

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL Y
ANTROPOLOGÍA FÍSICA

METALOTIONEÍNAS EN PECES Y GASTERÓPODOS : SU
APLICACIÓN EN LA EVALUACIÓN DE LA
CONTAMINACIÓN

ROCÍO UREÑA ROBLES

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2007

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 15 de Desembre de 2006 davant un tribunal format per:

- D. Juan Javier Díaz Mayans
- D^a. María João Bebianno
- D. Julián Blasco Moreno
- D. Manuel Soto López
- D^a. María Dolores Garcerá Zamorano

Va ser dirigida per:

D^a. Amparo Torreblanca Tamarit

D. José Juan del Ramo Romero

©Copyright: Servei de Publicacions
Rocío Ureña Robles

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-6761-2

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115



VNIVERSITATĀ VALÈNCIA

Facultat de Ciències Biològiques

Departament de Biologia Funcional i Antropologia Física

Metalotioneínas en peces y gasterópodos:
su aplicación en la evaluación de la
contaminación

Rocío Ureña Robles
Burjassot, Valencia
2006

Tesis presentada por *Rocío Ureña Robles* para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas por la Universitat de València.

Fdo. Rocío Ureña Robles

Tesis dirigida por:

Amparo Torreblanca Tamarit, Doctora en Ciencias Biológicas y Profesora Titular de Fisiología de la Universitat de València.

Jose Juan del Ramo Romero, Doctor en Ciencias Biológicas y Profesor Titular de Fisiología de la Universitat de València.

Fdo. Amparo Torreblanca Tamarit

Fdo. Jose Juan del Ramo Romero

La investigación presentada en esta Tesis se realizó en la Unidad de Fisiología Animal del Departament de Biologia Funcional i Antropologia Física de la Facultat de Ciències Biològiques de la Universitat de València, y se ha realizado durante el disfrute de una Beca del Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación y Ciencia (Ref: AP2001-0373).

A mi madre

III

“En el punto donde se detiene la ciencia, empieza la imaginación”
Heyendhal

Agradecimientos.

En primer lugar, agradecer a Amparo y Jose que la realización de este trabajo haya sido posible, por confiar en mí y ayudarme en todo lo posible.

A Agustín Pastor por su inestimable ayuda en el análisis de las muestras de metal. A Libia Sanz del Laboratorio de Proteínas de Biomedicina y a sus compañeros, por enseñarme y responder a todas mis preguntas acerca de la electroforesis y los geles. A Luz Valero y Pino del Servicio de Proteómica del Centro de Investigaciones Príncipe Felipe, por su colaboración en la espectrometría de masas y su paciencia conmigo.

A Maria Bebianno por acogerme en su laboratorio, enseñarme el método polarográfico y atenderme siempre que lo necesitaba.

A los miembros del departamento por echarme una mano cuando la he pedido, y en especial, a mis compañeras de laboratorio, a Ame y Ana, por resolver todas mis dudas y estar dispuestas a escucharme, a Gloria por todas las horas que ha echado conmigo en el laboratorio y a Neus por ser mi compañera y mi amiga.

A todas mis amigas por estar siempre ahí y animarme cuando me quedaba sin fuerzas. Y a Rosa porque siempre tiene las palabras que necesito oír.

A mi madre y mis hermanos, que a pesar de no entender mucho este camino, siempre me han animado a seguirlo.

A Jero, que me ha apoyado en esto, porque era importante para m

ÍNDICE

VI

ÍNDICE.

ORGANIZACIÓN DE LA TESIS	1
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	5
1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS METALOTIONEÍNAS.	9
1.1.1. Metalotioneínas en peces.	13
1.1.2. Metalotioneínas en gasterópodos.....	15
1.2. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE METALOTIONEÍNA	16
1.2.1. Saturación con plata.	19
1.2.2. Polarografía de pulso diferencial (PPD).	21
1.2.3. Ejercicio de intercalibración (BEQUALM).....	24
1.3. METALES EN EL MEDIO ACUÁTICO.	25
1.3.1. Cadmio.	28
1.3.2. Plomo.	29
1.4. BIBLIOGRAFÍA	30
2. IMPACTO DE LA CONTAMINACIÓN POR METALES SOBRE CARPAS Y BARBOS EN DIFERENTES PUNTOS DEL RÍO EBRO.	39
2.1. INTRODUCCIÓN.....	41
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.	43
2.2.1. Obtención de las muestras.	43
2.2.2. Cuantificación de metalotioneína por saturación con plata.....	45
2.2.3. Determinación de metales.....	47
2.2.4. Análisis estadístico.....	48
2.3. RESULTADOS.	49
2.4. DISCUSIÓN.....	57
2.5. BIBLIOGRAFÍA.....	62

3. ESTUDIOS EN ANGILOSA EUROPEA *Anguilla anguilla*. 65

3.1. INTRODUCCIÓN.....	67
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.	71
3.2.1. Diferencias en el contenido en metales y en metalotioneína entre anguilas salvajes y cultivadas.	71
3.2.1.1. Obtención de las muestras.	71
3.2.1.2. Determinación de metalotioneína por polarografía (PPD).....	71
3.2.1.3. Determinación de metales.	73
3.2.1.4. Análisis estadístico.	74
3.2.2. Efectos de la exposición a plomo en anguila.	74
3.2.2.1. Obtención de las muestras y exposición a plomo.	74
3.2.2.2. Determinación de metalotioneína y de metales.	75
3.2.2.3. Cromatografía de exclusión molecular.	76
3.2.2.4. Análisis estadístico.	77
3.3. RESULTADOS	78
3.3.1. Diferencias en el contenido en metales y en metalotioneína entre anguilas salvajes y cultivadas.	78
3.3.2. Efectos de la exposición a plomo en anguila.	88
3.4. DISCUSIÓN.	98
3.5. BIBLIOGRAFÍA.	108

4. ESTUDIOS EN EL GASTERÓPODO *Melanopsis dufouri*. 113

4.1. INTRODUCCIÓN.	115
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS.	120
4.2.1. Respuesta de <i>Melanopsis dufouri</i> frente a la exposición a cadmio.	120
4.2.1.1. Muestreo, transporte y aclimatación.....	120
4.2.1.2. Exposición a cadmio.....	121
4.2.1.3. Estudios preliminares.	123
4.2.1.4. Aspectos metodológicos en la determinación de metalotioneína en <i>M. dufouri</i>	124
4.2.1.5. Evaluación de la exposición crónica a cadmio en la salud del individuo, acumulación de metal y contenido en metalotioneína.	127
4.2.1.6. Determinación de metalotioneína por polarografía (PPD).....	128
4.2.1.7. Determinación de metales.	129

4.2.1.8. Análisis estadístico.	130
4.2. Purificación parcial de metalotioneína.	131
4.2.2.1. Cromatografía de intercambio iónico.	131
4.2.2.2. Electroforesis.	132
4.2.2.3. Determinación del peso molecular.	134
4.2.2.4. Identificación de proteínas.	134
4.3. RESULTADOS.	138
4.3.1. Respuesta de <i>Melanopsis dufouri</i> frente a la exposición a cadmio.	138
4.3.1.1. Acumulación de cadmio y respuesta polarográfica en los estudios preliminares de <i>M. dufouri</i>	138
4.3.1.2. Aspectos metodológicos en la determinación de metalotioneína en <i>M. dufouri</i>	147
4.3.1.3. Efecto de la exposición a cadmio en el índice de condición, acumulación de metal y contenido de metalotioneína.	152
4.3.2. Purificación parcial de metalotioneína.	160
4.4. DISCUSIÓN.	169
4.5. BIBLIOGRAFÍA.	184
5. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES.	189
5.1. DISCUSIÓN GENERAL.	191
5.2. CONCLUSIONES.	193
ANEXO 1: Resultados del ejercicio de intercalibración para la determinación de metalotioneína.	195
1. INTRODUCCIÓN.	197
2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.	197
3. RESULTADOS.	198

Abreviaturas

ALA: Ácido δ -aminolevulínico
ALAD: Ácido δ -aminolevulínico deshidratasa
BCF: Factor de bioconcentración
BEQUALM: Biological effects quality assurance in monitoring programmes
CHE: Confederación hidrográfica del Ebro
CID: Centro de Investigaciones y Desarrollo
DTT: Ditiotreitól
EAA: Espectrofotometría de absorción atómica
ESI: Ionización mediante electrospray
HSI: Índice hepatosomático
Hb: Hemoglobina
IC: Índice de condición
ICP-MS: Espectrómetro de masas con fuente de plasma acoplado
IT: Trampa iónica
MALDI: Ionización desorción con láser asistida con matriz
MRE: Elementos de respuesta al metal
MS/MS: Espectrometría de masas en tándem
MS222: Metansulfonato de tricaina
MT: Metalotioneína
MTs: Metalotioneínas
PGB: Porfobilinógeno
PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PPD: Polarografía de pulso diferencial
Q: Cuadrupolo
RCSP: Red de control de sustancias peligrosas
ROS: Especies reactivas de oxígeno
RPT: Respuesta polarográfica total
SMDE: Electrodo de gotas de mercurio estacionario
TCEP: Tris (2-carboxietil) fosfito
TOF: Tiempo de vuelo
TTM: Tetratiomolibdato

ORGANIZACIÓN DE LA TESIS

ORGANIZACIÓN DE LA TESIS

Todos los estudios que se describen en la presente memoria se han realizado durante el disfrute de una beca predoctoral de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación y Ciencia. Dicha beca se solicitó con el fin de realizar parte del proyecto de Investigación: "Utilización de biomarcadores en macroinvertebrados para la evaluación de la contaminación de aguas epicontinentales: estudio de su aplicación en ríos de la Comunidad Valenciana", DGICYT AMB1999-0706 (2000-2002). Dado que dicho proyecto finalizó transcurrido un año de la beca, hay una parte importante de estudios que constituyen la presente Tesis Doctoral que ha sido financiada gracias a distintos tipos de ayudas de investigación que se detallan a continuación:

- Programa de Intercalibración y control de calidad para la determinación de metalotioneína en hígado de peces dentro del proyecto BEQUALM (Biological Effects quality assurance in monitoring programs). Secretaria de Estado de Universidades, Investigación y Desarrollo (Plan Nacional I + D. Acciones Especiales), AMB1999-1402-E.
- Aplicación de biomarcadores en macroinvertebrados para la evaluación de la contaminación en ríos de la Comunidad Valenciana". Prog. de Proyectos de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico de la Generalitat Valenciana. GV99-137-1-16.
- Desarrollo de actividades cooperativas I + D: Expresión de interés en el VI Programa Marco de la Comunidad Europea. Biological Effects of Environmental Pollution in Aquatic Ecosystems BEEP-Web". Oficina de Ciencia y Tecnología de la Generalitat Valenciana (2002).

- 0Estudios sobre biomarcadores de contaminación en anguilas de la Albufera de Valencia en relación con la exposición a metales pesados". REN2002-12540-E MAR (2004-2005).

Esta Tesis se organiza en cinco capítulos. En el primer capítulo de la Tesis se ofrece una introducción general del tema. Se considera el comportamiento de los metales en el medio acuático. Se describen las características de la metalotioneína (MT), proteína objeto de estudio, así como la utilización de los niveles de expresión de esta proteína en animales acuáticos como biomarcador de exposición a ciertos metales. También se comentan los métodos de determinación de MT más ampliamente utilizados para la cuantificación de esta proteína. El segundo capítulo se corresponde con una parte de un estudio más amplio que tuvo como objeto el seguimiento de los niveles de distintas sustancias químicas contaminantes en hígado de carpas *Cyprinus carpio* y barbos *Barbus graellsii*, capturados en distintos puntos del río Ebro y la evaluación de respuestas bioquímicas que presentaban los peces ante dichas sustancias. Entre las distintas respuestas bioquímicas se determinó la concentración de metalotioneína por ser ésta considerada una respuesta específica a la contaminación por metales. En el tercer capítulo se recogen dos estudios sobre el contenido de metalotioneína y de metales en los tejidos de la anguila europea (*Anguilla anguilla*) en diferentes condiciones ambientales. En el primero se abordó las diferencias existentes entre anguilas salvajes y cultivadas y en el segundo la respuesta de anguilas cultivadas frente a una exposición subletal a plomo. El cuarto capítulo de la memoria se ocupa de la evaluación de la respuesta en términos de niveles de metalotioneína del gasterópodo *Melanopsis dufouri* frente a una exposición subletal a cadmio. Con este objetivo fue necesario abordar la problemática de la determinación de MT en los gasterópodos prosobranquios, así como la purificación y caracterización parcial de la MT en esta especie. Y por último, el quinto capítulo recoge una discusión general y las conclusiones.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL.

Los vertidos industriales y urbanos constituyen un aporte importante de los metales que llegan a los ríos y mares. La presencia de metales en el medio acuático es preocupante, ya que estas sustancias producen efectos adversos sobre los seres vivos (Martin y Richardson, 1991). Además de la elevada toxicidad de algunos metales para la fauna acuática, su persistencia y su grado de acumulación a lo largo de la cadena trófica pueden llegar a afectar a la salud humana (Hernández-Hernández et al., 1990).

Con la finalidad de detectar los efectos adversos de las sustancias contaminantes sobre los organismos antes de que éstos tengan repercusión sobre las poblaciones y los ecosistemas, se han realizado y se siguen llevando a cabo muchos estudios para el desarrollo, validación y aplicación de los denominados biomarcadores de contaminación ambiental, existiendo varias revisiones sobre el tema (Cajaraville et al., 2000; Van der Oost et al., 2003; Forbes et al., 2006). Los biomarcadores son respuestas biológicas a sustancias contaminantes ambientales que se manifiestan a nivel molecular, bioquímico, celular o fisiológico y proporcionan una medida de la exposición al contaminante o de la magnitud del efecto que éste causa sobre el organismo. La metalotioneína (MT) es considerada un biomarcador específico de contaminación por metales. Por esta razón en muchos estudios de monitorización ambiental se ha incluido la determinación de los niveles de esta proteína en los tejidos de los animales (Cosson, 2000; Langston et al., 2002). Sin embargo, la adecuada aplicación de los niveles de esta proteína como biomarcador y la correcta interpretación de los resultados requiere tener en cuenta aspectos relacionados con la determinación cuantitativa de la proteína, así como aspectos más biológicos, que incluirían la efectividad y potencia de los metales presentes en el medio para inducir la síntesis de MT en los distintos tejidos de los animales, y los factores

bióticos y abióticos que pueden influir sobre los niveles de metales y MT presentes en los tejidos.

Esta Tesis Doctoral tiene como objetivo abordar distintos aspectos relacionados con la viabilidad de la utilización de la MT como biomarcador en el seguimiento de los efectos de la contaminación por metales en aguas epicontinentales. Para ello hemos tenido la oportunidad de realizar estudios en los que se ha aplicado diferentes métodos de determinación de esta proteína y se han cuantificado los niveles de metales en tejidos de cuatro especies animales en distintas situaciones:

- Estudios de campo en diferentes tramos del curso medio-bajo de la cuenca del Ebro utilizando carpas y barbos como animales indicadores. Esta zona presenta una problemática ambiental importante, ya que recibe el impacto de vertidos tanto urbanos como industriales en diferentes puntos, entre los que destacan los realizados durante décadas por parte de industrias químicas.
- Estudios de campo y estudios bajo condiciones experimentales controladas en anguila, una de las especies más representativas del lago de la Albufera, cuya población está en declive. Es una zona sometida en la actualidad a diversos impactos ambientales que entre otros efectos, alteran de la calidad del agua.
- Estudios experimentales bajo condiciones de laboratorio en el gasterópodo *Melanopsis dufouri*, especie ampliamente distribuida en los ríos de la Comunidad Valenciana.

1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS METALOTIONEÍNAS.

Las metalotioneínas (MTs) son proteínas no enzimáticas, de cadena única, de bajo peso molecular, con un contenido alto en metal y azufre. Fueron descritas por primera vez en el año 1957, al identificar una proteína que unía cadmio en riñón de caballo (Kägi y Vallee, 1960). Posteriormente fue aislada en los principales grupos de invertebrados, incluyendo nematodos, anélidos, artrópodos, equinodermos y moluscos (Roesijadi y Fowler, 1991; Dallinger et al., 1993; Berger et al., 1995). Actualmente, el término "metalotioneína" se usa para designar una serie de moléculas bien conocidas que muestran muchas similitudes estructurales y funcionales con la MT de riñón de caballo anteriormente mencionada (Kojima et al., 1999). Son proteínas que están ampliamente distribuidas, presentes en procariotas, protistas, hongos, plantas y animales (Kägi y Kojima, 1987).

Los estudios sobre su estructura, función y regulación molecular llevaron a pensar en un papel central de estas moléculas en la regulación y detoxificación de metales esenciales, así como en la detoxificación de los metales no esenciales. El interés de los metales como contaminantes ambientales y la necesidad de entender los mecanismos asociados con la toxicidad de éstos han sido los principales estímulos en la investigación de la estructura y función de las MTs. Sin embargo, aún quedan muchos aspectos por dilucidar acerca del papel de estas proteínas (Klaassen et al., 1999).

Las MTs tienen una serie de propiedades que las distinguen fácilmente del resto de proteínas (Kägi y Schäffer, 1988). Se presentan, principalmente, en el citoplasma celular, pero también se han detectado en el núcleo y en los lisosomas (Riordan y Richards, 1980). Aunque están presentes en un gran número de tejidos diferentes, se encuentran predominantemente en el hígado y riñón de vertebrados, y en la glándula digestiva e intestino de invertebrados (Roesijadi, 1992).

En cuanto a su estructura y propiedades moleculares, las MTs se caracterizan por presentar un bajo peso molecular (6-10 kD) y una secuencia de 61 o 62 aminoácidos, con una elevada proporción de cisteína, que representa entre un 20 y 30 % de los residuos de aminoácidos totales (un total de 20 cisteínas). Carecen de aminoácidos aromáticos y, en el caso de presentarlos, su número es bajo. Son termoestables y solubles en agua. La proteína es capaz de unir estrecha y específicamente cationes como Cu^{+1} , Cd^{+2} y Zn^{+2} mediante los átomos de azufre de los residuos de cisteína. Cada uno de estos metales puede así formar complejos tiolato-metal (mediante un enlace mercáptido), los cuales tienen un espectro de absorción típico en el rango de luz UV (Cu: 270 nm, Cd: 254 nm, Zn: 220 nm). Su fuerte capacidad de unión al metal presenta diferente afinidad, según el metal considerado: $\text{Hg} > \text{Cu} > \text{Cd} > \text{Zn}$ (de 6 a 12 átomo-gramo por mol).

A pesar de las diferencias específicas de especie, todas las MTs comparten algunas características importantes. Presentan un elevado grado de similitud en su secuencia de aminoácidos y una posición muy conservada de los residuos de cisteína, con una alta repetición de las secuencias cys-x-cys, cys-cys y cys-x-y-cys donde x e y son aminoácidos distintos a la cisteína.

Como se puede ver en la figura 1.1, las MTs de mamíferos están organizadas espacialmente en dos agrupaciones o clusters, el dominio α (cluster de 4 átomos de metal) y el dominio β (cluster de 3 átomos de metal). Sin embargo, en algunos invertebrados, se ha descrito la existencia de dos clusters con 3 átomos de metal cada uno que serían equivalentes a dos dominios β de los anteriormente citados.

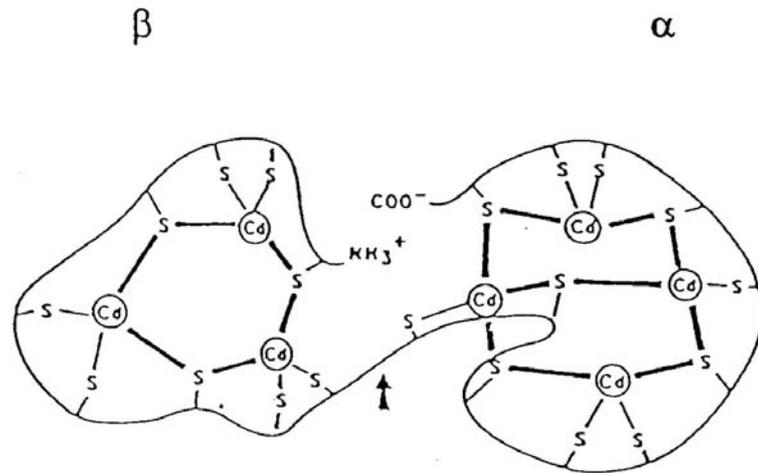


Figura 1.1. Estructura de la metalotioneína dividida en dos dominios, propuesta por Winge y Miklossy (1982).

La clasificación tradicional de las MTs se basa esencialmente en sus características estructurales. De esta forma, la **Clase I** incluye todas las formas de MT de vertebrados y también de otros fila, con estructura primaria muy similar a la MT de caballo (Kägi y Kojima, 1987). En la **Clase II** se encuentran los polipéptidos que tienen poca homología con las secuencias de aminoácidos de las MTs de mamíferos. Finalmente, la **Clase III** se define como atípica, está constituida por una familia de péptidos de cadena corta, con capacidad para unir iones metálicos formando complejos estables intracelulares. Son polipéptidos constituidos por unidades $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{X}^3$, donde n varía entre once y doce veces, dependiendo del organismo y X es frecuentemente glicina o β -alanina. Estos compuestos, cadistinas y fitoquelatinas, fueron aislados en las vacuolas de células de levaduras y de células de plantas superiores, respectivamente (Murasugi et al., 1981; Robinson et al., 1993).

La presencia en algunas especies de varias isoformas de MT, con pequeñas diferencias en su estructura primaria, aunque suficientes para diferenciarlas en términos de carga total de proteína, son una indicación de polimorfismo genético (Kägi y Kojima, 1987). La nomenclatura adoptada para las isoformas de MT (isoMT) está basada en las recomendaciones de la IUPAC-IUB (Nomenclature of Multiple Forms of Enzymes), siendo numeradas de acuerdo con la secuencia de elución de las resinas de intercambio iónico (MT-1, MT-2, MT-3, etc.), las subisoformas son representadas por letras (MT-1a, MT-1b, etc.).

La síntesis de MT puede ser inducida por una gran variedad de estímulos, entre los que se incluyen ciertos metales, hormonas, toxinas y el estrés (Klaassen et al., 1999), siendo los metales los inductores más potentes (tabla 1.1).

La inducción de la síntesis de MT requiere la participación de unas secuencias específicas de ADN, denominadas MRE (elementos de respuesta al metal), y se cree que son los sitios de unión de unos factores de transcripción encargados de la regulación de los metales. Los MREs están presentes en múltiples copias, en la región promotora de los genes (Hammer, 1986). La síntesis se inicia con la unión de los metales a inhibidores de los factores de transcripción, de forma que, tras la unión, dichos factores de transcripción quedan libres para unirse al promotor del gen y producir la síntesis de MT que se unirán al exceso de metal (Palmiter, 1994). La expresión de las MTs puede verse alterada por cambios en la estructura del gen, como amplificación y metilación, y por la diferenciación y desarrollo celular. En contraste con las bien conocidas propiedades estructurales de esta proteína, su función es todavía materia de discusión. Abundan los estudios que demuestran su implicación en la detoxificación de metales (Roesijadi, 1992; Klaassen et al., 1999), en la protección de la célula frente al estrés oxidativo (Chubatsu y Meneghini, 1993; Dalton et al.,

1996; Viarengo et al., 1999) y en el suministro de metales esenciales a las células (control homeostático de la absorción y del metabolismo de cobre y zinc) (Cousins, 1985; Engel y Brouwer, 1987).

Tabla 1.1. Factores que inducen la síntesis de las metalotioneínas.

Factores	Ejemplos
Iones metálicos	Cd, Zn, Mg, Cu, Hg, Pb, Cr, Bi, Ni, Ag, Co.
Factores de estrés	Temperaturas elevadas; exposición a radiación X y UV; elevada presión parcial de O ₂ ; falta de alimento; infección; estrés físico; hipotermia; alteración de la salinidad.
Hormonas y mensajeros secundarios	Glucocorticoides; progesterona; estrógeno; insulina; glucagón; adenosina; AMPc; diacilglicerol.
Agentes inflamatorios	Lipopolisacáridos; dextrano; endotoxina.
Agentes citotóxicos	Etanol; butirato; agentes alquilantes; ácidos grasos; cloroformo; di(2-etilexil)ftalato; tetracloruro de carbono; formaldehído; etionina; uretano; D-penicilamina; estradiol

1.1.1. Metalotioneínas en peces

Son muy numerosos los estudios realizados sobre distintos aspectos de las MTs de peces. En muchos de los experimentos realizados, tras inyectar intraperitonealmente metales a los peces, se encontraban elevadas concentraciones de MT en distintos órganos (Ariyoshi et al., 1990; George et al., 1996; Castaño et al., 1998). Además, se ha demostrado que los niveles de MT se incrementan en función de la dosis de metal recibida (George y Young, 1986; George, 1989; Hogstrand y Haux, 1991; George et al., 1992;

Castaño et al., 1998) o en función del tiempo transcurrido tras la administración (Beyer et al., 1997). Experimentos consistentes en la exposición de peces a metales en el agua también encontraron inducción de MT (Roch y McCarter, 1984; Hogstrand y Haux, 1991; Cosson, 1994).

Todos estos hallazgos llevaron a considerar la MT como un biomarcador de exposición a metales (Roesijadi, 1992; Livingstone, 1993). Sin embargo, la inducción de MT en peces, originada por una exposición ambiental a metales, es más difícil de evaluar en situaciones de campo, en las que las condiciones ambientales y fisiológicas de los peces no están tan controladas. Es necesario considerar la influencia de los factores endógenos y exógenos sobre la inducción de MT (Overnell et al., 1987; Kägi y Kojima, 1987). La eficacia de los metales para inducir MT es dependiente de la especie, el tejido y las condiciones experimentales (De Smet et al., 2001; Hollis et al., 2001; De Boeck et al., 2003; Chowdhury et al., 2005). Además, como ya se ha comentado en la sección anterior, la MT puede ser inducida por sustancias distintas a los metales (Hyllner et al., 1989; Olsson et al., 1990; George et al., 1992; Kling et al., 1996).

Los estudios estructurales realizados sobre la MT de peces muestran diferencias con respecto a las MTs de mamífero en cuanto a la estructura primaria, flexibilidad e hidrofobicidad (Scudiero et al., 2005). También se han encontrado diferencias en la reactividad y capacidad de intercambio de metales entre MT de peces y de mamíferos (D'Auria et al., 2001; Capasso et al., 2003).

Se han caracterizado las regiones promotoras de genes de MT de varias especies de peces. La característica común en todos estos genes es la presencia de MRE localizados en la parte distal y proximal, participando ambos en la inducción por metal (Zafarullah et al., 1988; Murphy et al., 1990; Kille et al., 1993; Olsson et al., 1995; Chan et al., 2004; Cheung et al., 2005).

Con respecto a las especies de peces teleósteos considerados en la presente Tesis hay que hacer notar que, en ciprínidos, las MTs y el metabolismo de metales han sido muy estudiados (Kuroshima, 1992; Raldúa y Pedrocchi, 1996; Sun y Jeng, 1998; De Boeck et al., 2003) lo que contrasta con los escasos trabajos realizados en anguilas, orden Ápoda (tablas 3.3 y 3.4).

1.1.2. Metalotioneínas en gasterópodos.

De las numerosas especies de invertebrados acuáticos en las que se han identificado las MTs, la mayoría son moluscos o crustáceos. Dentro del phylum de los moluscos, las MTs se han identificado mayoritariamente en bivalvos y gasterópodos. Existen revisiones sobre el metabolismo de metales en moluscos (Langston et al., 1998) y sobre las MTs de invertebrados acuáticos (Amiard et al., 2006) que abordan este tema. Las primeras MTs descritas en invertebrados fueron las purificadas en la ostra (*Crassostrea virginica*) y el mejillón (*Mytilus edulis*) (Casterline y Yip, 1975; Noel-Lambot, 1976). Actualmente se conoce la secuencia aminoacídica parcial o total de las MTs de varios moluscos (Park et al., 2002; English y Storey, 2003; Ryu et al., 2003; Dallinger et al., 2004a, 2004b) y se puede acceder a ellas a través de bases de datos "on line". Su similitud con la MT de mamíferos ha llevado a clasificarlas como MT de clase I. Se han identificado varias isoformas de MT en algunas especies de moluscos, destacando las 9 isoformas de MT inducida por Cd en *Mytilus edulis*. En gasterópodos se han aislado y caracterizado 2 isoformas de MT específicas de metal, una de ellas que une preferentemente cadmio y otra que une específicamente Cu (Dallinger et al., 1997; Park et al., 2002; Ryu et al., 2003).

En los gasterópodos el grado de expresión de MT varía considerablemente en función de la especie y del tejido. Aunque en algunos

estudios se ha encontrado inducción de MT por exposición a metales, en la literatura existen muchas contradicciones e inconsistencias (tabla 4.5).

La estructura y función de las MTs de los gasterópodos ha recibido menos atención que la de los bivalvos. Los estudios realizados hasta el momento en gasterópodos muestran que las características de peso molecular, absorbancia, propiedades de unión al metal y contenido en aminoácidos son similares a las MTs de otros moluscos. El metabolismo de los metales ha sido particularmente bien estudiado en el caracol marino *Littorina littorea* (Mason y Nott, 1981; Mason et al., 1984; Langston y Zhou, 1986, 1987; Bebianno et al., 1992; Gully y Mason, 1993; Bebianno y Langston, 1995) y en el gasterópodo terrestre *Helix pomatia*. Dallinger et al. (1997) aportan evidencias de la existencia de distintas isoformas de MT en gasterópodos terrestres, una parece dedicada a la detoxificación de Cd y la otra a la regulación de Cu. Cabe destacar los pocos estudios realizados al respecto en gasterópodos de agua dulce (Flessas et al., 2000; Wepener et al., 2005).

1.2. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE METALOTIONEÍNA.

La identificación, cuantificación y caracterización estructural de la MT constituye una importante contribución para clarificar los papeles específicos que juegan estas metaloproteínas en el organismo. Actualmente, los estudios de MT están enfocados a una tarea más específica, la identificación y cuantificación de las diferentes isoformas que coexisten en una muestra, sus estructuras, sus respuestas y posibles papeles en relación a factores externos, como es la presencia de metales.

