 40, (1), 136-45.
160. Vioque-Fernández, A.; Alves de Almeida, E.; Lopez-Barea, J., Assessment of Donana National Park contamination in *Procambarus clarkii*: integration of conventional biomarkers and proteomic approaches. *Sci Total Environ* 2009, 407, (5), 1784-97.

161. Sanchez Lopez, F. J.; Gil Garcia, M. D.; Martinez Vidal, J. L.; Aguilera, P. A.; Garrido Frenich, A., Assessment of metal contamination in Donana National Park (Spain) using crayfish (*Procambarus clarkii*). *Environ Monit Assess* 2004, 93, (1-3), 17-29.
162. Faria, M.; Huertas, D.; Soto, D. X.; Grimalt, J. O.; Catalan, J.; Riva, M. C.; Barata, C., Contaminant accumulation and multi-biomarker responses in field collected zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and crayfish (*Procambarus clarkii*), to evaluate toxicological effects of industrial hazardous dumps in the Ebro river (NE Spain). *Chemosphere* 2010, 78, (3), 232-240.
163. Johnson, B. L.; Willacker, J. J.; Eagles-Smith, C. A.; Pearl, C. A.; Adams, M. J., Invasive crayfish as vectors of mercury in freshwater food webs of the Pacific Northwest. *Environ Toxicol Chem* 2014, 33, (11), 2639-2645.
164. van Oosterhout, F.; Goitom, E.; Roessink, I.; Lürling, M., Lanthanum from a modified clay used in eutrophication control is bioavailable to the marbled crayfish (*Procambarus fallax f. virginalis*). *PLoS One* 2014, 9, (7), e102410.
165. Bonvillain, C. P.; Rutherford, D. A.; Kelso, W. E.; Green, C. C., Physiological biomarkers of hypoxic stress in red swamp crayfish *Procambarus clarkii* from field and laboratory experiments. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* 2012, 163, (1), 15-21.
166. Tan SH, Y. Z., Liu YF, Yang YN., Effects of Cd²⁺ on antioxidant system in hepatopancreas of *Procambarus clarkii*. *J Appl Ecol* 2012, 23, (9): 2595-601.
167. Brinkman, S.; Johnston, W., Acute Toxicity of Zinc to Several Aquatic Species Native to the Rocky Mountains. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2012, 62, (2), 272-281.
168. Wigginton, A. J.; Birge, W. J., Toxicity of cadmium to six species in two genera of crayfish and the effect of cadmium on molting success. *Environ Toxicol Chem* 2007, 26, (3), 548-54.
169. Barbee, G. C.; McClain, W. R.; Lanka, S. K.; Stout, M. J., Acute toxicity of chlorantraniliprole to non-target crayfish (*Procambarus clarkii*) associated with rice-crayfish cropping systems. *Pest Management Science* 2010, 66, (9), 996-1001.
170. Stara, A., et al., Effect of Chronic Exposure to Prometryne on Oxidative Stress and Antioxidant Response in Red Swamp Crayfish (*Procambarus clarkii*). *BioMed Research International* 2014, 2014, 6.
171. Nicosia, A.; Celi, M.; Vazzana, M., et al., Profiling the physiological and molecular response to sulfonamidic drug in *Procambarus clarkii*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2014, 166, 14-23.
172. Al Kaddissi, S.; Legeay, A.; Elia, A. C.; Gonzalez, P.; Floriani, M.; Cavalie, I.; Massabuau, J.-C.; Gilbin, R.; Simon, O., Mitochondrial gene expression, antioxidant responses, and histopathology after cadmium exposure. *Environ. Toxicol.* 2014, 29, (8), 893-907.
173. Vazquez-Cobos, J., Presente y Futuro de la Proteómica. Laboratorio de Proteómica UAM (ed) Madrid, 2003.
174. Görg, A.; Obermaier, C.; Boguth, G.; Harder, A.; Scheibe, B.; Wildgruber, R.; Weiss, W., The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 2000, 21, (6), 1037-1053.
175. Berkelman T, S. T., 2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients. Principles & Methods. Amersham Pharmacia Biotech Inc.: 1998.
176. Görg, A.; Weiss, W.; Dunn, M. J., Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *PROTEOMICS* 2004, 4, (12), 3665-3685.
177. Patton, W. F., A thousand points of light: The application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics. *Electrophoresis* 2000, 21, (6), 1123-1144.
178. Tonge, R.; Shaw, J.; Middleton, B., et al., Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics* 2001, 1, (3), 377-96.
179. Zhou, G.; Li, H.; DeCamp, D., et al., 2D Differential In-gel Electrophoresis for the Identification of Esophageal Scans Cell Cancer-specific Protein Markers. *Mol. Cell Proteomics* 2002, 1, (2), 117-123.
180. Karas, M.; Hillenkamp, F., Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* 1988, 60, (20), 2299-2301.
181. Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M., Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 1989, 246, (4926), 64-71.
182. Simpson, R., The use of mass spectrometry in proteomics. In: *Proteins and Proteomics: a Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002, pp 425-596. Cold Spring Harbor Laboratory Press: 2002.
183. Biemann, K., Laying the groundwork for proteomics – Mass spectrometry from 1958 to 1988. *Int. J. Mass Spectrom* 2007, 259, 1-7.
184. Pappin, D. J.; Hojrup, P.; Bleasby, A. J., Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr Biol.* 1993, 3, (6), 327-332.
185. Nesvizhskii, A. I.; Aebersold, R., Interpretation of shotgun proteomic data the protein inference problem. *Mol. Cell Prot.* 2005, 4, (10), 1419-1440.
186. Braconi, D.; Bernardini, G.; Santucci, A., Linking protein oxidation to environmental pollutants: Redox proteomic approaches. *J Proteomics* 2011, 74, (11), 2324-2337.
187. Butterfield, D. A.; Dalle-Donne, I., Redox proteomics. *Antioxid Redox Signal* 2012, 17, (11), 1487-9.

188. Dalle-Donne, I.; Aldini, G.; Carini, M.; Colombo, R.; Rossi, R.; Milzani, A., Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med* 2006, *10*, (2), 389-406.
189. Eaton, P., Protein thiol oxidation in health and disease: Techniques for measuring disulfides and related modifications in complex protein mixtures. *Free Radical Bio Med* 2006, *40*, (11), 1889-1899.
190. Ros, E. C. a. J., Oxidative damage to proteins: structural modifications and consequences in cell function. In *Redox Proteomics*, 2006.
191. Hwang, N. R.; Yim, S. H.; Kim, Y. M.; Jeong, J.; Song, E. J.; Lee, Y.; Lee, J. H.; Choi, S.; Lee, K. J., Oxidative modifications of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase play a key role in its multiple cellular functions. *Biochem J* 2009, *423*, (2), 253-64.
192. Lee, E.; Jeong, J.; Kim, S. E.; Song, E. J.; Kang, S. W.; Lee, K. J., Multiple functions of Nm23-H1 are regulated by oxido-reduction system. *PLoS One* 2009, *4*, (11), e7949.
193. Yamakura, F.; Kawasaki, H., Post-translational modifications of superoxide dismutase. *Biochimica et Biophysica Acta -Proteins and Proteomics* 2010, *1804*, (2), 318-325.
194. Davies, M. J., The oxidative environment and protein damage. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 2005, *1703*, (2), 93-109.
195. Butterfield, D. A.; Dalle-Donne, I., Redox proteomics: from protein modifications to cellular dysfunction and disease. *Mass Spectrom Rev* 2014, *33*, (1), 1-6.
196. Herrlich, P.; Bohmer, F. D., Redox regulation of signal transduction in mammalian cells. *Biochem Pharmacol* 2000, *59*, (1), 35-41.
197. Biswas, S.; Chida, A. S.; Rahman, I., Redox modifications of protein-thiols: emerging roles in cell signaling. *Biochem Pharmacol* 2006, *71*, (5), 551-64.
198. Go, Y. M.; Jones, D. P., The redox proteome. *J Biol Chem* 2013, *288*, (37), 26512-20.
199. Company, R.; Torreblanca, A.; Cajaraville, M.; Bebianno, M. J.; Sheehan, D., Comparison of thiol subproteome of the vent mussel *Bathymodiolus azoricus* from different Mid-Atlantic Ridge vent sites. *Sci. Total Environ* 2012, *437*, (0), 413-421.
200. Dalle-Donne, I.; Milzani, A.; Gagliano, N.; Colombo, R.; Giustarini, D.; Rossi, R., Molecular mechanisms and potential clinical significance of S-glutathionylation. *Antioxid Redox Signal* 2008, *10*, (3), 445-73.
201. Hansen, R. E.; Roth, D.; Winther, J. R., Quantifying the global cellular thiol-disulfide status. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, *106*, (2), 422-7.
202. Jung, C.-H.; Thomas, J. A., S-Glutathiolated Hepatocyte Proteins and Insulin Disulfides as Substrates for Reduction by Glutaredoxin, Thioredoxin, Protein Disulfide Isomerase, and Glutathione. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1996, *335*, (1), 61-72.
203. Dalle-Donne, I.; Rossi, R.; Colombo, G.; Giustarini, D.; Milzani, A., Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans. *Trends Biochem. Sci.* 2009, *34*, (2), 85-96.
204. Eaton, P., Protein thiol oxidation in health and disease: techniques for measuring disulfides and related modifications in complex protein mixtures. *Free Radic. Biol. Med.* 2006, *40*, (11), 1889-99.
205. Winterbourn, C. C.; Hampton, M. B., Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radic. Biol. Med* 2008, *45*, (5), 549-61.
206. Winterbourn, C. C.; Metodiewa, D., Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med* 1999, *27*, (3-4), 322-8.
207. Ma, N.; Sasoh, M.; Kawanishi, S.; Sugiura, H.; Piao, F., Protection effect of taurine on nitrosative stress in the mice brain with chronic exposure to arsenic. *J. Biomed. Sci* 2010, *17*, (Suppl 1), S7-S7.
208. Woo, H. A.; Kang, S. W.; Kim, H. K.; Yang, K. S.; Chae, H. Z.; Rhee, S. G., Reversible oxidation of the active site cysteine of peroxiredoxins to cysteine sulfinic acid. Immunoblot detection with antibodies specific for the hyperoxidized cysteine-containing sequence. *J Biol Chem* 2003, *278*, (48), 47361-4.
209. Couturier, J.; Chibani, K.; Jacquot, J.-P.; Rouhier, N., Cysteine-based redox regulation and signalling in plants. *Frontiers in Plant Science* 2013, *4*.
210. Gallogly, M. M.; Mieczal, J. J., Mechanisms of reversible protein glutathionylation in redox signaling and oxidative stress. *Curr Opin Pharmacol* 2007, *7*, (4), 381-91.
211. Lo Conte, M.; Carroll, K. S., The redox biochemistry of protein sulfenylation and sulfinylation. *J. Biol. Chem* 2013, *288*, (37), 26480-26488.
212. Dalle-Donne, I.; Rossi, R.; Colombo, R.; Giustarini, D.; Milzani, A., Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem* 2006, *52*, (4), 601-23.
213. Janssen-Heininger, Y. M. W.; Mossman, B. T.; Heintz, N. H.; Forman, H. J.; Kalyanaraman, B.; Finkel, T.; Stamler, J. S.; Rhee, S. G.; van der Vliet, A., Redox-based regulation of signal transduction: Principles, pitfalls, and promises. *Free Radical Bio Med* 2008, *45*, (1), 1-17.
214. Winterbourn, C. C.; Hampton, M. B., Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radical Bio Med* 2008, *45*, (5), 549-561.
215. Ying, J.; Clavreul, N.; Sethuraman, M.; Adachi, T.; Cohen, R. A., Thiol oxidation in signaling and response to stress: Detection and quantification of physiological and pathophysiological thiol modifications. *Free Radical Bio Med* 2007, *43*, (8), 1099-1108.
216. V. Bonetto, P. G., Thiol-disulfide oxidoreduction of protein cysteines: old methods revisited for

- proteomics Proteins. In Redox Proteomics, John Wiley & Sons, Inc.: 2006
217. Charles, R.; Jayawardhana, T.; Eaton, P., Gel-based methods in redox proteomics. *Biochim. Biophys. Acta - General Subjects* 2014, *1840*, (2), 830-837.
 218. Chiappetta, G.; Ndiaye, S.; Igarria, A.; Kumar, C.; Vinh, J.; Toledano, M. B., Chapter 10 - Proteome Screens for Cys Residues Oxidation: The Redoxome. In *Methods in Enzymology*, Enrique, C.; Lester, P., Eds. Academic Press: 2010; *473*, 199-216.
 219. Chouchani, E. T.; James, A. M.; Fearnley, I. M.; Lilley, K. S.; Murphy, M. P., Proteomic approaches to the characterization of protein thiol modification. *Curr Opin Chem Biol* 2011, *15*, (1), 120-128.
 220. Thamsen, M.; Jakob, U., The redoxome: Proteomic analysis of cellular redox networks. *Curr Opin Chem Biol* 2011, *15*, (1), 113-119.
 221. Paulsen, C. E.; Carroll, K. S., Cysteine-mediated redox signaling: Chemistry, biology, and tools for discovery. *Chem Rev* 2013, *113*, (7), 4633-4679.
 222. Paulech, J.; Solis, N.; Edwards, A. V.; Puckeridge, M.; White, M. Y.; Cordwell, S. J., Large-scale capture of peptides containing reversibly oxidized cysteines by thiol-disulfide exchange applied to the myocardial redox proteome. *Anal Chem* 2013, *85*, (7), 3774-80.
 223. Mermelekas, G.; Makridakis, M.; Koeck, T.; Vlahou, A., Redox proteomics: From residue modifications to putative biomarker identification by gel- and LC-MS-based approaches. *Expert Rev Proteomics* 2013, *10*, (6), 537-549.
 224. Fuentes-Almagro, C. A.; Prieto-Álamo, M.-J.; Pueyo, C.; Jurado, J., Identification of proteins containing redox-sensitive thiols after PRDX1, PRDX3 and GCLC silencing and/or glucose oxidase treatment in Hepa 1-6 cells. *J Proteomics* 2012, *77*, (0), 262-279.
 225. Hampton, M. B.; Baty, J. W.; Winterbourn, C. C., Use of a Proteomic Technique to Identify Oxidant-Sensitive Thiol Proteins in Cultured Cells. In *Redox Proteomics*, John Wiley & Sons, Inc.: 2006; pp 253-265.
 226. Minard, K. I.; Carroll, C. A.; Weintraub, S. T.; McAlister-Henn, L., Changes in disulfide bond content of proteins in a yeast strain lacking major sources of NADPH. *Free Radical Bio Med* 2007, *42*, (1), 106-117.
 227. Pérez, V. I.; Pierce, A.; de Waal, E. M.; Ward, W. F.; Bokov, A.; Chaudhuri, A.; Richardson, A., Chapter 8 - Detection and Quantification of Protein Disulfides in Biological Tissues: A Fluorescence-Based Proteomic Approach. In *Methods in Enzymology*, Enrique, C.; Lester, P., Eds. Academic Press: 2010; Vol. Volume 473, pp 161-177.
 228. Scaloni, A., Mass Spectrometry Approaches for the Molecular Characterization of Oxidatively/Nitrosatively Modified Proteins. In *Redox Proteomics*, John Wiley & Sons, Inc.: 2006; pp 59-99.
 229. McDonagh, B.; Sheehan, D., Effect of oxidative stress on protein thiols in the blue mussel *Mytilus edulis*: Proteomic identification of target proteins. *Proteomics* 2007, *7*, (18), 3395-3403.
 230. Braconi, D.; Bernardini, G.; Santucci, A., Linking protein oxidation to environmental pollutants: Redox proteomic approaches. *J Proteomics* 2011, *74*, (11), 2324-2337.
 231. McDonagh, B.; Sheehan, D., Effects of oxidative stress on protein thiols and disulphides in *Mytilus edulis* revealed by proteomics: Actin and protein disulphide isomerase are redox targets. *Mar. Environ. Res.* 2008, *66*, (1), 193-195.
 232. Rainville, L. C.; Coelho, A. V.; Sheehan, D., Application of a redox-proteomics toolbox to *Daphnia magna* challenged with model pro-oxidants copper and paraquat. *Environ Toxicol Chem* 2015, *34*, (1), 84-91.
 233. Hu, W.; Culloty, S.; Darmody, G., et al., Toxicity of copper oxide nanoparticles in the blue mussel, *Mytilus edulis*: A redox proteomic investigation. *Chemosphere* 2014, *108*, 289-299.
 234. Rainville, L.-C.; Carolan, D.; Varela, A. C.; Doyle, H.; Sheehan, D., Proteomic evaluation of citrate-coated silver nanoparticles toxicity in *Daphnia magna*. *Analyst* 2014, *139*, (7), 1678-1686.
 235. Pedriali, A.; Riva, C.; Parolini, M.; Cristoni, S.; Sheehan, D.; Binelli, A., A redox proteomic investigation of oxidative stress caused by benzoylcegonine in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Drug Testing and Analysis* 2013, *5*, (8), 646-656.
 236. Sellami, B.; Khazri, A.; Mezni, A.; Louati, H.; Dellali, M.; Aissa, P.; Mahmoudi, E.; Beyrem, H.; Sheehan, D., Effect of permethrin, anthracene and mixture exposure on shell components, enzymatic activities and proteins status in the Mediterranean clam *Venerupis decussata*. *Aquat. Toxicol.* 2015, *158*, 22-32.
 237. Jaafar, S. N. T.; Coelho, A. V.; Sheehan, D., Redox proteomic analysis of *Mytilus edulis* gills: effects of the pharmaceutical diclofenac on a non-target organism. *Drug Testing and Analysis* 2015, *7*, (10), 957-966.
 238. Tedesco, S.; Doyle, H.; Iacopino, D.; O'Donovan, I.; Keane, S.; Sheehan, D., Gold Nanoparticles and Oxidative Stress in the Blue Mussel, *Mytilus edulis*. In *Oxidative Stress and Nanotechnology: Methods and Protocols*, Armstrong, D.; Bharali, J. D., Eds. Humana Press: Totowa, NJ, 2013; pp 197-203.
 239. Cole, C.; Coelho, A. V.; James, R. H.; Connelly, D.; Sheehan, D., Proteomic responses to metal-induced oxidative stress in hydrothermal vent-living mussels, *Bathymodiolus sp.*, on the Southwest Indian Ridge. *Mar. Environ. Res.* 2014, *96*, 29-37.
 240. Madian, A. G.; Regnier, F. E., proteomic identification of carbonylated proteins and their oxidation sites. *J. Proteome Res.* 2010, *9*, (8), 3766-3780.

241. Climent, I.; Levine, R. L., Oxidation of the active site of glutamine synthetase: conversion of arginine-344 to gamma-glutamyl semialdehyde. *Arch Biochem Biophys* 1991, 289, (2), 371-5.
242. Cabisco, E.; Aguilar, J.; Ros, J., Metal-catalyzed oxidation of Fe²⁺ dehydrogenases. Consensus target sequence between propanediol oxidoreductase of *Escherichia coli* and alcohol dehydrogenase II of *Zymomonas mobilis*. *J. Biol. Chem* 1994, 269, (9), 6592-6597.
243. Kwon, O. J.; Lee, S. M.; Floyd, R. A.; Park, J.-W., Thiol-dependent metal-catalyzed oxidation of copper, zinc superoxide dismutase. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1998, 1387, (1-2), 249-256.
244. Requena, J. R.; Chao, C.-C.; Levine, R. L.; Stadtman, E. R., Glutamic and amino adipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001, 98, (1), 69-74.
245. Berlett, B. S.; Stadtman, E. R., Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. *J. Biol. Chem* 1997, 272, (33), 20313-20316.
246. Boguszewska-Mańkowska, D.-.; M., N.; Zagdańska, B., Protein Oxidation and Redox Regulation of Proteolysis, Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress. In *Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress*, Gowder, S. J. T., Ed. InTech: 2015.
247. Uchida, K.; Stadtman, E. R., Modification of histidine residues in proteins by reaction with 4-hydroxynonenal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992, 89, (10), 4544-4548.
248. Sayre, L. M.; Lin, D.; Yuan, Q.; Zhu, X.; Tang, X., Protein Adducts Generated from Products of Lipid Oxidation: Focus on HNE and ONE. *Drug Metab. Rev.* 2006, 38, (4), 651-675.
249. Perluigi, M.; Di Domenico, F.; Giorgi, A., et al., Redox proteomics in aging rat brain: Involvement of mitochondrial reduced glutathione status and mitochondrial protein oxidation in the aging process. *J. Neurosci. Res.* 2010, 88, (16), 3498-3507.
250. Weiss, M. F.; Erhard, P.; Kader-Attia, F. A.; Wu, Y. C.; Deoreo, P. B.; Araki, A.; Glomb, M. A.; Monnier, V. M., Mechanisms for the formation of glycoxidation products in end-stage renal disease. *Kidney Int* 2000, 57, (6), 2571-2585.
251. Levine, R. L.; Williams, J. A.; Stadtman, E. R.; Shacter, E., Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Meth. Enzymol.* 1994, 233, 346-357.
252. Keller, R. J.; Halmes, N. C.; Hinson, J. A.; Pumford, N. R., Immunochemical detection of oxidized proteins. *Chem. Res. Toxicol.* 1993, 6, (4), 430-433.
253. Kim, J.-H.; Sedlak, M.; Gao, Q.; Riley, C. P.; Regnier, F. E.; Adamec, J., Dynamics of Protein Damage in Yeast Frataxin Mutant Exposed to Oxidative Stress. *OMICS* 2010, 14, (6), 689-699.
254. Dalle-Donne, I.; Giustarini, D.; Colombo, R.; Rossi, R.; Milzani, A., Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med* 2003, 9, (4), 169-176.
255. Cabisco, E.; Tamarit, J.; Ros, J., Protein carbonylation: Proteomics, specificity and relevance to aging. *Mass Spectrom Rev* 2014, 33, (1), 21-48.
256. Parvez, S.; Raisuddin, S., Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environ Toxicol Pharmacol* 2005, 20, (1), 112-7.
257. McDonagh, B.; Tyther, R.; Sheehan, D., Carbonylation and glutathionylation of proteins in the blue mussel *Mytilus edulis* detected by proteomic analysis and Western blotting: Actin as a target for oxidative stress. *Aquat. Toxicol.* 2005, 73, (3), 315-326.
258. Lushchak, O. V.; Kubrak, O. I.; Torous, I. M.; Nazarchuk, T. Y.; Storey, K. B.; Lushchak, V. I., Trivalent chromium induces oxidative stress in goldfish brain. *Chemosphere* 2009, 75, (1), 56-62.
259. Kubrak, O. I.; Lushchak, O. V.; Lushchak, J. V.; Torous, I. M.; Storey, J. M.; Storey, K. B.; Lushchak, V. I., Chromium effects on free radical processes in goldfish tissues: Comparison of Cr(III) and Cr(VI) exposures on oxidative stress markers, glutathione status and antioxidant enzymes. *Comp Biochem Phys C* 2010, 152, (3), 360-370.
260. Chora, S.; McDonagh, B.; Sheehan, D.; Starita-Gerbaldi, M.; Roméo, M.; Bebianno, M. J., Ubiquitination and carbonylation as markers of oxidative-stress in *Ruditapes decussatus*. *Mar. Environ. Res.* 2008, 66, (1), 95-97.
261. Bagnyukova, T. V.; Luzhna, L. I.; Pogribny, I. P.; Lushchak, V. I., Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish liver in response to short-term exposure to arsenite. *Environ. Mol. Mutagen.* 2007, 48, (8), 658-665.
262. Almroth, B. C.; Sturve, J.; Stephensen, E.; Holth, T. F.; Förlin, L., Protein carbonyls and antioxidant defenses in corkwing wrasse (*Symphodus melops*) from a heavy metal polluted and a PAH polluted site. *Mar. Environ. Res.* 2008, 66, (2), 271-277.
263. Patetsini, E.; Dimitriadis, V. K.; Kaloyianni, M., Biomarkers in marine mussels, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to environmentally relevant levels of the pesticides, chlorpyrifos and penoxsulam. *Aquat. Toxicol.* 2013, 126, 338-345.
264. Dowling, V.; Hoarau, P. C.; Romeo, M.; O'Halloran, J.; van Pelt, F.; O'Brien, N.; Sheehan, D., Protein carbonylation and heat shock response in *Ruditapes decussatus* following p,p'-dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) exposure: A proteomic approach reveals that DDE causes oxidative stress. *Aquat. Toxicol.* 2006, 77, (1), 11-18.
265. Dorts, J.; Silvestre, F.; Tu, H. T.; Tyberghein, A.-E.; Phuong, N. T.; Kestemont, P., Oxidative stress, protein carbonylation and heat shock proteins in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, following

- exposure to endosulfan and deltamethrin. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2009, 28, (2), 302-310.
266. Taze, C.; Panetas, I.; Kalogiannis, S., et al., Toxicity assessment and comparison between two types of iron oxide nanoparticles in *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* 2016, 172, 9-20.
267. Tedesco, S.; Doyle, H.; Blasco, J.; Redmond, G.; Sheehan, D., Exposure of the blue mussel, *Mytilus edulis*, to gold nanoparticles and the pro-oxidant menadione. *Comp Biochem Phys C* 2010, 151, (2), 167-174.
268. Parolini, M.; Magni, S.; Binelli, A., Environmental concentrations of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA)-induced cellular stress and modulated antioxidant enzyme activity in the zebra mussel. *Environ Sci Pollut Res* 2014, 21, (18), 11099-11106.
269. Williams, R. J. P., Chemical selection of elements by cells. *Coordination Chemistry Reviews* 2001, 216-217, 583-595.
270. Frausto da Silva J. J. R.; P., W. R. J., The Biological Chemistry of The Elements: The Inorganic Chemistry of Life. Oxford University Press.: 2001.
271. Szpunar, J., Metallomics: a new frontier in analytical chemistry. *Anal Bioanal Chem* 2004, 378, (1), 54-6.
272. Mounicou, S.; Szpunar, J.; Lobinski, R., Metallomics: the concept and methodology. *Chem Soc Rev* 2009, 38, (4), 1119-38.
273. Szpunar, J., Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics. *Analyst* 2005, 130, (4), 442-65.
274. Mounicou, S.; Lobinski, R., Challenges to metallomics and analytical chemistry solutions. *Pure App. Chem.* 2008, 80, (12), 2565-2575.
275. Haraguchi, H., Metallomics as integrated biometal science. *J Anal At Spectrom* 2004, 19, (1), 5-14.
276. Mounicou, S.; Szpunar, J.; Lobinski, R., Inductively-coupled plasma mass spectrometry in proteomics, metabolomics and metallomics studies. *Eur J Mass Spectrom* 2010, 16, (3), 243-53.
277. Bowen, B.; Northen, T., Dealing with the unknown: Metallomics and Metabolite Atlases. *J. Am. Soc. Mass Spectrom* 2010, 21, (9), 1471-1476.
278. Fiehn, O., Metabolomics — the link between genotypes and phenotypes. In *Functional Genomics*, Town, C., Ed. Springer Netherlands: 2002; pp 155-171.
279. Wei, L.; Liao, P.; Wu, H.; Li, X.; Pei, F.; Li, W.; Wu, Y., Metabolic profiling studies on the toxicological effects of realgar in rats by 1H NMR spectroscopy. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2009, 234, (3), 314-325.
280. Bundy, J.; Davey, M.; Viant, M., Environmental metabolomics: a critical review and future perspectives. *Metabolomics* 2009, 5, (1), 3-21.
281. Lin, C. Y.; Viant, M. R.; Tjeerdema, R. S., Metabolomics: Methodologies and applications in the environmental sciences. *J Pestic Sci* 2006, 31, (3), 245-251.
282. Griffiths, W. J.; Koal, T.; Wang, Y.; Kohl, M.; Enot, D. P.; Deigner, H.-P., Targeted Metabolomics for Biomarker Discovery. *Angewandte Chemie International Edition* 2010, 49, (32), 5426-5445.
283. Han, J.; Gagnon, S.; Eckle, T.; Borchers, C. H., Metabolomic Analysis of Key Central Carbon Metabolism Carboxylic Acids as Their 3-Nitrophenylhydrazones by UPLC/ESI-MS. *Electrophoresis* 2013, 34, (19), 2891-2900.
284. Yuan, M.; Breitkopf, S. B.; Yang, X.; Asara, J. M., A positive/negative ion-switching, targeted mass spectrometry-based metabolomics platform for bodily fluids, cells, and fresh and fixed tissue. *Nature protocols* 2012, 7, (5), 872-881.
285. Galuska, C. E.; Hartmann, M. F.; Sanchez-Guijo, A.; Bakhaus, K.; Geyer, J.; Schuler, G.; Zimmer, K. P.; Wudy, S. A., Profiling intact steroid sulfates and unconjugated steroids in biological fluids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). *Analyst* 2013, 138, (13), 3792-801.
286. Bruins, M. J.; Dane, A. D.; Strassburg, K.; Vreeken, R. J.; Newman, J. W.; Salem, N., Jr.; Tyburczy, C.; Brenna, J. T., Plasma oxylipin profiling identifies polyunsaturated vicinal diols as responsive to arachidonic acid and docosahexaenoic acid intake in growing piglets. *J Lipid Res* 2013, 54, (6), 1598-607.
287. Patti, G. J.; Yanes, O.; Siuzdak, G., Metabolomics: the apogee of the omic trilogy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012, 13, (4), 263-269.
288. Dunn, W. B., Current trends and future requirements for the mass spectrometric investigation of microbial, mammalian and plant metabolomes. *Phys Biol* 2008, 5, (1), 011001.
289. Griffin, J. L.; Nicholls, A. W., Metabolomics as a functional genomic tool for understanding lipid dysfunction in diabetes, obesity and related disorders. *Pharmacogenomics* 2006, 7, (7), 1095-1107.
290. Lin, H.-M.; Helsby, N. A.; Rowan, D. D.; Ferguson, L. R., Using metabolomic analysis to understand inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* 2011, 17, (4), 1021-1029.
291. Sun, J.; Lynn, B. C., Development of a MALDI-TOF-MS method to identify and quantify butyrylcholinesterase inhibition resulting from exposure to organophosphate and carbamate pesticides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2007, 18, (4), 698-706.
292. Garcia-Sevillano, M. A.; Garcia-Barrera, T.; Navarro, F.; Gomez-Ariza, J. L., Inorganic mass spectrometry-based metallomics for environmental monitoring of terrestrial ecosystems affected by metal pollution using *Mus spretus* as bioindicator. *J. Int. OMICS* 2013, 3, (2), 88-98.

293. Favretto, D.; Cosmi, E.; Ragazzi, E., et al., Cord blood metabolomic profiling in intrauterine growth restriction. *Anal Bioanal Chem* 2012, *402*, (3), 1109-21.
294. Mehrotra, B.; Mendes, P., Bioinformatics Approaches to Integrate Metabolomics and Other Systems Biology Data. In *Plant Metabolomics*, Saito, K.; Dixon, R.; Willmitzer, L., Eds. Springer Berlin Heidelberg: 2006; Vol. 57, pp 105-115.
295. Wu, H.; Wang, W. X., Tissue-specific toxicological effects of cadmium in green mussels (*Perna viridis*): nuclear magnetic resonance-based metabolomics study. *Environ Toxicol Chem* 2011, *30*, (4), 806-12.
296. Kwon, Y. K.; Jung, Y. S.; Park, J. C.; Seo, J.; Choi, M. S.; Hwang, G. S., Characterizing the effect of heavy metal contamination on marine mussels using metabolomics. *Mar Pollut Bull* 2012, *64*, (9), 1874-9.
297. Kokushi, E.; Uno, S.; Harada, T.; Koyama, J., (1) H NMR-based metabolomics approach to assess toxicity of bunker a heavy oil to freshwater carp, *Cyprinus carpio*. *Environ Toxicol* 2012, *27*, (7), 404-14.
298. Viant, M. R.; Pincetich, C. A.; Tjeerdema, R. S., Metabolic effects of dinoseb, diazinon and esfenvalerate in eyed eggs and alevins of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) determined by 1H NMR metabolomics. *Aquat Toxicol* 2006, *77*, (4), 359-71.
299. Watanabe, M.; Meyer, K. A.; Jackson, T. M.; Schock, T. B.; Johnson, W. E.; Bearden, D. W., Application of NMR-based metabolomics for environmental assessment in the Great Lakes using zebra mussel. *Metabolomics* 2015, *11*, (5), 1302-1315.
300. Ji, C.; Cao, L.; Li, F., Toxicological evaluation of two pedigrees of clam *Ruditapes philippinarum* as bioindicators of heavy metal contaminants using metabolomics. *Environ Toxicol Pharmacol* 2015, *39*, (2), 545-54.
301. Ji, C.; Wang, Q.; Wu, H.; Tan, Q.; Wang, W. X., A metabolomic investigation of the effects of metal pollution in oysters *Crassostrea hongkongensis*. *Mar Pollut Bull* 2015, *90*, (1-2), 317-22.
302. Gago-Tinoco, A.; Gonzalez-Dominguez, R.; Garcia-Barrera, T.; Blasco-Moreno, J.; Bebianno, M. J.; Gomez-Ariza, J. L., Metabolic signatures associated with environmental pollution by metals in Donana National Park using *P. clarkii* as bioindicator. *Environ Sci Pollut Res Int* 2014, *21*, (23), 13315-23.
303. Zhang, Y.; Deng, Y.; Zhao, Y.; Ren, H., Using combined bio-omics methods to evaluate the complicated toxic effects of mixed chemical wastewater and its treated effluent. *J Hazard Mater* 2014, *272*, 52-8.
304. Skelton, D. M.; Ekman, D. R.; Martinovic-Weigelt, D.; Ankley, G. T.; Villeneuve, D. L.; Teng, Q.; Collette, T. W., Metabolomics for in situ environmental monitoring of surface waters impacted by contaminants from both point and nonpoint sources. *Environ Sci Technol* 2014, *48*, (4), 2395-403.
305. Cappello, T.; Mauceri, A.; Corsaro, C.; Maisano, M.; Parrino, V.; Lo Paro, G.; Messina, G.; Fasulo, S., Impact of environmental pollution on caged mussels *Mytilus galloprovincialis* using NMR-based metabolomics. *Mar Pollut Bull* 2013, *77*, (1-2), 132-9.
306. Fasulo, S.; Iacono, F.; Cappello, T., et al., Metabolomic investigation of *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck 1819) caged in aquatic environments. *Ecotoxicol Environ Saf* 2012, *84*, 139-46.
307. Liu, X.; Zhang, L.; You, L.; Cong, M.; Zhao, J.; Wu, H.; Li, C.; Liu, D.; Yu, J., Toxicological responses to acute mercury exposure for three species of Manila clam *Ruditapes philippinarum* by NMR-based metabolomics. *Environ Toxicol Pharmacol* 2011, *31*, (2), 323-32.



***ANTECEDENTES,
JUSTIFICACIÓN Y
OBJETIVOS***

Antecedentes y justificación

La contaminación es uno de los problemas más importantes del siglo XXI, con importantes repercusiones sobre el bienestar de la población, la sostenibilidad de los recursos naturales y la conservación del medio natural. Los grupos de investigación donde se ha desarrollado el trabajo que se presenta como Tesis poseen una amplia trayectoria de trabajo conjunto adquirida a lo largo de 4 proyectos nacionales y 3 de ámbito autonómico ejecutados desde 2002, centrados en la problemática del Parque Nacional de Doñana y su entorno, que se ha convertido en un fabuloso laboratorio natural para el desarrollo y aplicación de nuevas metodologías analíticas que permitan una aproximación mucho más global y precisa para la evaluación de los problemas de contaminación medioambiental. En estos proyectos se abordó primero las metodologías para determinar la presencia de metales y plaguicidas y sus efectos en biomarcadores convencionales. En los proyectos subsiguientes, ante la baja correlación encontrada entre contaminantes y biomarcadores, se procedió a desarrollar herramientas metodológicas más robustas que permitan la correcta monitorización de los sistemas ambientales para establecer su calidad, y, en su caso, la aplicación de medidas correctoras. Las herramientas actuales más eficientes son las de análisis masivo no dirigido, denominadas ómicas, que permiten cuantificar alteraciones de los ciclos homeostáticos a nivel transcripcional -transcriptómica, a nivel de proteínas -proteómica, y de metabolitos -metabolómica. Recientemente se ha propuesto la integración de ómicas para tener una visión global (holística), mucho más realista de los procesos que se producen en el medio ambiente.

Este trabajo se centra en el uso de procedimientos proteómicos, metabolómicos y metalómicos, ya desarrollados en nuestros grupos de investigación en otros organismos (ratones), introduciendo mejoras metodológicas para su aplicación al decápodo *P. clarkii*, que se utilizará como organismo bioindicador de la calidad ambiental de ecosistemas acuáticos. El presente estudio se centra en Doñana y su Entorno que, a pesar de su importancia ecológica, sufre la acción potencial de la actividad agrícola, industrial y minera de zonas cercanas. Los animales se han muestreado en varios puntos relacionados con la presencia de productos agroquímicos (arroyos del Partido y la Rocina) o metales y

plaguicidas (arrozal del “Matochal”). Como control se ha empleado el Lucio del Palacio, en el corazón de Doñana.

Hipótesis de partida

Las premisas en que se apoya esta Tesis son las siguientes:

- i. Los contaminantes y sus productos o especies químicas de degradación provocan respuestas biológicas sobre los organismos de los ecosistemas afectados.
- ii. La acción final de los contaminantes sobre los seres vivos está vinculada a la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los mismos.
- iii. Las respuestas a la contaminación se manifiestan de una manera global que sólo puede abarcarse utilizando de forma integrada metodologías ómicas.
- iv. Los contaminantes provocan notables cambios en la homeostasis de los elementos esenciales, sobre todo a nivel de expresión de metalobiomoléculas (metalómica) y metabolitos pequeños (metalometabolómica).
- v. La aplicación e integración multidisciplinar de todas estas herramientas analíticas innovadoras van a permitir:
 - a. Disponer de nuevas plataformas instrumentales para el estudio del medio ambiente, formas de interpretación más precisas de los episodios medioambientales y, en definitiva, aproximaciones más potentes que aseguren la calidad y salud medioambiental.
 - b. Identificar de forma más fiable biomarcadores para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de problemas que afectan a la salud de los ecosistemas.

Objetivos

Los Objetivos planteados en esta Tesis, y a los que se trata de dar respuesta en los distintos Capítulos que integran esta Memoria son:

1. Investigar la bioacumulación de metales en tejidos de cangrejos *P. clarkii* y determinar su capacidad para reflejar la contaminación de metales pesados y metaloides presentes en su medio, mediante la cuantificación por ICP-MS de estos elementos tanto a nivel tisular (glándula digestiva y branquias) como en sedimentos de la zona. ***Este Objetivo se aborda en el Capítulo 1.***
2. Evaluar el daño oxidativo a biomoléculas provocado por contaminación mediante la cuantificación de niveles de peroxidación lipídica y de carbonilación de proteínas en diferentes órganos de *P. clarkii*. ***Este Objetivo se aborda en los Capítulos 2 y 3.***
3. Cuantificar el grado de oxidación reversible de tioles en proteínas de cangrejos *P. clarkii* capturados en zonas contaminadas por proteómica redox. ***Este Objetivo se aborda en el Capítulo 4***, publicado en Science of The Total Environment [Sci. Total Environ. 2014, 490, (0), 121-133], con un IP de 4.099 y situada en el primer decil (18/223) de su categoría (Environmental Sciences)
4. Estudiar de la respuesta biológica a nivel proteómico, en branquias y glándula digestiva, de cangrejos *P. clarkii* capturados en zonas con altos niveles de contaminación. Para ello, se usará proteómica 2D-DIGE que permitirá detectar proteínas con variaciones de abundancia estadísticamente significativas, que se identificarán por MS para establecer las rutas metabólicas afectadas por la contaminación. Estas proteínas pueden ser nuevos biomarcadores de contaminación. ***Este Objetivo se aborda en el Capítulo 5.***
5. Identificar y caracterizar los cambios a nivel metabólico causados por contaminación en *P. clarkii*, mediante el análisis de los metabolomas de glándula digestiva y branquias de cangrejos capturados en zonas con diferentes niveles de contaminación. ***Este Objetivo se aborda en el Capítulo 6.***
6. Como **objetivo global** se pretende obtener una visión integral de las respuestas biológicas causadas por la contaminación y desarrollar pautas y protocolos útiles para la gestión ambiental y vigilancia de los sistemas acuáticos.

Objectives

The objectives of this Thesis, addressed in its different Chapters, are:

1. To study the bioaccumulation of metals in digestive gland and gills of *P. clarkii* crayfish and to determine the suitability of this decapod to reflect the pollution by heavy metals and metalloids in their environment, by using ICP-MS for quantification of elements at tissues (digestive gland and gills) and sediments. ***This objective is addressed in Chapter 1***
2. To assess the level of oxidative damage caused to biomolecules by environmental pollution by quantifying lipid peroxidation and protein carbonylation in *P. clarkii*. ***This objective is addressed in Chapters 2 and 3.***
3. To evaluate the utility of redox proteomics as a novel biomarker by quantifying the changes in the level of reversible thiol oxidation in proteins caused by environmental pollution in *P. clarkii* digestive gland. ***This objective is addressed in Chapter 4***, and its results has been published in Science of the Total Environment (2014) 49:121-133, with an IP of 4,099 and positioned on the first decile (18/223) of its category (Environmental Sciences).
4. To analyze the biological response, at the protein level, to environmental pollution in *P. clarkii* gills and digestive glands. By using 2D-DIGE proteomics and MS, proteins with statistically significant variations in abundance will be detected and identified to establish the metabolic pathways affected by pollution. This study may provide novel biomarkers for evaluation of environmental pollution. ***This objective is addressed in Chapter 5.***
5. To identify and characterize the metabolic changes caused by pollution in *P. clarkii* tissues by analyzing the metabolome of digestive gland and gills of specimens caught in areas with different levels of pollution. ***This objective is addressed in Chapter 6.***
6. A final and global objective of this Thesis is to get a comprehensive understanding of the biological responses elicited by pollution and to develop useful guidelines and protocols for the environmental management and surveillance of the aquatic systems.



***ZONAS Y MÉTODOS
DE MUESTREO***

Zonas de muestreo

Teniendo en cuenta las distintas actividades antropogénicas que amenazan al PND y las vías por las que los contaminantes derivados de ellas pueden acceder al mismo, se capturaron ejemplares de *P. clarkii* en puntos clave de las vías de acceso de agua al Parque, esto es, en los arroyos del Partido y la Rocina, que suministran agua por el oeste, y en los arrozales de El Matochal, que cogen agua del arroyo Brazo de la Torre, en el este del Parque. Como referencia se capturaron animales en una laguna del interior del Parque, lo más alejadas posible de los focos de contaminación. Los sitios exactos de captura se muestran en la Fig. I y se describen brevemente a continuación.

- **Lucio del Palacio (LP)**, situado en interior de la Reserva Biológica de Doñana, la zona más protegida del Parque y desde hace más tiempo. Esta localización fue tomada como zona control y los cangrejos capturados en ella como organismos de referencia, al tratarse de un punto libre de contaminantes, según estudios de nuestro grupo a lo largo de varios años.

-**Partido (PAR)**, situado en el curso bajo del arroyo del Partido, al Sur de la población de Almonte y que constituye otra de las fuentes de entrada de agua al Parque. Este lugar está influenciado por la contaminación derivada del uso abundante de agroquímicos en la agricultura intensiva que se ha desarrollado en los últimos años en la zona y por otra parte debido a la contaminación antropogénica dada su cercanía al núcleo de población y la deficiente depuración de las aguas residuales (tal y como se pudo comprobar *in situ* en el momento del muestreo).

-**Matochal (MAT)**, situado al Sur de los arrozales de Villafranco, y al Este del PND. En dichos arrozales es donde se da la mayor producción de arroz de España y por tanto es una zona potencialmente afectada por contaminantes de uso agrícola, como herbicidas, plaguicidas y alguicidas. Asimismo, el punto de muestreo elegido se encuentra muy cercano a la zona de Entremuros directamente afectada por los lodos tóxicos del vertido de Aznalcóllar.

-**Rocina (ROC)**, situado en el curso medio del arroyo La Rocina, uno de los principales aportes de agua al PND y bajo la fuerte influencia de la contaminación generada por el cultivo de fresa y cítricos que se da en su entorno.

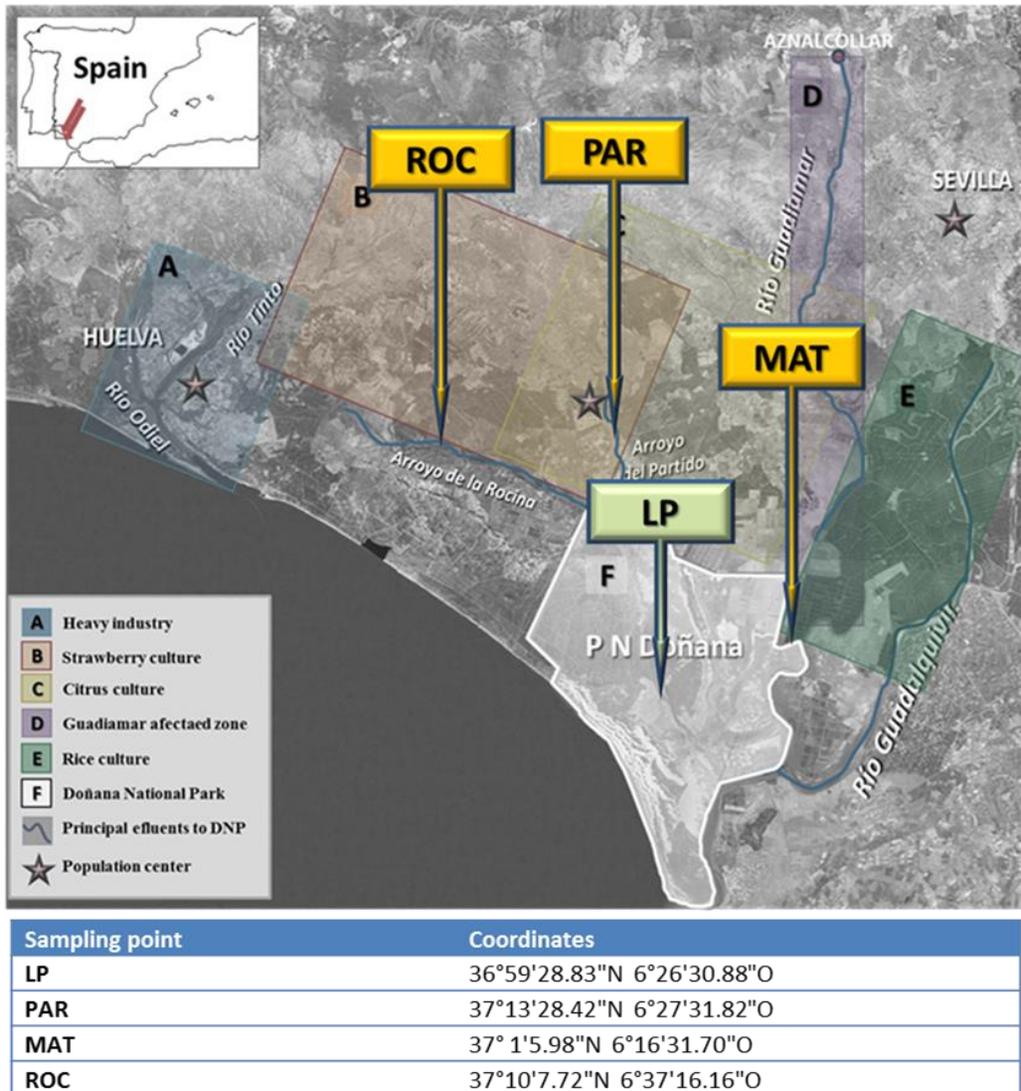


Figure I. Principal sources of pollution that threaten Doñana and sampling points where the specimens of *P. clarkii* were collected.

Captura de animales

Los cangrejos se capturaron en la primavera (mayo-junio) de 2009. La captura se hizo durante la noche, usando nasas tubulares cebadas con carne de pollo. Las nasas se recogieron cada mañana para evitar estrés a los cangrejos capturados y que algún anfibio entrase accidentalmente en el dispositivo (Fig. II).



Figure II. Placement of creels to capture crayfish and mode of transport

Por cada zona se capturaron entre 14 y 20 cangrejos, reteniéndose solo individuos machos con una longitud de entre 8 y 11 cm (tamaño de un adulto). Cada día, tras su captura, los cangrejos se llevaron al laboratorio de El Bolín, en la Estación Biológica de Doñana, donde fueron pesados y diseccionados (Fig. III a y b) y a cada uno se le asignó un código indicando la zona de procedencia y la fecha de muestreo.

Extracción y procesado de órganos

Tras el sacrificio, de cada animal se extrajo la glándula digestiva (hepatopáncreas) y las branquias. Los órganos se pesaron individualmente (Fig. III c) y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido, tras lo cual se almacenaron a -80°C en el laboratorio de la Reserva Biológica de Doñana, hasta su traslado al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba. Una vez aquí, los órganos se trituraron individualmente con un criohomogeneizador (Freezer/Mill 6770) y se dividieron en alícuotas y almacenaron a -80°C hasta su procesado para los distintos análisis.

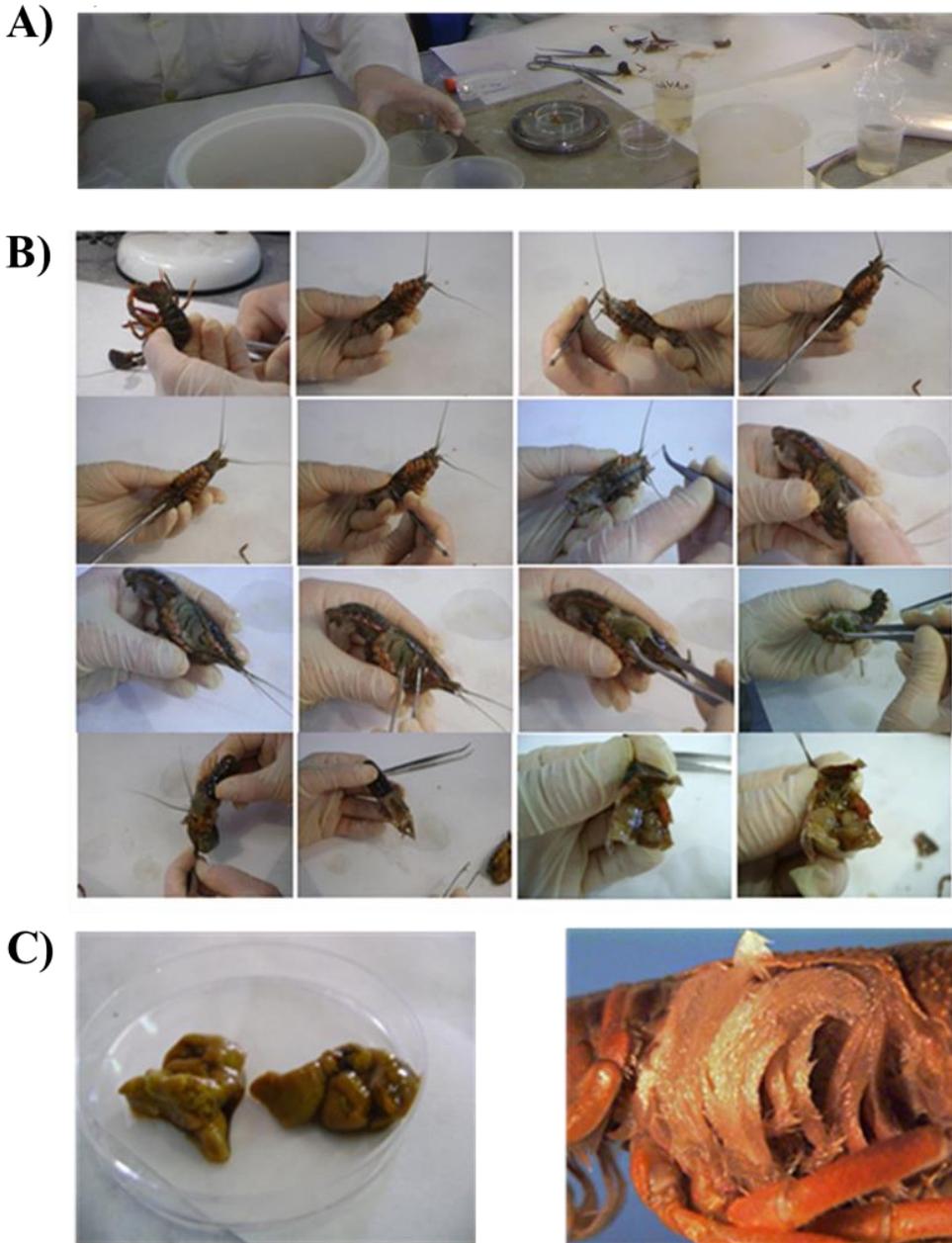


Figure III. Images of dissection and handling of the samples in the laboratory of the Biological Station of Doñana. A) Dissection process, weighting and N₂ freezing of samples in the laboratory El Bolin. B) Scheme of the process of dissection and removal of organs. C) Details of the antennal gland and gills of *P. clarkii*.

CAPÍTULO 1

*PRESENCIA
DE METALES EN
GLANDULA DIGESTIVA Y
BRANQUIAS DE CANGREJOS
P. CLARKII CAPTURADOS
EN ZONAS CONTAMINADAS*

1.1. Resumen

El uso de pesticidas y fertilizantes constituye una fuente de metales y metaloides para suelos y aguas, que acaban contaminados con elevadas cantidades de As, Cd, Co, Cu, Ni, Pb, Zn, Fe, Mn y otros metales pesados. Metales y metaloides persisten en el ambiente por años y tienen una elevada toxicidad, por lo que se consideran peligrosos para organismos y ecosistemas. Hemos evaluamos mediante ICP_MS, el nivel de contaminación por metales de sedimentos y tejidos de cangrejos *Procambarus clarkii* capturados en las zonas problema PAR y MAT, tomando como referencia muestras recogidas en LP. De esta manera se pudo evaluar tanto la bioaccesibilidad como la biodisponibilidad de los 16 elementos analizados (Be, Al, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Ag, Cd, Tl y Pb). La determinación de elementos en glándula digestiva, branquias y sedimentos se llevó a cabo por ICP-MS, utilizando, en el caso de los sedimentos, la fracción < 630 μm , única que puede ser ingerida casualmente por *P. clarkii* al estar asociada a la fracción orgánica del sedimento. El estudio se hizo agrupando cantidades iguales de tejido de catorce ejemplares de *P. clarkii* capturados en cada zonas en 4 lotes, que se consideraron como réplicas biológico/técnicas. De esta manera se redujo la carga de trabajo y el coste económico, al tiempo que se tenía en cuenta la posible variabilidad interindividual^{1, 2}. Los resultados obtenidos indican que la zona LP y los cangrejos capturados en ella son buenas referencias en estudios de contaminación ambiental y que las zonas PAR y, especialmente, MAT son sitios altamente contaminados por metales y metaloides tanto esenciales como no esenciales. Es destacable que los animales de MAT acumularon principalmente elementos esenciales (Mn, Fe, Zn, Cu), a diferencia de los de PAR, que lo hicieron principalmente con elementos tóxicos (Cr, As). Fue también notoria la alta bioacumulación de Cd y As en animales capturados en MAT, ambos elementos procedentes probablemente del vertido de lodos causado por la rotura de la balsa de contención de la mina de Aznalcóllar en 1998. La buena correlación directa encontrada entre concentración de metales en sedimentos y en órganos de *P. clarkii* sustenta la idea de que este decápodo es un buen bioindicador de contaminación por metales. Es muy probable que el exceso de estos contaminantes y sus interacciones y sinergias entre sí y con otros contaminantes presentes en el medio alteren la homeostasis de *P. clarkii* y le provoquen estrés celular, enfermedad e incluso la muerte, causando alteraciones a nivel molecular que se estudiarán en posteriores secciones de esta Tesis.

1.2. Determinación de metales por ICP-MS en glándula digestiva y branquias como medida del grado de contaminación de *P. clarkii* y las zonas de captura

Como se comentó en la Introducción General, el Parque Nacional de Doñana (PND) se ve continuamente expuesto a una gran presión ecológica a consecuencia de las actividades antropogénicas llevadas a cabo en sus alrededores³⁻⁸. Estas zonas limítrofes con el Parque albergan una densa población humana cuyas actividades principales están relacionadas con el turismo y la agricultura. De ellas parten arroyos (Partido, La Rocina, Guadamar) y aguas subterráneas que alimentan las marismas de Doñana y pueden arrastrar multitud de contaminantes. La agricultura convencional utilizada mayoritariamente en la zona se basa en el uso de una gran cantidad de herbicidas, insecticidas, pesticidas y fertilizantes para el cultivo del arroz, los cítricos y las fresas en invernadero. Hace más de 3.000 años que se viene utilizando en la zona algún tipo de pesticida para proteger las cosechas. Desde los primeros, basados en el uso de polvo de azufre, pesticidas alcaloides, organoclorados, fosfoclorados, carbamatos, piretrinas, triazinas, han ido siendo usados y prohibidos a lo largo de los siglos. Estos pesticidas contienen elementos como As, el Cd, el Hg o el Pb, en los que muchas veces se basa su acción. También los fertilizantes, orgánicos e inorgánicos (urea, superfosfato cálcico, sulfato de hierro, sulfato de cobre), constituyen una fuente adicional de metales y metaloides (Cd, Co, Cu, Ni, Pb, Zn, Fe y/o Mn) en los suelos y las aguas⁹. Estos usos agrícolas, unidos a otras actividades industriales y mineras, causan la liberación, muchas veces inadvertida, de metales al medio ambiente. Incluso siendo manipulados cuidadosamente, la posibilidad de una exposición accidental es grande, especialmente para los organismos que viven próximos a las zonas tratadas. El problema se agrava al ser elementos muy persistentes en el medio, lo que facilita su entrada en la cadena trófica. Son, además, altamente muy reactivos y frecuentemente tóxicos por lo que constituyen un riesgo para la vida¹⁰.

El término metal pesado viene siendo usado por ecotoxicólogos y científicos medioambientales para referirse a metales que causan contaminación ambiental¹¹. Se

pueden definir como elementos metálicos que tienen alta densidad relativa en comparación al agua ¹². Asumiendo que pesadez y toxicidad están íntimamente conectados, se incluyen en este grupo también metaloides como el As, muy tóxico incluso a niveles bajos. Algunos metales pesados son micronutrientes esenciales, como Cu, Fe, Mn, Ni o Zn. Estos elementos son generalmente requeridos en cantidades muy pequeñas, que los organismos suelen poder regular, de modo que sólo cuando se presentan en exceso resultan tóxicos. En contraste, los elementos no esenciales como Al, As, Cd, Pb y Hg, esto es, que no participan en funciones biológicas normales, rápidamente desencadenan efectos tóxicos ^(10y referencias que cita). Ambos tipos, esenciales y no esenciales, se pueden acumular en el organismo con el riesgo de ser transferidos a niveles tróficos superiores, hasta alcanzar a los humanos. Además, tras entrar en el organismo, los metales pesados pueden interactuar directamente con diversas biomoléculas, alterando procesos biológicos críticos y causando enfermedad (anemia, disfunción renal, daño cerebral, destrucción del tejido testicular, cáncer y parálisis, por citar algunos ^(10y referencias que cita)).

Siguiendo la lógica de trabajos previos ¹³⁻¹⁶, evaluamos el nivel de contaminación de los tres grupos de animales tomando como indicador de concentración la concentración de varios metales y metaloides en glándula digestiva y branquias. Se suele el contenido total de metales en suelo o agua para evaluar el riesgo. Sin embargo, es muy importante considerar la bioaccesibilidad (posibilidad de entrar en contacto con el compuesto) y la biodisponibilidad (absorción por el organismo de la sustancia bioaccesible) y por ello, han de hacerse las medidas también en los tejidos de los organismos. Sedimentos y cangrejos *P. clarkii* se recolectaron en dos zonas contaminadas localizadas en los alrededores del PND (pág. 90). Una de ellas fue la zona media del arroyo El Partido (PAR), relativamente alejada de zonas de cultivo pero que recoge parte de las aguas de la ciudad de Almonte. La otra zona de captura fue la de los arrozales de Matochal (MAT). Los cangrejos de referencia se capturaron en la Laguna del Palacio (LP), en el corazón de la Reserva Biológica de Doñana y, por tanto, una zona limpia ¹⁷. Utilizando la metodología ICP-MS, se determinaron a la vez las concentraciones de 16 (Be, Al, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Ag, Cd, Tl, Pb) en cada una de las muestras (sedimentos y animales).

1.3. Materiales y métodos

1.3.1. Muestras utilizadas.

Se analizaron glándula digestiva y branquias de cangrejos *P. clarkii* y sedimentos sus hábitats de estos animales. Se prepararon cuatro lotes por sitio de muestreo (LP, la zona de referencia y las zonas contaminadas PAR y MAT) mezclando en cada lote iguales cantidades de tejido homogenizado de 3-4 cangrejos. Las cuatro mezclas por zona se consideraron réplicas biológicas en las diferentes determinaciones.

1.3.2. Preparación de muestras para la determinación de metales.

Cada una de las muestras se sometió a digestión ácida por microondas, poniendo 200 mg de tejido en recipientes de 5 mL y añadiendo 600 μ L de ácido nítrico y peróxido de hidrogeno (4:1 v/v). Tras 10 min, los viales se cerraron e introdujeron en un Sistema de Reacción Acelerada de Microondas (MARS, CEM). La mineralización se realizó a 400 W; la temperatura se aumentó desde 25°C a 160°C en 15 min y se mantuvo luego a 160°C durante 20 min. Tras ello, los volúmenes se ajustaron hasta 4 mL con agua ultrapura.

Las muestras de sedimentos se secaron al aire y se pasaron por un tamiz de luz de malla de 2 mm. A continuación, se trituraron en mortero de ágata y se tamizaron de nuevo usando un tamiz de luz de malla de 0,63 μ m. Una vez bien secas, 250 mg de cada muestra se colocó en un reactor de teflón Express, se añadieron 5 mL de ácido nítrico, 2 mL de ácido fluorhídrico y 1 mL de ácido clorhídrico y se introdujeron en el horno microondas. La mineralización realizó usando una potencia de 800 W y una rampa de temperatura desde temperatura ambiente hasta 180°C durante 10 min. y se mantuvo a esta temperatura durante 50 min. Después de la digestión, se añadieron 6 mL de ácido bórico para neutralizar el exceso de ácido fluorhídrico. Posteriormente, las muestras mineralizadas se enrasaron hasta 25 g mediante adición de agua ultrapura, y se filtraron con filtros hidrófilos PVDF de 0,45 μ m de luz de malla antes de su análisis mediante ICP-MS.

1.3.3. Concentración de metales en órganos de *P. clarkii* y en sedimentos

La concentración de metales (Be, Al, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Ag, Cd, Tl, Pb) se determinó usando un espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) Agilent 7500ce (Agilent Technologies), equipado con un octopolo como celda de colisión/reacción y con un micronebulizador Micromist (GlasExpansion). Se usó He (pureza >99,999 %) como gas de colisión y se sintonizó con la solución que contenía Li, Co, Y Tl a 1 µg/L para optimizar las condiciones experimentales. 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 con una disolución de 1 µg/L de Li, Y, Ce y Tl, al 2% en HNO₃. Posteriormente se comprobó la exactitud de las masas, la resolución espectral y los porcentajes de óxidos e iones doblemente cargados, así como la sensibilidad y reproducibilidad, y se optimizaron los flujos de gas de colisión/reacción en función de la complejidad de

la Tabla 1.1.

<i>Experimental conditions ICP-MS Agilent 7500ce</i>	
Power	1500 W
Plasma gas flow	15.0 L min ⁻¹
Auxiliary gas flow	1.0 L min ⁻¹
Carrier gas flow	0.9 L min ⁻¹
Sampling depth	8 mm
Conos	Ni
He flow	3.9 mL min ⁻¹
	3.5 mL min ⁻¹
H ₂ flow	
Q _{oct}	18 V
Q _p	16 V
Integración time	0.3 seg per isotope
Monitorized isotopes	Using He as collision gas: ⁵³ Cr, ⁵⁵ Mn, ⁶³ Cu, ⁶⁵ Cu, ⁶⁴ Zn, ⁶⁶ Zn, ⁷⁵ As, ⁵⁷ Fe, ¹⁰³ Rh, ¹¹⁴ Cd.
	Using H ₂ as reaction gas: ⁵⁶ Fe, ⁸⁰ Se.

Table 1.1 Optimized operational conditions for the ICP-MS Agilent 7500ce analysis.

La cuantificación se realizó en todos los casos por calibración interna, empleando como estándar interno rodio (Rh) a 1 µg/L en todas las muestras, patrones de calibración y controles de calidad empleados. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

1.4. Resultados y discusión

1.4.1. Concentración de elementos en tejidos de *P. clarkii*

Los resultados del análisis del contenido de 16 metales (Be, Al, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Ag, Cd, Tl, Pb) por ICP-MS en glándula digestiva y branquias de *P. clarkii* capturados en las tres zonas de estudio se muestran en la Fig.1.1. No se han considerado los datos correspondientes a Be y Pb, pues las concentraciones detectadas fueron muy próximas o inferiores a los límites de detección de la técnica. Se encontraron diferencias importantes en la concentración de elementos, siendo la glándula digestiva el principal órgano bioacumulador de metales y los cangrejos de PAR y MAT los más afectados, en comparación con los datos obtenidos para los capturados en LP.

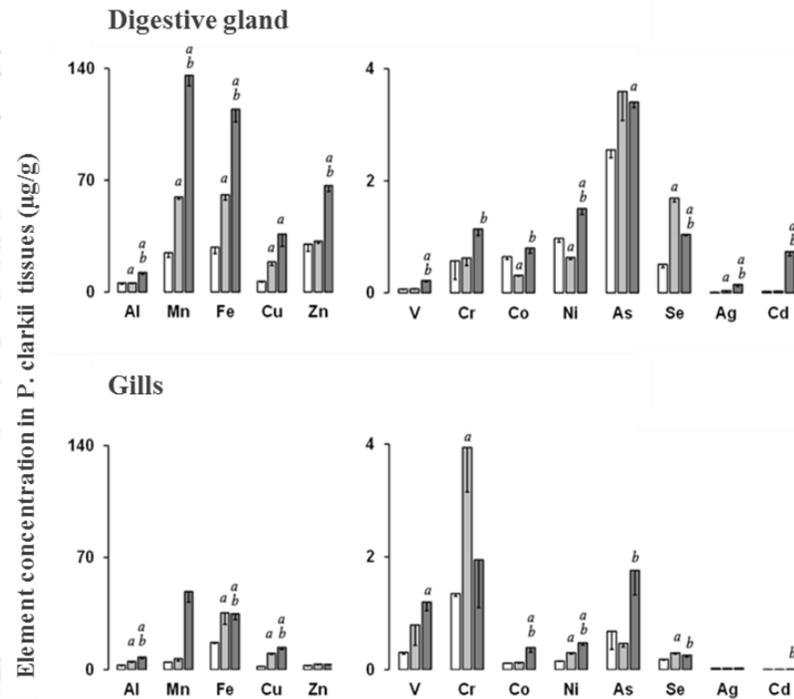
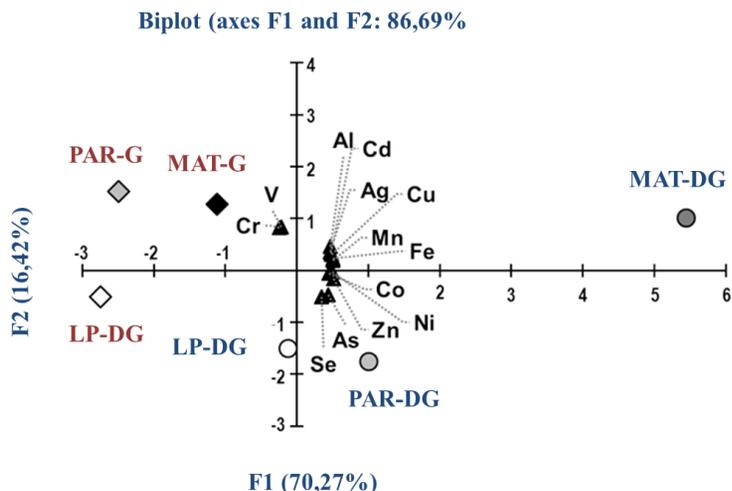


Figure 1.1. Element concentrations in extracts of digestive glands and gills of *P. clarkii* crayfish from the three studied sites. Data (µg/g) are mean ± SEM from the fourteen crayfish at each capture site (LP, PAR and MAT) grouped in 4 pools. All measurements were made in triplicate. LODs were (in µg/g): Al: 1.120 µg/g; V: 0.054 µg/g; Cr: 0.098 µg/g; Mn: 0.032 µg/g; Fe: 0.621 µg/g; Co: 0.026 µg/g; Ni: 0.098 µg/g; Cu: 0.065 µg/g; Zn: 0.165 µg/g; As: 0.027 µg/g; Se: 0.033 µg/g; Ag: 0.008 µg/g; Cd: 0.001 µg/g. Statistical significances were determined in an unpaired Student t-test (a) between LP and PAR/MAT; (b) between PAR and MAT.

Mn, Fe, Zn y Cu presentaron la mayor tasa de acumulación en los cangrejos de los tres grupos de estudio, con valores entre 7 (Cu) y 30 (Zn) $\mu\text{g/g}$ en el caso de la glándula digestiva de cangrejos LP, que subían hasta valores hasta 36 (Cu) y 135 (Mn) $\mu\text{g/g}$ en cangrejos MAT. Estos metales fueron también mayoritarios en branquias, aunque con valores 3 veces inferiores a los de glándula digestiva. El Al presentó valores de concentración y preferencia de acumulación semejante a los del Cu. El As se acumuló sobre todo en glándula digestiva y en animales capturados en las zonas contaminadas. Co, Ni y Se almacenaron en ambos órganos con preferencia (> 4 veces) por la glándula digestiva, aunque en este caso los valores máximos, alcanzado en cangrejos MAT, estaban alrededor de 1-1,5 $\mu\text{g/g}$. En cambio, V y Cr se acumularon principalmente en branquias, duplicando los valores alcanzados en glándula digestiva. Ag y Cd fueron los elementos menos abundantes, aunque en el caso del Cd sus niveles subieron drásticamente en animales expuestos a contaminación (>28 veces en la glándula digestiva de cangrejos MAT). Es destacable que los animales de MAT acumularon principalmente elementos esenciales (Mn, Fe, Zn, Cu) a diferencia de los de PAR, que lo hicieron principalmente con elementos tóxicos (Cr, As).

Se realizó un estudio de componentes principales (PCA) con los datos de la Fig. 1.1 para comprender mejor la acumulación de metales en los dos órganos y en animales capturados en los tres lugares de estudio. Las dos primeras componentes del PCA explicaron el $\sim 87\%$ de la variación y generaron un diagrama de dispersión (Fig.1.2) mostrando claramente la separación entre individuos capturados en LP, la “zona limpia” y los capturados en las zonas contaminadas PAR y MAT, así como entre los dos órganos, glándula digestiva y branquias, de animales expuestos a contaminación.



Factorial Load	Variable													
	Al	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	As	Se	Ag	Cd	
F1	0.88	-0.42	-0.47	0.96	0.95	0.85	0.93	0.94	0.97	0.84	0.65	0.89	0.90	
F2	0.42	0.77	0.76	0.18	0.21	-0.05	-0.03	0.28	-0.15	-0.43	-0.47	0.33	0.30	

Figure 1.2. Principal component analysis (type Spearman n-1) of element concentration ($\mu\text{g/g}$) for captured crayfish. Factor loading of the concentrations (\blacktriangle , first component space) and tissue/sampling sites (second component space) points scores corresponding to digestive gland (\circ \bullet) and to gill (\diamond \blacklozenge) from crayfish captured at LP, PAR and MAT sites, respectively, are shown.

Los coeficientes de correlación de Pearson (Tabla 1.2) mostraron, asimismo, dos conjuntos de asociaciones, una con los metales pesados Fe, Cu, Ag, Mn y Al, correlacionados positivamente con el Cd, y otra con Zn, Se, Ni y Co, donde también se incluye el As.

Table 1.2. Pearson's correlation coefficients between elements concentration found in digestive gland and gills of crayfish at the different studied sites.