El nuevo desafío es el constante perfeccionamiento de la metodología, y la aplicación de métodos fiables dedicados a la investigación de los aspectos de la MT y las isoformas de la misma. Las propiedades individuales de los

dominios α y β de la MT también son de interés. Se han desarrollado diferentes técnicas y metodologías para la cuantificación de MT: técnicas electroanalíticas, espectrofotometría UV-VIS (Viarengo et al., 1997), ensayos de saturación por metal o métodos inmunológicos como ELISA o RIA. Esta metodología basa la detección total de MT en las diferentes propiedades de la molécula. A continuación se presenta una visión general de los distintos métodos utilizados para la determinación de MT, basándonos en la revisión de Dabrio et al. (2002).

Los **métodos indirectos** se basan en la determinación de metales unidos a las proteínas y estiman indirectamente la concentración de MT, asumiendo una saturación total de la molécula con los metales. Los metales utilizados para la saturación pueden ser cadmio, mercurio o plata, y en ocasiones se utilizan los isótopos radioactivos de estos metales para aumentar la sensibilidad. Entre los métodos de saturación con metal cabe destacar el método de saturación con plata, el ensayo Cd-Chelex y el método del tetratiomolibdato (TTM) (Scheuhammer y Cherian, 1986; Bartsch et al., 1990; Klein et al., 1990).

Existe una amplia variedad de **métodos directos** para la determinación de esta metaloproteína. Éstos requieren diferentes pasos de purificación y de concentración de la proteína y permiten analizar tanto el contenido de MT total como las isoformas de MT. La cromatografía líquida mediante HPLC y la electroforesis capilar son dos métodos directos que se utilizan en combinación con técnicas de detección. A pesar de las mejoras en sensibilidad y límites de detección ofrecido por técnicas como electroforesis capilar o HPLC, no es fácil la identificación de las moléculas solamente por sus tiempos de elución. Sin embargo, la **espectrometría de masas** es una técnica analítica capaz de determinar la masa molecular y la abundancia de los componentes de una mezcla, así como proporcionar una valiosa información estructural de la misma. Es una tecnología que permite producir

iones en fase gaseosa a partir de moléculas orgánicas o inorgánicas, clasificarlos en función de su masa-carga (m/z) y medir su intensidad. Un espectrómetro de masas está formado por tres partes: la fuente de iones, el analizador y el detector. La conversión de los componentes de la muestra en iones en fase gaseosa se realiza mediante técnicas de ionización suave, como la ionización desorción con láser asistida con matriz (MALDI) o la ionización mediante electroespray (ESI). Los iones son transferidos al analizador donde son acelerados y separados en función de su m/z . Hay varios tipos de analizadores destacando entre otros los de cuadrupolo (Q), de tiempo de vuelo (TOF) y de trampa iónica (IT). Estas técnicas proporcionan información molecular muy precisa sobre las proteínas analizadas, pero la información de su secuencia es muy limitada. Para obtener información de este tipo se recurre a la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) que combina dos analizadores diferentes, donde se selecciona un ión y se somete a procesos que producen su fragmentación. Estos equipos de espectrometría permiten al menos dos tipos de estrategias para la identificación de proteínas: la huella peptídica y la secuencia peptídica. La huella peptídica de una determinada proteína es el conjunto de péptidos generados mediante la digestión de la proteína con una proteasa específica. Al ser analizados generalmente con MALDI-TOF, se obtiene un espectro característico que se compara con los espectros teóricos de las proteínas que se encuentran en la base de datos. La secuencia peptídica es la estrategia de elección para la identificación de proteínas no anotadas en las bases de datos o para las identificaciones que han resultado ambiguas mediante MALDI-TOF. Para la determinación de la secuencia de aminoácidos se utilizan espectrómetros de masas en tándem, obteniendo espectros de fragmentación de los diferentes iones.

En la determinación de MT por **métodos electroquímicos** son importantes las propiedades electroactivas de los grupos sulfidrilos y las de

unión al ión metálico. La determinación del contenido total de MT mediante estas técnicas se basa en la reacción de Brdicka. Este método se desarrolla posteriormente en el apartado 1.2.2.

Las **técnicas inmunológicas** se basan en la reacción de la MT con un anticuerpo específico. Para ello se puede utilizar ensayos tipo ELISA (Mizzen et al., 1996) o aplicar técnicas inmunohistoquímicas. En algunos casos, la determinación de la expresión de la MT se mide a través de la **cuantificación del ARNm** mediante técnicas de biología molecular. Es importante señalar que la presencia de niveles endógenos de ARNm de MT, no implica niveles de expresión de la proteína.

1.2.1. Saturación con plata.

El método de saturación por plata utilizado en esta Tesis se basa en un trabajo previo de Onosaka et al. (1978). En este ensayo, las muestras son incubadas con exceso de Cd^{+2} para saturar los sitios de unión del metal a la MT. El Cd^{+2} que no se une a la MT es posteriormente eliminado por la adición de hemolisado de glóbulos rojos, seguido por un tratamiento por calor para precipitar todas las proteínas excepto la MT. El Cd que permanece en las muestras se mide mediante espectrofotometría de absorción atómica y se calcula la concentración de MT basándose en un contenido 7 átomos-gramo de Cd por mol de MT (Otvos y Armitage, 1980). Otros autores han utilizado Cd radioactivo en este ensayo (Eaton y Toal, 1982).

La Ag muestra una alta afinidad por los grupos tiol de la MT (Kägi y Vallee, 1961; Sabbioni y Marafante, 1975). Basándose en este principio, Scheuhammer y Cherian en 1986, investigaron la unión de la Ag^+ a la MT y desarrollaron un ensayo de saturación por Ag para las medidas de MT en los tejidos. Las muestras se incuban con Ag unida con $^{110\text{m}}\text{Ag}$, desplazando a los metales unidos a la MT y mediante un paso de

hemolisado/calor/centrifugación se elimina la ^{110m}Ag que no se ha unido (Onosaka y Cherian, 1982). El tratamiento por calor causa la precipitación de la hemoglobina unida a la Ag y otras proteínas, excepto la MT que es termoestable. El material precipitado se elimina por centrifugación, y la Ag unida a la MT se mide con un contador de radiación gamma. La cantidad de Ag en la fracción final de sobrenadante es proporcional a la cantidad de MT presente.

El método de saturación por Ag estima mayores cantidades de MT que el ensayo de saturación por Cd, puesto que el Cd no desplaza al Cu que tiene unido la MT. En la MT de mamíferos, los 20 grupos tiol unen 7 átomos-gramo de Cd o Zn por mol manteniéndose la estructura de los clusters, mientras que la saturación de la MT por Ag se consigue con unos 17 átomos-gramo, lo cual indica una probable razón de metal/tiol de 1:1 y una desorganización o rotura de la estructura de los clusters de MT. La mayor afinidad de la plata con respecto a otros metales en su unión con la MT mejoran las condiciones de cuantificación. Este método original de saturación por plata fue modificado en nuestro laboratorio con el fin de no requerir la utilización del isótopo radiactivo en el ensayo (Del Ramo et al., 1995).

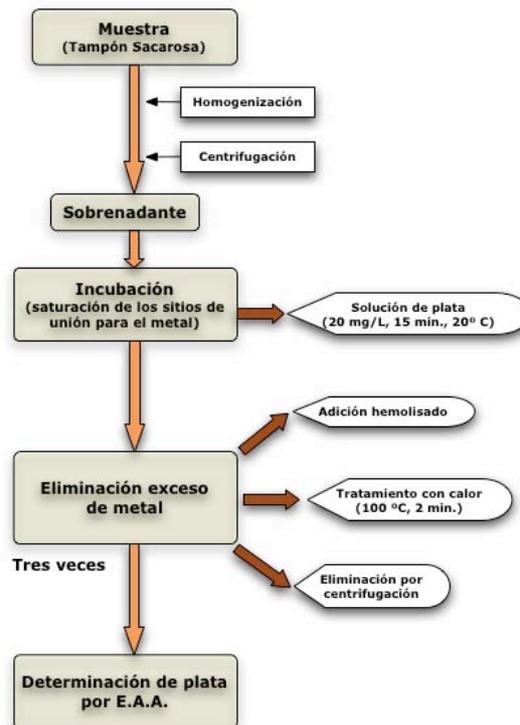


Figura 1.2. Esquema del procedimiento seguido del método de saturación con plata para determinación de MT mediante el procedimiento seguido por Del Ramo et al. (1995).

1.2.2. Polarografía de pulso diferencial (PPD).

La voltamperometría es una técnica electroquímica en la cual se mide la corriente originada por una reacción de transferencia de electrones en la superficie de un electrodo, en función del potencial aplicado al mismo. La polarografía es un tipo de voltamperometría que emplea un electrodo de gotas de mercurio. Un polarógrafo consta esencialmente de una fuente de corriente continua mediante la cual se aplican potenciales variables al electrodo de mercurio y se recoge la intensidad de corriente que pasa en cada momento por los electrodos. Cuando el potencial aplicado al electrodo está próximo al potencial redox en el que empieza a reducirse el analito de

interés se registra paso de corriente. La curva intensidad-potencial obtenida se denomina polarograma. La celda electroquímica contiene tres electrodos sumergidos en una disolución que contiene el analito y también un exceso de electrolito no reactivo llamado electrolito soporte. Los tres electrodos son: el electrodo de trabajo, el electrodo de referencia y el electrodo auxiliar. La intensidad se mide entre el electrodo de trabajo y el auxiliar, mientras que el potencial aplicado se mide entre el electrodo de trabajo y el de referencia. En el electrodo de trabajo es donde ocurre la reacción y es el transductor de una información química en señal eléctrica. La polarografía trabaja en condiciones dinámicas puesto que la superficie del electrodo de mercurio se renueva constantemente. Para la determinación de MT se suele utilizar el electrodo de gotas de mercurio estacionario SMDE (Static mercury drop electrode) que permite que se formen gotas con un tamaño determinado.

Además de los electrodos, la celda posee un sistema de purga de la solución por burbujeo de N_2 para eliminar el oxígeno molecular, ya que éste es una especie reducible en el intervalo de potenciales de trabajo y puede contribuir a la corriente medida. Con el fin de mejorar la sensibilidad, los límites de detección y la selectividad de la técnica, se desarrollaron las técnicas "de pulsos", entre las que cabe destacar la polarografía de pulso diferencial. Los polarogramas obtenidos mediante esta técnica tienen forma de pico, cuya altura es directamente proporcional a la concentración del analito.

El método de determinación polarográfica de proteínas que contienen grupos -SH en solución tampón de amonio con sales de cobalto fue descrito por primera vez por Brdicka (1933). Más tarde, la técnica fue adaptada al análisis de MT en mamíferos (Leber y Miya, 1976; Olafson, 1981) y en algunas especies marinas (Olafson y Sim, 1979; Olafson et al., 1979; Thompson y Cosson, 1984). La respuesta polarográfica por el método modificado de Brdicka es independiente del contenido de metal o del tipo de metal unido a MT (Olafson y Sim, 1974). Este método presenta una alta sensibilidad en la determinación de concentración total de MT. Sin embargo, se requiere mayor pureza dentro de la muestra, debido a la presencia de un número de componentes electroactivos que interfieren con el análisis. La secuencia de las reacciones electroquímicas que tienen lugar en el electrodo de mercurio mediante el procedimiento de Brdicka para el análisis de MT fueron descritas por Raspor (2001).

El complejo formado entre la proteína y el cobalto (II) tiene un papel fundamental en la aparición de efecto polarográfico. El polarograma obtenido está típicamente constituido por una onda con dos máximos, el primero debido a la reducción del cobalto y el segundo compuesto por una onda A y B. La onda B se atribuye a la reducción del hidrógeno de los grupos -SH (Brdicka et al., 1965; Thompson y Cosson, 1984; Raspor et al., 2001). La onda A (-1,35 V versus electrodo referencia) no puede ser cuantificada correctamente porque está influenciada por el lado catódico de la onda de reducción del cobalto, mientras que la onda B está mejor resuelta ($E_p = -1,48$ V) y es donde se determina el contenido en MT (figura 1.3).

La determinación de las proteínas que contienen grupos -SH se basa en la relación lineal entre la altura de la segunda onda polarográfica y la concentración de proteína polarográficamente activa.

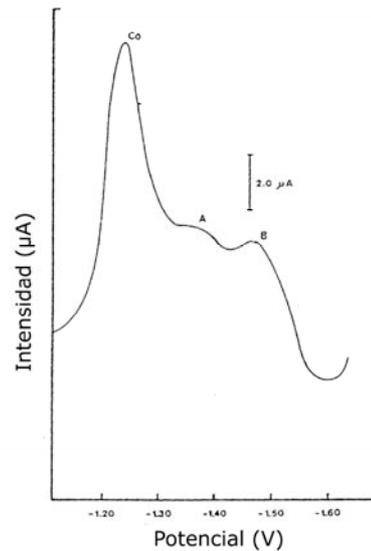


Figura 1.3. Polarograma obtenido por polarografía de pulso diferencial mediante el procedimiento de Brdicka.

1.2.3. Ejercicio de intercalibración (BEQUALM).

A menudo resulta difícil comparar los resultados obtenidos por distintos grupos de investigación, debido al uso de diferentes métodos de determinación y condiciones de ensayo. Estas variables influyen sobre la expresión de los resultados, de modo que distintos laboratorios pueden llegar a resultados diferentes a partir de muestras de la misma especie. Por este motivo, surge la necesidad de llevar a cabo experimentos de intercalibración y control de calidad para los biomarcadores más comúnmente utilizados, con el fin de comparar los métodos aplicados en distintos laboratorios. Dado que la MT se utiliza en programas internacionales de seguimiento de los efectos de la contaminación en ambientes acuáticos, se realizó un ejercicio de intercalibración financiado por la Unión Europea dentro del programa BEQUALM (Biological effects

quality assurance in monitoring programmes), en el cual participaron un gran número de laboratorios europeos, entre ellos el nuestro. La descripción de la intercalibración y sus resultados se resumen en el Anexo 1.

1.3. METALES EN EL MEDIO ACUÁTICO.

Los metales que entran en el medio acuático pueden tener origen natural o antropogénico. La erosión y la lixiviación química de suelos y rocas constituyen la aportación más importante por procesos de origen natural. Sin embargo, actualmente la cantidad de metales procedentes de la actividad industrial y minera, iguala o excede a la liberada al medio acuático por procesos naturales.

La necesidad que tiene un ser vivo de un determinado elemento se verá reflejada en la capacidad que tiene de captarlo del medio ambiente, concentrarlo y utilizarlo, lo que se define como metabolización del elemento. Esta capacidad de metabolización será un hecho diferencial claro que permitirá discernir entre elementos esenciales y no esenciales. No obstante, la metabolización de algunos elementos no esenciales puede ser similar a la de los elementos esenciales, siendo ésta una de las razones de su carácter tóxico. El aspecto más importante que distingue a los metales de otros contaminantes tóxicos es el hecho de no ser biodegradables. Una vez en el ambiente pueden permanecer durante cientos de años. La exposición a concentraciones elevadas de metales esenciales también puede producir efectos tóxicos resultantes, normalmente, de la unión poco específica de los metales a macromoléculas biológicamente importantes como son los grupos prostéticos de enzimas o metaloproteínas, de forma que pueden alterar su conformación y actividad biológica. Este tipo de unión no específica, constituye la forma principal de toxicidad de los metales (Mas y Arola, 1993).

Los metales llegan a los tejidos de los animales acuáticos a través de las superficies expuestas al medio y del alimento. Las branquias y el tracto digestivo son las principales superficies que permiten el paso de los metales. El transporte desde la superficie permeable hasta los distintos órganos tiene lugar por medio del líquido circulante (sangre o hemolinfa). Los metales se unen de forma más o menos inespecífica a las proteínas presentes en este líquido y son transportados a todos los tejidos. Los órganos en los que se suele producir una mayor acumulación son el riñón y el hígado (o la glándula digestiva en los animales invertebrados), siendo el riñón la vía principal de excreción (Díaz-Mayans et al., 1993). Los principales factores que afectan la entrada de metal son su forma química, la presencia de otros metales, el pH, la salinidad, la especie animal y la fase del ciclo de vida.

En la figura 1.4 se presenta un diagrama esquemático del metabolismo y toxicidad de los metales en las células eucariotas. Los organismos acuáticos han desarrollado sistemas subcelulares para la acumulación, regulación e inmovilización de metales (George et al., 1979; Viarengo y Nott, 1993). Existen varios mecanismos propuestos para el flujo de entrada de los iones metálicos en las células, destacando entre otros la entrada a través de canales iónicos, bombas de transporte activo o proteínas transportadoras localizadas en la membrana plasmática (Simkiss, 1998).

En el citoplasma, el metal libre puede unirse a MT, a ligandos de bajo peso molecular o de alto peso molecular, como metaloenzimas. Además, el metal puede unirse a factores de transcripción específicos de la MT, que interaccionan con elementos reguladores específicos para el metal (MRE), localizados en el promotor del gen de MT, aumentando la síntesis y transcripción de la misma. En algunos tipos de células, los metales son englobados en lisosomas, y pueden ser eliminados de la célula mediante exocitosis. En los moluscos y algunos crustáceos los metales pueden ser incorporados en gránulos minerales esféricos en formas insolubles menos

reactivas (Rainbow, 1998; Langston et al., 1998). Otra estrategia de detoxificación que aparece solamente en moluscos, es la presencia de células específicas llamadas rodocitos o células poro, las cuales actúan como sitio de almacenamiento de metales, principalmente el Cu en forma granular (Dallinger et al., 2005).

El grado de bioacumulación de un metal es el resultado del balance entre la tasa de entrada y la tasa de eliminación. Los procesos de bioacumulación son debidos básicamente a la imposibilidad, por parte del organismo afectado, de mantener los niveles necesarios de excreción del contaminante, por lo que sufre una retención en el interior del mismo (Torreblanca et al., 1993).

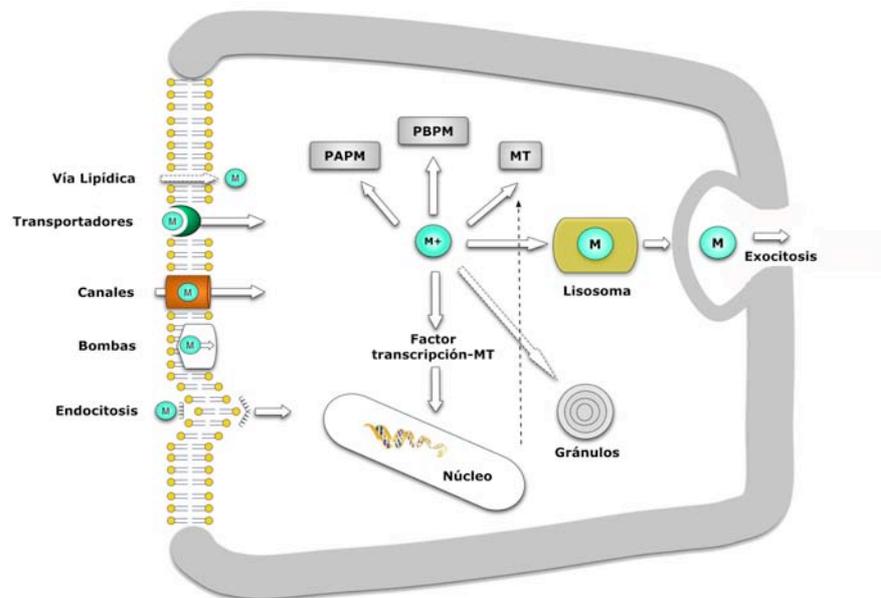


Figura 1.4. Representación esquemática del metabolismo y toxicidad de los metales en las células eucariotas. (PAPM: proteínas de alto peso molecular, PBPM: proteínas de bajo peso molecular, MT: metalotioneína, M: metal)

1.3.1. Cadmio

El cadmio ha sido detectado en más de 1000 especies de flora y fauna, tanto acuática como terrestre. No existe evidencia de que sea biológicamente esencial, y por el contrario se ha comprobado que a concentraciones relativamente bajas es tóxico para todas las formas de vida. Es un elemento divalente con masa atómica de 112,41. Es soluble en ácidos minerales, con los que forma las sales minerales correspondientes, y es insoluble en agua. Es uno de los contaminantes de mayor importancia, debido a su persistencia, toxicidad y potencial de bioacumulación (USEPA, 2000).

La incorporación natural de cadmio procede, principalmente, de la actividad volcánica, lixiviación de rocas e incendios forestales. Las fuentes antropogénicas de cadmio son muy variadas. Se emplea industrialmente como agente lubricante, en baterías, en aleaciones o pigmentos plásticos y es un producto de la combustión del carbón, además de ser utilizado en las centrales nucleares y en la industria electrónica.

Los principales efectos tóxicos del cadmio son debidos a que compite con otros iones, especialmente con el zinc, el hierro, el cobre y el calcio, produciendo alteraciones en diversos procesos metabólicos. Otros efectos tóxicos están relacionados con anomalías genéticas, fenómenos de esterilidad y carcinogénesis. Se ha encontrado una alta mortalidad, una reducción del crecimiento o inhibición de la reproducción en animales acuáticos expuestos a cadmio (Del Ramo et al., 1993; Kakkar y Jaffery, 2005). Por otra parte, en humanos la exposición crónica al cadmio provoca principalmente disfunciones renales, alteraciones en el tracto intestinal y dolencias óseas. Es incluso reconocido como una de las causas principales de la enfermedad "Itai-Itai", que afectó a la población japonesa por un envenenamiento crónico de Cd (Azcue, 1993; Jarup et al., 2000).

1.3.2. Plomo.

El plomo es el metal tóxico más extendido y ampliamente distribuido en la naturaleza. Es un elemento químico de peso atómico 207,19, se funde con facilidad (327,4°C), es relativamente resistente al ataque de los ácidos sulfúrico y clorhídrico y sus valencias químicas normales son 2 y 4. Rara vez se encuentra en su estado elemental y se encuentra en minerales como el sulfuro, la galena, la anglosita y la cerusita. Es un metal escaso de la corteza terrestre, de forma que el riesgo de contaminación surge de las emisiones asociadas al empleo del metal y sus derivados. Todos los compuestos de plomo son tóxicos en cierto grado, dependiendo de la naturaleza química y del grado de solubilidad de cada compuesto, siendo los compuestos orgánicos de plomo los que presentan mayor toxicidad. Los compuestos más importantes desde el punto de vista industrial son los óxidos de plomo y el tetraetilo de plomo.

La contaminación del agua por plomo se origina por la aportación de sus sales solubles al agua procedentes de fábricas de pinturas, alfarerías y talleres de esmaltado entre otros. Las dos vías principales de acceso de los compuestos de plomo al organismo son el tracto digestivo y los pulmones. En humanos solo el 10 % del plomo ingerido es excretado, de forma que tiende a acumularse en órganos y tejidos. El 90 % del plomo que se encuentra en el cuerpo humano está depositado en el esqueleto óseo. La intoxicación de Pb se caracteriza por la aparición de afecciones neurológicas, ya que bloquea la transmisión del impulso nervioso y la liberación de acetilcolina; también provoca disfunción renal y anemia (Del Ramo et al., 1993, Kakkar y Jaffery, 2005). La anemia se produce por una disminución de la longevidad de los glóbulos rojos y la inhibición de numerosas enzimas que intervienen en la síntesis de hemoglobina, en especial de la ALAD (ácido δ -aminolevulínico deshidratasa), una enzima que interviene en la formación del grupo hemo. La inhibición de su actividad produce una acumulación de

ALA (ácido δ -aminolevulínico) en sangre y orina. La actividad de la ALAD se utiliza como biomarcador de exposición a Pb en mamíferos (Yagminas y Villeneuve, 1987) y peces (Burden et al., 1998; Schmitt et al., 2005).

1.4. BIBLIOGRAFÍA.

- Amiard, J.C.; Amiard-Triquet, C.; Barka, S.; Pellerin, J.; Rainbow, P.S. (2006) "Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers". *Aquatic Toxicology*. **76**: 160-202.
- Ariyoshi, T.; Hasegawa, H.; Nanri, Y.; Arizono, K. (1990) "Profile of hemoproteins and heme-metabolizing enzymes in rats treated with surfactants". *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology*. **44**: 369-76.
- Azcue, J. (1993) "Contaminación por efecto de la actividad humana". En: *Metales en sistemas biológicos*. Mas, A.; Azcue, J. (Ed). Promociones y Publicaciones Universitarias, S.A., Barcelona
- Bartsch, R.; Klein, D.; Summer, K.H. (1990) "The Cd-Chelex assay: a new sensitive methods to determine metallothionein containing zinc and cadmium". *Arch Toxicol*. **64**: 177-80.
- Bebianno, M.J.; Langston, W.J.; Simkiss, K. (1992) "Metallothionein induction in *Littorina littorea* (Mollusca: Prosobranchia) on exposure to cadmium". *Journal Of The Marine Biological Association Of The United Kingdom*. **72**: 329-42.
- Bebianno, M.J.; Langston, W.J. (1995) "Induction of metallothionein synthesis in the gill and kidney of *Littorina littorea* exposed to cadmium". *J Mar Biol Assn Uk*. **75**: 173-86.
- Berger, B.; Dallinger, R.; Thomaser, A. (1995) "Quantification of metallothionein as a biomarker for cadmium exposure in terrestrial gastropods". *Environ Toxicol Chem*. **14**: 781-91.
- Beyer, J.; Sandvik, M.; Skare, J.U.; Egaas, E.; Hylland, K.; Waagbo, R.; Goksoyr, A. (1997) "Time- and dose-dependent biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus*) exposed to benzo". *Biomarkers*. **2**: 35-44.
- Brdicka, R. (1933) "Polarographic studies with dropping mercury katode - Part XXXI. -A new test for proteins in the presence of cobalt salts in ammoniacal solutions of ammonium chloride". *Collect. Czech. Chem. Comun*. **5**: 112-28.
- Brdicka, R.; Brezina, M.; Kalous, V. (1965) "Polarography of proteins and its analytical aspects". *Talanta*. **12**: 1149-62.
- Burden, V.M.; Sandheinrich, M.B., Caldwell, C.A. (1998) "Effects of lead on the growth and δ -aminolevulinic acid dehydratase activity of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*". *Environ Pollut* **101**: 285-89.

- Cajaraville, M.P.; Bebianno, M.J.; Blasco, J.; Porte, C.; Sarasquete, C.; Viarengo, A. (2000) "The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach". *Sci Total Environ.* **247**: 295-311.
- Capasso, C.; Carginale, V.; Scudiero, R.; Crescenzi, O.; Spadaccini, R.; Temussi, P.A.; Parisi, E. (2003) "Phylogenetic divergence of fish and mammalian metallothionein: relationships with structural diversification and organismal temperature". *J Mol Evol.* **57 Suppl 1**: S250-57.
- Castaño, A.; Carbonell, G.; Carballo, M.; Fernandez, C.; Boleas, S.; Tarazona, J.V. (1998) "Sublethal effects of repeated intraperitoneal cadmium injections on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)". *Ecotoxicology & Environmental Safety.* **41**: 29-35.
- Casterline, J.L., Jr.; Yip, G. (1975) "The distribution and binding of cadmium in oyster, soybean, and rat liver and kidney". *Archives of Environmental Contamination & Toxicology.* **3**: 319-29.
- Chan, P.C.; Shiu, C.K.; Wong, F.W.; Wong, J.K.; Lam, K.L.; Chan, K.M. (2004) "Common carp metallothionein-1 gene: cDNA cloning, gene structure and expression studies". *Biochim Biophys Acta.* **1676**: 162-71.
- Cheung; Pok Lap, A.; Kwok Lim Lam, V.; Chan, K.M. (2005) "Tilapia metallothionein genes: PCR-cloning and gene expression studies". *Biochim Biophys Acta.* **1731**: 191-201.
- Chowdhury, M.J.; Baldisserotto, B.; Wood, C.M. (2005) "Tissue-specific cadmium and metallothionein levels in rainbow trout chronically acclimated to waterborne or dietary cadmium". *Arch Environ Contam Toxicol.* **48**: 381-90.
- Chubatsu, L.S.; Meneghini, R. (1993) "Metallothionein protects DNA from oxidative damage". *Biochemical Journal.* **291**: 193-98.
- Cosson, R.P. (1994) "Heavy metal intracellular balance and relationship with metallothionein induction in the gills of carp - after contamination by Ag, Cd, and Hg following pretreatment with Zn or not". *Biol Tr Elem Res.* **46**: 229-45.
- Cosson, R.P. (2000) "Bivalve metallothionein as a biomarker of aquatic ecosystem pollution by trace metals: limits and perspectives". *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* **46**: 295-309.
- Cousins, R.J. (1985) "Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin". *Physiological Review.* **65**: 238-309.
- D'Auria, S.; Carginale, V.; Scudiero, R.; Crescenzi, O.; Di Maro, D.; Temussi, P.A.; Parisi, E.; Capasso, C. (2001) "Structural characterization and thermal stability of *Notothenia coriiceps* metallothionein". *Biochem J.* **354**: 291-99.
- Dabrio, M.; Rodriguez, A.R.; Bordin, G.; Bebianno, M.J.; De Ley, M.; Sestakova, I.; Vasak, M.; Nordberg, M. (2002) "Recent developments in quantification methods for metallothionein". *Journal of Inorganic Biochemistry.* **88**: 123-34.

- Dallinger, R.; Rainbow, P.S. (1993) "Ecotoxicology of metals in invertebrates". Lewis Publishers, Boca Raton.
- Dallinger, R.; Berger, B.; Hunziker, P.; Kägi, J.H. (1997) "Metallothionein in Snail Cd and Cu Metabolism". *Nature* **388**: 237-38.
- Dallinger, R.; Chabicoovsky, M.; Berger, B. (2004a) "Isoform-specific quantification of metallothionein in the terrestrial gastropod *Helix pomatia*. I. Molecular, biochemical, and methodical background". *Environ Toxicol Chem.* **23**: 890-901.
- Dallinger, R.; Chabicoovsky, M.; Lagg, B.; Schipflinger, R.; Weirich, H.G.; Berger, B. (2004b) "Isoform-specific quantification of metallothionein in the terrestrial gastropod *Helix pomatia*. II. A differential biomarker approach under laboratory and field conditions". *Environ Toxicol Chem.* **23**: 902-10.
- Dallinger, R.; Chabicoovsky, M.; Hodl, E.; Prem, C.; Hunziker, P.; Manzl, C. (2005) "Copper in *Helix pomatia* (Gastropoda) is regulated by one single cell type: differently responsive metal pools in rhogocytes". *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **289**: R1185-95.
- Dalton, T.P.; Lio, Q.W.; Bittel, D.; Liang, L.C.; Andrews, G.K. (1996) "Oxidative Stress Activates Metal Responsive Transcription Factor 1 Binding Activity: Occupancy In Vivo Of Metal Response Elements In the Metallothionein I Gene Promoter". *Journal Of Biological Chemistry.* Oct. **271**: 26233-41.
- De Boeck, G.; De Wachter, B.; Vlaeminck, A.; Blust, R. (2003) "Effect of cortisol treatment and/or sublethal copper exposure on copper uptake and heat shock protein levels in common carp, *Cyprinus carpio*". *Environmental Toxicology and Chemistry.* **22**: 1122-26.
- De Smet, H.; De Wachter, B.; Lobinski, R.; Blust, R. (2001) "Dynamics of (Cd,Zn)-metallothioneins in gills, liver and kidney of common carp *Cyprinus carpio* during cadmium exposure". *Aquatic Toxicology.* **52**: 269-81.
- Del Ramo, J.; Torreblanca, A.; Díaz-Mayans, J. (1993) "Toxicidad de los metales". En: *Metales en sistemas biológicos*. Mas, A.; Azcue, J.M. (Ed). Promociones y Publicaciones Universitarias, S.A., Barcelona
- Del Ramo, J.; Torreblanca, A.; Martínez, M.; Pastor, A.; Díaz-Mayans, J. (1995) "Quantification of Cadmium-Induced Metallothionein in Crustaceans by the Silver-Saturation Method". *Marine Environmental Research.* **39**: 121-25.
- Díaz-Mayans, J.; Torreblanca, A.; Del Ramo, J. (1993) "Presencia de metales en medio acuático". En: *Metales en sistemas biológicos*. Mas, A.; Azcue, J. (Ed). Promociones y Publicaciones Universitarias, S.A., Barcelona
- Eaton, D.L.; Toal, B.F. (1982) "Evaluation of the Cd/Hemoglobin Affinity Assay for the Rapid Determination of Metallothionein in Biological Tissues". *Toxicology and Applied Pharmacology.* **66**: 134-42.
- Engel, D.W.; Brouwer, M. (1987) "Metal regulation and molting in the blue crab, *Callinectes sapidus*: copper, zinc, and metallothionein". *Biol Bull.* **172**: 69-82.

- English, T.E.; Storey, K.B. (2003) "Freezing and anoxia stresses induce expression of metallothionein in the foot muscle and hepatopancreas of the marine gastropod *Littorina littorea*". *J Exp Biol.* **206**: 2517-24.
- Forbes, V.E.; Palmqvist, A.; Bach, L. (2006) "The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology". *Environ Toxicol Chem.* **25**: 272-80.
- George, S.G.; Carpena, E.; Coombs, T.L.; Overnell, J.; Youngson, A. (1979) "Characterisation of cadmium-binding proteins from mussels, *Mytilus edulis* (L), exposed to cadmium". *Biochim Biophys Acta.* **580**: 225-33.
- George, S.G.; Young, P. (1986) "The time course of effects of cadmium and 3-methylcholanthrene on activities of enzymes of xenobiotic metabolism and metallothionein levels in the plaice, *Pleuronectes platessa*". *Comp. Biochem. Physiol.* **83C**: 37-44.
- George, S.G. (1989) "Cadmium effects on plaice liver xenobiotic and metal detoxification systems : dose response". *Aquatic Toxicology.* **15**: 303-10.
- George, S.; Burgess, D.; Leaver, M.; N., F. (1992) "Metallothionein induction in cultured fibroblasts and liver of a marine flatfish, the turbot, *Scophthalmus maximus*". *Fish Physiol. Biochem.* **10**: 43-54.
- George, S.G.; Todd, K.; Wright, J. (1996) "Regulation Of Metallothionein In Teleosts: Induction Of MT mRNA and Protein By Cadmium In Hepatic and Extrahepatic Tissues Of a Marine Flatfish, the Turbot (*Scophthalmus maximus*)". *Comparative Biochemistry And Physiology C Pharmacology Toxicology And Endocrinology. Feb.* **113**: 109-15.
- Gully, J.R.; Mason, A.Z. (1993) "Cytosolic Redistribution and Enhanced Accumulation of Cu in Gill Tissue of *Littorina littorea* as a Result of Cd Exposure". *Mar Environ Res.* **35**: 53-57.
- Hammer, D.H. (1986) "Metallothionein". *Ann. Rev. Biochem.* **55**: 913-51.
- Hernandez-Hernandez, F.M.; Ansuategui, J.; Conesa, M. (1990) "Heavy Metal Concentrations in Some Marine Organisms from the Mediterranean Sea (Castellon, Spain): Metal Accumulation in Different Tissues". *Scientia Marina.* **54 (2)**: 113-29.
- Hogstrand, C.; Haux, C. (1991) "Binding and detoxification of heavy metals in lower vertebrates with reference to metallothionein". *Comp. Biochem. Physiol.* **100C**: 137-41.
- Hollis, L.; Hogstrand, C.; Wood, C.M. (2001) "Tissue-specific cadmium accumulation, metallothionein induction, and tissue zinc and copper levels during chronic sublethal cadmium exposure in juvenile rainbow trout". *Arch Environ Contam Toxicol.* **41**: 468-74.
- Hyllner, S.J.; Andersson, T.; Haux, C.; Olsson, P.E. (1989) "Cortisol induction of metallothionein in primary culture of rainbow trout hepatocytes". *Journal of Cellular Physiology.* **139**: 24-8.

- Jarup, L.; Hellstrom, L.; Alfven, T.; Carlsson, M.D.; Grubb, A.; Persson, B.; Pettersson, C.; Spang, G.; Schutz, A.; Elinder, C.G. (2000) "Low level exposure to cadmium and early kidney damage: the OSCAR study". *Occup Environ Med.* **57**: 668-72.
- Kägi, J.H.R.; Vallee, B.L. (1960) "Metallothionein: a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex". *J. Biol. Chem.* **235**: 3460-65.
- Kägi, J.H.R.; Vallee, B.L. (1961) "Metallothionein: a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. II. Physicochemical properties". *J. Biol. Chem.* **236**: 2435-42.
- Kägi, J.H.R.; Kojima, Y. (Ed) (1987) "Chemistry and Biochemistry of metallothionein. Metallothionein II." Birkhäuser Verlag, Basel.
- Kägi, J.H.R.; Schäffer, A. (1988) "Biochemistry of metallothionein". *Biochemistry.* **27**: 8509-15.
- Kakkar, P.; Jaffery, F.N. (2005) "Biological markers for metal toxicity". *Environmental Toxicology and Pharmacology.* **19**: 335-49.
- Kille, P.; Kay, J.; Sweeney, G.E. (1993) "Analysis of regulatory elements flanking metallothionein genes in Cd-tolerant fish (pike and stone loach)". *Biochimica et Biophysica Acta.* **1216**: 55-64.
- Klaassen, C.D.; Liu, J.; Choudhuri, S. (1999) "Metallothionein: An intracellular protein to protect against cadmium toxicity". *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**: 267-94.
- Klein, D.; Bartsch, R.; Summer, K.H. (1990) "Quantitation of Cu-containing metallothionein by a Cd-saturation method". *Anal Biochem.* **189**: 35-9.
- Kling, P.; Erkell, L.J.; Kille, P.; Olsson, P.E. (1996) "Metallothionein induction in rainbow trout gonadal (rtg-2) cells during free radical exposure". *Marine Environmental Research.* **42**: 33-36.
- Kojima, Y.; Binz, P.A.; Kägi, J.H.R. (1999) "Nomenclature of metallothionein : Proposal for a revision." En: *Metallothionein IV.* Klaassen, C.D. (Ed). Birkhäuser Verlag, Basel
- Kuroshima, R. (1992) "Comparison of Cadmium Accumulation in Tissues Between Carp *Cyprinus carpio* and Red Sea Bream *Pagrus major*". *Nippon Suisan Gakkaishi.* **58**: 1237-42.
- Langston, W.J.; Zhou, M. (1986) "Evaluation of the significance of metal-binding proteins in the gastropod *Littorina littorea*". *Marine Biology.* **92**: 505-15.
- Langston, W.J.; Zhou, M. (1987) "Cadmium accumulation, distribution and elimination in the bivalve *Macoma balthica*: neither metallothionein nor metallothionein-like proteins are involved". *Marine Environmental Research.* **21**: 225-37.
- Langston, W.J.; Bebianno, M.J.; Burt, G.R. (1998) "Metal handling strategies in molluscs". En: *Metal Metabolism in Aquatic Environments.* Langston, W.J.; Bebianno, M.J. (Ed). Chapman & Hall, London

- Leber, A.P.; Miya, T.S. (1976) "A mechanism for cadmium- and zinc-induced tolerance to cadmium toxicity: involvement of metallothionein". *Toxicology & Applied Pharmacology*. **37**: 403-14.
- Livingstone, D.R. (1993) "Biotechnology and pollution monitoring - use of molecular biomarkers in the aquatic environment". *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. **57**: 195-211.
- Martín, M.; Richardson, B.J. (1991) "Long term contaminant biomonitoring: views front Southern and Northern Hemisphere perspectives." *Marine Pollution Bulletin* **22**: 533- 37.
- Mas, A.; Arola, L. (1993) "Conceptos generales del metabolismo de metales". En: *Metales en sistemas biológicos*. Mas, A.; Azcue, J. (Ed). Promociones y Publicaciones Universitarias, S.A., Barcelona
- Mason, A.Z.; Nott, J.A. (1981) "The role of intracellular biomineralised granules in the regulation and detoxification of metals in gastropods with special reference to the marine prosobranch *Littorina littorea*". *Aquatic Toxicology*. **1**: 239-56.
- Mason, A.Z.; Simkiss, K.; Ryan, K.P. (1984) "The ultrastructural localisation of metals in specimens of *Littorea littorea* collected from clean and pollutes sites". *Journal of the Marine Biological Association of the UK*. **64**: 699-720.
- Mizzen, C.A.; Cartel, N.J.; Yu, W.H.; Fraser, P.E.; McLachlan, D.R. (1996) "Sensitive detection of metallothioneins-1, -2 and -3 in tissue homogenates by immunoblotting: a method for enhanced membrane transfer and retention". *J Biochem Biophys Methods*. **32**: 77-83.
- Murasugi, A.; Wada, C.; Hayashi, Y. (1981) "Purification and unique properties in UV and CD spectra of Cd-binding peptide 1 from *Schizosaccharomyces pombe*". *Biochemical & Biophysical Research Communications*. **103**: 1021-28.
- Murphy, M.F.; Collier, J.; Koutz, P.; Howard, B. (1990) "Nucleotide sequence of the trout metallothionein A gene 5' regulatory region". *Nucleic Acids Research*. **18**: 4622.
- Noel-Lambot, F. (1976) "Distribution of cadmium, zinc and copper in the mussel *Mytilus edulis*. Existence of cadmium-binding proteins similar to metallothioneins". *Experientia*. **32**: 324-25.
- Olafson, R.W.; Sim, R.G. (1979) "An electrochemical approach to quantitation and characterization of metallothioneins". *Anal. Biochem*. **100**: 187-201.
- Olafson, R.W.; Sim, R.G.; Kearns, A. (1979) "Physiological and chemical characterization of invertebrate metallothionein-like proteins". *Experientia Supplementum*. **34**: 197-204.
- Olafson, R.W. (1981) "Differential pulse polarographic determination of murine metallothionein induction kinetics." *J. Biol. Chem*. **256 (3)**: 1263-68.
- Olsson, P.E.; Hyllner, S.J.; Zafarullah, M.; Andersson, T.; Gedamu, L. (1990) "Differences in metallothionein gene expression in primary cultures of rainbow trout hepatocytes and the RTH-149 cell line". *Biochimica et Biophysica Acta*. **24**: 78-82.

- Olsson, P.E.; Zafarullah, M.; Foster, R.; et al. (1995) "Developmental regulation of metallothionein mRNA, zinc and copper levels in rainbow trout, *Salmo gairdneri*". *European Journal of Biochemistry*. **209**: 229-35.
- Onosaka, S.; Tanaka, K.; Doi, M.; Okahara, K. (1978) "A simplified procedure for determination of metallothionein in animal tissues". *Eisei Kagaku*. **24**: 128-33.
- Onosaka, S.; Cherian, M.G. (1982) "Comparison of Metallothionein Determination by Polarographic and Cadmium-Saturation Methods". *Toxicology and Applied Pharmacology*. **63**: 270-74.
- Otvos, J.D.; Armitage, I.M. (1980) "Structure of metal clusters in rabbit liver metallothionein". *Proc Natl Acad Sci USA*. **77**: 7094-98.
- Overnell, J.; Mcintosh, R.; Fletcher, T.C. (1987) "The levels of liver metallothionein and zinc in plaice, *Pleuronectes platessa*, during the breeding season, and the effect of oestradiol injection". *J. Fish. Biol.* **43**: 539-46.
- Palmiter, R.D. (1994) "Regulation of Metallothionein Genes by Heavy Metals Appears to Be Mediated by a Zinc-Sensitive Inhibitor That Interacts with a Constitutively Active Transcription Factor, MTF-1". *Proc Natl Acad Sci USA*. **91**: 1219-23.
- Park, J.S.; Chung, S.; Park, I.S.; Kim, Y.; Koh, C.; Lee, I.S. (2002) "Purification and characterization of metallothionein-like cadmium binding protein from Asian periwinkle *Littorina brevicula*". *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. **131**: 425-31.
- Rainbow, P.S. (1998) "Phylogeny of trace metal accumulation in crustaceans". En: *Metal Metabolism in Aquatic Environments*. Langston, W.J.; Bebianno, M.J. (Ed). Chapman & Hall, London
- Raldúa, D.; Pedrocchi, C. (1996) "Mercury Concentrations In Three Species Of Freshwater Fishes From the Lower Gállego and Cinca Rivers, Spain". *Bulletin Of Environmental Contamination And Toxicology*. **57**: 597-602.
- Raspor, B. (2001) "Elucidation of the mechanism of de Brdicka reaction". *Journal of Electroanalytical Chemistry*. **503**: 159-62.
- Riordan, J.R.; Richards, V. (1980) "Human fetal liver contains both zinc- and copper-rich forms of metallothionein". *Journal of Biological Chemistry*. **255**: 5380-83.
- Robinson, N.J.; Tommey, A.M.; Kuske, C.; Jackson, P.J. (1993) "Plant metallothioneins". *Biochemical Journal*. **295**: 1-10.
- Roch, M.; McCarter, J.A. (1984) "Hepatic metallothionein production and resistance to heavy metals by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) I. Exposed to an artificial mixture of zinc, copper and cadmium". *Comparative Biochemistry & Physiology. C, Comparative Pharmacology & Toxicology*. **77**: 71-5.
- Roesijadi, G.; Fowler, B.A. (1991) "Purification of invertebrate metallothioneins". *Methods in Enzymology*. **205**: 263-73.
- Roesijadi, G. (1992) "Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals". *Aquatic Toxicology*. **22**: 81-114.

- Ryu, S.K.; Park, J.S.; Lee, I.S. (2003) "Purification and characterization of a copper-binding protein from Asian periwinkle *Littorina brevicula*". *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. **134**: 101-07.
- Sabbioni, E.; Marafante, E. (1975) "Heavy metals in cadmium binding protein". *Environ. Physiol. Biochem*. **5**: 132-41.
- Scheuhammer, A.M.; Cherian, M.G. (1986) "Quantification of Metallothioneins by a Silver-Saturation Method". *Toxicology and Applied Pharmacology*. **82**: 417-25.
- Schmitt, C.J.; White, J.J.; Brunbaugh, W.G.; Tillitt, D.E. (2005) "Biochemical effects of lead, zinc, and cadmium from minino on fish in the tri-states district of Northeastern Oklahoma, USA". *Environ Toxicol Chem* **24**(6): 1483-95-
- Scudiero, R.; Temussi, P.A.; Parisi, E. (2005) "Fish and mammalian metallothioneins: a comparative study". *Gene*. **345**: 21-6.
- Simkiss, K. (1998) "Mechanisms of metal uptake". En: *Metal Metabolism in Aquatic Environments*. Langston, W.J.; Bebianno, M.J. (Ed). Chapman & Hall, London
- Sun, L.T.; Jeng, S.S. (1998) "Comparative zinc concentrations in tissues of common carp and other aquatic organisms". *Zoological Studies*. **37**: 184-90.
- Thompson, J.A.J.; Cosson, R.P. (1984) "An improved electrochemical method for the quantification of MT in marine organisms". *Mar Environ Res*. **11**: 137-52.
- Torreblanca, A.; Díaz-Mayans, J.; Del Ramo, J. (1993) "Acumulación de metales". En: *Metales en sistemas biológicos*. Mas, A.; Azcue, J.M. (Ed). Promociones y Publicaciones Universitarias, S.A., Barcelona
- USEPA (U.S. Environmental Protection Agency Office of Water Office of Science and Technology) "2000 Update of ambient water quality criteria for cadmium." EPA Contract No. 68-C-98-134 Work Assignment No. 1-11, Great Lakes Environmental Center Traverse City, Michigan 49686.
- van der Oost, R.; Beyer, J.; Vermeulen, N.P.E. (2003) "Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review". *Environmental toxicology and pharmacology*. **13**: 57-149.
- Viarengo, A.; Nott, J.A. (1993) "Mechanisms of heavy metal cation homeostatis in marine invertebrates". *Comparative Biochemistry and Physiology* **103C**: 355-72.
- Viarengo, A.; Ponzano, E.; Dondero, F.; Fabbri, R. (1997) "A Simple Spectrophotometric Method For Metallothionein Evaluation In Marine Organisms: an Application to Mediterranean and Antarctic Molluscs". *Marine Environmental Research. Jul*. **44**: 69-84.
- Viarengo, A.; Burlando, B.; Cavaletto, M.; Marchi, B.; Ponzano, E.; Blasco, J. (1999) "Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*". *Am J Physiol*. **277**: R1612-19.

- Winge, D.R.; Miklossy, K.A. (1982) "Domain nature of metallothionein". *Journal of Biological Chemistry*. **257**: 3471-76.
- Yagminas, A.P.; Villeneuve, D.C. (1987) "Kinetic parameters of the inhibition of red blood cell aminolevulinic acid dehydratase by triethyl lead and its reversal by dithiothreitol and zinc". *J. Biochem Toxicol* **2**: 115-24.
- Zafarullah, M.; Bonham, K.; Gedamu, L. (1988) "Structure of the rainbow trout metallothionein B gene and characterization of its metal-responsive region". *Molecular & Cellular Biology*. **8**: 4469-76.

**2.- IMPACTO DE LA CONTAMINACIÓN POR METALES
SOBRE CARPAS Y BARBOS EN DIFERENTES PUNTOS DEL
RÍO EBRO.**

2. IMPACTO DE LA CONTAMINACIÓN POR METALES SOBRE CARPAS Y BARBOS EN DIFERENTES PUNTOS DEL RÍO EBRO.

2.1. INTRODUCCIÓN.

Las actividades industriales y agrícolas han incrementado el uso de productos químicos. Estos productos y sus derivados a menudo llegan a los ríos y pueden representar un riesgo para el hombre y la biota, alterando la calidad del agua. Los múltiples usos que el hombre realiza del agua y la necesidad de conservar los valores naturales del medio hídrico, hacen necesaria una vigilancia para el control de la contaminación. La Confederación Hidrográfica del Ebro (CHE) diseñó, en 1992, una red de control a lo largo de la cuenca, denominada Red de Control de Sustancias Peligrosas (RCSP), cuyo objetivo es el seguimiento de determinados compuestos tóxicos, persistentes y bioacumulables. Dicho control se realiza mediante el análisis químico de muestras de aguas, de sedimentos y de biota.

La mortandad piscícola detectada en marzo de 1999 en la mencionada cuenca, puso de manifiesto que los peces del río Cinca, aguas abajo de Monzón, presentaban altas concentraciones de derivados de DDT y mercurio que hacía peligroso su consumo. La contaminación fue presumiblemente producida por Montecinca, una empresa que fabrica pesticidas, y que desde 1987 hasta 1993 realizó actividades sin poseer autorización para realizar vertidos. El Instituto Pirenaico de Ecología determinó las concentraciones de mercurio en tres especies de peces de los ríos Gállego y Cinca en el verano de 1993, y la Confederación Hidrográfica del Ebro lo realizó en agua y sedimento, concluyendo que los niveles de mercurio en peces de estas zonas muestreadas, eran muy altos y podrían ser considerados peligrosos para el consumo humano (Raldúa y Pedrocchi, 1996). En los años 1999,

2000 y 2001 se realizaron, por parte de la Confederación Hidrográfica del Ebro, análisis de sustancias consideradas peligrosas en aguas, sedimento y biota (CHE, 2000) encontrándose altos niveles de metales en algunos puntos (tabla 2.1).

El presente estudio se centra en el curso bajo-medio del río Ebro. Este río presenta el mayor flujo (255-425 m³/s) de todos los ríos de la Península Ibérica y recibe una serie de vertidos de diferente origen (doméstico, industrial y agrícola) existiendo varios estudios que indican la presencia de productos potencialmente tóxicos, como metales y compuestos organoclorados, en el agua y sus sedimentos (Ramos et al., 1999; Fernández et al., 1999).

Tabla 2.1. Contenido de metal en la matriz sedimento proporcionado por la CHE en 2000 (CHE, 2000). Los datos están expresados en µg/g de peso seco.

Metal	Punto de muestreo			
	Pina (Z)	Flix (F)	Segre (L)	Monzón (M)
Cu	20,90	19,50	22,00	12,80
Cd	0,44	6,49	0,29	0,29
Hg	0,08	5,60	0,05	0,37
Zn	96,40	87,10	72,60	65,20

Se seleccionaron dos organismos como especies centinela, la carpa común *Cyprinus carpio* y el barbo *Barbus graellsii*. La carpa es una de las especies dulceacuícolas más resistentes a la contaminación y es representativa de las comunidades de peces en el curso bajo del río Ebro. Es abundante, estando presente en la mayoría de puntos de muestreo, y de fácil captura. Su amplia distribución a lo largo del área de estudio (300 km) permite la comparación entre diferentes puntos. El barbo se seleccionó como especie alternativa, habita en el curso alto del río y se seleccionaron

dos estaciones de muestreo. Esta especie es otro miembro de la familia de los ciprínidos, de hábitos comparables en muchos aspectos a los de la carpa dado su carácter omnívoro y bentónico. Sin embargo, esta especie parece ser mucho menos abundante que la carpa en el tramo bajo del Ebro.

Ante la disponibilidad de muestras de hígado de carpas y barbos procedentes de algunos puntos de la red durante el año 2000, nos propusimos evaluar y utilizar la MT de hígado de dichas especies, como biomarcador de contaminación por metales, y estudiar la influencia de dicha contaminación sobre la concentración de metales en el hígado y sobre la concentración de MT en dicho órgano.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.2.1. Obtención de las muestras.

La toma de muestras, así como la logística y disección de los animales fue realizada por el equipo de la doctora Cinta Porte del Centro de Investigaciones y Desarrollo (CSIC, Barcelona). Los puntos de muestreo seleccionados a lo largo del río Ebro fueron cinco, cuatro de ellos correspondientes con estaciones de la Red de Control de Sustancias Peligrosas de la Confederación Hidrográfica del Ebro. Los cinco puntos seleccionados, así como las claves de cada uno, quedan reflejados en la tabla 2.2.

Tabla 2.2. Localización y clave de los puntos de muestreo realizados en el año 2000.

Fecha	Río	Tramo	Clave (RCSP)	Clave (CID)
19/09	Ebro	Presa de Pina	T-2	Z
21/09	Cinca	Monzón	T-5	M
31/09	Segre	Torres de Segre	T-4	L
17/10	Ebro	Delta del Ebro	—	D
18/11	Ebro	Flix	T-3	F

Las estaciones de muestreo fueron seleccionadas de acuerdo con diferentes características medioambientales. El punto Z está localizado a 35 km de la ciudad de Zaragoza y de su planta de tratamiento de aguas residuales. Recibe el impacto de una combinación de contaminación urbana e industrial. M es una estación, en el río Cinca (afluente del río Ebro), localizada a 5 km de un área con una alta carga industrial. El punto L está localizado en un área relativamente limpia en el río Segre, a 20 km de la ciudad de Lérida y será considerado como sitio de referencia. El punto D es una zona de actividad agrícola. Recibe el impacto de los canales de riego del parque natural del Delta del Ebro. F está aguas abajo de Flix, un punto con alta carga de contaminación de tipo industrial. La localización geográfica de los puntos de muestreo dentro de la cuenca del río Ebro queda caracterizada en el mapa de la figura 2.1.

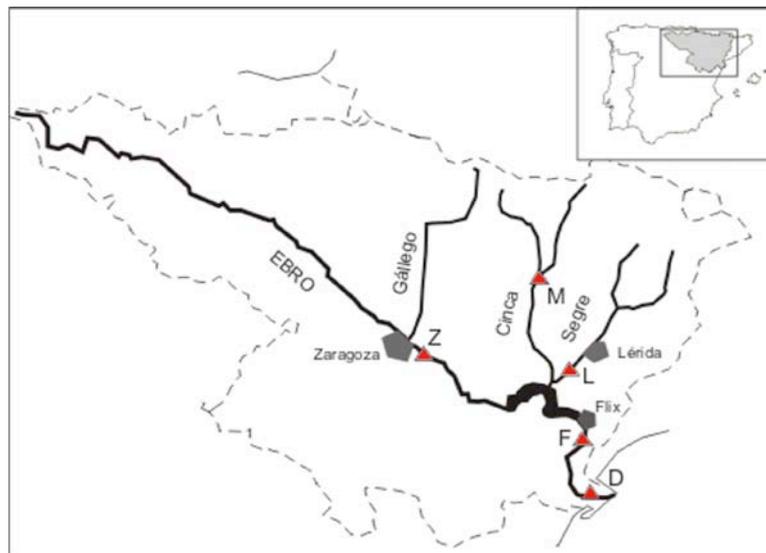


Figura 2.1. Puntos de muestreo seleccionados en la cuenca del río Ebro.

Se capturaron un total de 31 carpas y 12 barbos entre septiembre y octubre de 2000, intentando recoger peces de similar tamaño y estado reproductivo. En la estación de Monzón sólo fue posible obtener barbos. Todas las muestras fueron capturadas mediante pesca eléctrica, excepto en el punto F, donde fueron obtenidas por pescadores locales. Tras su captura, los ejemplares fueron pesados, medidos y se calculó el índice de condición como $[\text{peso del animal}/(\text{longitud})^3] \times 100$. Posteriormente se sacrificaron, se diseccionó el hígado de cada uno de ellos y se congeló en nitrógeno líquido. Se trasladaron en nieve carbónica al laboratorio de la Unidad de Fisiología Animal del Departament de Biologia Funcional i Antropologia Física de la Universitat de València, donde se almacenaron a -80°C hasta su análisis. Las muestras de hígado se dividieron en dos partes, una para la determinación de metalotioneína y la otra para el análisis de metales.

2.2.2. Cuantificación de metalotioneína por saturación con plata.

Un paso previo a la cuantificación, es la obtención de un hemolisado celular de sangre de conejo, necesario para la eliminación de la plata no unida a la MT (figura 2.2). Tras lavar los glóbulos rojos mediante la adición de KCl y posteriores centrifugaciones, obtenemos un precipitado conteniendo los mismos. Dicho precipitado se resuspende en una solución hipotónica de tampón Tris-HCl en la cual se rompen las células y se libera la hemoglobina. Mediante una centrifugación posterior se eliminan las membranas de los eritrocitos.

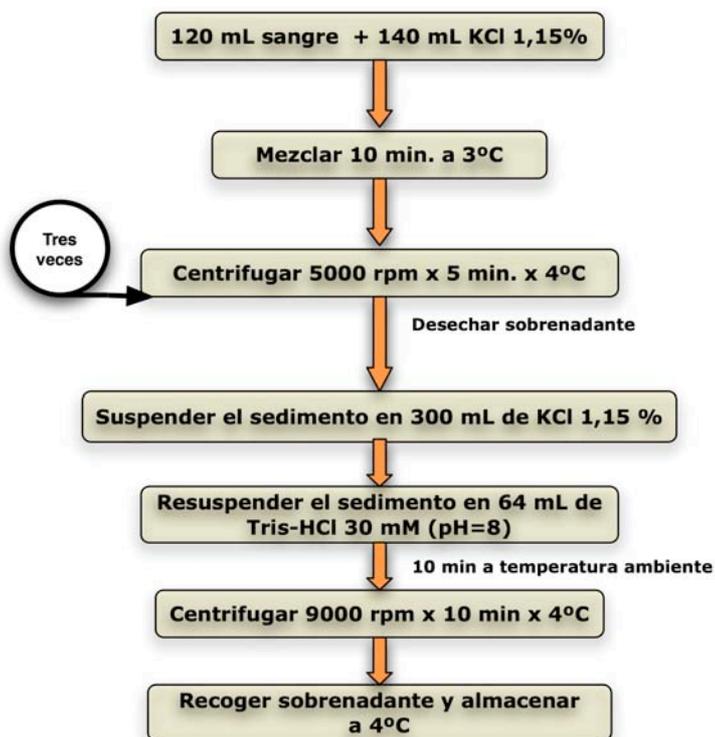


Figura 2.2. Procedimiento seguido para la obtención del hemolisado.