Element	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	As	Se	Ag	Cd
Al	0.047	-0.144	0.933	0.883	0.808	0.847	0.925	0.773	0.609	0.345	0.859	0.870
V		0.685	-0.204	-0.272	-0.336	-0.432	-0.138	-0.595	-0.538	-0.573	-0.220	-0.267
Cr			-0.368	-0.219	-0.531	-0.470	-0.178	-0.523	-0.728	-0.511	-0.168	-0.209
Mn				0.959	0.768	0.851	0.970	0.878	0.764	0.584	0.923	0.905
Fe					0.673	0.820	0.986	0.893	0.701	0.634	0.953	0.923
Co						0.964	0.671	0.847	0.734	0.328	0.633	0.731
Ni							0.796	0.949	0.776	0.473	0.768	0.841
Cu								0.842	0.701	0.611	0.925	0.887
Zn									0.831	0.661	0.832	0.866
As										0.854	0.526	0.524
Se											0.423	0.349
Ag												0.983

Values that are statistically significant at the $P \leq 0.05$ level are indicated in bold.

Las componentes F1 y F2 resumieron estos patrones de correlación y permitieron diferenciar claramente los dos órganos en *P. clarkii*. En conjunto, los cangrejos de LP tenían concentraciones menores en sus órganos, mientras que las glándulas digestivas de los cangrejos de MAT se situaron en el otro extremo del gradiente de contaminación por acumulación de metales pesados y, posiblemente, otros contaminantes, como pesticidas, fertilizantes y alguicidas usados en el cultivo del arroz^{18, 19}.

Concentración de elementos en glándula digestiva.

El análisis PCA (Fig. 1.2) demostró la separación natural de los dos órganos estudiados en animales contaminados, siendo la glándula digestiva la que acumuló la mayor concentración de todos los elementos analizados, excepto V y Cr (Fig. 1.2). Estos datos están en consonancia con el papel de este órgano en el almacenamiento y detoxificación de metales pesados²⁰, además de en diversos procesos fisiológicos, como la secreción de jugos digestivos, la absorción y almacenamiento de alimentos digeridos o la muda. En estos mecanismos de detoxificación participan, por ejemplo, metalotioneínas presentes en la glándula digestiva y cuya abundancia suele aumentar en organismos expuestos a metales, sirviéndose de sus grupos tiólicos para unirlos y secuestrarlos²¹.

La componente F1 del PCA, que explicó el 70,3 % de la variabilidad observada (Fig. 1.2), está relacionada con las concentraciones de Fe, Mn, Zn y Cu, que, a su vez, se correlacionan positivamente entre sí. Las muestras de glándula digestiva de cangrejos capturados en PAR y sobre todo en MAT, presentaron las concentraciones más altas de estos elementos, plenamente de acuerdo con lo discutido previamente. Fe y Mn juegan un papel importante en la química del oxígeno, como cofactores de enzimas que retiran los productos dañinos del metabolismo del O₂ como el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno. El Fe tiene alto potencial redox y puede causar estrés oxidativo por la reacción de Fenton²². El Mn es menos propenso a estas reacciones por su mayor potencial redox. Sin embargo la exposición a altas concentraciones de Mn incrementa los niveles de ROS y la disminución de los niveles de enzimas antioxidantes como SOD²³, causando daños oxidativos en lípidos y proteínas. Las consecuencias son alteraciones en el sistema inmune y neurotoxicidad y afectación de funciones como la percepción quimiosensorial

del alimento²⁴. El Cu forma parte del pigmento respiratorio hemocianina, lo que explica su abundancia natural en la glándula digestiva²⁵. El aumento de Cu inhibe distintas enzimas esenciales para la supervivencia de la célula, altera la capacidad osmorreguladora de branquias y la generación de ROS²⁶ a través también de la reacción de Fenton, provocando el descenso de los niveles de GSH²². Al contrario que estos biometales, activos en procesos redox, el Zn es redox-inerte y se le atribuyen propiedades antioxidantes únicas, que le permiten modular el estrés oxidativo a través de la protección de los grupos -SH de las proteínas, contribuyendo a su correcto plegamiento y mantenimiento de su estabilidad^{27, 28}.

Concentración de elementos en branquias.

Las branquias de los organismos acuáticos están en contacto directo con el medio y, por ello, con los posibles contaminantes que éste pudiera contener. No se tiene aún un conocimiento completo de cómo las branquias participan en la entrada de metales al organismo ni sobre los mecanismos presentes en las branquias para el almacenamiento y detoxificación de estos elementos. Diversos trabajos indican que las branquias incorporan metales mediante endocitosis²⁹. Tal es el caso de las branquias de mejillón, que incorporan Fe coloidal y Pb mediante este mecanismo³⁰. El Cr es el único elemento estudiado que se acumuló preferentemente en branquias de *P. clarkii*, independientemente de su zona de captura (Fig. 1.1). Estos resultados coinciden con el hecho de ser las branquias el sitio donde el Cr ejerce mayor toxicidad, al causar inflamación crónica que afecta al intercambio gaseoso y la ingesta de alimentos³¹. Igual que en la glándula digestiva, la acumulación de elementos en las branquias fue superior en animales capturados en las zonas contaminadas PAR y MAT que en animales de la zona control LP (Fig. 1.1).

1.4.2. Concentración de elementos en sedimentos

La concentración de elementos esenciales como Cu, Mn, Zn y Fe se regula íntimamente, tanto a nivel celular como de organismo. En tanto que la exposición a estos elementos esté por debajo de un cierto valor umbral, los decápodos no los acumulan en sus tejidos, sino que son detoxificados por metalotioneínas y eliminados a través de los órganos excretores o las branquias²⁵. Solo cuando se superan esos umbrales en el medio,

los elementos esenciales se acumulan en los organismos y acaban causando enfermedad e incluso muerte. Nuestros resultados (Fig. 1.1) indicaron una concentración hasta 10 veces superior de Mn, Fe, Zn and Cu en los cangrejos capturados en PAR y MAT, lo que sugería que en estos animales se ha sobrepasado la capacidad reguladora, probablemente por la presencia de cantidades elevadas de estos elementos en el medio.

A diferencia de lo que ocurre con los elementos esenciales, los no esenciales se acumulan en función de su presencia en el medio y su biodisponibilidad. El organismo contribuye a su acumulación, pues en muchas ocasiones son atrapados por metalotioneínas y almacenados^{22, 32}. Se ha descrito, por ejemplo, que la tasa de bioacumulación de Cd es superior a la de la mayoría de otros elementos, debido a que suele asimilarse rápidamente y a que tiene una baja tasa de excreción^(33 y referencias que cita). De acuerdo con esta observación, en este trabajo se encontró una concentración de Cd 28 veces mayor en la glándula digestiva de los cangrejos MAT que en la de animales de referencia (Fig. 1.1). También la acumulación de As fue mayor en cangrejos de zonas contaminadas especialmente en PAR (incrementos de 2,6 veces). La bioacumulación de As es altamente dependiente de la especie iónica y de propiedades de los propios sedimentos, como pueden ser la presencia de óxidos de hierro, sulfatos y/o carbono orgánico disuelto, las cuales controlan la movilidad del As en los suelos³⁴.

Para comprobar en qué medida la presencia de metales en los tejidos de *P. clarkii* reflejaba la contaminación del medio en que se capturaron, se determinó la concentración de Mn, Fe, Zn, Cu, As y Cd en los sedimentos. La determinación se llevó a cabo por ICP-MS utilizando únicamente la fracción < 630 μm , la única que puede ser ingerida casualmente por *P. clarkii* al estar asociada a la fracción orgánica del sedimento. La concentración de estos cinco elementos Mn, Cu, Zn, As y Cd, en las muestras de sedimento recolectadas de tres puntos diferentes en los tres sitios estudiados se muestran en la Tabla 1.3.

Table 1.3. Elements concentration ($\mu\text{g/g}$) in sediments from LP, PAR y MAT.

Element ($\mu\text{g/g}$)	Elements oncentration in sediments ^a						<i>P</i> ^b			Fold-change		LOD ^c ($\mu\text{g/g}$)
	LP		PAR		MAT		LDP vs PAR	LDP vs MAT	LDP vs PAR	PAR vs LP	MAT vs LP	
	Average	SEM	Average	SEM	Average	SEM						
Mn	282.475 ± 9.133		408.363 ± 67.906		641.051 ± 1.762		0.0335	0.0008	< 0.0001	1.446	2.269	0.032
Cu	13.032 ± 2.774		27.691 ± 2.346		53.783 ± 3.994		0.0240	0.0009	0.0036	2.125	4.127	0.118
Zn	64.907 ± 12.029		94.145 ± 21.389		157.118 ± 34.694		0.3270	0.0032	0.0041	1.450	2.421	1.023
As	3.835 ± 0.808		6.035 ± 0.862		16.514 ± 6.052		0.7466	0.0106	0.0119	1.574	4.307	0.031
Cd	0.236 ± 0.087		0.575 ± 0.116		0.878 ± 0.049		0.0027	0.0004	0.0005	2.441	3.727	0.002
Σ	364.484 ± 4.983		536.809 ± 9.624		869.344 ± 6.823							

^aData ($\mu\text{g/g}$) are mean \pm SEM from the three samples at each studied site (LDP, PAR and MAT). Element concentrations were determined with an inductively coupled plasma mass spectrometer Agilent 7500ce (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) equipped with an octopole collision/reaction cell, and the flows of collision/reaction gases were fixed at 3.7 mL min⁻¹ for He and at 3.5 mL min⁻¹ for H₂ in order to avoid or reduce the interferences. All measurements were made in triplicate.

^bStatistical significances were determined in an unpaired Student *t*-test. The two-tailed *P* values are given.

^cThe limits of detection (LOD) for the sediments element levels.

Las concentraciones más bajas de todos estos elementos se cuantificaron en muestras recogidas en LP (Tabla 1.3). Por el contrario, el análisis mostró que los sedimentos de la zona PAR y en particular de MAT, afectadas por prácticas de agricultura intensiva, tenían una mayor carga de estos elementos. Estos resultados están de acuerdo con datos anteriores publicados sobre el contenido total de metales en suelos, sedimentos y agua recogidas en los mismos puntos en estudio en campañas anteriores^{8,35,36}, ratificando la alta contaminación que sufre PAR y especialmente MAT, donde los 5 elementos presentaron concentraciones superiores en más de 2 veces a las del sitio de referencia. Aunque pueden tener diversos orígenes, sin duda una de las principales fuentes de Mn, Fe, Cu y Zn es su presencia en los fertilizantes, pesticidas y alguicidas ampliamente usados en los cultivos de cítricos, invernaderos de fresas y arrozales. Esto sería también aplicable a elementos no esenciales como As y Cd. La mayor presencia de metales en sedimentos y animales capturados en MAT podría estar relacionada con la contaminación generada por la rotura de la presa de la mina de Aznalcóllar, que liberó lodos ricos en Fe, Zn, Pb, As, Cu, Mn, Sb y Ba, entre otros elementos. Los lodos se extendieron casi un km a ambas orillas del arroyo Guadiamar a lo largo de 20 km de su curso y, aunque no llegaron a entrar en Doñana, afectaron gravemente a sus inmediaciones, incluyendo la zona de El Matochal³⁷. A pesar de los esfuerzos realizados para su limpieza, la contaminación de los acuíferos de la zona es aún importante³⁸.

El análisis de regresión lineal comparando la concentración de Mn, Cu, Zn, As y Cd en glándula digestiva de *P. clarkii* y en sedimentos demostró una buena correlación positiva (> 93%) para Mn, Cu y Zn (Fig.1.3). Asimismo se encontró buena correlación (> 99,5%) entre la concentración de Mn y Cu en sedimentos y los dos órganos analizados de *P. clarkii*. En el caso del Zn la correlación fue buena en glándula digestiva pero no en branquias, indicando que este órgano no acumula de igual manera este elemento. Los resultados obtenidos sugieren que los mecanismos reguladores que controlan la acumulación de metales esenciales (Mn, Cu, Zn) están sobrepasados en los cangrejos PAR y MAT y que el nivel de acumulación de los mismos en sus tejidos es, por ello, un reflejo de las concentraciones de estos elementos en los sedimentos de la zona.

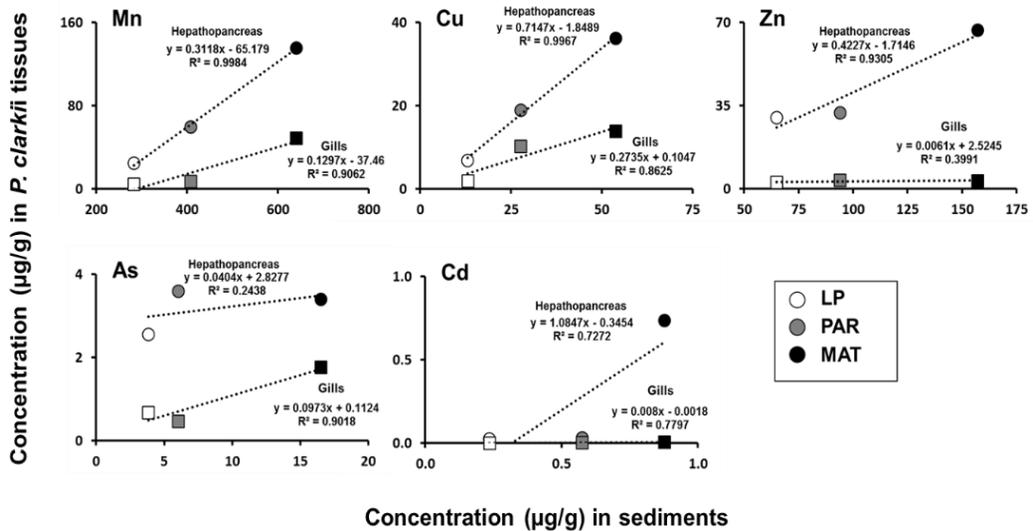


Figure 1.3. Linear regression comparing Mn, Cu, Zn, As and Cd concentrations in *P. clarkii* organs and in sediments of the LP, PAR and MAT sites. Analysis was performed with the XLSTAT v. 2013.6.02 (Addinsoft)

El As mostró también una buena correlación entre sedimentos y branquias (> 90%), pero no con glándula digestiva (24%), donde se acumula en mayor cantidad, especialmente en animales de PAR. En el caso del Cd, la correlación fue similar en ambos órganos (> 72%). Niveles de correlación mejores se esperarían para el Cd y el As que para los otros tres metales, pues los animales son incapaces de regular su

absorción/excreción, como se comentó antes. Sin embargo, es posible que la alta variabilidad interindividual encontrada al determinar las concentraciones de estos elementos, Cd y As, esté enmascarando el resultado, incluso en el caso del Cd, que presenta la mayor tasa de bioacumulación (> 28 veces en tejido de cangrejos MAT, lo que supone más de 6 veces de aumento observado en sedimento de esta zona, siempre referido a las muestras de referencia) (Fig. 1.3).

1.5. Conclusiones

El bajo contenido en metales determinado en la zona LP y en los cangrejos capturados en ella, validan su utilización como referencia en estudios de contaminación ambiental, coincidiendo con resultados previos de nuestro grupo y de otros^{6, 7, 14, 17, 35, 36, 39}. Asimismo, los resultados de este trabajo vienen a confirmar que PAR y, especialmente, MAT son sitios altamente muy contaminados^{13, 35, 39-41}, con niveles elevados de diversos elementos, tanto esenciales como no esenciales. Aunque el origen de la contaminación de PAR y MAT puede ser diversa, una de las principales fuentes de Mn, Fe, Cu y Zn es, sin duda, la presencia de estos metales en fertilizantes y pesticidas muy usados en el cultivo de cítricos, fresas y arroz. Es posible que este sea también el origen de otros metales y metaloides esenciales y no esenciales, y explicaría por qué los animales de MAT, un arrozal, presentan mayores cantidades que los de PAR.

Es destacable la alta bioacumulación de Cd en los cangrejos, superior a la de la mayor parte de los metales estudiados. Probablemente, el hecho de que se asimile rápidamente y que sea difícil de excretar explique que el Cd se acumule en cantidades 7 veces superiores a los controles en glándula digestiva de cangrejos de PAR y hasta 28 veces más en los capturados en MAT. Estos cangrejos MAT también concentran As. Ambos, As y Cd, pueden tener su origen, al menos parcialmente, en el vertido causado por la rotura de la balsa de contención de lodos de la mina de Aznalcóllar en 1998³⁷.

Considerados en conjunto, nuestros resultados indican que los animales que viven en PAR y especialmente en MAT, acumulan altos contenidos de metales y metaloides, muchos de ellos relacionados con estrés oxidativo y diversas enfermedades. El exceso de estos contaminantes y sus interacciones y sinergias entre sí y con otros contaminantes presentes en el medio, pueden acabar ocasionando alteraciones

homeostáticas conduciendo a situaciones de estrés celular y, en última instancia, causar enfermedad e incluso la muerte⁴²⁻⁴⁶. La comparación de la concentración de metales en sedimentos y en los órganos de *P. clarkii* sustenta la idea de que este decápodo es un buen indicador de contaminación por metales en los ecosistemas.

1.6. Referencias

- Caudill, S. P., Characterizing populations of individuals using pooled samples. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2010, 20, (1), 29-37.
- Diz, A. P.; Truebano, M.; Skibinski, D. O., The consequences of sample pooling in proteomics: an empirical study. *Electrophoresis* 2009, 30, (17), 2967-75.
- Bonilla-Valverde, D.; Ruiz-Laguna, J.; Muñoz, A.; Ballesteros, J.; Lorenzo, F.; Gómez-Ariza, J. L.; López-Barea, J., Evolution of biological effects of Aznalcollar mining spill in the Algerian mouse (*Mus spretus*) using biochemical biomarkers. *Toxicology* 2004, 197, (2), 122-137.
- Zorrilla-Miras, P.; Palomo, I.; Gómez-Baggethun, E.; Martín-López, B.; Lomas, P. L.; Montes, C., Effects of land-use change on wetland ecosystem services: A case study in the Doñana marshes (SW Spain). *Landscape and Urban Planning* 2014, 122, (0), 160-174.
- Fernández-Cisnal, R.; Alhama, J.; Abril, N.; Pueyo, C.; Lopez-Barea, J., Redox proteomics as biomarker for assessing the biological effects of contaminants in crayfish from Donana National Park. *Sci Total Environ* 2014, 490, 121-33.
- Vioque-Fernández, A.; Alves de Almeida, E.; Lopez-Barea, J., Assessment of Donana National Park contamination in *Procambarus clarkii*: integration of conventional biomarkers and proteomic approaches. *Sci Total Environ* 2009, 407, (5), 1784-97.
- Ruiz-Laguna, J.; Garcia-Alfonso, C.; Peinado, J.; Bonilla, D.; Moreno, S.; Ieradi, L. A.; Cristaldi, M.; López-Barea, J., Biochemical biomarkers of pollution in Algerian mouse (*Mus spretus*) to assess the effects of the Aznalcollar disaster on Doñana Park (Spain). *Biomarkers* 2001, 6, 146-160.
- Gago-Tinoco, A.; González-Domínguez, R.; García-Barrera, T.; Blasco-Moreno, J.; Bebianno, M. J.; Gómez-Ariza, J.-L., Metabolic signatures associated with environmental pollution by metals in Doñana National Park using *P. clarkii* as bioindicator. *Environ Sci Pollut Res* 2014, 21, (23), 13315-13323.
- Gimeno-García, E.; Andreu, V.; Boluda, R., Heavy metals incidence in the application of inorganic fertilizers and pesticides to rice farming soils. *Environ. Pollut.* 1996, 92, (1), 19-25.
- Gall, J.; Boyd, R.; Rajakaruna, N., Transfer of heavy metals through terrestrial food webs: a review. *Environ Monit Assess* (2015), 187, (4), 1-21.
- Fergusson, J. E., *The Heavy Elements: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*. Oxford: Pergamon Press: 1990.
- Duffus, J. H., Heavy metals-a meaningless term?. *Pure Appl. Chem.* 2002, 74, (5), 793-807.
- Ruiz-Laguna, J.; Abril, N.; Garcia-Barrera, T.; Gomez-Ariza, J. L.; Lopez-Barea, J.; Pueyo, C., Absolute transcript expression signatures of Cyp and Gst genes in *Mus spretus* to detect environmental contamination. *Environ Sci Technol* 2006, 40, (11), 3646-52.
- Montes-Nieto, R.; Fuentes-Almagro, C. A.; Bonilla-Valverde, D.; Prieto-Alamo, M. J.; Jurado, J.; Carrascal, M.; Gomez-Ariza, J. L.; Lopez-Barea, J.; Pueyo, C., Proteomics in free-living *Mus spretus* to monitor terrestrial ecosystems. *J. Proteomics* 2007, 7, (23), 4376-4387.
- Abril, N.; Chicano-Galvez, E.; Michan, C.; Pueyo, C.; Lopez-Barea, J., iTRAQ analysis of hepatic proteins in free-living *Mus spretus* mice to assess the contamination status of areas surrounding Donana National Park (SW Spain). *Sci Total Environ* 2015, 523, 16-27.
- Abril, N.; Ruiz-Laguna, J.; Garcia-Sevillano, M. A.; Mata, A. M.; Gomez-Ariza, J. L.; Pueyo, C., Heterologous Microarray Analysis of Transcriptome Alterations in *Mus spretus* Mice Living in an Industrial Settlement. *Environ Sci Technol* 2014, 48, (4), 2183-92.
- Abril, N.; Ruiz-Laguna, J.; Osuna-Jimenez, I.; Vioque-Fernández, A.; Fernández-Cisnal, R.; Chicano-Galvez, E.; Alhama, J.; Lopez-Barea, J.; Pueyo, C., Omic approaches in environmental issues. *J Toxicol Environ Health A* 2011, 74, (15-16), 1001-19.
- Gimeno-García, E.; Andreu, V.; Boluda, R., Heavy metals incidence in the application of inorganic fertilizers and pesticides to rice farming soils. *Environ Pollut* 1996, 92, (1), 19-25.
- Suarez-Serrano, A.; Alcaraz, C.; Ibanez, C.; Trobajo, R.; Barata, C., *Procambarus clarkii* as a bioindicator of heavy metal pollution sources in the lower Ebro River and Delta. *Ecotoxicol Environ Saf* 2010, 73, (3), 280-6.
- Anderson, M. B.; Reddy, P.; Preslan, J. E.; Fingerman, M.; Bollinger, J.; Jolibois, L.; Maheshwarudu, G.; George, W. J., Metal accumulation in crayfish, *Procambarus clarkii*, exposed to a petroleum-contaminated Bayou in Louisiana. *Ecotoxicol Environ Saf* 1997, 37, (3), 267-72.
- Sterling, K. M.; Roggenbeck, B.; Ahearn, G. A., Dual control of cytosolic metals by lysosomal transporters in lobster hepatopancreas. *J Exp Biol* 2010, 213, (5), 769-74.
- Jomova, K.; Valko, M., Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 2011, 283, (2-3), 65-87.
- Xu, B.; Wu, S.-W.; Lu, C.-W.; Deng, Y.; Liu, W.; Wei, Y.-G.; Yang, T.-Y.; Xu, Z.-F., Oxidative stress involvement in manganese-induced alpha-synuclein oligomerization in organotypic brain slice cultures. *Toxicology* 2013, 305, (0), 71-78.
- Baden, S. P.; Eriksson, S. P., Role, routes and effects of manganese in crustaceans. In *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review.*, Gibson, R. N.;

- Atkinson, R. J. A.; Gordon, J. D. M., Eds. Taylor & Francis: 2006; Vol. 44, pp 61-83.
25. Alcorlo, P.; Otero, M.; Crehuet, M.; Baltanas, A.; Montes, C., The use of the red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*, Girard) as indicator of the bioavailability of heavy metals in environmental monitoring in the River Guadiamar (SW, Spain). *Sci Total Environ* 2006, 366, (1), 380-90.
26. Sun, S.; Chen, L.; Qin, J.; Ye, J.; Qin, C.; Jiang, H.; Li, E., Molecular cloning, characterization and mRNA expression of copper-binding protein hemocyanin subunit in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Fish Shellfish Immunol* 2012, 33, (5), 1222-1228.
27. Onderci, M.; Sahin, N.; Sahin, K.; Kilic, N., Antioxidant properties of chromium and zinc: in vivo effects on digestibility, lipid peroxidation, antioxidant vitamins, and some minerals under a low ambient temperature. *Biol Trace Elem Res* 2003, 92, (2), 139-50.
28. Zago, M. P.; Oteiza, P. I., The antioxidant properties of zinc: interactions with iron and antioxidants. *Free Radic Biol Med* 2001, 31, (2), 266-74.
29. O'Brien, P.; Rainbow, P. S.; Nugegoda, D., The effect of the chelating agent EDTA on the rate of uptake of zinc by *Palaemon elegans* (Crustacea: Decapoda). *Mar. Environ. Res.* 1990, 30, (2), 155-159.
30. Langston, W. J.; Bebianno, M. J., Metal Metabolism in Aquatic Environments. Springer US: 1998; p 448.
31. Zwolak, I.; Zaporowska, H., Selenium interactions and toxicity: A review. *Cell Biol Toxicol* 2012, 28, (1), 31-46
32. García-Sevillano, M. A.; Abril, N.; Fernández-Cisnal, R.; García-Barrera, T.; Pueyo, C.; López-Barea, J.; Gómez-Ariza, J. L., Functional genomics and metabolomics reveal the toxicological effects of cadmium in *Mus musculus* mice. *Metabolomics* 2015, 11, (5), 1432-1450.
33. Pan, K.; Wang, W., Allometry of cadmium and zinc concentrations and bioaccumulation in the scallop *Chlamys nobilis*. *Marine Ecology Progress Series* 2008, 365, 115-126.
34. Lee, B.-T.; Lee, S.-W.; Kim, K.-R.; Kim, K.-W., Bioaccumulation and the soil factors affecting the uptake of arsenic in earthworm, *Eisenia fetida*. *Environ Sci Pollut Res* 2013, 20, (12), 8326-8333.
35. Vioque-Fernández, A.; de Almeida, E. A.; Ballesteros, J.; García-Barrera, T.; Gomez-Ariza, J. L.; Lopez-Barea, J., Donana National Park survey using crayfish (*Procambarus clarkii*) as bioindicator: esterase inhibition and pollutant levels. *Toxicol. Lett.* 2007, 168, (3), 260-8.
36. Garcia-Sevillano, M. A.; Gonzalez-Fernández, M.; Jara-Biedma, R.; Garcia-Barrera, T.; Lopez-Barea, J.; Pueyo, C.; Gomez-Ariza, J. L., Biological response of free-living mouse *Mus spretus* from Donana National Park under environmental stress based on assessment of metal-binding biomolecules by SEC-ICP-MS. *Anal Bioanal Chem* 2012, 404, (6-7), 1967-81.
37. Grimalt, J. O.; Ferrer, M.; Macpherson, E., The mine tailing accident in Aznalcollar. *Sci Total Environ* 1999, 242, (1-3), 3-11.
38. Olías, M.; Moral, F.; Galván, L.; Cerón, J., Groundwater contamination evolution in the Guadiamar and Agrio aquifers after the Aznalcollar spill: assessment and environmental implications. *Environ Monit Assess* 2012, 184, (6), 3629-3641.
39. 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., Use of metallomics in environmental pollution assessment using mice *Mus musculus*/*Mus spretus* as bioindicators. *Curr Anal Chem* 2013, 9, (2), 229-243.
40. Bonilla-Valverde, D.; Ruiz-Laguna, J.; Munoz, A.; Ballesteros, J.; Lorenzo, F.; Gomez-Ariza, J. L.; Lopez-Barea, J., Evolution of biological effects of Aznalcollar mining spill in the Algerian mouse (*Mus spretus*) using biochemical biomarkers. *Toxicology* 2004, 197, (2), 123-38.
41. Gonzalez-Fernández, M.; Garcia-Sevillano, M. A.; Jara-Biedma, R.; Garcia-Barrera, T.; Vioque, A.; Lopez-Barea, J.; Pueyo, C.; Gomez-Ariza, J. L., Size characterization of metal species in liver and brain from free-living (*Mus spretus*) and laboratory (*Mus Musculus*) mice by SEC-ICP-MS: Application to environmental contamination assessment. *J Anal At Spectrom* 2011, 26, (1), 141-149.
42. David, R. W., Environmental Pesticides and Heavy Metals: Role in Breast Cancer. In *Toxicity and Hazard of Agrochemicals* 2015.
43. Solenkova, N. V.; Newman, J. D.; Berger, J. S.; Thurston, G.; Hochman, J. S.; Lamas, G. A., Metal pollutants and cardiovascular disease: Mechanisms and consequences of exposure. *American Heart Journal* 2014, 168, (6), 812-822.
44. Pereira, P.; de Pablo, H.; Guilherme, S.; Carvalho, S.; Santos, M. A.; Vale, C.; Pacheco, M., Metal accumulation and oxidative stress responses in *Ulva* spp. in the presence of nocturnal pulses of metals from sediment: a field transplantation experiment under eutrophic conditions. *Mar Environ Res* 2014, 94, 56-64.
45. Khan, A. R.; Awan, F. R., Metals in the pathogenesis of type 2 diabetes. *J Diabetes Metab Disord* 2014, 13, (1), 16.
46. Jaishankar, M.; Tseten, T.; Anbalagan, N.; Mathew, B. B.; Beeregowda, K. N., Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip Toxicol* 2014, 7, (2), 60-72.

CAPÍTULO 2

*PEROXIDACIÓN DE
LÍPIDOS EN GLÁNDULA
DIGESTIVA Y BRANQUIAS
DE CANGREJOS P. CLARKII
COMO MEDIDA DE ESTRÉS
AMBIENTAL*

2.1. Resumen

Los tejidos de los cangrejos *P. clarkii* capturados en las zonas PAR y MAT presentaron una acumulación de metales muy superior a la observada en los animales de referencia (Cap. 1). Dada la capacidad de los metales de generar especies reactivas de oxígeno (ROS), es muy posible que estos animales estén sufriendo una situación de estrés oxidativo, con el consiguiente daño a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. El ataque de ROS a los lípidos de membrana genera peróxidos orgánicos, en un proceso en cascada denominado peroxidación lipídica, que se considera el principal mecanismo implicado en el daño oxidativo a las estructuras celulares y al proceso de toxicidad que lleva a la muerte celular. Aldehídos como malondialdehído (MDA), 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) y acroleína, se generan por peroxidación de los lípidos de las membranas biológicas, que pierden su integridad. Mitocondrias, retículo endoplásmico y demás orgánulos de la célula ven, así seriamente comprometida su función y se detienen procesos esenciales que dependen del funcionamiento de estos orgánulos, como la síntesis de ATP, el transporte de metabolitos e iones o el bombeo de protones, provocando como resultado final el colapso de la célula.

La medida del nivel de peroxidación lipídica tiene un alto valor predictivo como biomarcador de los efectos de las ROS. El MDA es uno de los principales productos originados por peroxidación lipídica y se utiliza habitualmente para determinar el estado de oxidación de las células. En este estudio se ha llevado a cabo la cuantificación de MDA, usando el método de reacción con TPA, en glándula digestiva y branquias de cangrejos *P. clarkii* capturados en las zonas PAR y MAT, usando como referencia animales capturados LP. Los niveles de oxidación lipídica encontrados en los animales de las tres zonas se corresponden plenamente con las concentraciones de metales halladas en los mismos (Fig. 1.1. pág.103), especialmente con la acumulación de Mn, Zn y Cu. Así los cangrejos de PAR y sobre todo de MAT, mostraron un nivel de peroxidación lipídica más elevado que los cangrejos de LP, siendo la glándula digestiva el órgano con mayor nivel de daño en lípidos. La buena correlación positiva entre la concentración de metales en sedimentos y en órganos de *P. clarkii* y los niveles de MDA medidos en estos órganos sustenta la idea de que este parámetro puede ser un buen biomarcador de metales.

2.2. Niveles de peroxidación lipídica como medida del estrés oxidativo generado en cangrejos *P. clarkii* de zonas contaminadas

Metales y metaloides son la mayor causa de contaminación de acuíferos, a los que llegan debido al uso de fertilizantes y pesticidas en agricultura entre otras actividades antropogénicas. El estudio recogido en el Capítulo 1 demostró la presencia de elevadas concentraciones de 14 metales pesados en sedimentos de las zonas denominadas El Partido (PAR), relativamente lejos de zonas de cultivo, pero que recoge los efluentes de Almonte, y El Matochal (MAT), un arrozal, situado en las proximidades del Parque de Doñana (Fig. I, pág.90). En este trabajo se encontró también una correlación directa entre el contenido en metales pesados en sedimentos y las concentraciones determinadas en glándula digestiva y branquias de cangrejos *P. clarkii* capturados en estas zonas. Los resultados obtenidos sugieren que la zona LP y los cangrejos capturados en ella son adecuados para ser utilizados como referencia en estudios de contaminación ambiental y que las zonas PAR y, especialmente, MAT son sitios altamente contaminados por metales y metaloides tanto esenciales y no esenciales. Es destacable que los animales de MAT acumularon principalmente elementos esenciales (Mn, Fe, Zn, Cu) a diferencia de los de PAR, que lo hicieron principalmente con elementos tóxicos (Cr, As). No obstante, es notoria la alta acumulación de Cd y As en glándula digestiva de animales MAT, que pueden tener su origen en el desastre ecológico de Aznalcóllar en 1998.

Debido a su persistencia, acumulación y magnificación a través de la cadena trófica, los metales son una importante causa de estrés en la célula. Además, esenciales o no esenciales, estos elementos desencadenan estrés oxidativo debido a su capacidad de generar especies reactivas de oxígeno. Las ROS provocan daños al DNA, peroxidación de lípidos y carbonilación de proteínas, daños moleculares que han venido siendo usados como biomarcadores de respuesta celular a exposición a metales^(1, 2 y referencias que citan).

La peroxidación de lípidos está hoy considerada como el principal mecanismo implicado en el daño oxidativo a las estructuras celulares y al proceso de toxicidad que lleva a la muerte de la célula³. El proceso de peroxidación lipídica es una cadena de reacciones iniciada por el ataque de ROS a los grupos metileno que separan los dobles

enlaces en la cadena de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). Los dobles enlaces adyacentes se reordenan y se combinan con O_2 produciendo un radical peróxido, generando peróxidos orgánicos con capacidad de iniciar de nuevo el proceso, atacar a otro PUFA e iniciar una reacción en cascada (Fig. 2.1). Es decir, en presencia de metales, los peróxidos orgánicos producen radicales que reinician el proceso por ciclación redox de los mismos ⁴.

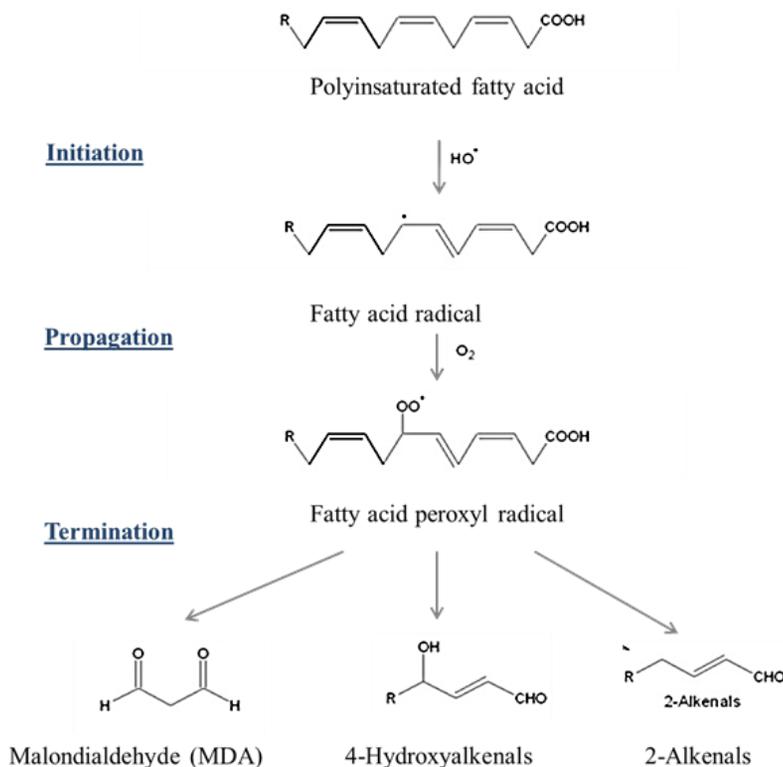
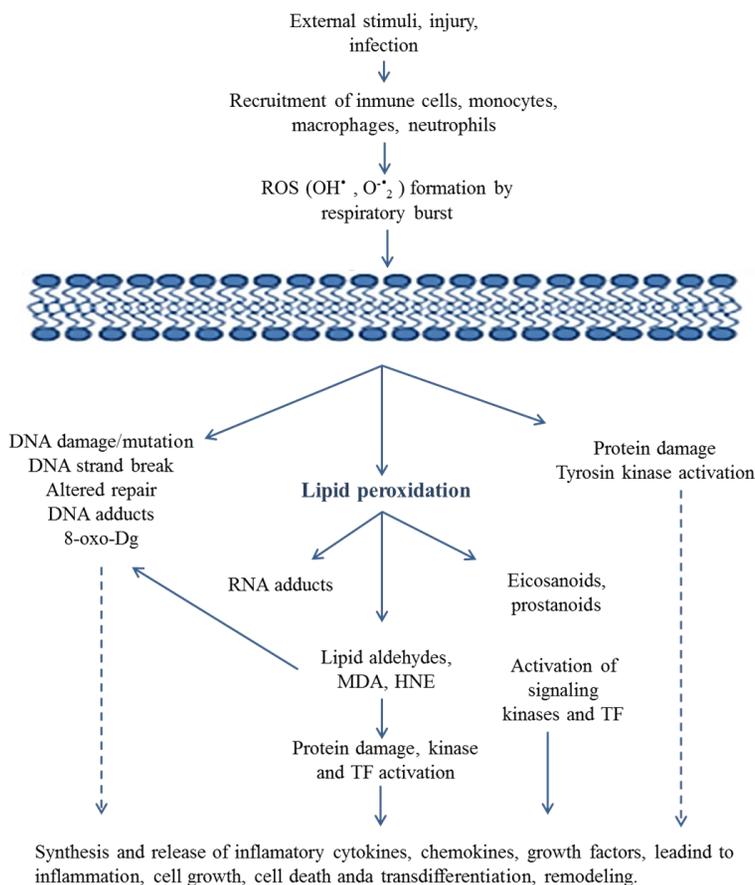


Figure 2.1. Steps in lipid peroxidation processes.

Los hidroperóxidos lipídicos, ayudados por iones metálicos catalíticos, producen varios productos, incluyendo aldehídos como el malondialdehído (MDA), el 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) y la acroleína, que se generan por peroxidación de los lípidos de las membranas biológicas. Los PUFA como el linoleico o el araquidónico, presentes como ésteres de fosfoglicéridos en los lípidos de membrana, son particularmente susceptibles a oxidación, así que mitocondrias, retículo endoplásmico y demás orgánulos celulares ven seriamente comprometida su función ⁵ y se detienen procesos esenciales

que dependen del funcionamiento de estos orgánulos, como la síntesis de ATP, el transporte de metabolitos e iones o el bombeo de protones, provocando como resultado final el colapso de la célula. Los derivados de la peroxidación lipídica reaccionan también con proteínas y ácidos nucleicos y activan cascadas señalización y factores de trascrición que desencadenan diversas patologías inflamatorias ligadas a estrés oxidativo como diabetes, síndrome metabólico, degeneración vascular y neural, toxicidad de hígado y riñón, cáncer o envejecimiento ⁶ (Fig. 2.2).



Pathogenesis: cancer, alzheimer's, asthma, diabetic and cardiovascular complications.

Figure 2.2 Contribution of lipid peroxidation-derived aldehydes in various disease complications. Adapted from ⁷.

La medida del grado de peroxidación lipídica a nivel de tejido es, pues, de máxima importancia para conocer su estado de oxidación. Como el MDA es uno de los principales productos originados por peroxidación lipídica, se han propuesto diversos métodos para la cuantificación de MDA. El más usado es el llamado TBARS (*thiobarbituric acid reactive substances assay*), basado en la reacción de condensación de MDA con TBA (Fig. 2.3), que genera un complejo de color rojo que puede ser cuantificado espectrofotométricamente en el rango de 500-600 nm, o por espectroscopia de fluorescencia ⁸.

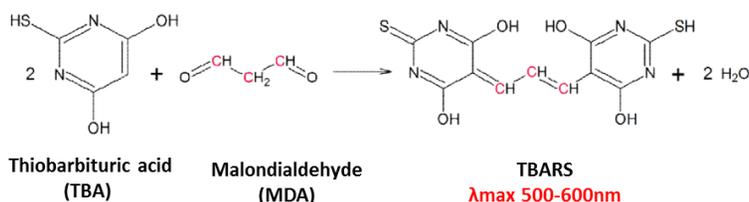


Figure 2.3 Assay of TBARS measures malondialdehyde (MDA)

El principal problema con el ensayo TBARS es su falta de especificidad, ya que reacciona con una variedad de aldehídos, incluyendo glucosa, desoxirribosa, ácido ascórbico, homocisteína y algunos aminoácidos tales como, prolina, arginina y glutamato⁹. No obstante, en el presente trabajo, esta técnica aportó información útil para el monitoreo de la reacción de peroxidación, ya que al trabajar con fracciones lipídicas, las sustancias reactivas con TBA sólo provinieron de la reacción de peroxidación de los lípidos.

Teniendo en cuenta la acumulación de metales (Al, Mn, Fe, Cu, Zn, V, Cr, Co, Ni, As, Se, Ag, Cd) en glándula digestiva y branquias de los cangrejos *P. clarkii* capturados en PAR y MAT, muy por encima de los niveles hallados en los de referencia LP, y que muchos de ellos generan ROS (ver, i.e., 10-20), pareció necesario comprobar la existencia de una situación de estrés oxidativo en los cangrejos. Para ello, evaluamos los niveles de peroxidación lipídica en los órganos de animales capturados en las zonas estudiadas, utilizando el ensayo fluorimétrico del TBA.

2.3. Materiales y métodos

2.3.1. Muestras utilizadas.

Se analizaron glándula digestiva y branquias de cangrejos *P. clarkii*. El estudio se hizo agrupando cantidades iguales de tejido de 14 capturados en cada una de las zonas en 3 lotes independientes, que se consideraron como réplicas biológico/técnicas. De esta manera se redujo la carga de trabajo y el coste económico, pero teniendo en cuenta la posible variabilidad interindividual^{21,22}.

2.3.2. Preparación de muestras para la cuantificación de MDA

La peroxidación lipídica se determinó en cada una de las tres réplicas de cada tejido y zona de muestreo, usando aproximadamente 100 mg de tejido criotriturado cada una. Las muestras de tejido, que se mantuvieron a 4°C durante todo el proceso, se lisaron con un pistilo en 300 µL de Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, suplementado con 1 mM EDTA, 1 mM GSH y PMSF 1 mM e inhibidores de proteasas (Sigma Protease Inhibitor P2714). La rotura se llevó a cabo en tres periodos de 30 s separados por periodos de 30 s en hielo. Después, los lisados se homogeneizaron haciéndolos pasar varias veces a través de una aguja de calibre 26 (0,4 mm) unida a una jeringa de plástico estéril.

2.3.3. Determinación de niveles de MDA en glándula digestiva y branquias de *P. clarkii*

Diferentes cantidades (entre 2 y 10 µL) de cada lisado se mezclaron con 125 µL de butilhidroxitolueno (BHT) 0,5% (p/v) en metanol; 50 µL de H₂SO₄ 0,66 N (0,33M) y 37,5 µL de Na₂WO₄ 4 M, y el volumen total se ajustó a 787,5 µL con H₂O.

Las muestras se centrifugaron (5.000 xg, 5 min, a temperatura ambiente) para precipitar las proteínas. El sobrenadante se recogió y mezcló con 250 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 1% (p/v en NaOH 0,1M). Esta mezcla se calentó 95°C durante 1 hora, y se dejó enfriar a temperatura ambiente antes de determinar la fluorescencia (Ex/Em 515/550 nm, con un ancho de rendija de 15 nm) en un fluorímetro LS 50B (Perkin Elmer).

Se preparó un estándar 1 μM de MDA a partir de una solución stock de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (Sigma, Ref. 108383). A partir de este estándar se prepararon diluciones seriadas (concentración final de 5 a 125 nM), que se trataron del mismo modo que el resto de las muestras, y con las que se obtuvo una recta patrón. La medida se efectuó en tres días diferentes y, cada vez, se hizo la determinación en cada muestra por triplicado. Los resultados se expresaron en pmoles MDA/ μg proteína extraída.

2.3.4. Análisis de los datos.

Los datos se analizaron con una prueba *t* de Student usando el software GraphPad Instant v.3,0. El análisis de regresión lineal se hizo con el software XLSTAT v. 2015.2.02 (Addinsoft).

2.4. Resultados y discusión

2.4.1. Determinación de los niveles de peroxidación lipídica en glándula digestiva y branquias.

Una de las principales consecuencias de la exposición a metales pesados es la producción de ROS y la generación de una situación de estrés oxidativo en la célula. La medida del nivel de peroxidación lipídica tiene un alto valor predictivo como biomarcador de los efectos de las ROS^{23,24}. El principal aldehído reactivo que resulta de la peroxidación lipídica es MDA, por lo que se analizaron los niveles de MDA en *P. clarkii* usando el método de reacción con TBA y los resultados obtenidos en glándula digestiva y branquia de *P. clarkii* capturados en LP, PAR y MAT se muestran en la Fig. 2.4.

Las concentraciones de MDA tanto en glándula digestiva como en branquias fueron significativamente superiores en las muestras de los cangrejos capturados en las zonas contaminadas, siendo los extractos de MAT los que mostraron los mayores niveles de peroxidación lipídica (incrementos >2 veces en ambos órganos) en relación a la referencia LP. Los datos en la Fig. 2.4 también indican un alto nivel de oxidación lipídica en los animales de PAR, y que la glándula digestiva se ve más afectada que las branquias,

de acuerdo con los datos de acumulación de metales pesados (Mn, Zn y Cu) que aparecen en la Fig.1.1 (pág.103). La figura Fig. 2.4.B muestra la existencia de una relación positiva directa entre el contenido de metales y el nivel de peroxidación lipídica en ambos tejidos, que resultó especialmente significativa para Mn, Zn y Cu.

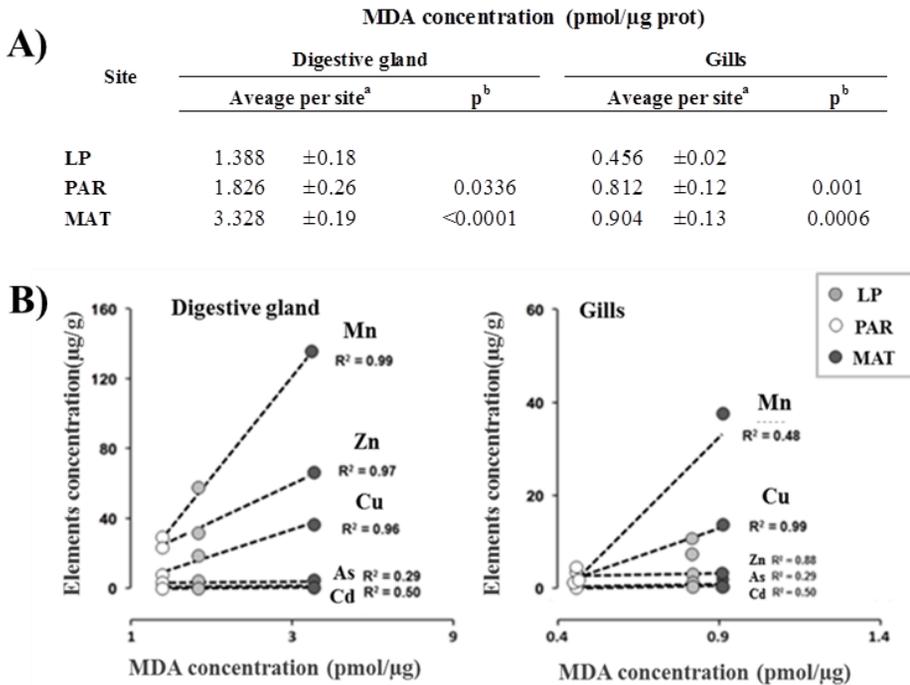


Figure 2.4 (A) MDA concentration in pooled digestive gland or pooled gills. Data (pmol/ μ g) are mean \pm SD from fourteen crayfish at each capture site (LP, PAR and MAT) grouped in three pools per tissue and zone. All measurements were made in triplicate and the determination was carried out at least three times. Statistical significances were determined by an unpaired Student t-test between LP and PAR/MAT. (B) Linear regression comparing MDA concentrations in the digestive glands and the gills, respectively, of *P. clarkii* crayfish captured at LP, PAR and MAT, with the element concentration data measured in the same samples (Fig. 1.1, Chapter 1). Determination was performed with the software XLSTAT v. 2015.2.02 (Addinssoft).

Estos resultados confirman que los animales de las zonas contaminadas PAR y MAT están sometidos a una situación de estrés oxidativo, causada, al menos en parte, por la bioacumulación de metales pesados. Asimismo, indican que la glándula digestiva, como órgano metabólicamente muy activo y mejor acumulador de metales y es el órgano donde se produce mayor cantidad daño.

2.5. Conclusiones

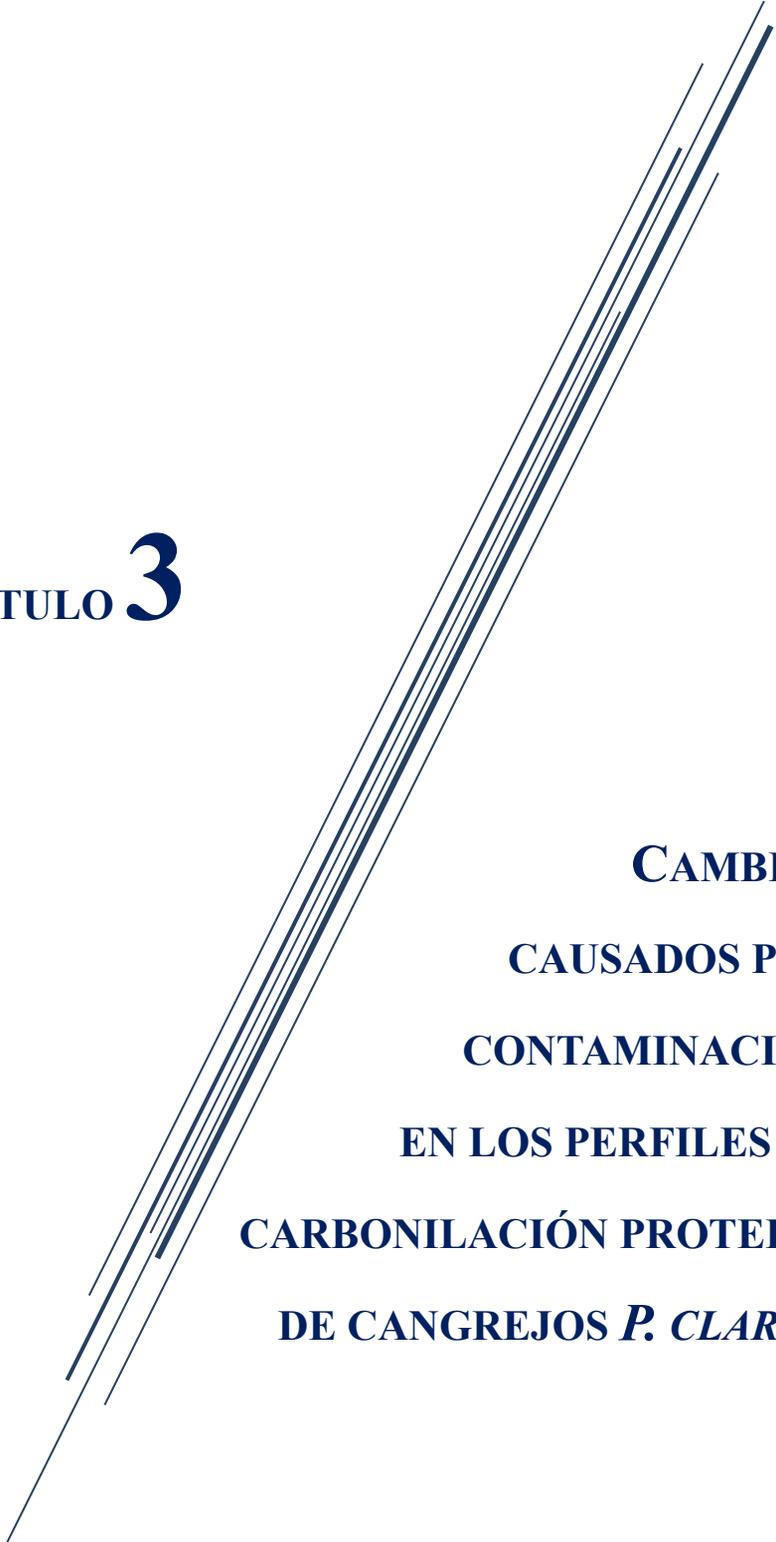
Los niveles de daños oxidativos, medidos como cantidad de MDA en glándula digestiva y branquias de *P. Clarkii*, se correlacionan de modo directo y positivo con la concentración de metales acumulados en esos órganos determinada en capítulos anteriores. Esta afirmación se sustenta en el hecho que los animales de PAR y, especialmente de MAT, presentaron un mayor nivel de MDA que los capturados en LP y en que fue en la glándula digestiva donde se detectó la mayor acumulación de metales, siendo este órgano el que también presentó el mayor nivel de oxidación lipídica.

En ambos órganos, glándula digestiva y branquias, los metales esenciales Mn, Zn y Cu mostraron una correlación más alta con los niveles de MDA, ratificando la idea de que los animales de PAR y MAT habían perdido totalmente el control sobre sus concentraciones intracelulares de estos metales esenciales, lo que habría permitido que se acumulasen a niveles tóxicos, provocando daños debido a su carácter prooxidante.

2.6. Referencias

1. Wei, K.; Yang, J., Oxidative damage induced by copper and beta-cypermethrin in gill of the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. *Ecotox Environ Safe* 2015, *113*, , 446-453.
2. Gall, J.; Boyd, R.; Rajakaruna, N., Transfer of heavy metals through terrestrial food webs: a review. *Environ Monit Assess* 2015, *187*, (4), 1-21.
3. Repetto, M. G.; Ferrarotti, N. F.; Boveris, A., The involvement of transition metal ions on iron-dependent lipid peroxidation. *Arch Toxicol* 2010, *84*, (4), 255-62.
4. Halliwell, B.; Gutteridge, J. M., Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J.* (1984), *219*, (1), 1-14.
5. Repetto MG; Ferrarotti NF; A., B., Lipid Peroxidation: Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination In Lipid Peroxidation, InTech, Ed. 2012.
6. Yadav, U. C.; Ramana, K. V., Regulation of NF-kappaB-induced inflammatory signaling by lipid peroxidation-derived aldehydes. *Oxid Med Cell Longev* 2013, 2013, 690545.
7. Yadav, U. C. S.; Ramana, K. V., Regulation of NF-B-Induced Inflammatory Signaling by Lipid Peroxidation-Derived Aldehydes. *Oxid Med Cell Longev* 2013, 2013, 11.
8. Schmedes, A.; Hølmer, G., A new thiobarbituric acid (TBA) method for determining free malondialdehyde (MDA) and hydroperoxides selectively as a measure of lipid peroxidation. *J Am Oil Chem Soc* 1989, *66*, (6), 813-817.
9. Spickett, C. M.; Wiswedel, I.; Siems, W.; Zarkovic, K.; Zarkovic, N., Advances in methods for the determination of biologically relevant lipid peroxidation products. *Free Radic Res* 2010, *44*, (10), 1172-202.
10. Valko, M.; Morris, H.; Cronin, M. T., Metals, toxicity and oxidative stress. *Current medicinal chemistry* 2005, *12*, (10), 1161-208.
11. Morcillo, P.; Esteban, M. A.; Cuesta, A., Heavy metals produce toxicity, oxidative stress and apoptosis in the marine teleost fish SAF-1 cell line. *Chemosphere* 2015, *144*, 225-233.
12. Beg, M. U.; Al-Jandal, N.; Al-Subiai, S., et al., Metallothionein, oxidative stress and trace metals in gills and liver of demersal and pelagic fish species from Kuwaits' marine area. *Mar Pollut Bull* 201,5 *100*, (2), 662-72.
13. Fatima, M.; Usmani, N.; Firdaus, F., et al., In vivo induction of antioxidant response and oxidative stress associated with genotoxicity and histopathological alteration in two commercial fish species due to heavy metals exposure in northern India (Kali) river. *Comp Biochem Physiol C -Toxicol Pharmacol* 2015, *176*-*177*, 17-30.
14. Nunes, B.; Caldeira, C.; Luisa Pereira, J.; Goncalves, F.; Correia, A. T., Chronic Effects of Realistic Concentrations of Non-essential and Essential Metals (Lead and Zinc) on Oxidative Stress Biomarkers of the Mosquitofish, *Gambusia holbrooki*. *Arch Environ Contam Toxicol* 2015, *69*, (4), 586-95.
15. Soullart, L. Catalytic C-C Bond Activations via Oxidative Addition to Transition Metals. *Chem Rev* 2015, *115*, (17), 9410-64.
16. Hermenean, A.; Damache, G.; Albu, P., et al., Histopathological alterations and oxidative stress in liver and kidney of *Leuciscus cephalus* following exposure to heavy metals in the Tur River, North Western Romania. *Ecotoxicol Environ Saf* 2015, *119*, 198-205.
17. Kim, B. M.; Rhee, J. S.; Jeong, C. B.; Seo, J. S.; Park, G. S.; Lee, Y. M.; Lee, J. S., Heavy metals induce oxidative stress and trigger oxidative stress-mediated heat shock protein (hsp) modulation in the intertidal copepod *Tigriopus japonicus*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2014, *166*, 65-74.
18. Sciskalska, M.; Zalewska, M.; Grzelak, A.; Milnerowicz, H., The influence of the occupational exposure to heavy metals and tobacco smoke on the selected oxidative stress markers in smelters. *Biol Trace Elem Res* 2014, *159*, (1-3), 59-68.
19. Espin, S.; Martinez-Lopez, E.; Jimenez, P.; Maria-Mojica, P.; Garcia-Fernández, A. J., Effects of heavy metals on biomarkers for oxidative stress in Griffon vulture (*Gyps fulvus*). *Environ Res* 2014, *129*, 59-68.
20. Pereira, P.; de Pablo, H.; Guilherme, S.; Carvalho, S.; Santos, M. A.; Vale, C.; Pacheco, M., Metal accumulation and oxidative stress responses in *Ulva* spp. in the presence of nocturnal pulses of metals from sediment: a field transplantation experiment under eutrophic conditions. *Mar Environ Res* 2014, *94*, 56-64.
21. Caudill, S. P., Characterizing populations of individuals using pooled samples. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2010, *20*, (1), 29-37.
22. Diz, A. P.; Truebano, M.; Skibinski, D. O., The consequences of sample pooling in proteomics: an empirical study. *Electrophoresis* 2009, *30*, 2967-75.
23. Gupta, R. C.; Patterson, G. T.; Dettbarn, W. D., Mechanisms involved in the development of tolerance to DFP toxicity. *Fund Appl Toxicol* 1985, *5*, (6 Pt 2), S17-28.
24. Guilherme, S.; Valega, M.; Pereira, M. E.; Santos, M. A.; Pacheco, M., Antioxidant and biotransformation responses in *Liza aurata* under environmental mercury exposure - relationship with mercury accumulation and implications for public health. *Mar Pollut Bull* 2008, *56*, (5), 845-59.

CAPÍTULO 3



**CAMBIOS
CAUSADOS POR
CONTAMINACIÓN
EN LOS PERFILES DE
CARBONILACIÓN PROTEICA
DE CANGREJOS *P. CLARKII***

3.1. Resumen

La cuantificación de grupos carbonilos en proteínas de muestras biológicas se ha convertido en una forma ampliamente usada para determinar la existencia de estrés oxidativo en un organismo. Combinada con técnicas proteómicas, permite la identificación de proteínas específicas que son diana de la carbonilación y cuya actividad resulta irreversiblemente comprometida por ello. El presente estudio considera y compara el estado de carbonilación de las proteínas de glándula digestiva y de branquias de cangrejos rojos de río (*P. clarkii*) capturados en dos sitios contaminados, el arroyo de El Partido (PAR) y los campos de arroz de El Matochal (MAT), localizados en las inmediaciones del PN Doñana pero fuera de sus límites, con animales capturados en LP, la Laguna de Lucio del Palacio, una zona de referencia limpia localizada dentro de la Reserva Biológica¹⁻⁵ (Fig.I, pág.90). Se empleó la técnica de inmunodetección 1-DE Oxyblots para evaluar el estado de estrés oxidativo en glándula digestiva y branquias de *P. clarkii*, mediante la detección y cuantificación de carbonilos proteicos. Este método está basado en la reacción llevada de la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) con los grupos carbonilo, formando un grupo estable de 2,4-dinitrofenilhidrazona, que puede ser cuantificado mediante el uso de anticuerpos específicos.

Se encontraron cambios que afectaron a la abundancia de proteínas y a su estado de oxidación, cuya intensidad dependió del órgano y de la procedencia de los animales. Los cambios afectaron principalmente a cangrejos de la zona MAT y a proteínas de glándula digestiva. Estos resultados concuerdan con la mayor acumulación de metales (Cap. 1) y de daños por peroxidación lipídica, medida como MDA (Cap. 2) en glándula digestiva y, especialmente, en cangrejos de MAT y permiten afirmar que la determinación de los niveles de carbonilación de proteínas es una potente herramienta para evaluar los efectos biológicos de la contaminación, incluso en organismos no modelo, como es el caso de *P. clarkii*. Probablemente los aumentos en abundancia de proteínas detectados reflejen adaptaciones metabólicas que permitan a estos animales soportar una situación crónica de estrés. Asimismo, y dado que además de su abundancia aumenta su oxidación, es posible que estas proteínas, ya de por sí abundantes, actúen “absorbiendo” parte de la oxidación, evitando así daños oxidativos a otras biomoléculas.

3.2. Introducción

La alta concentración de MDA encontrada en glándula digestiva y branquias de cangrejos *P. clarkii* capturados en las zonas contaminadas PAR y, especialmente MAT, descrita anteriormente, sugiere que una considerable producción de ROS podría estar teniendo lugar en estos animales, probablemente relacionada con la acumulación de metales como Mn y Cu (Fig. 1.1, Cap. 1) y sugerida por los niveles de peroxidación lipídica detectada en ellos (Cap. 2). Como componentes mayoritarios de casi todos los sistemas biológicos, las proteínas son dianas preferentes de ROS y otros subproductos secundarios del estrés oxidativo formados *in vivo*, intra- o extracelularmente, pudiendo llegar a absorber un 50-75% de radicales reactivos⁶. Como consecuencia, las proteínas sufren modificaciones oxidativas que pueden dar lugar a cambios estructurales y a pérdida parcial o total de la función proteica. Por ello, se estima que la oxidación proteica juega un importante papel en el proceso de envejecimiento y en el desarrollo de arterosclerosis, cáncer y varias enfermedades neurodegenerativas, incluyendo Alzheimer y Parkinson^(7 y ref. que cita).

La carbonilación es una modificación oxidativa de proteínas que no puede ser eficientemente revertida por las defensas antioxidantes. La carbonilación proteica puede resultar del ataque de ROS a la cadena lateral de ciertos aminoácidos—típicamente Pro, Arg, Lys, y Thr—cuyos grupos son oxidados a aldehídos o cetonas. Los productos carbonilados más comunes formados por estas reacciones de “carbonilación primaria” son los semialdehídos glutámico y el semialdehído aminoadípico, derivados de Arg y Lys, respectivamente. Los grupos carbonilo también pueden ser generados por “carbonilación proteica secundaria” un proceso en el que se le adicionan aldehídos generados, por ejemplo, durante la peroxidación lipídica, como son 4-hidroxinonal (4-HNE), 2-propenal (acroleína), y el propio malondialdehído (MDA). Finalmente, los grupos carbonilo reactivos pueden generarse por reacción del grupo amino de residuos de Lys con azúcares reductores o sus productos de oxidación (glicación/ glicoxidación), que produce compuestos como carboximetil-lisina^(7 y ref. que cita).

La determinación del nivel de grupos carbonilos en las proteínas como biomarcador de estrés oxidativo presenta diversas ventajas en comparación con la cuantificación de otros productos de oxidación, por su temprana formación y estabilidad.

Las técnicas proteómicas son muy adecuadas para la evaluación de sub-proteomas de carbonilación que podrían ser indicativos de contaminación ambiental. La integración de la electroforesis en gel y la metodología de *immunoblot* (Western blot) usando anticuerpos específicos anti-carbonilos, permite la detección de proteínas irreversiblemente carboniladas presentes en mezclas complejas de proteínas ⁸.

La proteómica redox ha sido aplicada con éxito en la evaluación de los niveles de disulfuros y de carbonilación proteica como biomarcadores específicos y tempranos del estrés oxidativo en organismos acuáticos expuestos a diversos estreses ambientales ^(i.e., 9-14). En este trabajo se ha empleado la técnica de inmunodetección 1-DE Oxyblots para evaluar el estrés oxidativo en glándula digestiva y branquias de *P. clarkii*, mediante la detección y cuantificación de carbonilos proteicos. Este método está basado en la reacción de la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) con los carbonilos, formando un grupo estable de 2,4-dinitrofenilhidrazona. El grupo dinitrofenilo formado puede ser detectado y cuantificado espectrofotométricamente, ya que muestra un espectro de absorción característico, con un máximo de absorbancia a 365–375 nm. Sin embargo, la forma más común de detectar y cuantificar los grupos DNP es el uso de anticuerpos anti-DNP disponibles comercialmente, mediante la metodología de Western blotting ⁷ que utilizamos en este trabajo.

Las proteínas de glándula digestiva o branquias de los cangrejos estudiados se separaron por 1-DE (PAGE) usando la tecnología *stain-free* de BioRad y, terminada la electroforesis, los geles se activaron para cuantificar la proteína, se transfirieron a membranas de PVDF y los grupos carbonilos se cuantificaron por *immunoblotting*. Aunque no alcanza la capacidad resolutive de la electroforesis bidimensional, el análisis proteómico mediante 1-D SDS-PAGE constituye una poderosa herramienta para la detección de los efectos de contaminantes sobre los perfiles proteicos en organismos centinela. La tecnología *stain-free* es una química *in-gel* que incorpora un trihalocompuesto, capaz de unirse covalentemente a los residuos de Trp de las proteínas en el gel y emitir una señal fluorescente por irradiación con luz UV. De esta manera, es posible la visualización por fluorescencia de las proteínas tanto en los geles donde se separan como en las membranas a las que se transfieren para hibridarlas con anticuerpos específicos. Esto permite monitorizar fácilmente la calidad de la separación

electroforética de las proteínas, y la eficiencia de la transferencia de proteínas a la membrana. Usando el software adecuado, la cantidad de la proteína total de cada carril o banda del blot (medida como fluorescencia) puede ser calculada y utilizada para normalizar la intensidad de quimioluminiscencia resultante de incubar la membrana con el anticuerpo primario y hacer reaccionar los inmunoprecipitados con anticuerpos secundarios unidos a peroxidasa. De esta manera se establecieron las relaciones de índices de carbonilación, normalizando las intensidades de la inmuno-reactividad 2,4-DNP observada en los 1-DE Oxyblots con la huella proteica digitalizada en las mismas membranas, eliminando la posibilidad de que algunos cambios en la intensidad de la carbonilación se debiesen a cambios en la concentración de proteína. Estos índices de carbonilación, de nuevo evidenciaron una situación de estrés oxidativo en cangrejos procedentes de zonas contaminadas, correlacionada con sus niveles de metales y de MDA.

3.3. Materiales y métodos

3.3.1. Muestras utilizadas.

Se analizaron glándula digestiva y branquias de cangrejos *P. clarkii*. Se prepararon tres mezclas por sitio de muestreo (LP, la zona de referencia y las zonas contaminadas PAR y MAT) mezclando en cada lote cantidades iguales de tejido homogeneizado de 4-5 cangrejos. Las tres mezclas por sitio se consideraron réplicas biológicas en las diferentes determinaciones.

3.3.2. Extracción y aislamiento de proteínas para la determinación carbonilos.

Unos de 100 mg de cada una de las tres réplicas biológicas por zona de muestreo, correspondientes a glándula digestiva o branquias, fueron lisadas en Tris-HCl 20 mM, pH 7,6, con sacarosa 0,5 M; KCl 0,15M; DTT 20 mM; PMSF 1 mM; leupeptina 6 µM e inhibidores de proteasas (Sigma Protease Inhibitor P2714), a razón de 3 mL/g. Los restos celulares se eliminaron con tres centrifugaciones sucesivas (14.000 xg, 10 min). Tras ello, el sobrenadante se trató con benzonasa (500 U/mL) durante 30 min para eliminar ácidos nucleicos. Finalmente, la preparación se ultracentrifugó (100.000 xg, 60 min, 4°C, Optima™ TLX Ultracentrifuge, Beckman, rotor TLA-120.2) para precipitar

los materiales no peptídicos. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford, usando Bradford Reagent (Sigma-Aldrich) y midiendo, en un iMark™ Microplate Reader (BioRad), el cambio de absorbancia a 595 nm que experimenta una solución ácida del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 al unirse a las proteínas. Los datos de absorbancia fueron referidos a una curva patrón de albúmina de suero bovino (Sigma-Aldrich).

3.3.3. Derivatización, separación electroforética e inmunodetección de carbonilos proteicos.

Se usó el kit comercial *Oxyblot Protein Oxidation Detection kit* (Chemicon/Millipore) para evaluar la presencia de grupos carbonilo en las proteínas, de acuerdo con el protocolo del fabricante. Brevemente, los grupos carbonilo de las cadenas laterales de las proteínas se derivatizan a 2,4-dinitrofenilhidrazona por reacción con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (Fig. 3.1). Se usaron 50 µg de proteína por cada muestra y las muestras derivatizadas con el grupo 2,4-dinitrofenol (DNP) se cargaron y separaron en un gel de acrilamida al 12 % (*Mini-Protean® TGX Stain-Free™ precast gels, BioRad*), que lleva un trihalocompuesto para visualizar las proteínas tras ser activado con luz UV. Finalizada la SDS-PAGE (*Mini Protean tetra-cell, BioRad*), los geles se activaron con luz UV y se comprobó la calidad de la separación proteica. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF usando el sistema *Trans-Blot® Turbo™ transfer easystem* (BioRad). Tras la transferencia, las membranas se lavaron en agua destilada y se digitalizó la imagen de las proteínas transferidas usando el *ChemiDoc™ MP Imaging System* (BioRad) para evaluar la calidad de la transferencia. Las membranas se bloquearon con Disolución de Bloqueo/Tampón de Dilución (PBS-T: 1% BSA en un tampón salino de fosfato, pH 7,2-7,5; 0,05% Tween-20) durante 1 hora, en agitación, tras lo que se incubaron durante 1h con el anticuerpo primario, específico para los restos de DNP de las proteínas, diluido 1:150 en Disolución de Bloqueo/Tampón de Dilución. Luego la membrana se lavó con PBS-Tween y se incubó durante 1 h con un anticuerpo conjugado con una peroxidasa de rábano dirigido contra el anticuerpo primario (anticuerpo secundario: de cabra anti-IgG de conejo, diluido 1:300 en Disolución de Bloqueo/Tampón de Dilución). Los inmunoprecipitados se revelaron usando el protocolo de *Clarity™ Western ECL Detection System* (BioRad), consistente en la oxidación de

luminol por H₂O₂, catalizada por la peroxidasa unida al anticuerpo secundario. La captura de imágenes y los análisis densitométricos se llevaron a cabo con ChemiDoc MP Imaging System e ImageLab 4.1 software (BioRad), respectivamente. Para excluir reacciones inespecíficas se llevó a cabo un experimento en el que se omitía la incubación con DNPH.

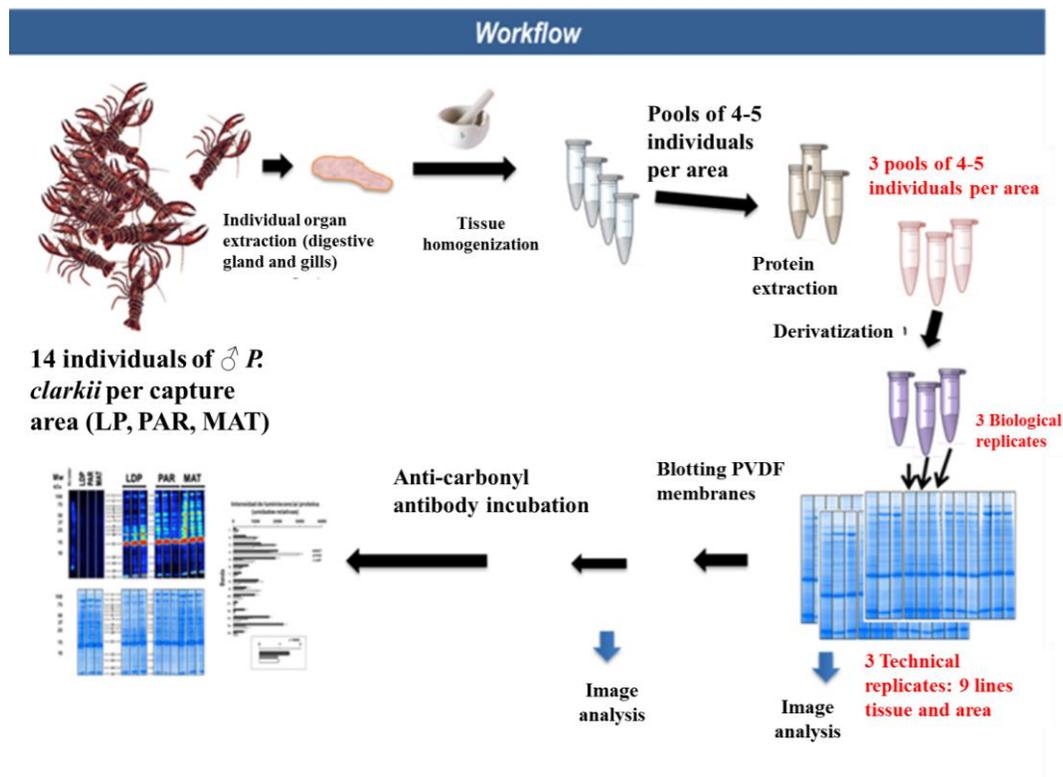


Figure 3.1 General workflow followed to obtain the protein carbonylation profiles.

3.3.4. Análisis estadístico

Los niveles de carbonilación de los controles se compararon con las muestras de las zonas contaminadas con un test *t* de Student, usando el software GraphPad Instant v.3,0.

3.4. Resultados y discusión

3.4.1. Cambios en los perfiles de abundancia proteica en glándula digestiva y branquias de cangrejos *P. clarkii* procedentes de zonas con diferentes niveles de contaminación

El uso de la metodología *stain-free* permite visualizar y cuantificar las bandas obtenidos tras separación electroforética 1-DE de las proteínas y su transferencia a las membranas de PVDF. De esta manera es posible normalizar de una manera bastante exacta la intensidad de la luminiscencia obtenida en los inmunoblots. Pero también permite hacer una estimación de los cambios en los perfiles de abundancia proteica de las muestras comparadas.

La Fig. 3.2 muestra cambios importantes en abundancia para muchas de las bandas de proteínas resueltas por 1-DE al comparar animales LP con aquellos capturados en PAR y MAT, los sitios contaminados. La mayoría de las bandas resueltas en glándula digestiva mostraron cambios en los cangrejos de PAR/MAT en comparación con los especímenes de LP, cambios que fueron, en la mayoría de los casos, incrementos en la cantidad de proteína. La glándula digestiva puede considerarse como el órgano central del metabolismo del cangrejo, dado que lleva a cabo funciones intestinales, hepáticas y pancreáticas. También participa en la respuesta inmune, siendo sus células epiteliales la principal fuente de moléculas inmunes, como lectinas, hemocianina, ferritina, proteínas antibacterianas y antivirales, enzimas proteolíticas y óxido nítrico¹⁵. La glándula digestiva es además un órgano clave en la destoxicación de metales pesados y xenobióticos orgánicos en el cangrejo, mediante la activación de enzimas de destoxicación de Fase I y II, algunas de ellas, probablemente representadas en las bandas de la Fig.3.2.B.

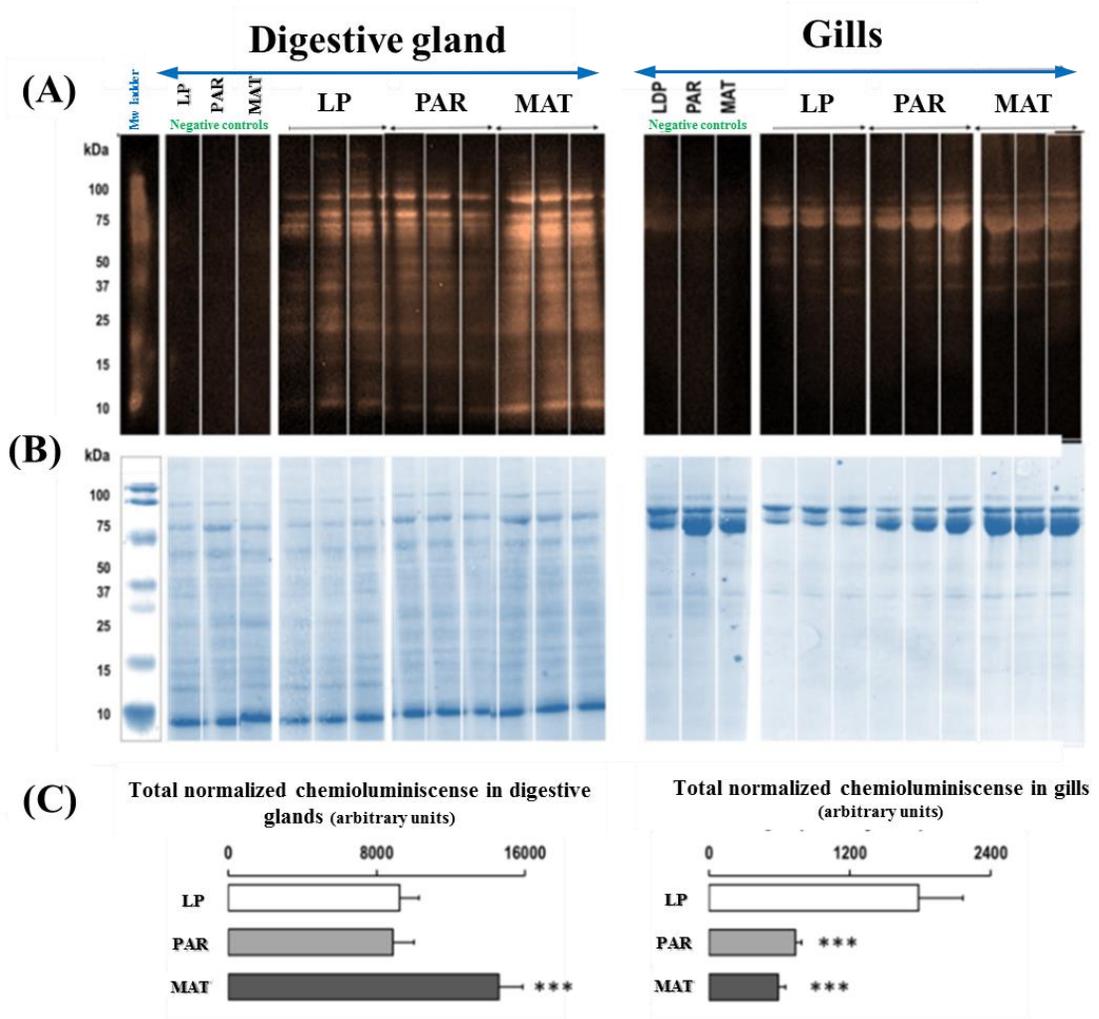


Fig 3.2. Separation via 1-D-SDS-PAGE gel of carbonylated proteins from *P. clarkii* organs. (A) Chemo-luminescence images obtained by immunoreaction of protein carbonyl groups with anti-DNPH antio-dies and detection by incubation with a secondary antibody conjugated to rabbit horseradish. Non-derivatized proteins were included as negative controls. Images were captured with the ChemoDoc MP Imaging system and densitometry performed with the Image Lab 4.1 software (BioRad) (B) UV image of the same membrane, used to normalize the carbonyl groups amount per lane. (C) Total protein carbonylation levels in digestive gland and gills from PAR and MAT crayfish in comparison with LP animals. Data are means \pm SD ($n=3$) of normalized chemioluminescence (arbitrary units). The variability among the replicates was always less than 25%. Statistical significances were determined with a unpaired two-tailed Student's *t*-test and are expressed as *** for $P < 0,001$.

La función de intercambio de gases y nutrientes que tienen las branquias, unida al hecho de su continuo contacto con el medio y a la envoltura mucosa que las recubre para protegerlas del mismo, convierten a este órgano en un importante acumulador de

contaminantes^{16, 17}. En la Fig.1.1 del Cap.1 (pág.103) se mostró la existencia de una concentración de metales en las branquias de cangrejos de PAR y MAT muy superior a la presente en cangrejos de la zona de referencia LP. Es de suponer que los animales expuestos a contaminación pongan en marcha mecanismos que les permitan hacer frente a esta situación de estrés oxidativo causada por los metales^{16, 17}, lo que ha de traducirse en cambios en sus perfiles proteicos. El perfil de expresión proteica de las branquias de los cangrejos mostró prevalencia de dos bandas, identificadas como hemocianinas en trabajos previos de nuestro grupo (resultados no publicados). La hemocianina es la proteína que se encarga del transporte de O₂ en muchos moluscos y artrópodos. Presenta dos átomos de cobre en su centro activo, lo que le da color azul cuando está oxigenada. La medida de metales en los órganos de los cangrejos (Fig.1.1, pág. 103) indicó también una fuerte acumulación de Cu en las branquias de los animales PAR y MAT y trabajos previos de nuestro grupo han demostrado una significativa correlación positiva entre las concentraciones de Cu en glándula digestiva de *P. clarkii* y los niveles de transcrito codificantes de hemocianinas¹⁸. Los resultados aquí presentados corroboran estos estudios previos y extienden tal correlación a nivel de proteína.

3.4.2. Cuantificación de la tasa de carbonilación en glándula digestiva y branquias de cangrejos *P. clarkii* procedentes de zonas con diferentes niveles de contaminación

La tasa de carbonilación se cuantificó como la media de las tres réplicas por órgano y zona, tras normalizar la intensidad de quimioluminiscencia de los inmunoprecipitados anti-2,4-DNP con la intensidad de proteína total del carril, medidos ambos parámetros en la misma membrana, para reducir la posibilidad de que los cambios de intensidad de carbonilación se debieran a cambios en la cantidad de proteína. La Fig. 3.2 A y C muestran que el daño oxidativo total de proteínas varió en función del órgano analizado y del sitio de muestreo de los cangrejos. No se detectó señal de quimioluminiscencia en los controles con proteínas no derivatizadas.

La glándula digestiva presentó más proteínas carboniladas que las branquias, niveles que fueron muy altos en los cangrejos de MAT. Como se ha discutido, la glándula digestiva es uno de los principales órganos encargados de la destoxicación de metales pesados y xenobióticos orgánicos, mediante la activación de enzimas de destoxicación

de Fase I y II, en *P. clarkii*. En capítulos anteriores se encontró que, además, es el órgano donde se presenta mayor acumulación de metales (Fig. 1.1, Cap. 1, pág.103) y donde se midieron los mayores niveles de peroxidación de lípidos, así como que los animales de MAT fueron los más afectados con valores de MDA que casi duplicaron a los de PAR (Fig. 2.4, Cap. 2, Pág.125). También fueron los animales de MAT los que presentaron una diferencia más clara en la abundancia de proteínas respecto a los controles y, según vemos en la Fig. 3.2, los que presentaron mayor aumento en la tasa de carbonilación proteica.

En las branquias los valores normalizados de proteínas carboniladas fueron menores en los organismos capturados en las zonas contaminadas que en los animales de referencia a pesar del fuerte incremento en la quimioluminiscencia total (Fig. 3.2). Esto es, probablemente debido al gran incremento en la abundancia de proteínas mayoritarias, en este caso, de hemocianinas, que podrían actuar como sumideros de ROS que protegen a otras biomoléculas de ser oxidadas, jugando un papel similar al descrito para la tubulina^{19,20} o para la albúmina plasmática de mamíferos²¹.

3.5. Conclusiones

Los *P. clarkii* capturados en zonas del entorno de Doñana con distintos niveles de contaminación mostraron cambios en los perfiles de expresión proteicos, probablemente para aumentar en la célula la cantidad de proteínas que combaten la situación de estrés y permiten al animal adaptarse a nuevas condiciones metabólicas. Los cambios afectaron principalmente a cangrejos de la zona MAT y a las proteínas de glándula digestiva.

Esas proteínas que aumentaron en los animales sometidos a condiciones ambientales adversas probablemente sean también capaces de absorber buena parte de la oxidación y evitar así daños oxidativos a otras biomoléculas, ya que se observaron incrementos en sus niveles de carbonilación proteica en los órganos estudiados. Estos resultados concuerdan con la mayor acumulación de metales y de daños por peroxidación

lipídica, medida como MDA, en glándula digestiva y especialmente en cangrejos de MAT descritos en los Capítulos 1 y 2.

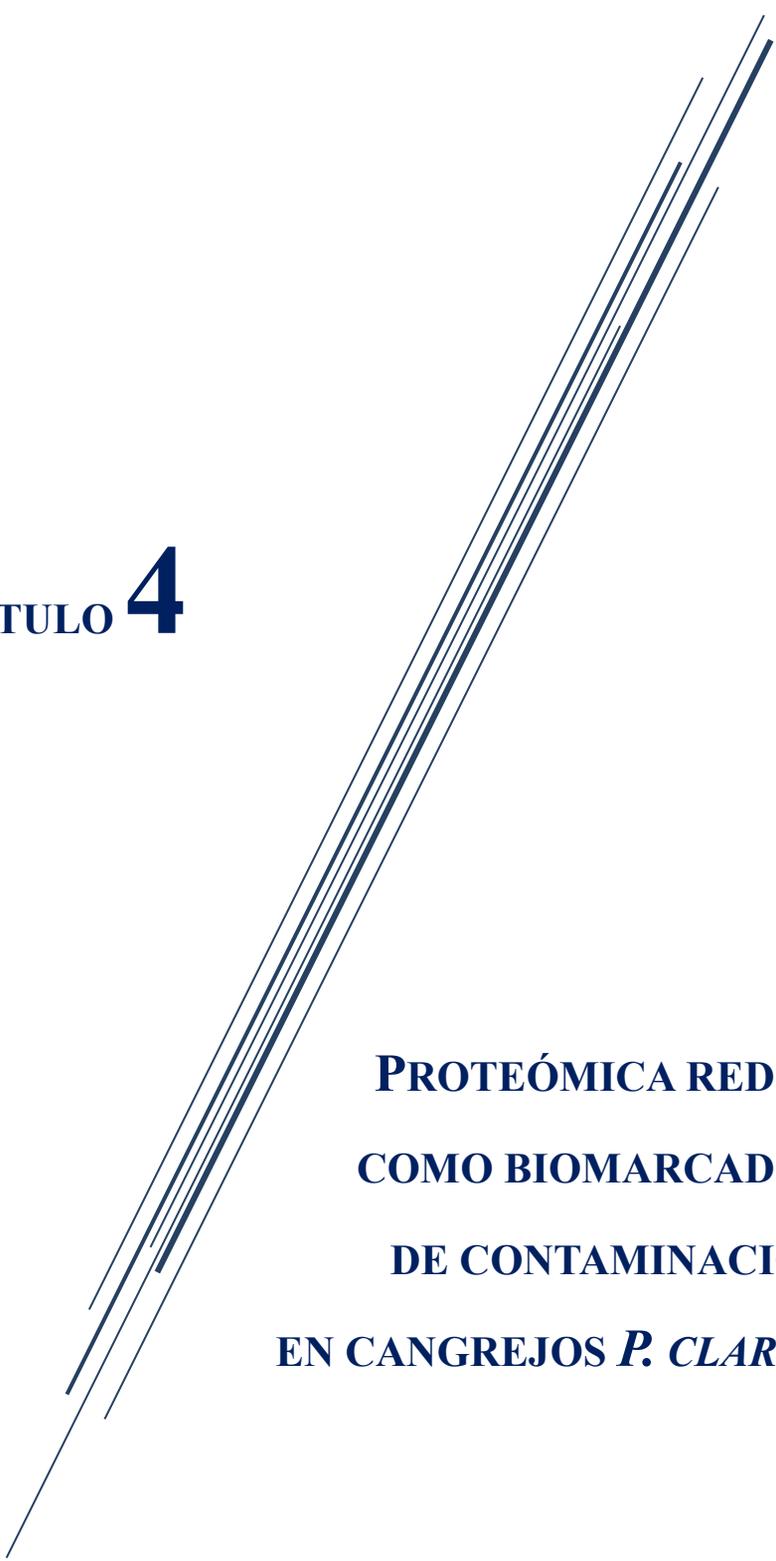
Dados los resultados obtenidos, se puede afirmar que la determinación de los niveles de carbonilación de proteínas es una potente herramienta para la evaluación de los efectos biológicos de la contaminación, incluso en organismos, como es el caso de *P. clarkii*, para los que no se tiene mucha información proteómica en las bases de datos.

3.6. Referencias

1. Pueyo, C.; Gómez-Ariza, J.-L.; Bello-López, M.-A.; Fernández-Torrez, R.; Abril, N.; Alhama, J.; García-Barrera, T.; López-Barea, J., New methodologies for assessing the presence and ecological effects of pesticides in Doñana National Park (SW Spain). In *Pesticides in the Modern World - Trends in Pesticides Analysis*, Stoytcheva, M., Ed. InTech: RijeKa, Croatia, 2011; pp 167-196.
2. Abril, N.; Chicano-Galvez, E.; Michan, C.; Pueyo, C.; Lopez-Barea, J., iTRAQ analysis of hepatic proteins in free-living *Mus spretus* mice to assess the contamination status of areas surrounding Donana National Park (SW Spain). *Sci Total Environ* 2015, 523, 16-27.
3. Abril, N.; Osuna-Jimenez, I.; Frenandez-Cisnal, R.; Chicano-Galvez, E.; Prieto-Alamo, M. J.; Alhama-Carmona, J.; Gomez-Ariza, J. L.; Lopez-Barea, J.; Pueyo, C., Integrating omic technologies into environmental risk assessment. *FEBS Journal* 2012, 279, 227-227.
4. Abril, N.; Ruiz-Laguna, J.; Garcia-Sevillano, M. A.; Mata, A. M.; Gomez-Ariza, J. L.; Pueyo, C., Heterologous Microarray Analysis of Transcriptome Alterations in *Mus spretus* Mice Living in an Industrial Settlement. *Environ Sci Technol* 2014, 48, (4), 2183-92.
5. Abril, N.; Ruiz-Laguna, J.; Osuna-Jimenez, I.; Vioque-Fernández, A.; Fernández-Cisnal, R.; Chicano-Galvez, E.; Alhama, J.; Lopez-Barea, J.; Pueyo, C., Omic approaches in environmental issues. *J Toxicol Environ Health A* 2011, 74, (15-16), 1001-19.
6. Davies, M. J.; Fu, S.; Wang, H.; Dean, R. T., Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Radical Bio Med* 1999, 27, (11-12), 1151-1163.
7. Cabiscol, E.; Tamarit, J.; Ros, J., Protein carbonylation: Proteomics, specificity and relevance to aging. *Mass Spectrom Rev* 2014, 33, (1), 21-48.
8. Dorts, J.; Kestemont, P.; Marchand, P. A.; D'Hollander, W.; Thezenas, M. L.; Raes, M.; Silvestre, F., Ecotoxicoproteomics in gills of the sentinel fish species, *Cottus gobio*, exposed to perfluorooctane sulfonate (PFOS). *Aquat Toxicol* 2011, 103, (1-2), 1-8.
9. Dorts, J.; Silvestre, F.; Tu, H. T.; Tyberghein, A.-E.; Phuong, N. T.; Kestemont, P., Oxidative stress, protein carbonylation and heat shock proteins in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, following exposure to endosulfan and deltamethrin. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2009, 28, (2), 302-310.
10. Dowling, V.; Hoarau, P. C.; Romeo, M.; O'Halloran, J.; van Pelt, F.; O'Brien, N.; Sheehan, D., Protein carbonylation and heat shock response in *Ruditapes decussatus* following p,p'-dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) exposure: A proteomic approach reveals that DDE causes oxidative stress. *Aquat. Toxicol.* 2006, 77, (1), 11-18.
11. Dowling, V. A.; Sheehan, D., Proteomics as a route to identification of toxicity targets in environmental toxicology. *Proteomics* 2006, 6, (20), 5597-604.
12. Sellami, B.; Khazri, A.; Mezni, A.; Louati, H.; Dellali, M.; Aissa, P.; Mahmoudi, E.; Beyrem, H.; Sheehan, D., Effect of permethrin, anthracene and mixture exposure on shell components, enzymatic activities and proteins status in the Mediterranean clam *Venerupis decussata*. *Aquat. Toxicol.* 2015, 158, 22-32.
13. Wei, K.; Yang, J., Oxidative damage of glándula digestiva induced by pollution depresses humoral immunity response in the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. *Fish Shellfish Immunol.* 2015, 43 (2), 510-519.
14. Wei, K.; Yang, J., Oxidative damage induced by copper and beta-cypermethrin in gill of the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. *Ecotoxicol Environ Saf* 2015, 113, (0), 446-453.
15. Röszer, T., The invertebrate midintestinal gland ("glándula digestiva") is an evolutionary forerunner in the integration of immunity and metabolism. *Cell Tissue Res* 2014, 358, (3), 685-695.
16. Anderson, M. B.; Reddy, P.; Preslan, J. E.; Fingerma, M.; Bollinger, J.; Jolibois, L.; Maheshwarudu, G.; George, W. J., Metal accumulation in crayfish, *Procambarus clarkii*, exposed to a petroleum-contaminated Bayou in Louisiana. *Ecotoxicol Environ Saf* 1997, 37, (3), 267-72.
17. Alcorlo, P.; Otero, M.; Crehuet, M.; Baltanas, A.; Montes, C., The use of the red swamp crayfish

- (*Procambarus clarkii*, Girard) as indicator of the bioavailability of heavy metals in environmental monitoring in the River Guadiamar (SW, Spain). *Sci Total Environ* 2006, 366, (1), 380-90.
18. Osuna-Jiménez, I.; Abril, N.; Vioque-Fernández, A.; Gómez-Ariza, J. L.; Prieto-Álamo, M.-J.; Pueyo, C., The environmental quality of Doñana surrounding areas affects the immune transcriptional profile of inhabitant crayfish *Procambarus clarkii*. *Fish Shellfish Immunol.* 2014, 40, (1), 136-145.
19. Landino, L. M.; Iwig, J. S.; Kennett, K. L.; Moynihan, K. L., Repair of peroxynitrite damage to tubulin by the thioredoxin reductase system. *Free Radic Biol Med* 2004, 36, (4), 497-506.
20. Landino, L. M.; Moynihan, K. L.; Todd, J. V.; Kennett, K. L., Modulation of the redox state of tubulin by the glutathione/glutaredoxin reductase system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004, 314, (2), 555-560.
21. Taverna, M.; Marie, A. L.; Mira, J. P.; Guidet, B., Specific antioxidant properties of human serum albumin. *Ann Intensive Care* 2013, 3, (1), 4.

CAPÍTULO 4



**PROTEÓMICA REDOX
COMO BIOMARCADOR
DE CONTAMINACIÓN
EN CANGREJOS *P. CLARKII***

4.1. Resumen

Según los estudios mostrados en Capítulos previos de esta trabajo, la presencia de metales (Cap. 1) en el medio y su biocumulación en glándula digestiva y branquias de cangrejos *P. clarkii*, genera una situación de estrés oxidativo en los tejidos que provoca daños a lípidos (Cap. 2). Las proteínas son también potenciales dianas de ROS (Cap. 3) encontrándose elevados niveles de carbonilación en las proteínas de los cangrejos de zonas contaminadas. Especialmente vulnerables por sus propiedades electrofílicas son los tioles de los residuos de Cys. Estos residuos Cys participan en el ciclo de S-tiolación/destiolación, oxidándose por acción de ROS a disulfuros mixtos, formando puentes disulfuro entre ellos o con glutatión, lo que conlleva un descenso en los niveles de ROS (se estima que hasta un 70%). La S-tiolación protege a los tioles de las proteínas de oxidaciones irreversibles durante el estrés oxidativo, aunque también produce modificaciones redox y la alteración de la estructura de la proteína, su función o su papel en la señalización redox.

En este estudio se aplica la proteómica redox, mediante el marcaje fluorescente de los grupos tioles oxidados y la separación 2D de las proteínas, para la detección, cuantificación e identificación del estado de oxidación de tioles en proteínas de cangrejos *P. clarkii* de las zonas contaminadas de PAR, MAT y ROC. Las proteínas diferencialmente oxidadas identificadas ponen de manifiesto procesos afectados en estos animales debido al estrés oxidativo causado por los contaminantes. Así, indican una inducción de estrés del retículo endoplásmico (ER), con la consiguiente alteración de la función de muchas proteínas debido a su mal plegamiento o, diversas respuestas relacionadas con la inflamación y la respuesta inmune. Por otra parte, la oxidación reversible de tioles de algunas proteínas podría constituir un mecanismo temprano de respuesta que permite a los animales sobrevivir bajo condiciones de estrés oxidativo en zonas contaminadas. En este sentido, se observó una adaptación en el metabolismo energético hacia una glucólisis aerobia (efecto Warburg) para permitir la supervivencia celular en condiciones en las que la función de las mitocondrias se ve comprometida por daños oxidativos a lípidos de la célula.

4.2. Introducción

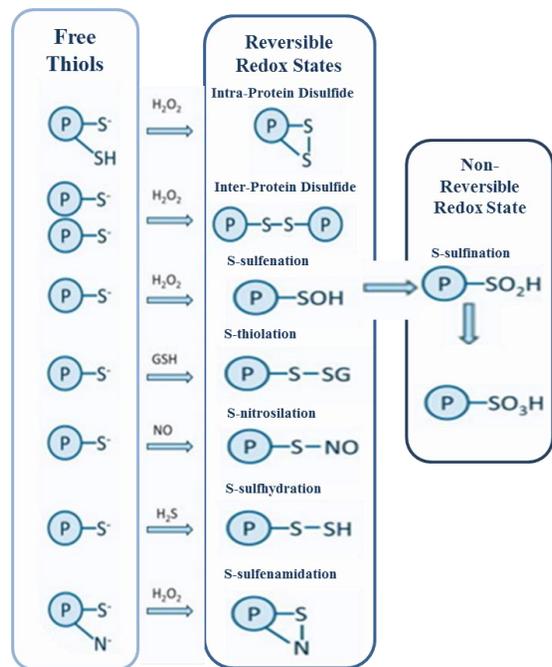
En los sistemas biológicos, los metales pesados afectan a orgánulos y componentes celulares como membranas plasmáticas, mitocondrias, lisosomas, retículo endoplásmico, núcleo y a muchas enzimas implicadas en el metabolismo, la detoxificación y la reparación de daños. La toxicidad de estos elementos está mediada en muchas ocasiones por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y estrés oxidativo. En secciones anteriores (Cap. 1), se ha determinado la presencia de metales pesados en cantidades superiores en los sitios PAR y MAT que en la zona usada como referencia, LP. Estos metales se acumulan directamente en glándula digestiva y branquias de cangrejos *P. clarkii* que habitan estas zonas en concentraciones que mostraron correlación directa con el contenido en metales en los sedimentos de la zona. En consecuencia, estos animales de zonas contaminadas presentaron un considerable daño oxidativo en lípidos (Cap. 2) y proteínas (Cap. 3), determinado mediante cuantificación de productos que surgen (MDA) o indican (carbonilación) daños irreversibles a estas biomoléculas.

En general, el término estrés oxidativo sugiere que hay un exceso de ROS que tienen un impacto negativo sobre la célula y sus funciones. Sin embargo, está bien demostrado que las ROS tiene funciones biológicas que no son nocivas y que pueden ser cruciales para el mantenimiento de la homeostasis o actuar en rutas de señalización protectoras. Estas respuestas biológicas dirigidas por cambios en la concentración intracelular de ROS se conocen como señalización redox. Así, una situación de estrés oxidativo tiene también como consecuencia la alteración de estas cruciales rutas de señalización redox, con lo cual interfieren con rutas reguladoras clave para el mantenimiento de la salud ¹.

La Cys es un importante aminoácido implicado en catálisis, en señalización redox, el plegamiento proteico y el tráfico de proteínas, desempeñando papeles fundamentales en cuanto a la estructura, flexibilidad y propiedades mecánicas de estas biomoléculas ². Esto es debido a que, en ambientes oxidantes, los átomos de azufre de los grupos tiólicos (-SH) de las cadenas laterales de las Cys pueden formar puentes disulfuros (-S-S-), creando un enlace covalente pero reversible, que puede romperse en presencia de un agente reductor. Por ello, los puentes disulfuro proporcionan una estabilidad a la

estructura plegada de las proteínas ajustable a las circunstancias y que les permite funciones mecánicas específicas, como el de actuar de sensores, conmutadores y señalizadores moleculares. Desde una perspectiva físico-química, los contactos intermoleculares formados mediante los átomos de azufre controlan la elasticidad de las proteínas ^(2 y ref. que cita). El grupo tiol de la cadena lateral de la Cys puede asimismo reaccionar con ROS y con otros grupos tiólicos, como los del GSH, generando en las proteínas modificaciones post-traduccionales (PTM) oxidativas (Fig. 4.1) que en algunos casos regulan funcionalmente a la proteína.

Figure 4.1- Summary of the oxidative modifications in protein thiols. Protein thiols can experience a variety of oxidative modifications, including reversible (intra-protein disulfides, inter-protein disulfides, S-sulfenation, S-nitrosation, S-thiolation, S-sulfhydration, S-sulfenamitation) and non-reversible hyper-oxidized (S-sulfination, S-sulfonation) redox states. Some redox states, such as S-sulfenation, S-nitrosation or S-sulfhydration, can be intermediates that transition to disulfides. Prolonged exposure to oxidants can result in irreversible modifications such as S-sulfination or S-sulfonation.



En principio, éste podría parecer un mecanismo poco probable de regulación de la función proteica, ya que se supone que una elevación en los niveles de ROS oxidaría de manera no selectiva todos los tioles proteicos, potencialmente causando cambios funcionales descoordinados y desencadenando una patología. Sin embargo, esto no es así, ya que la modificación oxidativa de los tioles proteicos por ROS ocurre de un modo altamente selectivo. Las ROS reaccionan preferentemente con tiolatos nucleofílicos desprotonados (-S-) con una baja constante de disociación ³. La mayoría de los residuos tiólicos, con valores de pKa de 8-9, están casi totalmente protonados a pH fisiológico, lo

que los hace poco reactivas con los oxidantes y, por tanto, poco susceptibles de modificaciones oxidativas que sirvan para la regulación de la función proteica. El pKa de los grupos tioles se ve disminuido por la proximidad de aminoácidos como Hys, Lys o Arg, capaces de aceptar H^+ o por la presencia de oxidasas. Los grupos tiólicos de ciertas proteínas (peroxirredoxinas, tiorredoxinas) son especialmente susceptibles de oxidación ($pK_a \approx 5,5$), y evitan el acceso de las ROS a otros tioles, que solo resultarían oxidados en un paso posterior ¹ (Fig. 4.2)

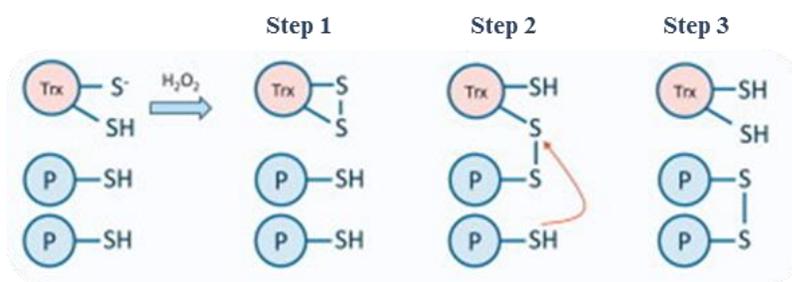


Figure 4.2. Alternate potential mechanisms leading to disulfide formation. A protein thiol may be oxidized via another redox sensitive protein, in this example thioredoxin (Trx), first becoming oxidized. Trx has a lower pKa than most other proteins and so is more likely to be preferentially oxidized by H_2O_2 to form an intra-molecular disulfide. The Trx disulfide is then attacked by a thiol of a second protein with a higher pKa which is then reduced by a second thiol. Trx essentially picks-up and passes on the oxidation state to the less reactive target protein thiol.

La oxidación selectiva de cisteínas y la consecuente formación reversible de disulfuros, se considera, por esto, una PTM con propiedades únicas. Los avances metodológicos están permitiendo un cada vez mayor conocimiento de las proteínas que se modifican por oxidación. Se sabe ya que muchas las proteínas sufren modificaciones redox de algunas de sus Cys para controlar su actividad: factores de transcripción, canales iónicos, proteínas transportadoras mitocondriales y proteínas de citoesqueleto. En algunos casos estas modificaciones redox activan la proteína, como es el caso de las kinasas PKC (protein kinase C), Src (sarcoma kinase) o EGFR (epidermal growth factor receptor) y, en otros, hacen que pierdan su funcionalidad, como es el caso de la kinasa MKK4 (Mitogen-activated protein kinase kinase 4) o de las fosfatasa PTP1B (protein-tyrosine phosphatase 1B) o PP2A (Protein phosphatase 2) ^(4 y ref. que cita).

Los métodos para la detección, cuantificación e identificación de tioles proteicos sensibles a oxidación han sido objeto de varias revisiones^{1, 5-13}. Estos métodos conllevan el marcaje diferencial de los tioles y disulfuros proteicos, seguido de una separación cromatográfica o electroforética de las proteínas. Finalmente, las proteínas se identifican por espectrometría de masas, pudiendo saberse el estado redox de sus residuos de Cys. Los avances en las metodologías proteómicas han llevado a la publicación de un número creciente de trabajos que evalúan el estado de los tioles proteicos en células sometidas a estrés oxidativo¹⁴⁻¹⁸. El uso de N-etilmaleimida (NEM) o iodoacetamida (IAM) permite bloquear los tioles nativos reducidos lo que evita su oxidación durante el proceso de extracción de proteínas. Cuando se combina este bloqueo con un paso posterior de reducción de los disulfuros nativos, éstos pueden ser marcados fluorescentemente con 5-iodoacetamidofluoresceína (IAF) y se pueden así detectar y cuantificar. Este método detecta solo disulfuros nativos, tanto los inter/intra proteicos (PS-SP) como los disulfuros mixtos con glutatión (PS-SG)^{8, 19-22}. Las proteínas con tioles sensibles a modificaciones redox pueden ser identificadas por espectrometría de masas (MS), obteniéndose información del estado de oxidación de grupo tiólicos y/o de la capacidad de oxidación reversible de residuos Cys específicos^{9-13, 19, 23}.

Las metodologías proteómicas que evalúan modificaciones proteicas causadas por el estrés oxidativo que originan muchos contaminantes, podrían ser usados como nuevos biomarcadores de contaminación, y proporcionarían información sobre los mecanismos de toxicidad de estos contaminantes^{24 25}. Este trabajo tuvo como objetivo la validación de la proteómica redox como biomarcador que detectara los efectos biológicos de las actividades antropogénicas sobre el ecosistema acuático de Doñana y sus alrededores usando el cangrejo *P. clarkii* como bioindicador. Los resultados demuestran sin duda la validez de esta herramienta para este fin. Las proteínas con tioles oxidados identificadas proporcionan información sobre rutas y procesos metabólicos afectados por contaminantes como los metales que desencadenan estrés oxidativo. El uso de la espectrometría de masas ha permitido identificar modificaciones en tioles específicos sobre residuos Cys vulnerables, que son importantes para comprender la respuesta a estrés y la señalización celular por redox.

4.3. Materiales y métodos

4.3.1. Muestras utilizadas

Se analizaron glándulas digestivas de cangrejos *P. clarkii* capturados en las zonas mencionadas en capítulos anteriores y otros procedentes de la zona ROC, situada en el curso medio del arroyo de la Rocina, considerada muy contaminada según resultados previos²⁶. El estudio se hizo agrupando cantidades iguales de tejido de 14 ejemplares de *P. clarkii* capturados en cada una de las zonas (LP, PAR, MAT, ROC) en un único lote a fin de reducir la carga de trabajo y el coste económico.

4.3.2. Marcaje fluorescente de tioles nativos oxidados reversiblemente en proteínas de glándula digestiva de *P. clarkii*.

Se prepararon extractos a partir de 200 mg de tejido, que se homogeneizó en tres volúmenes de tampón HEPES 40 mM a pH 7,4 con NaCl 50 mM, EDTA 1 mM, fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) 1 mM, leupeptina 6 μ M y 100 μ L/mL inhibidores de proteasas (Sigma P2714) al que se añadió iodoacetamida (IAM) 200 mM para bloquear los grupos tiólicos nativos libres (reducidos). Los extractos se incubaron a 37°C durante 15 min. y se eliminaron los residuos celulares por centrifugación (Eppendorf 5415 R, 10 min, 16.000 g). Posteriormente, los sobrenadantes se centrifugaron de nuevo (Beckman Optima TLX, 1 h, 100.000 \times g) para obtener la fracción citosólica. Para asegurar la completa solubilización de las proteínas y el bloqueo total de los grupos tioles reducidos los extractos se incubaron con CHAPS 1% w/v durante 30 min.

Cada muestra se separó en tres réplicas técnicas y se cuantificó la cantidad de proteínas en cada una de ellas por el método de Bradford (BioRad Protein Assay). A continuación, se precipitaron las proteínas con 2-D Clean-Up Kit (GE Healthcare) para eliminar el exceso de IAM. Las proteínas se resuspendieron en 100 μ L de tampón HEPES 40 mM con NaCl 50 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM y CHAPS al 1%. Los tioles oxidados (disulfuros PS-SP y PS-SG) se redujeron añadiendo tributilfosfina (TBP) a una concentración final de 1 mM e incubando la mezcla a 37°C durante 30 min. Seguidamente se añadió 5-iodoacetamido-fluoresceína (IAF) a una concentración final de 200 μ M para marcar los tioles ahora reducidos. Se incubaron las mezclas otros 30 min en oscuridad. Todos los pasos siguientes también se realizaron en oscuridad. Para eliminar el exceso de IAF y sales, las proteínas se precipitaron de nuevo con 2-D Clean-Up Kit (GE

Healthcare), y se resuspendieron en 50 μ L de tampón Tris-HCl 30mM pH 8,5 con urea 8M, 4% CHAPS, 1% IPG buffer pH 3–10 (GE Healthcare Life Sciences) y DTT 60 mM.

4.3.3. Separación de las proteínas marcadas con IAF por 2-DE-PAGE

Las proteínas marcadas con IAF se separaron electroforéticamente mediante 2-DE-PAGE. Brevemente, 100 μ g de proteínas marcadas se cargaron en el extremo catódico de tiras *Immobiline DryStrips* (pH 4–7, 24 cm; GE Healthcare) rehidratadas. Tras 6 h de rehidratación activa (50 V), el IEF se realizó (20 °C, 75 μ A/tira) en una Protean IEF cell (BioRad) a 500 V, 1.000 V, 2.000 V, 4.000 V, 6.000 V y 8.000 V (cada uno durante 90 min) y 8.000 V (hasta alcanzar 57.000 Vh). Para la segunda dimensión, se sumergieron las tiras durante 15 min en tampón con IAM (Tris-HCl 50 mM pH 8.8, urea 6 M, glicerol 30%, SDS 2%, DTT 50 mM con IAM 250 mM). Las tiras se cargaron en geles SDS-PAGE al 12.5 % (24 cm) y las proteínas se separaron a 20°C en una *DodecaCell Plus* (BioRad) a 3 W/gel. Como estándares se usaron marcadores *Sigma Marker wide range* (S8445), que se redujeron con TBP 1 mM y CHAPS al 1% y se marcaron con IAF (200 μ M) antes de cargarlos.

Terminada la electroforesis, los geles se escanearon con un *FX Molecular Imager* (BioRad) con longitudes de onda de 488 nm para la excitación y 530 nm de emisión/detección para detectar las proteínas marcadas con IAF. Los geles se trataron posteriormente con SYPRO Ruby para teñir las proteínas totales y se volvieron a escanear (excitación 532 nm; emisión/detección 555 nm). Todas las imágenes y determinaciones de proteínas oxidadas se analizaron con el software PDQuest® (BioRad). Para garantizar la bondad de las comparaciones, las imágenes fluorescentes se capturaron con igual sensibilidad y se procesaron utilizando los mismos valores para los parámetros del panel de control del software PDQuest®.

Ambos tipos de imagen (IAF y SYPRO Ruby) se exportaron del software PDQuest® en formato TIFF y se colocaron en diferentes capas de un mismo archivo Adobe Photoshop de forma que coincidieran exactamente. Los marcadores de peso molecular, cargados en ambos extremos del gel, se utilizaron como referencia y puntos de anclaje para determinar los puntos exactos de coincidencia de las dos imágenes de cada gel. Esto permitió determinar la posición exacta de las proteínas con tioletes

diferencialmente oxidados en los geles teñidos con SYPRO Ruby, asegurando la precisión necesaria en la escisión de los spots en el análisis de MS.

4.3.4. Análisis de conglomerados o cluster

Para el análisis mediante agrupamiento de las cinéticas de las distintas manchas estudiadas mediante el software PDQuest® se usó el software bioinformático denominado Genesis (http://genome.tugraz.at/genesisclient/genesisclient_description.shtml) diseñado en principio para microarrays, pero también aplicable en proteómica. Tras leer los datos desde ficheros planos delimitados por tabulaciones, Genesis genera una representación en forma de matriz, con las intensidades de las manchas organizadas en filas y las repeticiones de estas manchas en columnas. Además de la normalización efectuada en PDQuest®, las intensidades de las manchas volvieron a ser normalizadas con las herramientas de Genesis. Se llevó a cabo un tratamiento de los datos con la correlación tipo Pearson y posteriormente se llevó a cabo un análisis de agrupación jerárquica para intensidad de los 35 spots de proteínas con tioles diferencialmente oxidados, analizando los tres geles correspondientes a las muestras de los cuatro sitios estudiados.

4.3.5. Identificación de proteínas por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF

La escisión de los spots de interés, su digestión y análisis por espectrometría de masas, se llevó a cabo en el Servicio de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba. La escisión se realizó mediante el robot *Investigator™ ProPic* (Genomic Solutions). Los fragmentos escindidos se destiñeron (100 mM de bicarbonato amónico y 40% v/v acetonitrilo), se deshidrataron (acetonitrilo 100%) y secaron y se digirieron con tripsina. Los péptidos resultantes se purificaron en una estación de PrepII Pro (Genomic Solutions) con una microcolumna C18 (ZipTip, Millipore) y se cargaron directamente en las placas MALDI usando ácido α -ciano hidroxycinnámico como matriz.

El análisis MS se realizó en un MALDI-TOF/TOF (4800 Proteomics Analyzer, Applied Biosystems) en un rango m/z de 800 a 4000 y a 20 kV de voltaje creciente. Los espectros se calibraron internamente con péptidos obtenidos mediante auto-digestión con tripsina (MH 842.509, MH 2211.104). La m/z se midió con una precisión de 720 ppm.

Los iones peptídicos de mayor intensidad se sometieron a análisis de fragmentación MS/MS, que proporciona información de la secuencia peptídica. Las proteínas se identificaron mediante huella peptídica y se confirmó la identificación mediante el análisis MS/MS. Se utilizó el motor de búsqueda Mascot 2.0 (Matrix Science) del software GPS Explorer™ v3.5 (Applied Biosystems), comparando con las bases de datos UniProt, restringiendo la búsqueda a crustáceos y artrópodos. Se permitió un único error de corte por tripsina, una tolerancia de ± 0.2 Da del fragmento, una tolerancia de ± 100 ppm en la masa del péptido precursor y se incluyeron en los parámetros de búsqueda las modificaciones en Cys por la unión de acetamida y acetamidafluoresceína, así como la oxidación de metionina.

Se consideraron identificaciones positivas aquellas con un nivel de significación $P < 0.05$ teniendo en cuenta masa y pI, usando el algoritmo MOWSE score. La identificación de proteínas se validó de acuerdo al porcentaje de coincidencia con la secuencia de la proteína homóloga de la base de datos, la valoración (score), la probabilidad, el número de péptidos que identifican esa misma secuencia y el número y score de los iones fragmentados

4.3.6. Análisis estadístico de los datos.

Los datos se analizaron mediante una t de Student utilizando el software GraphPad Instant v.3.0.

4.4. Resultados y discusión

4.4.1. Utilidad de la proteómica redox como biomarcador de contaminación en ecosistemas acuáticos de Doñana

Trabajos previos de nuestro grupo usando el cangrejo *P. clarkii* para monitorizar los ecosistemas de agua dulce de diversas zonas que rodean el DNP mostraron claramente que MAT y ROC son zonas contaminadas. En animales capturados en estas zonas en campañas anteriores (año 2003) se encontraron biomarcadores de respuesta a metales, compuestos pro-oxidantes y pesticidas²⁷⁻²⁹. Mediante análisis proteómicos utilizando la tecnología 2-DE se lograron resolver unos 2.500 spots proteicos a partir de extractos de branquias de *P. clarkii*, 35 de los cuales presentaron diferencias significativa en abundancia entre los grupos de estudio y permitieron señalar a los arrozales de MAT como la zona más contaminada, seguida de ROC y PAR, de acuerdo con los altos niveles de metales y pesticidas de estas zonas²⁹. A similar conclusión se llegó mediante aproximaciones transcriptómicas realizadas en glándula digestiva de esos mismos animales³⁰. En este caso, fueron 45 genes diferencialmente expresados los que permitieron llegar a una misma gradación de las muestras por su nivel de contaminación y consecuente alteración molecular³⁰. En los animales utilizados en esta Tesis (campaña 2009) sigue habiendo acumulación de metales en cangrejos capturados en PAR y MAT (Cap. 1), que están produciendo en glándula digestiva y branquias una situación de estrés oxidativo correlacionada con el nivel de acumulación de metales, según se determinó midiendo MDA (Cap. 2) y carbonilación de proteínas (Cap. 3). Por ello, en este trabajo nos planteamos la validación de la proteómica redox como biomarcador de exposición a contaminación en ecosistemas de agua dulce.

La determinación del estado redox de un residuo Cys en una proteína es muy difícil, dado el carácter reversible de esta modificación post-traducciona. Típicamente, este análisis conlleva un primer paso de bloqueo de tioles nativos reducidos, la reducción posterior de tioles reversiblemente oxidados y su marcaje una vez reducidos con un fluoróforo, y finalmente, la separación de las proteínas por electroforesis y la detección de las proteínas oxidadas mediante fluorescencia³¹ (Fig.4.3). En este trabajo se utilizó 2-iodoacetamida (IAM) para bloquear tioles estaban reducidos de forma nativa y

tributilfosfina (TBP) para reducir los tioles oxidados, que más tarde fueron marcados con 5-iodoacetamidofluoresceína (IAF). El análisis se realizó con proteínas extraídas de glándula digestiva, el principal órgano destoxicador de *P. clarkii*. Para cada sitio se fabricó una mezcla con cantidades iguales de proteínas marcadas con IAF y en cada caso se analizaron tres réplicas técnicas.

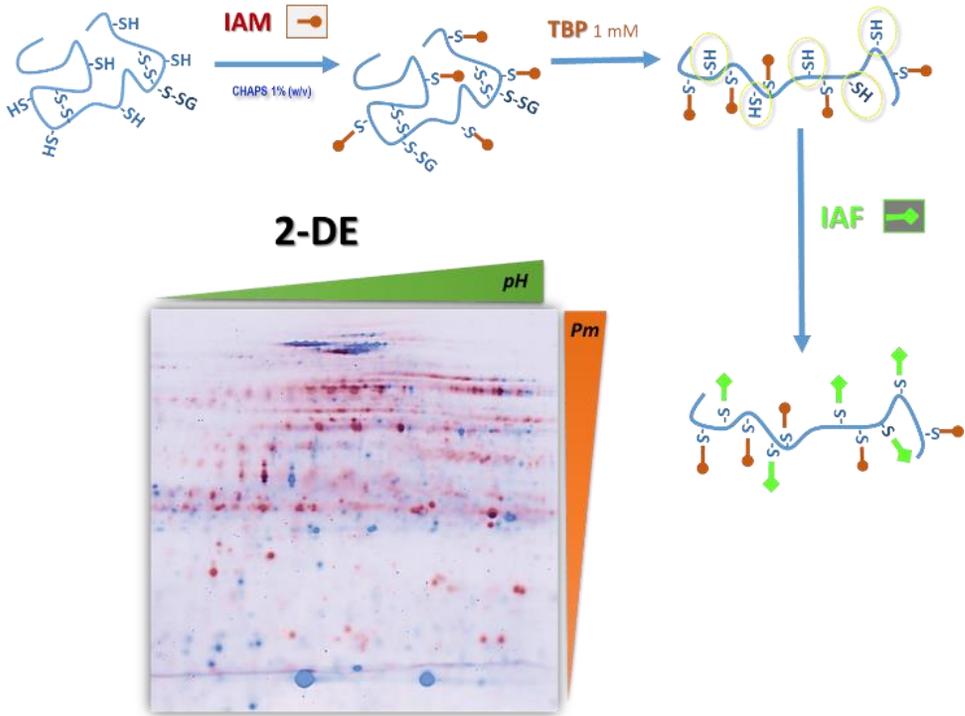


Figure 4.3. Schematic representation of the workflow used to detect reversibly oxidized thiol groups in proteins by fluorescence labeling on a proteomic scale. Thiols (-SH) in the extracts are alkylated with IAM. Upon reduction of reversibly oxidized thiols with TBP, the resulting thiols (-SH) are alkylated with IAF and the proteins separated by mono- or bi-dimensional electrophoresis. Quantitative MS of the protein mixture reveals the extent of thiol modification in any given peptide. Peptide sequence and identity of the modified cysteine are determined by MS/MS.

En este trabajo incluimos un nuevo punto de muestreo, denominado ROC, localizado en el curso medio del arroyo La Rocina (Fig. I, pág. 90). En este punto de muestreo confluyen en el arroyo de La Rocina otros riachuelos que provienen de zonas de cultivo intensivo de fresas y cítricos. Estudios previos de nuestro grupo usando el ratón

moruno *Mus spretus* como bioindicador sugerían que esta zona también presentaba altos niveles de contaminación que afectaban al estado redox celular y llevaban a incrementos en los niveles de enzimas detoxificantes como peroxidasas y glutatión-transferasas, indicando claramente la existencia de estrés oxidativo²⁶ en estos animales. La proteómica redox aplicada a ejemplares de *P. clarkii* capturados en esta zona permitiría validar los resultados de ese trabajo previo y demostraría la validez de esta metodología como biomarcador.

La Fig.4.4 muestra la imagen de geles representativos correspondientes a glándula digestiva de animales procedentes de cada uno de los cuatro sitios estudiados. Se analizaron las imágenes fluorescentes (Fig. 4.4.A) correspondientes a la tinción con IAF de los 3 geles por sitio (12 imágenes en total), que señalaban los tioles proteicos oxidados en cada zona, y las imágenes de los mismos geles teñidos con SYPRO Ruby (Fig. 4.4.B), que permitía la cuantificación de proteínas totales. Tras el análisis de imagen, se calculó la intensidad total de los spots proteicos para las proteínas con tioles oxidados (Fig. 4.4 derecha). Los datos de fluorescencia IAF de los spots se normalizó por los valores totales de proteínas.

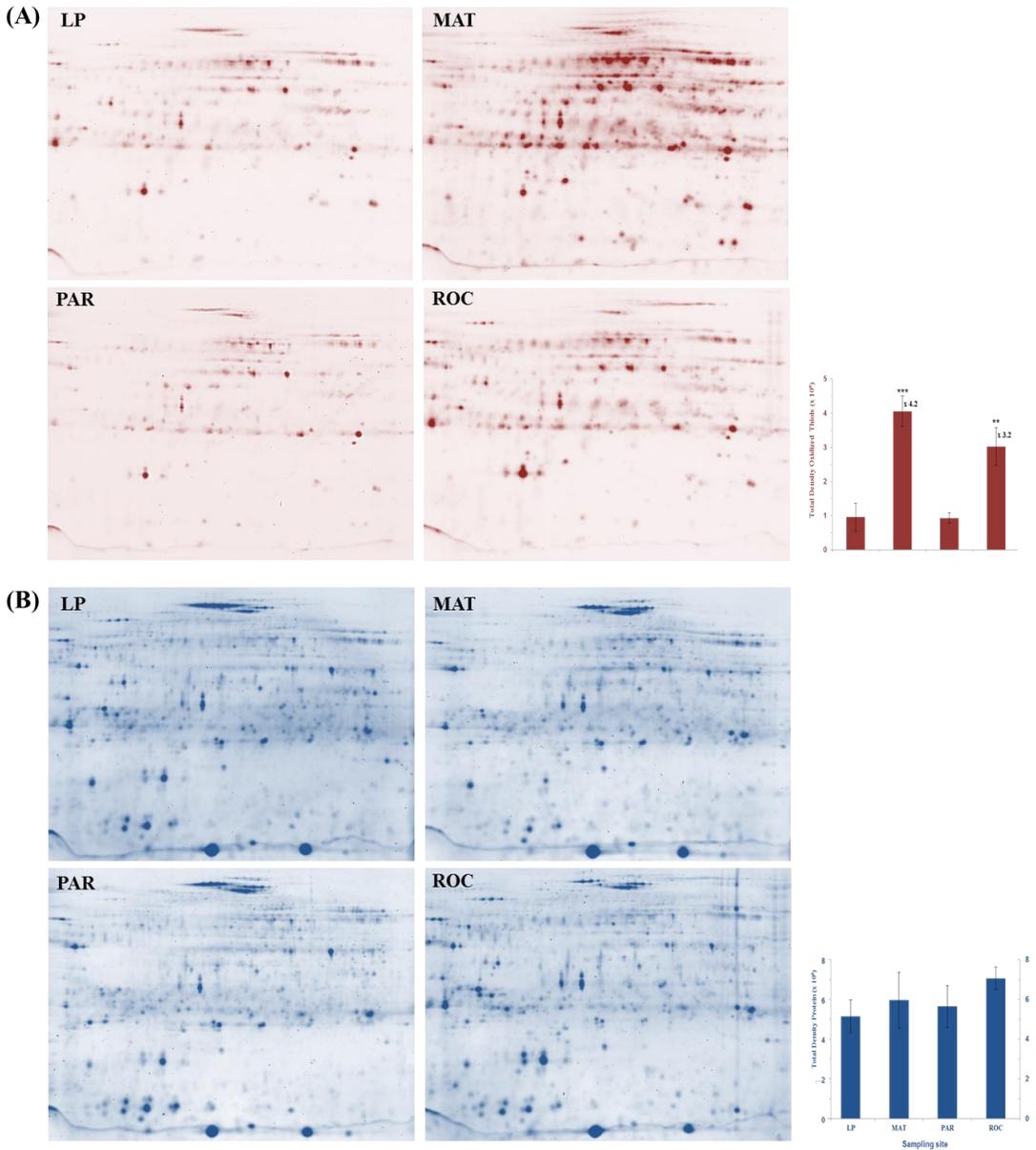


Figure. 4.4. Representative 2-DE gel images of IAF labeled oxidized thiol proteins (A) and total proteins SYPRO Ruby-stained in the same gels (B) of digestive gland of *P. clarkii* collected from the four studied sites. To differentiate the two stains, the original gray color of the AF image was changed to red and that of the SYPRO Ruby image to blue. The fluorescent images of the gels were captured at equal sensitivity and processed using the same values for the parameters in the transform control panel in PDQuest[®] software. Both types of 2-DE images (AF and SYPRO Ruby) were exported from PDQuest[®] software in TIFF format and placed in different layers of the same Adobe Photoshop file so that they would overlap exactly. The total density in the three gels per site was determined and is shown at the right part of the figure as bars diagrams. Values are mean \pm SD of three gels of each site. The statistical significance of the differences is compared with LP, used as reference. Statistical significances: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Numbers represent the fold increase relative to the reference sample LP

La cantidad de proteína total determinada fue muy similar en los cuatro sitios de estudio, como se ve en la Fig. 4.4 B. De hecho, la mayoría de los spots se pudieron encontrar en la misma región del gel para cada uno de los sitios, indicando que todas ellas estaban presentes en todas las muestras, aunque las intensidades de alguna de ellas variaron entre las zonas. Por el contrario, se observaron grandes diferencias en los niveles de proteínas con tioles oxidados. Como se ve en la Fig. 4.4, los geles mostraron pocos spots proteicos marcados con IAF, es decir, con tioles oxidados, en las muestras LP y PAR, mientras que las muestras de ROC y MAT presentaron una gran cantidad de spots marcados. Los diagramas de barras en la parte derecha de esta Fig. 4.4, indican que la densidad total de proteínas con tioles oxidados fue mucho mayor en cangrejos capturados en ROC (incrementos de 3.2 veces, $P < 0.01$) y especialmente en MAT (incrementos de 4.2 veces, $P < 0.001$).

En la parte izquierda de la Fig.4.5, un gel representativo de proteínas de cangrejos MAT marcadas con IAF muestra aproximadamente 800 spot proteicos con tioles reversiblemente oxidados. Este número representa un 46% del total de spots (1721 ± 118) detectados por tinción con SYPRO Ruby. Se indica también en la figura la posición de los 35 spots que muestran diferencia de intensidad ($> \pm 2$ veces de cambio, $P < 0.05$) respecto a las muestras LP de referencia, y los nombres de las proteínas que han podido ser identificadas. Los nombres de estos 23 spots proteicos identificados mediante MALDI-TOF/TOF, que también aparecen en la Fig. 4.5 se recogen en la Tabla 4.1. Estos spots representan 8 especies proteicas: 1) *Ferritina* (FER) identificada a partir de los spots 2, 3, 4 y 36 (Fig. 4.5) ; 2) *superóxido dismutasa* (SOD) identificada a partir de los spots 6–9 y 37–38 (Fig. 4.5); 3) *disulfuro isomerasa* (PDI) identificada a partir del spot 18; 4) *actina*, identificada a partir de los spots 19–22; 5) *proteína de unión a ácidos grasos* (fatty acid-binding protein, FABP), identificada a partir de los spots 29 y 30; 6) *nucleósido difosfato kinasa* (NDK) identificada a partir de los spots 24 y 25; 7) *fructosa bifosfato aldolasa* (FBA), identificada a partir de los spots 26 y 39 (Fig. 5); y 8) *fosfopiruvato hidratasa* identificada a partir de los spots 34 y 35. El spot 39 no cumplía los estrictos requisitos de selección ($> \pm 2$ veces de cambio, $P < 0.05$) que se aplicó al resto de los spots. Sin embargo, fue elegido para ser identificado por su proximidad (masa y pI) al spot 26. Ambos fueron identificados inequívocamente como FBA y el mismo péptido

LADIGLENTEENRR fue obtenido mediante fragmentación TOF/TOF de estos spots 26 and 39.

Se llevó a cabo un análisis de agrupamiento jerárquico con el software Genesis para visualizar cuantitativamente las alteraciones en los niveles de tioles oxidados de los 35 spots seleccionados (Fig. 4.5, derecha). Proteínas y sitios resultaron, así, agrupados en función de la similitud de sus perfiles de expresión. Coincidiendo con los datos de carbonilación (Cap. 3) no se encontraron diferencias notables en los niveles de disulfuros oxidados en proteínas de cangrejos capturados en PAR y en LP. Por el contrario, como se comentó arriba y coincidiendo con los resultados de cuantificación de metales, MDA y carbonilos, el marcaje con IAF de la mayoría de las proteínas (spots 5-35) de MAT fue mucho más intenso que en el resto de las muestras.

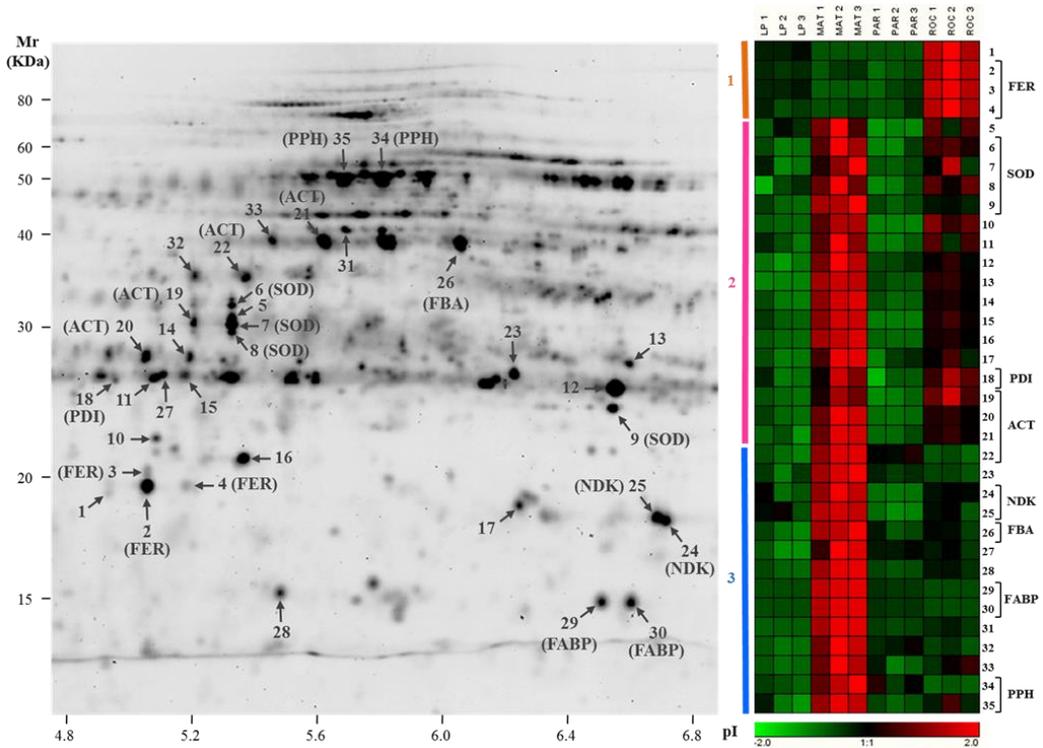


Figure 4.5. (Left) 2-DE gel of oxidized thiol proteins of *P. clarkii* from MAT. The arrows mark the 35 differentially expressed oxidized thiol protein spots (N2-fold intensity differences, $p < 0.05$) compared to LP, 19 of which were identified via MALDI-TOF/TOF and are indicated in parentheses. **(Right) Cluster analysis.** Each row represents one oxidized thiol protein spot, showing the proteins identified on the right. Columns represent the expression profile for one biological replicate at each study site. Green rectangles indicate samples with lower intensity for the particular protein spot relative to the average intensity of all samples, and red rectangles, samples where the spot is more intense. The color intensity is proportional to the distance of each sample intensity to the average value, as represented by the scale.

Las proteínas oxidadas resultaron agrupadas en tres clústeres diferentes. El clúster 1 incluía los únicos 4 spots (1-4) cuyo marcaje con IAF era más intenso en las muestras de ROC, tres de los cuales (2-4) se identificaron como FER. El clúster 2 está formado por 17 proteínas (spots 5-21) que mostraron niveles especialmente altos niveles de marcaje con IAF en muestras MAT, aunque también en animales de ROC sus niveles eran superiores a los de los animales de referencia LP; en este clúster se incluyen spots identificados como SOD (spots 6–9); PDI (spot 18) y ACT (spots 19-21). El clúster 3 lo forman 14 proteínas con niveles de oxidación elevados solo en animales MAT (spots 22-35), entre las que se identificaron ACT (spot 22), NDK (spots 24-25), FBA (spot 26), FABP (spots 29-30) y PPH (spots 34-35).

Table 4.1: Differentially expressed *Procambarus clarkii* proteins identified by MALDI-TOF/TOF analysis.

Spot No. ^a	Protein symbol	Protein name, organism ^b	Uniprot ID ^b	Mr (pI)		Seq. cov. (%)	Peptides matched	Protein score ^c	Expect	Mr ion	Fragmented ion	Ion score ^d
				Theor.	Exp.							
2	FER	Ferritin, <i>Procambarus clarkii</i>	F5A6F3	19.4 (5.2)	19.8 (5.1)	64	12	401	5.7E-36	1341.66	AGTSGLGEFLFDK	136
										1497.76	RAGTSGLGEFLFDK	49
										2850.32	NTDAHLTNMLEDLFLEEQVESIEK	158
3		Ferritin, <i>Procambarus clarkii</i>	F5A6F3	19.4 (5.2)	20.2 (5.1)	33	7	144	2.8E-10	1341.66	AGTSGLGEFLFDK	89
										2850.33	NTDAHLTNMLEDLFLEEQVESIEK	35
4		Ferritin, <i>Procambarus clarkii</i>	F5A6F3	19.4 (5.2)	19.9 (5.2)	24	7	268	1.1E-22	1341.67	AGTSGLGEFLFDK	120
										1497.77	RAGTSGLGEFLFDK	15
										2850.31	NTDAHLTNMLEDLFLEEQVESIEK	112
36		Ferritin, <i>Procambarus clarkii</i>	F5A6F3	19.4 (5.2)	19.1 (5.2)	81	18	373	4.5E-32	1183.68	SLLDLHVTASK	30
										1341.67	AGTSGLGEFLFDK	132
										1497.77	RAGTSGLGEFLFDK	18
										1591.67	QNYHEDCEAAINK	45
										2658.20	QINLELYASYVYMSMGYYFDR	28
										2850.31	NTDAHLTNMLEDLFLEEQVESIEK	24
6	SOD	Superoxide dismutase, <i>Procambarus clarkii</i>	A9LRV6	31.3 (5.4)	31.0 (5.3)	33	11	260	7.1E-22	1551.83	LAELSGIEVDQIHK	88
										1709.84	AFFNVINWSNVNER	81
										1970.98	QAEANDVGAMNALLPAIK	50
7		Superoxide dismutase, <i>Procambarus clarkii</i>	A9LRV6	31.3 (5.4)	29.3 (5.3)	27	10	332	4.5E-29	1551.83	LAELSGIEVDQIHK	100
										1709.84	AFFNVINWSNVNER	97
										1970.98	QAEANDVGAMNALLPAIK	101
8		Superoxide dismutase, <i>Procambarus clarkii</i>	A9LRV6	31.3 (5.4)	28.0 (5.3)	24	6	127	1.4E-08	1709.84	AFFNVINWSNVNER	108
9		Mitoch. Mn superoxide dismutase (Frag.) <i>Procambarus clarkii</i>	C3VUT8	15.1 (6.2)	22.4 (6.5)	40	6	304	2.8E-26	1809.89	HHQTYINNLNIAEDK	121
										1951.97	NLSPDGGEPEGELLAAINR	161
37		Superoxide dismutase, <i>Procambarus clarkii</i>	A9LRV6	31.3 (5.4)	26.9 (5.5)	31	8	127	1.4E-08	1551.83	LAELSGIEVDQIHK	95
38		Superoxide dismutase, <i>Procambarus clarkii</i>	A9LRV6	31.3 (5.4)	30.4 (5.5)	32	12	378	1.1E-33	1551.83	LAELSGIEVDQIHK	100
										1679.93	KLAELSGIEVDQIHK	102
										1970.99	QAEANDVGAMNALLPAIK	91
										2525.25	YEYSALEPHISALIMEIHHQK	43
18	PDI	Protein disulfide isomerase, <i>Litopenaeus vannamei</i>	COJBY4	55.3 (4.6)	23.2 (5.0)	11	5	86	2.3E-03	2159.11	FVAANSLPLVVDFNHETASK	74

Table 4.1 (cont): Differentially expressed *Procambarus clarkii* proteins identified by MALDI-TOF/TOF analysis.

Spot No. ^a	Protein symbol	Protein name, organism ^b	Uniprot ID ^b	Mr (pI)		Seq. cov. (%)	Peptides matched	Protein score ^c	Expect	Mr ion	Fragmented ion	Ion score ^d
				Theor.	Exp.							
19	ACT	Actin (Fragment), <i>Triops granarius</i>	D1MVD9	31.3 (5.3)	29.5 (5.2)	30	5	105	2.3E-06	1790.89	SYELPDGQVITIGNER	91
20		β -Actin (Fragment), <i>Litopenaeus vannamei</i>	G3EQI6	22.6 (4.8)	24.0 (5.1)	22	4	106	1.8E-06	1790.89	SYELPDGQVITIGNER	95
21		Cytoplasmatic actin, <i>Daphnia pulex</i>	E9H3B3	42.0 (5.6)	37.7 (5.6)	33	12	125	2.3E-08	1790.89	SYELPDGQVITIGNER	93
22		Actin (Fragment), <i>Anopheles stephensi</i>	D9YST7	24.0 (5.2)	34.5 (5.4)	15	3	73	4.4E-02	1804.90	SYELPDGQVITIANER	66
24	NDK	Nucleoside diphosphate kinase, <i>Eriocheir sinensis</i>	E7CHR6	17.0 (7.7)	18.3 (6.7)	35	6	74	3.0E-03	1330.74	TFIAVKPDGVQR	59
25		Nucleoside diphosphate kinase, <i>Eriocheir sinensis</i>	E7CHR6	17.0 (7.7)	18.5 (6.7)	35	8	104	2.8E-06	1052.48 1330.74	GDFCIEVGR TFIAVKPDGVQR	50 39
26	FBA	Fructose-bisphosphate aldolase, <i>Tribolium castaneum</i>	D2A6E8	39.7 (7.6)	37.4 (6.1)	18	7	86	2.1E-03	1629.82	LADIGLENTEENRR	71
39		Fructose-bisphosphate aldolase, <i>Tribolium castaneum</i>	D2A6E8	39.7 (7.6)	37.3 (6.1)	15	5	70	0.1	1629.81	LADIGLENTEENRR	63
29	FABP	Fatty acid binding protein, <i>Cherax quadricarinatus</i>	L0I6Z9	15.0 (6.3)	14.5 (6.5)	24	3	68	1.1E-02	1452.66	LGQEVDESTFDGR	59
30		Fatty acid binding protein, <i>Cherax quadricarinatus</i>	L0I6Z9	15.0 (6.3)	14.5 (6.6)	31	4	88	1.0E-04	1452.66	LGQEVDESTFDGR	76
34	PPH	Phosphopyruvate hydratase, <i>Penaeus monodon</i>	O96656	47.8 (6.2)	52.1 (5.8)	8	4	64	2.7E-02	1230.68	AGAAELGIPLYR	58
35		Phosphopyruvate hydratase, <i>Penaeus monodon</i>	O96656	47.8 (6.2)	52.3 (5.7)	19	7	80	7.6E-04	1230.68	AGAAELGIPLYR	63

^a The numbering of the spots is arbitrary and corresponds to that of Fig. 4.5.

^b Protein name, organism and identifier (ID) as UniProtKB/Swiss-Prot database.

^c MOWSE protein score based on MS data. All identifications were carried out contrasting with contrasting results to crustacean peptide sequences existing in the UniProt database, except spots 22, 26 and 39 which were contrasted against arthropoda's. Protein scores greater than 61 and 72 were significant ($p < 0.05$) for crustacean and arthropoda databases, respectively.

^d Ions score is $-10 * \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.

La Tabla 4.2 recoge los valores de las intensidades del marcaje con IAF de los 19 spots proteicos identificados en los 4 sitios estudiados y el número de veces de cambio en relación a LP. Los tres spots identificados como ferritina que componen el clúster 1 mostraron incrementos en la intensidad de fluorescencia IAF superiores a 3 veces en animales de ROC ($P < 0.001$). En los otros sitios estudiados estos spots mostraron una tendencia a disminuir de intensidad, que se hizo significativa ($P < 0.05$) para el spot 3 tanto en animales de PAR como los de MAT.

Table 4.2. AF signal intensity of the identified proteins at the different studied sites.