Las muestras de hígado destinadas a la determinación de MT fueron pesadas y homogeneizadas en sacarosa 0,25 M a 4°C en un baño de hielo, mediante un homogeneizador de vidrio. Posteriormente, se centrifugaron a 20.000 g durante 20 minutos a 4°C, y se guardó el sobrenadante a -20°C hasta la cuantificación de MT.

La estimación de la cantidad de MT se basó en el método de saturación por plata (Scheuhammer y Cherian, 1986), con algunas modificaciones (Del Ramo et al., 1995), siguiendo el protocolo de la figura 1.2. Se tomaron alícuotas de 750 µL de sobrenadante de las muestras y se incubaron con 1 mL de una solución de 20 mg/L de plata (preparada disolviendo AgNO₃ en

agua nanopure) durante 15 minutos a 20°C. El exceso de metal se eliminó mediante la adición a cada muestra de 200 µl de hemolisado de sangre de conejo. Posteriormente, las muestras fueron sometidas a un tratamiento con calor en un baño a 100°C durante 2 minutos y una centrifugación a 1000 g durante 5 minutos a 4°C. Con el fin de conseguir una exhaustiva eliminación de la plata libre en solución, los pasos desde la adición del hemolisado hasta la centrifugación se repitieron 3 veces.

Para el calibrado del ensayo se prepararon soluciones que contenían concentraciones crecientes de MT de hígado de conejo (de 1 a 40 µg MT/mL), que se sometieron al mismo tratamiento que las muestras. La plata que permaneció en la muestra tras el proceso, corresponde a Ag unida a la MT. Con el fin de calibrar el equipo se prepararon soluciones con concentraciones de plata de 0 a 2,5 mg/L. Se añadió un 1,5 % de HNO₃ BAKER a los sobrenadantes de las muestras, a los de las soluciones patrón de MT y a las soluciones patrón de plata. Se determinó a la llama las concentraciones de Ag de todas las soluciones mediante un espectrofotómetro de absorción atómica (EAA) modelo 5000 Perkin-Elmer a una longitud de onda de 328,1 nm. Mediante la interpolación en la curva de calibrado proporcionada por las soluciones patrón de MT se calculó la concentración de la misma en las muestras. Los valores están expresados en µg/g de peso fresco.

2.2.3. Determinación de metales.

El análisis de metales se realizó en muestras de aproximadamente 0,2 g de hígado. La digestión se llevó a cabo con ácido nítrico concentrado (BAKER) en una relación de 1 mL por 0,1 gr de muestra. Se mantuvieron en una placa a 80°C durante 24 horas, después de enfriadas se diluyeron con agua ultrapura hasta un volumen final constante. La determinación de las

concentraciones de los metales Cu, Zn, Cd y Hg se realizó mediante un equipo de espectrometría ICP-MS (ELAN 5000) en los Servicios científico-técnicos de la Universidad de Barcelona. Se realizaron 3 réplicas por muestra y se incluyeron blancos así como digeridos de material de referencia (DORM-2 NRC-CNRC, Ottawa, Canadá). Las concentraciones de metales medidas estuvieron dentro del rango certificado del material de referencia (2,45±0,36 mg/kg de Cu frente a 2,34±0,16 mg/kg del valor certificado; 24,8±1,7 mg/kg de Zn frente a 25,6±2,3 mg/kg del valor certificado; 0,042±0,07 mg/kg de Cd frente a 0,043±0,008 mg/kg del valor certificado; 3,99±0,5 mg/kg de Hg frente a 4,64±0,26 mg/kg del valor certificado). Los resultados de las concentraciones de metales determinadas son expresados en µg/g peso fresco.

2.2.4. Análisis estadístico.

Todos los análisis estadísticos de los datos correspondientes al contenido de metal y MT, incluyendo test de normalidad, correlación, ANOVA, ANCOVA, test de la t y análisis de regresión, se realizaron utilizando el paquete estadístico Stata 9 (Stata Corp.) para Mac OS X. En primer lugar, se analizó la normalidad de las variables consideradas (peso y longitud del animal, índice de condición, MT, Cu, Zn, Cd, Hg). En aquellos casos donde las variables no presentaban una distribución normal se procedió a su transformación siguiendo el método "escala de potencia", que proporciona una guía para elegir la transformación más adecuada.

En cada una de las especies se realizó un análisis de correlación para las distintas parejas de variables, mediante el test de Pearson. Dado que el número de correlaciones analizadas era alto, se aplicó el test de Bonferroni, que consistió en dividir el valor de significación por el número de correlaciones, y se consideró este resultado como el valor límite para

establecer el nivel de significación en las correlaciones. También se llevó a cabo un análisis de regresión, para ver la naturaleza de la relación entre las variables correlacionadas. Con el fin de establecer las posibles diferencias en los niveles de metales y metalotioneína presentados en los hígados de las carpas capturadas en los distintos puntos, se realizó un ANOVA con los valores de concentración de Cu, Zn, Hg y MT. Con el fin de comprobar la asunción de homogeneidad de las varianzas, se tuvo en cuenta el resultado proporcionado por el test de Bartlett, y se empleó el test de Scheffe como test *a posteriori*. Para analizar las diferencias en el contenido de cadmio en el hígado de carpas procedentes de diferentes puntos de muestreo, y dada la correlación existente entre el peso de las carpas y el contenido en cadmio en el hígado, se realizó un ANCOVA en el que se tomó el peso del animal como una covariable. Para comparar la concentración de metales y los niveles de MT en el hígado de los barbos procedentes de los dos puntos de muestreo, se realizó un test de la t con varianzas desiguales (test de Welch).

2.3. RESULTADOS.

Las características de peso, longitud e índice de condición de las carpas y los barbos de los diferentes puntos de muestreo se presentan en la tabla 2.3. Se encontraron diferencias en términos de peso y longitud de los animales capturados. Las carpas de los puntos D y L fueron las de menor tamaño, las de la estación Z tuvieron un tamaño intermedio, y los animales de mayores dimensiones fueron los de la estación F. Los barbos de los puntos Z y M también presentaron distinto tamaño. El índice de condición fue homogéneo tanto para carpas como para barbos, indicado un estado nutricional de los peces similar en todos los puntos de muestreo.

Tabla 2.3. Datos morfométricos de carpas y barbos capturados en distintos puntos de muestreo. Los datos se expresan como valor medio \pm D.E.

Especies	Estación	n	Peso (g)	Longitud (cm)	Índice de condición (g/cm ³)
Carpas	Z	6	833 \pm 63 ^a	35,7 \pm 1,2 ^a	1,83 \pm 0,08
	L	7	371 \pm 98 ^b	26,4 \pm 2,8 ^b	1,82 \pm 0,11
	F	11	1404 \pm 129 ^c	42,1 \pm 1,2 ^c	1,83 \pm 0,05
	D	7	336 \pm 45 ^b	25,9 \pm 1,1 ^b	1,87 \pm 0,04
Barbos	Z	6	950 \pm 62 ^b	41,0 \pm 1,3 ^b	1,38 \pm 0,06
	M	6	1400 \pm 138 ^a	47,0 \pm 1,5 ^a	1,34 \pm 0,08

(*) n: número de animales capturados. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Las concentraciones de los diferentes metales Cu, Hg, Zn y Cd obtenidas en hígado de carpas y barbos en las zonas muestreadas del río Ebro, así como la concentración de MT, se muestran en las figuras 2.3, 2.4, 2.5, 2.6 y 2.7 respectivamente. En la esquina superior derecha de dichas figuras se indica la existencia de diferencias significativas entre las carpas muestreadas en las distintas estaciones, según el test de Scheffe. De la misma forma, se muestran los resultados del test de la t indicando las diferencias entre los barbos capturados en Z y M.

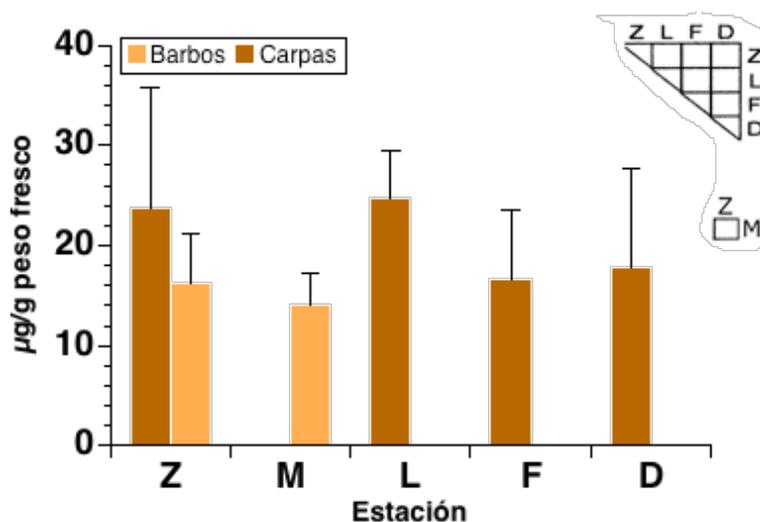


Figura 2.3. Concentraciones de Cu en el hígado de carpas (*Cyprinus carpio*) y barbos (*Barbus graellsii*) muestreadas en los puntos indicados del río Ebro. Las diferencias entre sitios ($p < 0,05$) se indican con círculos negros ($n \geq 6$). Los datos se expresan como valor medio \pm D.E.

Los valores de concentración de Cu en hígado de carpa se obtuvieron en un rango de 17,8 a 24,8 $\mu\text{g/g}$, siendo los valores medios similares en todos los puntos. El ANOVA no mostró diferencias significativas entre los sitios muestreados. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre el contenido de Cu en hígado de barbos capturados en los puntos Z y M, siendo dicho contenido similar al determinado en hígado de carpas.

Se encontró una alta concentración de Hg (0,63 $\mu\text{g/g}$) en el hígado de carpas capturadas en el punto Flix. El análisis estadístico realizado puso de manifiesto que existen diferencias significativas en las concentraciones medias de Hg entre los puntos de muestreo, destacando las diferencias de los puntos Delta y Flix con el resto de sitios y entre ellos. Las concentraciones de Hg más altas se obtuvieron en barbos del punto M (9,9 $\mu\text{g/g}$), encontrándose diferencias significativas con la estación Z.

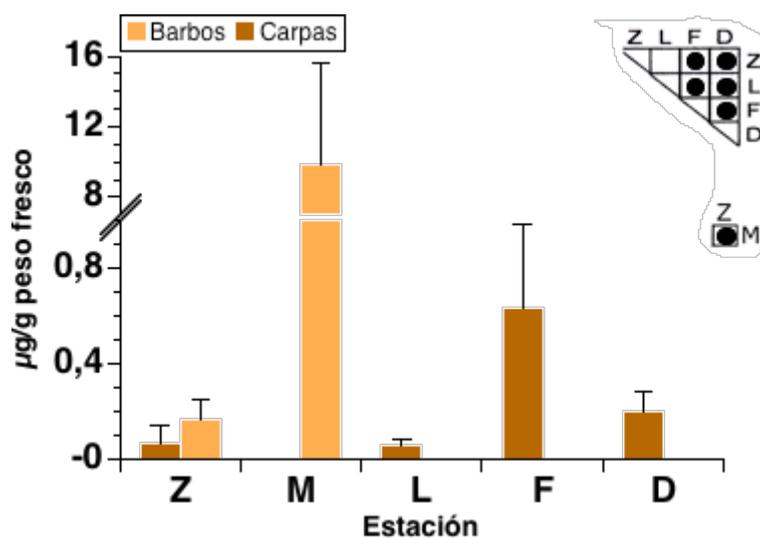


Figura 2.4. Concentraciones de Hg en el hígado de carpas (*Cyprinus carpio*) y barbos (*Barbus graellsii*) muestreadas en los puntos indicados del río Ebro. Las diferencias entre sitios ($p < 0,05$) se indican con círculos negros ($n \geq 6$). Los datos se expresan como valor medio \pm D.E.

Las concentraciones de Zn en el hígado de carpas fueron similares (109,6–140,4 $\mu\text{g/g}$) en todas las estaciones excepto en Flix, donde se encontraron valores más bajos (69,3 $\mu\text{g/g}$). El resultado del análisis estadístico revela diferencias en las concentraciones de Zn entre los sitios Delta y Flix. Las concentraciones de Zn en el hígado de los barbos fueron similares en los dos puntos donde se capturaron, no encontrándose diferencias significativas. Estas concentraciones fueron inferiores a las determinadas en el hígado de las carpas.

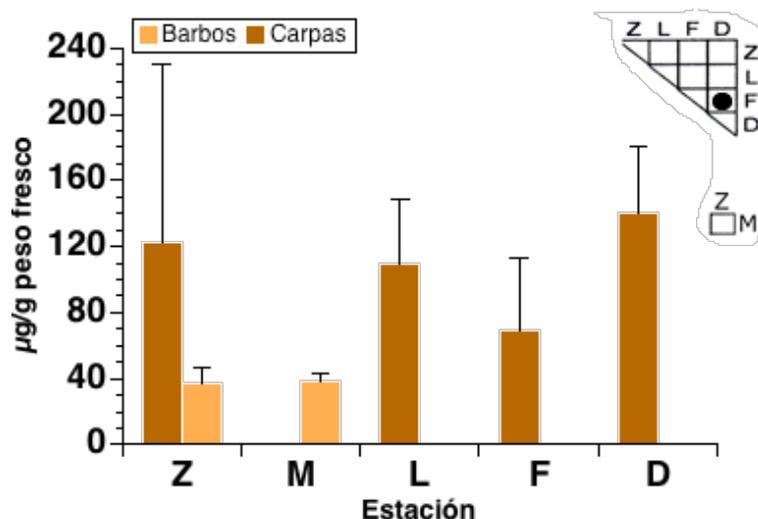


Figura 2.5. Concentraciones medias (\pm D.E.) de Zn en el hígado de carpas (*Cyprinus carpio*) y barbos (*Barbus graellsii*) muestreadas en los puntos indicados del río Ebro. Las diferencias entre sitios ($p < 0,05$) se indican con círculos negros ($n \geq 6$).

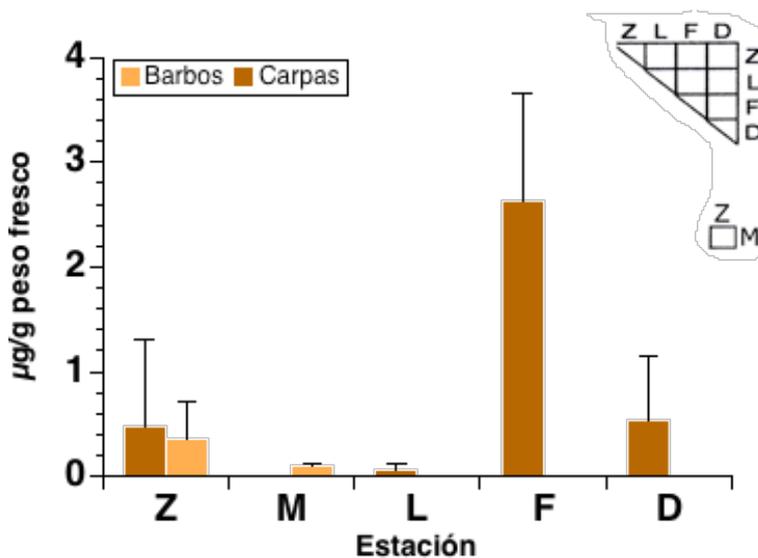


Figura 2.6. Concentraciones medias (\pm D.E.) de Cd en el hígado de carpas (*Cyprinus carpio*) y barbos (*Barbus graellsii*) muestreadas en los puntos indicados del río Ebro. Las diferencias entre sitios ($p < 0,05$) se indican con círculos negros ($n \geq 6$).

A pesar de la alta concentración de Cd encontrada en el hígado de carpas capturadas en la estación Flix (2,63 $\mu\text{g/g}$), el ANCOVA realizado no mostró un efecto estadísticamente significativo. Sin embargo, tal como puede observarse en la figura 2.6 el valor medio de cadmio en Flix no solamente es muy superior a todos los demás sino que además las desviaciones estándar de los valores de este punto no se solapan con las de ningún otro punto. Las concentraciones de Cd encontradas en barbos fueron similares a las obtenidas en carpas exceptuando el punto Flix, y no se encontraron diferencias entre los valores correspondientes a los dos puntos donde se muestrearon los barbos.

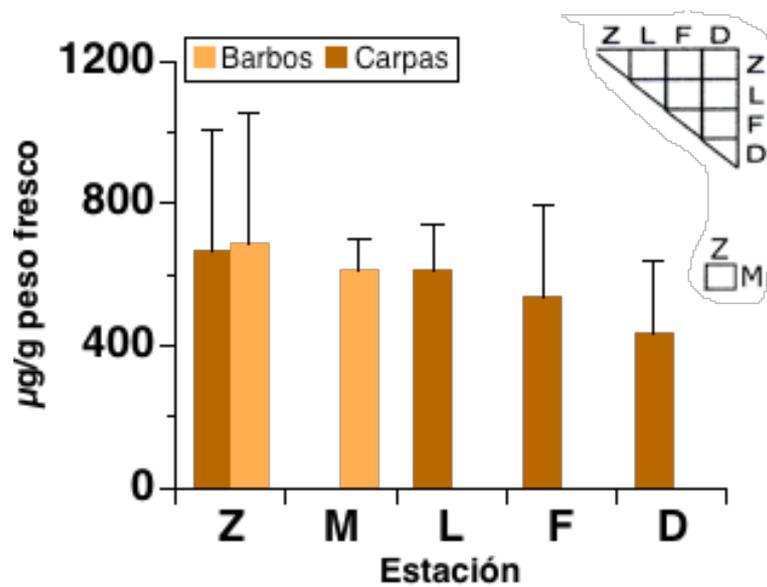


Figura 2.7. Concentraciones de MT en el hígado de carpas (*Cyprinus carpio*) y barbos (*Barbus graellsii*) muestreadas en los puntos indicados del río Ebro. Las diferencias entre sitios ($p < 0,05$) se indican con círculos negros ($n \geq 6$). Los datos se expresan como valor medio \pm D.E.

Los niveles de MT determinados en hígado de carpas, se presentan en un rango de 170 a 1300 $\mu\text{g/g}$, y no se encontraron diferencias significativas entre los puntos muestreados. Como se puede observar en la figura 2.7, las concentraciones de MT en el hígado de barbos fueron similares a los de las carpas, presentando valores en un rango de 315 a 1368 $\mu\text{g/g}$, y no se observaron diferencias entre los puntos M y Z.

Los análisis de correlación entre las variables consideradas (concentración de metales, de MT y peso del animal) a partir de los datos obtenidos en las carpas y barbos capturados se muestra en las tablas 2.4 y 2.5. La concentración de Cd en los hígados de carpas se correlacionó con la concentración de Hg ($r^2=0,7315$, $p<0,01$). Teniendo en cuenta la transformación realizada con el fin de normalizar la variable, se observa un incremento en la concentración de cadmio al aumentar la de Hg. Únicamente la concentración de cadmio en carpas ($r^2=0,731$, $p<0,05$), y la concentración de mercurio en barbos ($r^2=0,652$, $p<0,05$), se correlacionó con el peso de animal. Cabe destacar que en ambas especies de peces se encontró una correlación positiva entre la concentración de MT y la de Cu. En la figura 2.8 se muestra la naturaleza de la relación entre las dos variables Cu-MT en carpas y barbos, después de aplicar el análisis de regresión.

Tabla 2.4. Coeficientes de correlación de Pearson (r) entre los metales, la MT y el peso del animal en hígado de carpas (n=33).

	Ln Cu	Ln Zn	1/√Cd	Ln Hg	Ln MT
Ln Cu					
Ln Zn	0,2932				
1/√Cd	0,1071	0,1169			
Ln Hg	-0,1506	-0,0705	-0,8553**		
Ln MT	0,8498**	0,0573	-0,0033	-0,1319	
Ln peso	-0,1981	0,2080	-0,6030*	0,4447	-0,0416

(*) Niveles de significación de *0,05 y **0,01 después de la corrección de Bonferroni para test múltiples.

Tabla 2.5. Coeficientes de correlación de Pearson (r) entre los metales, la MT y el peso del animal en hígado de barbos (n=12).

	Cu	Zn	Hg	Ln Cd	Ln MT
Cu					
Zn	0,6514				
Hg	-0,0705	0,1871			
Ln Cd	-0,0235	0,3904	-0,1674		
Ln MT	0,7815*	0,2188	0,1011	-0,5187	
Ln peso	-0,0073	0,2447	0,8079*	0,2636	0,1272

(*) Niveles de significación de *0,05 y **0,01 después de la corrección de Bonferroni para test múltiples.

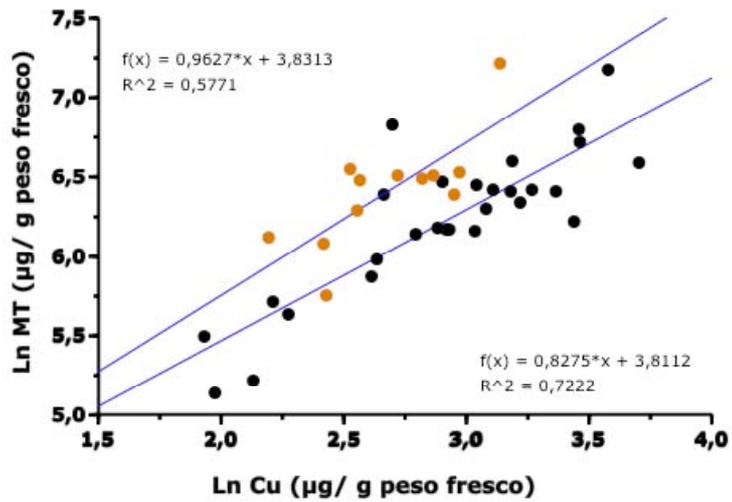


Figura 2.8. Rectas de regresión entre la concentración de Cu y MT en hígado de carpas (puntos negros, n=31) y barbos (puntos marrones, n=12) procedentes del río Ebro.

2.4. DISCUSIÓN.

El presente estudio muestra que los peces que habitan en el curso bajo-medio del río Ebro están expuestos a altas concentraciones de algunos metales, particularmente en las estaciones F y M. Las carpas procedentes de la estación F mostraron la mayor concentración de Cd en el hígado. Esto podría ser parcialmente explicado por la correlación positiva encontrada entre el contenido de Cd en hígado y el peso de las carpas, junto al elevado peso de los animales capturados en este punto. Los valores de Cd encontrados en este punto son comparables a las concentraciones alcanzadas (2,5 µg/g) en hígado de carpas tras una exposición a Cd (Kuroshima, 1992). Cabe destacar que el contenido de cadmio en

sedimentos del punto Flix, determinado por la Confederación Hidrográfica del Ebro (tabla 2.1), es mucho más alto que los niveles encontrados por esta organización en el resto de puntos muestreados (CHE, 2000). La concentración de Cd en sedimentos de la estación F supera la concentración en sedimentos de sistemas de agua dulce (3,5 µg/g peso seco) por encima de la cual pueden aparecer efectos biológicos adversos (CEQG, Canadian Environmental Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life, 2002), y excede también, el valor propuesto (5,0 µg/g peso seco) como objetivo de calidad para proteger a los animales que habitan en el sedimento de los ríos (Crane et al., 2002). Las concentraciones de Cd en el hígado de barbos capturados en la estación Z fueron similares a las obtenidas en carpas de la misma estación y a las de barbos muestreados en la estación M.

El contenido de Zn en el hígado de carpas capturadas en Flix fue significativamente menor (figura 2.5) que el obtenido en las otras estaciones, a pesar de que las concentraciones de Zn en los sedimentos del río encontradas por la CHE fueron similares en todos los puntos muestreados (65,2-96,4 µg/g peso seco). Según la literatura consultada, los valores medios de Zn en el hígado de carpas control están alrededor de 100 µg/g (Kuroshima, 1992; Sun y Jeng, 1998) y por tanto en el mismo rango que los encontrados en aquellas capturadas en la estaciones Z, L y D. El excepcionalmente bajo valor de Zn en las muestras de hígado correspondientes a Flix podría ser el resultado de la alta contaminación por cadmio en este punto. El efecto antagonista del cadmio sobre la captación y acumulación del Zn ha sido estudiado en diferentes sistemas biológicos (Torreblanca et al., 1992; Martínez et al., 1999). Además, Kuroshima (1992) encontró que el contenido de Zn en el hígado de carpas disminuía tras una exposición experimental a Cd. Los resultados obtenidos en el presente estudio proporcionan una evidencia de que este tipo de interacción se puede también manifestar en condiciones de campo. Las concentraciones de Zn en

hígado de barbos fueron menores que las determinadas en carpas. Estos resultados están en concordancia con las extraordinariamente altas concentraciones de Zn encontradas en carpas en relación con otras especies de peces (Sun y Jeng, 1998).

La concentración más alta de Hg detectada en el hígado de carpas fue en la estación F en comparación con el resto de puntos muestreados (figura 2.4), lo cual está de acuerdo con las elevadas concentraciones de Hg encontradas en sedimentos por la CHE en este mismo punto (tabla 2.1). Sin embargo, la elevada concentración de Hg (9,9 µg/g) detectada en el hígado de los barbos en el punto M, en relación con los moderados niveles encontrados en los sedimentos en esta misma estación, pueden ser explicados por el mayor tamaño de los individuos capturados en esta zona y por la correlación positiva encontrada entre la concentración de Hg y el peso de los barbos. Los niveles de Hg encontrados en sedimentos por la CHE se sitúan por encima de los valores en sedimentos indicados por los criterios de calidad canadienses (0,48 µg/g) y del objetivo de calidad para la protección de animales bentónicos de los ríos (1,1 µg/g) (Crane et al., 2002; CEQG, 2002). De la misma forma, los valores de mercurio determinados en hígado de individuos de ambas especies capturados en F y M están por encima de 0,033 µg/g, valor definido como nivel de probable efecto según las directrices de calidad ambiental canadiense (CEQG, 2002). La contaminación de mercurio en los afluentes del río Ebro ya fue estudiada por Raldúa y Pedrocchi (1996). Estos autores encontraron en peces capturados en el río Cinca (estación M) y en el río Gállego niveles de Hg, suficientemente altos para afectar a la salud humana. Además, sugieren que la principal fuente de contaminación de estas especies bentónicas es a través de los sedimentos, ya que los animales están en contacto casi continuo con éstos, por lo que, la disponibilidad de Hg o Cd se incrementaría durante la absorción a través de las branquias.

Después de la mortandad piscícola ocurrida en 1999, producida por contaminación por mercurio y por DTT principalmente, en el año 2000 las autoridades sanitarias locales prohibieron pescar ejemplares de más de 400 g en varios puntos del río Ebro. La mayoría de la contaminación de mercurio en los puntos F y M fue presumiblemente producida por plantas químicas de cloro-álcali. En las plantas tradicionales de cloro-álcali se produce simultáneamente hidróxidos de cloro y sodio mediante la electrólisis de agua salada (salmuera) en una celda de mercurio. En dichas celdas el mercurio líquido flota en lo alto de la celda actuando como cátodo. Debido a que este metal es muy volátil, durante el proceso suele ocurrir contaminación por mercurio tanto en el producto como en la corriente de agua salada. Actualmente estas dos industrias están implicadas en un plan voluntario de sustitución de las celdas de mercurio por tecnologías alternativas.

A pesar de los altos niveles de Cd alcanzados en el hígado de las carpas procedentes de la estación F, las concentraciones de MT fueron similares en todos los puntos de muestreo (figura 2.7). Los resultados publicados en la literatura sobre la dinámica de la síntesis de MT en hígado de carpas durante la exposición a Cd son contradictorios. Algunos autores (De Smet et al., 2001) no encuentran un aumento en las concentraciones de MT en carpas expuestas experimentalmente a cadmio (29 días de exposición a 790 µg/L), mientras que otros (De Conto et al., 1998) observan un incremento de MT hepática de hasta seis veces después de un periodo de exposición de 50 días a 440 µg/L. Sin embargo, cabe destacar que los valores de MT en la mayoría de individuos del presente estudio fueron altos, alcanzando hasta 1300 µg/g, si los comparamos con los valores de 200 µg/g aproximadamente encontrados en hígado de carpas control bajo condiciones de laboratorio, determinados por PPD (De Conto et al., 1998), o los 150 µg/g obtenidos en otro trabajo en el cual la MT se determinó por el método de saturación por Cd (De Boeck et al., 2003). Además, hay que tener en

cuenta que el método de determinación de MT utilizado en el presente estudio, proporciona valores ligeramente inferiores al método de PPD, según el ejercicio de intercalibración BEQUALM (Anexo 1). Sólo dos de las 31 carpas muestreadas mostraron niveles de MT similares o inferiores a estos valores basales, el resto de individuos mostraron concentraciones de MT elevadas para ser animales expuestos de forma natural.

Las concentraciones de Cu en hígado fueron similares en carpas y barbos, y los niveles determinados estuvieron en el mismo rango que los encontrados en hígado de carpas control (De Boeck et al., 2003), los cuales presentaban 20 µg/g de Cu aproximadamente. La CHE encontró valores en el contenido de Cu en los sedimentos similares en todos los puntos (12,8-22 µg/g peso seco), estando por debajo de la concentración de los criterios de calidad canadiense (CEQG, 2002; Crane et al., 2002), aunque son mayores a los encontrados en puntos contaminados del río Ferreira (Linde et al., 2001).

El hecho de que en el presente estudio el Cu fuera el único metal cuya concentración se correlacionó con MT, sugiere que la forma predominante de MT en carpas y barbos podría ser Cu-MT. Otros autores han encontrado resultados similares en ejemplares de *Salmo trutta* procedentes de ríos contaminados por metales, en los que aproximadamente el 60% de la MT total corresponde a MT unida a cobre (Olsvik, 2001). Otros estudios realizados en la especie anteriormente citada (Linde et al., 2001) concluyen que la MT unida a cobre es la forma predominante de MT, independientemente de los niveles de cobre encontrados en el ambiente. Además, también se encontró un alto factor de correlación entre cobre y metalotioneína en el hígado de carpas expuestas experimentalmente a concentraciones subletales de Cu (De Boeck et al., 2003).

Los resultados obtenidos en este trabajo junto con las determinaciones de sustancias peligrosas en biota y sedimentos realizados por la CHE en el año 2000 y los niveles de contaminantes persistentes encontrados en estos mismos puntos de muestreo (Lavado et al., 2006) indican una baja calidad del agua en algunas de las estaciones muestreadas, y la necesidad de abordar esta problemática de forma eficiente, para asegurar la salud de los animales que viven en el río Ebro. A pesar de todo esto, el río Ebro volvió a ser noticia en 2004. Un estudio del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y la Universidad Autónoma de Barcelona informó de la presencia de entre 200.000 y 300.000 toneladas de residuos tóxicos visibles en la superficie, acumulados en el cauce y orilla del río Ebro, entre Riba-roja y Flix. Entre los residuos había entre 90 y 180 toneladas de metales como el mercurio, unas diez toneladas de organoclorados como el DDT, y miles de toneladas de materiales radiactivos como la fosforita, procedentes del depósito de la empresa Erkimia (perteneciente al grupo Ercros).

2.5. BIBLIOGRAFÍA.

- CEQG (2002) "Canadian Environmental Quality Guidelines". Disponible en http://www.ccme.ca/publications/can_guidelines.html.
- CHE (Confederación Hidrográfica del Ebro) (2000) "Red de control de sustancias peligrosas de la cuenca del Ebro". Informe RCSP año 2000 (disponible en www.oph.chebro.es/DOCUMENTACION/Calidad/rcsp/informes/INFORMERCSP_CCAA2000.pdf).
- Crane, J.L.; MacDonald, D.D.; Ingersoll, C.G.; Smorong, D.E.; Lindskoog, R.A.; Severn, C.G.; Berger, T.A.; Field, L.J. (2002) "Evaluation of numerical sediment quality targets for the St. Louis River Area of Concern". *Arch Environ Contam Toxicol.* **43**: 1-10.
- De Boeck, G.; De Wachter, B.; Vlaeminck, A.; Blust, R. (2003) "Effect of cortisol treatment and/or sublethal copper exposure on copper uptake and heat shock protein levels in common carp, *Cyprinus carpio*". *Environmental Toxicology and Chemistry.* **22**: 1122-26.
- De Conto Cinier, C.; Petit-Ramel, M.; Faure, R.; Bortolato, M. (1998) "Cadmium accumulation and metallothionein biosynthesis in *Cyprinus carpio* tissues". *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology.* **61**: 793-99.

- De Smet, H.; De Wachter, B.; Lobinski, R.; Blust, R. (2001) "Dynamics of (Cd,Zn)-metallothioneins in gills, liver and kidney of common carp *Cyprinus carpio* during cadmium exposure". *Aquatic Toxicology*. **52**: 269-81.
- Del Ramo, J.; Torreblanca, A.; Martínez, M.; Pastor, A.; Díaz-Mayans, J. (1995) "Quantification of Cadmium-Induced Metallothionein in Crustaceans by the Silver-Saturation Method". *Marine Environmental Research*. **39**: 121-25.
- Fernandez, M.A.; Alonso, C.; Gonzalez, M.J.; Hernandez, L.M. (1999) "Occurrence of organochlorine insecticides, PCBs and PCB congeners in waters and sediments of the Ebro River (Spain)". *Chemosphere*. **38**: 33-43.
- Kuroshima, R. (1992) "Comparison of Cadmium Accumulation in Tissues Between Carp *Cyprinus carpio* and Red Sea Bream *Pagrus major*". *Nippon Suisan Gakkaishi*. **58**: 1237-42.
- Lavado, R.; Ureña, R.; Martin-Skilton, R.; Torreblanca, A.; Del Ramo, J.; Raldúa, D.; Porte, C. (2006) "The combined use of chemical and biochemical markers to assess water quality along the Ebro River". *Environ Pollut*. **139**: 330-39.
- Linde, A.R.; Sanchez-Galan, S.; Valles-Mota, P.; Garcia-Vazquez, E. (2001) "Metallothionein as bioindicator of freshwater metal pollution: European eel and brown trout". *Ecotoxicology & Environmental Safety*. **49**: 60-63.
- Martínez, M.; Del Ramo, J.; Torreblanca, A.; Díaz Mayans, J. (1999) "Effect of cadmium exposure on zinc levels in the brine shrimp". *Aquaculture*. **172**: 315-25.
- Olsvik, P.A.; Gundersen, P.; Andersen, R.A.; Zachariassen, K.E. (2001) "Metal accumulation and metallothionein in brown trout, *Salmo trutta*, from two Norwegian rivers differently contaminated with Cd, Cu and Zn". *Comparative Biochemistry & Physiology C, Toxicology & Pharmacology*. **128**: 189-201.
- Raldúa, D.; Pedrocchi, C. (1996) "Mercury Concentrations In Three Species Of Freshwater Fishes From the Lower Gállego and Cinca Rivers, Spain". *Bulletin Of Environmental Contamination And Toxicology*. **57**: 597-602.
- Ramos, L.; Fernandez, M.A.; Gonzalez, M.J.; Hernandez, L.M. (1999) "Heavy metal pollution in water, sediments, and earthworms from the Ebro River, Spain". *Bull Environ Contam Toxicol*. **63**: 305-11.
- Scheuhammer, A.M.; Cherian, M.G. (1986) "Quantification of Metallothioneins by a Silver-Saturation Method". *Toxicology and Applied Pharmacology*. **82**: 417-25.
- Sun, L.T.; Jeng, S.S. (1998) "Comparative zinc concentrations in tissues of common carp and other aquatic organisms". *Zoological Studies*. **37**: 184-90.
- Torreblanca, A.; Del Ramo, J.; Sarkar, B. (1992) "Cadmium effect on zinc metabolism in human trophoblast cells: involvement of cadmium-induced metallothionein". *Toxicology*. **72**: 167-74.

3. ESTUDIOS EN ANGUILA EUROPEA *Anguilla anguilla*

3. ESTUDIOS EN ANGUILA EUROPEA *Anguilla anguilla*.

3.1. INTRODUCCIÓN.

La anguila europea (*Anguilla anguilla*) perteneciente al orden Ápoda de la clase osteictios, se caracteriza por su peculiar ciclo de vida, del cual hay aspectos que aún no se conocen en su totalidad. Las anguilas adultas (anguila plateada) ponen sus huevos en aguas del Mar de los Sargazos, posteriormente las larvas leptocéfalas realizan una migración hacia las costas europeas de unos dos años de duración. Cuando alcanzan las costas sufren una metamorfosis, transformándose en angulas que comienzan a colonizar las aguas continentales. Éstas van adquiriendo su coloración característica hasta completar su crecimiento en forma de "anguilas pardas" también llamadas pasturencas en la Comunidad Valenciana. Cuando alcanza la madurez sexual pasa a llamarse anguila plateada, o maresa en esta región, y comienza la migración marina de desove hacia el Atlántico, en el Mar de los Sargazos, donde muere.

Gastronómicamente es un alimento muy apreciado en la ciudad de Valencia y alrededores, y existen tradiciones muy arraigadas alrededor de la pesca de esta especie en el lago de la Albufera. También es apreciada en otros países europeos, siendo los países asiáticos los principales consumidores. La población de anguila europea se ha reducido considerablemente debido a la sobreexplotación de angulas, anguilas pardas y anguilas plateadas (Dekker, 2000). La destrucción y alteración de los hábitats naturales también ha contribuido a este descenso en su abundancia (Feunteun, 2002; Robinet y Feunteun, 2002; Pérez et al., 2004). Otros factores que pueden haber afectado a la reducción de las poblaciones de esta especie son la contaminación de los ecosistemas y la propagación de enfermedades. Ante el descenso del volumen de capturas de anguila de su medio natural, que resulta insuficiente para abastecer la demanda del

mercado, se ha producido un aumento de la acuicultura intensiva durante las últimas décadas (Pérez et al., 2004). Ésta se basa en el engorde de angulas capturadas de su medio natural, ya que no se ha conseguido que esta especie se reproduzca en condiciones de cautividad. Este hecho ocasiona que en el mercado coexistan anguilas procedentes del lago y anguilas procedentes de piscifactoría.

El lago de la Albufera está situado a 5 km de la ciudad de Valencia y tiene una extensión de 2300 ha (figura 3.1). Es un espacio protegido de importancia internacional, y debido a su gran relevancia ecológica está clasificado como Parque Natural. A pesar de ser un reserva natural protegida, en la actualidad está sometida a diversos impactos ambientales. Recibe, a través de los canales de irrigación, vertidos de residuos urbanos, industriales y agrícolas, parte de los cuales no han sido adecuadamente depurados. Los sedimentos de este lago presentan concentraciones significativas de algunos metales, y se han encontrado altas concentraciones de Cu y Zn en el agua de algunos canales de irrigación (Boluda et al., 2002). Se sabe que los fertilizantes aplicados en los campos de arroz que circundan el lago son una fuente de metales (Gimeno-García et al., 1996). Además, la Albufera de Valencia es el humedal mediterráneo con mayor cantidad de perdigones de plomo en sus sedimentos (Mateo et al., 1998).

La calidad del agua y la alimentación pueden ser determinantes en la composición de metales de los tejidos de anguila. Se han publicado varios trabajos sobre el contenido de metales en diferentes tejidos de anguila salvaje (tabla 3.3), sin embargo, no conocemos la existencia de estudios de este tipo en anguilas cultivadas. Además, los estudios que comparan los niveles de contaminantes en peces cultivados y salvajes son escasos (Alam et al., 2002; Alasalvar et al., 2002; Easton et al., 2002; Foran et al., 2004; The scientific panel on contaminants in the food Chain, 2005; Fernandes et al., 2006) y no hay datos publicados en *Anguilla anguilla*.

La MT de anguila ha recibido atención por algunos autores (tabla 3.4), pero en casi todos los casos se centra en MT hepática. A pesar de que en peces las branquias y el riñón son órganos diana en la toxicidad de los metales y están implicados en su detoxificación (Olsson et al., 1998), el papel de estos órganos ha recibido poca atención en anguila.

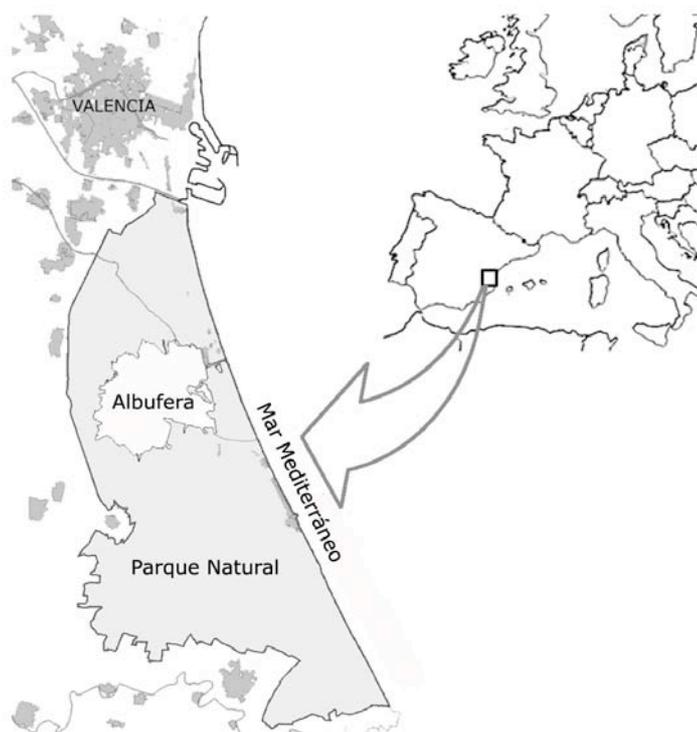


Figura 3.1. Situación geográfica del Parque Natural de la Albufera.

Como ya hemos descrito en el capítulo 1, la MT juega un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis y la detoxificación de los metales. No se conoce totalmente algunos aspectos de la función de la metalotioneína en la intoxicación por plomo, siendo contradictorios algunos

de los resultados publicados hasta el momento en cuanto a la inducción de MT por plomo y la unión del metal a esta proteína (Chu et al., 2000; Park et al., 2001; Campana et al., 2003; Jurczuk et al., 2006).

Uno de los efectos tóxicos del plomo mejor conocido es la inhibición del enzima ácido δ -aminolevulínico deshidratasa (ALAD), el cual participa en la biosíntesis del grupo hemo. Este enzima cataliza la condensación de dos moléculas de ácido δ -aminolevulínico (ALA) para formar porfobilinógeno (PBG), un precursor de la hemoglobina (Hb). El ALAD es una metaloproteína que en la mayoría de los animales utiliza el Zn^{+2} como cofactor metálico. Además, el Pb también puede alterar otras vías de la síntesis del grupo hemo, disminuyendo la actividad de enzimas como la coproporfirinógeno oxidasa y la ferroquelatasa; esta última cataliza la incorporación de hierro a la estructura de anillo de la porfirina (Goyer, 1993). A diferencia de lo observado en otras especies de peces (Rodrigues et al., 1989; Nakagawa et al., 1998; Campana et al., 2003) no se ha descrito inhibición de ALAD en los tejidos de *Anguilla* a pesar de existir algún estudio sobre el efecto del Pb en esta especie (Santos y Hall, 1990). Los objetivos del presente capítulo fueron:

1. Estudiar la influencia del ambiente en el que se desarrollan las anguilas (medio natural o cultivo intensivo) sobre el contenido de metales y de MT de sus tejidos.
2. Determinar la implicación de la MT en los efectos de la exposición crónica a plomo en *Anguilla anguilla*.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.2.1. Diferencias en el contenido en metales y en metalotioneína entre anguilas salvajes y cultivadas.

3.2.1.1. Obtención de las muestras.

En los meses de Octubre y de Noviembre de 2003 se obtuvieron anguilas pardas de la especie *Anguilla anguilla* de distinta procedencia. Doce ejemplares eran anguilas salvajes capturadas en el Parque Natural de la Albufera de Valencia (figura 3.1) por pescadores de la Cofradía de Pescadores del Palmar y otros 12 ejemplares eran anguilas cultivadas procedentes de una piscifactoría local. Los animales fueron trasladados al laboratorio y situados en recipientes con agua que contenían 100 mg/L del anestésico MS222 (metansulfonato de tricaina). Una vez adormecidos se procedió a anotar el peso y la longitud de los ejemplares que fueron posteriormente sacrificados por decapitación. Tras tomar una muestra de sangre se diseccionaron los diferentes tejidos (hígado, riñón, músculo caudal y branquias), se pesaron y se guardaron identificados y divididos en porciones a -80°C , para los diferentes análisis posteriores. Se calculó el índice de condición como $[\text{peso del animal}/(\text{longitud})^3] \times 100$ y el índice hepatosomático (HSI) como $[\text{peso del hígado} / \text{peso del animal}] \times 100$.

3.2.1.2. Determinación de metalotioneína por polarografía (PPD).

Una porción de aproximadamente 0,1-0,5 g de las muestras de cada tejido, fue homogeneizada en hielo con una Ultra-turrax en 2,3 mL de tampón Tris-HCl 20 mM pH 8,6, con 1 mM de DTT y 0,2 mM de PMSF. Los homogeneizados fueron centrifugados a 30.000 g durante 45 minutos a 4°C ,

y el sobrenadante obtenido se transfirió a tubos limpios y se calentó a 80°C durante 10 minutos, con el fin de desnaturalizar las proteínas. Posteriormente, se volvió a centrifugar a 30.000 g durante 45 minutos a 4°C, para precipitar las proteínas desnaturalizadas y se recuperó el sobrenadante que contiene en solución la MT que es termoestable (figura 3.2).

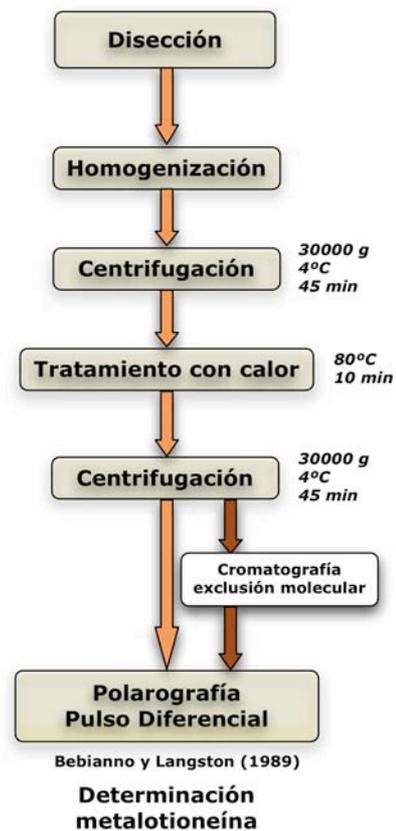


Figura 3.2. Procedimiento de determinación de MT por PPD.

La determinación de MT en el sobrenadante se realizó mediante el método de Polarografía de Pulso Diferencial (PPD) descrito por Bebianno y

Langston (1989). Se añadió una alícuota del sobrenadante de 25 μL (hígado y riñón) o 50 μL (branquias) en la célula polarográfica que contenía 20 mL de electrolito soporte (cloruro de hexaminocobalto) junto con 250 μL de Triton X-100 a una concentración de 0,025%. La célula se purgó durante 2 min con N_2 purificado antes del análisis. Posteriormente se midió la respuesta polarográfica de la muestra durante un barrido de potencial de -1,38 V hasta -1,7 V mediante un analizador modelo Methrom 757 (VA Computrace, Methrom, Switzerland) en modo SMDE (electrodo de gotas de mercurio estacionario).

La cuantificación se realizó usando el método de adiciones estándar con MT I+II (Sigma), adicionando 250 μL de MT patrón con una concentración de 10 mg/L en agua destilada. Finalmente, se compararon las alturas de las curvas polarográficas de la muestra y las adiciones. Los resultados se expresaron como $\mu\text{g/g}$ de peso fresco.

3.2.1.3. Determinación de metales.

Se pesó una porción de 0,1-0,5 g de cada uno de los tejidos y se digirieron con HNO_3 al 65% (Baker) a temperatura ambiente durante toda la noche y dos horas a 80°C. Las muestras de sangre se digirieron con ácido nítrico concentrado y peróxido de hidrógeno en las mismas condiciones. En cada serie de digestiones se utilizaron blancos con agua ultrapura sometidos al mismo procedimiento. Después de enfriadas, se diluyeron con agua ultrapura hasta un volumen final constante. La determinación de la concentración de metales (Cu, Zn, Mn, Fe, Cd, Hg y Pb) en todos los tejidos y el contenido de Pb en sangre se realizó en los Servicios científico-técnicos de la Universidad de Barcelona usando un espectrómetro de masas con fuente de plasma acoplado (ICP-Masas) modelo ELAN 6000 Perkin-Elmer. En cada serie de digestiones se incluyeron muestras de similar peso de material

certificado de referencia (TORT-2, DORM-2, DOLT-3 National Research Council, Canada, Ottawa y ERM-CE195, Institute for Reference Materials and Measurements). Los resultados obtenidos del material de referencia se muestran en la tabla 3.1.

3.2.1.4. Análisis estadístico.

El tratamiento estadístico de los resultados se realizó mediante el software Stata 9 (Stata Corp.) para Mac OS X. Se analizó la normalidad de todas las variables consideradas y se realizaron las transformaciones más adecuadas en aquellas variables que no presentaban una distribución normal. Para comparar todas las variables consideradas en los dos grupos de anguilas se realizó un test de la *t*, y cuando las variables fueron heterogéneas se aplicó el test de Welch. Los valores de *p* menores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson de los parámetros seleccionados en cada grupo de anguilas para evaluar la relación existente entre dichas variables. La transformación realizada en cada parámetro queda indicado en las gráficas y tablas.

3.2.2. Efectos de la exposición a plomo en anguila.

3.2.2.1. Obtención de las muestras y exposición a plomo.

Se obtuvieron 30 ejemplares de *Anguilla anguilla* procedentes, de una piscifactoría local, en Octubre de 2003. Antes de iniciar el experimento fueron aclimatados al laboratorio durante una semana en acuarios de 115 litros con aireación, a 25 °C. Los individuos se asignaron al azar a uno de los dos grupos experimentales: el grupo control y el grupo expuesto a 100 µg/L de plomo. La concentración deseada de plomo se consiguió mediante la

adición de una solución de acetato de plomo. La duración del experimento fue de tres semanas. Cada semana se renovó el agua de los acuarios y se tomaron muestras para determinar la concentración de Pb presente obteniéndose valores medios de 0,2 µg/L en el grupo control y de 50,4 en el expuesto. Después de 7, 14 y 21 días de exposición se muestrearon al azar 5 individuos de cada grupo. Los ejemplares se pesaron, se midió su longitud y se calculó el índice de condición y el índice hepatosomático (HSI) como queda descrito en el estudio anterior.

3.2.2.2. Determinación de metalotioneína y de metales.

La disección de los animales, el procesado de las muestras, así como la determinación de MT se realizó de la misma forma descrita en el apartado 3.2.1. Se determinó la concentración de MT en los tejidos de cada uno de los ejemplares. Además, se determinó la actividad enzimática de ALAD en la sangre, el hígado, el riñón y el bazo de los individuos de ambos grupos, siguiendo el método propuesto en el ejercicio de intercalibración BEQUALM 2000. Además se determinó el hematocrito como volumen del paquete globular respecto el volumen total de sangre. Las determinaciones de actividad ALAD y el hematocrito fueron realizadas por la Dra. Silvia Peri, profesora de la Universidad Nacional de la Plata (Buenos Aires, Argentina) durante una estancia como profesora invitada en nuestro laboratorio. Los resultados obtenidos de dichas determinaciones se incluyen en este trabajo para poder interpretar en conjunto otros resultados obtenidos dentro de este estudio.

La digestión de los tejidos se realizó de la misma forma descrita en el apartado 3.2.1. El análisis del contenido en Pb de los tejidos (hígado, riñón, branquias, músculo y sangre) se realizó mediante espectrofotometría de absorción atómica en cámara de grafito a 283,3 nm con un equipo modelo

Zeeman ZL4100 Perkin–Elmer. La determinación del resto de metales (Cu, Zn, Cd, Mn y Fe) en el hígado y en el músculo fue realizada en los Servicios científico-técnicos de la Universidad de Barcelona usando un espectrómetro ICP-Masas modelo ELAN 6000 Perkin-Elmer. En cada serie de digestiones se incluyeron muestras de similar peso de material certificado de referencia (TORT-2, DORM-2, DOLT-3 Nacional Research Council, Canada, Ottawa y ERM-CE195, Institute for Reference Materials and Measurements). Los resultados obtenidos del material de referencia se muestran en la tabla 3.1.

3.2.2.3. Cromatografía de exclusión molecular.

La columna cromatográfica se preparó con gel Sephadex G-75 hasta alcanzar un volumen aproximado de 200 mL. La columna fue equilibrada con Tris-HCl 20 mM pH 8,6; 1 mM de DTT y 0,01 M de NaCl a 4°C. Posteriormente, se calibró con marcadores estándar de peso molecular: citocromo C, quimiotripsinógeno A, albúmina y MT comercial de hígado de conejo. El volumen vacío y el volumen total de la columna se determinaron mediante azul dextrano y cloruro de cobalto, respectivamente. Se realizó el fraccionamiento cromatográfico de la fracción citosólica correspondiente al hígado de una anguila expuesta a Pb durante tres semanas. Para ello el tejido fue homogeneizado y centrifugado como se describe en la figura 3.2. Se tomó una alícuota de 850 µL del sobrenadante obtenido tras la primera centrifugación y antes del tratamiento con calor. Dicha solución se aplicó a la columna cromatográfica y se eluyó con un flujo de 20 mL/h, recogiendo fracciones de 4 mL. Todas la cromatografías presentadas en los distintos estudios se hicieron en las mismas condiciones. En cada fracción se determinó las proteínas tiólicas en base a su respuesta polarográfica, añadiendo en este caso 250 µL de eluido a la célula polarográfica, y se determinó las concentraciones de Cd, Zn, Cu y Pb mediante ICP-Masas (modelo ELAN 6000 Perkin-Elmer) en los Servicios científico-técnicos de la

Universidad de Barcelona. También se sometió a fraccionamiento cromatográfico el sobrenadante obtenido tras el tratamiento con calor y una segunda centrifugación y se determinó la respuesta polarográfica de las fracciones.

3.2.2.4. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó utilizando el mismo paquete estadístico que en estudios anteriores. Se analizó la normalidad de todas las variables consideradas y se realizaron las transformaciones más adecuadas en aquellas variables que no presentaban una distribución normal. La transformación realizada en cada parámetro queda indicado en las gráficas y tablas presentadas. Se realizó un análisis de correlación para las distintas parejas de variables, mediante el test de Pearson. Los valores de p menores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. También se llevó a cabo un análisis de regresión para ver la naturaleza de la relación entre las variables correlacionadas. Con el fin de establecer las posibles diferencias debidas al tratamiento con plomo y al tiempo de exposición al mismo, se realizó un ANOVA de doble vía para cada una de las variables consideradas y se empleó el test de Bonferroni como test *a posteriori*.

3.3. RESULTADOS.

3.3.1. Diferencias en el contenido en metales y en metalotioneína entre anguilas salvajes y cultivadas.

En la tabla 3.1 se muestran las concentraciones de metal obtenidas del material de referencia frente a su valor certificado.

Tabla 3.1. Límites de detección (LD), valores certificados (VC) y valores encontrados (VE) en el material de referencia TORT-2, DORM-2, DOLT-3 y ERM-CE195 (n=5). Los datos se expresan como valor medio±D.E.

	LD (µg/L)	TORT-2 (mg/kg)		DORM-2 (mg/kg)		DOLT-3 (mg/kg)		ERM-CE195 (µg/L)	
		VC	VE	VC	VE	VC	VE	VC	VE
Pb	0,1	0,35±0,13	0,35±0,14	0,065±0,007	0,064±0,02	0,32±0,05	0,33±0,05	416	415±21
Cu	1,0	106±10	106,4±2,3	2,34±0,16	2,14±0,36	31,2±1,0	30,2±1,3		
Cd	0,1	26,7±0,6	26,1±1,3	0,043±0,008	0,043±0,08	19,4±0,6	18,8±0,7		
Zn	5,0	180±6	181,3±7,2	25,6±2,3	26,5±1,9	86,6±2,4	84,8±4,2		
Hg	0,2	0,27±0,06	0,32±0,02	4,64±0,26	4,9±0,3	3,37±0,14	3,38±0,12		
Fe	10,0	105±13	104,2±13,4	142±10	138±12	1484±57	1479±76		
Mn	0,1	13,6±1,2	13,8±0,94	3,66±0,34	3,48±0,65				

Las principales características biométricas de los ejemplares de anguila empleados en el presente estudio se resumen en la tabla 3.2. Se han encontrado diferencias entre los dos grupos de anguilas en algunos parámetros biométricos. Las anguilas cultivadas mostraron un índice de condición significativamente mayor que las salvajes. El índice hepatosomático también fue estadísticamente diferente entre los dos grupos.

Tabla 3.2. Datos morfométricos de anguilas salvajes y cultivadas. *Diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$) (n=12). Los datos se expresan como valor medio±D.E.

Origen	Longitud (cm)	Peso (g)	Índice de condición (g/cm ³)	Índice hepatosomático
Salvaje	44,3±7,5	133±58	0,15±0,02	1,31±0,23
Cultivada	38,5±2,6*	121±22	0,21±0,04*	1,07±0,23*

Las concentraciones de metales determinadas en los tejidos se muestran en la figura 3.3 y el rango obtenido de las mismas en la tabla 3.3. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre anguilas salvajes y cultivadas en algunos de los metales analizados. El contenido de Zn fue significativamente menor en branquias y riñón de anguilas cultivadas. La concentración de Cu en el hígado de los individuos cultivados fue mayor, pero en branquias y riñón se encontró una concentración inferior de este metal respecto a la encontrada en anguilas salvajes. Las anguilas cultivadas exhibieron mayores niveles de Mn en hígado, a diferencia de las branquias en las que fueron inferiores. El contenido de Fe fue más bajo en hígado y mayor en riñón de anguilas cultivadas. En cuanto a los metales no esenciales, el contenido de Pb fue estadísticamente mayor en branquias y riñón de anguilas salvajes, y la concentración encontrada en sangre fue de $0,111\pm 0,08$ y $0,037\pm 0,09$ ng/ μ L para anguilas salvajes y cultivadas respectivamente, siendo diferentes de forma significativa. La concentración de Cd fue muy superior en hígado y en riñón de anguilas cultivadas. En riñón de anguilas cultivadas se encontraron mayores concentraciones de Hg. Estos resultados demuestran la diferencia en el contenido de metal y su distribución en los órganos de los dos grupos de anguilas estudiados. El resultado más significativo fue la alta concentración de Cd determinada en branquias, hígado y riñón de anguilas cultivadas en comparación con la encontrada en anguilas procedentes de la Albufera.