Spot No. ^a	Protein symbol ^b	Sampling site ^c				Cluster ^f
		LP	MAT	PAR	ROC	
2	FER	7181 ± 517 ^d	5186 ± 1541	4169 ± 1269	24480 ± 2760	1
		(1) ^e	(0.7)	(0.7)	(3.4) ^{***}	
3		1219 ± 78	574 ± 26	763 ± 285	3714 ± 296	1
		-1	(0.5) [*]	(0.6) [*]	(3.0) ^{***}	
4		761 ± 177	622 ± 76	650 ± 175	2695 ± 394	1
		-1	(0.8)	(0.9)	(3.5) ^{***}	
6	SOD	508 ± 92	1368 ± 256	484 ± 139	1030 ± 78	2
		-1	(2.7) ^{***}	(1.0)	(2.0) ^{**}	
7		966 ± 734	3951 ± 1362	1071 ± 169	2660 ± 1612	2
		-1	(4.1) [*]	(1.1)	(2.8)	
8		520 ± 311	1616 ± 360	455 ± 144	1244 ± 197	2
		-1	(3.1) ^{**}	(0.9)	(2.4) [*]	
9		901 ± 190	3171 ± 417	973 ± 116	1424 ± 98	2
		-1	(3.5) ^{***}	(1.1)	(1.6)	
18	PDI	388 ± 167	1054 ± 308	280 ± 175	1015 ± 186	2
		-1	(2.7) [*]	(0.7)	(2.6) ^{**}	
19	ACT	472 ± 108	1707 ± 419	336 ± 128	1877 ± 441	2
		-1	(3.6) ^{**}	(0.7)	(4.0) ^{**}	
20		825 ± 265	3636 ± 719	648 ± 54	2089 ± 211	2
		-1	(4.4) ^{***}	(0.8)	(2.5) ^{**}	
21		1846 ± 570	6161 ± 982	2034 ± 294	3929 ± 349	2
		-1	(3.3) ^{***}	(1.1)	(2.1) ^{**}	
22		664 ± 236	3354 ± 400	1665 ± 211	841 ± 135	3
		-1	(5.1) ^{***}	(2.5) ^{**}	(1.3)	
24	NDK	1045 ± 618	3620 ± 478	510 ± 44	1599 ± 102	3
		-1	(3.5) ^{***}	(0.5)	(1.5)	
25		1807 ± 440	3827 ± 132	866 ± 160	1729 ± 421	3
		-1	(2.1) ^{***}	(0.5) [*]	(1.0)	
26	FBA	2808 ± 731	9245 ± 849	3729 ± 729	4437 ± 674	3
		-1	(3.3) ^{***}	(1.3)	(1.6)	
29	FABP	0 ± 0	2822 ± 208	208 ± 50	0 ± 0	3
			(nd) ^{***}	(nd)	(nd)	
30		0 ± 0	3262 ± 305	259 ± 56	0 ± 0	3
			(nd) ^{***}	(nd)	(nd)	
34	PPH	1092 ± 156	3285 ± 768	1685 ± 414	984 ± 82	3
		-1	(3.0) ^{***}	(1.5)	(0.9)	
35		979 ± 849	4703 ± 539	1186 ± 222	2286 ± 768	3
		-1	(4.8) ^{***}	(1.2)	(2.3)	

^a The numbering of the spots is arbitrary and corresponds to that of Fig 4.5

^b For protein name, see the legend of Fig. 4.

^c For sampling sites, see the legend of Fig. 1.

^d Arbitrary units of fluorescence. Data are means ± SD (n = 3 replicate).

^e The numbers in parenthesis represent the AF signal intensity fold increase at the sites relative to LP; nd, not possible to calculate because the signal intensity in LP is zero. The statistical significance of the differences is compared with LP, used as reference. Statistical significances: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

^f Cluster number given by Genesis analysis as shown in Fig. 4 (right).

Todas las proteínas del clúster 2 estaban mucho más oxidadas en animales capturados en MAT, con incrementos entre 2.7 y 4.4 veces. El nivel de oxidación también fue más alto en las proteínas de animales ROC, aunque en este caso las diferencias con LP solo fueron significativas para los spots 6 y 8 (SOD), 18 (PDI) y 19–21(ATC). Los aumentos de intensidad fueron similares en animales MAT y ROC para los spots 6, 8, 18 y 19. Coincidiendo con el clúster 2, todas las proteínas que formaban el clúster 3 (spots 22, 24-25, 26, 29-30 y 34-35, identificados como ACT, NDK, FBA, FABP y PPH respectivamente) mostraron niveles incrementados de oxidación en animales MAT. Sin embargo, a diferencia de las proteínas del anterior clúster, solo el spot 22 mostró un aumento significativo ($P < 0.001$) en animales ROC. Los dos spots identificados como FABP (29–30) no se detectaron en muestras LP o ROC, aunque mostraron intensidades muy altas en MAT y especialmente en ROC.

Se estima que las proteínas absorben ~70% de las ROS y son una de las principales dianas de oxidación en la célula, como se comentó en capítulos anteriores. La oxidación de residuos Cys se considera una PTM que altera la estructura y la función proteica y con ella muchos procesos biológicos^{1, 4}. En este trabajo hemos utilizado marcaje diferencial de tioles nativos reducidos y oxidados y electroforesis bidimensional para validar el uso de la proteómica redox como biomarcador de exposición de cangrejos *P. clarkii* a contaminantes oxidativos. Los resultados obtenidos demuestran que efectivamente esta metodología es un biomarcador sumamente útil y sensible de daño oxidativo como el causado por exposición a metales de transición o compuestos electrofílicos como los descritos en DNP y sus alrededores^{28, 34-36}. Hemos encontrado que la densidad total correspondiente a proteínas oxidadas (Fig.4.4) es mucho más grande en animales del área de El Matochal y algo menor en animales del arroyo La Rocina, mientras que no hay grandes diferencias entre las proteínas de animales capturados en el arroyo de El Partido y los animales de referencia capturados en Lucio del Palacio. Estos resultados coinciden plenamente con las determinaciones mostradas en los capítulos anteriores respecto a bioacumulación de metales, peroxidación lipídica y carbonilación proteica (Capítulos 1, 2 y 3), además de con los biomarcadores convencionales, proteómicos y transcriptómicos previamente analizados por nuestro grupo^{26, 28-30, 37, 38}.

La intensidad de los cambios en niveles de tioles oxidados de los 35 spots seleccionados (Fig. 4.5 derecha) también confirman la presencia de diferentes grados de contaminación en los tres sitios problema. Así, 31 spots correspondientes a proteínas oxidadas se mostraron particularmente intensos en cangrejos de MAT. Entre estos están los 14 (22-35) spots que conforman el clúster 3, con niveles de intensidad superiores sólo en MAT, y los 17 (5-21) pertenecientes al clúster 2, con niveles de fluorescencia muy altos en cangrejos de MAT y altos en cangrejos de ROC. El moderado nivel de contaminación encontrado en la del arroyo La Rocina²⁸ explicaría que solo 4 spots (1-4), los que conforman el clúster 1, presenten niveles altos de fluorescencia solo en animales de esta zona.

4.4.2. El marcaje diferencial permite en algunos casos identificar diferencialmente las proteínas nativas y las oxidadas

La Fig. 4.6.A muestra un gel 2-DE representativo de cangrejos de MAT, donde las proteínas con tioles oxidados marcadas con IAF (en rojo) se superponen a las proteínas teñidas con SYPRO Ruby (en azul). La unión de IAF a los tioles reversiblemente oxidados suman 512,26 unidades de masa atómica por tiol y puede afectar también al pI de la proteína, por lo que no hay un solapamiento completo entre las dos imágenes IAF y SYPRO Ruby.

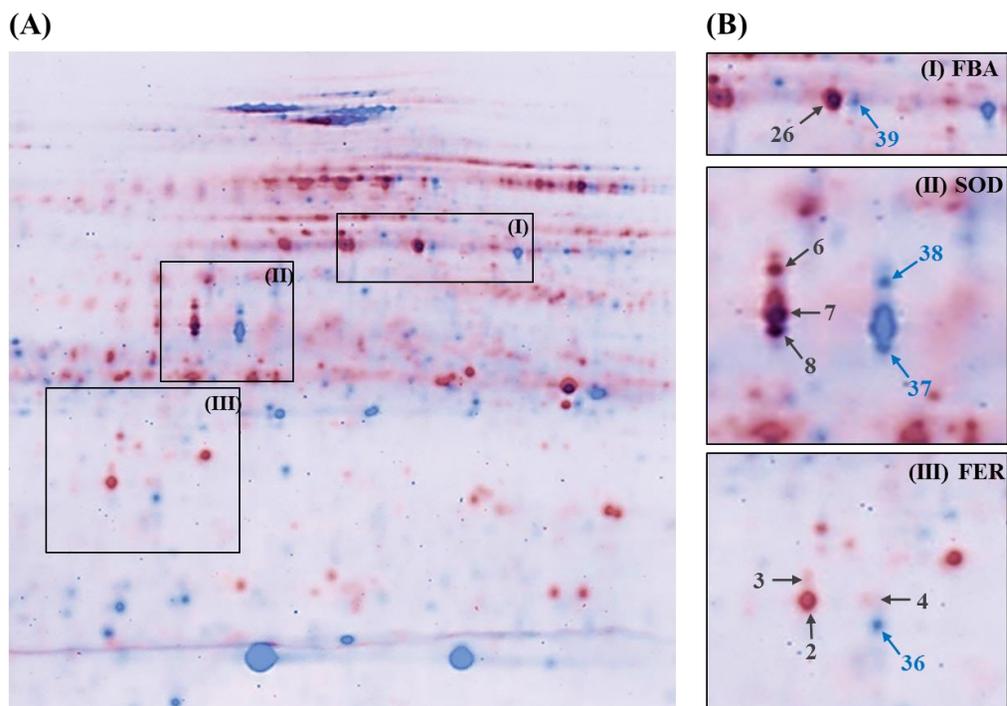


Figure. 4.6. (A) Overlapping representative 2-DE gel image of IAF labeled oxidized thiol proteins (in red) and total proteins SYPRO Ruby-stained (in blue) of *P. clarkii* from MAT. (B) Three enlarged representative regions are shown where the same protein has been identified from different spots: (I) FBA, (II) SOD and (III) FER. To differentiate the two stains, the original gray color of the IAF image was changed to red and that of the SYPRO Ruby image to blue. Black arrows point to IAF-labeled differentially oxidized thiol proteins and blue arrows point to non-labeled and, thus, non-oxidized proteins.

En la Fig. 4.6 B se presentan aumentadas tres regiones representativas de este gel, mostrando los diferentes spots que permitieron identificar una misma proteína. Los spots que aparecen en color rojo corresponden a la imagen de fluorescencia de IAF del gel, mientras que los azules corresponden a la imagen de fluorescencia de SYPRO Ruby del mismo gel. Los spots 26 (recuadro I), 6-8 (recuadro II) y 2-4 (recuadro III), identificados FBA, SOD y FER, respectivamente, se presentan desplazados hacia un pI más ácido y con una masa ligeramente mayor que los correspondientes spots 39, 37-38 y 36, identificados también como FBA, SOD y FER. Esto indica que estas proteínas pueden ser modificadas post-traduccionalmente mediante la formación de disulfuros internos entre sus grupos tioles. Los spots 26, 6-8 y 2-4 corresponderían a la porción de la proteína que presenta la PTM y que se ha marcado con IAF. Los spots 39, 37-38 y 36,

corresponderían a las formas nativas de las proteínas sin los grupos tioles oxidados o a moléculas que no se han marcado con IAF, por lo que pueden detectarse en la imagen del gel teñido con SYPRO Ruby (azul) pero no en la imagen de las proteínas con tioles oxidados marcados con IAF (rojo).

4.4.3. Identificación de residuos Cys con tioles sensibles a oxidación

Si los péptidos usados para la identificación de las proteínas incluyen residuos Cys, se puede estudiar la susceptibilidad de una Cys específica a sufrir oxidación reversible, como se muestra en la Tabla 4.4 para las dos proteínas FER y NDK, en que se ha conseguido determinar la modificación de Cys.

Table 4.4. Cysteine residues in proteins prone to reversible oxidation detected by MALDI-TOF/TOF analysis.

Protein symbol	Protein name, Organism ^a	No. Cys ^b (Position)	Spot No. ^c	IAF-Cys ^d	IA M-Cys ^d	Mw Ion	Peptide ^e
FER	Ferritin,	1	2	13		1922.73	QNYHEDC ^F EAAINK
	<i>Procambarus clarkii</i>	(13)	36		13	1591.67	QNYHEDC ^A EAAINK
NDK	Nucleoside diphosphate kinase, <i>Eriocheir sinensis</i>	3 (64, 76, 108)	24	108		1383.54	GDFC ^F IEVGR
					64	1894.91	HYADLADKPFYPG LC ^A K
			25	76		2421.17	YM ^O SSGPVVAM ^O C ^F WETGVVK
				108	1052.48	GDFC ^A IEVGR	
			64	1894.91	HYADLADKPFYPG LC ^A K		

^a Protein name, organisms UniProtKB/Swiss-Prot database.

^b Number of cysteine residues present in the protein (position of the Cys residues in the sequence of the protein).

^c The numbering of the spots corresponds to that of Figs. 4.5 and Table 4.1.

^d Cysteine residue modified by IAF (i.e. a residue prone to reversible oxidation) or by IAA (i.e. a reduced status).

^e Modified residues in the peptide are as follows: CF: Cys modified by IAF; CA: Cys modified by IAA; MO: oxidized Met.

Así, la ferritina de *P. clarkii*, que tiene una sola Cys en posición 13, se presentó oxidada (marcada con IAF) en el spot 2 y reducida (marcado con IAM) en el spot 36, mucho menos intenso, indicando que la mayoría de la proteína está oxidada. Este resultado confirma la hipótesis propuesta arriba de que el spot 36 pudiera representar la forma nativa de la ferritina. La proteína NDK contiene 3 residuos Cys en las posiciones 64, 76 y 108. La Cys₆₄ aparece reducida en los dos spots 24 y 25 que identificaron esta

proteína, mientras que la Cys₁₀₈ apareció oxidada en el spot 24 y reducida en el 25. La Cys₇₆, que sirvió para identificar el spot 25, apareció reducida.

4.4.4. Funciones biológicas de las proteínas identificadas con niveles de oxidación diferencial entre las muestras estudiadas

Algunas de las proteínas con tioles oxidados identificadas en este trabajo han sido relacionadas previamente con respuestas a exposición a contaminación, como es el caso de SOD^{29, 34}, o ACT³⁹ (pero no otras como FER, PDI, FBP, PPH, FABP o NDK. Por ello, se ha procedido a hacer una revisión de las funciones de las proteínas diferencialmente oxidadas en las distintas muestras para darle así significado biológico a los cambios observados.

El Fe es esencial para la vida pues forma parte de sitios activos de muchas metaloproteínas que juegan papeles clave en procesos biológicos cruciales como el transporte de O₂, almacenamiento y uso de O₂ en muchas reacciones redox y en las reacciones de transferencia de electrones dentro de la célula. Sin embargo, el exceso de Fe es altamente tóxico, ya que promueve la formación de ROS, principalmente mediante la reacción de Fenton⁴⁰. Los organismos han debido desarrollar mecanismos para manejar esta situación, almacenando el Fe que no se requiere de forma inmediata en una forma no tóxica y movilizando los almacenes cuando se precisa para participar en el metabolismo celular. La *ferritina* (FER) es la principal proteína intracelular responsable del secuestro, almacenamiento y liberación de Fe, pudiendo acumular más de 4.500 átomos de Fe, que se liberan cuando se necesita una mayor biodisponibilidad de este metal para el crecimiento y la proliferación celular^{40 41}. FER es una proteína ubicua y está fuertemente regulada por el Fe intracelular y el estado oxidativo de la célula⁴². FER almacena hierro como Fe³⁺ insoluble tras secuestrar Fe²⁺ del medio externo mediante su actividad ferroxidasa. El mecanismo de liberación del hierro aún no se ha establecido claramente, aunque se sabe que la actividad ferroxidasa no participa⁴³ (Fig. 4.7).

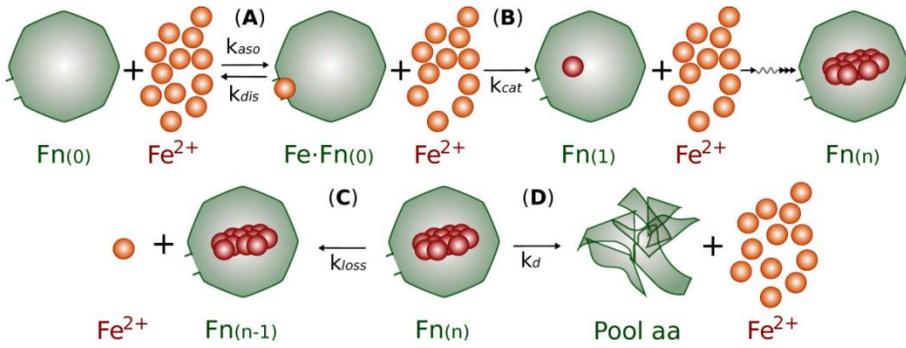
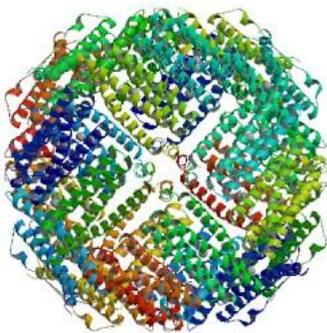


Figure 4.7 Proposed mechanism for iron uptake/release by ferritin. Proposed mechanism for iron uptake/release by ferritin. (A) Iron (Fe) enters through a pore in the apoferritin protein cage structure (Fn(0)), forming an iron-ferritin complex (FeFn0) through a reversible process. (B) A series of redox reactions lead to iron incorporation into the mineral core of ferritin (Fn(1)). After incorporation steps, the ferritin species Fn(n) is obtained. (C) Iron can be released from the mineral core through redox and transport processes. (D) Ferritin molecules can also be proteolytically degraded, returning their entire iron content during this process⁴⁴.

Los niveles de oxidación de ferritina son más bajos en cangrejos PAR y MAT que en los capturados en la zona de referencia. Por el contrario, la FER de cangrejos ROC muestra niveles de oxidación >3 veces superiores que el resto. Mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales están implicados en la inducción de FER por oxidantes y



citoquinas⁴⁵ y colaboran en el contenido total de FER en la célula. Frente a estudios que sugieren que la inducción de la FER protege frente al estrés oxidativo, otros sugieren que el daño oxidativo a FER incrementaría el contenido celular de Fe libre, lo que agravaría el daño oxidativo^{40,46}. La oxidación de FER se acompaña generalmente por la degradación proteosomal de la molécula proteica oxidada,

lo que resultaría en una disminución de la cantidad de ferritina en la célula sometida a estrés oxidativo⁴⁷ como se ve en cangrejos de MAT. No obstante, se ha demostrado que distintos oxidantes incrementan de manera diferente la susceptibilidad de FER a la proteólisis⁴⁷. Por ello, el mayor nivel de oxidación de FER en cangrejos ROC puede ser consecuencia de una menor tasa de degradación de FER por haber sido oxidada por contaminantes distintos de los presentes en las otras zonas de estudio.



La *proteína disulfuro isomerasa*, PDI, de 55 kDa y 508 aminoácidos, con dos dominios tipo tiorredoxina y una secuencia típica señal de retención/recuperación en el retículo endoplásmico (RE), desempeña una doble función en la célula. Por una parte, PDI funciona como una oxidasa introduciendo puentes disulfuros en las proteínas. Por otra parte, PDI actúa como una chaperona que inhibe la agregación proteica⁴⁸. Durante la oxidación de una proteína diana, PDI oxidada cataliza la formación de disulfuros en la proteína sustrato y se reduce. En el proceso, la proteína oxidoreductina del retículo endoplásmico (ERO1) se reoxida y regenera el sitio activo de PDI. Por el contrario, la forma reducida de PDI inicia un proceso de isomerización atacando el disulfuro del sustrato y formando un puente disulfuro intermolecular transitorio que acaba generando una reordenación del disulfuro intramolecular y una PDI reducida (Fig. 4.8). De esta manera, PDI forma parte de la sofisticada maquinaria celular que asegura la correcta formación de los puentes disulfuro e impide enlaces erróneos.

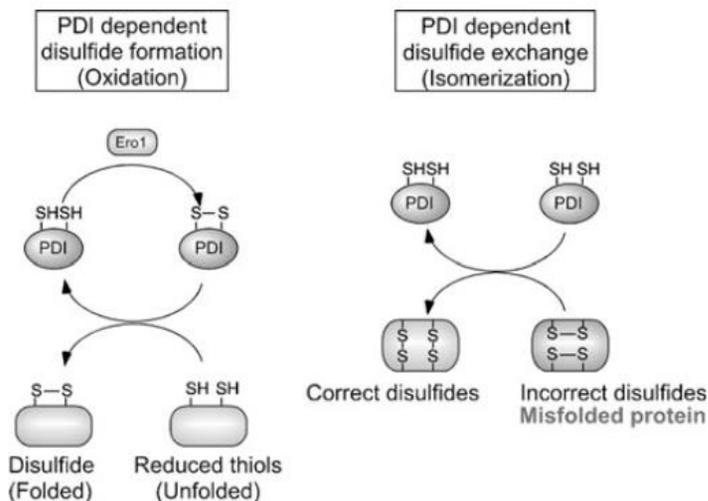


Figure 4.8 Molecular mechanisms of PDI-dependent oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum (ER). Oxidized PDI (top), which contains a disulfide bond at its active site, catalyzes the formation of a disulfide bond in a substrate protein (bottom), resulting in the reduction of PDI. Conversely, the ER oxidoreduction protein, Ero1, can reoxidize and regenerate the PDI active site. By repeating this cycle, PDI can continuously insert disulfide bonds into different substrate proteins. Right: In the early process of protein folding in the ER, cysteine residues often form inaccurate disulfide bonds (resulting in a misfolded protein). The isomerase activity of PDI (top) converts these incorrect disulfide bonds to their correct native form. This reaction occurs through breakage of substrate disulfide, formation of intramolecular disulfide, and reformation of intermolecular disulfide bonds with different thiols in the target substrate protein (bottom). For simplicity, the redox state of only one PDI active site is shown⁴⁹.

La proteína PDI resulta inhibida por S-nitrosilación y S-glutathionilación, lo que tiene como consecuencia mal plegamiento de proteínas, estrés de retículo endoplásmico (RE) y muerte celular^{49, 50} (Fig. 4.8). PDI parece ser un regulador negativo de NF-KB, el principal inductor de genes de supervivencia celular, cuya presencia se ha vinculado a la capacidad invasiva en cáncer. Recientemente se ha descrito un papel beneficioso del mantenimiento del estado oxidado de PDI, que reduciría la generación de ROS⁵² (Fig. 4.9). Asimismo, se ha descrito que PDI sufre proteólisis en el citoplasma mediada por caspasas, como parte del proceso apoptótico⁵¹. El proceso proteolítico posiblemente genere fragmentos con grupos tioles sensibles a procesos redox¹⁹. En este trabajo también hemos identificado un fragmento oxidado de PDI de 23.2 kDa (spot 18) en la fracción citosólica de glándula digestiva de cangrejos MAT y ROC (Fig.4.5), indicando posiblemente una situación apoptótica en la glándula digestiva de los cangrejos procedentes de esta zona contaminada.

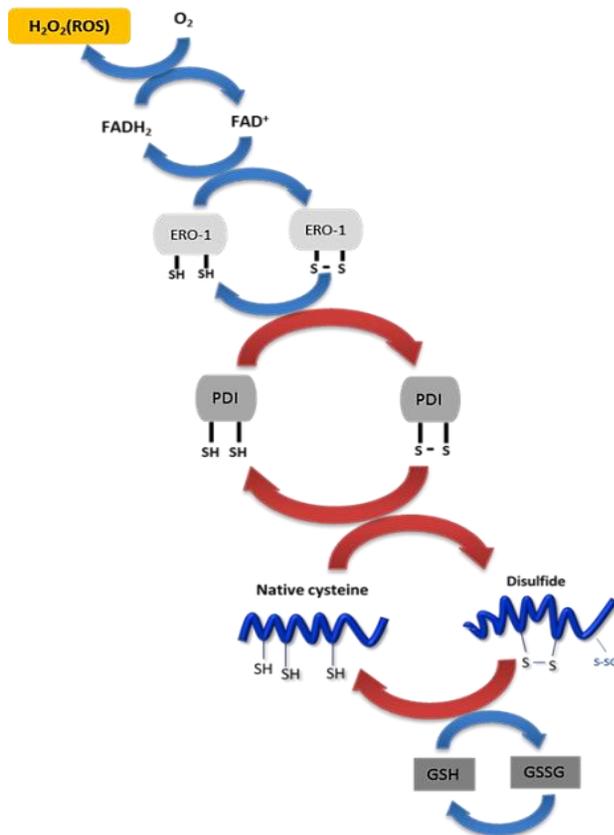
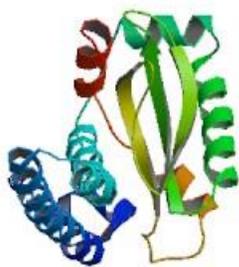
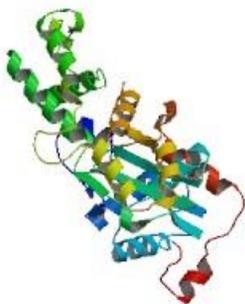


Figure 4.9 The formation of disulfide bonds in the ER is driven by PDI and ERO1. During disulfide bond formation, ERO1 operates in association with the flavin, FAD. ERO1 uses a FAD-dependent reaction to transfer electrons from PDI to molecular oxygen (O₂), which results in the production of reactive oxygen species (ROS) from H₂O₂ and the oxidation of PDI. PDI is reduced following the acceptance of electrons from protein-folding substrates, thereby oxidizing thiol (SH) groups in the target protein's cysteine residues and forming disulfide bonds. Reduced GSH assists in disulfide-bond reduction, resulting in the production of oxidized glutathione (GSSG). Under conditions of ER stress and the UPR, GSH is consumed and the ER environment becomes increasingly reduced. (Adapted from⁵³)

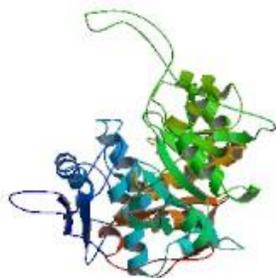


La *Cu-Zn-superoxido dismutasa* (SOD) es una de las proteínas cuyo correcto plegamiento está controlado por PDI. Esta enzima, una metaloproteína holomérica que dismuta el radical anión superóxido a O_2 y H_2O_2 , requiere la formación de un puente disulfuro intramolecular para la estabilización de su forma nativa funcional. La reducción de este puente disulfuro ocasiona mal plegamiento de la proteína y formación de agregados ⁵⁴. PDI disminuye la tasa de agregación de proteínas SOD reducidas ^{49, 55} por lo que la oxidación y proteólisis de PDI comentada anteriormente estarían contribuyendo a su agregación. El daño oxidativo (nitricación, fosforilación, glutationilación, cisteinilación, glicación, inapropiada formación de disulfuros) de SOD suele conllevar su disociación en monómeros con muy poca actividad ^{49, 56, 57}. En este trabajo se han detectado tres spots (spots 6-8), identificados como SOD, que mostraron altos niveles de fluorescencia en cangrejos de ROC y, especialmente, de MAT, correspondientes a estas formas monoméricas o a fragmentos de la propia proteína SOD.



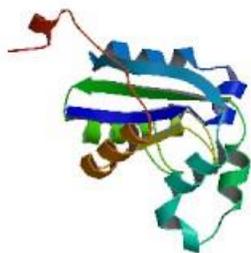
Numerosas líneas de evidencia sustentan la idea de que el daño que causa la oxidación a la célula en buena parte está mediado por daños al citoesqueleto, en el que el sistema de la *actina* (ACT) ³² representa una diana temprana y muy sensible ^{19,58-60}. ACT es una proteína ubicua, abundante y esencial. Los monómeros de G-actina (actina globular) polimerizan para formar la F-actina (actina fibrosa) cuyo ensamblaje/desensamblaje y organización es muy dependiente de estímulos tanto externos como internos ⁶¹. Varios residuos Cys y Met de ACT son susceptibles de oxidación, nitrosilación, nitricación, carbonilación y glutationilación ⁶². El procesamiento y las modificaciones post-traduccionales de ACT regulan importantes eventos celulares, dirigiendo procesos fisiológicos (crecimiento celular, migración celular, tráfico de membrana, endocitosis, morfogénesis celular) tanto como patológicos ^{62, 63}, ya que la modificación redox de residuos Cys críticos de la ACT alteran la ratio de proteína soluble y polimerizada y, en consecuencia, la arquitectura celular y la función de membrana ^{50, 62, 63}. Bajo condiciones suaves, no letales, de estrés, la S-tiolación evita la formación de

disulfuros inter/intramoleculares y previene la excesiva polimerización de ACT y el cross-link, preservando la dinámica de los microfilamentos ⁵⁸. Se ha descrito que la glutationilación de ACT es uno de los mecanismos tempranos que permiten a los animales sobrevivir al estrés oxidativo causado por contaminación ³⁹. Por ejemplo, se ha descrito que bajas dosis de Cd incrementan la glutationilación de ACT, lo que tiene efectos protectores in vivo. Por el contrario, dosis altas de Cd, que generan una situación de estrés oxidativo en la célula pero mantienen los niveles basales de glutationilación, causan disrupción del citoesqueleto ⁶⁴. En nuestro estudio, solo el spot 21 presentó una Mw (37.7 kDa) próxima a la teórica para la G-actina (42 kDa), mientras que los otros 3 spots (19, 20 y 22) identificados también como actina, podrían ser formas truncadas de menor masa molecular (29.5, 24.0 and 34.5 kDa), similares a otras previamente identificadas en situación de estrés oxidativo en la célula ^{19,65}, reconocidas como dianas de oxidación reversible de Cys ¹⁹.

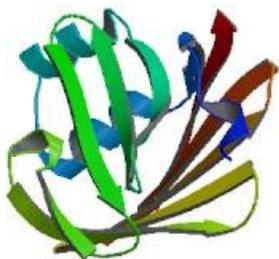


Las enzimas *fructosa 1,6-bifosfato aldolasa* (FBA) y fosfopiruvato hidratasa (PPH) son dos enzimas glicolíticas. FBA se encarga de romper la fructosa 1, 6-bifosfato en la glucolisis para dar dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído 3-fosfato y de catalizar la reacción inversa en el proceso gluconeogénico ³³. PPH actúa en un paso posterior de la glucolisis, convirtiendo 2-fosfoglicerato en fosfoglicerato, que es el segundo intermediario de alta energía productor de ATP durante la etapa glicolítica ³³. La oxidación de FBA y PPH observada en cangrejos MAT podría disminuir su actividad, con lo que la actividad glicolítica se reduciría y de esta manera se potenciaría el flujo de glucosa hacia la ruta de las pentosas fosfato para generar NADPH, que proporcionaría el poder reductor necesario para que las enzimas antioxidantes pudieran proteger a la célula frente al estrés oxidativo ⁶⁶. FBA lleva a cabo otras funciones menos conocidas por su capacidad de unirse a otras proteínas ⁶⁷. Por ejemplo, lo mismo que otras enzimas implicadas en la ruta glicolítica, interacciona con microfilamentos de actina en una manera redox-dependiente, para formar micro-compartmentos donde se localizan complejos multienzimáticos

glucolíticos que permiten que el citoesqueleto “perciba” e integre la actividad metabólica general en respuesta a cambios medioambientales o fisiológicos ^{67, 68}.



La *proteína de unión a ácidos grasos* (FABP) forma parte de la familia de proteínas de unión a ácidos grasos, un grupo de proteínas citosólicas pequeñas (14 kDa), ubicuas, multigénicas y multifuncionales bien estudiadas en vertebrados ^{69,70}, pero casi desconocidas en invertebrados ⁷¹. La principal función biológica de FABP es la unión y transporte de ácidos grasos de cadena larga y otros ligandos como prostaglandinas, ácidos biliares o eicosanoides, aunque también se le atribuye un importante efecto citoprotector por su capacidad de unir ácidos grasos potencialmente tóxicos, grupos hemo y otras moléculas que pueden ser citotóxicas cuando está libres. Además, FABP afecta a la función enzimática por sus efectos sobre la disponibilidad de ligandos, modula la actividad enzimática al cambiar la estructura de la membrana y su fluidez y regula la expresión génica al activar los receptores nucleares ⁷². Las proteínas FABP desempeñan un papel importante en el proceso de inflamación regulada por ácidos grasos en vertebrados y recientemente se ha descrito una función similar en cangrejo ⁷¹. Asimismo, FABP se considera un protector endógeno frente al estrés oxidativo, al secuestrar lípidos reactivos mediante la modificación covalente de su Cys₁₂₀ ³³ o la oxidación de sus pares de Cys ⁷⁰. Debido a esto la FABP ha sido propuesta como marcador bioquímico de daño tisular bajo condiciones patológicas ⁷⁰. La fluorescencia de la proteína FABP resultó indetectable en glándula digestiva de cangrejos LP y ROC, indicando que todas sus Cys estaban reducidas. En animales PAR se detectó señal de fluorescencia, pero muy inferior a la de animales de MAT, donde probablemente todas las Cys de FABP estaban oxidadas (Fig. 4.4).



Bajo condiciones de alta demanda energética e inadecuada producción de ATP, durante un tiempo limitado, las células pueden utilizar moléculas como fosfoarginina o GTP para fabricar ATP. Se ha descrito que varias proteínas implicadas en la transferencia de grupos fosforilo o pirofosforilo desde o hasta el ATP para biosíntesis o formación de nucleósidos trifosfato, disminuyen su presencia en organismos sometidos a estrés ^{73, 74}. Una de estas proteínas es la *nucleósido difosfato quinasa* (NDK), necesaria para mantener el pool de nucleósidos trifosfato requeridos en las reacciones biosintéticas. Originalmente identificada como supresora de metástasis tumoral, hoy en día NDK se considera una proteína multifuncional implicada en los principales eventos celulares, como la proliferación, diferenciación y desarrollo, adhesión, migración y tráfico de vesículas y participa en la transcripción y la reparación de DNA ⁷⁵. Los mecanismos celulares que regulan las funciones de NDK se conocen pobremente e incluyen modificaciones post-traduccionales esenciales para muchas funciones celulares y procesos reguladores. La Cys del péptido GDFCIQVGR (Cys₁₀₉ en humanos, Cys₁₀₈ en el decápodo *Eriocheir sinensis*), situada en la zona de contacto de las subunidades en las estructuras hexaméricas, es de particular importancia. La formación del disulfuro Cys₁₀₉-Cys₁₀₉ afecta a la estructura y función de la NDK ⁷⁶ y su glutationilación inactiva a NDK al afectar su estructura y dañar el sitio de unión con el nucleósido, lo que sugiere que la Cys₁₀₉ juega un papel clave en la respuesta al estrés oxidativo ⁷⁷. En este trabajo además de la Cys₁₀₈, que se encontró oxidada en el spot 24 (Fig. 4.4), se aporta la primera evidencia de oxidación reversible de la Cys₇₆ en NDK (spot 25).

4.5. Conclusiones

Este estudio proporciona información valiosa sobre los mecanismos y el significado biológico de los daños oxidativos a las proteínas. De los 4 sitios estudiados situados en el Parque Nacional de Doñana (LP) o sus inmediaciones, MAT y ROC fueron las dos áreas donde se capturaron cangrejos *P. clarkii* con los niveles más altos de oxidación reversible de proteínas en sus glándulas digestivas. Para la mayoría de estas proteínas se pudieron detectar spots correspondientes a diferentes formas de oxidación de Cys y para algunas, también los spots correspondientes a las formas nativas sin tioles oxidados.

Algunas de estas proteínas diferencialmente oxidadas se han identificado y ponen de manifiesto qué procesos se ven afectados en estos animales a consecuencia del estrés oxidativo provocado por los contaminantes. Basándonos en los cambios observados, se podrían proponer varias hipótesis al respecto. Por una parte, la oxidación reversible de tioles de algunas proteínas podría constituir un mecanismo temprano de respuesta que permite a los animales sobrevivir bajo condiciones de estrés oxidativo en zonas contaminadas. Por otra parte, la oxidación de algunas proteínas podría constituir un mecanismo regulador que detecta e integra la actividad metabólica general de la célula en respuesta a los cambios ambientales. Estas dos hipótesis representan respuestas homeostáticas normales. Si se consigue vincular los cambios en los niveles de oxidación observados en algunas proteínas directamente con la exposición a un grupo particular de productos químicos (tales como metales de transición), se podrían usar estas respuestas como marcadores de exposición, siendo de gran utilidad en los programas de vigilancia biológica, al ser más rápidos y baratos que las analíticas completas de las muestras de agua. No puede descartarse que estos cambios oxidativos estén afectando a las proteínas y su función hasta que se realicen estudios posteriores que demuestren que efectivamente estos cambios son nocivos para la célula.

Los residuos Cys₁₃ de la ferritina, así como las Cys₇₆ y Cys₁₁₈ de la nucleósido difosfato quinasa son susceptibles de oxidación reversible, lo que pone de manifiesto su participación en los procesos redox en que están implicadas estas proteínas.

4.6. Referencias

1. Rudyk, O.; Eaton, P., Biochemical methods for monitoring protein thiol redox states in biological systems. *Redox Biology* 2014, 2, 803-813.
2. Ketten, S.; Chou, C. C.; van Duin, A. C.; Buehler, M. J., Tunable nanomechanics of protein disulfide bonds in redox microenvironments. *J Mech Behav Biomed Mater* 2012, 5, (1), 32-40.
3. Lander, E. S.; Linton, L. M.; Birren, B., *et al.*, Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001, 409, (6822), 860-921.
4. Wani, R.; Nagata, A.; Murray, B. W., Protein redox chemistry: post-translational cysteine modifications that regulate signal transduction and drug pharmacology. *Front Pharmacol* 2014, 5: 224.
5. Coppo, L.; Priora, R.; Salzano, S.; Ghezzi, P.; Simplicio, P., Quantification of Global Protein Disulfides and Thiol-Protein Mixed Disulfides to Study the Protein Dethiolation Mechanisms. *Am. J. Anal Chem* 2013, 4, 9-19.
6. Hansen, R. E.; Roth, D.; Winther, J. R., Quantifying the global cellular thiol-disulfide status. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, 106, (2), 422-7.
7. Bonetto, V.; Ghezzi, P.-. Thiol-disulfide oxidoreduction of protein cysteines: old methods revisited for proteomics. 2006.
8. Charles, R.; Jayawardhana, T.; Eaton, P., Gel-based methods in redox proteomics. *Biochim. Biophys. Acta - General Subjects* 2014, 1840, (2), 830-837.
9. Chiappetta, G.; Ndiaye, S.; Igbaria, A.; Kumar, C.; Vinh, J.; Toledano, M. B., Chapter 10 - Proteome Screens for Cys Residues Oxidation: The Redoxome. In *Methods in enzymology*, Enrique, C.; Lester, P., Eds. Academic Press: 2010; Vol. Volume 473, pp 199-216.
10. Chouchani, E. T.; James, A. M.; Fearnley, I. M.; Lilley, K. S.; Murphy, M. P., Proteomic approaches to the characterization of protein thiol modification. *Curr Opin Chem Biol* 2011, 15, (1), 120-128.
11. Eaton, P., Protein thiol oxidation in health and disease: Techniques for measuring disulfides and related modifications in complex protein mixtures. *Free Radical Bio Med* 2006, 40, (11), 1889-1899.
12. Thamsen, M.; Jakob, U., The redoxome: Proteomic analysis of cellular redox networks. *Curr. Opinion . Chem.Biol.* 2011, 15, (1), 113-119.
13. Ying, J.; Clavreul, N.; Sethuraman, M.; Adachi, T.; Cohen, R. A., Thiol oxidation in signaling and response to stress: detection and quantification of physiological and pathophysiological thiol modifications. *Free Radic Biol Med* 2007, 43, (8), 1099-108.
14. Butterfield, D. A.; Gu, L.; Domenico, F. D.; Robinson, R. A. S., Mass spectrometry and redox proteomics: Applications in disease. *Mass Spectrom Rev* 2014, 33, (4), 277-301.
15. Butterfield, D. A.; Dalle-Donne, I., Redox proteomics: from protein modifications to cellular dysfunction and disease. *Mass Spectrom Rev* 2014, 33, (1), 1-6.
16. Butterfield, D. A.; Dalle-Donne, I., Redox proteomics. *Antioxid Redox Signal* 2012, 17, (11), 1487-9.
17. Company, R.; Torreblanca, A.; Cajaraville, M.; Bebianno, M. J.; Sheehan, D., Comparison of thiol subproteome of the vent mussel *Bathymodiolus azoricus* from different Mid-Atlantic Ridge vent sites. *Sci. Total Environ* 2012, 437, 413-421.
18. Janssen-Heininger, Y. M. W.; Mossman, B. T.; Heintz, N. H.; Forman, H. J.; Kalyanaraman, B.; Finkel, T.; Stamler, J. S.; Rhee, S. G.; van der Vliet, A., Redox-based regulation of signal transduction: Principles, pitfalls, and promises. *Free Radical Biol. Med.* 2008, 45, (1), 1-17.
19. Fuentes-Almagro, C. A.; Prieto-Alamo, M. J.; Pueyo, C.; Jurado, J., Identification of proteins containing redox-sensitive thiols after PRDX1, PRDX3 and GCLC silencing and/or glucose oxidase treatment in Hepa 1-6 cells. *J Proteomics* 2012, 77, 262-79.
20. Hampton, M. B.; Baty, J. W.; Winterbourn, C. C., Use of a Proteomic Technique to Identify Oxidant-Sensitive Thiol Proteins in Cultured Cells. In *Redox Proteomics*, John Wiley & Sons, Inc.: 2006; pp 253-265.
21. Pérez, V. I.; Pierce, A.; de Waal, E. M.; Ward, W. F.; Bokov, A.; Chaudhuri, A.; Richardson, A., Chapter 8 - Detection and Quantification of Protein Disulfides in Biological Tissues: A Fluorescence-Based Proteomic Approach. In *Methods in enzymology*, Enrique, C.; Lester, P., Eds. Academic Press: 2010; Vol. Volume 473, pp 161-177.
22. Minard, K. I.; Carroll, C. A.; Weintraub, S. T.; McAlister-Henn, L., Changes in disulfide bond content of proteins in a yeast strain lacking major sources of NADPH. *Free Radical Bio Med* 2007, 42, (1), 106-117.
23. Scaloni, A., Mass Spectrometry Approaches for the Molecular Characterization of Oxidatively/Nitrosatively Modified Proteins. In *Redox Proteomics*, John Wiley & Sons, Inc.: 2006; pp 59-99.
24. Braconi, D.; Bernardini, G.; Santucci, A., Linking protein oxidation to environmental pollutants: Redox proteomic approaches. *J Proteomics* 2011, 74, (11), 2324-2337.
25. Dowling, V. A.; Sheehan, D., Proteomics as a route to identification of toxicity targets in environmental toxicology. *Proteomics* 2006, 6, (20), 5597-5604.
26. Abril, N.; Chicano-Galvez, E.; Michan, C.; Pueyo, C.; Lopez-Barea, J., iTRAQ analysis of hepatic proteins in free-living *Mus spretus* mice to assess the contamination status of areas surrounding Donana National Park (SW Spain). *Sci Total Environ* 2015, 523, 16-27.

27. Vioque-Fernández, A.; de Almeida, E. A.; López-Barea, J., Esterases as pesticide biomarkers in crayfish (*Procambarus clarkii*, Crustacea): Tissue distribution, sensitivity to model compounds and recovery from inactivation. *Comp.Biochem.Physiol. Part C: Toxicology & Pharmacology* 2007, 145, (3), 404-412.
28. Vioque-Fernández, A.; de Almeida, E. A.; Ballesteros, J.; Garcia-Barrera, T.; Gomez-Ariza, J. L.; Lopez-Barea, J., Donana National Park survey using crayfish (*Procambarus clarkii*) as bioindicator: esterase inhibition and pollutant levels. *Toxicol. Lett.* 2007, 168, (3), 260-8.
29. Vioque-Fernández, A.; Alves de Almeida, E.; López-Barea, J., Assessment of Doñana National Park contamination in *Procambarus clarkii*: Integration of conventional biomarkers and proteomic approaches. *Sci.Total Environ.* 2009, 407, (5), 1784-1797.
30. Osuna-Jiménez, I.; Abril, N.; Vioque-Fernández, A.; Gómez-Ariza, J. L.; Prieto-Álamo, M.-J.; Pueyo, C., The environmental quality of Doñana surrounding areas affects the immune transcriptional profile of inhabitant crayfish *Procambarus clarkii*. *Fish Shellfish Immunol* 2014, 40, (1), 136-145.
31. Sheehan, D.; McDonagh, B.; Barcena, J. A., Redox proteomics. *Expert Rev Proteomics* 2010, 7, (1), 1-4.
32. Levine, R. L.; Williams, J. A.; Stadtman, E. R.; Shacter, E., Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Meth. Enzymol.* 1994, 233, 346-357.
33. Bennaars-Eiden, A.; Higgins, L.; Hertz, A. V.; Kapphahn, R. J.; Ferrington, D. A.; Bernlohr, D. A., Covalent modification of epithelial fatty acid-binding protein by 4-hydroxynonenal in vitro and in vivo. Evidence for a role in antioxidant biology. *J Biol Chem* 2002, 277, (52), 50693-702.
34. López-Barea, J., Biomarkers in Ecotoxicology: an Overview. In *Toxicology in Transition*, Degen, G.; Seiler, J.; Bentley, P., Eds. Springer Berlin Heidelberg: 1995; Vol. 17, pp 57-79.
35. Romero-Ruiz, A.; Carrascal, M.; Alhama, J.; Gomez-Ariza, J. L.; Abian, J.; Lopez-Barea, J., Utility of proteomics to assess pollutant response of clams from the Donana bank of Guadalquivir Estuary (SW Spain). *Proteomics* 2006, 6 Suppl 1, S245-55.
6. Sanchez Lopez, F. J.; Gil Garcia, M. D.; Martinez Vidal, J. L.; Aguilera, P. A.; Garrido Frenich, A., Assessment of metal contamination in Donana National Park (Spain) using crayfish (*Procambarus clarkii*). *Environ Monit Assess* 2004, 93, (1-3), 17-29.
37. Vioque-Fernández, A.; de Almeida, E. A.; Lopez-Barea, J., Biochemical and proteomic effects in *Procambarus clarkii* after chlorpyrifos or carbaryl exposure under sublethal conditions. *Biomarkers* 2009, 14, (5), 299-310.
38. Abril, N.; Ruiz-Laguna, J.; Osuna-Jimenez, I.; Vioque-Fernández, A.; Fernández-Cisnal, R.; Chicano-Galvez, E.; Alhama, J.; Lopez-Barea, J.; Pueyo, C., Omic approaches in environmental issues. *J Toxicol Environ Health A* 2011, 74, (15-16), 1001-19.
39. McDonagh, B.; Tyther, R.; Sheehan, D., Carbonylation and glutathionylation of proteins in the blue mussel *Mytilus edulis* detected by proteomic analysis and Western blotting: Actin as a target for oxidative stress. *Aquat Toxicol* 2005, 73, (3), 315-326.
40. Welch, K. D.; Davis, T. Z.; Van Eden, M. E.; Aust, S. D., Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. *Free Radical Bio Med* 2002, 32, (7), 577-583.
41. Koorts, A. M.; Viljoen, M., Ferritin and ferritin isoforms I: Structure-function relationships, synthesis, degradation and secretion. *Arch Physiol Biochem* 2007, 113, (1), 30-54.
42. Arosio, P.; Levi, S., Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage. *Free Radical Bio Med* 2002, 33, (4), 457-463.
43. Carmona, U.; Zhang, L.; Li, L.; Munchgesang, W.; Pippel, E.; Knez, M., Tuning, inhibiting and restoring the enzyme mimetic activities of Pt-apoferritin. *Chem Commun (Camb)* 2014, 50, (6), 701-3.
44. Salgado, J. C.; Olivera-Nappa, A.; Gerdtsen, Z. P.; Tapia, V.; Theil, E. C.; Conca, C.; Nuñez, M. T., Mathematical modeling of the dynamic storage of iron in ferritin. *BMC Systems Biology* 2010, 4, (1), 1-15.
45. Torti, F. M.; Torti, S. V., Regulation of ferritin genes and protein. *Blood* 2002, 99, (10), 3505-16.
46. Yoon, J. H.; An, S. H.; Kyeong, I. G.; Lee, M. S.; Kwon, S. C.; Kang, J. H., Oxidative modification of ferritin induced by hydrogen peroxide. *BMB Rep* 2011, 44, (3), 165-9.
47. Rudeck, M.; Volk, T.; Sitte, N.; Grune, T., Ferritin oxidation in vitro: implication of iron release and degradation by the 20S proteasome. *IUBMB Life* 2000, 49, (5), 451-6.
48. Wilkinson, B.; Gilbert, H. F., Protein disulfide isomerase. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins and Proteomics* 2004, 1699, (1-2), 35-44.
49. Nakamura, T.; Lipton, S. A., S-nitrosylation of critical protein thiols mediates protein misfolding and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Antioxid Redox Signal* 2011, 14, (8), 1479-92.
50. Tew, K. D.; Manevich, Y.; Grek, C.; Xiong, Y.; Uys, J.; Townsend, D. M., The role of glutathione S-transferase P in signaling pathways and S-glutathionylation in cancer. *Free Radical Bio Med* 2011, 51, (2), 299-313.
51. Na, K. S.; Park, B. C.; Jang, M.; Cho, S.; Lee do, H.; Kang, S.; Lee, C. K.; Bae, K. H.; Park, S. G., Protein disulfide isomerase is cleaved by caspase-3 and -7 during apoptosis. *Mol Cells* 2007, 24, (2), 261-7.
52. Kaplan, A.; Gaschler, M. M.; Dunn, D. E.; Colligan, R.; Brown, L. M.; Palmer, A. G., 3rd; Lo, D. C.; Stockwell, B. R., Small molecule-induced oxidation of

- protein disulfide isomerase is neuroprotective. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015, 112, (17), E2245-52.
53. Grek, C.; Townsend, D. M., Protein Disulfide Isomerase Superfamily in Disease and the Regulation of Apoptosis. *Endoplasmic Reticulum Stress Dis* 2014, 1, (1), 4-17.
 54. Toichi, K.; Yamanaka, K.; Furukawa, Y., Disulfide Scrambling Describes the Oligomer Formation of Superoxide Dismutase (SOD1) Proteins in the Familial Form of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *The J. Biol. Chem.* 2013, 288, 4970-4980.
 55. Walker, A. K.; Farg, M. A.; Bye, C. R.; McLean, C. A.; Horne, M. K.; Atkin, J. D., Protein disulphide isomerase protects against protein aggregation and is S-nitrosylated in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 2010, 133, (Pt 1), 105-16.
 56. Yamakura, F.; Kawasaki, H., Post-translational modifications of superoxide dismutase. *Biochim Biophys Acta* 2010, 1804, (2), 318-25.
 57. Wilcox, K. C.; Zhou, L.; Jordon, J. K.; Huang, Y.; Yu, Y.; Redler, R. L.; Chen, X.; Caplow, M.; Dokholyan, N. V., Modifications of superoxide dismutase (SOD1) in human erythrocytes: a possible role in amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* 2009, 284, (20), 13940-7.
 58. Dalle-Donne, I.; Rossi, R.; Milzani, A.; Di Simpicio, P.; Colombo, R., The actin cytoskeleton response to oxidants: from small heat shock protein phosphorylation to changes in the redox state of actin itself. *Free Radical Bio Med* 2001, 31, (12), 1624-1632.
 59. Wilson, C.; Gonzalez-Billault, C., Regulation of cytoskeletal dynamics by redox signaling and oxidative stress: implications for neuronal development and trafficking. *Front Cell Neurosci* 2015, 9.
 60. Go, Y. M.; Orr, M.; Jones, D. P., Actin cytoskeleton redox proteome oxidation by cadmium. *American journal of physiology. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2013.
 61. Papakonstanti, E. A.; Stourmaras, C., Cell responses regulated by early reorganization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett* 2008, 582, (14), 2120-2127.
 62. Terman, J. R.; Kashina, A., Post-translational modification and regulation of actin. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2013, 25, (1), 30-38.
 63. Sakai, J.; Li, J.; Subramanian, Kulandayan K., *et al.*, Reactive Oxygen Species-Induced Actin Glutathionylation Controls Actin Dynamics in Neutrophils. *Immunity* 2012, 37, (6), 1037-1049.
 64. Choong, G.; Liu, Y.; Xiao, W.; Templeton, D. M., Cadmium-induced glutathionylation of actin occurs through a ROS-independent mechanism: Implications for cytoskeletal integrity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2013, 272, (2), 423-430.
 65. Salas-Leiton, E.; Canovas-Conesa, B.; Zerolo, R.; Lopez-Barea, J.; Canavate, J. P.; Alhama, J., Proteomics of juvenile senegal sole (*Solea senegalensis*) affected by gas bubble disease in hyperoxygenated ponds. *Mar Biotechnol (NY)* 2009, 11, (4), 473-87.
 66. Shenton, D.; Grant, C. M., Protein S-thiolation targets glycolysis and protein synthesis in response to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J* 2003, 374, (Pt 2), 513-519.
 67. Ritterson Lew, C.; Tolan, D. R., Aldolase sequesters WASP and affects WASP/Arp2/3-stimulated actin dynamics. *J Cell Biochem* 2013, 114, (8), 1928-39.
 68. Wojtera-Kwiczor, J.; Gross, F.; Leffers, H. M.; Kang, M.; Schneider, M.; Scheibe, R., Transfer of a Redox-Signal through the Cytosol by Redox-Dependent Microcompartmentation of Glycolytic Enzymes at Mitochondria and Actin Cytoskeleton. *Front Plant Sci* 2012, 3, 284.
 69. Esteves, A.; Ehrlich, R., Invertebrate intracellular fatty acid binding proteins. *Comp. Biochem Physiol. Part C: Toxicol. & Pharmacol.* 2006, 142, (3-4), 262-274.
 70. Zimmerman, A. W.; Veerkamp, J. H., New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins. *Cell Mol Life Sci* 2002, 59, (7), 1096-116.
 71. Cheng, L.; Jin, X. K.; Li, W. W.; Li, S.; Guo, X. N.; Wang, J.; Gong, Y. N.; He, L.; Wang, Q., Fatty acid binding proteins FABP9 and FABP10 participate in antibacterial responses in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *PLoS One* 2013, 8, (1), e54053.
 72. Wang, G.; Bonkovsky, H. L.; de Lemos, A.; Burczynski, F. J., Recent insights into the biological functions of liver fatty acid binding protein 1. *J. Lipid Res.* 2015, 56, (12), 2238-2247.
 73. Pasquevich, M. Y.; Dreon, M. S.; Gutierrez Rivera, J. N.; Vazquez Boucard, C.; Heras, H., Effect of crude oil petroleum hydrocarbons on protein expression of the prawn *Macrobrachium borellii*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2013, 157, (4), 390-6.
 74. Tomanek, L., Environmental Proteomics: Changes in the Proteome of Marine Organisms in Response to Environmental Stress, Pollutants, Infection, Symbiosis, and Development. *Ann Rev Mar Sci* 2010, 3, (1), 373-399.
 75. Postel, E., Multiple Biochemical Activities of NM23/NDP Kinase in Gene Regulation. *J Bioenerg Biomembr* 2003, 35, (1), 31-40.
 76. Kim, M. S.; Jeong, J.; Shin, D. H.; Lee, K. J., Structure of Nm23-H1 under oxidative conditions. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2013, 69, (Pt 4), 669-80.
 77. Lee, E.; Jeong, J.; Kim, S. E.; Song, E. J.; Kang, S. W.; Lee, K. J., Multiple functions of Nm23-H1 are regulated by oxido-reduction system. *PLoS One* 2009, 4, (11), e7949.

CAPÍTULO 5

**ANÁLISIS
PROTEÓMICO
DE LA RESPUESTA
DE *P. CLARKII*
A CONTAMINACIÓN
AMBIENTAL**

5.1. Resumen

Los estudios precedentes mostraron una situación de estrés oxidativo los animales capturados en estas zonas, reflejada en un aumento de los niveles de peroxidación lipídica y oxidación (carbonilación y formación de disulfuros) de proteínas. La intensidad de estos daños se correlacionó directamente con la bioacumulación de metales y así, la glándula digestiva y los animales de MAT, con la mayor cantidad de metales y metaloides, presentaron los mayores niveles de daños en lípidos y proteínas.

El presente estudio pretende determinar las alteraciones funcionales causadas por dicha situación de estrés oxidativo, analizando los cambios en la abundancia de proteínas. Con este estudio proteómico se pretende lograr una información global de los niveles de expresión proteica y de su adaptación a las condiciones ambientales de los animales estudiados. Esto permitirá obtener una visión más profunda de las respuestas moleculares inducidas por la toxicidad de los contaminantes. Se ha usado la metodología 2D-DIGE, que usa electroforesis bidimensional para el análisis cuantitativo de las proteínas diferencialmente expresadas en animales capturados en PAR y MAT, utilizando como referencias ejemplares capturados en LP. El estudio se ha llevado a cabo en glándula digestiva, un órgano con alta actividad metabólica, pero también implicado en respuesta inmune y otras situaciones de estrés, y en branquias, el órgano que permite a estos animales el intercambio gaseoso y la captación de alimento.

En animales procedentes de las zonas PAR y MAT se encontraron cambios de abundancia en proteínas relacionadas con estrés oxidativo, incluyendo proteínas implicadas en estrés del retículo endoplásmico, otras que indicaban disfunción mitocondrial y otras relacionadas con procesos inflamatorios y de regulación epigenética de la expresión génica. Se observaron también diferencias en la abundancia de proteínas que indicaban un cambio metabólico hacia una elevada glucólisis aerobia (efecto Warburg), probablemente encaminada a generar ATP y poder reductor (NADPH) en una situación de estrés oxidativo que altera la integridad de las membranas mitocondriales y, en consecuencia, disminuye o anula su potencial eléctrico. Estas proteínas diferencialmente expresadas, además de permitir identificar los procesos metabólicos y fisiológicos alterados por los contaminantes, podrían ser utilizadas como biomarcadores de presencia de contaminantes perjudiciales, aunque estén en pequeñas concentraciones, en el medio.

5.2. Introducción

A lo largo de esta Tesis se ha mostrado la amplia presencia de contaminantes peligrosos en el medio y el serio problema que suponen para los ecosistemas y sus habitantes y, por ello, para la sociedad, los científicos y los gobernantes de todo el planeta.

En las secciones anteriores se ha demostrado la existencia de estrés oxidativo en glándula digestiva y branquias de *P. clarkii* capturados en las zonas de PAR y MAT. Sus niveles de peroxidación lipídica concuerdan con la acumulación de metales en sus tejidos (Cap. 1). También hemos encontrado que muchas de sus proteínas están oxidadas reversible o irreversiblemente (Capítulos 3 y 4), lo que sin duda debe repercutir en la homeostasis de los animales. Para dilucidar las alteraciones metabólicas causadas por esta situación de estrés oxidativo en los cangrejos PAR y MAT, hemos realizado también un análisis proteómico en estos tejidos para analizar los cambios en la abundancia de proteínas que causa el habitar en zonas contaminadas.

El proteoma es una trama dinámica y compleja que responde rápidamente a cambios en el medio, y muchas veces independientemente del genoma, i.e., sin necesidad de la transcripción. Esto se consigue por la multifuncionalidad de muchas proteínas, numerosas modificaciones post-traduccionales (PTMs) e interacciones entre ellas. Los análisis proteómicos son una poderosa herramienta en los estudios medioambientales que permiten profundizar en los mecanismos de toxicidad, descubrir nuevas proteínas implicadas en la defensa celular, e identificar nuevos biomarcadores de exposición a contaminación^{1, 2-4}. Sin embargo, se enfrentan a problemas como el hecho de que la mayoría de los organismos bioindicadores de interés ecológico están poco representados en las bases de datos de secuencias de genes o proteínas. Esto dificulta mucho la identificación de las proteínas, basada en combinar la espectrometría de masas con la búsqueda en bases de datos de genoma secuenciados, aunque no ha frenado a nuestro grupo y a otros a utilizar la proteómica para analizar los mecanismos moleculares de toxicidad de los contaminantes y de adaptación de los organismos a la contaminación³⁻¹³.

En la introducción se han revisado algunas de las aproximaciones proteómicas utilizadas en la actualidad. Entre ellas, las basadas en 2-DE siguen siendo una estupenda aproximación *top-down* (se empieza con la proteína íntegra, que se separa y luego se fragmenta en la trampa iónica), principalmente porque resuelve miles de especies

proteicas intactas en una sola carrera, permitiendo el análisis simultáneo del proteoma completo, incluyendo isoformas y modificaciones post-traduccionales¹⁴⁻¹⁶. En este trabajo se ha usado la metodología 2D-DIGE, versión avanzada de la proteómica que usa electroforesis bidimensional, para el análisis cuantitativo de las proteínas diferencialmente expresadas en animales capturados en PAR y MAT, usando los de LP como referencia. El estudio se ha realizado en glándula digestiva, un órgano con alta actividad metabólica, implicado en la respuesta inmune y otras situaciones de estrés, y en branquias, órgano que les permite el intercambio gaseoso y la captación de alimento. La metodología 2D-DIGE usa diferentes fluoróforos para marcar dos muestras que serán posteriormente separadas por 2-DE en un mismo gel. El uso de un estándar interno marcado con un tercer fluoróforo y cargado junto a las muestras en cada gel analítico, permite encajar y la normalizar la señal e intensidad de los spots entre geles. La estandarización permite detectar cambios pequeños con significación estadística en la abundancia de las proteínas, e identificar proteínas relevantes en el proceso biológico en estudio, que pueden ser usadas como alertas tempranas de la presencia de contaminantes perjudiciales, aunque estén en pequeñas concentraciones, en el medio.

Con este estudio proteómico se ha pretendido obtener una información global sobre los niveles de expresión proteica para identificar las alteraciones metabólicas que causan los contaminantes en los animales estudiados, así como las respuestas biológicas que permiten al organismo adaptarse a vivir en presencia de contaminación en el medio.

5.3. Materiales y métodos

5.3.1. Muestras utilizadas.

Se analizaron glándula digestiva y branquias de cangrejos *P. clarkii*. Se prepararon cuatro mezclas por sitio de muestreo (LP, la zona de referencia y las zonas contaminadas PAR y MAT) mezclando iguales cantidades de tejido homogeneizado de 3-4 cangrejos por pool. Las tres mezclas por sitio se consideraron réplicas biológicas (RB) en las diferentes determinaciones (Tabla 5.1)

Table 5.1 Distribution of the fourteen *P. clarkii* male individuals captured in each site into four pools/site. The length and weight of each animal and the weights of their digestive gland and gills are also shown.

Pool	Lucio delPalacio (LDP)				El Partido (PAR)				ElMatochal (MAT)				
	animal length (cm)	weight (g)			animal length (cm)	weight (g)			animal length (cm)	weight (g)			
		complete animal	digestive gland	gills		complete animal	digestive gland	gills		complete animal	digestive gland	gills	
1	9,50	26,49	1,72	0,89	8,00	14,70	0,40	0,79	10,50	31,60	2,25	1,48	
	9,45	23,55	1,24	0,94	10,00	24,11	0,98	1,18	8,80	20,13	1,31	0,69	
	9,30	27,31	1,67	1,02	10,50	33,40	1,32	1,26	9,00	25,85	1,23	1,09	
	average	9,42	25,78	1,54	0,95	9,50	24,07	0,90	1,08	9,43	25,86	1,60	1,09
	SEM	0,06	1,14	0,15	0,04	0,76	5,40	0,27	0,15	0,54	3,31	0,33	0,23
2	9,50	29,25	2,18	1,01	8,00	12,30	0,65	0,50	10,00	30,10	1,99	0,97	
	9,50	31,11	1,75	1,15	9,80	26,46	1,19	1,23	9,60	36,81	1,13	1,22	
	9,30	26,67	1,52	1,20	10,50	40,01	1,46	2,08	9,00	27,16	1,03	1,09	
	average	9,43	29,01	1,82	1,12	9,43	26,26	1,10	1,27	9,53	31,36	1,38	1,09
	SEM	0,07	1,29	0,19	0,06	0,74	8,00	0,24	0,46	0,29	2,86	0,30	0,07
3	9,50	24,68	2,18	1,01	9,00	22,50	0,88	0,85	9,00	23,02	0,88	0,89	
	9,50	27,20	1,59	1,35	8,50	15,73	0,70	0,69	8,50	18,30	1,16	0,63	
	9,30	19,40	1,51	1,10	9,20	23,90	1,23	1,83	10,00	35,66	1,52	0,69	
	9,20	19,20	1,16	0,71	10,50	41,00	1,30	1,65	8,50	19,60	0,74	0,66	
	average	9,38	22,62	1,61	1,04	9,30	25,78	1,03	1,25	9,00	24,15	1,08	0,72
SEM	0,08	1,99	0,21	0,13	0,43	5,38	0,14	0,28	0,35	3,97	0,17	0,06	
4	9,50	23,60	1,39	1,11	8,50	17,20	0,64	0,82	9,00	17,53	1,39	0,92	
	9,40	29,32	1,59	0,88	8,50	23,00	0,70	1,05	8,50	19,00	1,23	0,67	
	9,20	23,67	1,07	1,03	10,50	36,60	1,09	1,95	10,40	40,70	1,08	1,57	
	9,00	22,56	2,95	1,12	9,00	17,33	0,93	0,81	8,50	20,45	0,83	0,83	
	average	9,28	24,79	1,75	1,03	9,13	23,53	0,84	1,16	9,10	24,42	1,13	1,00
SEM	0,11	1,53	0,41	0,06	0,47	4,56	0,11	0,27	0,45	5,46	0,12	0,20	

5.3.2. Preparación de muestras para proteómica.

Todo el proceso se realizó a 4 °C, extremando el cuidado para evitar la contaminación de las muestras. La homogenización de las muestras se hizo manualmente con pistilo, triturando 100 mg de cada una en 200 µl de Tris-HCl 20 mM, pH 7,6 con sacarosa 0,5 M y KCl 0,15 M y suplementado con DTT (50 µg/mL), PMSF 1mM, leupeptina 0,006 mM, y un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma Protease Inhibitor P2714), que contenía AEBSF, EDTA, bestatina, E-64, leupeptina y aprotinina, siguiendo las instrucciones del fabricante. La rotura se realizó en tres periodos de 30s separados por periodos de 30s en hielo. Los homogenizados se centrifugaron (14.000 g, 10 min) a

continuación tres veces sucesivas para eliminar los restos subcelulares y lípidos presentes en ellos. El sobrenadante se incubó con benzonasa (500 U/mL) durante 30 min para eliminar los ácidos nucleicos y se centrifugó (1 h a 100.000 g, ultracentrífuga Optima™ TLX Ultracentrifuge, Beckman, rotor TLA-120.2) para obtener la fracción citosólica.

Tras la extracción, los extractos se limpiaron con *2D Clean-up Kit* (Amersham), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, a 100 µL de extracto se añadieron 300 µL de solución precipitante, para hacer las proteínas insolubles y tras incubarlo en hielo durante 15 min, se añadieron otros 300 µL de solución co-precipitante, que favorecen la precipitación de las proteínas. Se centrifugaron las mezclas (12.000 g, 5 min) y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se lavó con 40 µL de co-precipitante y se resuspendió en 25 µL de agua destilada. Se añadió 1 mL de tampón de lavado (-20 °C) y 5 µL de aditivo de lavado y se incubó la mezcla a -20°C, durante al menos 30 min, agitando brevemente en el vortex cada 10 min. De nuevo se centrifugó (12.000 g, 5 min) y se dejó secar el precipitado. Una vez seco, el precipitado se resuspendió en tampón de lisis (urea 8 M, Tris 30 mM, CHAPS 4%) adecuado para isoelectroenfoque y se ajustó el pH a 8,5 con sosa. Posteriormente se determinó la concentración de proteína mediante *2D-Quant Kit* (GE Healthcare). Se preparó un estándar interno mezclando cantidades iguales de todas las muestras de proteínas.

5.3.3. Marcaje fluorescente de proteínas.

El kit de marcaje *CyDye DIGE fluor lysine minimal labeling kit* (GE Healthcare Bio-Sciences) se dejó 5 min a temperatura ambiente y se añadió 5 µL de dimetilformamida (DMF) a cada tubo de fluoróforo Cy2, Cy3, Cy5 (concentración final 1 nmol/µL) y se preparó una solución de trabajo 400 pmol/ µL. Para el marcaje fluorescente, se mezclaron 50 µg de cada una de las cuatro replicas por zona se marcaron con 1 µL (400 pmol) de los fluoróforos Cy3 o Cy5, dos a dos. Para el estándar interno se reservó el fluoróforo Cy2. Tras 30 min. a 4 °C, la reacción de marcaje se paró añadiendo 1 µL de lisina 10 mM. Una vez marcadas, las muestras se mezclaron en un mismo tubo con el estándar interno (IS) según el esquema mostrado en la Tabla 5.2.

Table 5.2. Experimental design using CyDye DIGE fluor minimal dyes. Four independent pools per sampling site were prepared by mixing equal amounts of homogenized tissue of 3-4 crayfish per pool and each two marked with Cy3 or Cy5 and combined in each gel as indicated. The internal standar was marked with Cy2 in all cases.

Gel Number	CyDye™		
	Cy2	Cy3	Cy5
1	IS	LP1	MAT1
2	IS	LP2	PAR1
3	IS	MAT2	LP3
4	IS	PAR2	LP4
5	IS	MAT3	PAR3
6	IS	PAR4	MAT4

5.3.4. Separación de proteínas mediante 2DE-DIGE

Isoelectroenfoque: Para llevar a cabo la primera separación de proteínas por IEF, se usaron tiras de gradiente de pH inmovilizado (IPG) (pH lineal de 4 a 7 de 24 cm) (GE Healthcare) que se rehidrataron durante la noche a 20°C con 390 µL de solución de rehidratación *DeStreak* (GE Healthcare) que contiene 2% w/v de tampón IPG pH 4-7. Las muestras luego se mezclaron con un volumen igual de tampón urea 8 M con CHAPS 2%, IPG-Buffer pH 3-10 al 2% y DTT 130 mM y se incubaron 30 min a temperatura ambiente para conseguir la desnaturalización completa de las proteínas. Seguidamente, las proteínas desnaturalizadas se cargaron en las tiras de IPG a aproximadamente 1 cm del cátodo mediante la técnica de *cup-loading*, esto es, aplicando la muestra sobre el extremo básico de la tira previamente hidratada, que mejora la resolución y el enfoque de proteínas con puntos isoeléctricos extremos. Tras 6 h de rehidratación activa (50 V), el IEF se llevó a cabo a 20°C en una *Protean isoelectrofocusing cell* (BioRad). El voltaje se elevó gradualmente, alcanzándose valores de 500, 1.000, 2.000, 4.000, 6.000 y 8.000 V mediante rampas lineales de 90 min cada una (Tabla 5.3). Se mantuvo luego este voltaje hasta alcanzar 55.000 Vh en rampa rápida y una resistencia contante de 50 µA/tira La tabla 5.3 recoge las condiciones en que se realizó el IEF. Concluido el IEF, las tiras se congelaron a -80 °C.

Table 5.3 IEF conditions used to to separate protein species according to their isoelectric point

Step	Duration (h:min)	Voltage (V)	Ramp
0	6:00	50	Quick
1	1:30	500	Lineal
2	1:30	1000	Lineal
3	1:30	2000	Lineal
4	1:30	4000	Lineal
5	1:30	6000	Lineal
6	1:30	8000	Lineal
7	Up to 55 kVh	8000	Quick

Segunda dimensión: Tras la primera etapa de separación, las tiras, una vez descongeladas, se sumergieron durante 30 min en solución de equilibrado (Tris-HCl 50 mM, pH 8,8; urea 6 M; glicerol 30%; SDS 2%; trazas de azul de bromofenol) que contenía 65 mM de DTT. Luego, las tiras se sumergieron durante otros 20 minutos en solución de equilibrado con IAM 350 mM, para bloquear los grupos tioles de las Cys libres de las proteínas y mejorar la separación. Para la segunda dimensión, las tiras IPG se cargaron en la parte superior de un gel al 12,5% w/v SDS-PAGE, con cristales de baja fluorescencia (GE Helthcare) sellados con agarosa al 0,5%. Las proteínas se separaron en este caso en función a su masa molecular, realizando la electroforesis a 20°C en el equipo *BioRad Protean Plus Dodeca Cell*, primero a 2,5 W por gel durante 5 min y posteriormente 3 W por gel, durante aproximadamente 12-14 h.

5.3.5. Digitalización y análisis de imágenes

La digitalización y análisis de imágenes se realizó con el escáner *Typhoon TRIO* (GE Healthcare) usando el modo *Ettan DIGE Imager* para geles de 24 cm, un tamaño de pixel de 100 μm para obtener gran resolución, y un plano focal de +3 mm, ya que se trabajó con los geles dentro de los cristales. Usando un voltaje de 500 V en el fotomultiplicador, se tomaron tres imágenes para cada gel bajo diferentes condiciones de excitación y emisión de láser. La fluorescencia de Cy2 se detectó con láser de 488 nm y filtro de emisión de 520 nm y BP (paso de banda) de 40; las imágenes de fluorescencia de Cy3 se tomaron con láser de 532 nm y filtro de emisión de 580 nm y BP 30, y las

imágenes de fluorescencia de Cy5 con láser de 633 nm y filtro de emisión de 670 nm y BP30^{17, 18}.