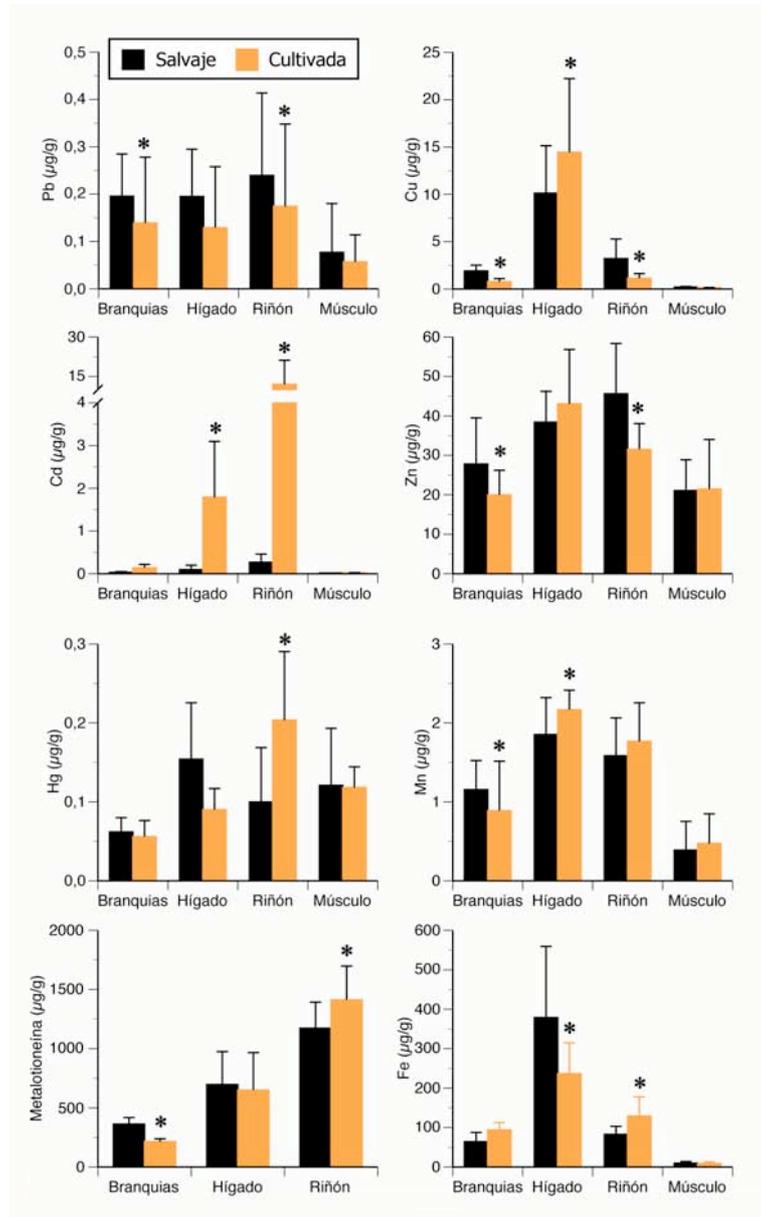


Figura 3.3. Concentraciones de metales y MT en anguilas salvajes y cultivadas. (*) Diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$) ($n = 12$). Los datos se expresan como valor medio \pm D.E.

La concentración de MT determinada en los tejidos se muestra en la figura 3.3 y el rango de valores en la tabla 3.4. El contenido de MT en los distintos tejidos sigue el siguiente orden tanto en anguilas salvajes como en cultivadas: riñón>hígado>branquias. Las branquias de anguilas cultivadas mostraron menor contenido de MT que las anguilas salvajes, mientras que la MT en riñón de anguilas cultivadas fue significativamente superior que la de las anguilas salvajes.

Los coeficientes de correlación de Pearson y su nivel de significación se muestran en las tablas 3.5, 3.6 y 3.7 para las branquias, hígado y riñón, respectivamente.

Las concentraciones de Cd en hígado y riñón están correlacionadas con el índice hepatosomático en anguilas cultivadas, reflejando una disminución en el HSI cuando el contenido de Cd aumenta. Una relación similar con el HSI se encontró para la concentración de Hg en hígado de ejemplares salvajes y en el riñón de ejemplares cultivados.

Se encontró una correlación altamente significativa entre la concentración de MT y el contenido de Cu en hígado de anguilas salvajes. La relación matemática entre estas variables se puede ver en la figura 3.4. La correlación que relaciona la MT y la concentración de Cd en riñón de anguilas cultivadas indica una fuerte asociación positiva entre ambas variables. Como se puede ver en la figura 3.5, las anguilas salvajes y cultivadas se pueden discriminar perfectamente por su contenido en Cd y MT.

Tabla 3.3. Rango de concentraciones de metal ($\mu\text{g/g}$ peso fresco) en *Anguilla anguilla* medidas por diferentes autores.

Referencia	Tejido	Pb	Cu	Zn	Cd	Mn	Hg	Fe
Este estudio (salvajes)	Hígado	0,07-0,44	6,10-23,62	25,65-50,95	0,03-0,33	1,41-2,91	0,07-0,33	189-819
	Músculo	0,02-0,23	0,18-0,33	12,79-36,77	< 0,02	0,10-1,46	0,02-0,24	3,72-17,12
	Riñón	0,08-0,67	1,83-8,83	29,72-70,19	0,08-0,64	0,70-2,57	0,07-0,29	39,02-114,66
	Sangre***	0,01-0,27						
	Branquias	0,07-0,40	1,12-3,04	17,73-56,33	0,03-0,08	0,50-1,79	0,06-0,12	27,09-112,76
Este estudio (cultivadas)	Hígado	0,02-0,34	5,41-35,88	18,26-69,75	0,40-3,80	0,62-2,65	0,08-0,17	147-367
	Músculo	0,02-0,30	< 0,17	9,53-49,45	< 0,02	0,08-1,15	0,08-0,16	3,47-18,02
	Riñón	0,07-0,53	0,34-2,13	24,09-42,48	3,95-35,50	0,78-2,34	0,08-0,38	59,27-249,68
	Sangre***	0,03-0,06						
	Branquias	0,08-0,27	0,46-1,61	12,49-31,70	0,07-0,34	0,34-2,13	0,03-0,10	56,15-115,08
Langston et al. 2002**	Hígado		1,58-24,94	30,57-99,70	0,11-0,36			
Linde et al. 1999	Hígado	0,50	8,50	28	0,60			
	Riñón	0,60	1,50	29	1,40			
Linde et al. 2001	Hígado	0,54-1,42	11,56-15,94	35,90-46,79	1,49-2,62			
Linde et al. 2004	Hígado	0,14-1,90	5,20-10,50		0,46-1,41		0,16-0,48	
	Músculo	0,001-0,108	0,15-0,29		0,006-0,060		0,15-0,53	
Noel-Lambot y Bouquegneau 1977*	Hígado				4,80 ^a		48,50 ^b	
	Riñón				16 ^a		116 ^b	
	Branquias				2 ^a		67 ^b	
	Músculo				0,20 ^a		13,40 ^b	

(*) Expuestos experimentalmente a cadmio^a o mercurio^b o plomo^c.

(**) Razón peso fresco/seco utilizada para las transformaciones hígado=4, músculo=3.

(***) ng/ μL .

Tabla 3.3. (Continuación).

Referencia	Tejido	Pb	Cu	Zn	Cd	Mn	Hg	Fe
Noel-Lambot et al. 1978	Hígado Branquias		14,50	43,50	1,20 0,20			
Maes et al. 2005	Músculo	0,05-0,10	0,37-1,20	17-33	0,01-0,02		0,06-0,24	
Ribeiro et al. 2005**	Hígado	0,09-0,16	14,75-19,00	50,25-53,75	0,03-0,11	1,88-1,93	0,08-0,19	200-293
	Músculo	0,07-0,26	0,06-0,14	18,3-19,3		0,04-0,11	0,05-0,20	4,0-4,6
Batty et al. 1996	Hígado	0,01-2,13	2-99	15-73	0,006-0,250		0,08-0,81	
Mason y Barak, 1990	Hígado	0,48-0,82			0,01-2,30			
Usero et al. 2004	Hígado	0,40-0,60	16-32	32-45	0,12-0,48	2,22-4,50	0,011-0,023	365-560
	Músculo	0,015-0,050	0,50-1,50	10-13	0,03-0,09	4,7-14,1	0,010-0,023	4,11-5,89
Zimmermann et al. 1999*	Hígado	14 ^c						
	Músculo	1,5 ^c						
	Branquias	3,5 ^c						
	Sangre	17 ^c						
Manzini et al. 2005**	Músculo	0,02-0,03			0,0002-0,0003		0,077-0,080	
Bordajandi et al. 2003	Músculo	0,02-0,26	0,22-0,98	12-17	0,00296-0,00792			
Yamaguchi et al. 2003	Músculo						153-312	
Cid et al. 2001	Músculo	0,04-0,08	0,64-1,04	14-23	0,00898-0,0423			
Palikova y Barus, 2003	Músculo						0,16-0,83	
	Hígado						0,18-1,43	

(*) Expuestos experimentalmente a cadmio^a o mercurio^b o plomo^c.

(**) Razón peso fresco/seco utilizada para las transformaciones hígado=4, músculo=3.

(***) ng/μL.

Tabla 3.4. Rango de concentraciones de MT ($\mu\text{g/g}$ peso fresco) en tejidos de anguilas medidas por diferentes métodos.

Referencia	Tejido	Metalotioneína	Método de determinación
Este estudio (salvajes)	Hígado	437-1260	PPD
	Riñón	935-1586	
	Branquias	293-504	
Este trabajo (cultivadas)	Hígado	299-1378	PPD
	Riñón	1055-2002	
	Branquias	167-241	
Langston et al. 2002	Hígado	280-2580	PPD
Linde et al. 1999	Hígado	110	Cd-chelex y TTM
	Riñón	13	
Linde et al. 2001	Hígado	100-180	Cd-chelex y TTM
Noel-Lambot et al. 1978	Hígado	350-3500	Estequiometría metal
Gorbi et al. 2005	Hígado	15 ^a	Espectrofotométrico

^a nmol SH equivalentes/mg proteína

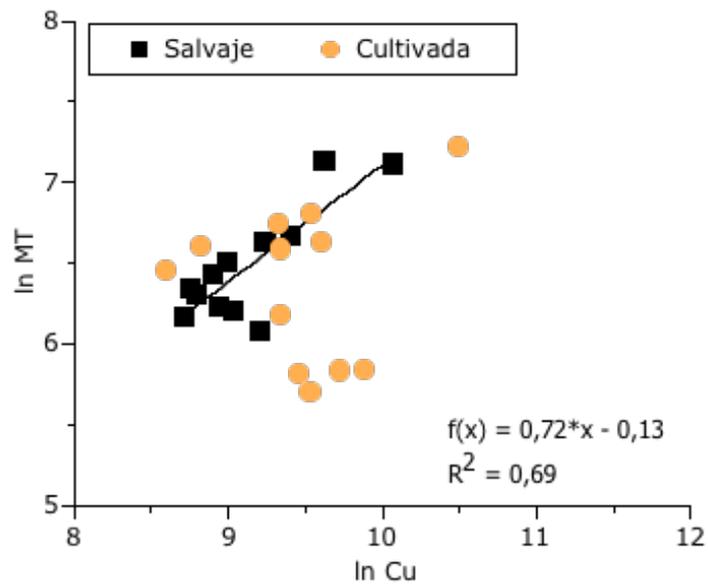


Figura 3.4. Relación entre la concentración de MT y de Cu en hígado de anguilas salvajes y cultivadas (n=12). Se representa la recta de regresión correspondiente a las anguilas salvajes.

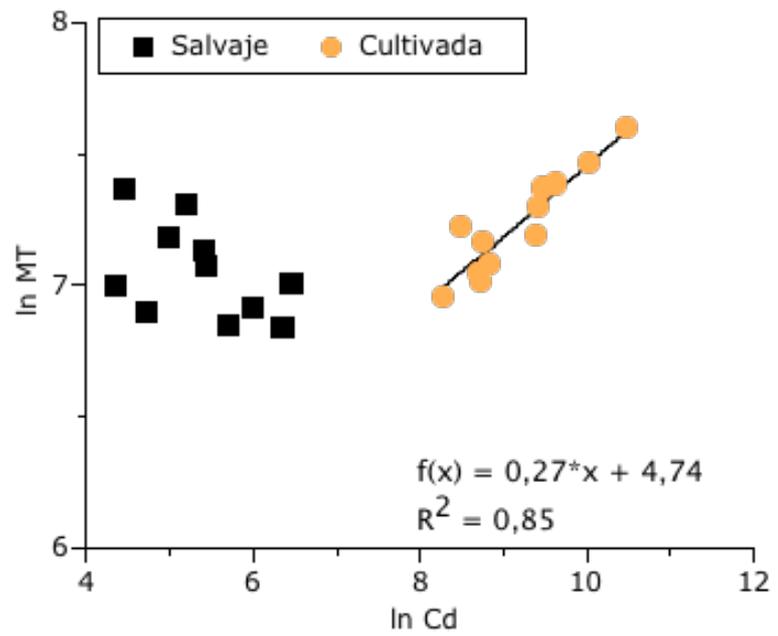


Figura 3.5. Relación entre la concentración de MT y de Cd en riñón de anguilas cultivadas y salvajes (n=12). Se representa la recta de regresión correspondiente a las anguilas cultivadas.

Tabla 3.5.- Coeficientes de correlación de Pearson (r) para la longitud del animal, índice de condición (IC), índice hepatosomático (HSI), MT y concentración de metales en branquias de anguilas. N.D.= valores por debajo del límite de detección (n=12).

Metal	Anguila cultivada				Metal	Anguila salvaje			
	Longitud	IC ^a	HSI	MT		Longitud	IC	HSI	MT ^a
Pb	-0,5219	-0,0201	-0,0615	-0,7590*	Pb	-0,3990	-0,2794	-0,2489	-0,1147
Cu ^a	0,0019	0,6273	0,5654	0,1947	Cu	-0,1579	0,0456	-0,3060	0,0715
Zn	0,1393	0,6768*	-0,0300	-0,1784	Zn ^a	0,6779*	-0,4858	0,1155	0,2087
Cd ^a	0,3898	0,0777	0,0916	0,5270	Cd	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

Se indican los niveles estadísticamente significativos *0,05 **0,01 y ***0,001.

^a 1/x transformación realizada

Tabla 3.6.- Coeficientes de correlación de Pearson (r) para la longitud del animal, índice de condición (IC), índice hepatosomático (HSI), MT y concentración de metales en hígado de anguilas. N.D.= valores por debajo del límite de detección (n=12).

Metal	Anguila cultivada				Metal	Anguila salvaje			
	Longitud	IC ^a	HSI	MT		Longitud	IC	HSI	MT ^a
Pb ^b	0,5235	0,0814	-0,0217	0,0506	Pb	-0,2463	0,2240	0,6397*	0,0368
Cu ^b	-0,4009	-0,2697	-0,4446	0,2942	Cu ^a	0,6622*	-0,4789	-0,0995	-0,7371**
Zn ^b	0,0527	0,1192	0,6303*	0,2306	Zn	-0,5874*	-0,4383	0,6238*	-0,5059
Cd ^a	0,2216	-0,0972	0,6524*	0,2306	Cd	-0,1691	0,2688	-0,0555	-0,1992
Hg	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	Hg	0,2429	-0,2849	-0,7456**	0,3684

Se indican los niveles estadísticamente significativos *0,05 **0,01 y ***0,001.

^a 1/x transformación realizada.

^b ln transformación realizada.

Tabla 3.7.- Coeficientes de correlación de Pearson (r) para la longitud del animal, índice de condición (IC), índice hepatosomático (HSI), MT y concentración de metales en riñón de anguilas. N.D.= valores por debajo del límite de detección (n=12).

Metal	Anguila cultivada				Metal	Anguila salvaje			
	Longitud	IC	HSI	MT		Longitud	IC	HSI	MT
Pb ^a	0,3015	-0,4619	0,2454	-0,1107	Pb ^a	0,5904	-0,1180	0,2095	0,0110
Cu	0,2748	0,0392	0,2868	-0,2621	Cu	-0,6108*	-0,0615	-0,1385	-0,0353
Zn	-0,0565	0,2744	-0,1663	0,1321	Zn	-0,2089	0,0752	-0,6099*	0,2348
Cd ^a	-0,1176	0,3210	0,6424*	-0,8486***	Cd	0,3535	-0,3132	-0,6981*	-0,4928
Hg	0,1359	-0,0803	-0,5926*	0,2494	Hg ^c	0,2353	-0,1007	-0,1580	-0,1802

Se indican los niveles estadísticamente significativos *0,05 **0,01 y ***0,001.

^a 1/x transformación realizada.

^b ln transformación realizada.

^c 1/x² transformación realizada.

3.3.2. Efectos de la exposición a plomo en anguila.

En la figura 3.6 se muestran las medias de los niveles de Pb alcanzados en los distintos tejidos estudiados. El análisis estadístico (tabla 3.11) muestra un efecto significativo de la exposición a Pb en todos los tejidos. Como se puede observar, los niveles alcanzados en los tejidos al final del experimento siguen este orden: riñón>hígado>branquias>sangre>músculo.

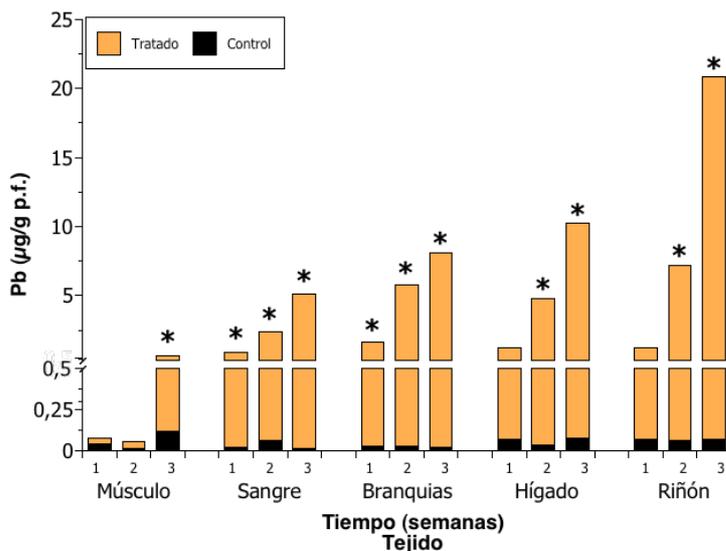


Figura 3.6. Concentraciones medias de Pb en los tejidos para cada tiempo de exposición. (*) Significativamente diferentes respecto del control ($p < 0,05$) ($n=5$).

En las tablas 3.8 y 3.9 se muestran las concentraciones medias de metales determinadas en hígado y músculo de anguilas, respectivamente. El análisis estadístico (tabla 3.11) ha mostrado un efecto de la exposición a plomo sobre la concentración de Fe en hígado y en músculo. Aunque el test *a posteriori* no demostró diferencias significativas entre los animales

controles y tratados para ninguno de los tiempos de exposición, los valores medios de Fe en ambos tejidos fueron siempre inferiores en los animales expuestos a plomo que en los controles. El ANOVA mostró un efecto de la exposición a plomo sobre los niveles de Mn en hígado, sin que el test *a posteriori* demostrara diferencias significativas entre controles y tratados para cada uno de los tiempos de exposición.

Tabla 3.8. Concentración de metales ($\mu\text{g/g}$) en hígado de anguilas controles (C) y expuestas a Pb (T) (n=5). Los datos se expresan como valor medio \pm D.E.

Tiempo (semanas)		Cu	Zn	Mn	Fe	Cd
1	C	10,98 \pm 4,13	31,39 \pm 6,43	0,59 \pm 0,71	213 \pm 109	2,80 \pm 0,31
	T	15,42 \pm 6,57	35,65 \pm 10,71	1,63 \pm 0,50	218 \pm 54	2,42 \pm 1,15
2	C	17,86 \pm 5,94	40,94 \pm 10,31	0,07 \pm 0,02	412 \pm 76	1,91 \pm 0,58
	T	23,10 \pm 15,94	50,17 \pm 15,60	2,01 \pm 0,28	261 \pm 68	2,23 \pm 0,14
3	C	16,00 \pm 6,13	38,75 \pm 11,88	0,96 \pm 0,88	357 \pm 151	1,97 \pm 1,23
	T	15,69 \pm 13,15	40,70 \pm 19,61	1,66 \pm 0,52	192 \pm 11	2,19 \pm 1,23

Tabla 3.9 Concentración de metales ($\mu\text{g/g}$) en músculo de anguilas controles (C) y expuestas a Pb (T) (n=5). Los datos se expresan como valor medio \pm D.E.

Tiempo (semanas)		Cu	Zn	Mn	Fe	Cd
1	C	< 0,17*	18,63 \pm 6,94	0,39 \pm 0,30	7,40 \pm 0,69	< 0,02**
	T	< 0,17*	18,10 \pm 3,13	0,26 \pm 0,10	5,48 \pm 0,83	< 0,02**
2	C	< 0,17*	13,45 \pm 2,25	0,36 \pm 0,25	5,07 \pm 0,77	< 0,02**
	T	< 0,17*	14,69 \pm 2,43	0,27 \pm 0,13	4,29 \pm 1,54	< 0,02**
3	C	< 0,17*	19,59 \pm 3,90	0,45 \pm 0,12	6,57 \pm 1,96	< 0,02**
	T	0,22 \pm 0,11	21,37 \pm 8,60	0,32 \pm 0,32	4,39 \pm 2,68	< 0,02**

(*) Límite de detección para el Cu= 0,17 $\mu\text{g/g}$

(**) Límite de detección para el Cd= 0,02 $\mu\text{g/g}$

En la figura 3.7 se muestran los valores obtenidos de concentración de metalotioneína en los tres tejidos. El análisis estadístico (tabla 3.11) mostró un efecto significativo de la exposición a plomo sobre el nivel de MT en riñón, sin que el test *a posteriori* mostrara diferencias significativas entre

controles y tratados en los distintos tiempos de exposición. En todos los tejidos los valores medios de MT de los animales tratados son superiores a los controles, a las dos y tres semanas de exposición.

En la figura 3.8 y la tabla 3.10 se muestran los valores medios de actividad ALAD en todos los tejidos en los que se ha determinado. El análisis estadístico (tabla 3.11) mostró un efecto de la exposición a plomo en todos los tejidos. La actividad ALAD en sangre y bazo fue significativamente menor en las anguilas expuestas a plomo a las tres semanas de exposición que en los controles respectivos ($p < 0,05$). La actividad ALAD de todos los tejidos de los ejemplares expuestos a plomo disminuye con el tiempo de exposición, excepto en el bazo. La exposición a plomo produjo una disminución significativa del hematocrito.

Tabla 3.10. Valores de actividad ALAD (pmol/h/g y pmol/min/mg proteína en sangre) y hematocrito en los tejidos de anguilas controles (C) y expuestas a Pb (T) (n=5). Los datos se expresan como valor medio±D.E.

Tiempo (semanas)		ALAD sangre	ALAD hígado	ALAD riñón	ALAD bazo	Hematocrito
1	C	14,95±1,02	65,21±11,26	44,95±17,28	80,22±7,85	0,46±0,07
	T	31,09±7,34	39,39±23,25	35,34±13,29	79,98±10,92	0,46±0,03
2	C	25,63±0,53	45,23±24,96	48,16±20,20	78,97±12,39	0,45±0,04
	T	16,39±5,69	29,74±5,63	26,62±16,34	68,25±2,27	0,40±0,05
3	C	28,79±7,61	29,30±12,30	42,60±16,20	93,90±13,83	0,53±0,06
	T	11,42±3,02**	9,49±2,77	16,47±16,28	72,13±4,66*	0,44±0,06

Diferencias significativas respecto del grupo control * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

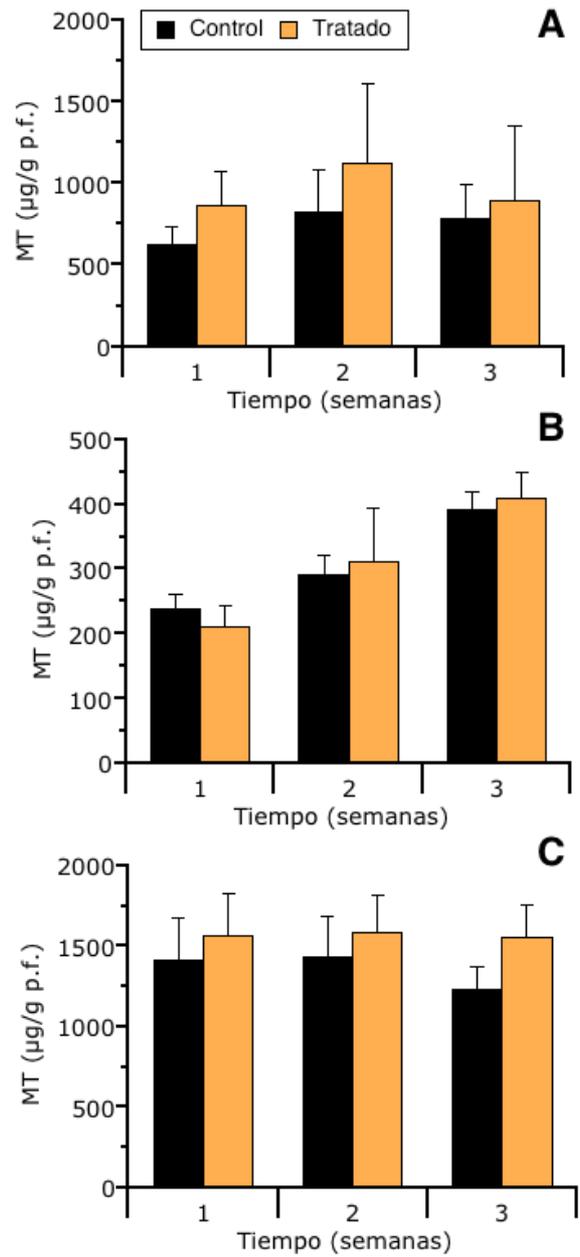


Figura 3.7. Concentraciones de MT en hígado (A), branquias (B) y riñón (C) de anguilas control y expuestas a plomo (n=5). Los datos se expresan como valor medio±D.E.

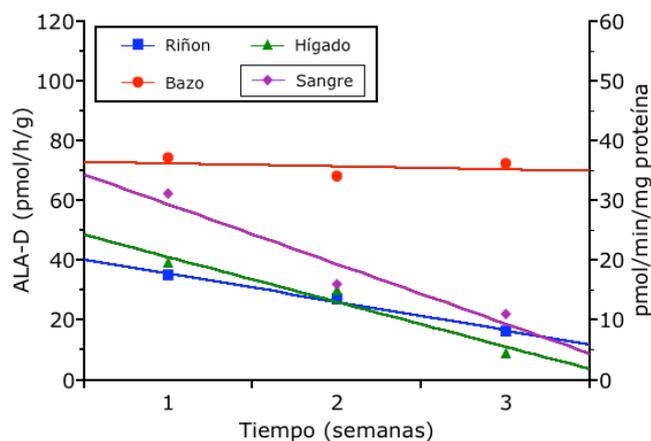


Figura 3.8. Valores medios de actividad ALAD en los tejidos ensayados. Los resultados están expresados en pmol/h/g de peso fresco, excepto para la actividad en la sangre que se expresa en pmol/min/mg proteína (n=5).

El análisis de correlación de las parejas de variables que hemos considerado de interés se muestran en la tabla 3.12. Existe una asociación negativa entre los niveles de plomo en sangre y la actividad ALAD de los distintos tejidos a excepción de la sangre. La concentración de plomo en riñón está asociada negativamente con la actividad ALAD en riñón y positivamente con los niveles de MT en el mismo órgano, existiendo en ambos casos correlaciones altamente significativas. En la figura 3.9 se representa gráficamente la relación matemática entre la concentración de MT y de plomo en riñón. El hematocrito presentó una asociación positiva tanto con la actividad ALAD en sangre como con dicha actividad en bazo. La concentración de MT en hígado está asociada positivamente tanto con los niveles de zinc como con los de cobre en dicho órgano, presentando correlaciones altamente significativas. En la figura 3.10 se muestra gráficamente la naturaleza de la relación entre dichas variables. En el hígado la concentración de Fe está negativamente asociada con la de Pb, mientras que la de Mn está asociada positivamente con la de plomo.

Tabla 3.11. Resultados obtenidos en los ANOVA de doble vía (n=5).

Parámetro	Efecto	F(gl1,gl2)	valor P
Pb sangre	Tratamiento	F(1, 5) = 128,24	<0,0001
	Tiempo	F(1, 5) = 10,83	0,0005
	Tratamiento x Tiempo	F(2, 5) = 11,02	0,0004
Pb músculo	Tratamiento	F(1, 5) = 9,77	0,0046
	Tiempo	F(1, 5) = 6,01	0,0077
	Tratamiento x Tiempo	F(2, 5) = 2,96	0,0707
Pb branquias	Tratamiento	F(1, 5) = 41,48	<0,0001
	Tiempo	F(1, 5) = 0,54	0,6548
	Tratamiento x Tiempo	F(2, 5) = 0,57	0,8684
Pb hígado	Tratamiento	F(1, 5) = 41,81	<0,0001
	Tiempo	F(1, 5) = 10,83	0,5922
	Tratamiento x Tiempo	F(2, 5) = 11,02	0,5750
Pb riñón	Tratamiento	F(1, 5) = 61,98	<0,0001
	Tiempo	F(1, 5) = 0,07	0,9372
	Tratamiento x Tiempo	F(2, 5) = 1,56	0,2306
MT riñón	Tratamiento	F(1, 5) = 6,26	0,0196
	Tiempo	F(1, 5) = 0,78	0,0469
	Tratamiento x Tiempo	F(2, 5) = 0,48	0,6254
ALAD sangre	Tratamiento	F(1, 5) = 1,98	0,1779
	Tiempo	F(1, 5) = 0,42	0,6617
	Tratamiento x Tiempo	F(2, 5) = 14,38	0,0002
ALAD hígado	Tratamiento	F(1, 5) = 11,63	0,0024
	Tiempo	F(1, 5) = 9,91	0,0008
	Tratamiento x Tiempo	F(2, 5) = 0,26	0,7730
ALAD riñón	Tratamiento	F(1, 5) = 9,20	0,0061
	Tiempo	F(1, 5) = 1,02	0,3770
	Tratamiento x Tiempo	F(2, 5) = 0,63	0,5411
ALAD bazo	Tratamiento	F(1, 5) = 13,48	0,0012
	Tiempo	F(1, 5) = 2,43	0,1096
	Tratamiento x Tiempo	F(2, 5) = 1,35	0,2788
Hematocrito	Tratamiento	F(1, 5) = 5,67	0,0255
	Tiempo	F(1, 5) = 3,02	0,0676
	Tratamiento x Tiempo	F(2, 5) = 2,29	0,1231
Fe hígado	Tratamiento	F(1, 5) = 7,90	0,0097
	Tiempo	F(1, 5) = 3,58	0,0644
	Tratamiento x Tiempo	F(2, 5) = 2,19	0,5833
Fe músculo	Tratamiento	F(1, 5) = 7,89	0,0097
	Tiempo	F(1, 5) = 3,08	0,0676
	Tratamiento x Tiempo	F(2, 5) = 0,55	0,1231
Mn hígado	Tratamiento	F(1, 5) = 38,22	<0,0001
	Tiempo	F(1, 5) = 1,87	0,1757
	Tratamiento x Tiempo	F(2, 5) = 7,67	0,0027

Las probabilidades estadísticamente significativas se resaltan en negrita.