El análisis de las imágenes se hizo con el software *DeCyder* v6.5. Las imágenes se cargaron y se agruparon según la muestra y el gel a la que perteneciera cada una. Se aplicó el módulo DIA (*Differential In-gel Analysis*) para co-detectar y cuantificar la intensidad de cada mancha de proteínas en cada imagen usando como referencia las del patrón interno para normalizarlas. En un segundo paso de análisis se utilizó la herramienta BVA (*Biological Variation Analysis*), que tiene en cuenta la variabilidad inter-geles, para relacionar las manchas entre los distintos geles comparados en el análisis y calcular las diferencias de expresión entre los distintos grupos de estudio. La herramienta BVA determina las intensidades normalizadas (abundancia estándar) de todos los spots proteicos comparándolos con el estándar interno, y proporciona un volumen medio y un valor de *P* relativo, calculado mediante una prueba *t* de Student. Solo se tuvieron en consideración cambios ≥ 2 - ó ≤ 2 veces en la intensidad del spot y un nivel de significación $P < 0.05$.

5.3.6. Identificación de proteínas mediante MALDI-TOF-TOF-MS

Para la identificación de las proteínas correspondientes a los spots seleccionados se hicieron geles preparativos en los que se cargaron 300 μg de proteína del estándar interno. La separación de proteínas se llevó a cabo en las mismas condiciones de los geles DIGE. Terminada la electroforesis, los geles se tiñeron con Sypro Ruby® (BioRad) siguiendo las especificaciones del fabricante y se digitalizaron las imágenes con un *FX Imager* (BioRad). Los spots de interés se escindieron mediante el robot *Investigator™ProPic* (Genomic Solutions) para su análisis por espectrometría de masas. Los fragmentos escindidos se destiñeron usando una disolución 100 mM de bicarbonato amónico y 40% (v/v) acetonitrilo durante 15 min a temperatura ambiente y, al menos, dos pasos posteriores de lavado con 25 mM de bicarbonato amónico con un 50% de acetonitrilo, durante 25 min cada uno hasta que toda la tinción fue eliminada. Las piezas de gel se deshidrataron con acetonitrilo 100% (v/v) durante 5 min, tras lo cual se retiró el compuesto antes de proceder a secarlas usando un Speed-Vac (ThermoElectron). La digestión proteolítica se llevó a cabo con 20 μL de tripsina (12,5 ng/ μL de tripsina en bicarbonato de amonio 25 mM) a 25°C durante 10 min, seguidos de otros 10 min de

tratamiento en un horno de microondas (200 W). La digestión se detuvo mediante la adición de 10 μ L de ácido trifluoroacético (TFA) al 0,5% (v/v). Los péptidos resultantes se purificaron en una estación de *PrepII Pro* (Genomic Solutions) con una microcolumna C18 (ZipTip, Millipore), eluyendo con solución de matriz (5 mg/mL de alfa-ciano-4-hidroxycinnámico en 70% de acetonitrilo y 0,1% de TFA).

El análisis de espectrometría de masas se hizo en un MALDI-TOF/TOF (4800 *Proteomics Analyzer*, Applied Biosystems) en un rango m/z de 800 a 4.000 y a 20 kV de voltaje creciente. Los espectros se calibraron internamente usando las relaciones m/z de los péptidos derivados de auto-digestión de tripsina porcina (MH 842.509, MH 2211.104). La m/z se midió con una precisión de 720 ppm. Los iones peptídicos de mayor intensidad se analizaron por fragmentación MS/MS que da información de la secuencia peptídica. Los espectros obtenidos en el análisis MALDI-TOF-TOF-MS, con umbral de ruido de señal ≥ 10 , se ajustaron a una línea de base, y tras la deconvolución de los perfiles isotópicos, se detectaron los valores de los iones monoisotópicos de cada péptido.

Las masas moleculares de los perfiles de péptidos trípticos se usaron para buscar en la base de datos UniPortKB (<http://www.uniprot.org/uniprot/>) con el software GPS Explorer v2.0 (Applied Biosystems) y la búsqueda de base de datos automatizada, utilizando el motor de búsqueda MASCOT (Matrix Science) sobre bases de datos NCBIInr (*National Center for Biotechnology Information non redundant protein sequences*). Todos los fragmentos de péptidos obtenidos para cada digestión se sometieron a una búsqueda realizada mediante la combinación de péptidos de masas de huellas dactilares (PMF) y los resultados de las fragmentaciones de MS/MS. Se permitió un error de corte por tripsina, una tolerancia de ± 0.2 Da del fragmento, una tolerancia de ± 100 ppm en la masa del péptido precursor. Se incluyeron como modificaciones a tener en cuenta la S-carbamidometilación de cisteínas, la oxidación de las metioninas, la formación de ácido piroglutámico, y la acetilación de N-terminal. Se consideraron identificaciones positivas aquéllas con $P < 0.05$, utilizando el algoritmo MOWSE (Molecular Weight SEarch) score.

5.4. Resultados y discusión

5.4.1. Consideraciones generales sobre la metodología utilizada

El análisis mediante la metodología 2D-DIGE llevado a cabo en glándula digestiva y branquias de cangrejos *P. clarkii* capturados en PAR y MAT ha permitido identificar proteínas con expresión diferencial en estos animales en comparación con los capturados en la zona de referencia LP. La utilización de tres fluoróforos hace posible la comparación en un mismo gel analítico de dos muestras y un estándar (Fig. 5.1), lo que aumenta enormemente la precisión y exactitud de las cuantificaciones.

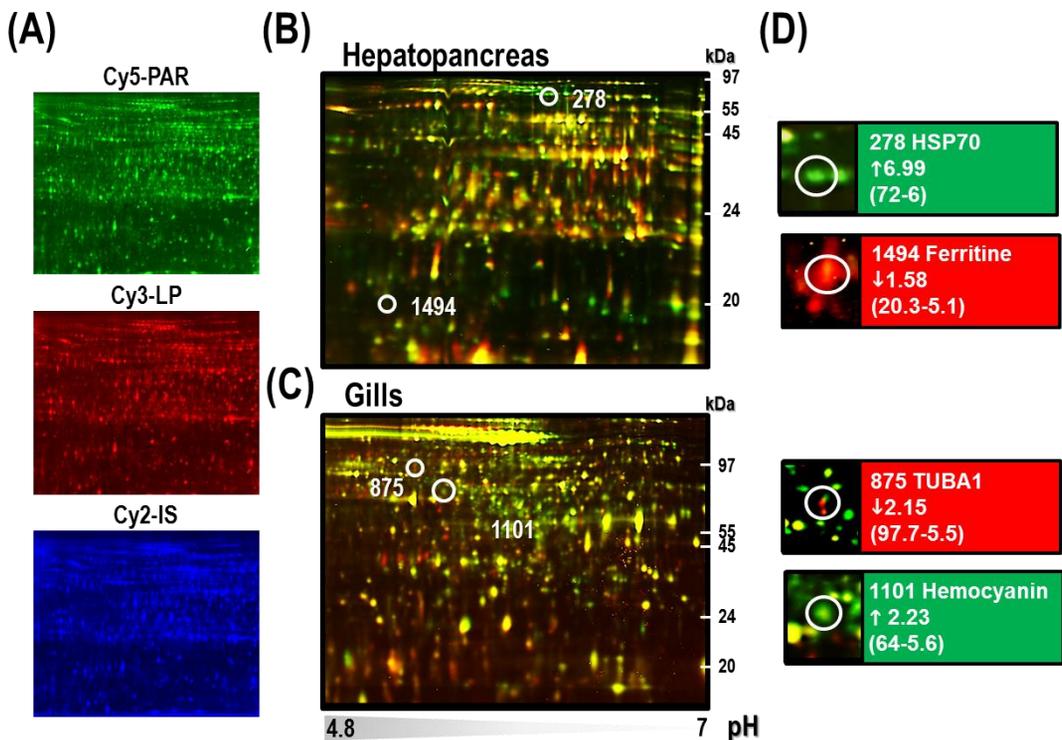


Figure 5.1. 2D-DIGE images showing the proteomes of crayfish from the LP reference site and PAR. Equal amounts of Cy2 (IS, internal standard with equally mixed samples), Cy3 (LP), and Cy5 (PAR) labeled samples were mixed and separated on analytical 2D-DIGE. Gels were scanned and (A) a set of Cy5, Cy3, and Cy2 images were obtained from each gel. An overlay of the three dye scan-images per gel was also obtained for each pair comparison (B and C, for digestive gland and gills, respectively). Spot intensities and relative expression ratios were computed using the DeCyder 6.5 software (Amersham Biosciences). As an example, the circles in (D) mark four spots whose intensity increase (green) or decrease (red) in relation to the IS in PAR crayfish; for these spots are indicated the symbol of the identified protein, the fold-change variation (all significant at a $p \leq 0.05$), and the number assigned; Mw and pI are given in brackets. The remarked spots are highlighted in B and C.

Finalizada la electroforesis, se procedió a la cuantificación de las proteínas usando algoritmos de co-detección (*DeCyder Differential Analysis Software*). De cada gel se obtuvieron tres imágenes: la derivada de la señal Cy2 para el estándar interno y las derivadas de las señales Cy3 y Cy5 para las muestras analizadas. La abundancia proteica de cada spot proteico en cada muestra se expresó como la relación normalizada relativa a la de los spots del estándar interno. El estándar interno presente en cada gel permite llevar a cabo el proceso de superposición de los spots entre los distintos geles. Las relaciones o ratios relativos de los spots individuales frente a la de sus estándares internos se usaron para comparar de manera precisa la abundancia proteica entre las muestras presentes en los diferentes geles. Los datos se filtraron en función de la ratio del volumen medio de cada spot detectado en muestras correspondientes a animales capturados en las zonas PAR o MAT, frente al correspondiente obtenido en animales de la zona control (LP). Solo se tuvieron en consideración aquéllos con cambios ≥ 2 - ó ≤ 2 veces y un nivel de significación $P < 0.05$, determinado mediante una prueba t de Student con la corrección de Bonferroni.

5.4.2. Expresión diferencial de proteínas en cangrejos *P. clarkii* capturados en cada una de las zonas de estudio.

De los aproximadamente 2700 y 1800 spots proteicos que, respectivamente, se detectaron en los geles de glándula digestiva y branquias, 55 y 82 spots cumplieron los requisitos arriba mencionados y se seleccionaron como spots de interés. Un total de setenta y seis spots de proteínas se escindieron de los geles para ser sometidos a digestión enzimática en gel y análisis por espectrometría de masas para su identificación. En la figura 5.2 se muestra un gel de electroforesis bidimensional representativo del proteoma de glándula digestiva en el que se señalan los spots proteicos analizados. De los 76 spots analizados, 29 spots en glándula digestiva y 14 en branquias (el 57%) derivaron en identificaciones satisfactorias, de las que 31 se correspondieron con proteínas únicas.

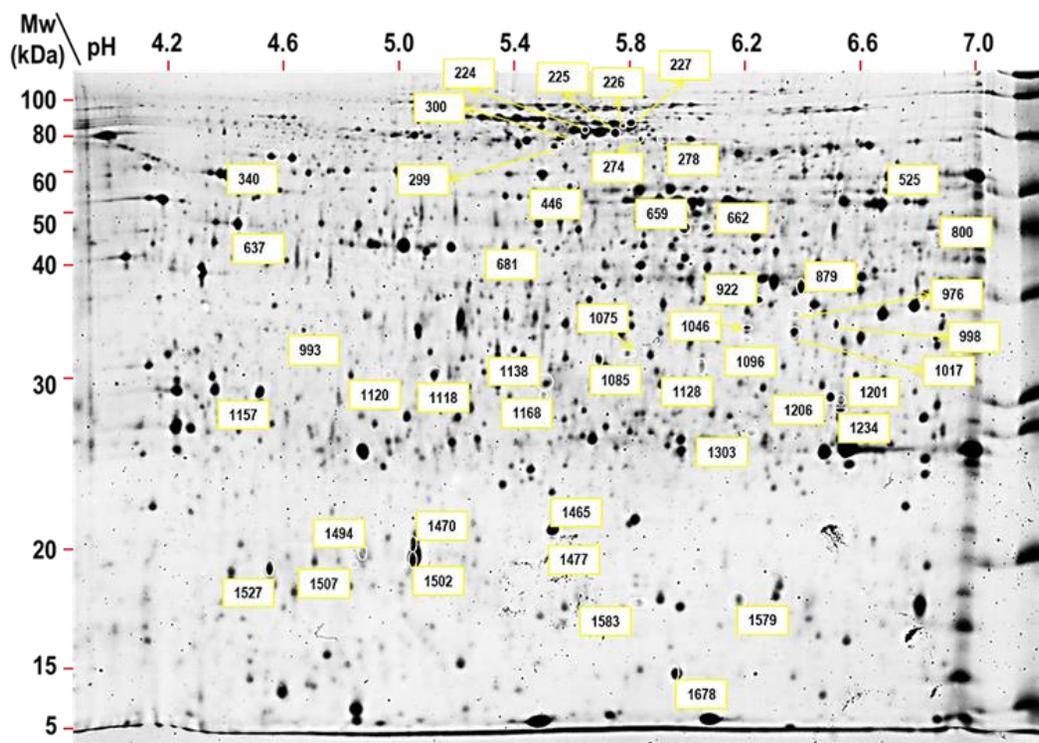


Fig. 5.2. Representative image indicating the excised spots from a digestive gland gel. The relative Mw is given on the left and the pH is given at the top of the figure. Numbers are the codes assigned to each spot.

En las tablas 5.4 y 5.5 aparecen estas proteínas identificadas en glándula digestiva y branquias, respectivamente, junto con los pesos moleculares y puntos isoeléctricos teóricos asignados a cada una de ellas, el porcentaje de cobertura, número de péptidos que se detectó por proteína identificada y el valor de score asignado a cada identificación tras emplear el algoritmo MOWSE que incorpora el motor de búsqueda MASCOT de matrixscience.com, así como con los valores promedio del número de veces de cambio respecto a la muestra de referencia LP.

Los resultados obtenidos en cuanto a número de proteínas desreguladas indicaron que la glándula digestiva resultó más afectada por la polución que las branquias. Estos resultados están de acuerdo con el hecho de que la glándula digestiva es un órgano central en el metabolismo de *P. clarkii*, en el que se llevan a cabo funciones asignadas al intestino, al hígado y al páncreas en mamíferos, y que participa en la destoxicación de

metales. En ambos órganos, el número de proteínas cuya abundancia disminuye por contaminación fue mayor que el de proteínas cuyas cantidades se incrementan. Las proteínas desreguladas en ambos órganos fueron diferentes, excepto en el caso de PDI y hemocianina, que se identificaron tanto en glándula digestiva como en branquias. El sentido del cambio (incremento o descenso) fue el mismo para las proteínas identificadas en muestras de PAR y MAT, aunque la intensidad del cambio fue en general mayor en glándula digestiva de animales PAR y branquias de animales MAT.

Se encontraron varias proteínas en diferentes isoformas o con distintas modificaciones post-transduccionales que determinaban cambios en Pm y/o pI, y por ello se identificaron en distintos spots. Tal es el caso de HSP70 (spots 278, 274, 299), FER (1470, 14945, 1502), ETFA (1075, 1138) y HEMO (227, 225, 1583) en la glándula digestiva, y HC (391, 1101, 544, 669, 522) en branquias. Todos los spots que identificaban una misma especie proteica mostraron el mismo sentido de cambio (incremento o disminución) y similar intensidad (Tablas 5.4 y 5.5)

Table 5.4. Differentially expressed proteins in *P. clarkii* digestive gland, identified by Mascot search based on MALDI-TOF-MS/MS data. Crayfish were captured at reference LP site, and PAR or MAT polluted sites. Only spots whose intensity changed at least 2-fold in at least one sampling site are included. Spot positions are shown in Fig. 2.1. Spot normalized intensity values (mean of three biological replicates and standard deviation) are shown. These values were subjected to ANOVA statistical test (FDR<0.05).

Spot no.	Symbol	Protein name	Identification for closest protein sequence	Molecular mass		pI		Total no. of peptides	Sequence coverage (%)	Protein score	Abundance ratio			
				nominal	calculated	nominal	calculated				PAR versus LP		MAT versus LP	
											Fold-change	t-test	Fold-change	t-test
278	HSP70	Heat shock protein 70 form 1	gi 156454270	71.9895	65.5	5.67	6.0	11	17	151	6.99	0.00018	2.03	0.23000
274	HSP70	Heat shock protein 70	gi 268321240	71.7023	65.4	5.2	5.9	15	25	235	5.05	0.00220	2.66	0.01300
1118	PLEXB	Plexin-B	Q9V4A7	235.1	30.3	6.21	5.3	22	13	79	4.68	0.00035	2.64	0.00076
227	HEMO	Hemocyanin	I7FMY1	77.9	74.7	5.5	5.9	7	7	200	4.52	0.00150	3.2	0.34000
225	HEMO	Hemocyanin	Q8MUH8	75.3883	69.2	5.5	5.8	19	18	272	4.38	7.2e-005	3.13	0.00013
659	AHCY	Adenosylhomocysteinase	gi 291287351	52.4186	45.0	5.42	6.1	12	27	139	2.63	0.00072	1.15	0.64000
922	ALDO	Fructose-bisphosphate aldolase	gi 242025190	40.383	18.0	6.5	5.9	6	10	133	2.39	0.00520	1.48	0.57000
662	ELBR	Extracellular ligand-binding receptor	gi 160898748	45.1376	45.1	8.8	6.1	18	59	91	2.3	0.00300	1.26	0.54000
525		Hypothetical protein VIA_001868	gi 261251847	8.9336	55.2	9.2	6.7	8	92	83	2.11	0.00780	1.41	0.35000
299	HSP70	Heat shock protein 70	H2B5Z8	71.3009	63.7	5.23	5.7	21	29	351	2.01	0.00100	1.77	0.00170
800	IDH	Isocitrate dehydrogenase	gi 209879746	47.166	43.8	8.0	6.9	8	13	92	1.83	0.00600	2.68	0.01300
1527	HRPA	ATP-dependent helicase HrpA	gi 238753569	148.2	19.4	8.3	4.8	21	23	87	-1.32	0.22000	-2.05	0.00470
998	RUMTOR	Hypothetical protein RUMTOR_02390	gi 153816142	71.6	36.1	8.09	6.6	20	37	86	-1.52	0.04700	-2.3	0.00240
1470	FER	Ferritin	F5A6F3	19.4	20.4	5.15	5.2	6	24	110	-1.54	0.00290	-2.24	0.00210
1494	FER	Ferritin	gi 26006755	20.7153	20.3	5.13	5.1	2	8	105	-1.58	0.00120	-2.45	0.17000
1502	FER	Ferritin	F5A6F3	19.437	20.0	6.3	5.1	14	49	426	-1.82	0.00980	-2.5	0.00093
1678		Putative uncharacterized protein	E9H7A1	7.4	15.2	4.3	6.0	12	84	82	-1.86	0.00390	-1.58	0.01200
1206	MYO5	Myosin V	O97417	208.6	28.9	8.6	6.5	24	15	75	-2.04	0.00140	-1.69	0.02800
879	ARK	Arginine kinase	H6VG12	40.4	38.1	6.2	6.4	30	53	696	-2.22	0.00058	-1.08	0.63000
1075	ETFA	Electron transfer flavoprotein subunit alpha	F4WZH9	34.2	33.6	7.74	6.0	5	10	190	-2.39	0.00130	-1.22	0.34000
1168	FER	Ferritin	gi 26006755	20.7153	29.2	5.13	5.6	2	8	90	-2.54	0.03500	-1.39	0.00140
448	AGAP	AGAP012407-PA (Fragment)	Q5TMX9	53.384	55.9	5.02	4.9	8	17	72	-2.99	0.01900	1.44	0.63000
1583	HEMO	Hemocyanin	I7FMY1	77.9	18.1	5.5	5.9	4	7	85	-3.06	0.00073	-1.28	0.00150
1138	ETFA	Electron transfer flavoprotein subunit alpha	F4WZH9	34.2	33.1	7.74	5.7	6	10	246	-3.34	0.00130	-1.7	0.12000
1477	DUF187	Protein of unknown function DUF187	gi 255037483	59.3	22.6	6.3	5.3	15	38	87	-3.81	0.00084	-1.59	0.17000
1234	SAV_1465	Putative two-component system sensor kinase	gi 169631573	53.4375	28.9	8.8	6.6	7	12	83	-4.23	0.00017	-1.13	0.57000
993	PDI	Protein disulfide isomerase	E0VRY3	33.4	33.4	4.9	4.9	6	18	120	-5.55	0.00054	-3.13	0.02100
1096	3HAO	3-Hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase	C1BPY7	34.5	39.3	5.63	6.2	5	12	75	-5.67	0.00028	-3.54	0.00062
1046	GLDC	Glycine dehydrogenase	B4LWC6	110.6	39.4	6.6	6.2	7	5	124	-7.42	0.00019	-2.22	0.05200

Table 5.5 Differentially expressed proteins in *P. clarkii* gills, identified by Mascot search based on MALDI-TOF-MS/MS data. Crayfish were captured at reference LP site, and PAR or MAT polluted sites. Only spots whose intensity changed at least 2-fold in at least one sampling site are included. Spot positions are shown in Fig. 5. Spot normalized intensity values (mean of three biological replicates and standard deviation) are shown. These values were subjected to ANOVA statistical test (FDR<0.05).

Spot no.	Symbol	Protein name	Identification for closest protein sequence	Molecular mass		pI		Total no. of peptides	Sequence coverage (%)	Protein score	Abundance ratio			
				nominal	calculated	nominal	calculated				PAR versus LP		MAT versus LP	
											Fold-change	t-test	Fold-change	t-test
1768	COX2	Putative cytochrome c oxidase subunit II	gi 109892850	1707.0	25.7	9.63	5.2	4	100	83	2.75	0.00029	2.27	0.50000
391	HEMO	Hemocyanin-like protein	A9Q7C4	27447.0	115.0	5.73	6.0	5	16	86	2.51	0.04000	2.11	0.83000
1101	HEMO L	Hemocyanin subunit L	B0L611	77298.0	64.0	5.29	5.6	3	6	105	2.23	0.03700	1.44	0.81000
1381	COX2	Putative cytochrome c oxidase subunit II	gi 109892850	1707.0	50.3	9.63	6.9	4	100	86	2.05	0.00029	1.24	0.88000
1150	TNP	Transposase IS4 family protein	gi 239826029	52810.0	60.1	9.51	5.9	14	38	72	2.03	0.00360	1.14	0.95000
544	HEMO B	Hemocyanin B chain	P83180	65533.0	104.8	5.81	5.4	12	20	137	1.71	0.00033	2.16	0.00029
1408	FUM	fumarate hydratase class I	gi 229493871	61608.0	44.3	5.3	5.5	19	41	101	-1.66	0.25000	-3.11	0.04200
669	HEMO B	Hemocyanin B chain	P83180	65533.0	102.9	5.81	6.0	14	27	94	-1.78	0.17000	-3.35	0.04600
1521	RUTF	NADH flavin oxidoreductase	gi 229207227 (D7AYI)	38751.0	32.2	5.72	5.4	13	53	88	-1.95	0.00270	-2.55	0.05600
875	TUBA	Alpha-I tubulin	I6LWU6	50735.0	97.7	4.96	5.5	10	26	128	-2.15	0.00480	-1.99	0.11000
522	HEMO YY	Hemocyanin subunit Y	B0L612	75149.0	110.0	5.38	5.5	10	10	289	-2.26	0.07200	-4.28	0.03800
842	PDI	Protein disulfide isomerase	COJBY4	55277.0	96.9	4.64	4.7	7	13	78	-2.35	0.07800	-3.04	0.02000
1767		Uncharacterized protein	E3X9J9	58855.0	25.1	9.81	5.0	12	34	83*	-2.36	0.00037	-2.89	0.05400
1744	GST	Glutathione S transferase	F5A6F0	25432.0	26.5	4.97	5.2	17	49	425	-2.37	0.00051	-2.36	0.03900
791	TUBB	Tubulin beta chain	B0W7E7	50653.0	92.5	4.69	5.3	18	30	454	-2.38	0.00066	-2.26	0.11000

5.4.3. Validación de los resultados 2D-DIGE por Western blot.

El uso de técnicas proteómicas ha permitido la identificación de un vasto número de proteínas desreguladas. Estas proteínas son indicativas de rutas metabólicas o procesos biológicos afectados por la exposición de los cangrejos *P. clarkii* a contaminantes presentes en su ecosistema y pueden considerarse potenciales biomarcadores de contaminación ambiental. Estas metodologías holísticas, no sesgadas y no dirigidas, requieren un paso posterior en el que usan aproximaciones dirigidas para la de verificación de, al menos, algunos resultados obtenidos. En este trabajo se verificaron los resultados proteómicos por Western blot, usando anticuerpos comerciales disponibles contra cuatro de las proteínas identificadas. El análisis Western blot hizo en las mismas preparaciones usadas en los experimentos proteómicos y sus resultados confirmaron que las proteínas HSP70 y HEMO son más abundantes en glándula digestiva de animales PAR y MAT, así como que las proteínas EFTA y TUBA disminuyen en glándula digestiva y branquias de estos cangrejos, siempre en referencia a los animales control de LP. Estos resultados validaron los datos proteómicos tanto a nivel cualitativo como cuantitativo (correlación positiva > 98%) (Fig. 5.3).

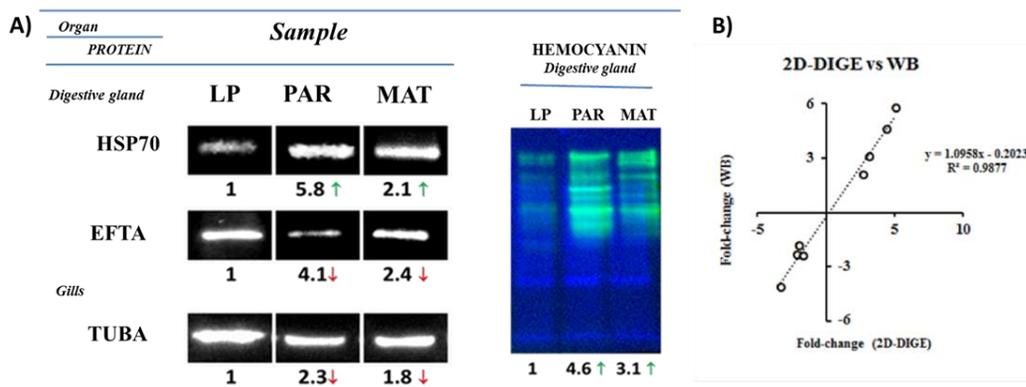


Figure. 5.3. Western blotting to confirm the differential abundance of HSP70, EFTA, TUBA AND HC in polluted and the reference *P. clarkii* crayfish. (A) Numbers indicate the Western blotting signal intensities normalized to the total protein contents, using stain-free technology for total protein quantification¹⁹. Protein extracts were the same used in the 2D-DIGE analysis. In the right part, the luminescence image indicating the amount of hemocyanine linked to the Anti-HEMO antibody is overlapped to the protein image. **(B)** Direct correlations ($R^2 = 0.988$, $P < 0.0001$) were observed between proteomics and immunoblotting data relatives to fold-change in protein abundance.

5.4.4. Significado biológico de proteínas expresadas diferencialmente

El análisis cualitativo y cuantitativo de los efectos biológicos causados por los contaminantes se ha convertido en una herramienta crucial para la evaluación de la calidad del medio ambiente. Los primeros efectos en un organismo de la exposición a cualquier agente físico o químico suelen ocurrir a nivel molecular y éste es el enfoque que se ha utilizado en este trabajo para analizar los cambios en los perfiles proteómicos en el cangrejo de río *P. clarkii* originados por la presencia de contaminantes en sus hábitats. Tal como se comentó anteriormente (Introducción general y Zonas de muestreo) los animales que viven en las zonas contaminadas PAR y MAT acumulan grandes cantidades de metales pesados y otros elementos en sus tejidos, especialmente en la glándula digestiva, órgano que en el cangrejo de río integra el metabolismo intermediario y la respuesta inmune. De hecho, hemos observado aumentos superiores hasta en un orden de magnitud para elementos esenciales (Mn, Fe, Cu) y tóxicos (Cd) en estos animales “contaminados” respecto a los usados como referencia.

La toxicidad de estos metales deriva de sus propiedades químicas, que determinan su capacidad de inactivar diversas enzimas por interacción con sus grupos –SH y de sustituir a otros cofactores metálicos en su interacción con numerosas metaloproteínas, así como de generar especies reactivas de oxígeno (ROS). La capacidad prooxidante de ciertos metales se manifiesta en daños al DNA, peroxidación de lípidos, modificaciones en proteínas y otros efectos, muchos de ellos sintomáticos de numerosas enfermedades. En este trabajo se demuestra la existencia de una correlación directa entre la acumulación de elementos en los tejidos y los niveles de peroxidación lipídica (Fig. 2.4), como cabría esperar. La peroxidación lipídica conlleva la reordenación de dobles enlaces en los lípidos insaturados y la eventual destrucción de los lípidos de membrana.

Estrés del retículo endoplásmico

Las membranas del retículo endoplásmico (RE) y las mitocondrias, así como las funciones de ambos orgánulos, resultan afectados por estrés oxidativo, y se producen inducción de proteínas de choque térmico, procesos inflamatorios, disfunción mitocondrial, y cambios metabólicos tendentes a suplir las deficiencias de la respiración mitocondrial. Todas estas respuestas biológicas fueron detectables en la glándula digestiva y/o las branquias de cangrejos *P. clarkii* capturados en las zonas contaminadas PAR y

MAT, según los resultados obtenidos en este trabajo identificando las proteínas cuya abundancia se veía alterada.

En el RE se lleva a cabo el plegamiento y modificación de proteínas, tanto las de membranas como las de secreción. La alteración de la homeostasis de este proceso post-traducciona l por cualquier situación de estrés que afecte al RE contribuye de manera importante al desarrollo de un estado de enfermedad y a generar otros estreses celulares ²⁰. La formación de puentes disulfuro en el lumen del RE es altamente sensible a alteraciones en el balance redox, y tanto los agentes oxidantes como los reductores, acaban afectando al plegamiento de las proteínas y adicionalmente provocan estrés en RE ²¹. La causa de esta sensibilidad radica en que el plegamiento de proteínas en el RE es un proceso oxidativo en tanto que los grupos tiol (-SH) de las Cys del polipéptido sustrato se oxidan y forman enlaces disulfuro, con liberación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) como subproducto ²⁰. La *proteína difulfuro isomerasa* (PDI), ya comentada en el Cap. 4, parece ser un regulador negativo de NF-KB, el principal inductor de genes de supervivencia celular; su presencia se ha vinculado a capacidad invasiva en cáncer ^(22 y ref. que cita) y ha descrito que PDI sufre proteólisis mediada por caspasas, como parte del proceso apoptótico ²². PDI, abundante en el RE, es una proteína con actividad oxidorreductasa que cataliza la formación y reordenación (isomerización) de puentes disulfuro, participando activamente en el plegamiento de proteínas (Fig. 5.4) ²³. En un RE estresado, la desregulación de la formación y ruptura de los puentes disulfuro conduce en una mayor acumulación de ROS y un estrés oxidativo más exacerbado ²⁰. Por ello, no es de extrañar que dadas las condiciones oxidantes encontradas en este trabajo para los cangrejos *P. clarkii* capturados en PAR y MAT, hayamos cuantificado en ellos niveles bajos de esta proteína respecto a los animales LP de referencia, tanto en glándula digestiva como en branquias (>4 y > 2 veces, respectivamente; Tablas 5.4 y 5.5). La disminución observada en los niveles de PDI en cangrejos *P. clarkii* que soportan una tasa elevada de contaminación puede interpretarse como un modo de impedir las consecuencias pro-oxidativas colaterales de la actuación de esta enzima, así como de promover la apoptosis que evitaría la aparición de un proceso canceroso.

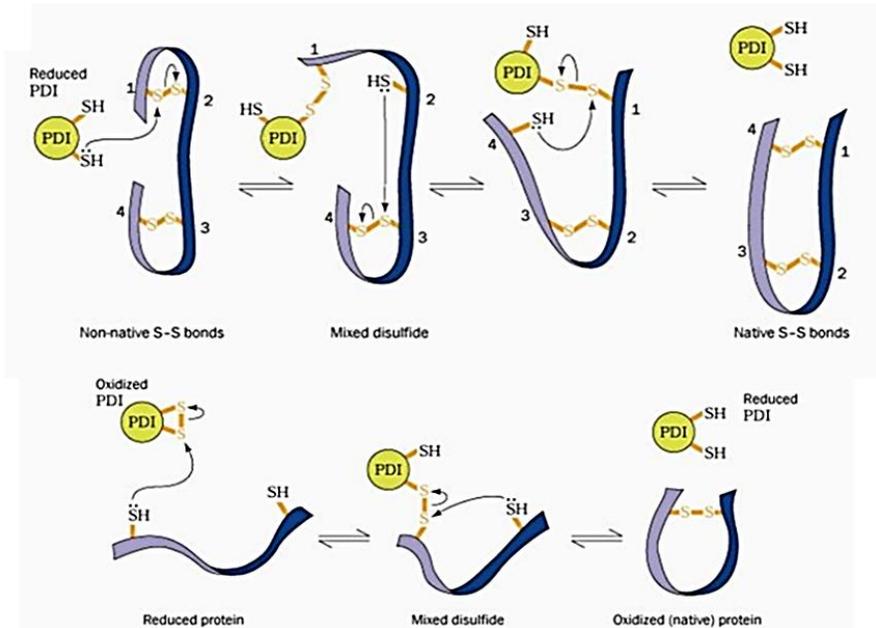


Figure 5.4 Diagram representing the disulphide bonds formation in the eukaryotic ER and redox reactions involving PDI. Oxidative folding of PDI leads to disulphide bond formation in native protein substrates. Reduced PDI facilitates isomerization of non-native bonds in protein substrates.

Como la PDI, la *heat shock protein 70* (HSP70) es una chaperona de RE. Pero a diferencia de lo que ocurre con PDI, los niveles de HSP70 se incrementaron (de 2 a 6 veces según las isoformas/fragmentos detectados) en glándula digestiva de los cangrejos *P. clarkii* procedentes de PAR y MAT (Tabla 5.4). Aunque su función es actuar principalmente como caperona molecular, HSP70 es una proteína inducida por una variedad de estreses, incluyendo choque térmico, estrés oxidativo, infecciones, privación de nutrientes y exposición a diversos compuestos químicos²⁴, para proteger a la célula de daños diversos, al actuar también como inmunomodulador²⁵. En crustáceos, la expresión del gen Hsp70^(26 y ref. que cita) y la cantidad de proteína HSP70³ se han propuesto como biomarcadores de situaciones de estrés, incluyendo la exposición a pesticidas).

Inflamación y respuesta inmune

La oxidación de biomoléculas tiene como resultado la producción de señales para la puesta en marcha de la respuesta inflamatoria ²⁷. Las plexinas constituyen una familia de proteínas transmembrana que actúan como receptores de señales inflamatorias, en concreto, de las proteínas semaforinas, relacionadas con la producción de citoquinas proinflamatorias ²⁸. El aumento de la cantidad de *Plexina B* (PlexB) en las muestras de glándula digestiva de cangrejos de PAR/MAT (Tabla 5.4) puede reflejar la inducción de una respuesta inflamatoria ligada al estrés oxidativo. El propósito de la activación de la reacción inflamatoria es la defensa del organismo frente a cualquier tipo de daño (Fig.5.5). Pero la respuesta inflamatoria causa daños también en los propios tejidos y no puede ser sostenida indefinidamente, ya que acaba causando diversas patologías autoinmunes. En una situación de agresión oxidativa crónica como las que están soportando los animales de PAR y MAT han de ponerse en marcha mecanismos que ayuden a la célula a recuperar la homeostasis.

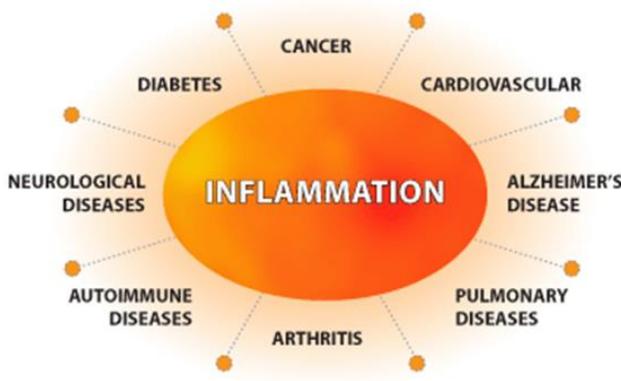


Figure 5.5. Implications of the inflammatory response in different pathologies

El metabolismo del Trp se está perfilando como un elemento importante en la prevención de una respuesta inmune descontrolada y excesiva ²⁹. La acumulación de ácido 3-hidroxiantranílico, uno de los catabolitos del Trp, parece inducir la apoptosis de los linfocitos T, posiblemente mediante la activación de la ruta mediada por el receptor Ah de hidrocarburos aromáticos ^{29,30} (y referencias que citan). La *3-hidroxiantranilato 3,4-dioxigenasa* (3-HAO) actúa sobre el ácido 3-hidroxiantranílico para dar ácido quinolínico y picolínico, un activador de las funciones efectoras de los macrófagos e inductor de proteínas proinflamatorias ³¹. En glándula digestiva de cangrejos *P. clarkii* capturados en PAR y MAT se observó un importante descenso (> 5 veces y > 3.5 veces en animales PAR y MAT respectivamente) en los niveles de 3-HAO, respecto a de los animales de la zona “limpia” LP. La disminución de 3-HAO determinaría la inactivación, al menos parcial, de la ruta de síntesis de ácido picolínico y la acumulación de ácido 3-hidroxiantranílico, lo que ayudaría a controlar el proceso inflamatorio ³², causado en estos animales por la contaminación, y a la recuperación de la homeostasis ²⁹.

Un efecto similar sobre la contención de la respuesta inflamatoria podría tener la fuerte disminución en los niveles de *glicina descarboxilasa* (GLDC) observada en la glándula digestiva (> 7 veces y > 2 veces en animales PAR y MAT, respectivamente). Esta enzima cataliza la primera etapa de la ruta catabólica de la Gly, en la que se libera CO₂. Varios estudios han sugerido que la Gly tiene un efecto antioxidante y reprime la expresión de las citoquinas proinflamatorias TNF- α e IL-6 ^(33 y referencias que cita). La disminución de los niveles de GLDC en la glándula digestiva, sin duda, conduce a un aumento en los niveles intracelulares de Gly y a la disminución de citoquinas inflamatorias. Así, la inhibición de la descarboxilación de la Gly tiene consecuencias anti-inflamatorias, mientras priva al metabolismo de una fuente de unidades de 1C necesaria para, entre otras, la síntesis de nucleótidos ³⁴. La inhibición de la síntesis de purinas y pirimidinas induce la parada del ciclo celular e inhibe la proliferación y la supervivencia de linfocitos T activados ³⁵.

La *ferritina* (FER) es una proteína de unión a Fe, ubicua y altamente conservada, que juega un papel clave en la protección contra agentes oxidantes, incluyendo metales pesados y que ya encontramos en el Cap. 4. Numerosos trabajos evidencian que el papel de la FER en la limitación del alcance, grado, y localización del estrés pro-oxidante que

caracteriza las enfermedades inflamatorias, el cáncer, y las condiciones de oxigenación alterada (Fig. 5.5) Mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales están implicados en la inducción de ferritina por oxidantes y citoquinas ³⁶ y colaboran en el contenido total de FER en la célula.

En crustáceos, se han realizado relativamente pocos estudios sobre la expresión génica de la FER o la abundancia de la proteína y los resultados obtenidos han sido hasta cierto punto inconsistentes. Por ejemplo, Ghedira *et al* ⁴ encontraron mayores niveles de ferritina en glándula digestiva de cangrejos *Carcinus maenas* capturados en zonas del litoral de Túnez y que acumulaban Zn, Cu y Cd. En contraste, estudios previos de nuestro grupo demostraron una disminución en el número de moléculas de mRNA de FER en cangrejos *P. clarkii* capturados en PAR y MAT ³⁷. Estos resultados coinciden con los encontrados en este trabajo, en los que se observó una disminución de los niveles de FER en glándula digestiva de los cangrejos *P. clarkii* capturados en zonas contaminadas (> 1.5 veces y > 2 veces en animales PAR y MAT respectivamente). La disminución en el contenido de ferritina en tejidos estresados oxidativamente puede ser algo inesperado, dado el papel antioxidante de esta proteína. Sin embargo, este papel antioxidante de la ferritina deriva de su capacidad de quelar Fe ³⁶. Esta reacción es posible por la actividad ferroxidasa de FER, una reacción que implica generación of H₂O₂ y radical hidroxilo (•OH), que acaban oxidando a la propia ferritina, favoreciendo su agregación ³⁸. La ferritina oxidada ya no es funcional y es rápidamente degradada como parte de la defensa antioxidante ³⁹, lo que explicaría la disminución observada en animales sometidos a estrés oxidativo.

La *hemocianina* (HEMO) es la proteína plasmática, de color azul (contiene Cu), que se encarga del transporte del oxígeno en muchos moluscos y artrópodos. La estructura básica de la HEMO de artrópodos es hexamérica (cada subunidad de 75 kDa) y suele presentarse como agrupaciones de estos monómeros (Fig.5.6). En el cangrejo de agua dulce *Pacifastacus leniusculus* se han identificado dos tipos de subunidades en la hemocianina. Una de estas subunidades, denominada HC o HC1 es fuente del péptido antibacteriano astacidina 1. La otra subunidad, HC2, se escinde proteolíticamente en su extremo amino-terminal para dar lugar a una proteína con actividad profenoloxidasa, implicada en la respuesta inmune y en el desarrollo del cangrejo ^{40, 41}. Por esto, se

considera que además de su función como transportadora de oxígeno, la hemocianina es una pieza clave de la inmunidad innata de crustáceos ⁴². Trabajos recientes ^{43, 44} indican que los transcritos de HEMO se expresan predominantemente en glándula digestiva y así lo confirma el alto número de transcritos de HEMO cuantificados en glándula digestiva de *P. clarkii* en trabajos previos de nuestro grupo ⁴⁵. En estos trabajos también se encontró que el número de transcritos para HC2 es mucho mayor que para HC1. Asimismo, se encontró una alta correlación positiva entre los niveles de expresión de estos genes y los niveles de Cu acumulados en los órganos de estos animales. Los datos proteómicos obtenidos aquí (Tabla 5.4 y 5.5) muestran un aumento similar de hemocianina a nivel de proteína que el que se refiere ⁴⁵ a nivel transcripcional (3-5 veces) para animales PAR y MAT respecto a los del grupo de referencia. Esta coincidencia permite postular que los perfiles transcripcionales pueden, al menos ocasionalmente, constituir un soporte indirecto para estimar los niveles de expresión proteica en relación a las funciones génicas y el fenotipo.

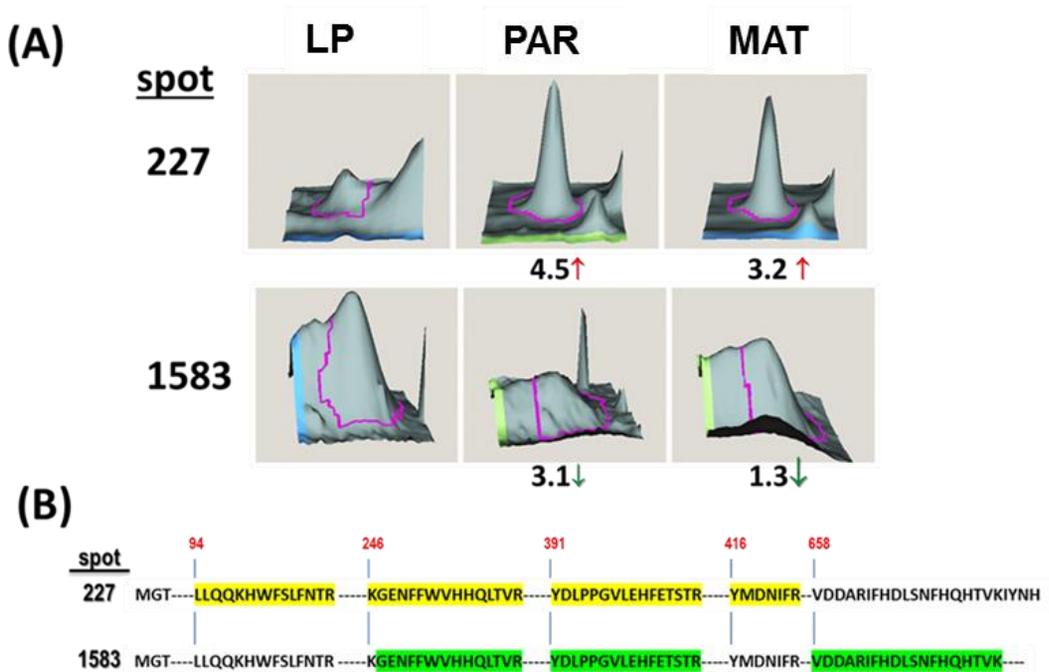


Figure 5.6 Structural organization of arthropod hemocyanin. Adapted from ⁴⁶.

Como se comentó antes, se han caracterizado multitud de isoformas de hemocianina que difieren en número de monómeros y presencia de polimorfismos ^{44,45}.

Estas variantes, sumadas a los distintos estados de agregación causados por oxidación, podrían explicar la existencia de diferentes spots proteicos identificadas como hemocianina en el análisis DIGE de glándula digestiva (Tablas 5.4 y 5.5). También podría explicar la discordancia en la dirección de cambio entre el spot 1583 (disminución de intensidad >3 veces en cangrejos PAR y MAT) y el spot 227 (aumento de intensidad >4 veces en cangrejos PAR y MAT) (Tabla 5.4), ambos identificados como la misma proteína I7FMY1 (hemocianina). Las secuencias obtenidas en el análisis MS/MS de estos spots identificados indican que la primera (spot 1583) empieza a partir del extremo C-terminal de la proteína mientras que la segunda (spot 227) llega hasta el extremo N-terminal pero carece de un fragmento del extremo C-terminal (Fig. 5.7), sugiriendo que ambas secuencias corresponden a un procesamiento alternativo del mRNA o de un polipéptido precursor que da lugar a dos isoformas de hemocianina afectadas de modo diferente por la contaminación.

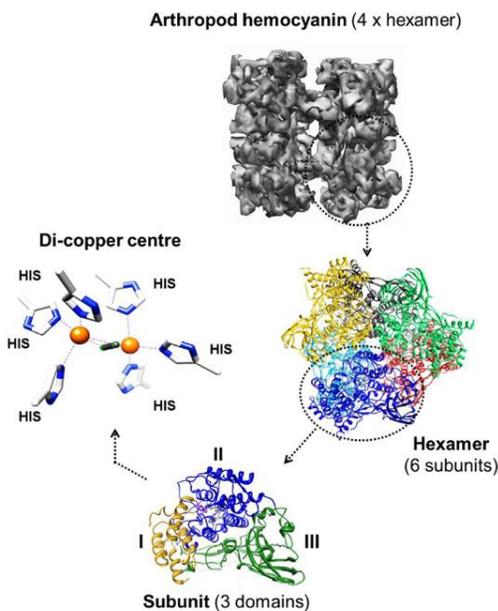


Figure 5.7. (A) Quantitative diagram of spots 227 and 1583 identified by mass spectrometry as hemocyanin (I7FMY1), showing increased (spot 227) or reduced (1583) level of expression in PAR/MAT crayfish compared with the reference LP animals. Numbers represent the fold-change in the intensity of the spots in comparison with LP (B) Alignment of the sequences obtained from spots 227 (yellow) and 1583 (green) with the I7FMY1 protein, the hemocyanin of *Cherax quadricarinatus*. Numbers indicate their localization on the I7FMY1 protein.

En las branquias de *P. clarkii* se identificaron hasta 5 isoformas de hemocianina (Tabla 5.4) habiendo también discordancia en el sentido de la dirección de cambio entre los spots 391, 1101 y 544, cuyas intensidades se elevan > 2 veces en cangrejos PAR y MAT y los spots 522 y 662 cuyas intensidades disminuyen hasta 4 veces en cangrejos procedentes de zonas contaminadas. Ninguna de las isoformas presentes en las branquias se identificó en glándula digestiva, lo que sugiere que *P. clarkii* ha expandido sus familias de genes/proteínas del sistema inmune para incrementar el repertorio de respuestas de este órgano, en continuo contacto con el medioambiente y sus contaminantes.

Disfunción mitocondrial: Alteraciones en el metabolismo energético y adaptación a glucolisis aerobia en glándula digestiva

La glucolisis es la primera etapa del metabolismo de los carbohidratos, un proceso anaeróbico de 10 reacciones que genera dos moléculas de ATP a partir de una de glucosa. El producto final de la glucolisis es el piruvato, que, en condiciones aeróbicas entra en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA). El ciclo TCA es responsable de la producción de las coenzimas reducidas NADH y FADH₂, usadas por la cadena de transporte electrónico para generar, en la mitocondria, el potencial de membrana necesario para la síntesis de ATP, proceso globalmente conocido como fosforilación oxidativa, que consume O₂ como aceptor final de electrones. El ataque de las ROS a los lípidos de membrana también afecta a la mitocondria, alterando el buen funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial, lo que resulta a su vez en la generación de más ROS y una deficiencia de ATP, con consecuencias nefastas para la célula, que ni siquiera pueden llevar a cabo el proceso apoptótico por falta de ATP⁴⁷. Las células en las que el estrés oxidativo causa disfunción mitocondrial adaptan su metabolismo activando la glucolisis aerobia para generar ATP. En esta versión glucolítica, el piruvato se transforma en lactato, proceso que no precisa O₂ ni membrana mitocondriales íntegras para generar ATP, o entra en el ciclo TCA, que suministra precursores anabólicos a las células proliferantes y el poder reductor en forma de NADH que precisan las enzimas antioxidantes⁴⁸. Las células pueden así iniciar un proceso de proliferación activa que posibilita su supervivencia. Células tumorales, altamente proliferativas, y las sometidas a estrés oxidativo⁴⁹, donde la mitocondrias dañadas, incapaces de sintetizar ATP por fosforilación oxidativa, debido a la incapacidad de los sustratos de moverse

completamente a través del ciclo TCA, deben cambiar a este tipo de glucolisis aerobia para mantener sus niveles de ATP

Seis enzimas metabólicas ETFA, ARK, COX2, ALDO, IDH y FH diferencialmente expresadas de manera significativa en glándula digestiva de cangrejos PAR y/o MAT (Tablas 5.5 y 5.4) sugieren una adaptación celular de estos animales a la disfunción mitocondrial causada por su situación de estrés oxidativo.

La subunidad alfa de la flavoproteína de transferencia de electrones (ETF), es parte de un heterodímero que contiene FAD y una molécula de AMP y sirve como aceptor de electrones obligatorio para varias deshidrogenasas presentes en lado de la matriz de la membrana mitocondrial interna. Los electrones, procedentes principalmente del catabolismo de los lípidos, pasan a la ubiquinona a través de la ETF-ubiquinona oxidorreductasa (ETF-QO), una proteína de membrana que contiene FAD y cuatro centros 4Fe-4S, en una reacción que genera anión superóxido^{50, 51 52} (Fig.5.8).

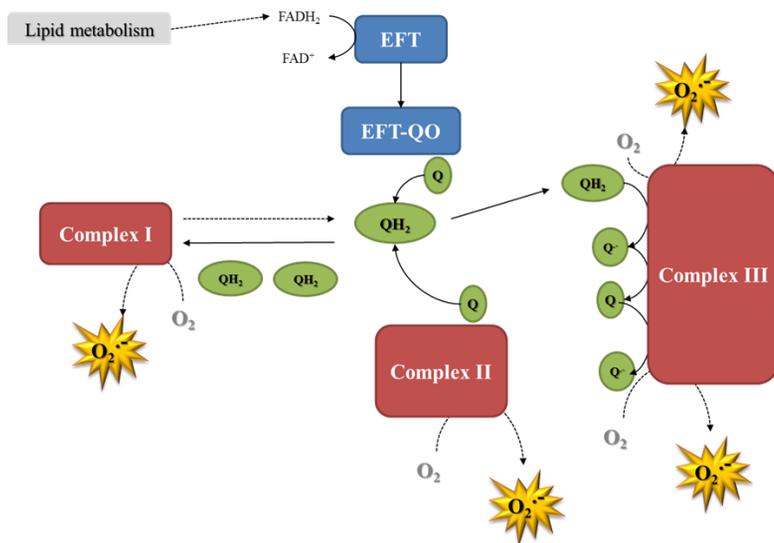


Figure 5.8. Schematic diagram showing the electron flow into the ubiquinone (Q) pool. High rates of electron flux into the Q pool from lipid metabolism are proposed to increase $O_2^{\bullet-}$ generation at complex I, due to decreased availability of oxidized Q and/or reverse electron flux from reduced Q (QH_2) back into complex I. ETF, electron-transferring flavoprotein; ETF-QO, electron-transferring flavoprotein dehydrogenase (Adapted from⁵¹).

La alteración de la membrana mitocondrial por ROS ocasiona la disminución de los potenciales de membrana, lo que desfavorece la transferencia de electrones desde el pool de ubiquinona, que los ha recibido de la EFTA, hasta el complejo I de la cadena respiratoria. Al no reoxidarse el pool de ubiquinona, se liberan de grandes cantidades de superóxido en la mitocondria dañando aún más la función mitocondrial.⁵² La disminución de la cantidad de proteína EFTA observada en las muestras procedentes de zonas contaminadas (Tabla 5.4) podría interpretarse como una respuesta de la célula que trata de evitar un daño oxidativo adicional debido a la imposibilidad de completar la reacción de transferencia electrónica mediada por EFTA-QO.

La *arginina quinasa* (ARK) es otra proteína con un papel clave en el metabolismo energético en invertebrados. Esta enzima cataliza la transferencia reversible de un fosforilo de alta energía del ATP a la L-arginina para formar fosfo-arginina. En insectos, crustáceos y otros organismos, la fosfoarginina actúa de modo similar a la fosfocreatina: como un fosfógeno que tampona los niveles de ATP celulares en células con altas demandas y/o fluctuaciones de energía⁵³. En algunos tejidos estas quinasas funcionan también como transportadores de ATP entre la mitocondria y el citosol. La disminución (>2 veces) de los niveles de ARK en los cangrejos de PAR refleja probablemente el impacto de la contaminación sobre el sistema energético de la célula. En una situación de desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, que conlleva una disminución de la síntesis de ATP en la cadena respiratoria mitocondrial, tal como se supone para los *P. clarkii* capturados en sitios contaminados, la reacción catalizada por la ARK se detiene por falta de utilidad (no se está sintetizando ATP que pueda ser almacenado) o porque la ARK resulta también oxidada y degradada⁵⁴.

El desacoplamiento entre cadena respiratoria y síntesis de ATP acelera el flujo de electrones. En branquias, el spot proteico 1381, cuya intensidad se eleva en las muestras correspondientes a *P. clarkii* de zonas contaminadas, se identificó como la *subunidad 2* de la *citocromo c oxidasa* (COX 2). Esta proteína forma parte del complejo enzimático involucrado en la transferencia de electrones desde citocromo C al O₂, último paso en la cadena de transporte de electrones mitocondrial. En condiciones fisiológicas normales, la reacción catalizada por COX constituye la etapa limitante de velocidad del flujo electrónico en la cadena respiratoria y su actividad es un indicador de la capacidad

oxidativa de las células ⁵⁵. El aumento de los niveles de COX2 (> 2 veces) en las branquias de cangrejos procedentes de zonas contaminadas corrobora el desacoplamiento entre transporte electrónico y síntesis de ATP por daños oxidativos y despolarización de la membrana mitocondrial, como se comentó arriba, acelerando la respiración y el consumo de oxígeno.

La enzima *fructosa bifosfato aldolasa* (FBA, ALDO), que ya encontramos en el Cap. 4, es esencial en la glucólisis, donde cataliza la ruptura reversible de fructosa 1,6 bifosfato para dar gliceraldehído 3-fosfato. La tabla 5.4. muestra que la cantidad de ALDO es superior (>2 veces) en glándula digestiva de cangrejos PAR que en los de referencia. Esta elevación de los niveles de ALDO puede representar el cambio metabólico que permite la supervivencia de células con alteraciones en las funciones mitocondriales, en las que hay un incremento de la velocidad del proceso glucolítico para generar piruvato, impulsando el ciclo TCA (Fig. 5.9), que a su vez suministra precursores anabólicos a las células proliferantes y el poder reductor como NADH que precisan las enzimas antioxidantes ⁴⁸.

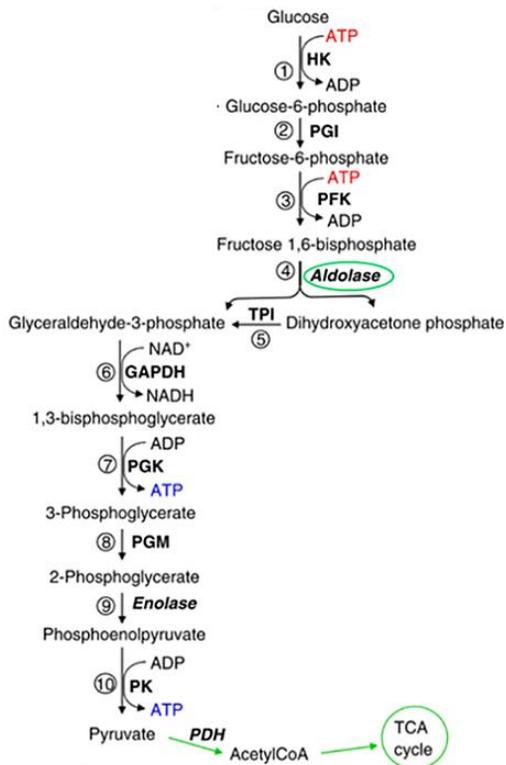


Fig. 5.9. Scheme showing the central role of the aldolase in glycolysis

La IDH (*isocitrato deshidrogenasa*) cataliza la descarboxilación oxidativa que convierte isocitrato en α -cetoglutarato con liberación de NAD(P)H (Fig. 5.10). En mamíferos, la actividad de la IDH aumenta en respuesta a diversas situaciones prooxidantes, puesto que el NAD(P)H protege frente a los radicales libres y las radiaciones UV⁵⁶. La elevación de los niveles de IDH en glándula digestiva de cangrejos de PAR y MAT parece, además, corroborar la idea sugerida arriba, basada en el aumento de proteína ALDO (Tabla 5.4), de que en estos animales está ocurriendo un incremento en la velocidad de la glucólisis y de una parte del ciclo TCA, para favorecer la supervivencia celular en un ambiente estresante por la contaminación.

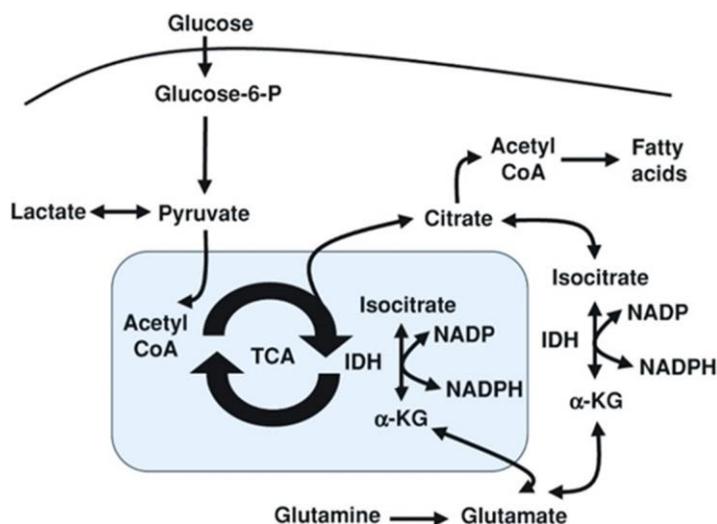


Fig. 5.10. Biochemical pathways proximal to IDH reactions. IDH1 is located in the cytoplasm and peroxisomes, whereas IDH2 is located in the mitochondrial matrix. The reactions catalyzed by these enzymes are linked to metabolites involved in amino acid metabolism, particularly that of glutamine and glutamate, and in fatty acid synthesis and the TCA cycle. IDH activity also affect the cytoplasmic and mitochondrial ratio of NADP/NADPH, a major source of reducing potential (Adapted from⁵⁷).

El incremento en los niveles de ALDO aceleraría la conversión de glucosa en piruvato y el exceso de piruvato se transformaría en un exceso de citrato en la mitocondria. Parte de este citrato fluye al citosol y se convierte en isocitrato, reducido posteriormente en paralelo a la reducción de NADP⁺ a NADPH por la acción catalítica de la IDH citoplásmica^{58,59}. Se ha descrito que la sobreexpresión de IDH evita que las células entren en apoptosis tras exposición a Cd⁶⁰, y también la existencia de

correlaciones directas entre la actividad IDH en diversas especies y la acumulación de metales en su medio ⁶¹. El NADPH es un equivalente reductor esencial para la regeneración de GSH por la glutatión reductasa y para la actividad del sistema tiorredoxina NADPH-dependiente ⁵⁶. Por lo tanto, el aumento observado en IDH, como fuente de electrones para los antioxidantes celulares, puede jugar un importante papel protector durante el estrés oxidativo ⁵⁹.

La disfunción mitocondrial ha sido ligada a la acumulación de fumarato a consecuencia de inactivación de la enzima *fumarato deshidratasa* (fumarasa, FH). La disminución de los niveles de esta enzima contribuye al funcionamiento incompleto del ciclo TCA, que ayuda a dirigir el piruvato a otros destinos encaminados a generar poder reductor, NADPH, clave para el mantenimiento del potencial redox y la prevención y reparación del daño oxidativo en la célula ⁶². También se ha propuesto que la acumulación de fumarato puede ayudar a la liberación de Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) por succinilación de su inhibidor KEAP1 (Fig. 5.11). Nrf2 es un potente activador transcripcional que juega un importante papel en la expresión inducible de muchos genes citoprotectores como respuesta a estreses oxidativos y electrofílicos ^{63,64}. Sin embargo, el fumarato también es responsable de la succinilación del GSH, capaz de actuar como sustrato alternativo de la glutatión reductasa, potenciando la ruta de señalización por ROS ⁶⁵.

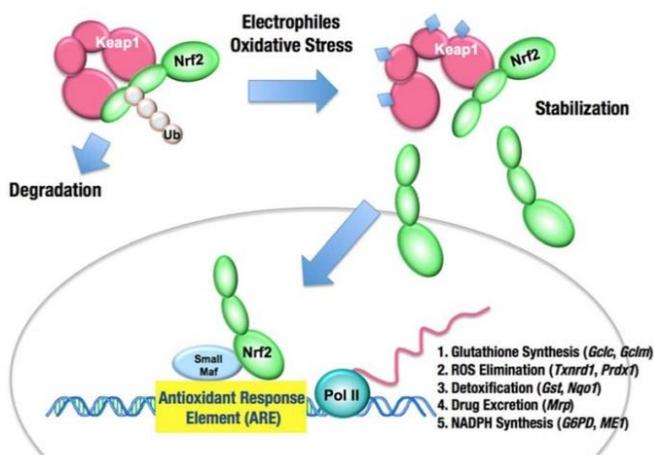


Fig. 5.11. The Keap1–Nrf2 system. Following exposure to electrophiles or oxidative stress, Keap1 is inactivated. Stabilized Nrf2 accumulates in the nucleus and activates many cytoprotective genes. Ub, ubiquitin (Adapted from ⁶⁶).

El GSH es sustrato de las enzimas *glutathione transferasas* (GSTs), una de las principales líneas de defensa celulares, con funciones que van desde la destoxificación a la biosíntesis y la señalización celular ^{67, 68}. Esta última función es realizada por su capacidad de establecer interacciones con otras proteínas cruciales en el control de la respuesta a estrés, apoptosis proliferación, que resultan inhibidas ⁶⁹. Se ha visto que estas interacciones se rompen por estrés medioambiental ⁶⁹ y es posible que esto ocurra por disminución de los niveles de GST, como se ve en branquias de los cangrejos capturados en PAR y MAT, donde la proteína GST disminuye >2 veces en relación a la referencia (Tabla 5.5).

La desregulación de todas estas proteínas evidencia una situación de estrés en los animales PAR y MAT, que alteran su metabolismo para adoptar una glucolisis aerobia que, aunque produciendo menos ATP que la fosforilación oxidativa, genera energía suficiente para la supervivencia celular ⁷⁰ en unas condiciones oxidantes que han dañado las mitocondrias. Además, la glucolisis aerobia derivara glucosa hacia rutas que generan NADPH, acetil-CoA y ribosa para la síntesis de ácidos grasos, proteínas y nucleótidos ⁷¹.

Alteración de la regulación por metilación en glándula digestiva

Los grupos metilo son importantes para numerosas funciones celulares, como la metilación del DNA y de histonas o la síntesis de fosfolípidos o proteínas. La mayoría de las metiltransferasas utilizan S-adenosilmetionina ⁷² como donante de grupos metilo. SAM se genera a partir de metionina por la L-metionina S-adenosiltransferasa (MAT). La metionina entra en la célula como parte de la dieta o se produce a partir de la homocisteína, vía metionina sintetasa o vía betaína-homocisteína metiltransferasa (BHMT). Durante la transferencia del grupo metilo, SAM es convertido en S-adenosilhomocisteína (SAH), un potente inhibidor de muchas metiltransferasas ⁷³, pues es a su vez hidrolizado por la S-adenosilhomocisteinasa hidrolasa (AHCY) a adenosina y homocisteína (Fig. 5.12)

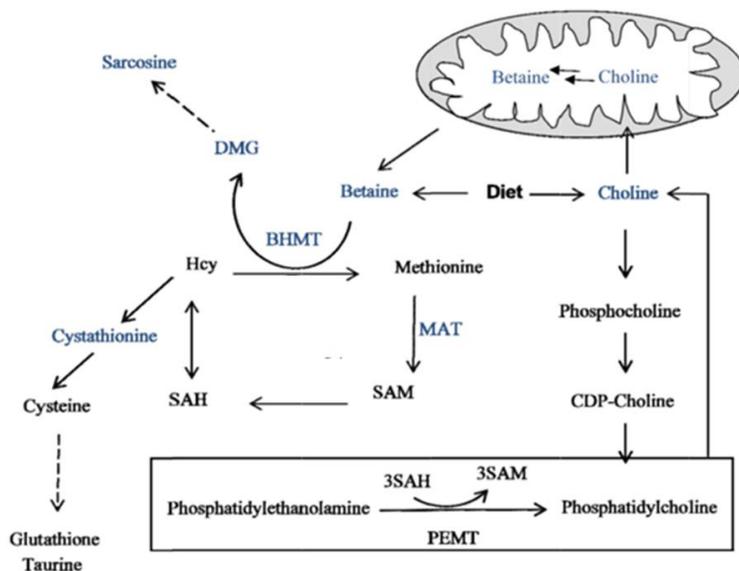


Fig. 5.12. Methylation cycle. BHMT: betaine homocysteine methyltransferase, Hcy: homocysteine, MAT: l-methionine S-adenosyltransferase, MS: methionine synthase, PEMT: phosphatidylethanolamine methyltransferase, SAH: S-adenosylhomocysteine, SAM: S-adenosylmethionine.

La homocisteína producida puede transmetilarse y regenerar la Met o sufrir un proceso de trans-sulfuración, produciendo Cys. Esta es requerida para la síntesis de GSH, un agente reductor por excelencia, así que el incremento observado de AHCY en la glándula digestiva de los cangrejos PAR/MAT (Tabla 2.1) puede servir para aliviar la situación de estrés oxidativo causada por la exposición de estos animales a metales y otros contaminantes presentes en estas zonas.

El aumento de actividad del ciclo de la homocisteína/metionina puede además ayudar a mantener el nivel de metilación del DNA. Los organismos tienen la capacidad de responder a los factores de estrés ambientales mediante la alteración de su epigenoma y, como consecuencia, de los perfiles de transcripción⁷⁴. Una alteración epigenética común es el descenso general del nivel de metilación del DNA (hipometilación global), que puede causar aumentos de expresión de algunos genes pero también provocar la reactivación de elementos transponibles y alterar la transcripción de genes adyacentes silenciados⁷⁴. La metilación del ADN está mediada por metiltransferasas de DNA (DNMTs) que también utilizan SAM como donador de grupo metilo, que resulta

transferido a la posición C5 de la citosina del DNA. El incremento observado en los niveles de *adenosil-homocisteinasa* (AHCY) en cangrejos PAR ayudaría a regenerar el ciclo de donadores de metilos de las DNMTs.

El aumento de IDH antes descrito puede contribuir también a regular la expresión génica en un proceso epigenético ligado a la metilación, en este caso de las histonas. Las histonas metiladas se unen con mayor afinidad al DNA, impidiendo así el acceso de la maquinaria transcripcional y por tanto de la transcripción de los genes situados en la región regulada. Las histonas se desmetilan por desmetilasas que usan α -cetoglutarato (α -KG) como sustrato. Este compuesto, α -KG, es un intermediario del ciclo TCA que se genera por acción de IDH. Por todo esto, es posible que la mayor presencia de AHCY e IDH en cangrejos de zonas contaminadas pueda afectar el estado de metilación del DNA y/o de las histonas, regulando su expresión génica para soportar la presión ambiental.

Disminución de los niveles de tubulina en branquias:

Los microtúbulos son orgánulos clave para en la regulación de la morfogénesis celular. La principal proteína de los microtúbulos es un heterodímero formado por cadenas peptídicas globulares estrechamente ligadas, las α - y β -tubulinas, que polimerizan en largos filamentos cilíndricos y huecos dentro de la célula. Muchos medicamentos y sustancias tóxicas alteran la estructura de los microtúbulos por su capacidad de oxidar los residuos de Cys de las tubulinas, en un proceso considerado beneficioso para la célula ya que no afecta la polimerización de los microtúbulos y puede servir para proteger a otras biomoléculas de resultar oxidadas^{75, 76}. Sin embargo, cuando el estado de oxidación en la célula es elevado, numerosos residuos de Cys de la tubulina resultan oxidados, lo que compromete la polimerización de los microtúbulos^{75, 77}. Varios los agentes pueden alterar el citoesqueleto. Por ejemplo, se ha descrito la capacidad de los iones metálicos (Cu^{2+} , Cd^{2+} , Cr^{6+}) de oxidar las tubulinas y provocar el desensamblaje de los microtúbulos o la del As^{3+} , que provoca la inhibición en la expresión de β -tubulina tanto a nivel de proteína como de RNA^(78 y referencias que cita). Los niveles de α - y β -tubulina (TUBA, TUBB) fueron inferiores en >2 veces en las branquias de los cangrejos de PAR/MAT comparados con la referencia (Tablas 2.2), un resultado plenamente coherente

con la acumulación de As y, especialmente, de Cr encontrados en este tejido de animales capturados en zonas contaminadas.

5.5. Conclusiones

Este trabajo demuestra que los animales procedentes de PAR/MAT presentan niveles alterados de diferentes proteínas implicadas en las respuestas celulares al estrés oxidativo. Por la intensidad de los cambios observados en los perfiles proteómicos, este trabajo confirma que MAT es una zona muy contaminada y PAR moderadamente contaminada, resultando la zona control LP como un espacio limpio. Asimismo, se confirma que la glándula digestiva se afecta mas que las branquias. Estos resultados están de acuerdo con los datos del contenido total de metales en sedimentos recogidos en los sitios estudiados (Cap. 1), el nivel de peroxidación lipídica (Cap. 2) y de oxidación de proteínas (Cap. 3 y 4)

Los cambios en los niveles de proteínas como PDI o la chaperona HSP70, encontrados en glándula digestiva y branquias de los animales de zonas problema, indican una inducción de estrés del retículo endoplásmico (ER), con la consiguiente alteración de las funciones de muchas proteínas, debido al mal plegamiento de las mismas.

La expresión diferencial de varias enzimas metabólicas en los cangrejos de zonas contaminadas indica una adaptación celular a la disfunción mitocondrial causada por su situación de estrés oxidativo y un cambio metabólico hacia un aumento de la glucólisis aeróbica, probablemente destinado a generar ATP y poder reductor en una situación de estrés oxidativo que altera la integridad mitocondrial.

Los niveles encontrados en proteínas como la GLDC o 3-HAO indican que la agresión oxidativa que soportan los cangrejos sometidos a contaminación crónica provoca también diversas respuestas relacionadas con la inflamación y la respuesta inmune.

En general, se puede afirmar que la exposición de *P. clarkii* a niveles elevados de contaminación causa una profunda alteración de todas sus funciones fisiológicas para tratar de adaptarse a las condiciones del medio. Muchas de las proteínas cuya abundancia se altera por contaminación pueden ser buenos biomarcadores de exposición a contaminantes para el monitoreo rutinario de los ecosistemas.