Tabla 3.12. Coeficientes de correlación de Pearson (r) entre las variables de interés (n=30).

Parámetros correlacionados (Asociación)	Coeficiente Correlación (R)
Pb _{Sangre} ^a -ALAD _{Sangre}	0,2896
Pb _{Sangre} ^a -ALAD _{Hígado} (-)	0,3918*
Pb _{Sangre} ^a -ALAD _{Riñón} (-)	0,4285*
Pb _{Sangre} ^a -ALAD _{Bazo} ^a (-)	-0,5481**
Pb _{Sangre} ^a -Hematocrito (-)	0,4335*
Pb _{Hígado} ^b -ALAD _{Riñón} (-)	0,5428**
Pb _{Riñón} ^a -ALAD _{Riñón} (-)	0,6227***
Pb _{Riñón} ^a -ALAD _{Bazo} ^a (-)	-0,6755***
Pb _{Riñón} ^a -MT _{Riñón} (+)	-0,4923**
Hematocrito-ALAD _{Sangre} (+)	0,4689*
Hematocrito-ALAD _{Bazo} ^a (+)	-0,3685*
MT _{Hígado} ^a -Cu _{Hígado} ^a (+)	0,7091***
MT _{Hígado} ^a -Zn _{Hígado} ^a (+)	0,7335***
Pb _{Hígado} ^b -Fe _{Hígado} (-)	0,3938*
Pb _{Hígado} ^b -Mn _{Hígado} ^c (+)	-0,7049***

Los niveles de significación están indicados por asteriscos (*p≤0,05 **p≤0,01 y ***p≤0,001).

^a 1/x transformación realizada.

^b 1/x² transformación realizada.

^c x² transformación realizada.

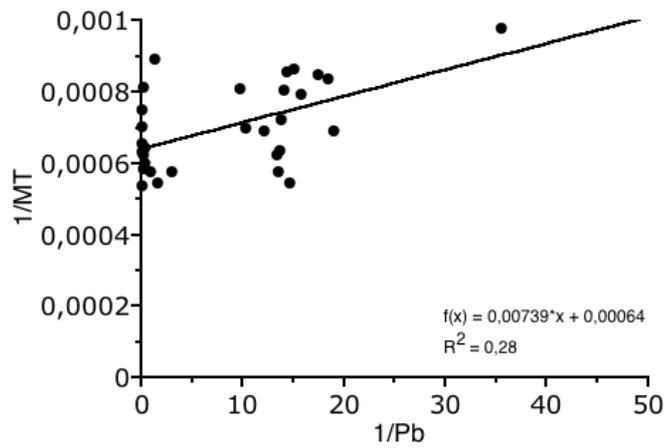


Figura 3.9. Recta de regresión entre la concentración de Pb y MT en riñón de las anguilas del experimento.

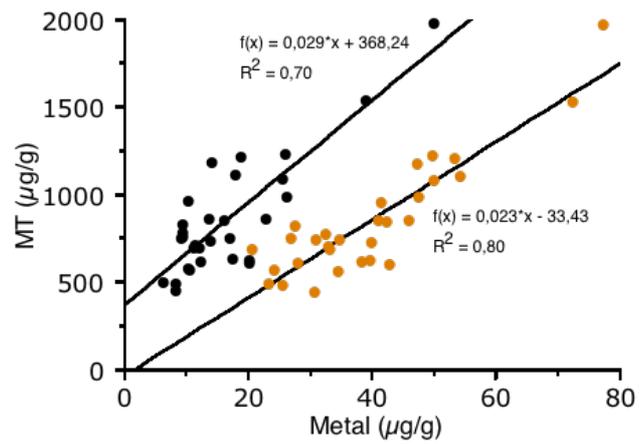


Figura 3.10. Rectas de regresión entre la concentración de Cu y MT (●) y entre la concentración de Zn y MT (●) en hígado de las anguilas del experimento.

En la figura 3.11 se muestra el cromatograma que representa la respuesta polarográfica de cada una de las fracciones obtenidas a partir del sobrenadante antes y después del tratamiento con calor. En ambos se observa respuesta polarográfica en las fracciones 25-27 que se corresponden al volumen de elución de la MT estándar y a un peso molecular aparente de 10-12 kDa. El sobrenadante no sometido a tratamiento con calor muestra además respuesta polarográfica en las fracciones 12-13 que corresponden al volumen vacío de la columna y por tanto a proteínas de alto peso molecular.

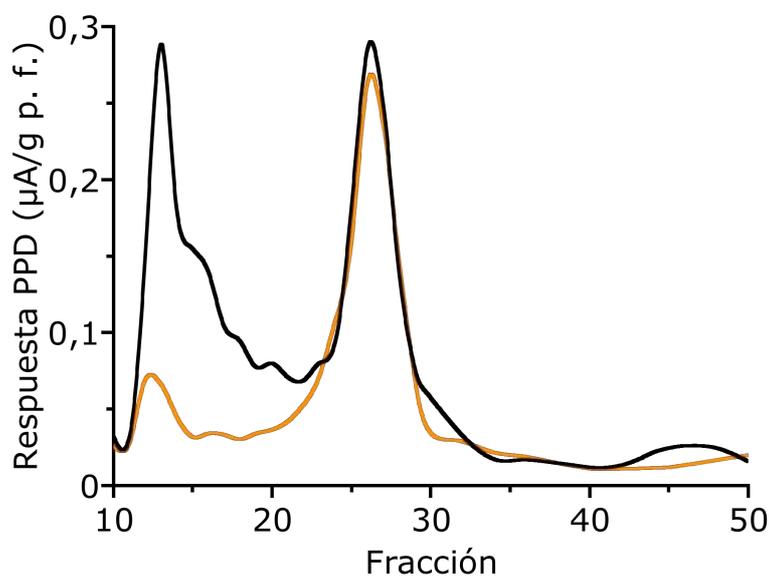


Figura 3.11. Perfiles cromatográficos de la señal polarográfica de sobrenadante con tratamiento con calor (línea naranja) y sin tratamiento con calor (línea negra) procedente de hígado de anguilas de piscifactoría.

En las figuras 3.12 y 3.13 se muestran las concentraciones de Cd, Pb, Cu y Zn determinadas en las fracciones cromatográficas obtenidas a partir de sobrenadante no sometido al tratamiento con calor, procedente de hígado de anguila expuesta a Pb. El cadmio se une de forma exclusiva a las fracciones correspondientes a MT, mientras que el plomo eluye mayoritariamente asociado a componentes de alto peso molecular, y en menor medida asociado a MT. Se puede también observar que el Zn se distribuye entre fracciones correspondientes a varios pesos moleculares, siendo importante su asociación a compuestos de peso molecular compatibles con la MT. Por el contrario el Cu presenta un perfil mucho más definido que el zinc consistente en dos picos, uno en el volumen vacío y otro asociado a MT.

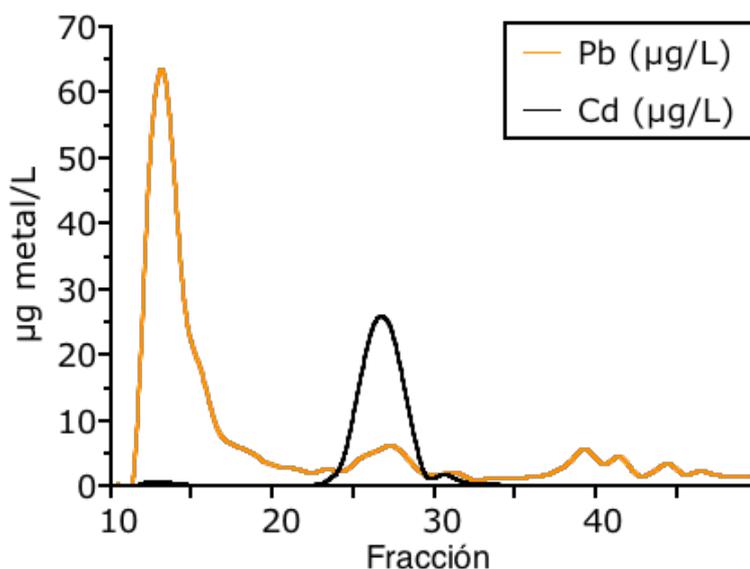


Figura 3.12. Concentraciones de Cd y Pb de las fracciones cromatográficas procedentes de sobrenadante de hígado de anguila expuesta a plomo.

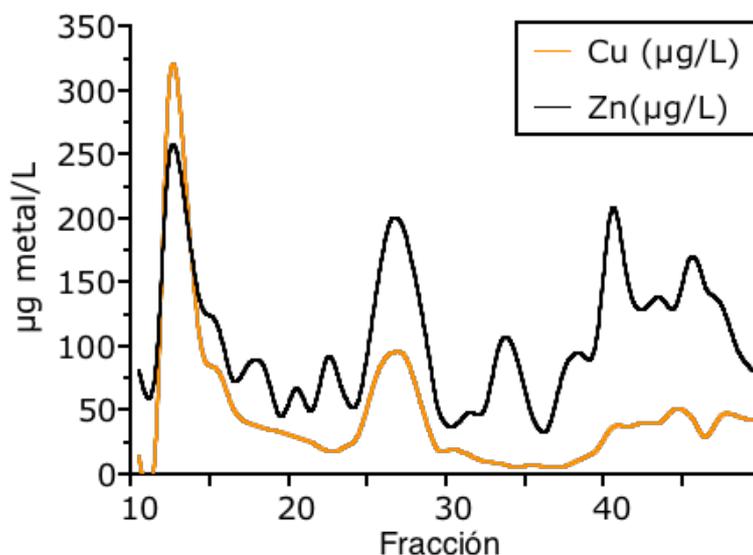


Figura 3.13. Concentraciones de Cu y Zn de las fracciones cromatográficas procedentes de sobrenadante de hígado de anguila expuesta a plomo.

3.4. DISCUSIÓN.

Como se puede observar en la tabla 3.3, los niveles de metales esenciales en los tejidos de los dos grupos de anguilas del primer estudio están en el mismo rango que la mayoría de valores encontrados en la literatura para anguilas salvajes. Sin embargo, en los niveles de metales no esenciales se observan diferencias destacables entre ambos grupos. Aunque la exposición a metal es una importante razón para estas diferencias, no se deben descartar otros factores como las posibles diferencias de edad o de estado nutricional.

El Pb es un metal de interés en el Lago de la Albufera. Ésta es una de las zonas húmedas mediterráneas con mayor abundancia de perdigones de Pb acumulados en sus sedimentos (2,8 millones de perdigones/ha), como consecuencia de muchas décadas de caza de aves, constituyendo una

fuentes de exposición para la fauna (Mateo et al., 1998). En otro estudio, los niveles de Pb encontrados en los sedimentos de la Albufera estaban entre 11 y 27,7 mg/kg (Requena, 2001). Esto es consistente con los niveles de Pb significativamente superiores encontrados en todos los tejidos de anguilas salvajes en comparación con los de las cultivadas. Además, las anguilas capturadas en la Albufera presentan mayor contenido de Pb en músculo (0,149 µg/g) que el encontrado en las poblaciones salvajes de otros lugares, como el río Turia (0,102 µg/g), el río Tiber (0,03 µg/g), el río Ferreiras (0,108 µg/g) o zonas costeras afectadas por contaminantes procedentes de áreas mineras (0,09 µg/g) (Linde et al., 1999; Bordajandi et al., 2003; Usero et al., 2004; Mancini et al., 2005). Cabe destacar que la concentración de Pb medida en músculo de anguilas cultivadas y salvajes está por debajo de 0,4 µg/g, valor considerado como nivel máximo establecido para consumo que se permite en el músculo de varias especies incluyendo *A. anguilla*, según la regulación de la Comunidad Europea (The Comision of the European Communities, 2001). Los niveles de Pb encontrados en el hígado y riñón de individuos procedentes de la Albufera son similares o menores que los publicados en la literatura para otras poblaciones (tabla 3.3). Estos hallazgos sugieren que el plomo, en la forma de perdigones o presente en cualquier otra forma en los sedimentos de la Albufera, no está altamente disponible para las anguilas.

La mayoría de muestras de músculo tienen concentraciones de Cd por debajo del límite analítico de detección (0,02 µg/g). Usero et al. (2004) encontraron valores por encima de 0,05 µg/g en músculo de anguila en una zona costera contaminada por metales, así como una alta correlación entre el contenido de Cd en músculo y la concentración de Cd en agua y sedimentos. Todo esto sugiere que las anguilas no están expuestas a altas concentraciones de Cd en la Albufera. Aunque en uno de los sitios muestreados de la Albufera se llegaron a encontrar valores de 51,4 mg/kg

de peso seco de cadmio en el sedimento, en la mayoría de los puntos muestreados no superan los 0,3 mg/kg peso seco (Requena, 2001). Esto concuerda con los niveles de cadmio encontrados en el presente estudio en hígado (0,095 $\mu\text{g/g}$) y riñón (0,269 $\mu\text{g/g}$), los cuales, aunque mayores que los encontrados en hígado por Batty et al. (1996), son mucho menores que los niveles de este metal en hígado y riñón de anguilas procedentes de ríos contaminados por varios metales (Linde et al., 1999, 2004; Usero et al., 2004). Un hallazgo destacable son los altos niveles de Cd presentes en todos los tejidos de anguilas cultivadas en comparación con los determinados en ejemplares procedentes de la Albufera y con la mayoría de otros valores encontrados en la literatura para poblaciones salvajes (tabla 3.3). Alam et al. (2002) realizaron un estudio comparando las concentraciones de metales en carpas salvajes y cultivadas, encontrando en riñón mayores concentraciones de cadmio, así como inferiores concentraciones de Zn, en las carpas cultivadas en comparación con las salvajes. Las concentraciones de Cd en el hígado determinadas en anguilas cultivadas en el presente estudio son similares a las encontradas por Linde et al. (2001, 2004) en anguilas procedentes de un río contaminado por metales pero no llegan a alcanzar los niveles encontrados en anguilas expuestas experimentalmente a 130 $\mu\text{g/L}$ de Cd durante 30 días (Noel-Lambot et al., 1978). Sin embargo las anguilas cultivadas llegan a acumular en su riñón concentraciones de cadmio que están dentro del mismo rango que las determinadas en el experimento anteriormente citado. Las concentraciones de Cd determinadas en el presente estudio en branquias y músculo de anguilas cultivadas son 10 veces inferiores a las encontradas en estos mismos tejidos por Noel-Lambot et al. (1978). La exposición a bajos niveles de Cd, presumiblemente a través de la dieta, durante un periodo de aproximadamente 18 meses, que es el tiempo en el cual las anguilas se mantienen en la piscifactoría, explicaría el alto contenido de cadmio acumulado en este tejido. Existen estudios realizados en truchas expuestas experimentalmente a Cd que afirman que la

vida media del Cd en el riñón es larga (McGeer et al., 2000) y en otros se destaca la importancia del riñón como indicador de exposición crónica a este metal (Chowdhury et al., 2005). Se debe mencionar que las concentraciones de los metales determinadas en este estudio, incluyendo el cadmio, son similares a las encontradas en el hígado de anguilas criadas en la misma piscifactoría en 1997 (Díaz-Mayans, comunicación personal). Además, el contenido de metal determinado en anguilas salvajes capturadas en 2004 del lago de la Albufera para otros propósitos (resultados no publicados) también presentaron concentraciones de metales en sus tejidos similares a los encontrados en las anguilas salvajes analizadas en el presente estudio. Teniendo en cuenta que las anguilas son procesadas (evisceradas, troceadas y embaladas) y distribuidas por los mayoristas a los puntos de venta, la mayoría del producto consiste en músculo y por lo tanto, su contenido de cadmio está por debajo de 0,1 µg/g, valor establecido por la Comisión de Regulación (EC) 466/2001 (2001). Sin embargo, este producto todavía contiene el riñón, el cual tiene 14 µg/g de Cd. Por ello sería recomendable eliminar este órgano antes de su comercialización dado su considerable peso en la anguila (0,5 g de media).

El contenido de Hg en músculo de anguilas salvajes (0,121 µg/g) se encuentra entre los valores publicados por Usero et al. (2004) y Linde et al. (2004). Esto mismo sucede con las concentraciones de Hg en hígado. Es destacable el hecho de que se alcancen concentraciones de Hg mayores en los tejidos de las anguilas de la Albufera que en las procedentes de las lagunas saladas de Huelva y Cádiz (Usero et al., 2004), a pesar de que la concentración de este metal es superior en los sedimentos de las lagunas (superiores a 1,6 µg/g) en comparación con los de la Albufera (0,1-0,2 µg/g) (Requena, 2001). Además del efecto de la salinidad sobre la disponibilidad del metal, la edad de los individuos muestreados o el tipo de alimentación también pueden explicar este hecho. Las anguilas de piscifactoría tienen

niveles de Hg en riñón superiores a los individuos salvajes, pero no se encontraron diferencias significativas en ningún otro tejido. Además, los dos grupos de anguilas muestran una distribución de mercurio diferente entre los tejidos. El contenido de Hg en riñón de anguilas cultivadas puede estar relacionado con el mayor contenido de MT en estas anguilas y la elevada afinidad de unión que la MT tiene por el Hg (Olsson et al., 1998). Los límites establecidos para el mercurio son de 1 µg/g (The Comision of the European Communities, 2001) y éstos no son excedidos por ninguno de los tejidos de los dos grupos de anguilas analizadas en el presente estudio.

Las concentraciones de Cu en músculo de anguilas salvajes son inferiores a la mayoría de concentraciones publicadas para anguilas presentes en aguas con moderada o elevada contaminación por metal (Cid et al., 2001; Bordajandi et al., 2003; Linde et al., 2004; Usero et al., 2004). El Cu en el hígado está en el mismo rango que la mayoría de los valores publicados.

Las concentraciones de Zn en músculo, como es de esperar, parecen bien reguladas ya que los valores encontrados caen dentro de un estrecho rango (14 a 23,1 µg/g). Lo mismo se puede decir para el hígado, en el cual encontramos valores de alrededor de 40 µg/g que son similares a los encontrados por Usero et al. (2004) y Ribeiro et al. (2005).

Las correlaciones negativas encontradas en el presente estudio entre las concentraciones de metales en los tejidos y el HSI (tablas 3.6 y 3.7) son similares a las encontradas por Maes et al. (2005) en esta especie. Éste y otros autores las interpretan como un impacto negativo de los metales sobre la salud de los peces (Goede y Barton, 1990; Norris et al., 2000). De acuerdo con esta interpretación, las concentraciones de Cd y Hg alcanzadas en anguilas cultivadas y salvajes presentan un nivel suficiente para que este efecto se manifieste. Los mecanismos de la toxicidad hepática en peces son muy similares a los de mamíferos (Wolf y Wolfe, 2005). Es común en los peces un descenso del tamaño del hígado, debido a la pérdida de glucógeno

hepático o lípidos que ocurre como consecuencia del efecto de los tóxicos (Wolf y Wolfe, 2005). La MT hepática unida a metal acaba siendo liberada a la sangre, llegando al riñón donde es absorbida y acumulada en el epitelio renal (Barbier et al., 2005). Esto podría explicar cómo la cantidad de metal acumulado en riñón o hígado está relacionada con el HSI.

El contenido de MT en los diferentes tejidos analizados sigue el orden riñón>hígado>branquias. La concentración de MT en hígado de anguilas salvajes y cultivadas es similar y dentro del rango de valores proporcionados por Noel-Lambot et al. (1978) y Langston et al. (2002) para esta especie. Sin embargo es difícil la comparación con valores publicados por otros autores debido a los diferentes métodos de determinación utilizados. A pesar de que la concentración de Cd en hígado de anguilas cultivadas es 15 veces mayor que en anguilas salvajes, los niveles de MT son similares en ambos grupos. Estos resultados son consistentes con los encontrados en el capítulo 2, en el cual carpas capturadas en diferentes puntos del río Ebro muestran grandes diferencias (hasta 25 veces) en la concentración de Cd, pero similar contenido en MT (Lavado et al., 2006). Aunque no se han llevado a cabo estudios sobre la dinámica de la síntesis de MT en *A. anguilla*, hay estudios realizados con otras especies de peces. Así, De Smet et al. (2001) no encontraron síntesis "de novo" de metalotioneína en hígado tras la exposición a cadmio. Al igual que ocurría con los barbos y las carpas estudiadas en el capítulo 2, existe una correlación positiva entre el cobre hepático y la MT en las anguilas salvajes (figura 3.4) y cultivadas del segundo estudio (figura 3.10). También se encontró una correlación positiva entre los niveles de MT y de Zn en las anguilas del estudio 2 (figura 3.10). Estos resultados están en concordancia con las cromatografías presentadas en las figuras 3.12 y 3.13 en las que se puede observar que la MT une preferentemente Zn y Cu. Además, en la cromatografía de la figura 3.12 se puede observar que el Cd se une exclusivamente a la metalotioneína,

indicando que no se superó la capacidad de unión de cadmio de esta proteína. De no ser así el cadmio se hubiera unido de forma inespecífica a proteínas de mayor peso molecular, fenómeno conocido como "spillover" (Langston y Zhou, 1986). Todo lo dicho anteriormente indica que es poco probable la existencia de concentraciones apreciables de Cd libre en el hígado siendo ésta la posible explicación de la baja efectividad del cadmio para inducir la síntesis de MT y la falta de correlación entre estos dos parámetros. También se puede observar en la cromatografía de la figura 3.12 que el plomo se une a la MT hepática, aunque en mucha menor proporción que el resto de metales comentados, estando el plomo unido preferentemente a moléculas de alto peso molecular (volumen vacío de la columna) entre las que se encontraría el ALAD.

El riñón es el tejido que presenta mayor contenido de MT en anguila, siendo significativamente superiores los valores encontrados en anguilas cultivadas que en las silvestres. Además, en el riñón, órgano en el que también se ha detectado mayor acumulación de Cd, existe una correlación entre los valores de MT y de cadmio. De Smet et al. (2001) también encontraron una correlación similar en riñón de carpa. De la misma forma, la exposición de truchas a 3 µg/L de cadmio durante 28 días incrementó significativamente los niveles de MT en riñón pero no en hígado (Chowdhury et al., 2005). Estos autores proponen al riñón como el lugar de almacenamiento de cadmio durante la exposición crónica.

Como se puede observar en las tablas 3.8 y 3.9 las concentraciones de metales analizadas en hígado y músculo de las anguilas del segundo estudio están en el mismo rango que las del primer estudio, a excepción del Pb de los animales expuestos experimentalmente al metal. Cabe destacar que el órgano que alcanza mayores concentraciones de plomo tras la exposición al metal es el riñón, corroborando su importante papel en el almacenamiento y detoxificación de metales que ya habíamos comentado anteriormente. De

la misma forma, los niveles de MT encontrados en este estudio (figura 3.7) están en el mismo rango que los determinados en el estudio anterior.

El test del ANOVA mostró un efecto de la exposición a plomo sobre los niveles de MT en riñón (tabla 3.11), siendo los valores medios superiores en los animales expuestos a plomo respecto de los controles, aunque en ningún caso se encontraron diferencias significativas mediante el test *a posteriori* utilizado. Además el análisis de correlaciones mostró la existencia de una correlación altamente significativa entre los niveles de plomo en riñón y los niveles de MT en este órgano. Todo ello nos lleva a un aumento de los niveles de MT por efecto del plomo en el riñón. Los posibles mecanismos de inducción de la MT por plomo son todavía materia de discusión. Un posible mecanismo es la inducción directa por el metal. Los trabajos realizados sobre inducción de MT por plomo en peces aportan resultados contradictorios y dependen de la especie estudiada. Así, a nivel molecular, se ha visto que el promotor del gen de MT-II del pez cebra (*Danio rerio*) no responde al Pb (Yan y Chan, 2002, 2004), mientras que los promotores del gen de MT de Tilapia (*Oreochromis mossambicus* y *Oreochromis aureus*) y carpa (*Cyprinus carpio*) sí que se activan por plomo, aumentando los niveles de ARNm (Chan et al., 2004; Cheung et al., 2005). A pesar de que el plomo no se considera dentro de los inductores más efectivos de MT, existen trabajos en mamíferos y peces en los que a nivel de expresión proteica se ha encontrado inducción de MT por plomo en hígado aunque no en riñón (Campana et al., 2003; Jurczuk et al., 2006).

De acuerdo con los resultados presentados en la figura 3.8 y en las tablas 3.10 y 3.11, se produce un efecto de la exposición a plomo sobre la actividad ALAD de anguila en riñón, de forma que existe una correlación negativa altamente significativa entre los niveles de plomo y ALAD en este tejido. A pesar de que el test *a posteriori* no mostró diferencias significativas entre controles y tratados para ninguno de los tiempos de exposición,

debido a la alta variabilidad encontrada, los valores medios de actividad ALAD siempre fueron menores en el grupo expuesto que en el control, alcanzándose una inhibición del 60%. Se sabe que la inhibición de la actividad de ALAD conduce a una acumulación de ALA, el cual sufre una oxidación catalizada por metal, produciendo especies de oxígeno reactivas (ROS): radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (OH^{\cdot}), induciendo estrés oxidativo (Bechara, 1996; Neal et al., 1998). Por todo lo anterior otro posible mecanismo de inducción de MT por plomo sería de una forma indirecta a través del estrés oxidativo, ya que el plomo no es capaz de inducir radicales libres directamente, dado que no participa en la reacción de Fenton (Valko et al., 2005). Además, existen trabajos que indican que la MT puede ser inducida por factores que generan radicales libres en los tejidos, siendo ésta capaz de eliminar los radicales libres y ejercer una función de protección contra el estrés oxidativo (Viarengo et al., 1999; Nath et al., 2000; Sato y Kondoh, 2002; Zhou et al., 2002).

Como se puede ver en las tablas 3.10 y 3.11, la exposición a plomo tiene un efecto significativo sobre la actividad ALAD en todos los tejidos estudiados. Existen correlaciones significativas entre los niveles de plomo en sangre y la actividad del enzima en todos los tejidos (con excepción de la sangre) indicando una disminución de actividad al aumentar los niveles del metal. Teniendo en cuenta que el riñón y el bazo son tejidos hematopoyéticos en peces, y el papel del ALAD en la síntesis del grupo hemo, es fácil entender la disminución significativa del hematocrito por la exposición a plomo. La exposición a plomo también tiene un efecto significativo sobre los niveles de Fe en hígado y en músculo. En el hígado hay una asociación negativa entre las variables, de forma que el incremento de plomo va acompañado de una disminución de Fe tal como muestra el análisis de correlaciones (tabla 3.12). En el músculo los valores medios de

Fe de los animales expuestos a plomo también fueron inferiores a los valores medios de los animales controles. Teniendo en cuenta que el hígado y el músculo son tejidos importantes en el almacenamiento del Fe, estos resultados indican una movilización de Fe como consecuencia de la exposición a plomo. Algunos autores proponen que en aquellas situaciones en las cuales se acumula ALA, los radicales libres producidos por esta molécula pueden movilizar Fe (II) de sus lugares de depósito (Toyokuni, 1996; Rocha et al., 2000). El test del ANOVA mostró un efecto de la exposición a plomo sobre los niveles de manganeso en hígado, siendo los valores medios superiores en los animales expuestos. El análisis de correlaciones (tabla 3.12) mostró una asociación positiva entre los niveles de plomo y manganeso en este tejido. El hecho de que la exposición a plomo tenga un efecto opuesto sobre los niveles de Fe y Mn en el hígado, puede estar en relación con que ambos metales compartan mecanismos de transporte a nivel de absorción y captación. En otros animales, esta relación inversa entre los niveles de ambos metales da lugar a que una deficiencia de Fe ocasione un incremento en los niveles de Mn (Roth y Garrik, 2003).

Comparando los dos perfiles de respuesta polarográfica de la figura 3.11 se observa que la mayoría de proteínas de alto peso molecular del sobrenadante de hígado de anguila se eliminan con el tratamiento con calor, mientras que la respuesta polarográfica de las fracciones atribuidas a MT permanece prácticamente sin cambios, confirmando la termoestabilidad de la MT. Por tanto, podemos concluir que el tratamiento con calor y la posterior centrifugación separa la MT del resto de componentes que interfieren en su determinación mediante PPD en el sobrenadante de hígado de anguila, permitiendo la cuantificación directa de esta proteína por polarografía.