5.6. Referencias

- Abril, N.; Ruiz-Laguna, J.; Osuna-Jimenez, I.; Vioque-Fernández, A.; Fernández-Cisnal, R.; Chicano-Gálvez, E.; Alhama, J.; Lopez-Barea, J.; Pueyo, C., Omic approaches in environmental issues. *J Toxicol Environ Health A* 2011, 74: 1001-1019.
- Fernández-Cisnal, R.; Alhama, J.; Abril, N.; Pueyo, C.; Lopez-Barea, J., Redox proteomics as biomarker for assessing the biological effects of contaminants in crayfish from Donana National Park. *Sci Total Environ* 2014, 490, 121-33.
- Jebali, J.; Chicano-Gálvez, E.; Fernández-Cisnal, R.; Banni, M.; Chouba, L.; Boussetta, H.; López-Barea, J.; Alhama, J., Proteomic analysis in caged Mediterranean crab (*Carcinus maenas*) and chemical contaminant exposure in Tébourba Harbour, Tunisia. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 2014, 100, 15-26.
- Ghedira, J.; Chicano-Gálvez, E.; Fernández-Cisnal, R.; Jebali, J.; Banni, M.; Chouba, L.; Boussetta, H.; López-Barea, J.; Alhama, J., Using environmental proteomics to assess pollutant response of *Carcinus maenas* along the Tunisian coast. *Sci. Total Environ* (2016) 541: 109-118.
- Zhang, Q.-H.; Huang, L.; Zhang, Y.; Ke, C.-H.; Huang, H.-Q., Proteomic approach for identifying gonad differential proteins in the oyster (*Crassostrea angulata*) following food-chain contamination with HgCl₂. *J Proteomics* 2013, 94, (0), 37-53.
- Fan, L.; Wang, A.; Wu, Y., Comparative proteomic identification of the hemocyte response to cold stress in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *J Proteomics* 2013, 80C, 196-206.
- Campos, A.; Tedesco, S.; Vasconcelos, V.; Cristobal, S., Proteomic research in bivalves: Towards the identification of molecular markers of aquatic pollution. *J Proteomics* 2012, 75, (14), 4346-4359.
- Montes-Nieto, R.; Garcia-Barrera, T.; Gomez-Ariza, J. L.; Lopez-Barea, J., Environmental monitoring of Domingo Rubio stream (Huelva Estuary, SW Spain) by combining conventional biomarkers and proteomic analysis in *Carcinus maenas*. *Environ Pollut* 2010, 158, (2), 401-8.
- Leroy, D.; Haubruge, E.; De Pauw, E.; Thomé, J. P.; Francis, F., Development of ecotoxicoproteomics on the freshwater amphipod *Gammarus pulex*: Identification of PCB biomarkers in glycolysis and glutamate pathways. *Ecotoxicol Environ Saf* 2010, 73, (3), 343-352.
- Vioque-Fernández, A.; de Almeida, E. A.; Lopez-Barea, J., Biochemical and proteomic effects in *Procambarus clarkii* after chlorpyrifos or carbaryl exposure under sublethal conditions. *Biomarkers* 2009, 14, (5), 299-310.
- Vioque-Fernández, A.; Alves de Almeida, E.; López-Barea, J., Assessment of Doñana National Park contamination in *Procambarus clarkii*: Integration of conventional biomarkers and proteomic approaches. *Sci. Total Environ* 2009, 407, (5), 1784-1797.
- Lei, T.; He, Q.-Y.; Cai, Z.; Zhou, Y.; Wang, Y.-L.; Si, L.-S.; Cai, Z.; Chiu, J.-F., Proteomic analysis of chromium cytotoxicity in cultured rat lung epithelial cells. *Proteomics* 2008, 8, (12), 2420-2429.
- Gomez-Ariza, J. L.; Gonzalez-Fernández, M.; Garcia-Barrera, T.; Lopez-Barea, J.; Pueyo, C., Integration of metallomics, proteomics and transcriptomics in environmental issues. *Chemické Listy* 2008, 102, 303-308.
- Oliveira, B. M.; Coorsen, J. R.; Martins-de-Souza, D., 2DE: The Phoenix of Proteomics. *J Proteomics* 2014, 104, 140-150.
- Rogowska-Wrzęsinska, A.; Le Bihan, M.-C.; Thaysen-Andersen, M.; Roepstorff, P., 2D gels still have a niche in proteomics. *J. Proteomics* 2013, 88, 4-13.
- Catherman, A. D.; Skinner, O. S.; Kelleher, N. L., Top Down proteomics: Facts and perspectives. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2014, 445:683-693.
- Alban, A.; David, S. O.; Bjorkesten, L.; Andersson, C.; Sloge, E.; Lewis, S.; Currie, I., A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: Two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics* 2003, 3, (1), 36-44.
- Marouga, R.; David, S.; Hawkins, E., The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem* 2005, 382, (3), 669-78.
- Gürtler, A.; Kunz, N.; Gomolka, M.; Hornhardt, S.; Friedl, A. A.; McDonald, K.; Kohn, J. E.; Posch, A., Stain-Free technology as a normalization tool in Western blot analysis. *Anal. Biochem.* 2013, 433, (2), 105-111.
- Chaudhari, N.; Talwar, P.; Parimisetty, A.; Lefebvre d'Hellencourt, C.; Ravanan, P., A molecular web: endoplasmic reticulum stress, inflammation, and oxidative stress. *Front Cell Neurosci* 2014, 8, 213.
- Malhotra, J. D.; Kaufman, R. J., Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid Redox Signal* 2007, 9, (12), 2277-93.
- Na, K. S.; Park, B. C.; Jang, M.; Cho, S.; Lee do, H.; Kang, S.; Lee, C. K.; Bae, K. H.; Park, S. G., Protein disulfide isomerase is cleaved by caspase-3 and -7 during apoptosis. *Mol Cells* 2007, 24, (2), 261-7.
- Muller, C.; Bandemer, J.; Vindis, C., et al., Protein disulfide isomerase modification and inhibition contribute to ER stress and apoptosis induced by oxidized low density lipoproteins. *Antioxid Redox Signal* 2013, 18, (7), 731-42.

24. Lindquist, S.; Craig, E. A., The Heat-Shock Proteins. *Annu. Rev. Genet* 1988, 22, (1), 631-677.
25. Borges, T. J.; Wieten, L.; van Herwijnen, M. J.; Broere, F.; van der Zee, R.; Bonorino, C.; van Eden, W., The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70. *Front Immunol* 2012, 3, 95.
26. Celi, M.; Filiciotto, F.; Parrinello, D.; Buscaino, G.; Damiano, M. A.; Cuttitta, A.; D'Angelo, S.; Mazzola, S.; Vazzana, M., Physiological and agonistic behavioural response of *Procambarus clarkii* to an acoustic stimulus. *J Exp Biol* 2013, 216, (Pt 4), 709-18.
27. Bennett, S.; Griffiths, H., Regulation of T-Cell Functions by Oxidative Stress. In *Studies on Arthritis and Joint Disorders*, Alcaraz, M. J.; Gualillo, O.; Sánchez-Pernaute, O., Eds. Springer New York: 2013; pp 33-48.
28. Malik, M. F.; Ye, L.; Jiang, W. G., The Plexin-B family and its role in cancer progression. *Histol Histopathol* 2014, 29, (2), 151-65.
29. Van Baren, N.; Van den Eynde, B. J., Tryptophan-degrading enzymes in tumoral immune resistance. *Front Immunol* 2015, 6, 34.
30. Li, L.; Huang, L.; Lemos, H.; Mautino, M.; Mellor, A. L., Altered tryptophan metabolism as a paradigm for good and bad aspects of immune privilege in chronic inflammatory diseases. *Front Immunol*. 2012, 3.
31. Rapisarda, A.; Pastorino, S.; Massazza, S.; Varesio, L.; Bosco, M. C., Antagonistic effect of picolinic acid and interferon- γ on macrophage inflammatory protein-1 α/β production. *Cellular immunology* 2002, 220, (1), 70-80.
32. Hayashi, T.; Mo, J. H.; Gong, X., et al., 3-Hydroxyanthranilic acid inhibits PDK1 activation and suppresses experimental asthma by inducing T cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104, (47), 18619-24.
33. Almanza-Perez, J. C.; Alarcon-Aguilar, F. J.; Blancas-Flores, G.; Campos-Sepulveda, A. E.; Roman-Ramos, R.; Garcia-Macedo, R.; Cruz, M., Glycine regulates inflammatory markers modifying the energetic balance through PPAR and UCP-2. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2010, 64, (8), 534-540.
34. Pai, Y. J.; Leung, K.-Y.; Savery, D., et al., Glycine decarboxylase deficiency causes neural tube defects and features of non-ketotic hyperglycinemia in mice. *Nat Commun* 2015, 6, 6388-6388.
35. Quemeneur, L.; Gerland, L. M.; Flacher, M.; Ffrench, M.; Revillard, J. P.; Genestier, L., Differential control of cell cycle, proliferation, and survival of primary T lymphocytes by purine and pyrimidine nucleotides. *J Immunol* 2003, 170, (10), 4986-95.
36. Torti, F. M.; Torti, S. V., Regulation of ferritin genes and protein. *Blood* 2002, 99, (10), 3505-16.
37. Osuna-Jiménez, I.; Abril, N.; Vioque-Fernández, A.; Gómez-Ariza, J. L.; Prieto-Álamo, M.-J.; Pueyo, C., The environmental quality of Doñana surrounding areas affects the immune transcriptional profile of inhabitant crayfish *Procambarus clarkii*. *Fish Shellfish Immunol* 2014, 40, (1), 136-145.
38. Welch, K. D.; Reilly, C. A.; Aust, S. D., The role of cysteine residues in the oxidation of ferritin. *Free Radical Bio Med* 2002, 33, (3), 399-408.
39. Rudeck, M.; Volk, T.; Sitte, N.; Grune, T., Ferritin oxidation in vitro: implication of iron release and degradation by the 20S proteasome. *IUBMB Life* 2000, 49, (5), 451-6.
40. Lee, S. Y.; Lee, B. L.; Soderhall, K., Processing of crayfish hemocyanin subunits into phenoloxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 332, 490-496.
41. Lee, S. Y.; Lee, B. L.; Soderhall, K., Processing of an antibacterial peptide from hemocyanin of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J Biol Chem* 2003, 278, (10), 7927-33.
42. Coates, C. J.; Nairn, J., Diverse immune functions of hemocyanins. *Dev Comp Immunol* 2014, 45: 43-55.
43. Sun, S.; Chen, L.; Qin, J.; Ye, J.; Qin, C.; Jiang, H.; Li, E., Molecular cloning, characterization and mRNA expression of copper-binding protein hemocyanin subunit in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Fish Shellfish Immunol* 2012, 33, (5), 1222-1228.
44. Xu, J. P.; Ruan, L.; Li, Z.; Yu, X.; Li, S.; Shi, H.; Xu, X., Characterization of four hemocyanin isoforms in *Litopenaeus vannamei*. *Acta Oceanol. Sin.* 2015, 34, (2), 36-44.
45. Osuna-Jiménez, I.; Abril, N.; Vioque-Fernández, A.; Gómez-Ariza, J. L.; Prieto-Álamo, M.-J.; Pueyo, C., The environmental quality of Doñana surrounding areas affects the immune transcriptional profile of inhabitant crayfish *Procambarus clarkii*. *Fish Shellfish Immunol* 2014, 40, (1), 136-145.
46. Coates, C. J.; Nairn, J., Diverse immune functions of hemocyanins. *Developmental & Comparative Immunology* 2014, 45, (1), 43-55.
47. David, S.; Hamilton, J. P., Drug-induced Liver Injury. *US Gastroenterol Hepatol Rev* 2010, 6, 73-80.
48. Shenton, D.; Grant, C. M., Protein S-thiolation targets glycolysis and protein synthesis in response to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 2003, 374, (Pt 2), 513-9.
49. Shi, D.-y.; Xie, F.-z.; Zhai, C.; Stern, J.; Liu, Y.; Liu, S.-l., The role of cellular oxidative stress in regulating glycolysis energy metabolism in hepatoma cells. *Mol Cancer* 2009, 8, (1), 1-15.
50. Hao, X. L.; Yao, H. F.; Cheng, Y. Z.; Wang, R. X., Homology cloning, sequence characterization, and expression analysis of cDNA encoding electron transfer flavoprotein beta polypeptide in mud crab (*Scylla paramamosain*). *Genet Mol Res* 2012, 11, (4), 4316-22.
51. Fisher-Wellman, K. H.; Neuffer, P. D., Linking mitochondrial bioenergetics to insulin resistance via redox biology. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 2012, 23, (3), 142-153.

52. Watmough, N. J.; Frerman, F. E., The electron transfer flavoprotein: Ubiquinone oxidoreductases. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics* 2010, 1797, (12), 1910-1916.
53. Chen, X.; Yao, P.; Chu, X.; Hao, L.; Guo, X.; Xu, B., Isolation of arginine kinase from *Apis cerana cerana* and its possible involvement in response to adverse stress. *Cell Stress Chaperones* 2015, 20, (1), 169-83.
54. Wang, W.-D.; Wang, J.-S.; Shi, Y.-L.; Zhang, X.-C.; Pan, J.-C.; Zou, G.-L., Mutation of residue arginine 330 of arginine kinase results in the generation of the oxidized form more susceptible. *Int. J. Biol. Macromol.* 2013, 54, 238-243.
55. Srinivasan, S.; Avadhani, N. G., Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress. *Free Radical Bio Med* 2012, 53, (6), 1252-1263.
56. Mellai, M.; Caldera, V.; Annovazzi, L.; Schiffer, D., The Distribution and Significance of IDH Mutations in Gliomas. In *Evolution of the Molecular Biology of Brain Tumors and the Therapeutic Implications*, Lichtor, T., Ed. InTech 2013.
57. Cairns, R. A.; Mak, T. W., Oncogenic Isocitrate Dehydrogenase Mutations: Mechanisms, Models, and Clinical Opportunities. *Cancer Discovery* 2013, 3, 730-741.
58. Liu, J.; Litt, L.; Segal, M. R.; Kelly, M. J.; Pelton, J. G.; Kim, M., Metabolomics of oxidative stress in recent studies of endogenous and exogenously administered intermediate metabolites. *Int J Mol Sci* 2011, 12, (10), 6469-501.
59. Smolkova, K.; Jezek, P., The Role of Mitochondrial NADPH-Dependent Isocitrate Dehydrogenase in Cancer Cells. *Int J Cell Biol* 2012, 2012, 273947.
60. Kil, I. S.; Shin, S. W.; Yeo, H. S.; Lee, Y. S.; Park, J.-W., Mitochondrial NADP+-Dependent Isocitrate Dehydrogenase Protects Cadmium-Induced Apoptosis. *Molecular pharmacology* 2006, 70, (3), 1053-1061.
61. Oliva, M.; Perales, J. A.; Gravato, C.; Guilhermino, L.; Galindo-Riaño, M. D., Biomarkers responses in muscle of Senegal sole (*Solea senegalensis*) from a heavy metals and PAHs polluted estuary. *Marine pollution bulletin* 2012, 64, (10), 2097-2108.
62. Zhang, D.; Li, J.; Wang, F.; Hu, J.; Wang, S.; Sun, Y., 2-Deoxy-D-glucose targeting of glucose metabolism in cancer cells as a potential therapy. *Cancer Lett* 2014, 355, (2), 176-83.
63. Ishii, T.; Itoh, K.; Takahashi, S.; Sato, H.; Yanagawa, T.; Katoh, Y.; Bannai, S.; Yamamoto, M., Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *J Biol Chem* 2000, 275, (21), 16023-9.
64. Itoh, K.; Wakabayashi, N.; Katoh, Y.; Ishii, T.; Igarashi, K.; Engel, J. D.; Yamamoto, M., Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes & development* 1999, 13, (1), 76-86.
65. Sullivan, L. B.; Garcia-Martinez, E.; Nguyen, H.; Mullen, A. R.; Dufour, E.; Sudarshan, S.; Licht, J. D.; Deberardinis, R. J.; Chandel, N. S., The protonometabolite fumarate binds glutathione to amplify ROS dependent signaling. *Molecular cell* 2013, 51, (2), 236-248.
66. Mitsuishi, Y.; Motohashi, H.; Yamamoto, M., The Keap1-Nrf2 system in cancers: Stress response and anabolic metabolism. *Frontiers in Oncology* 2012, 2.
67. Hayes, J. D.; Flanagan, J. U.; Jowsey, I. R., GLUTATHIONE TRANSFERASES. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2004, 45, (1), 51-88.
68. Hayes, J. D.; Pulford, D. J., 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* 1995, 30, (6), 445-600.
69. Pajaud, J.; Kumar, S.; Rauch, C.; Morel, F.; Aninat, C., Regulation of Signal Transduction by Glutathione Transferases. *International journal of hepatology* 2012, 2012, 137676.
70. DeBerardinis, R. J.; Lum, J. J.; Hatzivassiliou, G.; Thompson, C. B., The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metabolism* 2008, 7, (1), 11-20.
71. Vander Heiden, M. G.; Cantley, L. C.; Thompson, C. B., Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009, 324, (5930), 1029-33.
72. Craig-Venter, J.; Adams, M. D.; Myers, E. W., et al., The sequence of the human genome. *Science* 2001, 291, (5507), 1304-51.
73. Yi, P.; Melnyk, S.; Pogribna, M.; Pogribny, I. P.; Hine, R. J.; James, S. J., Increase in Plasma Homocysteine Associated with Parallel Increases in Plasma S-Adenosylhomocysteine and Lymphocyte DNA Hypomethylation. *J. Biol. Chem* 2000, 275, (38), 29318-29323.
74. Hou, L.; Zhang, X.; Wang, D.; Baccarelli, A., Environmental chemical exposures and human epigenetics. *Int J Epidemiol* 2012, 41, (1), 79-105.
75. Landino, L. M.; Iwig, J. S.; Kennett, K. L.; Moynihan, K. L., Repair of peroxynitrite damage to tubulin by the thioredoxin reductase system. *Free Radic Biol Med* 2004, 36, (4), 497-506.
76. Landino, L. M.; Moynihan, K. L.; Todd, J. V.; Kennett, K. L., Modulation of the redox state of tubulin by the glutathione/glutaredoxin reductase system. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2004, 314, (2), 555-560.
77. Clark, H. M.; Hagedorn, T. D.; Landino, L. M., Hypothiocyanous acid oxidation of tubulin cysteines inhibits microtubule polymerization. *Archives of biochemistry and biophysics* 2014, 541, 67-73.
78. Zhao, Y.; Toselli, P.; Li, W., Microtubules as a critical target for arsenic toxicity in lung cells in vitro and in vivo. *Int J Environ Res Public Health* 2012, 9, 474-95.

CAPÍTULO 6



**ANÁLISIS
METABOLÓMICO
DE LA RESPUESTA
DE *P. CLARKII*
A CONTAMINACIÓN
AMBIENTAL**

6.1. Resumen

La metabolómica analiza el conjunto completo de metabolitos de bajo peso molecular que hay en una célula en determinadas condiciones. Esta metodología refleja mejor que otras *ómicas* el estado fisiológico de un sistema biológico, ya que los metabolitos surgen como producto final de la interacción entre la expresión de genes y proteínas y el ambiente celular. En este trabajo hemos utilizado un espectrómetro de masas de infusión directa con fuente de electrospray y analizador de masas QqQ-TOF-MS para identificar y cuantificar metabolitos cuya abundancia se ve alterada en *P. clarkii* capturados en las zonas PAR y MAT, en comparación con animales procedentes de la zona de referencia LP.

Los resultados obtenidos demostraron diferencias significativas en los niveles de varios metabolitos en animales de zonas contaminadas. Se encontró un descenso significativo de los niveles de fosfatidilcolinas en cangrejos capturados en PAR y MAT, lo que es un indicador de alteración y disfunción de las biomembranas. La elevación de β -oxidación observada serviría como vía de eliminación de los lípidos dañados por peroxidación. Se encontraron también niveles alterados de metabolitos con propiedades antioxidantes y osmorreguladoras (betaína, taurina), que sugieren una activación de rutas protectoras para paliar los efectos oxidantes de los contaminantes en estas zonas que rodean Doñana. También se incrementaron niveles de metabolitos (acetilcolina) que implican aumento de actividades enzimáticas (3-HAO, GLDC, ver Capítulo 5) encaminadas a inhibir la excesiva producción de citoquinas proinflamatorias y, así, restaurar la homeostasis. Acetilcolina y dopamina serían responsables de la elevación de los niveles de glucosa encontrados en animales de PAR y MAT y del cambio metabólico hacia la glucólisis aeróbica en glándula digestiva, para generar energía en un ambiente celular oxidativo que altera la función mitocondrial. La gran cantidad de piruvato generada en esta vía glucolítica explicaría la elevación de los niveles de TGA. La intensidad de los cambios observados estuvo íntimamente relacionada con la acumulación de metales y los daños oxidativos a lípidos y proteínas, y los resultados corroboran los encontrados en capítulos anteriores, y las hipótesis propuestas sobre los cambios metabólicos y de respuesta a estrés que ocurren en animales a consecuencia de la contaminación.

6.2. Introducción

La metabolómica es una aproximación de la genómica funcional que persigue el estudio del conjunto completo de metabolitos endógenos de bajo peso molecular (típicamente < 1000 Da) que hay en una célula o tejido de un ser vivo bajo determinadas condiciones internas/externas. Se afirma que los datos de metabolómica son más precisos que los obtenidos mediante proteómica o transcriptómica en cuanto a reflejar el estado fisiológico de un sistema biológico, puesto que los metabolitos surgen como producto final de la interacción entre la expresión de genes y de proteínas y el ambiente celular ¹. Se podría considerar que, si bien los datos genómicos y proteómicos sugieren lo que podría estar sucediendo en una célula, el perfil metabólico puede dar una imagen instantánea de la fisiología de esta célula.

Al igual que la transcriptómica o la proteómica, la metabolómica constituye una herramienta sumamente útil para la diagnosis de cambios importantes a nivel celular y biológico relacionados con el medio ambiente, los alimentos y la salud, siendo uno de los atractivos más importantes de esta disciplina la posibilidad de llevar a cabo, si es necesario, análisis cuantitativos no invasivos en tejidos y fluidos biológicos. Los enfoques metabolómicos se han desarrollado en muchas áreas de la investigación bioanalítica, incluyendo la Toxicología ², debido a la posibilidad de detectar la respuesta metabólica a la exposición química con el propósito de encontrar biomarcadores sobre el estado fisiológico real de los organismos vivos. Por esta razón, la metabolómica juega un papel clave para entender los resultados de los procesos biológicos complejos, tales como exposición a xenobióticos y elementos tóxicos (^{3, 4 y referencias que citan}). En este sentido, la metabolómica ambiental es un metodología de creciente aplicación en el estudio de los perfiles metabólicos de sistemas biológicos expuestos a estrés medioambiental, para poder así caracterizar las interacciones de los xenobióticos con los organismos vivos ^{5, 6}. Cuando se emplea de forma integrada con otras *ómicas*, como genómica, transcriptómica y proteómica, la metabolómica permite evaluar el impacto bioquímico global de los xenobióticos y los aspectos toxicológicos que lo acompañan ⁶. Los procedimientos metabolómicos pueden aplicarse a organismos de vida libre o en experiencias de exposición, para comprobar qué contaminantes pueden causar un efecto crónico o

conocer el modo de acción ⁷ de un tóxico a nivel metabólico como parte de la evaluación del riesgo ambiental. Se ha hablado de los fundamentos y la metodología de la metabolómica en la Introducción (Pág. 66)

Como vimos antes la presencia de metales en las zonas del PND objeto de estudio provoca una situación de estrés oxidativo tanto en glándula digestiva y branquias de los cangrejos *P. clarkii* capturados en ellas. A lo largo de los capítulos anteriores se ha visto cómo debido a él se producen daños oxidativos a lípidos y proteínas y cambios en los perfiles de expresión proteica que determinan importantes modificaciones en el metabolismo celular de estos animales para adaptarse a esta situación crónica de estrés. El estudio de cambios en los niveles de metabolitos complementará a los capítulos anteriores y permitirá determinar que procesos metabólicos son afectados por la contaminación en *Procambarus clarkii*.

En un estudio preliminar previo, considerando en conjunto varios tejidos de *P. clarkii* capturados en estas zonas, se han descrito claras diferencias entre especímenes capturados en la zona de referencia y las contaminadas, que, a nivel de organismo completo, parecen mostrar desbalance metabólico ⁸. Para identificar y caracterizar con mayor detalle los cambios que se producen a nivel metabólico en *P. clarkii* por efecto de la contaminación se analizaron los metabolomas de glándula digestiva y branquias de *P. clarkii* capturados de LP, PAR y MAT mediante DIMS QqQ-TOF-MS.

6.3. Materiales y métodos

6.3.1. Muestras utilizadas.

Se analizaron glándula digestiva y branquias de *P. clarkii*. Se prepararon cuatro mezclas por sitio de muestreo (LP, PAR y MAT) mezclando iguales cantidades de tejido homogeneizado de 3-4 cangrejos por pool (las mismas utilizadas en el análisis 2D-DIGE Cap. 5). Las tres mezclas por sitio se consideraron réplicas biológicas.

6.3.2. Preparación de muestras para análisis metabolómico

Para evitar pérdidas de ciertos metabolitos, tanto para glándula digestiva como para branquias, la extracción se hizo en dos pasos. En primer lugar, se extrajeron los metabolitos polares a partir de 30 mg de tejido de cada RB previamente criohomogenizado, que se mezclaron con 300 μL de metanol al 0,1% en ácido fórmico frío (- 20° C). La mezcla se homogenizó durante 2 min usando un pistilo con motor y, posteriormente, se centrifugó (10.000 rpm, 4 °C) durante 10 min. El sobrenadante resultante (*extracto polar*) se almacenó a -80 ° C hasta su análisis. A continuación, se extrajeron los metabolitos lipofílicos a partir del precipitado obtenido en la centrifugación anterior. Para ello, se mezcló este precipitado con 300 μL de cloroformo y metanol (2:1) conteniendo 10 mM de formiato de amonio (para formar aductos de amoniaco) y 0,1 % de ácido fórmico, usando un pistilo con motor durante 2 min. Finalmente, el extracto se centrifugó (10.000 rpm, 4 ° C) 10 min. y el sobrenadante (*extracto apolar*) se almacenó a -80 ° C hasta su análisis.

Para optimizar la ionización por electroespray usada en espectrometría de masas (ESI-MS), se emplearon diferentes aditivos. Para el modo de iones positivos se añadió ácido fórmico 0,1% a los extractos polares, para potenciar la protonación. Para el ESI en modo de iones negativos, se añadió amonio (10 mM acetato amónico) para los extractos lipofílicos, a fin de potenciar la desprotonación, ya que los lípidos neutros no se ionizan fácilmente. Para el caso de la ionización negativa en los extractos polares no fue necesaria la adicción de ningún reactivo.

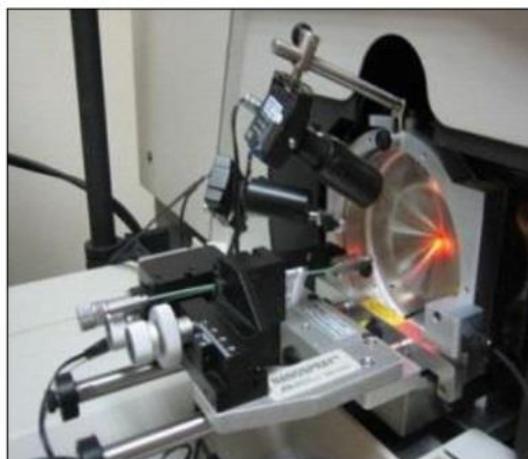


Figure 6.2. Photograph of the nano-electrospray source used in the present study.

6.3.3. Análisis metabolómico mediante DI-ESI(+)-QqQ-TOF-MS

El análisis mediante DIMS (*Direct Infusion Mass Spectrometry*) se llevó a cabo en el Departamento de Química y Ciencias de los Materiales de la Universidad de Huelva. Se empleó el sistema híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo *QSTAR XL Hybrid* (Applied Biosystems), usando un electrospray (Fig. 6.2) como fuente de ionización, según el método previamente optimizado por García-Sevillano et al.⁹ (Tabla 6.1). Tanto los extractos polares como los lipofílicos fueron analizados en los modos de ionización (ESI+/ESI-) dando lugar a diferentes perfiles en un amplio rango espectral (m/z 50 a 1.100). Se adquirió un espectro completo cada 0,2 min en un amplio rango espectral (m/z 50 a 1100), con un tiempo de escaneo de 1,005 s por escaneo. Para el modo positivo se fijó el voltaje del electrospray a 3.300 V usándose N_2 de alta pureza como gas cortina (a $1,13 \text{ L min}^{-1}$) y gas nebulizador (a $1,56 \text{ L min}^{-1}$). La temperatura de la fuente se fijó en 60°C con un potencial de desolvatación (DP) de 60 V y un potencial de enfoque (FP) de 250 V. Para adquirir los espectros de MS/MS se usó N_2 como gas de colisión.

Table 6.1. Operational conditions used for metabolomic analysis by DI-ESI-QqQ-TOF-MS.

Operational conditions DI-ESI-QqQ-TOF-MS		
Flow	$5 \mu\text{L min}^{-1}$	
Acquisition time	0,2 min	
Range m / z	50-1100	
Collision gas (N2)	$1,13 \text{ L min}^{-1}$	
Nebulizing gas (N2)	$1,56 \text{ L min}^{-1}$	
Source temperature	60°C	
	Acquisition mode	
	Positive Mode	Negative Mode
Ion spray voltage (IS)	3300 V	-4000 V
Solvation potential (DP)	60 V	-100 V
Potential approach (FP)	250 V	-250 V
Ion energy (IE)	2.0 V	-2.0 V
Channel electron multiplier (CEM)	2200 V	2200 V

6.3.4. Análisis estadístico de resultados e identificación de metabolitos

Procesamiento de datos. Todas las muestras se analizaron por duplicado y al azar. Antes de realizar el análisis estadístico de los resultados obtenidos, éstos fueron procesados para eliminar variaciones en tiempos de retención o en intensidad de pico. Tras adquirir los datos por DI-ESI-QqQ-TOF-MS, los resultados fueron tratados con el software Markerview™ (Applied Biosystems,) para filtrarlos, transformarlos en una matriz de dos dimensiones y finalmente normalizados para su posterior análisis mediante el análisis multivariante.

Análisis Estadístico Multivariante. El análisis de datos estadísticos de los resultados se hizo por análisis de componentes principales (PCA) y análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) usando el paquete de software estadístico SIMCA-P™ (versión 11.5). Los parámetros de calidad del modelo utilizados R^2 y Q^2 nos indican la precisión y exactitud del mismo y, por tanto, proporciona información sobre la separación entre grupos de exposición y el poder de predicción del modelo. En este trabajo, dichos parámetros estaban dentro del rango 0-1. Finalmente, para la identificación de los metabolitos alterados se utilizó el parámetro VIP (variable independiente en proyección). VIP es una suma ponderada de los cuadrados de PLS-DA, que indica la importancia de la variable a todo el modelo. El coeficiente VIP indica la variación conjunta entre cada variable explicativa y la variable respuesta. Por lo tanto, es posible seleccionar variables con la contribución más significativa para discriminar entre los perfiles metabólicos correspondientes a grupos de exposición frente a los controles. En este trabajo solo se seleccionaron las variables con valores $VIP > 1,5$ cuyo valor indica una diferencia significativa entre los distintos grupos experimentales. Se determinaron que metabolitos presentaban concentraciones diferentes en función de la zona de muestreo mediante las medidas de masa exacta que permite el equipo y mediante la obtención de los espectros de fragmentación MS/MS. Adicionalmente, la validación de los resultados obtenidos se realizó mediante tratamiento estadístico t de Student usando el programa STATISTICA 8.0. Los metabolitos alterados con valor de $P < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Identificación de metabolitos. La identificación de los metabolitos con abundancia diferencial entre las muestras se llevó a cabo por comparación de sus espectros MS/MS

con los disponibles en las diferentes bases de datos metabólicas públicas, como METLIN (<http://metlin.scripps.edu>) y Mass Bank (<http://www.massbank.jp>), con una precisión de 100 ppm.

6.4. Resultados y Discusión

6.4.1. Preparación de muestras para análisis metabólico

Frente a la genómica y la proteómica que tratan combinaciones de 4 bases y 20 aminoácidos, respectivamente, la metabolómica se enfrenta a la gran complejidad química y física de los metabolitos, que engloban compuestos muy polares y otros muy hidrófobos, con masas muy diversas de 50 a 1.000 Da. Además, algunos, como hormonas y neurotransmisores, están presentes en muy bajas concentraciones (pM) mientras que otros, como la glucosa o algunos aminoácidos, se presentan en concentraciones mM en la gran mayoría de las matrices biológicas¹⁰⁻¹². Por ello, la preparación de la muestra es un paso crucial en metabolómica, ya que al tratarse de una ciencia holística en la que se pretende analizar la totalidad de los metabolitos, el tratamiento debe ser lo más simple posible para evitar pérdidas de algunos de ellos, como puede ocurrir con técnicas de extracción convencionales, y poder realizar una correcta interpretación biológica de los resultados obtenidos del estudio¹³. Dada esta heterogeneidad, no existe un método de preparación de muestra ni una técnica analítica universal que permita la detección de todos los metabolitos presentes en una determinada muestra biológica. En nuestro caso, la extracción se realizó en dos pasos, separando metabolitos polares y lipofílicos secuencialmente y utilizando aditivos específicos (ácido fórmico para los extractos polares y acetato amónico para los apolares) para optimizar la sensibilidad en el análisis mediante electroespray espectrometría de masas (ESI-MS).

6.4.2. Análisis metabólico mediante *DI-ESI(+)-QqQ-TOF-MS*

La técnica de infusión directa de las muestras acoplada a un espectrómetro de masas es un método sencillo, rápido y altamente reproducible para el *screening* de perfiles metabólicos, que elimina el filtro que representa el uso de técnicas cromatográficas acopladas, y permite tener una información más amplia de los analitos presentes en las muestras. En este trabajo hemos hecho uso de un espectrómetro de masas de infusión directa con fuente de electroespray y analizador de masas QqQ-TOF-MS (*Triple quadrupole mass spectrometer time-of-flight mass spectrometer*) que proporciona elevada sensibilidad y resolución, y evita en gran medida los problemas de supresión iónica asociados a la infusión directa. Además, este sistema permite la identificación de especies mediante experimentos MS/MS en los que los cuadrupolos Q1 y Q3 actúan como filtros de masas, Q2 como celda de colisión y el TOF como analizador de masas.

Para el análisis metabólico mediante DIMS se usaron para ambos tipos de extractos (polares y no polares) los modos ion positivo (ESI+) y negativo (ESI-), diferenciándose los perfiles en un amplio rango espectral (m/z 50 a 1.100) en todos los casos, como se muestra en la Fig. 6.3.

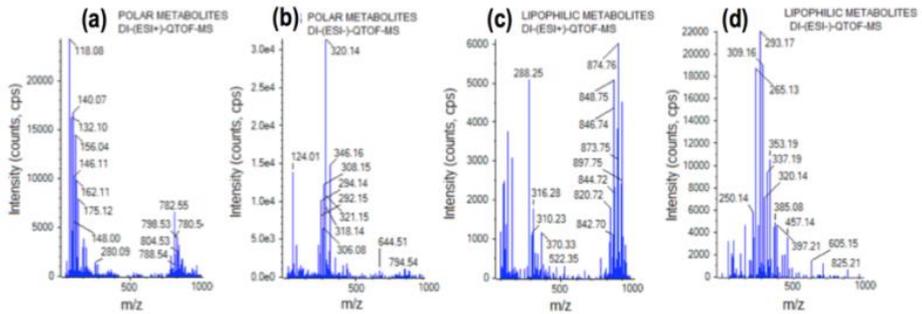
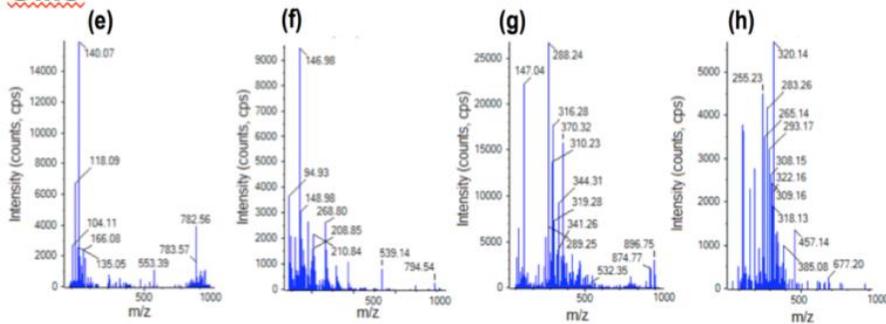
(A) Digestive gland**(B) Gills**

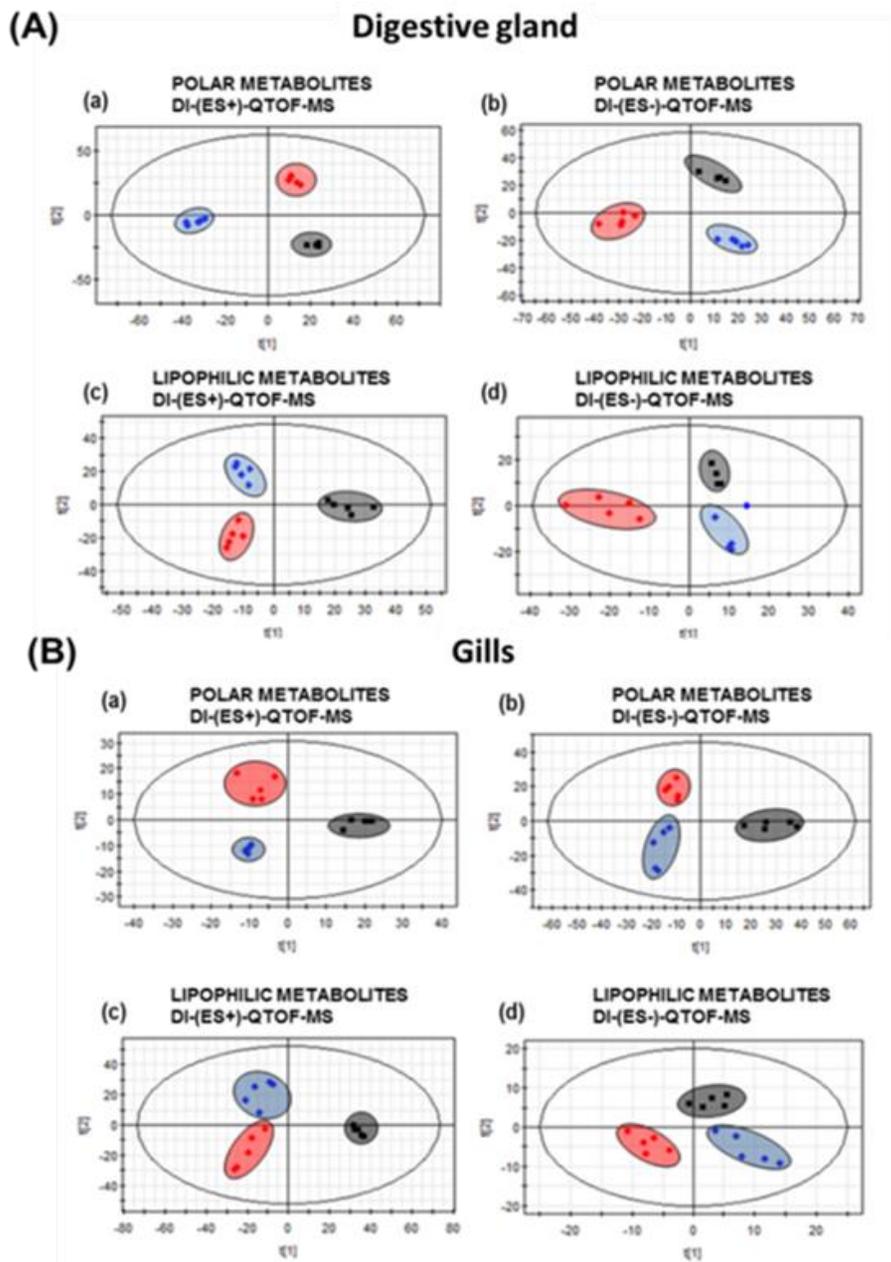
Figure 6.3. Mass spectra from digestive glands and gills tissue extracts of crayfish collected in LP. (a, e) ESI(+) spectrum of polar metabolites; (b, f) ESI(-) spectrum of polar metabolites; (c, g) ESI(+) spectrum of lipophilic metabolites; (d, h) ESI(-) spectrum of lipophilic metabolites.

Estos estudios estadísticos son de gran utilidad en metabolómica ya que el número de muestras y de variables es muy elevado. El empleo de estas técnicas en la evaluación de los resultados presenta numerosas aplicaciones, como la visualización de diferencias o semejanzas entre distintas muestras, búsqueda de variables que producen diferencias entre los grupos o la construcción de modelos predictivos. El análisis de datos estadísticos de los resultados se llevó a cabo mediante análisis de componentes principales (PCA) y el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA). Los parámetros de calidad, R² y Q² se mantuvieron dentro del rango 0-1, indicando que la separación entre los grupos es correcta.

Los modelos construidos con metabolitos polares y lipofílicos usando el modo positivo y negativo, a partir de los resultados del análisis PLS-DA y empleando las

intensidades de las señales de todos los experimentos, permitieron una buena clasificación de las muestras de las tres áreas estudiadas. En la Fig. 6.4 se muestran estos modelos con sus respectivos diagramas de puntuación.

Figure 6.4. Scores plots of PLS-DA for ESI+ and ESI- ionization modes of polar and lipophilic digestive glands (A) and gills (B) extracts from *P. clarkii* captured in the three studied sites. Black squares: LP; blue diamond: PAR; red circle: MAT.



El coeficiente VIP permitió identificar las variables que contribuyen más significativamente en la discriminación entre los perfiles metabolómicos de los cangrejos de diferentes zonas. Los valores de R²Y (variación explicada en Y, acumulativa) y Q² (capacidad predictiva, acumulativa) del modelo combinado fueron 0,85-0,99 y 0,80-0,95, respectivamente, lo que indica que una combinación de conjuntos de datos apareados de diferentes tiempos de exposición permite su clasificación. Solo fueron seleccionadas las variables con valores VIP >1,5 para su uso en experimentos MS/MS adicionales con vistas a identificar los metabolitos alterados usando bases de datos metabolómicas de libre acceso.

6.4.3. Metabolitos con abundancia diferente en glándula digestiva de cangrejos *P. clarkii* capturados en zonas contaminadas.

El empleo de los análisis estadísticos anteriores, y el de espectrometría de masas ha permitido la caracterización de posibles biomarcadores que están alterados en función de la contaminación de la zona de capturas de los cangrejos. Para valorar el efecto de la contaminación en la glándula digestiva de estos cangrejos de distintas zonas del PND y su entorno, se determinó el número de veces de cambio (*fold-change*) como el cociente entre las medias de intensidades obtenidas para cada metabolito en los animales de PAR y MAT, y las de las intensidades obtenidas para el metabolito en cuestión en el grupo control LP. Se muestran estos datos en la Tabla 6.2, en la que es de destacar la complementariedad existente entre ambos modos de ionización para los metabolitos polares y lipofílicos. Se observaron diferencias significativas en los niveles de varios metabolitos en animales procedentes de zonas contaminadas, especialmente en cangrejos de MAT. Los datos de nuevo están en consonancia con la mayor concentración de metales, oxidación de lípidos y de proteínas en los animales procedentes de la zona de MAT (Cap. 1, 2 y 3) que señalan a MAT como una zona altamente contaminada y a PAR como moderadamente contaminada, y demuestran que sus habitantes están sometidos a un fuerte estrés oxidativo.

Table 6.2. Potential biomarkers of pollution in the digestive gland of *P. clarkii* crayfish captured in different areas from DNP and surroundings.

Altered Metabolites	m/z	Mode of acquisition	Extract	Fold change		
				PAR	MAT	
Metabolism						
Glucose	203.05 [M+Na] ⁺	ESI (+)	Digestive glands	Polar	2,69	1,61
			Gills		2,8	2,33
Acetoacetato	103.12 [M+H] ⁺	ESI (+)	Digestive glands	Polar	1,73	2,5
Acetyl carnitine	204.12 [M+H] ⁺	ESI (+)	Digestive glands	Polar	1,44	2,3
Carnitine	162.11 [M+H] ⁺	ESI (+)	Digestive glands	Lipophilic	-1,94	2,45
			Gills	Polar	-2,14	2,31
					-1,17	-1,69
Guanidineacetic acid	135.05 [M+H] ⁺	ESI (+)	Digestive glands	Lipophilic	-3,1	1,06
Citric acid	191.04 [M+H] ⁺	ESI (-)	Digestive glands	Polar	-1,7	-1,9
			Gills		-1,57	-1,75
Creatinine	114.07 [M+H] ⁺	ESI (+)	Digestive glands	Polar	-2,35	1,07
Thymine	125.01 [M-H] ⁻	ESI (-)	Digestive glands	Polar	1,19	2,56
3-Hydroxybutiric acid	103.03 [M-H] ⁻	ESI (-)	Gills	Polar	1,15	1,38
Malic acid	135.03 [M+H] ⁺	ESI (+)	Gills	Lipophilic	-11,76	5,42
Uric acid	167.02 [M-H] ⁻	ESI (-)	Gills	Polar	1,7	3,3
Neurotransmitters						
Acetyl-choline	146.12 [M+H] ⁺	ESI (+)	Digestive glands	Polar	2,89	2,96
			Gills		1,45	1,69
Dopamine	154.05 [M+H] ⁺	ESI (+)	Digestive glands	Lipophilic	1,19	4,14
Antioxidants/osmoregulators						
Betaine	118.09 [M+H] ⁺	ESI (+)	Digestive glands	Lipophilic	2,54	2,48
Carnosine	227.13 [M+H] ⁺	ESI (+)	Digestive glands	Polar	2,12	-9,31
Choline	104.11 [M+H] ⁺	ESI (+)	Digestive glands	Polar	-4,39	1,54
			Digestive glands	Lipophilic	-5,43	1,53
Taurine	124.04 [M-H] ⁻	ESI (-)	Digestive glands	Polar	1,16	1,54
			Digestive glands	Lipophilic	1,13	1,49
Dimethylglycine	102.04 [M-H] ⁻	ESI (-)	Gills	Polar	-3,77	-1,21
Anthranilic acid	138.05 [M-H] ⁻	ESI (+)	Gills	Polar	-1,81	-1,34
Free proteinogenic amino acids						
Alanine	90.05 [M+H] ⁺	ESI (+)	Digestive glands	Polar	-4,69	-3,55
Arginine	175.11 [M+H] ⁺	ESI (+)	Digestive glands	Polar	1,55	-11,88
			Digestive glands	Lipophilic	1,2	-10,16
Glutamine	147.05 [M+H] ⁺	ESI (+)	Digestive glands	Lipophilic	1,19	1,51
Histidine	154.01 [M-H] ⁻	ESI (-)	Digestive glands	Polar	1,06	1,47
			Digestive glands	Lipophilic	1,32	3,49
Leucine	132.10 [M+H] ⁺	ESI (+)	Digestive glands	Polar	1,35	3,17
			Gills		1,29	1,78
Phenylalanine	166.09 [M+H] ⁺	ESI (+)	Digestive glands	Lipophilic	1,26	1,91
			Digestive glands	Polar	1,26	1,67
			Gills	Polar	2,24	4,01
Proline	116.07 [M+H] ⁺	ESI (+)	Digestive glands	Polar	-1,58	-2,08
Serine	106.06 [M+H] ⁺	ESI (+)	Digestive glands	Polar	-1,01	-1,08
Valine	118.09 [M+H] ⁺	ESI (+)	Digestive glands	Polar	1,47	1,22
Glutamate	146.03 [M-H] ⁻	ESI (-)	Digestive glands	Lipophilic	-4,03	1,32
			Digestive glands	Polar	-6,58	1,29
Aspartic acid	134.11 [M+H] ⁺	ESI (+)	Digestive glands	Polar	1,54	1,8

Table 6.2 (cont). Potential biomarkers of pollution in the digestive gland of *P. clarkii* crayfish captured in different areas from DNP and surroundings.

Altered Metabolites	m/z	Mode of acquisition	Extract	Fold change		
				PAR	MAT	
<i>Phosphatidilcholines</i>						
C14:0/C18:3	728.54 [M-H] ⁺	ESI (+)	Digestive glands	Polar	-1,01	-2,21
C14:0/C20:0	762.50 [M-H] ⁺	ESI (+)	Digestive glands	Polar	-4,08	-3,1
			Gills		-1,39	-1,59
C14:1/C18:3	726.53 [M-H] ⁺	ESI (+)	Digestive glands	Polar	-1,27	-6,06
C14:1/C20:5	750.53 [M-H] ⁺	ESI (+)	Digestive glands	Polar	-6,9	-4,44
C16:1/C20:0	790.55 [M-H] ⁺	ESI (+)	Digestive glands	Polar	-1,31	-1,56
C18:2/C15:0	744.52 [M-H] ⁺	ESI (+)	Digestive glands	Polar	-2,08	-2,46
C18:3/C15:0	742.52 [M-H] ⁺	ESI (+)	Digestive glands	Polar	-4,31	-2,17
C18:3/C18:3	778.54 [M-H] ⁺	ESI (+)	Digestive glands	Polar	-3,58	-3,5
C16:0/C18:2	758.54 [M-H] ⁺	ESI (+)	Gills	Polar	-1,08	-1,23
C18:1/C18:1	782.55 [M-H] ⁺	ESI (+)	Gills	Polar	-3,32	-3,91
C18:3/C18:2	780.55 [M-H] ⁺	ESI (+)	Gills	Polar	-8,26	-9,8
<i>Triglycerides</i>						
C14:0/C17:2/C19:1	846.73 [M+NH ₄] ⁺	ESI (+)	Digestive glands	Lipophilic	1,34	1,58
			Gills	Polar	1,32	1,66
C14:0/C18:1/C18:3	844.71 [M+NH ₄] ⁺	ESI (+)	Digestive glands	Lipophilic	1,4	1,51
C14:0/C18:2/C18:3	842.67 [M+NH ₄] ⁺	ESI (+)	Digestive glands	Lipophilic	1,94	2,41
C14:0/C18:3/C20:2	870.71 [M+NH ₄] ⁺	ESI (+)	Digestive glands	Lipophilic	1,51	1,29
C14:1/C18:2/C22:1	900.71 [M+NH ₄] ⁺	ESI (+)	Digestive glands	Lipophilic	1,56	1,52
			Digestive glands	Lipophilic	1,23	1,61
C15:1/C18:4/C18:4	848.75 [M+NH ₄] ⁺	ESI (+)	Gills	Polar	1,25	1,7
			Digestive glands	Lipophilic	2,59	1,57
C18:4/C20:5/C20:5	936.67 [M+NH ₄] ⁺	ESI (+)	Digestive glands	Lipophilic	2,59	1,57
C14:1/C18:2/C22:3	896.76 [M+NH ₄] ⁺	Gills		Polar	1,82	1,66

Los metabolitos alterados en la glándula digestiva de *P. clarkii* fueron principalmente aminoácidos proteinogénicos, antioxidantes y osmorreguladores, lípidos (fosfatidilcolinas, triglicéridos) y otros compuestos relacionados con el metabolismo energético. Los estudios proteómicos realizados en estos mismos cangrejos (Capítulo 5) mostraron cambios en la abundancia de proteínas involucradas en la respuesta antioxidante ligadas a la inducción de estrés del retículo endoplásmico, rutas de metilación, procesos de inflamación, desequilibrio del metabolismo mitocondrial y cambios metabólicos hacia una glucólisis aerobia incrementada, atribuible a una disfunción oxidativa de las mitocondrias. Los resultado metabolómicos corroboran y amplían los resultados proteómicos, ya que los metabolitos afectados están relacionados con estrés oxidativo y alteración de membranas lipídicas, entre ellas las mitocondriales, lo que reduce la tasa de respiración oxidativa y determina un cambio metabólico hacia la glucólisis aeróbica.

6.4.4. Análisis funcional de los metabolitos con niveles alterados en glándula digestiva de *P. clarkii*, posibles biomarcadores de exposición a contaminación.

Metabolitos con propiedades antioxidantes y osmorreguladoras: En la glándula digestiva de cangrejos procedentes de las zonas contaminadas PAR y MAT se encontraron niveles alterados de varios metabolitos con potente capacidad antioxidante como taurina, betaína, colina y carnosina¹⁴ (Tabla 6.2 y Fig. 6.5). Los cangrejos de ambas zonas presentaron niveles elevados de betaína (>2 veces) y taurina (>1.5 veces en cangrejos MAT). Sin embargo, los niveles de otros dos metabolitos antioxidantes, carnosina y colina mostraron diferente comportamiento dependiendo de la zona. La carnosina mostró un aumento >2 veces en cangrejos PAR pero disminuyó fuertemente (>9 veces) en los animales MAT; por el contrario, los niveles de colina disminuyeron (>4 veces) en cangrejos PAR, pero se incrementaron en cangrejos MAT (>1.5 veces).

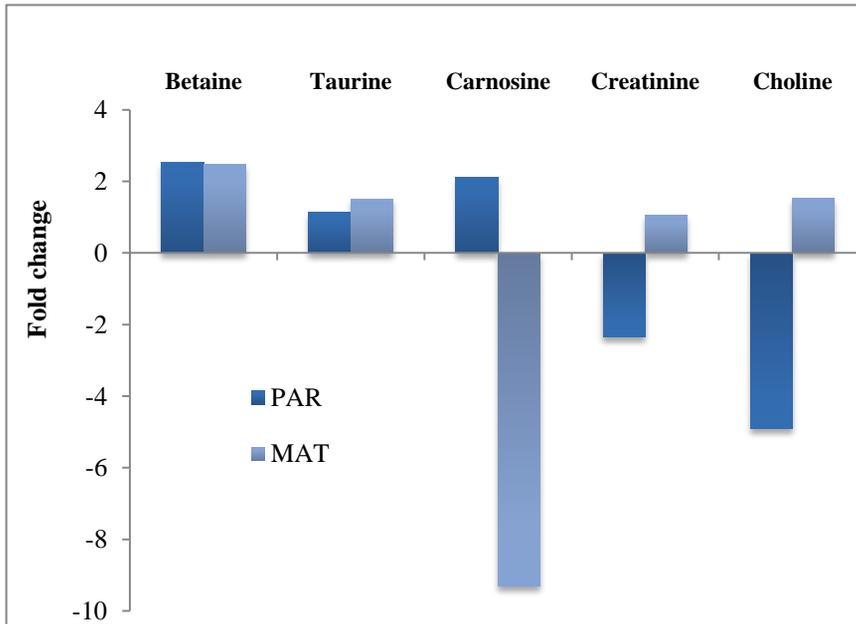


Figure 6.5. Fold change variation in the digestive gland levels of antioxidant/osmoregulator metabolites in *P. clarkii* crayfish captured at polluted sites (data from Table 6.2).

La *carnosina* (β -alanil-L-histidina) es un dipéptido hidrofílico endógeno con efectos antioxidativos y protectores, derivados de su capacidad para eliminar radicales libres y actuar como quelante de metales de transición como el Cu y de su actividad como superóxido dismutasa (SOD) ^{15,16}. Esta capacidad inhibe la peroxidación lipídica y la carbonilación de proteínas, por lo que la carnosina ejerce un efecto protector de las membranas biológicas ^{17, 18 19, 20}. (Fig. 6.4) Por ello, no es de extrañar que sus niveles se vean elevados en glándula digestiva de cangrejos PAR (Tabla 6.2), ayudando al mantenimiento de la homeostasis. Sin embargo, se encontró una disminución >9 veces en los niveles de este metabolito en los cangrejos MAT, aun cuando su situación de estrés oxidativo es muy superior, ya que acumulan una mayor cantidad de metales, incluyendo Cu (Cap. 1, Fig.1.1). Estudios recientes ⁸ corroboran, no obstante, estos resultados, que se atribuyen al agotamiento de las defensas antioxidantes celulares, un efecto que ha sido ampliamente observado tras la exposición a tóxicos, y que causa una disminución tanto en la protección antioxidante enzimática primaria (SOD, catalasa) como en los niveles de antioxidantes no enzimáticos ²¹. Las diferencias entre los cangrejos de PAR y MAT pueden ser indicativas de la mayor acumulación de metales y otros contaminantes en la glándula digestiva de estos último, que llegaron a sobrepasar sus defensas antioxidantes, por lo que también observamos mayores daños oxidativos en sus tejidos.

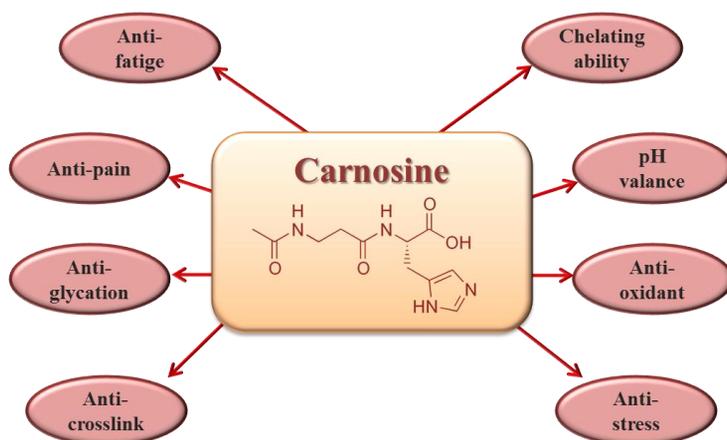


Figure 6.6. Carnosine. Structure and functions (adapted from ²²)

La betaína (trimetil glicina) es un osmolito que desempeña un papel importante en la protección celular frente al estrés ambiental, protegiendo a las células de toxinas como rotenona, cloroformo y otros agentes oxidantes y que sirve como donador de metilo en diversas rutas bioquímicas, por lo que se le atribuye una importante función protectora frente a patologías cardíacas y hepáticas, tiene efectos antiproliferativos en células cancerosas y potencia la respiración mitocondrial contribuyendo a revertir el efecto Warburg ²³. La betaína se transforma en dimetilglicina por reacción con homocisteína, catalizada por la betaína-homocisteína metiltransferasa, (Fig.6.7). La dimetilglicina es otro importante osmolito en invertebrados, cuyos niveles se alteran como parte de la respuesta a estrés osmótico inducida por exposición a metales y otros contaminantes (Cu, Cd, DDT) ²⁴⁻²⁶. El incremento observado en los niveles de estos osmolitos en animales de PAR y MAT respecto a los animales de referencia, viene a corroborar nuestros datos proteómicos y sugieren una activación de esta ruta protectora para paliar los efectos de los contaminantes presentes en estas zonas que rodean el Parque Nacional de Doñana.

La betaína, además, entra en el ciclo del metilo activado, donde actúa como donador de metilo en la ruta de remetilación de homocisteína a metionina, para generar el agente metilante S-adenosilmetionina ²⁷, el mayor donante de grupos metilo en la célula, como se comentó antes, participa en numerosas reacciones incluyendo la metilación del ADN y la síntesis de fosfatidilcolina, creatinina, carnitina y otros antioxidantes como la taurina ²⁸, así como en el metabolismo de fosfolípidos y en el mantenimiento de la estructura de membranas ²⁹ (Fig.6.7). Durante la transferencia del grupo metilo, SAM es hidrolizado para dar S-adenosilhomocisteína (SAH) por la S-adenosilhomocisteinasa hidrolasa (AHCY), cuyos niveles encontramos elevados a nivel de proteína en la glándula digestiva de los cangrejos PAR/MAT (Cap. 5, Tabla 5.5). SAM participa en numerosas reacciones, entre ellas la reacción de trans-sulfuración que resulta en la transferencia de un grupo sulfuro desde Met a Ser para formar Cys. Esta ruta está conectada con la síntesis de glutatión, por lo que la elevación de los niveles de betaína implicaría un potencial incremento en la síntesis de este poderoso agente antioxidante.

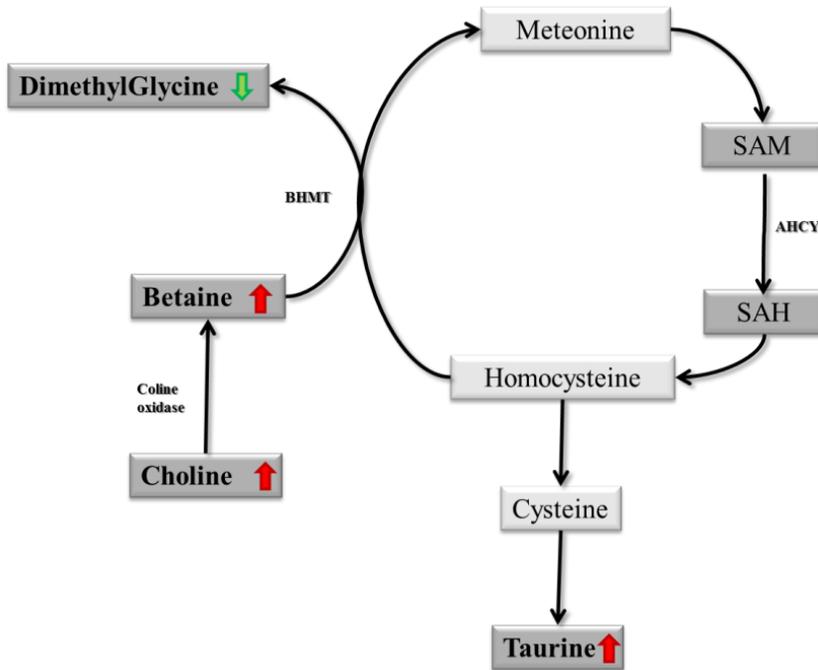


Figure 6.7: Interrelation of choline and betaine with the methionine-homocysteine cycle. Arrows indicate the direction of the change detected for these metabolites in this study. BHMT: betaine homocysteine methyltransferase, AHCY: adenosyl homocysteinase, SAH: S-Adenosyl-homocysteine, SAM: S-adenosyl -methionine

La cisteína es también precursora de taurina, uno de los componentes mayoritarios de la bilis, referida como un aminoácido azufrado, a pesar de carecer de grupo carboxílico. La taurina se produce por descarboxilación de derivados oxidados de la cisteína y desempeña un importante papel en la detoxificación de fase II al, formar derivados solubles que pueden ser más fácilmente excretados. Se ha descrito que la taurina tiene capacidad para eliminar ROS y reducir la producción de peroxidación lipídica y sus productos finales contribuyendo a mantener la integridad de las membranas biológicas^{30; 31-33}. Este pequeño aminoácido actúa también como neuromodulador del sistema nervioso central y como efector cardiovascular, endocrino y metabólico. Distintos investigadores han descrito que la taurina protege en muchos órganos frente a la toxicidad y el estrés oxidativo provocado por metales pesados y otros compuestos químicos³³⁻³⁵ lo que explicaría su incremento en cangrejos procedentes de zonas contaminadas.

Al ser el mayor donante de grupos metilo en la célula, SAM participa en muchas más reacciones incluyendo la síntesis de creatinina y otros compuestos

relacionados ²⁸ (Fig. 6.8). En los crustáceos decápodos la creatinina es uno de los compuestos orgánicos que incorporan para su excreción el amonio generado al final del metabolismo del nitrógeno ³⁶. La síntesis de creatinina comienza cuando la glicina se combina con arginina para formar ornitina y guanidinoacetato. La enzima que promueve este primer paso de la síntesis de creatina es la arginina-glicina amidinotransferasa (AGAT), que cataliza la transferencia del grupo amida desde la arginina al grupo amino de la glicina generada desde la betaína en la ruta dependiente de la SAM ³⁷. El guanidinoacetato es metilado por SAM para formar creatina y SAH (S-adenosilhomocisteína). La creatinina se genera a partir de la creatina que en un paso intermedio es fosforilada por la creatina quinasa (CK) y posteriormente en el músculo la fosfocreatina se transforma en creatinina por reacción espontánea y es liberada para su excreción. La CK es muy susceptible al estrés oxidativo debido a la presencia de un grupo sulfhidrilo altamente reactivo (Cys₂₈₃) que provoca la inhibición de esta enzima ³⁸. El descenso en los niveles de guanidinioacetato y creatinina en los cangrejos de PAR pudiera ser indicativo de una regulación negativa de la síntesis de la creatinina, permitiendo así el incremento de grupos metilo disponibles para la síntesis de proteínas y los fosfolípidos ³⁹ que sustituyan a los dañados por estrés oxidativo (Fig. 6.8).

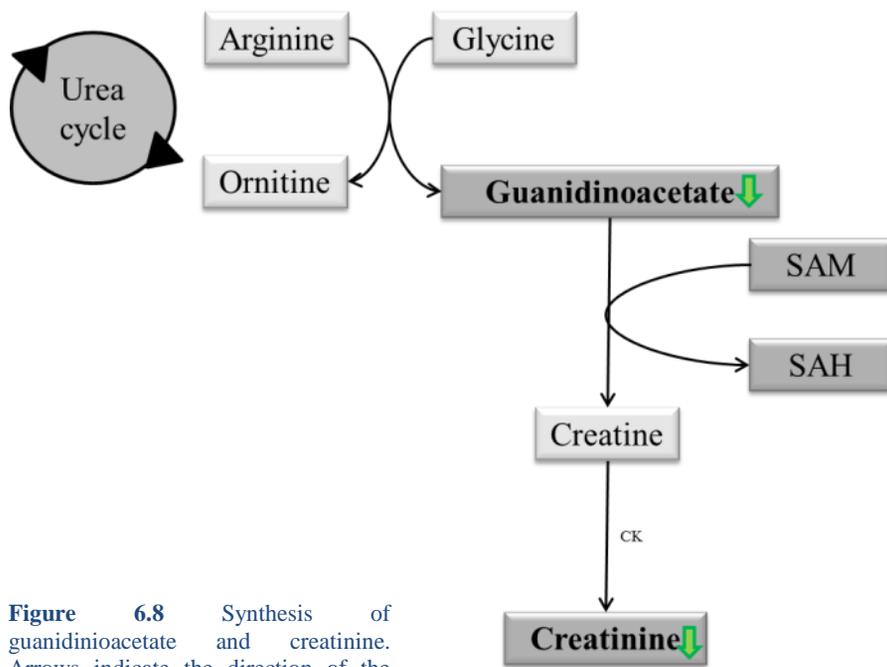


Figure 6.8 Synthesis of guanidinoacetate and creatinine. Arrows indicate the direction of the change detected for these metabolites in this study.

La colina es una amina cuaternaria (trimetil- β -hidroxietileamonio) con funciones cruciales para las células, cuya oxidación genera betaína. Los niveles de colina se incrementaron en animales MAT, lo que estaría en concordancia con los mayores niveles de betaína y taurina observados en estos animales. Por el contrario, los niveles de colina fueron muy inferiores en animales PAR respecto a los animales de referencia LP, a pesar de tener altos los niveles de betaína, como los cangrejos capturados en MAT, aunque no de taurina. La colina tiene otras importantes funciones en la célula, siendo su principal destino la síntesis de componentes lipídicos esenciales de las membranas celulares como son la fosfatidilcolina⁴⁰ y las esfingomielina, así como de potentes mediadores lipídicos como el factor activador de plaquetas y la lisofosfatidilcolina. La mayor potenciación de estas rutas en cangrejos de PAR podría explicar la discordancia entre los niveles de los distintos metabolitos antioxidantes: colina, betaína y taurina. La colina desempeña también un papel clave como precursor del neurotransmisor acetilcolina^(41 y ref. que cita). Puede ser que la concentración de este metabolito venga también determinada por la inhibición de la síntesis acetilcolina (ACh) y/o degradación de PC, procesos discutidos en apartados posteriores y totalmente dependientes de la contaminación en cangrejos de PAR y MAT.

Neurotransmisores: La acetilcolina (ACh) está implicada en el proceso químico de transmisión del impulso nervioso en las sinapsis. La ACh es una molécula simple sintetizada a partir de colina y acetil-CoA por la enzima colina acetiltransferasa (Fig. 6.9) en las denominadas neuronas colinérgicas. Una vez liberada, la ACh debe ser eliminada rápidamente para permitir la repolarización de la membrana presináptica. Este paso, la hidrólisis de la acetilcolina, es llevado a cabo por la enzima acetilcolinesterasa (AChE) y se libera colina y acetato. La colina es recaptada por la neurona presináptica, donde de nuevo sirve de sustrato para la síntesis de acetilcolina⁴².

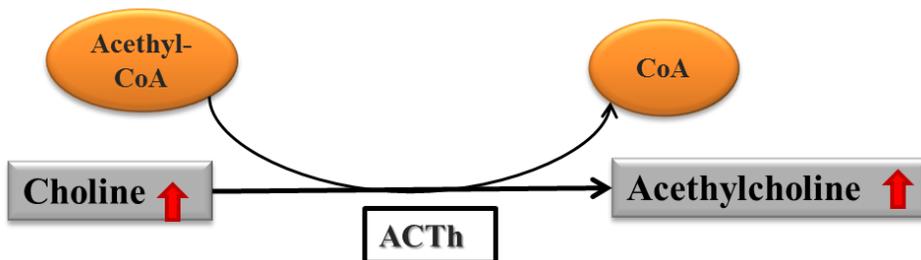


Figure 6.9. Synthesis of acetylcholine from choline and acetyl CoA. Arrows indicate the direction of the change detected for these metabolites in this study.

La enzima AChE es fuertemente inhibida por distintos contaminantes (organofosforados, carbamatos, metales) lo que conduce a la acumulación de la acetilcolina⁴³ y explicaría el incremento de ≈ 3 veces en los niveles de ACh en los animales capturados en las zonas contaminadas (Fig.6.10), así como la alteración en los niveles de colina en los mismos. La ACh juega también un importante papel en muchos procesos fisiológicos, incluyendo el control de la inflamación y la modulación para evitar un exceso en las respuestas que provocarían graves daños. El incremento de la ACh en los cangrejos de PAR y MAT podría inhibir la excesiva producción de citoquinas proinflamatorias a través de receptores nicotínicos de la acetilcolina para reducir el daño inmunológico y restaurar la homeostasis. Se ha descrito que la ACh restaura el potencial de membrana mitocondrial e inhibe las cascadas preapoptóticas, reduciendo así la muerte celular y manteniendo la estructura del retículo endoplásmico⁴⁴. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el estudio proteómico (Cap. 5) donde se relacionaba la disminución de los niveles de 3-hidroxi-antranilato 3,4 dioxigenasa (3-HAO) y de glicina descarboxilasa (GLDC) en la glándula digestiva de los cangrejos de ambas zonas contaminadas con la puesta en funcionamiento de un mecanismo para controlar el proceso inflamatorio causado por el estrés oxidativo.

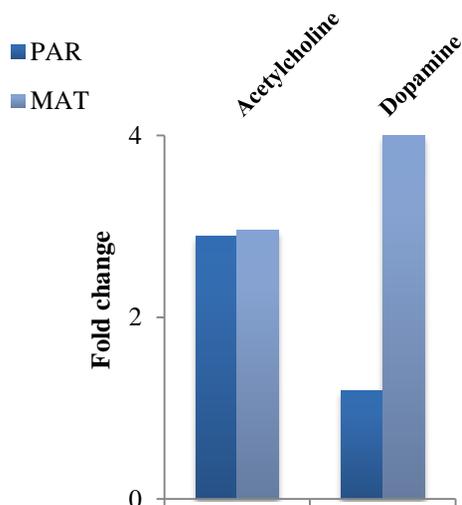


Figure 6.10 Fold change variation in the digestive gland levels of neuropeptides in *P. clarkii* crayfish captured at polluted sites (data from Table 6.2).

Los niveles de dopamina (DA) se incrementaron >4 veces en cangrejos capturados en MAT. La DA es un neurotransmisor catecolamínico de presencia ubicua (incluyendo el glándula digestiva de crustáceos ⁴⁵) que se sintetiza a partir de tirosina y que, junto con sus derivados adrenalina y noradrenalina, forma parte de la respuesta a estrés en crustáceos ⁴⁶. Hay evidencias de que el metabolismo de DA se asocia con la generación de ROS ^(47 y ref. que cita), pero también numerosos trabajos demuestran que DA puede actuar como un antioxidante endógeno que promueve la supervivencia al disminuir los niveles intracelulares de ROS y, consecuentemente, retrasar la peroxidación lipídica ^(48 y ref. que cita), explicando su incremento en animales contaminados.

Fosfatidilcolinas: Como se comentó antes, el principal destino de la colina es la síntesis de fosfatidilcolinas (PC, 1,2-diacil-*sn*-glicero-3 fosfocolinas) mediante la ruta de Kennedy. El 95 % de la colina celular se utiliza para sintetizar PC, que a su vez sirve como sustrato para la síntesis de esfingomielina, y el 5% restante da lugar a plasmalógenos y lisofosfatidilcolina ⁴⁹. Las fosfatidilcolinas son los principales componentes de las membranas biológicas y juegan un importante papel en la regulación del metabolismo celular, transmisión de señales y mantenimiento de la integridad estructural de la célula ⁵⁰.

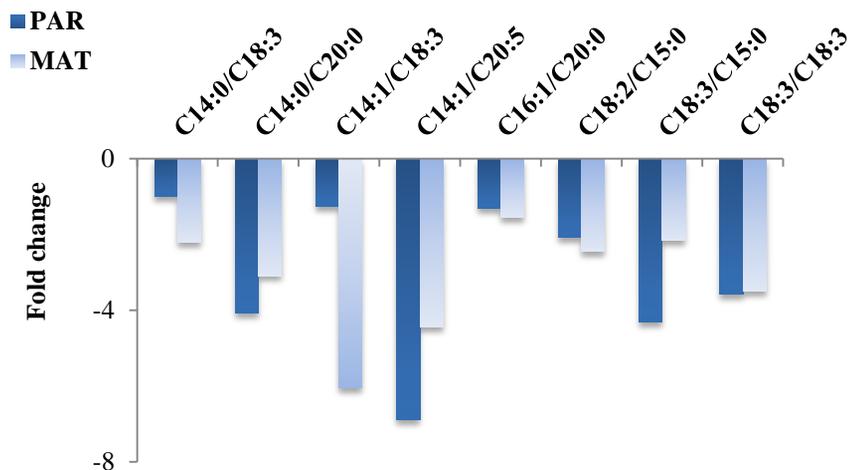


Figure 6.11 Fold change variation in the digestive gland levels of phosphatidylcholines in *P. clarkii* crayfish captured at polluted sites (data from Table 6.2) and names of the FA that form part of their structure.

Este trabajo aporta evidencias de que la contaminación, que aumenta considerablemente el estrés oxidativo en los glándula digestiva de *P. clarkii* (Ver capítulos anteriores), provoca el descenso significativo de los niveles de PC (Fig. 6.11 y Tabla 6.2) en cangrejos capturados en PAR y MAT. Estudios previos coinciden en demostrar que la concentración de PC se ve drásticamente reducida en muchas patologías donde el estrés oxidativo es un factor importante y de hecho se ha propuesto la concentración de PC como indicador de disfunción de las biomembranas o deterioro metabólico de las células afectadas ^(51 y ref. que cita). Los ácidos grasos polinsaturados (PUFA) de las PC son especialmente susceptibles a la peroxidación, convirtiéndose en productos oxidados que se eliminan por fosfolipasas, generando ácido fosfatídico y colina libre. Así, la disminución del contenido en PC es consistente con el daño oxidativo detectado en cangrejos PAR y MAT.

Glucolisis aerobia: En condiciones normales las células generan energía principalmente mediante la degradación oxidativa del piruvato, que es un producto final de la glucolisis y cuyo destino es la oxidación descarboxilativa para generar poder reductor que ceda electrones a la cadena respiratoria de las mitocondrias. En esta situación, la conversión de glucosa a lactato sólo tiene lugar en ausencia de oxígeno (denominado "efecto Pasteur"). Por el contrario, en células sometidas a estrés oxidativo la peroxidación lipídica provoca

la alteración de las mitocondrias y defectos en la respiración mitocondrial que promueven rutas alternativas para la generación de energía. Estas células estresadas metabolizan la glucosa produciendo un exceso de ácido láctico incluso en presencia abundante de oxígeno, este fenómeno es llamado glucólisis aeróbica o efecto Warburg, característico de células cancerosas (proliferativas) (Fig. 6.12)^{52,53} y, según diversos estudios en respuesta a contaminación^{54,55}. Se considera que el efecto Warburg surge por un aumento de la captación de glucosa y de la glucólisis y/o una baja regulación del metabolismo mitocondrial (revisado en 56).

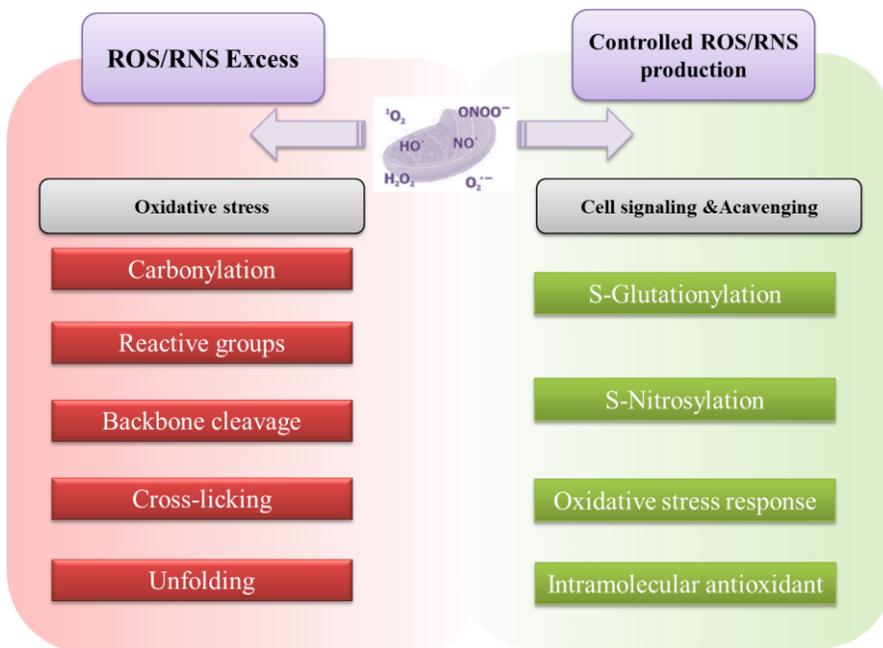


Figure 6.12. Schematic representation of the differences between oxidative phosphorylation, anaerobic glycolysis, and aerobic glycolysis (Warburg effect). In the presence of oxygen, nonproliferating (differentiated) tissues first metabolize glucose to pyruvate via glycolysis and then completely oxidize most of that pyruvate in the mitochondria to CO_2 during the process of oxidative phosphorylation. Because oxygen is required as the final electron acceptor to completely oxidize the glucose, oxygen is essential for this process. When oxygen is limiting, cells can redirect the pyruvate generated by glycolysis away from mitochondrial oxidative phosphorylation by generating lactate (anaerobic glycolysis). This generation of lactate during anaerobic glycolysis allows glycolysis to continue (by cycling NADH back to NAD^+), but results in minimal ATP production when compared with oxidative phosphorylation. Warburg observed that cancer cells tend to convert most glucose to lactate regardless of whether oxygen is present (aerobic glycolysis). This property is shared by normal proliferative tissues. Mitochondria remain functional and some oxidative phosphorylation continues in both cancer cells and normal proliferating cells. Nevertheless, aerobic glycolysis is less efficient than oxidative phosphorylation for generating ATP. In proliferating cells, ~10% of the glucose is diverted into biosynthetic pathways upstream of pyruvate production.

El estudio proteómico realizado en estos cangrejos (Cap. 5) señaló un cambio metabólico hacia glucolisis aeróbica en la glándula digestiva de *P. clarkii* para generar energía en un ambiente celular oxidativo, donde, probablemente, las mitocondrias no funcionan correctamente debido a la oxidación de los lípidos. Como se ve en la tabla 4, se encontraron niveles elevados de glucosa en la glándula digestiva de los cangrejos capturados en las dos zonas contaminadas, PAR y MAT, junto con niveles también elevados de ACh y dopamina, como se ha discutido anteriormente. Además de las funciones anteriormente referidas, estos dos neurotransmisores son también responsables de la regulación homeostática de la glucosa. En mamíferos, cantidades elevadas de ACh dan como resultado la aceleración en la producción de insulina por parte de las células β pancreáticas, la supresión de la gluconeogénesis y el aumento de la captación de glucosa por el hígado ^(57 y ref. que cita). En los últimos años, han sido identificados en invertebrados péptidos que comparten homologías sustanciales con la insulina de los vertebrados y factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs), lo que indica un alto grado de conservación de los sistemas de insulina / IGF través de la evolución animal. Parece que estos péptidos relacionados con la insulina pueden actuar para provocar un incremento agudo en el contenido de glucosa libre en ciertos tejidos, como la glándula digestiva ⁵⁸. En los crustáceos, la concentración de glucosa en la hemolinfa se controla dentro de un intervalo estricto por la secreción equilibrada de varias hormonas que controlan la actividad de la denominada Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH). Numerosos estudios demuestran que CHH desempeña importantes funciones reguladoras en las principales rutas del metabolismo de carbohidratos y se considera una hormona de estrés que ocasiona hiperglicemia inducida por exposición a diversos estresantes medioambientales⁵⁹. CHH está bajo control dopaminérgico, así que la hiperglucemia observada en los animales *P. clarkii* capturados en zonas contaminadas puede estar positivamente relacionada con la elevación de ACh y dopamina en la glándula digestiva de estos animales (Tabla 6.2), contribuyendo al cambio metabólico hacia la glucolisis aerobia.

Triacilglicéridos: Durante la glucolisis aeróbica se genera una gran cantidad de piruvato, en gran parte por el incremento de la actividad de las enzimas que participan en la ruta glucolítica ⁵⁶. Nuestro estudio proteómico demostró la existencia de niveles elevados de ALDO en los cangrejos de PAR/MAT (2DE-DIGE) (Cap. 5). Esta enzima, esencial para

la glucólisis, cataliza la rotura de 1,6 bifosfato en gliceraldehído 3-fosfato y acelera la conversión de glucosa en piruvato. En condiciones normales el piruvato es transportado a la matriz mitocondrial para ser convertido en acetil-CoA y entrar posteriormente en el ciclo de Krebs, para producir el poder reductor que necesita la cadena respiratoria para llevar a cabo la fosforilación oxidativa. En las células bajo glucólisis aeróbica, parte de la piruvato permanece en el citosol y se reduce a lactato por la lactato deshidrogenasa (LDH) ⁵⁶. Pero estas células también pueden redireccionar el exceso de piruvato hacia la síntesis *de novo* de ácidos grasos (FA). De hecho, cada vez hay más trabajos que consideran la alteración del metabolismo lipídico como una de las características de la glucólisis aerobia. Diversas enzimas lipogénicas utilizan NADPH y acetil-CoA generado en el metabolismo de la glucosa y la glutamina para sintetizar ácidos grasos (FA) y sus derivados ⁶⁰. La conversión neta de glucosa a lípidos es dependiente de la capacidad de las células para producir acetil-CoA citosólico a partir de citrato mitocondrial por acción de la ATP-citrato liasa. Los niveles de esta enzima están marcadamente incrementados en células en proliferación, así como lo están la acetil-CoA carboxilasa, que convierte parte del acetil-CoA en malonil-CoA, y la sintasa de ácidos grasos, que realiza la condensación de acetil-CoA y malonil-CoA para dar lugar a palmitato y otros ácidos grasos saturados de cadena larga ⁶¹. Los FA saturados de cadena larga pueden ser modificados posteriormente por elongasas o desaturasas para formar más ácidos grasos más complejos, usados en la síntesis de varios otros lípidos celulares como fosfolípidos, triglicéridos o ésteres de colesterol ⁶².

Los resultados del análisis proteómico en estos animales (Cap. 5) y los resultados metabolómicos aquí expuestos, apoyan que estas vías metabólicas están produciéndose en los cangrejos de PAR/MAT. El descenso de los niveles de citrato y el incremento de la cantidad de TGA (Fig. 6.13) podrían ser reflejo del flujo de citrato hacia el citosol donde las cotas de NADPH se incrementan debido a la generación de isocitrato, promovido por los niveles elevados de IDH (Cap. 5) trabajando en un proceso de carboxilación reductiva ^{63, 64}.

Los FA que componen los triglicéridos (TGA) con niveles incrementados en glándula digestiva de *P. clarkii* fueron principalmente de número par con 14-22 C y un 65% de ellos presentaron insaturaciones. Los más frecuentes fueron los ácidos C14 y C18, siendo el mirístico (C14:0) el único FA saturado hallado. Es de destacar la presencia de FA de número impar de átomos de carbono, tanto en los TGA como en la PC (Tabla 6.2), descritos como frecuentes en peces, moluscos y crustáceos ⁶⁵.

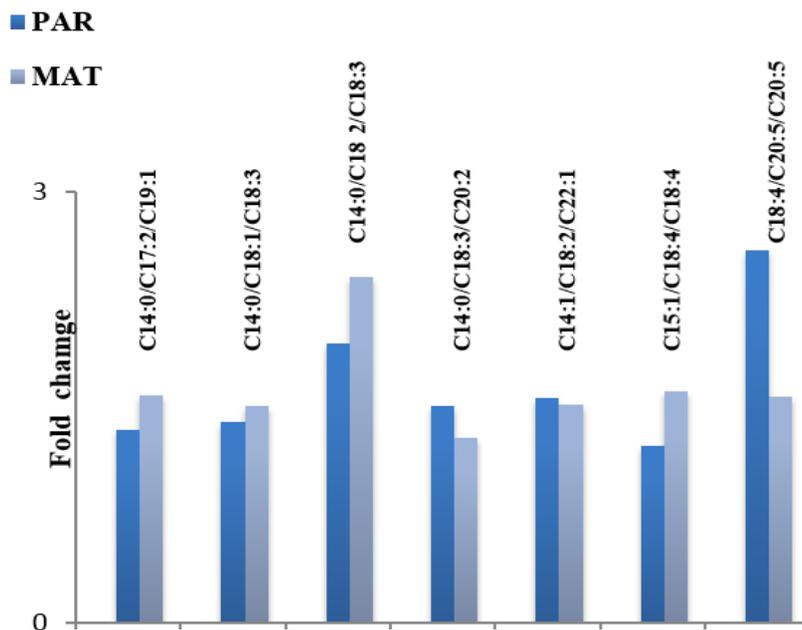


Figure 6.13 Fold change variation in the digestive gland levels of triacylglycerides in *P. clarkii* crayfish captured at polluted sites (data from Table 6.2).

Metabolismo de lípidos: Una característica asociada al cambio metabólico hacia la glucólisis aerobia es el incremento en la síntesis de lípidos. El acetil-CoA citosólico necesario para la lipogénesis parece provenir de dos fuentes. Por una parte, el acetil-CoA mitocondrial se condensa con ácido oxalacético en el TCA, formando citrato. El ciclo del citrato no funciona plenamente en células donde la glucólisis aerobia se ve incrementada y en consecuencia, el citrato es exportado al citoplasma, donde sirve como sustrato para generar de nuevo acetil-Coa para la síntesis de lípidos. Por otra, la célula eleva la incorporación de acetato como sustrato de la acetil-CoA sintetasa citosólica⁶⁶⁻⁶⁸. La disminución de citrato en cangrejos de PAR y MAT corroboraría que esta ruta también está activada en estos animales respecto a los controles.

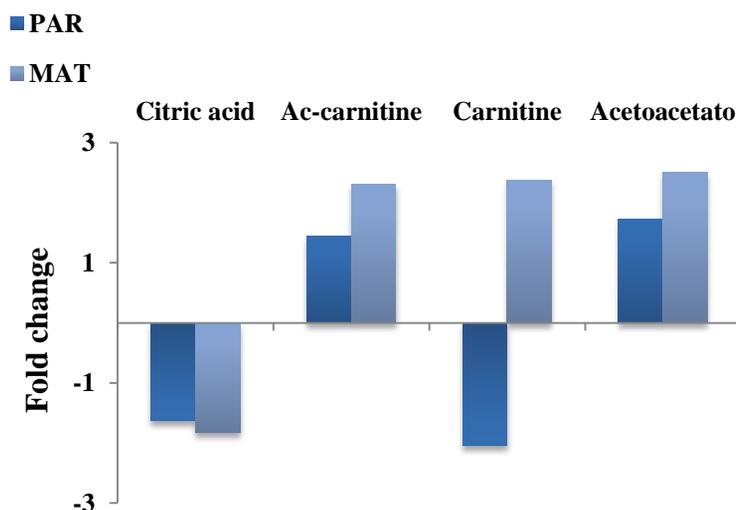


Figure 6.14 Fold change variation in the digestive gland levels of lipids metabolism molecules in *P. clarkii* crayfish captured at polluted sites (data from Table 6.2).

Sin embargo, el incremento en los niveles de carnitina, acetilcarnitina y acetoacetato encontrados en glándula digestiva de cangrejos de MAT (Tabla 6.2) sugiere también un aumento de la lipólisis y la cetogénesis (Fig. 6.14). Esto no deja de ser sorprendente, dado que es ampliamente aceptado que el malonil-CoA producido por la acetil-CoA carboxilasa durante la síntesis de FA inhibe la carnitina palmitoiltransferasa (CPT1), enzima que controla la entrada y oxidación de FA en la mitocondria, evitando la oxidación de los ácidos grasos recién formados⁶⁹. Además, es de esperar que los daños oxidativos a las membranas mitocondriales provocados por la exposición a la contaminación afectara también de modo negativo a la β -oxidación de FA⁷¹. Sin embargo, estudios recientes sugieren que la síntesis de FA y la oxidación de los mismos pueden ser vías simultáneas bajo estas circunstancias metabólicas especiales⁷⁰ y, por lo tanto, excepto en casos de daño severo en la mitocondria, la oxidación de los ácidos grasos puede ser usada como un aporte extra de energía que permita la supervivencia de la célula. En el caso de la glándula digestiva de cangrejos *P. clarkii* estresados, la oxidación de ácidos grasos puede, además, servir como vía de eliminación de los lípidos que se encuentren dañados por peroxidación (Cap. 3). La situación de desregulación

lipídica en la glándula digestiva de *P. clarkii* sometido a contaminación ambiental activa la cetogénesis, como ocurre en procesos de esteatosis hepática⁷², que convierte el acetil-CoA derivado de la β -oxidación, en los cuerpos cetónicos acetoacetato y β -hidroxibutirato (Fig. 6.15)

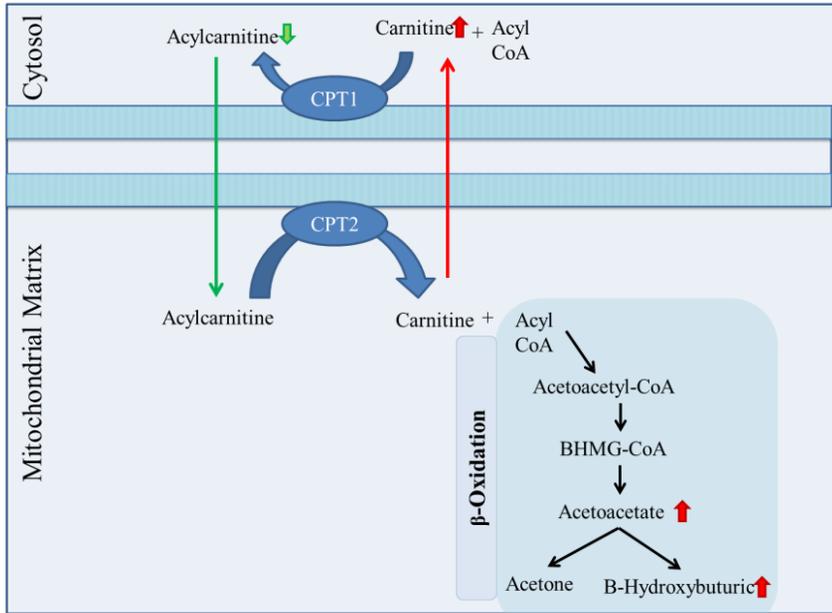


Figure 6.15. Fatty acid transport into the mitochondrial matrix. The acyl group of long-chain acyl-coenzyme A⁷³, the active form of long-chain fatty acids, is transferred to carnitine via carnitine palmitoyltransferase I (CPT1), forming acylcarnitine and generating free coenzyme A. Carnitine palmitoyltransferase II (CPT2) regenerates free carnitine by catalyzing the transfer of the acyl group from carnitine to coenzyme A. In the mitochondrial matrix carnitine and CoA can drift toward Ketogenesis. Arrows indicate the direction of the change detected for these metabolites in this study.

Free amino acids: Un grupo importante de metabolitos diferencialmente expresado en animales de zonas contaminadas está constituido por aminoácidos. El incremento en los niveles de ROS y el consiguiente estrés oxidativo inducen autofagia, un proceso homeostático que permite a las células degradar proteínas citoplasmáticas y/o de orgánulos celulares dañados^(52 y ref. que cita) y lleva a un aumento de aminoácidos libres (FAA) en la célula. En este estudio se ha detectado un incremento significativo en los niveles de His, Gln, Leu, Phe y Asp en animales MAT, y de Val y Asp en los capturados en PAR. Los FAA representan una parte importante del metaboloma de los organismos

acuáticos. De hecho, los tejidos de crustáceos contienen cantidades de aminoácidos libres aproximadamente diez veces superiores a las de tejidos de mamíferos. Estos FAA desempeñan una importante función como efectores osmóticos intracelulares, controlando el volumen celular en respuesta a cambios de salinidad y otros diversos estreses ambientales ^(74, 75 y referencias que citan). Muchos contaminantes son capaces de alterar los mecanismos osmorreguladores, ya que causan pérdida de iones y otras moléculas esenciales. Por ello, la elevación de la cantidad de aminoácidos libres puede convertirse en un mecanismo para restaurar la osmolaridad ^{76, 77}. En este estudio los cangrejos fueron capturados en zonas de similar salinidad, así que las diferencias encontradas en las cantidades de FAA pueden suponerse ligadas a perturbaciones en mecanismo osmorreguladores causadas por exposición a contaminación. Esta sugerencia se sustenta por diversos trabajos que demuestran incremento en los niveles de aminoácidos proteogénicos en crustáceos tras exposición a metales y otros contaminantes ⁷⁸⁻⁸³. Las diferencias de incremento de FAA observadas entre animales PAR y MAT puede ser causada por la diferencial acumulación de metales en los tejidos de ambos grupos de animales. Mn, Cu y Zn se acumularon en mayor cantidad en tejidos de animales MAT, en los que también se acumulaba el metal tóxico Cd en cantidades 23 veces superiores.

La acumulación de Gln en cangrejos MAT puede también relacionarse con la situación de estrés que sufren estos animales, ya que es un rasgo característico de células proliferativas, que la usan como combustible, transportadora de carbono y nitrógeno entre tejidos y molécula señalizadora ⁸⁴. Esta acumulación de Gln explicaría el descenso de abundancia de otros aminoácidos (Pro, Ala y especialmente Glu y Arg) (Fig. 6.16) que se muestra en la Tabla 6.2. El destino principal de la Gln es hidrolizarse para generar Glu, que posteriormente se metaboliza a GSH, Pro, ornitina y Arg, a menos que sea catabolizado a CO₂ o glucosa. Pero la elevación de los niveles de Gln es capaz de inducir la degradación que la convierte en Glu, lo que explicaría la disminución de metabolitos generados en pasos posteriores de la vía ⁸⁴.

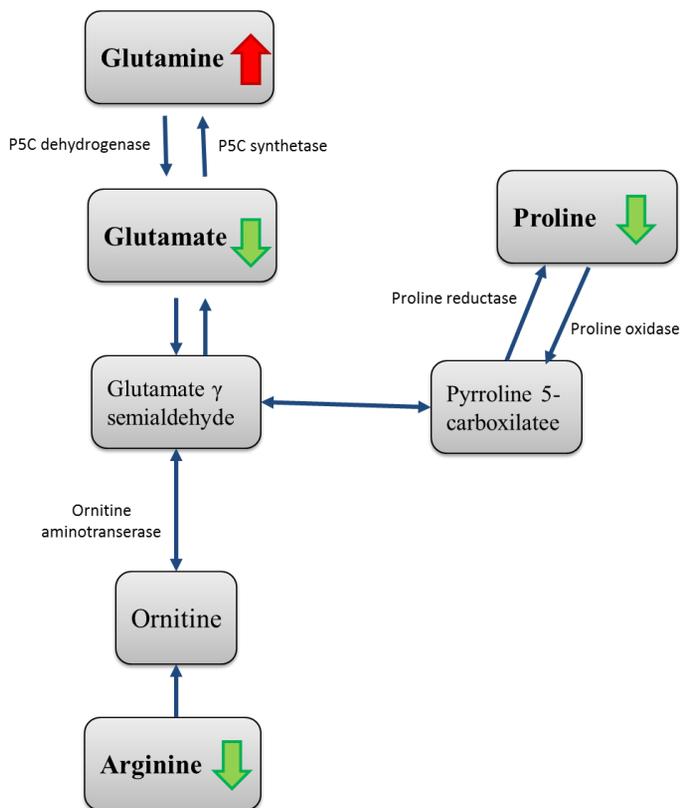


Figure 6.16 Metabolic relationship between Pro, Glu and Arg . Arrows indicate the direction of the change detected for these metabolites in this study.

6.4.5. Metabolitos con abundancia diferente en branquias de cangrejos *P. clarkii* capturados en zonas contaminadas.

El análisis metabolómico de las branquias permitió identificar un menor número de metabolitos con abundancia diferente entre los grupos de cangrejos *P. clarkii* estudiados (Tabla 5). Sin embargo, los metabolitos encontrados apuntan hacia las mismas alteraciones metabólicas que las encontradas en la glándula digestiva (Tabla 6.2), esto es, elevados niveles de glucosa y glucólisis aerobia, incremento de FAA osmorreguladores y de neurotransmisores acetilcolina); disminución de dimetilglicina que resulta de la no degradación del antioxidante betaína, etc. Resulta llamativa la significativa disminución (<11 veces) de los niveles de malato en branquias de animales de PAR y su subida >5 veces en animales de MAT. El malato actúa como lanzadera para encauzar poder reductor

procedente de la glucólisis en la mitocondria, mediante mecanismos de antiporte que implican Glu y Asp. En la branquia no se han identificado estos dos FAA, pero si asumimos un cambio metabólico similar al de la glándula digestiva y que, por tanto, los niveles de Glu son muy bajos en animales PAR, es de esperar que se presenten niveles bajos de malato, lo que contribuye por otra parte a evitar la apoptosis y favorecer la proliferación y supervivencia celular.

6.5. Conclusiones

El estudio recogido en este Capítulo demuestra que los animales procedentes de PAR/MAT presentan niveles alterados de diversos metabolitos que indican diferentes respuestas celulares al estrés oxidativo.

Se encontró un aumento de en los niveles de metabolitos con propiedades antioxidantes y osmorreguladoras (betaína, taurina) en los *P. clarkii* de PAR/MAT, lo que sugiere la activación de rutas protectoras encaminadas a paliar los efectos del estrés ambiental provocado por los contaminantes presentes en estas zonas.

Se detectó, también, un significativo descenso de los niveles de fosfatidilcolinas en cangrejos de las zonas contaminadas, lo que es un indicador de alteración y disfunción membranas celulares.

Los niveles de carnitina, acilcarnitina y acetoacetato encontrados apuntan a elevación de β -oxidación, que serviría, tanto como vía de eliminación de los lípidos dañados por peroxidación, como para un aporte extra de energía en una situación de estrés. En el mismo sentido, y coincidiendo con los datos aportados en el Capítulo 5, se encontró un cambio metabólico en los cangrejos de PAR y MAT hacia la glucólisis aeróbica, para generar energía en un ambiente celular oxidativo que altera la función mitocondrial. Los niveles de acetilcolina y dopamina serían responsables de la elevación de los niveles de glucosa encontrados en animales de y del cambio metabólico La gran cantidad de piruvato generada en esta vía glucolítica explicaría la elevación de los niveles de TGA encontrados en los cangrejos de PAR y MAT.

También se incrementaron niveles de metabolitos (acetilcolina) que implican incremento de actividades enzimáticas (3-HAO, GLDC, Cap. 5) encaminadas a inhibir la excesiva producción de citoquinas proinflamatorias y, así, restaurar la homeostasis.

La intensidad de los cambios observados estuvo íntimamente relacionada con la acumulación de metales y los daños oxidativos a lípidos y proteínas en los animales, y los resultados corroboran los encontrados en capítulos anteriores, así como las hipótesis propuestas sobre los cambios metabólicos y de respuesta a estrés que ocurren en animales a consecuencia de la contaminación

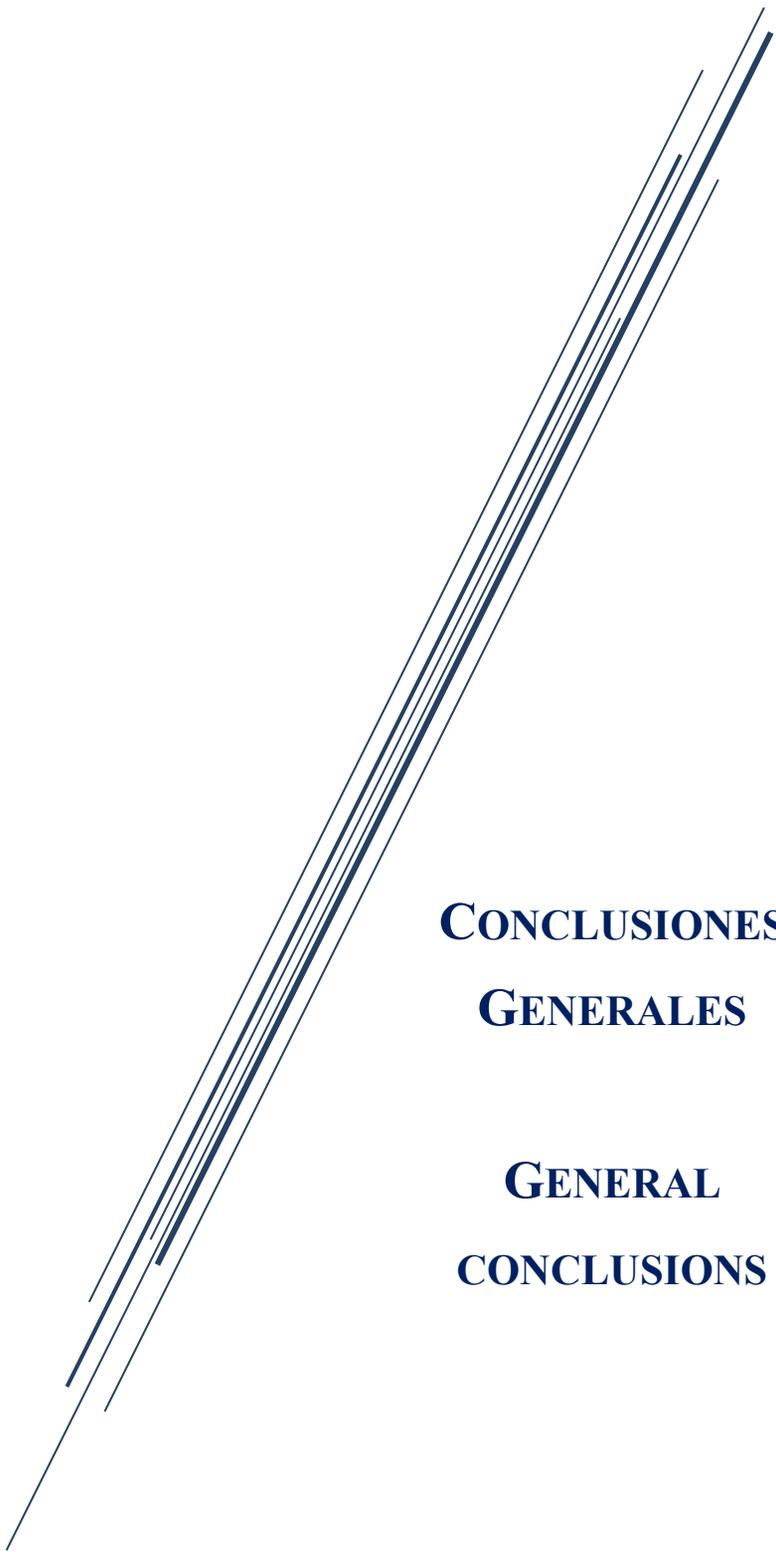
6.6. Referencias

- Bundy, J. G.; Davey, E. M. P.; Viant, M. R., Environmental metabolomics: a critical review and future perspectives. *Publi Cat* 2009, 5, 3-21.
- Wei, L.; Liao, P.; Wu, H.; Li, X.; Pei, F.; Li, W.; Wu, Y., Metabolic profiling studies: a critical review of the toxicological effects of realgar in rats by 1H NMR spectroscopy. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2009, 234, (3), 314-325.
- García-Sevillano, M. A.; García-Barrera, T.; Navarro, F.; Gomez-Ariza, J. L., Analysis of the biological response of mouse liver (*Mus musculus*) exposed to As₂O₃ based on integrated -omics approaches. *Metallomics* 2013, 5, (12), 1644-55.
- Connon, R. E.; Geist, J.; Werner, I., Effect-based tools for monitoring and predicting the ecotoxicological effects of chemicals in the aquatic environment. *Sensors (Basel)* 2012, 12, (9), 12741-71.
- Bundy, J.; Davey, M.; Viant, M., Environmental metabolomics: a critical review and future perspectives. *Metabolomics* 2009, 5, (1), 3-21.
- Lin, C. Y.; Viant, M. R.; Tjeerdema, R. S., Metabolomics: Methodologies and applications in the environmental sciences. *J Pestic Sci* 2006, 31, (3), 245-251.
- Moalla, S. M. N.; Awadallah, R. M.; Rashed, M. N.; Soltan, M. E., Distribution and chemical fractionation of some heavy metals in bottom sediments of Lake Nasser. *Hydrobiologia* 1997, 364, (1), 31-40.
- Gago-Tinoco, A.; González-Domínguez, R.; García-Barrera, T.; Blasco-Moreno, J.; Bebianno, M. J.; Gómez-Ariza, J.-L., Metabolic signatures associated with environmental pollution by metals in Doñana National Park using *P. clarkii* as bioindicator. *Environ Sci Pollut R* 2014, 21, (23), 13315-13323.
- García-Sevillano, M. A.; García-Barrera, T.; Navarro, F.; Gomez-Ariza, J. L., Analysis of the biological response of mouse liver (*Mus musculus*) exposed to AsO based on integrated -omics approaches. *Metallomics* 2014 11,(1), 13-19.
- García-Sevillano, M. A.; García-Barrera, T.; Navarro, F.; Abril, N.; Pueyo, C.; Lopez-Barea, J.; Gomez-Ariza, J. L., Combination of direct infusion mass spectrometry and gas chromatography mass spectrometry for toxicometabolomic study of red blood cells and serum of mice *Mus musculus* after mercury exposure. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2015, 985, 75-84.
- García-Sevillano, M. A.; García-Barrera, T.; Navarro, F.; Abril, N.; Pueyo, C.; Lopez-Barea, J.; Gomez-Ariza, J. L., Use of metallomics and metabolomics to assess metal pollution in Donana National Park (SW Spain). *Environ Sci Technol* 2014, 48, (14), 7747-55.
- García-Sevillano, M. A.; Gonzalez-Fernández, M.; Jara-Biedma, R.; García-Barrera, T.; Lopez-Barea, J.; Pueyo, C.; Gomez-Ariza, J. L., Biological response of free-living mouse *Mus spretus* from Donana National Park under environmental stress based on assessment of metal-binding biomolecules by SEC-ICP-MS. *Anal Bioanal Chem* 2012, 404, (6-7), 1967-81.
- Putri, S. P.; Yamamoto, S.; Tsugawa, H.; Fukusaki, E., Current metabolomics: technological advances. *J Biosci Bioeng* 2013, 116, (1), 9-16.
- Basaran-Kucukgergin, C.; Bingul, I.; Tekkesin, M. S.; Olgac, V.; Dogru-Abbasoglu, S.; Uysal, M., Effects of carnosine, taurine, and betaine pretreatments on diethylnitrosamine-induced oxidative stress and tissue injury in rat liver. *Toxicol Ind Health* 2014, 31, 0748233714563432.
- Boldyrev, A. A.; Stvolinsky, S. L.; Fedorova, T. N.; Suslina, Z. A., Carnosine as a natural antioxidant and geroprotector: from molecular mechanisms to clinical trials. *Rejuvenation Res* 2010, 13, (2-3), 156-8.
- Arnal, N.; de Alaniz, M. J.; Marra, C. A., Carnosine and neocoptroine as neutralizing agents for copper overload-induced damages in cultured human cells. *Chem Biol Interact* 2011, 192, (3), 257-63.
- Kang, J. H.; Kim, K. S.; Choi, S. Y.; Kwon, H. Y.; Won, M. H.; Kang, T. C., Carnosine and related dipeptides protect human ceruloplasmin against peroxyl radical-mediated modification. *Mol Cells* 2002, 13, (3), 498-502.
- Aldini, G.; Facino, R. M.; Beretta, G.; Carini, M., Carnosine and related dipeptides as quenchers of reactive carbonyl species: from structural studies to therapeutic perspectives. *Biofactors* 2005, 24, (1-4), 77-87.
- Aydin, A. F.; Kucukgergin, C.; Ozdemirler-Erata, G.; Kocak-Toker, N.; Uysal, M., The effect of carnosine treatment on prooxidant-antioxidant balance in liver, heart and brain tissues of male aged rats. *Biogerontology* 2010, 11, (1), 103-9.
- Kalaz, E. B.; Coban, J.; Aydin, A. F.; Dogan-Ekici, I.; Dogru-Abbasoglu, S.; Oztezcan, S.; Uysal, M., Carnosine and taurine treatments decreased oxidative stress and tissue damage induced by D-galactose in rat liver. *J Physiol Biochem* 2014, 70, (1), 15-25.
- Limon-Pacheco, J.; Gonshebbat, M. E., The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat Res* 2009, 674, (1-2), 137-47.
- Kawahara, M.; Konoha, K.; Koyama, H.; Ohkawara, S.; Sadakane, Y., Zinc and Neurodegenerative Diseases., In *Neurodegenerative Diseases*, Kishore, U., Ed. InTech: Rijeka, Croatia, 2013.
- Lee, I., Betaine is a positive regulator of mitochondrial respiration. *Biochem Biophys Res Commun* 2015, 456, (2), 621-5.
- WU, G.; MORRIS, S. M., Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem. J.* 1998, 336, (1), 1-17.

25. Wu, H.; Wang, W.-X., NMR-based metabolomic studies on the toxicological effects of cadmium and copper on green mussels *Perna viridis*. *Aquat. Toxicol.* 2010, *100*, (4), 339-345.
26. Song, Q.; Chen, H.; Li, Y.; Zhou, H.; Han, Q.; Diao, X., Toxicological effects of benzo(a)pyrene, DDT and their mixture on the green mussel *Perna viridis* revealed by proteomic and metabolomic approaches. *Chemosphere* 2016, *144*, 214-224.
27. Craig-Venter, J.; Adams, M. D.; Myers, E. W., et al., The sequence of the human genome. *Science* 2001, *291*, (5507), 1304-51.
28. Obeid, R., The Metabolic Burden of Methyl Donor Deficiency with Focus on the Betaine Homocysteine Methyltransferase Pathway. *Nutrients* 2013, *5*, (9), 3481-3495.
29. Ueland, P., Choline and betaine in health and disease. *J Inherit Metab Dis* 2011, *34*, (1), 3-15.
30. Acharya, M.; Lau-Cam, C. A., Comparison of the protective actions of N-acetylcysteine, hypotaurine and taurine against acetaminophen-induced hepatotoxicity in the rat. *J Biomed Sci* 2010, *24*, (17), 1423-0127.
31. Balkan, J.; Kanbagli, O.; Aykac-Toker, G.; Uysal, M., Taurine treatment reduces hepatic lipids and oxidative stress in chronically ethanol-treated rats. *Biol Pharm Bull* 2002, *25*, (9), 1231-3.
32. Giriş, M.; Depboylu, B.; Dođru-Abbasođlu, S.; Erbil, Y.; Olgaç, V.; Aliş, H.; Aykaç-Toker, G.; Uysal, M., Effect of taurine on oxidative stress and apoptosis-related protein expression in trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis. *Clin. Exp. Immunol.* 2008, *152*, (1), 102-110.
33. Ma, N.; Sasoh, M.; Kawanishi, S.; Sugiura, H.; Piao, F., Protection effect of taurine on nitrosative stress in the mice brain with chronic exposure to arsenic. *J. Biomed. Sci.* 2010, *17*, (Suppl 1), S7-S7.
34. Manna, P.; Sinha, M.; Sil, P. C., Taurine plays a beneficial role against cadmium-induced oxidative renal dysfunction. *Amino acids* 2009, *36*, (3), 417-28.
35. Manna, P.; Sinha, M.; Sil, P. C., Amelioration of cadmium-induced cardiac impairment by taurine. *Chem Biol Interact* 2008, *174*, (2), 88-97.
36. Regnault, M., nitrogen excretion in marine and freshwater crustacea. *Biological Reviews* 1987, *62*, (1), 1-24.
37. Brosnan, J. T.; da Silva, R. P.; Brosnan, M. E., The metabolic burden of creatine synthesis. *Amino acids* 2011, *40*, (5), 1325-31.
38. Schlattner, U.; Tokarska-Schlattner, M.; Wallimann, T., Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. *Biochim. Biophys. Acta - Molecular Basis of Disease* 2006, *1762*, (2), 164-180.
39. McBreairty, L. E.; Robinson, J. L.; Furlong, K. R.; Brunton, J. A.; Bertolo, R. F., Guanidinoacetate Is More Effective than Creatine at Enhancing Tissue Creatine Stores while Consequently Limiting Methionine Availability in Yucatan Miniature Pigs. *PLoS ONE* 2015, *10*, (6), e0131563.
40. Dorado Martínez, C.; Rugerio Vargas, C.; Rivas Arancibia, S., *Estrés oxidativo y neurodegeneración*. 2003; Vol. 46
41. Michel, V.; Yuan, Z.; Ramsubir, S.; Bakovic, M., Choline transport for phospholipid synthesis. *Exp Biol Med* 2006, *231*, (5), 490-504.
42. Shi, X.; Wang, L.; Zhou, Z.; Liu, R.; Li, Y.; Song, L., Acetylcholine modulates the immune response in Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Fish Shellfish Immunol.* 2014, *38*, (1), 204-210.
43. Čolović, M. B.; Krstić, D. Z.; Lazarević-Pašti, T. D.; Bondžić, A. M.; Vasić, V. M., Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Curr Neuropharmacol.* 2013, *11*, (3), 315-335.
44. He, X.; Bi, X. Y.; Lu, X. Z.; Zhao, M.; Yu, X. J.; Sun, L.; Xu, M.; Wier, W. G.; Zang, W. J., Reduction of Mitochondria-Endoplasmic Reticulum Interactions by Acetylcholine Protects Human Umbilical Vein Endothelial Cells Hypoxia/Reoxygenation Injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015, *35*, (7), 1623-34.
45. Marmaras, V. J.; Fragoulis, E. G., Studies on the metabolism of 14C-dopa in the hepatopancreas of decapod crustacean *Upogebia littoralis*. *Comp Gen Pharmacol* 1971, *2*, (5), 52-8.
46. Aparicio-Simón, B.; Piñón, M.; Racotta, R.; Racotta, I. S., Neuroendocrine and metabolic responses of Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to acute handling stress. *Aquaculture* 2010, *298*, (3-4), 308-314.
47. Kim, Y.-D.; Lantz-McPeak, S. M.; Ali, S. F.; Kleinman, M. T.; Choi, Y.-S.; Kim, H., Effects of ultrafine diesel exhaust particles on oxidative stress generation and dopamine metabolism in PC-12 cells. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2014, *37*, (3), 954-959.
48. Jodko-Piorecka, K.; Litwinienko, G., Antioxidant activity of dopamine and L-DOPA in lipid micelles and their cooperation with an analogue of alpha-tocopherol. *Free Radic Biol Med* 2015, *83*, 1-11.
49. Gibellini, F.; Smith, T. K., The Kennedy pathway--De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB Life* 2010, *62*, (6), 414-28.
50. Tjiburg, L. B. M.; Geelen, M. J. H.; van Golde, L. M. G., Regulation of the biosynthesis of triacylglycerol, phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in the liver. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids and Lipid Metabolism* 1989, *1004*, (1), 1-19.
51. Chang, H.-M.; Mai, F.-D.; Chen, B.-J.; Wu, U.-I.; Huang, Y.-L.; Lan, C.-T.; Ling, Y.-C., Sleep deprivation predisposes liver to oxidative stress and phospholipid damage: a quantitative molecular imaging study. *J. Anat.* 2008, *212*, (3), 295-305.
52. Cui, H.; Kong, Y.; Zhang, H., Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *J Signal Transduct* 2012, *2012*, 646354.

53. Kong, Y.; Trabucco, S. E.; Zhang, H., Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and the mitochondria theory of aging. *Interdiscip Top Gerontol* 2014, 39, 86-107.
54. García-Sevillano, M. A.; García-Barrera, T.; Navarro-Roldan, F.; Montero-Lobato, Z.; Gomez-Ariza, J. L., A combination of metallomics and metabolomics studies to evaluate the effects of metal interactions in mammals. Application to *Mus musculus* mice under arsenic/cadmium exposure. *J Proteomics* 2014, 104, 66-79.
55. García-Sevillano, M. A.; Abril, N.; Fernández-Cisnal, R.; García-Barrera, T.; Pueyo, C.; López-Barea, J.; Gómez-Ariza, J. L., Functional genomics and metabolomics reveal the toxicological effects of cadmium in *Mus musculus* mice. *Metabolomics* 2015, 11, (5), 1432-1450.
56. Diaz-Ruiz, R.; Uribe-Carvajal, S.; Devin, A.; Rigoulet, M., Tumor cell energy metabolism and its common features with yeast metabolism. *Biochim Biophys Acta* 2009, 1796, (2), 252-65.
57. Turovsky, E. A.; Turovskaya, M. V.; Dolgacheva, L. P.; Zinchenko, V. P.; Dymnik, V. V., Acetylcholine Promotes Ca²⁺ and NO-Oscillations in Adipocytes Implicating Ca²⁺ → NO → cGMP → cADP-ribose → Ca²⁺ Positive Feedback Loop - Modulatory Effects of Norepinephrine and Atrial Natriuretic Peptide. *PLoS ONE* 2013, 8, (5), e63483.
58. Verri, T.; Mandal, A.; Zilli, L., et al., d-Glucose transport in decapod crustacean hepatopancreas. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 2001, 130, (3), 585-606.
59. Liu, Y.; Chen, T.; Li, M. H.; Xu, H. D.; Jia, A. Q.; Zhang, J. F.; Wang, J. S., (1)H NMR based metabolomics approach to study the toxic effects of dichlorvos on goldfish (*Carassius auratus*). *Chemosphere* 2015, 138, 537-45.
60. Zhang, F.; Du, G., Dysregulated lipid metabolism in cancer. *World J. Biol. Chem* 2012, 3, (8), 167-174.
61. Menendez, J. A.; Lupu, R., Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 2007, 7, (10), 763-777.
62. Perry, R. J.; Camporez, J. P.; Kursawe, R., et al., Hepatic acetyl CoA links adipose tissue inflammation to hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Cell* 2015, 160, (4), 745-58.
63. Liu, J.; Litt, L.; Segal, M. R.; Kelly, M. J.; Pelton, J. G.; Kim, M., Metabolomics of oxidative stress in recent studies of endogenous and exogenously administered intermediate metabolites. *Int J Mol Sci* 2011, 12, (10), 6469-501.
64. Smolkova, K.; Jezek, P., The Role of Mitochondrial NADPH-Dependent Isocitrate Dehydrogenase in Cancer Cells. *Int J Cell Biol* 2012, 2012, 273947.
65. Sinanoglou, V. J.; Zoumpoulakis, P.; Heropoulos, G.; Proestos, C.; Ciric, A.; Petrovic, J.; Glamoclija, J.; Sokovic, M., Lipid and fatty acid profile of the edible fungus *Laetiporus sulphureus*. Antifungal and antibacterial properties. *J Food Sci Technol* 2015, 52, (6), 3264-72.
66. Vander Heiden, M. G.; Cantley, L. C.; Thompson, C. B., Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009, 324, (5930), 1029-33.
67. Dakubo, J. C.; Naaeder, S. B.; Tettey, Y.; Gyasi, R. K., Colorectal carcinoma: an update of current trends in Accra. *West Afr J Med* 2010, 29, (3), 178-83.
68. Iansante, V.; Choy, P. M.; Fung, S. W., et al., PARP14 promotes the Warburg effect in hepatocellular carcinoma by inhibiting JNK1-dependent PKM2 phosphorylation and activation. *Nat Commun* 2015, 6, 7882.
69. Carracedo, A.; Cantley, L. C.; Pandolfi, P. P., Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight. *Nature reviews. Cancer* 2013, 13, (4), 227-232.
70. Caro, P.; Kishan, Amar U.; Norberg, E., et al., Metabolic Signatures Uncover Distinct Targets in Molecular Subsets of Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cancer Cell* 2012, 22, (4), 547-560.
71. Begriche, K.; Massart, J.; Robin, M.-A.; Borgne-Sanchez, A.; Fromenty, B., Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: Mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver. *Journal of Hepatology* 2011, 54, (4), 773-794.
72. Cotter, D. G.; Ercal, B.; Huang, X., et al., Ketogenesis prevents diet-induced fatty liver injury and hyperglycemia. *J Clin Invest* 2014, 124, (12), 5175-90.
73. Coates, C. J.; Naim, J., Diverse immune functions of hemocyanins. *Dev Comp Immunol* 2014, 45, (1), 43-55.
74. Mente, E.; Davidson, I.; Karapanagiotidis, I. T.; Fountoulaki, E.; Nengas, I., Amino Acid Analysis in the Shore Crab (Decapoda: Brachyura). *J. Crust. Biol.* 2010, 30, (4), 643-650.
75. Wang, W.-N.; Wang, A.-L.; Bao, L.; Wang, J. P.; Liu, Y.; Sun, R.-Y., Changes of protein-bound and free amino acids in the muscle of the freshwater prawn *Macrobrachium nipponense* in different salinities. *Aquaculture* 2004, 233, (1-4), 561-571.
76. Bhavan, P. S.; Geraldine, P., Alterations in Concentrations of Protein, Carbohydrate, Glycogen, Free Sugar, and Lipid in the Prawn *Macrobrachium malcolmsonii* Exposure to Sublethal Concentrations of Endosulfan. *Pestic Biochem Physiol* 1997, 58, (2), 89-101.
77. Stalin, A.; Broos, K. V.; Sadiq Bukhari, A.; Syed Mohamed, H. E.; Singhal, R. K.; Venu-Babu, P., Morphological and histological studies on freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de man) irradiated with (60)Co gamma radiation. *Aquat Toxicol* 2013, 144-145, 36-49.
78. Bambang, Y.; Thuet, P.; Charmantier-Daures, M.; Trilles, J.-P.; Charmantier, G., Effect of copper on survival and osmoregulation of various developmental

- stages of the shrimp *Penaeus japonicus* bate (Crustacea, Decapoda). *Aquat. Toxicol.* 1995, 33, (2), 125-139.
79. Brooks, S. J.; Lloyd Mills, C., The effect of copper on osmoregulation in the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* 2003, 135, (4), 527-537.
80. Lignot, J. H.; Pannier, F.; Trilles, J. P.; Charmantier, G., Effects of tributyltin oxide on survival and osmoregulation of the shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda). *Aquat. Toxicol.* 1998, 41, (4), 277-299.
81. Souza, I. C.; Duarte, I. D.; Pimentel, N. Q., et al., Matching metal pollution with bioavailability, bioaccumulation and biomarkers response in fish (*Centropomus parallelus*) resident in neotropical estuaries. *Environ. Pollut.* 2013, 180, 136-144.
82. Wu, J. P.; Chen, H.-C., Effects of cadmium and zinc on oxygen consumption, ammonium excretion, and osmoregulation of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Chemosphere* 2004, 57, (11), 1591-1598.
83. Amado, E. M.; Freire, C. A.; Souza, M. M., Osmoregulation and tissue water regulation in the freshwater red crab *Dilocarcinus pagei* (Crustacea, Decapoda), and the effect of waterborne inorganic lead. *Aquat. Toxicol.* 2006, 79, (1), 1-8.
84. Watford, M., Glutamine metabolism and function in relation to proline synthesis and the safety of glutamine and proline supplementation. *J Nutr* 2008, 138, (10), 2003S-2007S.



**CONCLUSIONES
GENERALES**

**GENERAL
CONCLUSIONS**

CONCLUSIONES GENERALES

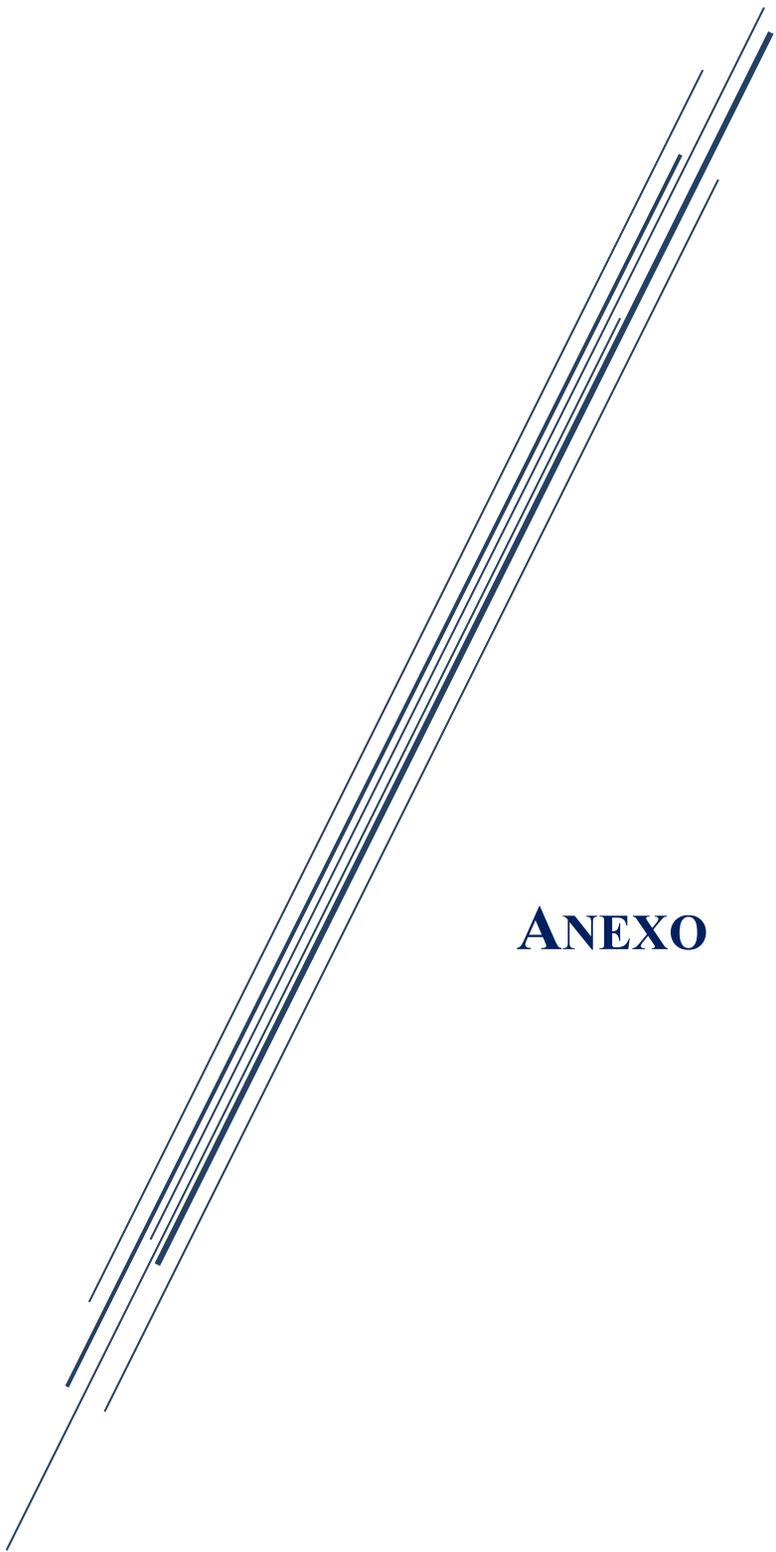
- La zona LP y los cangrejos *P. clarkii* capturados en ella son adecuados para ser utilizados como referencia en estudios de contaminación ambiental, por su bajo nivel de contaminación por metales pesados. Por el contrario, las zonas de PAR y especialmente MAT son sitios altamente contaminados.
- La concentración de metales en glándula digestiva y branquias de *P. clarkii* refleja la existente en los sedimentos de su zona de captura, lo que sustenta la idea de que este decápodo es un buen bioindicador de contaminación ambiental por metales.
- La glándula digestiva de *P. clarkii* es el principal órgano detoxificador y, por ello, más adecuado que las branquias para la determinación de biomarcadores, ya que acumula mayor cantidad de metales y se ve más afectada que las branquias en relación a todos los parámetros determinados en este estudio.
- La acumulación de metales y, posiblemente, otros contaminantes en glándula digestiva y branquias de *P. clarkii* provoca daños oxidativos a biomoléculas en estos tejidos, dada la correlación directa encontrada entre concentración de metales acumulados y niveles de peroxidación lipídica y carbonilación de proteínas medidos en esos órganos.
- Los cangrejos *P. clarkii* responden a los daños oxidativos cambiando su metabolismo a diferentes niveles (señalización redox, los perfiles proteicos y de metabolitos) para adaptarse y sobrevivir bajo condiciones de exposición crónica a contaminación.

- La oxidación reversible de tioles de algunas proteínas específicas podría formar parte de sistemas reguladores que detectan e integran la actividad metabólica general de la célula en respuesta a los cambios ambientales. Este tipo de modificación post-traducciona l podría constituir un mecanismo temprano de respuesta que permite a los animales sobrevivir bajo condiciones de estrés oxidativo en zonas contaminadas.
- La integración de resultados bioquímicos, proteómicos y metabolómicos permite establecer que la exposición crónica de cangrejos *P. clarkii* a niveles elevados de contaminación causa alteración de muchas funciones fisiológicas relacionadas con la defensa frente a estrés oxidativo, como son estrés del retículo endoplásmico, inflamación y respuesta inmune, así como alteraciones en el metabolismo energético para adaptarse a una situación en que la función mitocondrial se ve comprometida por los daños oxidativos a lípidos y membranas biológicas.
- La medida de los niveles de carbonilación de proteínas, la proteómica en general y la proteómica redox de cuantificación de disulfuros libres y reversiblemente oxidados, así como la metabolómica, constituyen, por sí mismas, unas potentes herramientas para la evaluación de los efectos biológicos de la contaminación, siendo adecuadas como biomarcadores de exposición de gran utilidad en los programas de vigilancia de la salud de los ecosistemas.
- Las proteínas y metabolitos cuyos niveles resultan alterados en *P. clarkii* por la contaminación ambiental, pueden constituir buenos biomarcadores para el control de la calidad ambiental.
- El Parque Nacional de Doñana es un ecosistema sometido a una fuerte presión ambiental por las numerosas y crecientes actividades antropogénicas realizadas en su entorno, cuyos residuos pueden alcanzarlo a través de los acuíferos que lo riegan, poniendo en grave riesgo la salud y supervivencia de los organismos que lo integran.

GENERAL CONCLUSIONS

- Lucio del Palacio and the *P. clarkii* specimens captured at this site can be considered as virtually free of metal contamination and hence, adequate to be used as reference in environmental pollution studies. In contrast, PAR and especially, MAT, are sites heavily polluted by metals.
- The amounts of metals measured in the digestive gland and gills of *P. clarkii* crayfish reflect those quantified in the sediments of their area of capture, reinforcing the proposal of this Decapod being a good bioindicator of environmental metal pollution.
- Digestive gland of *P. clarkii* is the main organ of detoxification and, therefore more suitable than gills for determining biomarkers, as it accumulated more metals and resulted more affected than the gills in relation to all the parameters determined in this studio.
- The accumulation of metals, and possibly other contaminants, in the digestive gland and gills of *P. clarkii* causes oxidative damage to biomolecules, as inferred from the strong positive correlation found between concentration of accumulated metals and the levels of lipid peroxidation and protein carbonylation measured in these organs.
- *P. clarkii* responds to oxidative damage by changing their metabolism at different levels (redox signaling, proteins and metabolites profiles) to adapt and survive under conditions of chronic exposure to pollution.
- The reversible oxidation of thiols of some specific proteins might be part of regulatory systems that detect and integrate the overall metabolic activity of the cell in response to environmental changes. This type of post-translational modification could be an early mechanism of response that allows animals to survive under conditions of oxidative stress in polluted areas.

- The integration of biochemical, proteomics and metabolomics results allows to establish that chronic exposure of crayfish *P. clarkii* to high levels of pollution causes changes in many physiological functions related to defense against oxidative stress, such as endoplasmic reticulum stress, inflammation and immune response, as well as alterations in energy metabolism to adapt to a situation in which the mitochondrial function is compromised by oxidative damage to lipids and biological membranes.
- The measurement of protein carbonylation, the proteomic approaches, the redox proteomics for the quantization of free or reversibly oxidized disulfides, as well as the metabolomic methodology, are powerful tools for assessing the biological effects of pollution; they form a suitable battery of exposure biomarkers to be used for the evaluation of ecosystems health and in monitoring programs.
- The proteins and metabolites whose levels resulted altered in *P. clarkii* as a consequence of pollution might be good biomarkers for environmental quality control.
- Doñana National Park is an ecosystem under strong environmental pressure due to the numerous and increasing anthropogenic activities carried out in its surroundings, whose residues reach the Park through the aquifers that water it, endangering the health and the survival of its inhabitants. grave risk to the health and survival of organisms in it.



ANEXO



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv

Redox proteomics as biomarker for assessing the biological effects of contaminants in crayfish from Doñana National Park

Ricardo Fernández-Cisnal¹, José Alhama¹, Nieves Abril, Carmen Pueyo, Juan López-Barea*

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Agrifood Campus of International Excellence (ceiA3), University of Córdoba, Córdoba, Spain

HIGHLIGHTS

- Great differences between the four sites were observed among thiol oxidized proteins.
- Thirty five spots showed intensity differences compared to the reference site.
- Nineteen proteins were identified showing thiol oxidation differences among sites.
- Evidence of reversible oxidation was found for specific Cys residues.
- Redox proteomics is useful as a new pollution biomarker for Doñana National Park.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 March 2014

Received in revised form 14 April 2014

Accepted 28 April 2014

Available online 21 May 2014

Editor: Eddy Y. Zeng

Keywords:

Procambarus clarkii

Pollutant-elicited oxidative stress

Protein thiol redox state

Ferritin

Nucleoside diphosphate kinase

ABSTRACT

Despite its environmental relevance and sensitivity, Doñana National Park (DNP) is under high ecological pressure. In crayfish (*Procambarus clarkii*), the utility of redox proteomics as a novel biomarker was evaluated in the aquatic ecosystems of DNP and its surroundings, where agricultural activity is a serious concern. After fluorescence labeling of reversibly oxidized Cys and 2-DE separation, the total density of proteins with reversibly oxidized thiols was found to be much higher in animals from the *Matochal* (MAT) and *Rocina* (ROC) streams, while no difference was found in crayfish from *Partido* (PAR) stream compared to those from the DNP core at *Lucio del Palacio* (the negative control). The 2-DE analysis revealed 35 spots with significant differences in thiol oxidation, among which 19 proteins were identified via MALDI-TOF/TOF. While 3 spots, identified as ferritin, showed higher oxidation levels in ROC, other identified proteins were more intense at MAT than at ROC (superoxide dismutase, protein disulfide isomerase and actin) or were overoxidized only in MAT (nucleoside diphosphate kinase, fructose-biphosphate aldolase, fatty acid-binding protein, phosphopyruvate hydratase). For most of the identified proteins, spots corresponding to different Cys oxidized forms were detected, and the native forms, without oxidized thiol groups were also found in some of them. Evidence of reversible oxidation was found for specific Cys residues, including Cys13 in ferritin as well as Cys76 and Cys108 in nucleoside diphosphate kinase. The identified thiol-oxidized proteins provide information about the metabolic pathways and/or physiological processes affected by pollutant-elicited oxidative stress.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Doñana National Park (DNP) is a 50,720 ha wildlife reserve located in Huelva province (Andalusia, SW Spain). Due to the variety of

ecosystems, plants and animal species it harbors, DNP was declared a UNESCO Biosphere Reserve in 1981, a Ramsar Site in 1982 and a World Heritage Site in 1994. Despite the environmental relevance and sensitivity of the park, it has been exposed to increasing ecological pressures, as diverse human activities carried out in its surroundings threaten its ecosystems in the following ways:

Abbreviations: AM-labeled, acetamido-labeled; AF-labeled, acetamidofluorescein-labeled; 2-DE, two-dimensional electrophoresis; IAM, iodoacetamide; IAF, 5-iodoacetamidofluorescein; IEF, isoelectric focusing; LP, *Lucio del Palacio*; MAT, *Matochal*; PAR, *Partido* stream; PTMs, post-translational modifications; ROC, *Rocina* stream; ROS, reactive oxygen species; RNS, reactive nitrogen species; SSH, suppression subtractive hybridization; TBP, tributylphosphine.

* Corresponding author at: Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Córdoba, Rabanales Campus, S. Ochoa Building, 2nd floor, 14071 Córdoba, Spain. Tel.: +34 957 218139; fax: +34 957 218082.

E-mail address: bb1lobaj@uco.es (J. López-Barea).

¹ Both authors contributed equally to this work and should be considered first authors.

- 1) DNP is under the influence of industries (petrochemical, fertilizer, paint) located at Huelva Estuary, 40 km to the west. The estuary is formed by the Odiel and Tinto Rivers, which also carry metals from pyrite mines located north of Huelva (Montes-Nieto et al., 2007; 2010).
- 2) Early studies showed that wind and the water courses that feed the Doñana marshes carry most of the contaminants (Albaiges et al., 1987). Doñana is watered by the *Rocina*, *Partido* and *Guadimar*

streams and the Guadalquivir River which are surrounded by agricultural areas. To the NE, the marshes between the Guadimar stream and Guadalquivir River are responsible for most Spanish rice production. To the NW, near the *Partido* and *Rocina* streams, strawberry and citrus are cultured using large amounts of agrochemicals.

- 3) In 1998, the tailings dam of the Aznalcóllar pyrite mine, 60 km to the north, collapsed and released acidic water and mud with high levels of toxic metals into the course of the Guadimar. Although the spill did not have a major effect in Doñana, due to the early implementation of an emergency plan (Grimalt et al., 1999), it alarmed the authorities and the scientific community, raising concern about the presence of contaminants unrelated to the Aznalcóllar spill in DNP (Pueyo et al., 2011). In fact, most of recent studies point to agriculture as the main threat to DNP because of the high level of agrochemical use in nearby areas (Bonilla-Valverde et al., 2004; Gomara et al., 2008; Pueyo et al., 2011; Ruíz-Laguna et al., 2001; Vioque-Fernández et al., 2009). The most serious gap in the knowledge about environmental quality within Doñana is related to agrochemical pollution, as this type of contamination is diffuse and difficult to assess (Gomara et al., 2008; Pueyo et al., 2011).

In environmental assessments, sentinel organisms serve as bioindicators in which biomarkers are measured to determine pollutant exposure, effects or risks (Livingstone, 1993; López-Barea, 1995). Most such studies are concentrated in polluted environments, whereas they are scarce in natural ecosystems, such as national parks (Pueyo et al., 2011). The decapod crustacean *Procambarus clarkii* (red crayfish), native to southeastern USA, was introduced to the Doñana marshes (SW Spain, Fig. 1) in 1973, subsequently generating dense populations and becoming an invasive species. *P. clarkii* can be used in the assessment of fresh water ecosystems, particularly to study the effects of metals and pesticides near DNP (Martin-Diaz et al., 2006; Pueyo et al., 2011;

Vioque-Fernández et al., 2007b, 2009). The use of conventional biomarkers (esterases, biotransforming enzymes, oxidative stress) in pollution studies is biased because these markers concentrate in few proteins, thus most of the other proteins that are altered, but whose relationship to pollution is still unknown, would be ignored (López-Barea and Gómez-Ariza, 2006). “Omic” approaches have become powerful tools in environmental studies, as they allow the identification of novel biomarkers as well as the elucidation of toxicity mechanisms or proteins that are involved in toxic responses that have not been described previously (Montes-Nieto et al., 2007; Pueyo et al., 2011; Vioque-Fernández et al., 2009). After the identification of key proteins indicating exposure or effects, omic analyses can be used in risk assessments (Abril et al., 2011; Pueyo et al., 2011).

Several types of pollutants, such as metals and oxidative organic chemicals, generate reactive O and N species (ROS/RNS) that induce oxidative stress (Braconi et al., 2011; López-Barea, 1995). When such oxidative damage is excessive, it ends in cell death and various pathologies (Butterfield and Dalle-Donne, 2012; Dalle-Donne et al., 2006; Eaton, 2006; Roberts et al., 2009). ROS/RNS also play key roles in signaling (Eaton, 2006; Tell, 2006). Proteins are major targets of ROS/RNS, in which many post-translational modifications have been described (Butterfield and Dalle-Donne, 2012; Cabisco and Ros, 2006; Davies, 2005) with essential roles in cellular localization, protein–protein interactions, and protein structure or biological activity (Cabisco and Ros, 2006; Hwang et al., 2009; Lee et al., 2009; Yamakura and Kawasaki, 2010).

Cysteine is a key residue involved in protein catalysis, oxidative folding/trafficking, redox signaling and regulation. However, its unique redox properties also render Cys vulnerable to many electrophiles, especially ROS/RNS, leading to redox modifications and alteration of protein structure, function, or redox signaling (Ying et al., 2007). Although Cys residues are rare, representing 1–3% of total residues, protein thiols (10–30 mM) are more abundant than

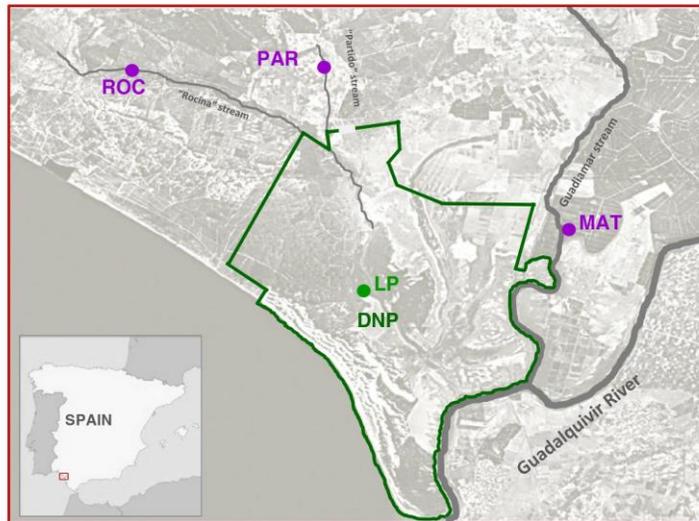


Fig. 1. Map of Doñana National Park (DNP) and its surroundings showing the sites where crayfish (*P. clarkii*) were collected. The locations of the sites (and their UTM coordinates) are indicated: Lucio del Palacio (LP, X = 193,800, Y = 4,099,515); el Matochal (MAT, X = 208,681, Y = 4,102,207); Partido stream (PAR, X = 191,173, Y = 4,124,977) and Rocina stream (ROC, X = 178,653, Y = 4,119,937).

glutathione (1–10 mM) (Company et al., 2012; Dalle-Donne et al., 2008; Hansen et al., 2009). Protein thiols participate in the S-thiolation/dethiolation cycle, first being oxidized to mixed disulfides, with a parallel decrease in ROS levels, followed by the disulfides being reduced back to thiols by thioredoxin, glutaredoxin and/or protein disulfide isomerase (Jung and Thomas, 1996). S-thiolation protects protein thiols from irreversible oxidation and reprograms metabolism during oxidative stress (Dalle-Donne et al., 2009). The oxido-reduction of Cys protein thiols is a major molecular switch for integrating oxidants into signal transduction pathways (Eaton, 2006; Hwang et al., 2009; Tell, 2006; Winterbourn and Hampton, 2008). Reversible types of Cys oxidation include the formation of disulfide, sulfenic acid and sulfinic acid as well as S-thiolation and S-nitrosylation (Eaton, 2006; Janssen-Heininger et al., 2008; Jeong et al., 2011; Lee et al., 2009; Ying et al., 2007). While a protein may contain many Cys residues, few are reactive because they more readily ionize to a thiolate state due to charged amino acids nearby (Bonetto and Ghezzi, 2006; Eaton, 2006; Janssen-Heininger et al., 2008; Ying et al., 2007). Several Cys targets have been identified in proteins whose oxidation has key consequences for signal transduction (Eaton, 2006; Fuentes-Almagro et al., 2012; Janssen-Heininger et al., 2008).

Advances in proteomic technologies have led to an increasing number of reports assessing changes in the redox state of protein thiols in oxidatively stressed cells (Butterfield and Dalle-Donne, 2012; Company et al., 2012; Dalle-Donne et al., 2006; Janssen-Heininger et al., 2008; Winterbourn and Hampton, 2008; Ying et al., 2007). Methods for the detection, quantification and identification of oxidant-sensitive thiol proteins, referred to as redox proteomics, have been reviewed (Bonetto and Ghezzi, 2006; Charles et al., 2013; Chiappetta et al., 2010; Chouchani et al., 2011; Eaton, 2006; Thamsen and Jakob, 2011; Ying et al., 2007). They combine specific labeling of oxidized thiols and two-dimensional electrophoresis (2-DE) separation. The use of *N*-ethylmaleimide (NEM) or iodoacetamide (IAM) allows native reduced thiols to be blocked and oxidation to be avoided during the extraction procedure, followed by the reduction of native disulfide bonds and fluorescence labeling with 5-iodoacetamidofluorescein (IAF). This method detects only native disulfides, i.e. inter-/intra-molecular protein disulfides (PS-SP) and protein–glutathione mixed disulfides (PS-SG) (Charles et al., 2013; Fuentes-Almagro et al., 2012; Hampton et al., 2006; Minard et al., 2007; Perez et al., 2010).

Despite the important role of Cys modifications, the identity and physiological significance of most changes in protein thiols are unknown (Chouchani et al., 2011). Nevertheless, Cys-containing proteins can be identified via mass spectrometry (MS), and information on the thiol-disulfide status of peptides or evidence of reversible oxidation of specific Cys residues can be obtained (Chiappetta et al., 2010; Chouchani et al., 2011; Eaton, 2006; Fuentes-Almagro et al., 2012; Scaloni, 2006; Thamsen and Jakob, 2011; Ying et al., 2007).

Proteomic methods for assessing protein modifications due to pollutant-promoted oxidative stress can be used as new biomarkers of pollution and could provide basic insights into toxicity mechanisms (Braconi et al., 2011; Dowling and Sheehan, 2006). This work aimed to evaluate the biological effects of anthropogenic activities on the aquatic ecosystems of DNP and its surroundings using *P. clarkii* as a bioindicator. Redox proteomic analyses are highly useful for monitoring environmental pollution. The thiol-oxidized proteins identified here provide information about the metabolic pathways and/or physiological processes affected by pollutant-elicited oxidative stress. MS analysis identified specific thiol modifications on vulnerable Cys residues, which are important for understanding the response to stress and cell signaling.

2. Materials and methods

2.1. Study areas, animal trapping and tissue collection

Crayfish were collected in May–June 2009 at four sites in DNP and its surroundings. Fig. 1 shows the sites and their UTM coordinates. *Lucio del*

Palacio, LP, is a non-polluted site in the DNP core that has been described in previous studies (Ruiz-Laguna et al., 2001; Vioque-Fernández et al., 2009). The other three sites are near areas of intensive agriculture: *Matochal*, MAT, is affected by rice-growing fields; *Partido*, PAR, is near citrus fruit and grape fields and *Rocina*, ROC, is near strawberry, citrus fruit and grape fields. A total of 15 male crayfish/site were caught with tubular plastic mesh traps baited with chicken meat that were put in place in the evenings and checked the next morning. Adults were transported alive to Doñana Biological Reserve-CSIC, then killed and dissected after their site/date of capture, sex, weight and length were recorded. The digestive glands were excised, weighed in Eppendorf vials and frozen in liquid N₂. Organs were transported frozen to a laboratory at Córdoba University, where they were individually ground in a mortar with liquid N₂ and stored at –80 °C for analysis.

2.2. Labeling of oxidized protein thiols and two-dimensional electrophoresis

Unless otherwise stated, all reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Alcobendas, Spain) or Merck (Mollet del Valles, Spain). Reversibly oxidized thiols within proteins were detected via fluorescence labeling and 2-DE (Baty et al., 2002; Minard et al., 2007). Digestive gland extracts were prepared from pools of 6–8 male animals/site (14 ± 4.7 g, 8.07 ± 0.67 cm length, $n = 29$). The tissue (200 mg) was homogenized in three volumes of buffer (200 mM IAM in 40 mM HEPES, pH 7.4, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 6 μ M leupeptin and 100 μ l ml⁻¹ protease inhibitors, Sigma P2714). The extract was incubated at 37 °C for 15 min, and the cell debris was cleared via centrifugation (Eppendorf 5415 R, 10 min, 16,000 g) and re-centrifuged (Beckman Optima TLX, 1 h, 100,000 g). CHAPS was added to a 1% w/v final concentration and the extract was vortexed and incubated for 30 min. The protein content was determined using the Bradford method (Bio-Rad Protein Assay) after separation into 3 technical replicates, and excess IAM was removed by precipitating the proteins (200 μ g) with the 2-D Clean-Up Kit (GE Healthcare). The proteins were resuspended in 100 μ l of buffer (40 mM HEPES, pH 7.4, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 1% CHAPS). Oxidized thiols (PS-SP and PS-SG) were reduced by adding tributylphosphine (TBP) at a 1 mM final concentration, and the solution was subsequently incubated at 37 °C for 30 min. Then, 5-iodoacetamidofluorescein (IAF) was added to a 200 μ M final concentration, and the extract was incubated in the dark for another 30 min. Subsequent steps were performed with minimal exposure of the samples to light. To remove excess IAF and salts, the labeled proteins were again precipitated with the 2-D Clean-Up Kit, then resuspended in 50 μ l of lysis solution (30 mM Tris-HCl pH 8.5, 8 M urea, 4% CHAPS, 1% IPG buffer pH 3–10 and 60 mM DTT) and incubated on ice for 15 min.

For separation in the 1st dimension through isoelectric focusing (IEF), 100 μ g of the labeled proteins was cup-loaded at the cathodic end of rehydrated Immobiline DryStrips (pH 4–7, 24 cm; GE Healthcare). After 6 h of active (50 V) rehydration, IEF was carried out (20 °C, 75 μ A/strip) in a Proteom IEF apparatus (Bio-Rad) at 500 V, 1000 V, 2000 V, 4000 V, 6000 V and 8000 V (each for 90 min) and 8000 V (until reaching 57,000 Vh). For the 2nd dimension, the strips were soaked for 15 min in buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS) containing 50 mM DTT and again in the same buffer but containing 250 mM IAM. The strips were loaded onto 12.5% SDS-PAGE gels (24 cm) and separated at 20 °C in a DodecaCell Plus device (Bio-Rad) at 3 W/gel constant power. The Sigma Marker wide-range protein ladder was used as an Mr standard and was loaded on both sides of the gel after reduction (1 mM TBP, 1% CHAPS) and IAF (200 μ M) labeling. Following 2-DE, three replicate gels/site were scanned using an FX Molecular Imager (Bio-Rad) at a 488 nm excitation and 530 nm emission/detection wavelengths to detect AF-labeled proteins. The gels were then stained with SYPRO Ruby and rescanned at a 532 nm excitation and 555 nm emission/detection to reveal total proteins. All image analyses and determinations of oxidized thiol protein

regulation factors were performed using PDQuest software (Bio-Rad). To achieve accurate quantitative comparisons, fluorescent images of the 2-DE gels were captured at an equal sensitivity and processed using the same values for the parameters in the “transform” control panel of PDQuest software (low, high and gamma sliders).

Both types of 2-DE images (AF and SYPRO Ruby) were exported from PDQuest software in TIFF format and placed in different layers of the same Adobe Photoshop file so that they would overlap exactly. To differentiate the two stains, the original gray color of the AF image was changed to red and that of the SYPRO Ruby image to blue. The AF-labeled Mr markers, loaded on both sides of the gel, were used as reference and anchoring points to facilitate perfect matching of the two gels. This allowed us to determine the exact positions of the differentially oxidized thiol proteins in the SYPRO Ruby-stained gel, assuring their precise excision for MS analysis.

2.3. Cluster analysis

The Genesis package (Sturm et al., 2002) was used for cluster analysis. Intensity data were normalized, and the distance measure employed was Pearson correlation. A complete linkage hierarchical cluster analysis was performed using the intensity of the 35 differentially expressed oxidized thiol protein spots in each of the 3 gels from each study site.

2.4. MALDI-TOF/TOF mass spectrometry and protein identification

Spots were automatically excised in a ProPic station (Genomic Solutions, UK), then digested and loaded onto a MALDI plate using a ProPrep II station (Digilab Genomic Solutions Inc., UK). The gel plugs were bleached twice over 30 min at 37 °C with 200 mM NH_4HCO_3 in 40% acetonitrile. They were then subjected to 3 rounds with 100% acetonitrile and 25 mM NH_4HCO_3 in 50% acetonitrile and subsequently dehydrated for 5 min with 100% acetonitrile and dried over 4 h at room temperature. Then, 20 μl of modified porcine trypsin (sequencing grade; Promega) at a concentration of 12.5 ng/ μl in 25 mM NH_4HCO_3 was added to the dry gel plugs and digestion proceeded at 37 °C for 12 h. Peptides were extracted with 1 μl of 10% trifluoroacetic acid and incubated for 15 min, after which they were desalted and concentrated in μC_{18} ZipTip columns (Millipore) and directly loaded onto the MALDI plate using α -cyano hydroxycinnamic acid as the matrix.

MS analysis was conducted in a MALDI-TOF/TOF (4800 Proteomics Analyzer, Applied Biosystems) in an m/z range of 800 to 4000, at a 20 kV accelerating voltage. The spectra were internally calibrated with peptides obtained through trypsin autolysis (MH^+ , 842.509 and 2211.104). The most abundant peptide ions were subjected to fragmentation analysis (MS/MS), to provide information for peptide sequencing. The proteins were assigned identification through peptide mass fingerprinting and confirmed through MS/MS analysis. The Mascot 2.0 search engine (Matrix Science Ltd., London) was used for protein identification running on GPS Explorer™ software v3.5 (Applied Biosystems), comparing the results to crustacean and arthropoda peptide sequences existing in the UniProt database (monthly updated). The search settings allowed one missed cleavage with trypsin, an MS/MS fragment tolerance of 0.2 Da, a precursor mass tolerance of 100 ppm, and acetamidofluorescein- and acetamido-labeled Cys and Met oxidation as possible modifications. Proteins that were statistically significant ($p < 0.05$) were positively assigned identifications after considering Mr and pI values. The protein identifications were validated according to the following criteria: sequence coverage, high score, lowest expect, number of matched peptides, and the number and score of the fragmented ions.

2.5. Statistical analysis

The data are presented as the mean \pm SD of three independent gel images. They were analyzed using GraphPad Instant software

(version 3.05). Student's *t* statistic was calculated as an unpaired, two-tailed test. A $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

A quantitative analysis of reversibly oxidized thiols was performed in digestive gland extracts after reversibly labeling oxidized thiols with IAF. To identify proteins prone to undergo this change, three technical replicates of AF-labeled proteins were separated via 2-DE, and gel images obtained for each sampling site were compared. Fig. 2 shows four representative gels. Three gel images per site (12 images in total) were analyzed for thiol oxidized proteins (AF-labeled, Fig. 2A) and total proteins (SYPRO Ruby-stained, Fig. 2B). After image analysis, the total density of the protein spots was also calculated for reversibly oxidized thiol proteins (Fig. 3). Data on thiol oxidized proteins were normalized for total protein density.

The SYPRO Ruby-stained proteins detected for the four study sites were quite similar, as shown by the 2-DE gel patterns (Fig. 2B). In fact, each spot was visible in the same region of the 2-DE gel for every site, indicating a similar presence of each protein in the crayfish from all sites. In contrast, great differences between the four sites were observed among reversibly thiol oxidized proteins. As illustrated in Fig. 2A, the 2-DE gels showed few AF-labeled (thiol oxidized) spots in LP and PAR crayfish, while many more oxidized spots were visible in animals from the ROC and MAT sites. Fig. 3 confirms that compared to LP, the total density of proteins with reversibly oxidized thiols was much higher in ROC ($p < 0.01$) and especially in MAT crayfish ($p < 0.001$), where the intensity of oxidized spots was 3.2- and 4.2-fold higher, respectively.

A representative 2-DE gel of AF-labeled proteins from MAT crayfish (Fig. 4, left), shows that there were 798 ± 2 protein spots exhibiting reversibly oxidized thiols, corresponding to $46\% \text{ of } 1721 \pm 118$ spots detected through SYPRO Ruby staining. It also shows the position of 35 spots presenting differences in intensity (>2 -fold, $p < 0.05$) compared to the LP reference site as well as the names of the identified proteins.

Table 1 lists the 23 spots identified via MALDI-TOF/TOF, whose positions are indicated in Fig. 4 (and Fig. 5, see later). These spots represent 8 distinct proteins: 1) ferritin, FER, identified from four spots, 2–4 and 36 (Fig. 5); 2) superoxide dismutase, SOD, from six spots, 6–9, and 37–38 (Fig. 5); 3) protein disulfide isomerase, PDI, from spot 18; 4) actin, ACT, from four spots, 19–22; 5) fatty acid-binding protein, FABP, from two spots, 29 and 30; 6) nucleoside diphosphate kinase, NDK, from two spots, 24 and 25; 7) fructose-biphosphate aldolase, FBA, from two spots, 26 and 39 (Fig. 5); and 8) phosphopyruvate hydratase, PPH, from two spots, 34 and 35. Only spot 39 did not follow the stringent criteria (protein score > 72 and $p < 0.05$ in the arthropoda database) applied to obtain an unambiguous identification, but it was also considered to be identified due to its proximity (similar Mr and pI) to spot 26, which was unambiguously identified as FBA; in addition, the same peptide, LADIGLENTENRR, was obtained through TOF/TOF fragmentation of spots 26 and 39.

A hierarchical cluster analysis was carried out using the Genesis package to visually quantify the alterations in oxidized thiol levels among the 35 selected spots (Fig. 4, right). Proteins and sites were grouped based on similarities in their expression patterns. As indicated above, the AF-labeling of most proteins (spots 5–35) was stronger in MAT crayfish, while only 4 spots (1–4) presented stronger AF-labeling in ROC. Again, no difference in oxidized thiol levels was observed in PAR crayfish compared to LP animals. The oxidized protein spots were grouped into three clusters. Cluster 1 included four spots (1–4) that were exclusively up-regulated at ROC, among which spots 2–4 were identified as ferritin. Cluster 2 included seventeen proteins (5–21) that showed particularly high fluorescence in MAT animals and were also high at ROC; this abundant cluster included spots 6–9 (superoxide dismutase), 18 (protein disulfide isomerase) and 19–21 (actin). Cluster 3 included fourteen spots (22–35) that were up-regulated only at MAT, among which spots 22 (actin), 24–25 (nucleoside diphosphate kinase),

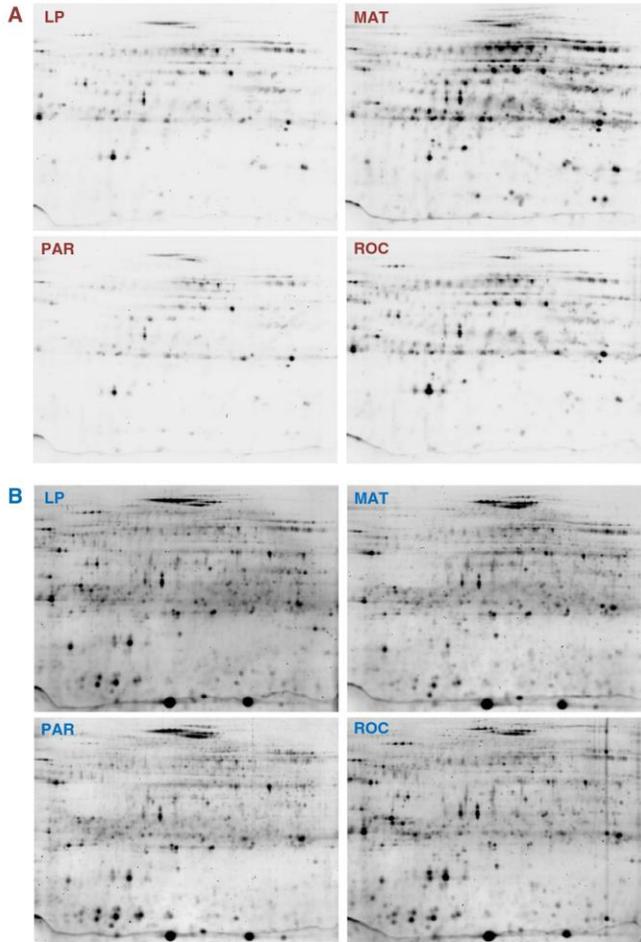


Fig. 2. Representative 2-DE gel images of IAF labeled oxidized thiol proteins (A) and total proteins SYPRO Ruby-stained in the same gels (B) of digestive gland of *P. clarkii* collected from different sites. For sampling sites, see Fig. 1 legend. The fluorescent images of the gels were captured at equal sensitivity and processed using the same values for the parameters in the transform control panel in PDQuest software.

26 (fructose-biphosphate aldolase), 29–30 (fatty acid-binding protein) and 34–35 (phosphopyruvate hydratase) were identified.

Table 2 presents the AF signal intensities of the 19 identified proteins showing thiol oxidation differences compared to the LP site. Regarding Cluster 1, the oxidation of the 3 FER spots increased >3 fold at ROC ($p < 0.001$), whereas it showed no change (spots 2, 4) or even decreased at the other sites (spot 3, $p < 0.05$). All of the Cluster 2 proteins were highly oxidized at MAT whereas at ROC, the difference was only significant for spots 6 and 8 (SOD), 18 (PDI), and 19–21 (ACT). Similar increases in intensity were found in ROC and MAT for spots 6, 8, 18

and 19. All of the identified proteins in Cluster 3 (22, ACT; 24–25, NDK; 26, FBA; 29–30, FABP; 34–35, PPH) were over-oxidized at MAT ($p < 0.001$), but only spot 22 showed an increase at ROC ($p < 0.01$). The two spots identified as FABP (29–30) were undetectable at LP or ROC, although both were very intense at MAT.

Fig. 5A is a representative 2-DE gel from MAT crayfish, where AF-labeled oxidized thiol proteins (in red) are overlaid on SYPRO Ruby-stained proteins (in blue). Because AF-binding to reversibly oxidized thiols adds 388.35 mass units per thiol and the protein pl can be also modified, there is little overlap between the two types of 2-DE

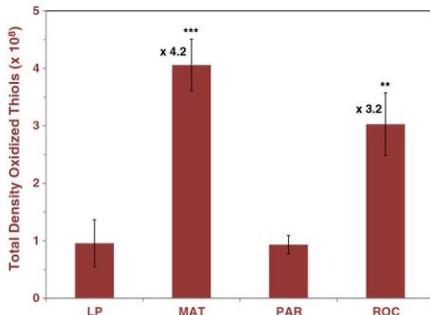


Fig. 3. Quantitative comparison of the 2-DE gel images of IAF labeled oxidized thiol proteins. Gel images were analyzed using PDQuest software and the total density in the gel was determined. Values are mean \pm SD of three gels of each site. The statistical significance of the differences is compared with LP, used as reference. Statistical significances: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. The numbers represent the total density fold increase at the sites with significant changes relative to LP.

images. Three representative regions are expanded in Fig. 5B, showing the same identified proteins from different spots. AF-labeled oxidized thiol spot numbers 26, identified as FBA, 6–8, identified as SOD and 2–4, identified as FER, are shifted to a more acidic pI and slightly higher Mr, suggesting that they harbor posttranslational modifications compared to spots 39 (also identified as FBA), 37–38 (identified as SOD),

and 36 (identified as FER). These last four proteins are likely the native forms without the oxidized thiol groups of the first set of proteins, as they are detected in the SYPRO Ruby-stained image (blue), but not in the image of the IAF labeled oxidized thiol proteins (red).

If the region covered by the peptides used for protein identification includes Cys residues, the susceptibility of a particular Cys to reversible oxidation can be studied, as shown in Table 3. Thus, *P. clarkii* ferritin harbors a single Cys at position 13, which is oxidized in spot 2 (AF-labeled) and reduced in spot 36 (AM-labeled). This confirms our previous assumption that spot 36 represents the un-oxidized thiol form of ferritin. In contrast, spots 24 and 25 correspond to two AF-labeled forms of nucleoside diphosphate kinase. This protein contains three Cys residues at positions 64, 67 and 108. Curiously, Cys108 was oxidized in spot 24 but reduced in spot, 25, while Cys76 appeared only to be oxidized in spot 25, and Cys64 was in a reduced state in spots 24 and 25.

4. Discussion

4.1. Utility of redox proteomics as pollution biomarker in aquatic DNP ecosystems

After the Aznalcollar spill in 1998 the pollution status of DNP and its surrounding areas was studied by combining conventional biomarkers and omic approaches (Abril et al., 2011; López-Barea and Gómez-Ariza, 2006; Pueyo et al., 2011; Ruiz-Laguna et al., 2006). Three inhabitant organisms were used as bioindicators, the free-living mice *Mus spretus* (Bonilla-Valverde et al., 2004; Ruiz-Laguna et al., 2001), the bivalve *Chamaelea gallina* (Romero-Ruiz et al., 2003, 2006) and the crayfish *P. clarkii* (Vioque-Fernández et al., 2007a, 2007b, 2009).

Freshwater aquatic DNP ecosystems were monitored using the crayfish, *P. clarkii*. Polluted sites, such as MAT and ROC, showed increased

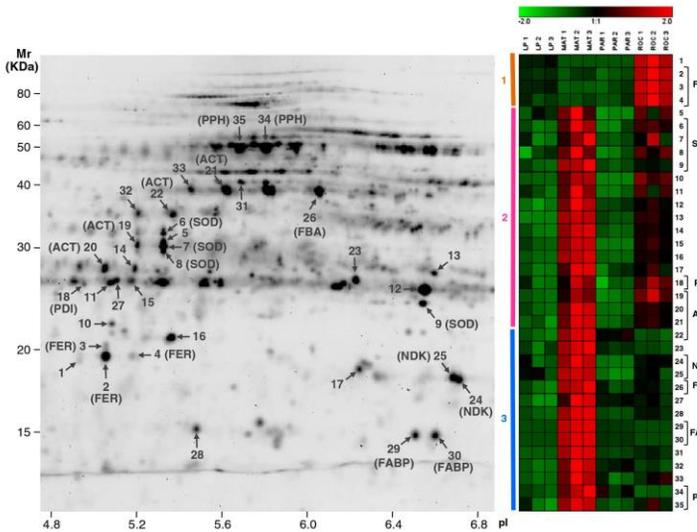


Fig. 4. (Left) 2-DE gel of oxidized thiol proteins of *P. clarkii* from MAT. The arrows mark the 35 differentially expressed oxidized thiol protein spots (>2-fold intensity differences, $p < 0.05$) compared to LP, 19 of which were identified via MALDI-TOF/TOF and are indicated in parentheses. (Right) Cluster analysis. Each row represents one oxidized thiol protein spot, showing the proteins identified on the right. Columns represent the expression profile for one biological replicate at each study site. Green rectangles indicate samples with lower intensity for the particular protein spot relative to other samples, and red rectangles samples where the spot is more intense. The color intensity is proportional to the fold change as represented by the scale.

Table 1
Differentially expressed *Procambarus clarkii* proteins identified by MALDI-TOF/TOF analysis.

Spot no. ^a	Protein symbol	Protein name, organism ^b	UniProt ID ^c	Mr (pI)		Sequence cov. (%)	Peptides matched	Protein score ^d	Expect	Mr (kD)	Fragmented ion	Ion score ^e							
				Theor.	Exp.														
2	FER	Ferritin, <i>Procambarus clarkii</i>	F5AGF3	19.4 (5.2)	19.8 (5.1)	64	12	401	5.7E-36	1341.66	ACTSGLGEFLFDK	136							
											RAGTSLGEFLFDK	49							
											NTMAHLTNMLEEFLHEEQVESIEK	158							
3		Ferritin, <i>Procambarus clarkii</i>	F5AGF3	19.4 (5.2)	20.2 (5.1)	33	7	144	2.8E-10	1341.66	ACTSGLGEFLFDK	89							
											2850.32	NTMAHLTNMLEEFLHEEQVESIEK	35						
											1341.67	ACTSGLGEFLFDK	120						
4		Ferritin, <i>Procambarus clarkii</i>	F5AGF3	19.4 (5.2)	19.9 (5.2)	24	7	268	1.1E-22	1487.77	RAGTSLGEFLFDK	115							
											2850.31	NTMAHLTNMLEEFLHEEQVESIEK	112						
											1183.68	SLLDLHVTASK	30						
36		Ferritin, <i>Procambarus clarkii</i>	F5AGF3	19.4 (5.2)	19.1 (5.2)	81	18	373	4.5E-32	1341.67	ACTSGLGEFLFDK	132							
											1487.77	RAGTSLGEFLFDK	18						
											1591.67	QNYHEKCAANK	45						
6	SOD	Superoxide dismutase, <i>Procambarus clarkii</i>	ASLRV6	31.3 (5.4)	31.0 (5.3)	33	11	260	7.1E-22	1551.83	QINLELYASYVMSMCGYFFDR	28							
											2850.31	NTMAHLTNMLEEFLHEEQVESIEK	24						
											1709.84	AFINVINWSVNER	81						
7		Superoxide dismutase, <i>Procambarus clarkii</i>	ASLRV6	31.3 (5.4)	29.3 (5.3)	27	10	332	4.5E-29	1551.83	QAEANDVGAMNALLPAIK	50							
											1709.84	AFINVINWSVNER	97						
											1709.84	QAEANDVGAMNALLPAIK	101						
8		Superoxide dismutase, <i>Procambarus clarkii</i>	ASLRV6	31.3 (5.4)	28.0 (5.3)	24	6	127	1.4E-08	1709.84	AFINVINWSVNER	108							
											151 (6.2)	22.4 (6.5)	40	6	304	2.8E-26	1809.89	HRHYVNNIAEIK	121
											1951.97	NLSFDGPEPEGLAANR	161						
37		Superoxide dismutase, <i>Procambarus clarkii</i>	ASLRV6	31.3 (5.4)	26.9 (5.5)	31	8	127	1.4E-08	1551.83	LAESGIEVDQHK	95							
											1551.83	LAESGIEVDQHK	100						
											1679.93	KLAESGIEVDQHK	102						
38		Superoxide dismutase, <i>Procambarus clarkii</i>	ASLRV6	31.3 (5.4)	30.4 (5.5)	32	12	378	1.1E-33	1551.83	QAEANDVGAMNALLPAIK	91							
											1709.99	QAEANDVGAMNALLPAIK	43						
											2525.25	YEYSALFPHSALMIEHHRK	43						
18	PDI	Protein disulfide isomerase, <i>Limpenurus vannamei</i>	Q8RY4	55.3 (4.6)	23.2 (5.0)	11	5	86	2.3E-03	2159.11	FVAANSLVYGRHETFAK	74							
19	ACT	Actin (fragment), <i>Triops granulosus</i>	D1MVD9	31.3 (5.3)	29.5 (5.2)	30	5	105	2.3E-06	1790.89	SVELPDGQVITGNR	91							
20		β-Actin (fragment), <i>Limpenurus vannamei</i>	G3EQI6	22.6 (4.8)	24.0 (5.1)	22	4	106	1.8E-06	1790.89	SVELPDGQVITGNR	95							
21		Cytoplasmic actin, <i>Deiphilia pulox</i>	E9H3E3	42.0 (5.6)	37.2 (5.6)	33	12	125	2.3E-08	1790.89	SVELPDGQVITGNR	93							
22		Actin (fragment), <i>Ampelisca stephensi</i>	E9Y5T7	24.0 (5.2)	34.5 (5.4)	15	3	73	4.4E-02	1804.90	SVELPDGQVITGNR	66							
24	NDK	Nucleoside diphosphate kinase, <i>Eriochelone shrenesi</i>	E7CHR6	17.0 (7.7)	18.3 (6.7)	35	6	74	3.0E-03	1330.74	TRAVKPKGVQR	59							
25		Nucleoside diphosphate kinase, <i>Eriochelone shrenesi</i>	E7CHR6	17.0 (7.7)	18.5 (6.7)	35	8	104	2.8E-06	1652.48	GDRLEWIKR	50							
26	FBA	Fructose-bisphosphate aldolase, <i>Tribolium castaneum</i>	D2A6E8	39.7 (7.6)	37.4 (6.1)	18	7	86	2.1E-03	1629.82	LADLGLTEENR	71							
											1336.74	TRAVKPKGVQR	39						
											1629.82	LADLGLTEENR	63						
39		Fructose-bisphosphate aldolase, <i>Tribolium castaneum</i>	D2A6E8	39.7 (7.6)	37.3 (6.1)	15	5	70	0.1	1629.81	LADLGLTEENR	63							
29	FABP	Fatty acid binding protein, <i>Chironomus quadricarinatus</i>	L8G29	15.0 (6.3)	14.5 (6.5)	24	3	68	1.1E-02	1452.66	LQGVKSTPDKR	59							
30		Fatty acid binding protein, <i>Chironomus quadricarinatus</i>	L8G29	15.0 (6.3)	14.5 (6.6)	31	4	88	1.0E-04	1452.66	LQGVKSTPDKR	76							
34	PPH	Phosphopyruvate hydratase, <i>Pemurus monodon</i>	O96656	47.8 (6.2)	52.1 (5.8)	8	4	64	2.7E-02	1230.68	AGAGELGPIYR	58							
35		Phosphopyruvate hydratase, <i>Pemurus monodon</i>	O96656	47.8 (6.2)	52.3 (5.7)	19	7	80	7.6E-04	1230.68	AGAGELGPIYR	63							

^a The numbering of the spots is arbitrary and corresponds to that of Figs. 4 and 5.
^b Protein name, organism and identifier (ID) as UniProt/Swiss-Prot database.
^c MOWSE protein score based on MS data. All identifications were carried out contrasting results with crustacean peptide sequences existing in the UniProt database, except spots 22, 26 and 39 which were contrasted against arthropoda's. Protein scores greater than 61 and 72 were significant ($p < 0.05$) for crustacean and arthropoda databases, respectively.
^d Ion score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.

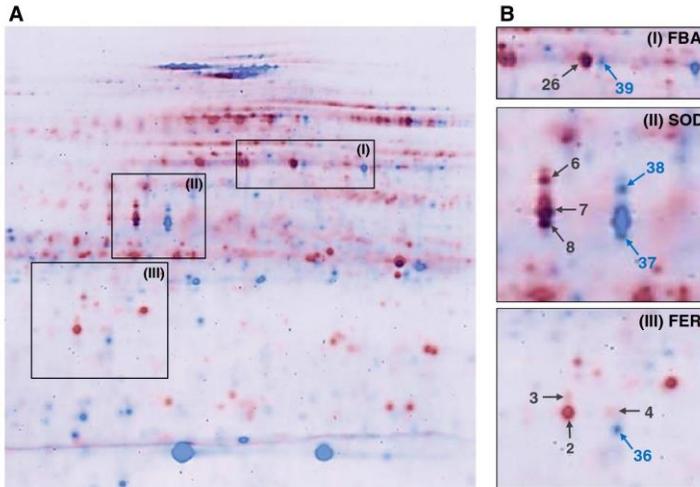


Fig. 5. Overlapping representative 2-DE gel image of IAF labeled oxidized thiol proteins (in red) and total proteins SYPRO Ruby-stained (in blue) of *P. clarkii* from MAT (A). Three enlarged representative regions are shown (B) where the same protein has been identified from different spots: (I) FBA, (II) SOD and (III) FER. Black arrows point IAF-labeled differentially oxidized thiol proteins and blue arrows point non-labeled and, thus, non-oxidized proteins.

levels of twelve biomarkers responsive to metals, prooxidant compounds and pesticides levels of twelve biomarkers responsive to metals, prooxidant compounds and pesticides (Vioque-Fernández et al., 2007a, 2007b, 2009). Two-dimensional electrophoresis resolved over 2500 gill spots, of which 35 showed significant intensity differences between the LP site and the other sites studied (Vioque-Fernández et al., 2009). Four protein expression patterns were established based on the fold-number of up-/down-regulation of these 35 proteins: 1) The highest response was detected at the *Matochal* (MAT) rice-growing areas (Vioque-Fernández et al., 2009), in agreement with the high levels of pesticides and metals detected in this area (Vioque-Fernández et al., 2007b). 2) A high response was found also at the upper *Rocina* (ROC) course, and, 3) an intermediate response at *Partido* (PAR) course (Vioque-Fernández et al., 2009), in agreement with their pesticide and metal levels (Vioque-Fernández et al., 2007b). 4) The *Lucio del Palacio* (LP) control site was essentially free of contaminants (Vioque-Fernández et al., 2009). Suppression subtractive hybridization (SSH) has been carried out in *P. clarkii* digestive glands to monitor the environmental quality of DNP and its surrounding areas.² Forty-three differentially expressed genes have been detected in animals collected in two sites classified as moderately (PAR) and highly polluted (MAT) compared to those from the LP control site. The differential mRNA expression of nine selected genes has been further validated by quantifying their transcript copy number by real-time qRT-PCR. Metal concentrations and sequence polymorphisms of the selected transcripts have been also studied to assist the biological interpretation of the transcriptomic results. This study confirms that MAT is a highly polluted site, PAR a moderately polluted site and LP the pristine control. The presence of metals and prooxidant compounds near DNP prompted us to study the utility

of redox proteomics as biomarker for assessing the environmental quality in aquatic DNP ecosystems.

Several pollutants promote oxidative stress via reactive O and N species (ROS/RNS) (López-Barea, 1995). Proteins absorb ~70% of ROS and are a major target of oxidants, which lead to structural changes including post-translational modifications (PTMs) and chain cleavage. PTMs control many biological processes via different mechanisms, such as changes in the activity, interactions and subcellular localization of proteins (Yamakura and Kawasaki, 2010). Redox-active Cys are major targets of ROS/RNS and electrophiles, which confer protection from oxidative damage and play key roles in redox signaling (Davies, 2005; Thamsen and Jakob, 2011; Ying et al., 2007). Oxidative/nitrosative stress alters protein folding reactions in the endoplasmic reticulum. Increased production of disulfide bonds in proteins promotes a futile cycle of disulfide formation/breakage that depletes GSH-reducing equivalents and generates further stress. Persistent oxidative stress and protein misfolding initiate apoptotic cascades with essential roles in pathological processes (Malhotra and Kaufman, 2007).

The present study confirms that redox proteomics is useful as a new, sensitive biomarker of pollutant-promoted oxidative damage, such as that due to the exposure to transition metals or electrophilic compounds (López-Barea, 1995) detected at different levels in DNP (Vioque-Fernández et al., 2007b). Thus, the total density of proteins with reversibly oxidized thiols (Fig. 3) was much higher in animals from the *Matochal* area and the *Rocina* stream, while no difference was found in crayfish from the *Partido* stream compared to those from the DNP core at *Lucio del Palacio*, in agreement with the conventional biomarkers and 2-DE approaches previously analyzed (Vioque-Fernández et al., 2007a, 2007b, 2009), and with the SSH results and transcriptomic analyses subsequently carried out in this species. The alterations in oxidized thiol levels of the 35 selected spots (Fig. 4, right) also confirm the presence of different pollution levels in the three problem sites. Thus, 31 thiol oxidized protein spots were particularly intense in animals captured at the *Matochal* area, including the fourteen spots (22–35)

² Osuna-Jiménez I, Abril N, Vioque-Fernández A, Gómez-Ariza JL, Prieto-Álamo MJ, Pueyo C. The environmental quality of Doñana surrounding areas affects the transcriptional profile of inhabitant crayfish *Procambarus clarkii*. Submitted to Fish & Shellfish Immunology.

Table 2
AF signal intensity of the identified proteins at the different sites around Doñana National Park.

Spot no. ^a	Protein symbol ^b	Sampling site ^c				Cluster ^f
		LP	MAT	PAR	ROC	
2	FER	7181 ± 517 ^d	5186 ± 1541	4169 ± 1269	24,480 ± 2760	1
		(1) ^e	(0.7)	(0.7)	(3.4) ^{***}	
3		1219 ± 78	574 ± 26	763 ± 285	3714 ± 296	1
		(1)	(0.5) [*]	(0.6) [*]	(3.0) ^{***}	
4		761 ± 177	622 ± 76	650 ± 175	2695 ± 394	1
		(1)	(0.8)	(0.9)	(3.5) ^{***}	
6	SOD	508 ± 92	1368 ± 256	484 ± 139	1030 ± 78	2
		(1)	(2.7) ^{***}	(1.0)	(2.0) ^{**}	
7		966 ± 734	3951 ± 1362	1071 ± 169	2660 ± 1612	2
		(1)	(4.1) [*]	(1.1)	(2.8)	
8		520 ± 311	1616 ± 360	455 ± 144	1244 ± 197	2
		(1)	(3.1) ^{**}	(0.9)	(2.4) [*]	
9		901 ± 190	3171 ± 417	973 ± 116	1424 ± 98	2
		(1)	(3.5) ^{***}	(1.1)	(1.6)	
18	PDI	388 ± 167	1054 ± 308	280 ± 175	1015 ± 186	2
		(1)	(2.7) [*]	(0.7)	(2.6) ^{**}	
19	ACT	472 ± 108	1707 ± 419	336 ± 128	1877 ± 441	2
		(1)	(3.6) ^{**}	(0.7)	(4.0) ^{**}	
20		825 ± 265	3636 ± 719	648 ± 54	2089 ± 211	2
		(1)	(4.4) ^{***}	(0.8)	(2.5) ^{**}	
21		1846 ± 570	6161 ± 982	2034 ± 294	3929 ± 349	2
		(1)	(3.3) ^{***}	(1.1)	(2.1) ^{**}	
22		664 ± 236	3354 ± 400	1665 ± 211	841 ± 135	3
		(1)	(5.1) ^{***}	(2.5) ^{**}	(1.3)	
24	NDK	1045 ± 618	3620 ± 478	510 ± 44	1599 ± 102	3
		(1)	(3.5) ^{***}	(0.5)	(1.5)	
25		1807 ± 440	3827 ± 132	866 ± 160	1729 ± 421	3
		(1)	(2.1) ^{***}	(0.5) [*]	(1.0)	
26	FBA	2808 ± 731	9245 ± 849	3729 ± 729	4437 ± 674	3
		(1)	(3.3) ^{***}	(1.3)	(1.6)	
29	FABP	0 ± 0	2822 ± 208	208 ± 50	0 ± 0	3
		(nd) ^{***}	(nd)	(nd)	(nd)	
30		0 ± 0	3262 ± 305	259 ± 56	0 ± 0	3
		(nd) ^{***}	(nd)	(nd)	(nd)	
34	PPH	1092 ± 156	3285 ± 768	1685 ± 414	984 ± 82	3
		(1)	(3.0) ^{***}	(1.5)	(0.9)	
35		979 ± 849	4703 ± 539	1186 ± 222	2286 ± 768	3
		(1)	(4.8) ^{***}	(1.2)	(2.3)	

^a The numbering of the spots is arbitrary and corresponds to that of Figs. 4 and 5.

^b For protein name, see the legend of Fig. 4.

^c For sampling sites, see the legend of Fig. 1.

^d Arbitrary units of fluorescence. Data are means ± SD (n = 3 replicate).

^e The numbers in parenthesis represent the AF signal intensity fold increase at the sites relative to LP; nd, not possible to calculate because the signal intensity in LP is zero. The statistical significance of the differences is compared with LP, used as reference. Statistical significances: *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

^f Cluster number given by Genesis analysis as shown in Fig. 4 (right).

pertaining to Cluster 3, up-regulated only at MAT, and the seventeen spots (5–21) pertaining to Cluster 2, with very high fluorescence in MAT crayfish, and with high (but lower) fluorescence also at ROC animals. The moderate contamination detected at the Rocina stream (Vioque-Fernández et al., 2007b) was consistent with the detection of

only 4 thiol oxidized protein spots (1–4) pertaining to Cluster 1 that were exclusively up-regulated in crayfish from the Rocina stream.

Noticeably, while some reversibly thiol oxidized proteins identified in the present work had been previously related with the response to environmental pollution, such as superoxide dismutase (López-Barea,

Table 3
Cysteine residues in proteins prone to reversible oxidation detected by MALDI-TOF/TOF analysis.

Protein symbol	Protein name, organism ^a	No. Cys ^b (position)	Spot no. ^c	AF-Cys ^d	AA-Cys ^d	Mr ion	Peptide ^e
FER	Ferritin, <i>Procambarus clarkii</i>	1	2	13		1922.73	QN ^Y HEDC ^C EA ^A INK
		(13)	36		13	1591.67	QN ^Y HEDC ^C EA ^A INK
NDK	Nucleoside diphosphate kinase, <i>Eriocheir sinensis</i>	3	24	108		1383.54	GDFC ^C IEVGR
		(64, 76, 108)			64	1894.91	HYADLADKPFYPGLC ^C K
			25	76		2421.17	YN ^M SSGPVAM ^M C ^C WEGTGVK
					108	1052.48	GDFC ^C IEVGR
			64	1894.91	HYADLADKPFYPGLC ^C K		

^a Protein name, organism as UniProtKB/Swiss-Prot database.

^b Number of cysteine residues present in the protein (position of the Cys residues in the sequence of the protein).

^c The numbering of the spots corresponds to that of Figs. 3 and 4, and Table 1.

^d Cysteine residue modified by IAF (i.e. a residue prone to reversible oxidation) or by IAA (i.e. a reduced status).

^e Modified residues in the peptide are as follows: C^C, Cys modified by IAF; C^A, Cys modified by IAA; M^M, oxidized Met.

1995; Vioque-Fernández et al., 2009) or actin (McDonagh et al., 2005), other proteins had never been related to pollution, including ferritin, protein disulfide isomerase, nucleoside diphosphate kinase, fructose-bisphosphate aldolase, fatty acid binding protein, or phosphopyruvate hydratase (enolase). The biological functions of these proteins will be subsequently reviewed to understand their relationship to the biological effects of environmental pollutants.

4.2. Biological functions of the identified reversibly thiol oxidized proteins

Sophisticated cellular machinery ensures proper disulfide bond formation and prevents the formation of illegitimate disulfides, including protein disulfide isomerase, PDI, a 55 kDa protein with two thioredoxin-like domains. PDI exhibits two activities, functioning as an oxidase to introduce disulfide bonds in proteins and an isomerase to rearrange incorrect disulfides, in addition to serving as a chaperone that inhibits aggregation (Wilkinson and Gilbert, 2004). Cd-exposed crabs show a strong induction of PDI to protect and/or repair target proteins and to decrease Cd toxicity (Silvestre et al., 2006). S-nitrosylation and S-glutathionylation inhibit PDI, leading to protein misfolding, ER stress and cell death (Nakamura and Lipton, 2011; Tew et al., 2011). PDI is highly abundant in the endoplasmic reticulum and is also present in the cytosol, where it is cleaved by apoptotic caspases (Na et al., 2007). In Hepa 1–6 cells subjected to oxidative stress, two spots were identified as PDI1 and PDI3 and were shown to be fragments containing redox-sensitive thiols (Fuentes-Almagro et al., 2012). In the present work, we identified a 23.2 kDa thiol-oxidized fragment of PDI in the cytosolic fraction from MAT and ROC crayfish.

Cells remove ROS via specific defense mechanisms, including the use of superoxide dismutase, SOD, a homodimeric metalloprotein that disproportionates superoxide anions to O₂ and H₂O₂. Three oxidized forms of SOD (spots 6–8) showed higher levels at MAT and ROC. The potential modifications of SOD include nitration, phosphorylation, glutathionylation, cysteininylation and glycation, most of which decrease SOD activity (Yamakura and Kawasaki, 2010). Oxidative SOD damage, including S-glutathionylation and inappropriate disulfide formation, dissociates SOD into low-activity monomers (Wilcox et al., 2009) related to the pathogenesis of neurodegenerative diseases (Nakamura and Lipton, 2011). PDI plays a key role in ameliorating SOD aggregation, and inhibition of PDI via S-nitrosylation may contribute to protein misfolding and neurotoxicity (Nakamura and Lipton, 2011; Walker et al., 2010).

Many lines of evidence support the idea that oxidant-induced cell damage is mainly mediated by the cytoskeleton, where the actin system represents an early and sensitive target (Dalle-Donne et al., 2001; Fuentes-Almagro et al., 2012; Rodríguez-Ortega et al., 2003). Actin, ACT, is a ubiquitous, abundant and essential protein. G-actin monomers (42 kDa) polymerize to form F-actin filaments, whose assembly/disassembly and organization in higher-order networks depends on external/internal stimuli (Papakonstanti and Stournaras, 2008). Actin is prone to redox-mediated modifications, such as oxidation, nitrosylation, nitration, carbonylation, and glutathionylation (Terman and Kashina, 2013). Processing and post-translational ACT modifications regulate important events, directing physiological and pathological processes (Sakai et al., 2012; Terman and Kashina, 2013). Redox modification of critical ACT Cys residues alters the soluble:polymerized ratio of the protein, which may influence cell architecture and membrane function (Sakai et al., 2012; Terman and Kashina, 2013; Tew et al., 2011). Under mild nonlethal oxidative stress, S-thiolation protects against inter-/intramolecular disulfide formation and prevents excessive ACT polymerization and cross-linking, preserving microfilament dynamics (Dalle-Donne et al., 2001). ACT glutathionylation is an early mechanism allowing animals to survive oxidative stress at polluted sites (McDonagh et al., 2005). Low Cd²⁺ concentrations increase ACT glutathionylation, leading to protective effects *in vivo*, whereas cytoskeleton disruption occurs at higher Cd²⁺ concentrations that increase ROS levels but maintain basal

glutathionylation levels (Choong et al., 2013). In the present study, only spot 21 presented an experimental Mr (37.7 kDa) close to that predicted for G-actin (42 kDa), while the other three spots (19, 20 and 22) corresponding to ACT could be lower Mr oxidized-truncated forms (29.5, 24.0 and 34.5 kDa), similar to forms previously identified under oxidative stress (Fuentes-Almagro et al., 2012; Rodríguez-Ortega et al., 2003; Salas-Leiton et al., 2009), which were recognized as Cys-reversible oxidation targets (Fuentes-Almagro et al., 2012).

Fructose-1,6-bisphosphate aldolase, FBA, and phosphopyruvate hydratase, PPH, are glycolytic enzymes. During glycolysis, FBA cleaves fructose 1,6-bisphosphate to dihydroacetone phosphate and glyceraldehyde 3-phosphate, whereas in gluconeogenesis, FBA catalyzes the reverse reaction. PPH interconverts 2-phosphoglycerate to phosphoenolpyruvate, which is the second high-energy intermediary yielding ATP during glycolysis. Oxidative modification of FBA, PPH and other glycolytic enzymes may result in a decreased activity and enhanced proteolytic susceptibility, leading to reduced glycolysis and glucose metabolism and, ultimately, ATP depletion, which has been related to pathological conditions (Offermann et al., 1984; Sultana et al., 2010). Changes in the redox state also regulates the expression of glycolytic enzymes, as the oxidation of the Sp1 transcription factor decreases its DNA-binding efficiency at the promoters of the genes encoding these enzymes (Hamm-Kunzelmann et al., 1997). Inhibition of the glycolytic flux shifts glucose into the pentose phosphate pathway to generate NADPH, which protects against oxidative stress by providing the reducing power for antioxidant enzymes (Shenton and Grant, 2003). In addition to its primary function, FBA plays "moonlighting" roles by binding to other proteins (Ritterson Lew and Tolan, 2013). Aldolase and other glycolytic enzymes interact with actin microfilaments in a redox-dependent manner to form microcompartments of glycolytic metabolites, thus allowing the cytoskeleton to sense and integrate the general metabolic activity in response environmental or physical changes (Norris et al., 2013; Ritterson Lew and Tolan, 2013; Wojtera-Kwiczor et al., 2013).

Iron is required for cell growth and proliferation, but excess Fe is potentially harmful, as it can catalyze the formation of toxic ROS/RNS via Fenton chemistry (Welch et al., 2002). Ferritin, FER, is the major intracellular protein responsible for the sequestration, storage and release of Fe. FER can accumulate up to 4500 Fe atoms and release them upon an increased cellular need for bioavailable Fe (Koorits and Viljoen, 2007; Welch et al., 2002). FER is ubiquitous and is tightly regulated in a complex manner by Fe and the cellular oxidative status (Arosio and Levi, 2002). In contrast to studies suggesting that FER induction protects against oxidative stress, oxidative damage to FER increases the cellular Fe content and exacerbates oxidant injury (Welch et al., 2002; Yoon et al., 2011). A 10-fold increase in malondialdehyde levels was observed at ROC compared to LP (results not shown), in parallel with the increase in oxidized ferritins. In crabs, secreted ferritin is as an evolutionarily conserved molecule involved in the Fe-withholding strategy of the innate immune defense (Kong et al., 2010).

Fatty acid-binding proteins, FABPs, are small (14 kDa), multifunctional, multigenic and ubiquitous cytosolic lipid-binding proteins (Esteves and Ehrlich, 2006; Zimmerman and Veerkamp, 2002) that have been well studied in vertebrates, but less well investigated in invertebrates (Cheng et al., 2013). Although their primary biological function appears to be the intracellular binding and transport of long-chain fatty acids and other hydrophobic ligands, such as prostaglandins, bile acids, eicosanoids and some drugs, other significant roles in cell growth and differentiation, cellular signaling and gene transcription have been proposed (Esteves and Ehrlich, 2006; Zimmerman and Veerkamp, 2002). In the vertebrate immune system, FABPs play a role in fatty acid-regulated inflammation via interaction with peroxisome proliferator activated receptors, and a similar function in the crab innate immune system has recently been reported (Cheng et al., 2013). FABPs are also effective as an endogenous cytoprotectant against oxidative stress (Yamauchi et al., 2011). Thus, FABPs function as antioxidant

proteins by scavenging reactive lipids through the covalent modification of Cys120 (Bennaars-Eiden et al., 2002). Additionally, the presence of Cys pairs in FABPs contributes to protein stability and may also relieve oxidative stress via thiol disulfide interchange (Zimmerman and Veerkamp, 2002). For this reason, FABPs have been proposed as biochemical markers of tissue injury under pathological conditions (Zimmerman and Veerkamp, 2002).

Nucleoside diphosphate kinase, NDK, belongs to a family of highly conserved proteins that show nucleoside diphosphate kinase activity to transfer γ -phosphate from nucleoside triphosphates to the β -phosphate of nucleoside diphosphates. While NDK was originally identified as tumor metastasis suppressor, it is now considered a multifunctional protein regulating major cellular events, such as proliferation, differentiation and development, adhesion, migration, and vesicular trafficking. These proteins also exhibit protein kinase and DNA transcription, repair and cleavage activities (Postel, 2003). NDK-induced modifications are essential in many cell functions and regulatory processes (Lee et al., 2009). Cys109 (108 in *Eriocheir sinensis* NDK) of the peptide ¹⁰⁶GDFCIQVGR¹¹⁴ shows particular importance, as it is oxidized to various oxidation states, including intra- and inter-disulfide crosslinks, glutathionylation, and sulfonic acid formation (Lee et al., 2009). Although Cys109 is not situated at the NDK active site, it is involved in subunit contacts in hexameric structures, and interdisulfide Cys109–Cys109 formation affects the activity and oligomeric structure of NDK (Kim et al., 2013; Lee et al., 2009). Glutathionylation of Cys109 also inactivates NDK by damaging nucleoside binding to the active site, suggesting that Cys109 plays a key role in the response to oxidative stress (Lee et al., 2009). In the present study, in addition to Cys108, which was found to be oxidized in spot 24, we provide the first evidence of reversible oxidation of Cys76 in NDK (spot 25).

5. Conclusions

In environmental studies, proteomics can be a valuable tool in risk assessments with the potential to identify novel biomarkers and provide insight into toxicity mechanisms. In this study, analysis of redox proteomics was used to assess the environmental quality of the aquatic ecosystems of DNP, which are potentially threatened by agrochemicals from nearby areas. The use of more classical ecological parameters, such as differences in *P. clarkii* density between points flagged as impacted, or effects on *P. clarkii* reproduction, is out of the scope of the present work. The DNP managers have followed the densities of *P. clarkii* and many other species, although no data are available about the three problem sites of our study, MAT, PAR and ROC. Nevertheless, they informed³ that after *P. clarkii* introduction at the seventies, its density reached a maximum around 1990, and has decreased since then, reaching now only 10% of its maximum density. This can be due to: a) Intense drought periods have hindered its reproductive cycles. b) Higher visibility rendered *P. clarkii* a favorite prey of birds, significantly diminishing its numbers. c) Finally, pollutants could have effects on *P. clarkii* reproduction.

Cys residues in proteins are particularly sensitive to oxidative insults generated by pollutants. This study provides key information about the mechanisms and biological significance of oxidative damages to proteins. MAT and ROC were the two areas showing the highest levels of protein oxidation. Oxidant-sensitive thiol proteins were detected and identified, revealing metabolic pathways and/or physiological processes affected by pollutant-elicited oxidative stress. Based on the observed changes, several hypotheses can be put forth: 1) Reversible thiol oxidation of some proteins may be an early protective mechanism to allow animal to survive under high oxidative stress in polluted sites. 2) Oxidation of some proteins may play a regulatory role by sensing and integrating the general metabolic activity of the cell in response to environmental changes. These two hypotheses represent normal

homeostatic responses. If these changes can be directly linked to exposure to a particular group of chemicals (such as transition metals), they could be used as markers of exposure, being of great use in biomonitoring programs, since they can be quicker and cheaper than full analytical panels of water samples. A third hypothesis is that some of the observed changes could affect the activity of the proteins and their function. However, until such a detrimental effect is observed, and linked to the exposure, hazard cannot be described. Further studies are needed to understand the exact significance of all of the differential responses observed in this work.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This project received grants CTM2012-38720-C03-02 from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, and BIO1657 from the Agency of Economy, Competitiveness, Science and Employment of the Andalusian Government. MALDI-TOF/TOF analysis was carried out in the UCO-SCAI proteomics facility, a member of Carlos III Networked Proteomics Platform, ProteoRed-ISCIIL.

References

- Abril N, Ruiz-Laguna J, Osuna-Jiménez I, Vioque-Fernández A, Fernández-Cisnal R, Chicano-Gálvez E, et al. Omic approaches in environmental issues. *J Toxicol Environ Health* 2011;74:1001–19.
- Albaiges J, Algaba J, Arambarri P, Cabrer F, Baluja G, Hernández LM, et al. Budget of organic and inorganic pollutants in the Doñana National Park (Spain). *Sci Total Environ* 1987;63:13–28.
- Arosio P, Levi S, Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage. *Free Radic Biol Med* 2002;33:457–63.
- Baty JW, Hampton MB, Winterbourn CC. Detection of oxidant sensitive thiol proteins by fluorescence labeling and two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* 2002;2:1261–6.
- Bennaars-Eiden A, Higgins L, Hertz AV, Kappahn RJ, Ferrington DA, Bernlohr DA. Covalent modification of epithelial fatty acid-binding protein by 4-hydroxynonenal *in vitro* and *in vivo*. Evidence for a role in antioxidant biology. *J Biol Chem* 2002;277:50693–702.
- Bonetto V, Ghezzi P. Thiol-disulfide oxidoreduction of protein cysteines: old methods revisited for proteomics. In: Dalle-Donne I, Scaloni A, Butterfield DA, editors. *Redox proteomics: from protein modifications to cellular dysfunction and diseases*. Hoboken, New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2006. p. 101–22.
- Bonilla-Valverde D, Ruiz-Laguna J, Munoz A, Ballesteros J, Lorenzo F, Gomez-Ariza JL, et al. Evolution of biological effects of Aznalcollar mining spill in the Algerian mouse (*Mus spretus*) using biochemical biomarkers. *Toxicology* 2004;197:123–38.
- Braconi D, Bernardini G, Santucci A. Linking protein oxidation to environmental pollutants: redox proteomic approaches. *J Proteomics* 2011;74:2324–37.
- Butterfield DA, Dalle-Donne I. Redox proteomics. *Antioxid Redox Signal* 2012;17:1487–9.
- Cabiscol E, Ros J. Oxidative damage to proteins: structural modifications and consequences in cell function. In: Dalle-Donne I, Scaloni A, Butterfield DA, editors. *Redox proteomics: from protein modifications to cellular dysfunction and diseases*. Hoboken, New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2006. p. 399–471.
- Charles R, Jayawardhana T, Eaton P. Gel-based methods in redox proteomics. *Biochim Biophys Acta* 2013;1840:830–7.
- Cheng L, Jin XK, Li WW, Li S, Guo XN, Wang J, et al. Fatty acid binding proteins FABP9 and FABP10 participate in antibacterial responses in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *PLoS One* 2013;8:e54053.
- Chiappetta G, Ndiaye S, Igaría A, Kumar C, Vinh J, Toledano MB. Proteome screens for Cys residues oxidation: the redoxome. *Methods Enzymol* 2010;473:199–216.
- Choong C, Liu Y, Xiao W, Templeton DM. Cadmium-induced glutathionylation of actin occurs through a ROS-independent mechanism: implications for cytoskeletal integrity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013;272:423–30.
- Chouchani ET, James AM, Fearnley IM, Lilley KS, Murphy MP. Proteomic approaches to the characterization of protein thiol modification. *Curr Opin Chem Biol* 2011;15:120–8.
- Company R, Torreblanca A, Cajaraville M, Bebianno MJ, Sheehan D. Comparison of thiol subproteome of the vent mussel *Bathymodiolus azoricus* from different Mid-Atlantic Ridge vent sites. *Sci Total Environ* 2012;437:413–21.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Milzani A, Di Simplicio P, Colombo R. The actin cytoskeleton response to oxidants: from small heat shock protein phosphorylation to changes in the redox state of actin itself. *Free Radic Biol Med* 2001;31:1624–32.
- Dalle-Donne I, Scaloni A, Butterfield DA. Redox proteomics: from protein modifications to cellular dysfunction and diseases. Hoboken, New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2006.

³ Bravo Utrera MA, Research Coordination Office, Doñana Biological Station, CSIC, Personal communication.

- Dalle-Donne I, Milzani A, Gagliano N, Colombo R, Giustarini D, Rossi R. Molecular mechanisms and potential clinical significance of S-glutathionylation. *Antioxid Redox Signal* 2008;10:445–73.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo G, Giustarini D, Milzani A. Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans. *Trends Biochem Sci* 2009;34:85–96.
- Davies MJ. The oxidative environment and protein damage. *Biochim Biophys Acta* 2005;1703:93–109.
- Dowling VA, Sheehan D. Proteomics as a route to identification of toxicity targets in environmental toxicology. *Proteomics* 2006;6:5597–604.
- Eaton P. Protein thiol oxidation in health and disease: techniques for measuring disulfides and related modifications in complex protein mixtures. *Free Radic Biol Med* 2006;40:1889–99.
- Esteves A, Ehrlich R. Invertebrate intracellular fatty acid binding proteins. *Comp Biochem Physiol C* 2006;142:262–74.
- Fuentes-Almagro CA, Prieto-Alamo MJ, Pueyo C, Jurado J. Identification of proteins containing redox-sensitive thiols after PRDX1, PRDX3 and GCLC silencing and/or glucose oxidase treatment in Hepa 1–6 cells. *J Proteomics* 2012;77:262–79.
- Gomara B, Gonzalez MJ, Baos R, Hiraldo F, Abad E, Rivera J, et al. Unexpected high PCB and total DDT levels in the breeding population of red kite (*Milvus milvus*) from Doñana National Park, south-western Spain. *Environ Int* 2008;34:73–8.
- Grimalt JO, Ferrer M, Macpherson E. The mine tailing accident in Aznalcollar. *Sci Total Environ* 1999;242:3–11.
- Hamm-Kunzelmann B, Schafer D, Weigert C, Brand K. Redox-regulated expression of glycolytic enzymes in resting and proliferating rat thymocytes. *FEBS Lett* 1997;403:87–90.
- Hampton MB, Baty JW, Winterbourn CC. Use of a proteomic technique to identify oxidant-sensitive thiol proteins in cultured cells. In: Dalle-Donne I, Scalon A, Butterfield DA, editors. *Redox proteomics: from protein modifications to cellular dysfunction and diseases*. Hoboken, New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2006. p. 253–65.
- Hansen RE, Roth D, Wintner JR. Quantifying the global cellular thiol-disulfide status. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:422–7.
- Hwang NR, Yim SH, Kim YM, Jeong J, Song EJ, Lee Y, et al. Oxidative modifications of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase play a key role in its multiple cellular functions. *Biochem J* 2009;423:253–64.
- Janssen-Heininger YM, Mossman BT, Heintz NH, Forman HJ, Kalyanaram B, Finkel T, et al. Redox-based regulation of signal transduction: principles, pitfalls, and promises. *Free Radic Biol Med* 2008;45:1–17.
- Jeong J, Jung Y, Na S, Jeong J, Lee E, Kim MS, et al. Novel oxidative modifications in redox-sensitive cysteine residues. *Mol Cell Proteomics* 2011;10: [M110 000513].
- Jung CH, Thomas JA. S-glutathiolated hepatocyte proteins and insulin disulfides as substrates for reduction by glutaredoxin, thioredoxin, protein disulfide isomerase, and glutathione. *Arch Biochem Biophys* 1996;335:61–72.
- Kim MS, Jeong J, Jeong J, Shin DH, Lee KJ. Structure of Nm23-H1 under oxidative conditions. *Acta Crystallogr* 2013;69:669–80.
- Kong P, Wang L, Zhang H, Zhou Z, Qiu L, Gai Y, et al. Two novel secreted ferritins involved in immune defense of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Fish Shellfish Immunol* 2010;28:604–12.
- Koorts AM, Viljoen M. Ferritin and ferritin isoforms I: structure–function relationships, synthesis, degradation and secretion. *Arch Physiol Biochem* 2007;113:30–54.
- Lee E, Jeong J, Kim SE, Song EJ, Kang SW, Lee KJ. Multiple functions of Nm23-H1 are regulated by oxidoreduction system. *PLoS One* 2009;4:e7949.
- Livingstone DR. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *J Chem Technol Biotechnol* 1993;57:195–211.
- López-Barea J. Biomarkers in ecotoxicology: an overview. In: Degen GH, Seiler JP, Bentley P, editors. *Toxicology in transition*. Berlin: Springer; 1995. p. 57–79.
- López-Barea J, Gómez-Ariza JL. Environmental proteomics and metalloproteomics. *Proteomics* 2006;6(Suppl. 1):S51–S562.
- Malhotra JD, Kaufman RJ. The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Semin Cell Dev Biol* 2007;18:716–31.
- Martin-Diaz ML, Tuberty SR, McKenney Jr CL, Blasco J, Sarasquete C, Delvals TA. The use of bioaccumulation, biomarkers and histopathology diseases in *Procambarus clarkii* to establish bioavailability of Cd and Zn after a mining spill. *Environ Monit Assess* 2006;116:169–84.
- McDonagh B, Tyrher R, Sheehan D. Carbonylation and glutathionylation of proteins in the blue mussel *Mytilus edulis* detected by proteomic analysis and Western blotting: actin as a target for oxidative stress. *Aquat Toxicol* 2005;73:315–26.
- Minard KI, Carroll CA, Weintraub ST, McAlister-Henn L. Changes in disulfide bond content of proteins in a yeast strain lacking major sources of NADPH. *Free Radic Biol Med* 2007;42:106–17.
- Montes Nieto R, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL, López-Barea J. Environmental monitoring of Domingo Rubio stream (Huelva Estuary, SW Spain) by combining conventional biomarkers and proteomic analysis in *Garcinus maenas*. *Environ Pollut* 2010;158:401–8.
- Montes-Nieto R, Fuentes-Almagro CA, Bonilla-Valverde D, Prieto-Alamo MJ, Jurado J, Carrascal M, et al. Proteomics in free-living *Mus spretus* to monitor terrestrial ecosystems. *Proteomics* 2007;7:4376–87.
- Na KS, Park BC, Jang M, Cho S, Lee D, H, Kang S, et al. Protein disulfide isomerase is cleaved by caspase-3 and -7 during apoptosis. *Mol Cells* 2007;24:261–7.
- Nakamura T, Lipton SA. S-nitrosylation of critical protein thiols mediates protein misfolding and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Antioxid Redox Signal* 2011;14:1479–92.
- Norris V, Amar P, Legent G, Ripoll C, Thellier M, Ovadi J. Sensor potency of the moonlighting enzyme-decorated cytoskeleton: the cytoskeleton as a metabolic sensor. *BMC Biochem* 2013;4:3.
- Offermann MK, McKay MJ, Marsh MW, Bond JS. Glutathione disulfide inactivates, destabilizes, and enhances proteolytic susceptibility of fructose-1,6-bisphosphate aldolase. *J Biol Chem* 1984;259:8886–91.
- Papakonstanti EA, Stourmaras C. Cell responses regulated by early reorganization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett* 2008;582:2120–7.
- Perez VI, Pierce A, de Waal EM, Ward WF, Bokov A, Chaudhuri A, et al. Detection and quantification of protein disulfides in biological tissues a fluorescence-based proteomic approach. *Methods Enzymol* 2010;473:161–77.
- Postel EH. Multiple biochemical activities of NM23/NDP kinase in gene regulation. *J Bioenerg Biomembr* 2003;35:31–40.
- Pueyo C, Gómez-Ariza JL, Bello-López MA, Fernández-Torres R, Abril N, Alhama J, et al. New methodologies for assessing the presence and ecological effects of pesticides in Doñana National Park (SW Spain). In: Solytecha M, editor. *Pesticides in the modern world – trends in pesticides analysis*. Rijeka, Croatia: INTECH open; 2011. p. 165–96.
- Ritterson Lew C, Tolan DR. Aldolase sequestrers WASP and affects WASP/Arp2/3-stimulated actin dynamics. *J Cell Biochem* 2013;114:1928–39.
- Roberts RA, Laskin DL, Smith CV, Robertson FM, Allen EM, Doorn JA, et al. Nitrate and oxidative stress in toxicology and disease. *Toxicol Sci* 2009;112:4–16.
- Rodríguez-Ortega MJ, Grosvik BE, Rodríguez-Ariza A, Goksoyr A, Lopez-Barea J. Changes in protein expression profiles in bivalve molluscs (*Chamaelea gallina*) exposed to four model environmental pollutants. *Proteomics* 2003;3:1535–43.
- Romero-Ruiz A, Amezcua O, Rodríguez-Ortega MJ, Muñoz JL, Alhama J, Rodríguez-Ariza A, et al. Oxidative stress biomarkers in bivalves transplanted to the Guadalquivir estuary after Aznalcollar spill. *Environ Toxicol Chem* 2003;22:92–100.
- Romero-Ruiz A, Carrascal M, Alhama J, Gomez-Ariza JL, Abian J, Lopez-Barea J. Utility of proteomics to assess pollutant response of clams from the Doñana bank of Guadalquivir Estuary (SW Spain). *Proteomics* 2006;6(Suppl. 1):S245–55.
- Ruiz-Laguna J, García-Alfonso C, Peinado J, Moreno S, Ieradi LA, Cristaldi M, et al. Biochemical biomarkers of pollution in Algerian mouse (*Mus spretus*) to assess the effects of the Aznalcollar disaster on Doñana Park (Spain). *Biomarkers* 2001;6:146–60.
- Ruiz-Laguna J, Abril N, García-Barrera T, Gomez-Ariza JL, Lopez-Barea J, Pueyo C. Absolute transcript expression signatures of Cyp and Gat genes in *Mus spretus* to detect environmental contamination. *Mondol Sci Technol* 2006;40:3646–52.
- Sakai J, Li J, Subramanian KK, Mondal S, Bajrami B, Hattori H, et al. Reactive oxygen species-induced actin glutathionylation controls actin dynamics in neutrophils. *Immunity* 2012;37:1037–49.
- Salas-Leiton E, Canovas-Conesa B, Zerolo R, Lopez-Barea J, Cañavate JP, Alhama J. Proteomics of juvenile senegal sole (*Solea senegalensis*) affected by gas bubble disease in hyperoxygenated ponds. *Marine Biotechnol* 2009;11:473–87.
- Salas-Leiton E, Abril N, García-Barrera T, Gomez-Ariza JL, Lopez-Barea J, Pueyo C. Absolute transcript expression signatures for the molecular characterization of oxidatively/nitrosatively modified proteins. In: Dalle-Donne I, Scalon A, Butterfield DA, editors. *Redox proteomics: from protein modifications to cellular dysfunction and diseases*. Hoboken, New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2006. p. 59–99.
- Shenton D, Grant CM. Protein S-thiolation targets glycolysis and protein synthesis in response to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 2003;374:513–9.
- Silvestre F, Dierick JF, Dumont Y, Dieu M, Raes M, Devos P. Differential protein expression profiles in anterior gills of *Eriocheir sinensis* during acclimation to cadmium. *Aquat Toxicol* 2006;76:46–58.
- Sturm A, Quackenbush J, Trajarski Z. Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics* 2002;18:207–8.
- Sultana R, Perluigi M, Newman SF, Pierce WM, Cini C, Coccia R, et al. Redox proteomic analysis of carbonylated brain proteins in mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *Antioxid Redox Signal* 2010;12:327–36.
- Tell G. Early molecular events during response to oxidative stress in human cells by differential proteomics. In: Dalle-Donne I, Scalon A, Butterfield DA, editors. *Redox proteomics: from protein modifications to cellular dysfunction and diseases*. Hoboken, New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2006. p. 369–97.
- Terman JR, Kashina A. Post-translational modification and regulation of actin. *Curr Opin Cell Biol* 2013;25:30–8.
- Tew KD, Manevich Y, Grek C, Xiong Y, Uys J, Townsend DM. The role of glutathione S-transferase P in signaling pathways and S-glutathionylation in cancer. *Free Radic Biol Med* 2011;51:299–313.
- Thamsen M, Jakob U. The redoxome: proteomic analysis of cellular redox networks. *Curr Opin Chem Biol* 2011;15:113–9.
- Vioque-Fernández A, de Almeida EA, López-Barea J. Esterases as pesticide biomarkers in crayfish (*Procambarus clarkii*, Crustacea): tissue distribution, sensitivity to model compounds and recovery from inactivation. *Comp Biochem Physiol C* 2007a;145:404–12.
- Vioque-Fernández A, de Almeida EA, Ballesteros J, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL, López-Barea J. Doñana National Park survey using crayfish (*Procambarus clarkii*) as bioindicator: esterase inhibition and pollutant levels. *Toxicol Lett* 2007b;168:260–8.
- Vioque-Fernández A, Alves de Almeida E, López-Barea J. Assessment of Doñana National Park contamination in *Procambarus clarkii*: integration of conventional biomarkers and proteomic approaches. *Sci Total Environ* 2009;407:1784–97.
- Walker AK, Farg MA, Bye CR, McLean CA, Home MK, Aktin JD. Protein disulfide isomerase protects against protein aggregation and is S-nitrosylated in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 2010;133:105–16.
- Weich KD, Davis TZ, Van Eden ME, Aust SD. Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. *Free Radic Biol Med* 2002;32:577–83.
- Wilcox KC, Zhou L, Jordan JK, Huang Y, Yu Y, Redler RL, et al. Modifications of superoxide dismutase (SOD1) in human erythrocytes: a possible role in amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* 2009;284:13940–7.
- Winterbourn B, Gilbert HF. Protein disulfide isomerase. *Biochim Biophys Acta* 2004;1699:35–44.
- Winterbourn CC, Hampton MB. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radic Biol Med* 2008;45:549–61.

- Wojtera-Kwiczor J, Gross F, Leffers HM, Kang M, Schneider M, Scheibe R. Transfer of a redox-signal through the cytosol by redox-dependent microcompartmentment of glycolytic enzymes at mitochondria and actin cytoskeleton. *Front Plant Sci* 2013;3:284.
- Yamakura F, Kawasaki H. Post-translational modifications of superoxide dismutase. *Biochim Biophys Acta* 2010;1804:318–25.
- Yamauchi S, Kiyosawa N, Ando Y, Watanabe K, Niino N, Ito K, et al. Hepatic transcriptome and proteome responses against diethyl maleate-induced glutathione depletion in the rat. *Arch Toxicol* 2011;85:1045–56.
- Ying J, Clavreul N, Sethuraman M, Adachi T, Cohen RA. Thiol oxidation in signaling and response to stress: detection and quantification of physiological and pathophysiological thiol modifications. *Free Radic Biol Med* 2007;43:1099–108.
- Yoon JH, An SH, Kyeong IC, Lee MS, Kwon SC, Kang JH. Oxidative modification of ferritin induced by hydrogen peroxide. *BMB Rep* 2011;44:165–9.
- Zimmerman AW, Veerkamp JH. New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins. *Cell Mol Life Sci* 2002;59:1096–116.