3.5. BIBLIOGRAFÍA.

- Alam, M.G.; Tanaka, A.; Allinson, G.; Laurenson, L.J.; Stagnitti, F.; Snow, E.T. (2002) "A comparison of trace element concentrations in cultured and wild carp (*Cyprinus carpio*) of Lake Kasumigaura, Japan". *Ecotoxicol Environ Saf.* **53**: 348-54.
- Alasalvar, C.; Taylor, K.D.A.; Zubcov, E.; Shahidi, F.; Alexis, M. (2002) "Differentiation of cultured and wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*): total lipid content, fatty acid and trace mineral composition". *Food Chemistry.* **79**: 145-50.
- Barbier, O.; Jacquillet, G.; Tauc, M.; Cougnon, M.; Poujeol, P. (2005) "Effect of heavy metals on, and handling by, the kidney". *Nephron Physiol.* **99**: p105-10.
- Batty, J.; Pain, D.; Caurant, F. (1996) "Metal Concentrations In Eels *Anguilla anguilla* From The Camargue Region Of France". *Biological Conservation.* **76**: 17-23.
- Bebiano, M.J.; Langston, W.J. (1989) "Quantification of metallothionein in marine invertebrates using Differential Pulse Polarography". *Portugaliae Electrochimica Acta.* **7**: 511-24.
- Bechara, E.J. (1996) "Oxidative stress in acute intermittent porphyria and lead poisoning may be triggered by 5-aminolevulinic acid". *Braz J Med Biol Res.* **29**: 841-51.
- BEQUALM Wokshop report (2000) "1st workshop on analysis of 5-aminolevulinic acid dehydratase activity in fish". *Workpackage 4 Partner 2 Norwegian Institute for Water Rsearch.*
- Boluda, R.; Quintanilla, J.F.; Bonilla, J.A.; Saez, E.; Gamon, M. (2002) "Application of the Microtox (R) test and pollution indices to the study of water toxicity in the Albufera Natural Park (Valencia, Spain)". *Chemosphere.* **46**: 355-69.
- Bordajandi, L.R.; Gomez, G.; Fernandez, M.A.; Abad, E.; Rivera, J.; Gonzalez, M.J. (2003) "Study on PCBs, PCDD/Fs, organochlorine pesticides, heavy metals and arsenic content in freshwater fish species from the River Turia (Spain)". *Chemosphere.* **53**: 163-71.
- Campana, O.; Sarasquete, C.; Blasco, J. (2003) "Effect of lead on ALA-D activity, metallothionein levels, and lipid peroxidation in blood, kidney, and liver of the toadfish *Halobatrachus didactylus*". *Ecotoxicol Environ Saf.* **55**: 116-25.
- Chan, P.C.; Shiu, C.K.M.; Wong, F.W.Y.; Lam, V.K.L.; Wong, J.K.Y.; Chan, K.M. (2004) "Common carp metallothionein (MT-I) gene: cDNA cloning, gene structure and gene expresion studies". *Biochim. Biophys. Acta.* **1676**: 162-71.
- Cheung; Pok Lap, A.; Kwok Lim Lam, V.; Chan, K.M. (2005) "Tilapia metallothionein genes: PCR-cloning and gene expression studies". *Biochim Biophys Acta.* **1731**: 191-201.
- Chowdhury, M.J.; Baldisserotto, B.; Wood, C.M. (2005) "Tissue-specific cadmium and metallothionein levels in rainbow trout chronically acclimated to waterborne or dietary cadmium". *Arch Environ Contam Toxicol.* **48**: 381-90.

- Chu, D.; Tang, Y.; Huan, Y.; He, W.; Cao, W. (2000) "The microcalorimetry study on the complexation of lead ion with metallothionein". *Thermochim. Acta.* **352-353**: 205-12.
- Cid, B.P.; Boia, C.; Pombo, L.; Rebelo, E. (2001) "Determination of trace metals in fish species of the Ria de Aveiro (Portugal) by electrothermal atomic absorption spectrometry". *Food Chemistry.* **75**: 93-100.
- De Smet, H.; De Wachter, B.; Lobinski, R.; Blust, R. (2001) "Dynamics of (Cd,Zn)-metallothioneins in gills, liver and kidney of common carp *Cyprinus carpio* during cadmium exposure". *Aquat Toxicol.* **52**: 269-81.
- Dekker, W. (2000) "A Procrustean assessment of the European eel stock". *Ices Journal Of Marine Science.* **57**: 938-47.
- Easton, M.D.; Luszniak, D.; Von der, G.E. (2002) "Preliminary examination of contaminant loadings in farmed salmon, wild salmon and commercial salmon feed". *Chemosphere.* **46**: 1053-74.
- Fernandes, D.; Porte, C.; Bebianno, M.J. (2006) "Chemical residues and biochemical responses in wild and cultured European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.)" *Environ Res.* doi:10.1016/j.envres.2006.05.015.
- Feunteun, E. (2002) "Management and restoration of European eel population (*Anguilla anguilla*): An impossible bargain". *Ecological Engineering.* **18**: 575-91.
- Foran, J.A.; Hites, R.A.; Carpenter, D.O.; Hamilton, M.C.; Mathews-Amos, A.; Schwager, S.J. (2004) "A survey of metals in tissues of farmed atlantic and wild pacific salmon". *Environmental Toxicology and Chemistry.* **23**: 2108-10.
- Gimeno-Garcia, E.; Andreu, V.; Boluda, R. (1996) "Heavy Metals Incidence In The Application Of Inorganic Fertilizers And Pesticides To Rice Farming Soils". *Environmental Pollution.* **92(1)**: 19-25.
- Goede, R.W.; Barton, B.A. (1990) "Organismic indices and an autopsy-based assessment as indicators of health and condition of fish". *Am. Fish. Soc. Symp.* **8**: 93-108.
- Gorbi, S.; Baldini, C.; Regoli, F. (2005) "Seasonal variability of metallothioneins, cytochrome P450, Bile metabolites and oxyradical metabolism in the European eel *Anguilla anguilla* L. (Anguillidae) and striped mullet *Mugil cephalus* L. (Mugilidae)". *Arch Environ Contam Toxicol.* **49**: 62-70.
- Goyer, R.A. (1993) "Toxic effects of metals". En: *Toxicology.* Amdur, M.O.; Doull, J.; Klaassen, C.D. (Ed). McGraw-Hill, New York
- Jurczuk, M.; Moniuszko-Jakoniuk, J.; Brzoska, M.M. (2006) "Involvement of some low-molecular thiols in the peroxidative mechanisms of lead and ethanol action on rat liver and kidney". *Toxicology.* **219**: 11-21.
- Langston, W.J.; Zhou, M. (1986) "Evaluation of the significance of metal-binding proteins in the gastropod *Littorina littorea*". *Marine Biology.* **92**: 505-15.

- Langston, W.J.; Chesman, B.S.; Burt, G.R.; Pope, N.D.; McEvoy, J. (2002) "Metallothionein in liver of eels *Anguilla anguilla* from the Thames Estuary: an indicator of environmental quality?" *Mar Environ Res.* **53**: 263-93.
- Lavado, R.; Ureña, R.; Martin-Skilton, R.; Torreblanca, A.; Del Ramo, J.; Raldua, D.; Porte, C. (2006) "The combined use of chemical and biochemical markers to assess water quality along the Ebro River". *Environ Pollut.* **139**: 330-9.
- Linde, A.R.; Sanchez-Galan, S.; Klein, D.; Garcia-Vazquez, E.; Summer, K.H. (1999) "Metallothionein and heavy metals in brown trout (*Salmo trutta*) and European eel (*Anguilla anguilla*): a comparative study". *Ecotoxicol Environ Saf.* **44**: 168-73.
- Linde, A.R.; Sanchez-Galan, S.; Valles-Mota, P.; Garcia-Vazquez, E. (2001) "Metallothionein as bioindicator of freshwater metal pollution: European eel and brown trout". *Ecotoxicol Environ Saf.* **49**: 60-3.
- Linde, A.R.; Sanchez-Galan, S.; Garcia-Vazquez, E. (2004) "Heavy metal contamination of European eel (*Anguilla anguilla*) and brown trout (*Salmo trutta*) caught in wild ecosystems in Spain". *J Food Prot.* **67**: 2332-6.
- Maes, G.E.; Raeymaekers, J.A.; Pampoulie, C.; Seynaeve, A.; Goemans, G.; Belpaire, C.; Volckaert, F.A. (2005) "The catadromous European eel *Anguilla anguilla* (L.) as a model for freshwater evolutionary ecotoxicology: relationship between heavy metal bioaccumulation, condition and genetic variability". *Aquat Toxicol.* **73**: 99-114.
- Mancini, L.; Caimi, S.; Ciardullo, S.; Zeiner, M.; Bottoni, P.; Tancioni, L.; Cautadella, S.; Caroli, S. (2005) "A pilot study on the contents of selected pollutants in fish from the Tiber River (Rome)". *Microchemical Journal.* **79**: 171-75.
- Mason, C.F.; Barak, N.A.E. (1990) "A catchment survey for heavy metals using the eel". *Chemosphere.* **21**: 695.
- Mateo, R.; Belliure, J.; Dolz, J.C.; Aguilar Serrano, J.M.; Guitart, R. (1998) "High Prevalences of Lead Poisoning in Wintering Waterfowl in Spain". *Arch Environ Contam Toxicol.* **35**: 342-47.
- McGeer, J.C.; Szebedinszky, C.; Gordon McDonald, D.; Wood, C.M. (2000) "Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout 2: tissue specific metal accumulation". *Aquatic Toxicol.* **50**: 245-56.
- Nakagawa, H.; Tajima, T.; Sato, T.; Kuboyama, M. (1998) "A field study of water lead pollution in fresh water areas of northern Kyushu, based on 5-aminolevulinic acid dehydratase activity and lead concentration in the blood of crucian carp, *Carassius auratus langsdorfii*." *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.* **43**: 209-15.
- Nath, R.; Kumar, D.; Li, T.; Singal, P.K. (2000) "Metallothioneins, oxidative stress and the cardiovascular system". *Toxicology.* **155**: 17-26.
- Neal, R.; Cooper, K.; Kellogg, G.; Gurer, H.; Ercal, N. (1998) "Pro-oxidant effects of 5-aminolevulinic acid on Chinese Hamster Ovary cells". *Toxicol. Lett.* **91**: 169-78.

- Noel-Lambot, F.; Bouquegneau, J.M. (1977) "Comparative study of toxicity, uptake and distribution of cadmium and mercury in the sea water adapted eel *Anguilla anguilla*". *Bull Environ Contam Toxicol*. **18**: 418-24.
- Noel-Lambot, F.; Gerday, C.; Disteche, A. (1978) "Distribution of Cd, Zn and Cu in the liver and gills of the eel *Anguilla anguilla* with special reference to metallothioneins". *Comparative Biochemistry and Physiology*. **61 C**: 177-87.
- Norris, D.O.; Camp, J.M.; Maldonado, T.A.; Woodling, J.D. (2000) "Some aspects of hepatic function in feral brown trout, *Salmo trutta*, living in metal contaminated water". *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. **127**: 71-78.
- Olsson, P.E.; Kling, P.; Hogstrand, C. (1998) "Mechanisms of heavy metal accumulation and toxicity in fish". En: *Metal metabolism in Aquatic Environments*. Langston, W.J.; Bebianno, M.J. (Ed). Chapman and Hall, London
- Palikova, M.; Barus, V. (2003) "Mercury content in *Anguillicola crassus* (Nematoda) and its host *Anguilla anguilla*". *Acta Veterinaria Brno*. **72**: 289-94.
- Park, J.D.; Liu, Y.; Klaassen, C.D. (2001) "Protective effect of metallothionein against the toxicity of cadmium and other metals(1)". *Toxicology*. **163**: 93-100.
- Pérez, L.; Barrera, R.; Asturiano, J.F.; Jover, M. (2004) "Producción de anguilas : pasado, presente y futuro". *Revista AquaTIC*. **20**: 51-78.
- Requena, S. (2001) "Caracterización y aprovechamiento de los sedimentos del lago de la Albufera de Valencia". Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia.
- Ribeiro, C.A.O.; Voltaire, Y.; Sanchez-Chardi, A.; Roche, H. (2005) "Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France". *Aquatic Toxicology*. **74**: 53-69.
- Robinet, T.; Feunteun, E. (2002) "Sublethal effects of exposure to chemical compounds: a cause for the decline in Atlantic eels?" *Ecotoxicology*. **11**: 265-77.
- Rocha, M.E.; Ferreira, A.M.; Bechara, E.J. (2000) "Roles of phosphate and an enoyl radical in ferritin iron mobilization by 5-aminolevulinic acid". *Free Radic Biol Med*. **29**: 1272-79.
- Rodrigues, A.L.; Bellinaso, M.L.; Dick, T. (1989) "Effect of some metal ions on blood and liver delta-aminolevulinic acid dehydratase of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Pimelodidae)". *Comp Biochem Physiol B*. **94**: 65-69.
- Roth, J.A.; Garrick, M.D. (2003) "Iron interactions and other biological reactions mediating the physiological and toxic actions of manganese". *Biochem Pharmacol*. **66**: 1-13.
- Santos, M.A.; Hall, A. (1990) "Influence of inorganic lead on the biochemical blood composition of the eel, *Anguilla anguilla* L". *Ecotoxicol Environ Saf*. **20**: 7-9.

- Sato, M.; Kondoh, M. (2002) "Recent studies on metallothionein: protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals". *Tohoku J Exp Med.* **196**: 9-22.
- The comission of the european communities (2001) "Comission regulation (EC) No 466/2001 of March 8, 2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs". Off. J. Eur. Communities.
- The scientific panel on contaminants in the food chain (2005) "Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the European Parliament related to the safety assessment of wild and farmed fish S Question N° EFSA-Q-2004-22". *The EFSA Journal.* **236**: 1-118.
- Toyokuni, S. (1996) "Iron-induced carcinogenesis: the role of redox regulation". *Free Radic Biol Med.* **20**: 553-66.
- Usero, J.; Izquierdo, C.; Morillo, J.; Gracia, I. (2004) "Heavy metals in fish (*Solea vulgaris*, *Anguilla anguilla* and *Liza aurata*) from salt marshes on the southern Atlantic coast of Spain". *Environ Int.* **29**: 949-56.
- Valko, M.; Morris, H.; Cronin, M.T. (2005) "Metals, toxicity and oxidative stress". *Curr Med Chem.* **12**: 1161-208.
- Viarengo, A.; Burlando, B.; Cavaletto, M.; Marchi, B.; Ponzano, E.; Blasco, J. (1999) "Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*". *Am J Physiol.* **277**: R1612-19.
- Wolf, J.C.; Wolfe, M.J. (2005) "A brief overview of nonneoplastic hepatic toxicity in fish". *Toxicol Pathol.* **33**: 75-85.
- Yamaguchi, N.; Gazzard, D.; Scholey, G.; Macdonald, D.W. (2003) "Concentrations and hazard assessment of PCBs, organochlorine pesticides and mercury in fish species from the Upper Thames: river pollution and its potential effects on top predators". *Chemosphere.* **50**: 265-73.
- Yan, C.H.M.; Chan, K.M. (2002) "Characterization of zebrafish metallothionein gene promoter in a zebrafish caudal fin cell-line, SJD.1". *Mar Environ Res.* **54**: 333-35.
- Yan, C.H.M.; Chan, K.M. (2004) "Cloning of a zebrafish metallothionein gene and characterization of its gene promoter in HeG2 cell-line". *Biochim. Biophys. Acta.* **1679**: 47-58.
- Zhou, Z.; Sun, X.; James Kang, Y. (2002) "Metallothionein protection against alcoholic liver injury through inhibition of oxidative stress". *Exp Biol Med (Maywood).* **227**: 214-22.
- Zimmermann, S.; Sures, B.; Taraschewski, H. (1999) "Experimental studies on lead accumulation in the eel-specific endoparasites *Anguillicola crassus* (Nematoda) and *Paratenuisentis ambiguus* (Acanthocephala) as compared with their host, *Anguilla anguilla*". *Arch Environ Contam Toxicol.* **37**: 190-95.

4. ESTUDIOS EN EL GASTERÓPODO *Melanopsis dufouri*

4. ESTUDIOS EN EL GASTERÓPODO *Melanopsis dufouri*.

4.1. INTRODUCCIÓN.

En los estudios de contaminación en ríos se suele utilizar los peces como organismo centinela. Sin embargo, en la Comunidad Valenciana, y en otras zonas en las que predominan ríos de poco caudal, los peces sólo se encuentran en determinadas zonas, por lo que creemos conveniente el uso de otros organismos, como son invertebrados, para el seguimiento de los efectos de la contaminación en esta región. Los moluscos de agua dulce constituyen un grupo de animales bien conocido en las aguas continentales de la Comunidad Valenciana (Pujante, et al., 1998). Son uno de los principales phyla de animales que habitan en el mar, las aguas dulces y la tierra. Los gasterópodos integran la clase más grande y diversificada del phylum y han logrado el mayor éxito evolutivo. Esta clase se divide tradicionalmente en tres subclases. La primera de ellas es conocida como Prosobranchia, incluye a los organismos que respiran por medio de branquias y presentan una evidente torsión. Los Pulmonata se caracterizan por la desaparición de las branquias, y en ellos la cavidad del manto se ha convertido en un pulmón. Por último los Opisthobranchia exhiben destorsión y la concha suele estar reducida o ausente.

Melanopsis dufouri es un gasterópodo prosobranquio del orden Mesogastropoda perteneciente a la subfamilia Melanopsidae (figura 4.1). Es una de las especies más característica de la fauna malacológica valenciana. Presenta una amplia distribución y se encuentra de forma frecuente en ríos y arroyos de la Comunidad Valenciana (figura 4.2). Además, el hecho de que los gasterópodos en general sean fáciles de muestrear, mantener y manipular en el laboratorio los hace especialmente adecuados para un estudio como el que nos ocupa.

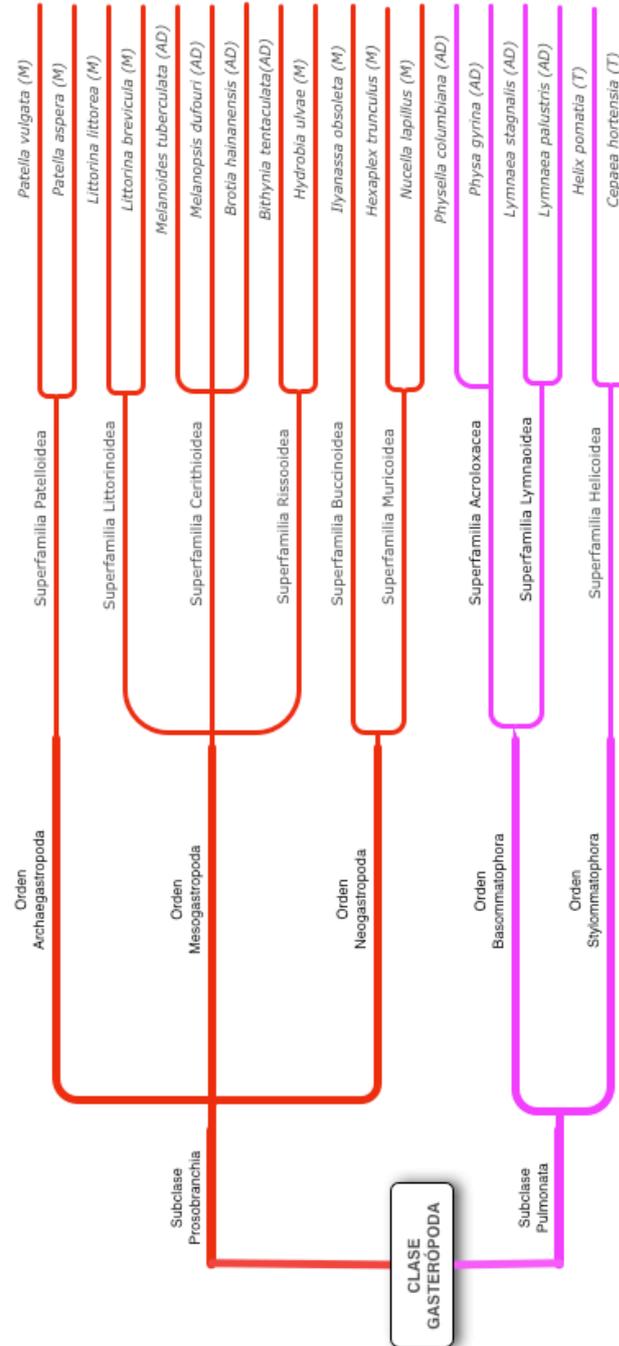


Figura 4.1. Esquema filogenético de las especies de gasterópodos citadas en la presente memoria.
M: Marino; AD: Agua dulce y T: Terrestre.

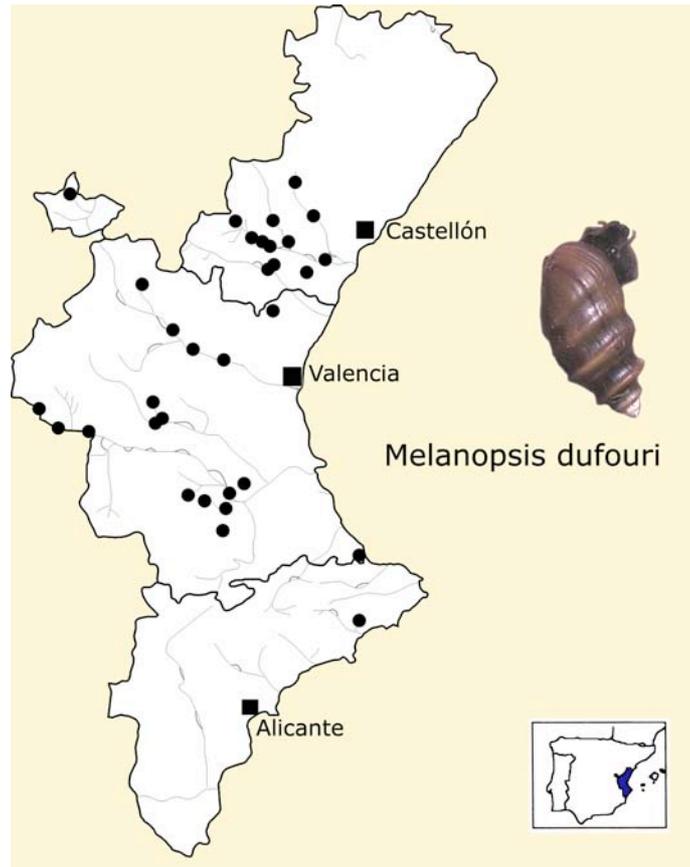


Figura 4.2. Distribución de *Melanopsis dufouri* en la Comunidad Valenciana.

A pesar del parecido fundamental de todos los gasterópodos, la morfología interna presenta diferentes grados de complejidad en los sistemas orgánicos de los diferentes grupos. En la figura 4.3 se presenta la organización anatómica de un gasterópodo prosobranquio del género *Melanopsis* donde se diferencia claramente la parte muscular y la parte visceral. La principal forma de alimentación en esta especie es el raspado, con su rádula, de vegetación acuática y toda clase de desechos orgánicos presentes en superficies rocosas.

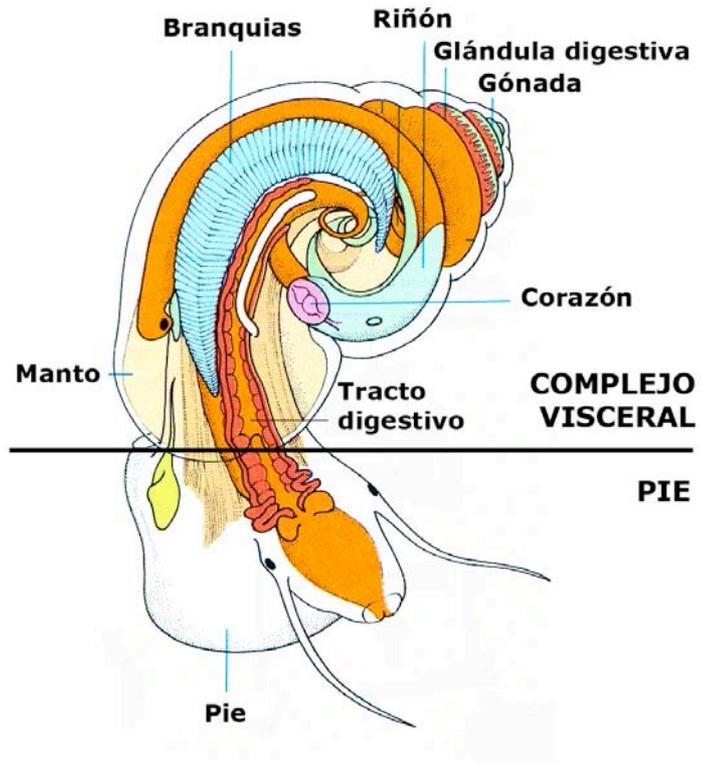


Figura 4.3. Organización anatómica del género *Melanopsis* (modificado de Historia Natural dels Països Catalans, Enciclopedia Catalana, Vol 8, 1988).

La temperatura es, sin duda, el factor determinante de la actual distribución de este género, el cual muestra una clara preferencia por las aguas termales o templadas. En la mayoría de puntos donde se encuentra, existen surgencias termales en las orillas (Pujante, 1987). *M. dufouri* tiende a situarse generalmente en aguas superficiales o de escasa profundidad. Muestra cierta indiferencia frente al tipo de ambiente, se encuentran preferentemente en aguas tranquilas, aguas lénticas, aunque los individuos

de mayor tamaño también tienden a situarse en los lugares de mayor corriente, aguas lóaticas. Se sitúa sobre rocas, gravas, arenas y vegetación, hallándose también con frecuencia sobre residuos y restos frutales depositados en los remansos de los ríos. Según Margalef (1982) la clasificación tradicional de los organismos, en función de su tolerancia a los distintos grados de contaminación, se establece en tres categorías. Oligosaprobios, que se relacionan con ambientes de buena calidad y escasa materia orgánica, mesosaprobios, con aguas medianamente contaminadas y polisaprobios con aguas muy deterioradas. *Melanopsis* es indicador de medios oligosaprobios, aunque puede presentar un carácter excepcionalmente mesosaprobio, indicando cierta resistencia a la contaminación (Pujante, 1987).

Como ya se ha visto en el apartado 1.1.2, existen numerosos trabajos acerca del metabolismo de metales y sobre la utilización de la MT como biomarcador de contaminación en gasterópodos. En la mayoría de estos estudios los gasterópodos presentan excelentes propiedades como centinela de contaminación por metales en ambientes marinos (Bebiano et al., 1992) y terrestres (Berger et al., 1995), pero solamente algunos estudios han examinado este potencial en especies de agua dulce (Flessas et al., 2000). Existe poca información sobre la capacidad de los gasterópodos de agua dulce para acumular y detoxificar los metales biodisponibles, siendo escasos los estudios de laboratorio y de campo realizados al respecto (Leung et al., 2003; Wepener et al., 2005). Dada la abundancia y la amplia distribución de los caracoles de agua dulce en los ríos de la Comunidad Valenciana merecen ser considerados como potenciales centinelas de la calidad de sus aguas. El presente trabajo está enfocado al estudio de la capacidad de respuesta de *M. dufouri* frente a la exposición a metales y la utilización de los niveles de MT en esta especie como un biomarcador de contaminación específico de metales.

Existen varios trabajos en los que se comparan diferentes técnicas de cuantificación de MT (Geret et al., 1998; Dabrio et al., 2002; Ivankovic et al., 2003; Zorita et al., 2005; Amiard et al., 2006). Las discrepancias encontradas entre los distintos métodos hacen evidente la necesidad de validar el método de elección en cada especie y/o tejido. El ensayo de saturación con metales y la PPD han sido los métodos más utilizados para la cuantificación de MT en gasterópodos (Bebiano y Langston, 1989; Berger et al., 1995; Leung y Furness, 1999a).

4.2.- MATERIALES Y MÉTODOS.

4.2.1.- Respuesta de *Melanopsis dufouri* frente a la exposición a cadmio.

4.2.1.1. Muestreo, transporte y aclimatación.

Se utilizaron individuos adultos de la especie *Melanopsis dufouri* de una longitud comprendida entre 14 y 19 mm. El muestreo se realizó en el río Verde, situado en la localidad de Massalavés (Valencia) en el mes de Marzo de 2003. La localización geográfica dentro de la Comunidad Valenciana queda indicada en el mapa de la figura 4.4. Los animales se encontraban sobre piedras, arena y plantas sumergidas. Además se recogieron piedras y otros sustratos colonizados por algas y musgos, para alimentar a los animales durante el experimento. Tras ser trasladados al laboratorio en recipientes con agua, los caracoles se aclimataron en acuarios de 20 litros con agua de la zona. Se mantuvieron con aireación, a una temperatura de 25 °C y fotoperiodo controlado durante una semana.

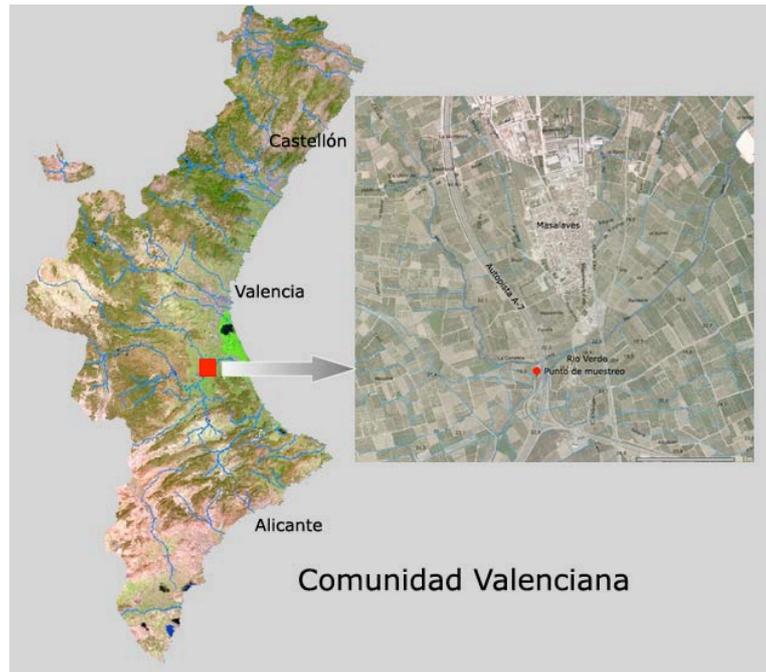


Figura 4.4. Punto de muestreo seleccionado dentro de la Comunidad Valenciana.

4.2.1.2. Exposición a cadmio.

En todos los casos se obtuvieron las concentraciones deseadas de cadmio en los acuarios de experimentación mediante la adición de los volúmenes correspondientes de una solución de Cd de 1000 mg/L, preparada a partir de $\text{CdCl}_2 \cdot 2,5 \text{H}_2\text{O}$. El agua de los acuarios se renovó semanalmente.

Estudio 1. Exposición aguda a cadmio.

Los animales se repartieron al azar en dos grupos y se sometieron a dos condiciones de experimentación: un grupo, que constituyó el grupo control, y otro grupo que fue expuesto a 3 mg/L de Cd. Los animales fueron mantenidos en esas condiciones durante una semana. Al finalizar el experimento fueron congelados a -80°C hasta su disección y análisis.

Estudio 2. Exposición crónica a cadmio durante dos semanas.

Los animales se repartieron de forma aleatoria en dos grupos sometidos a las siguientes condiciones: un grupo, que fue el grupo control, y otro grupo expuesto a 100 µg/L de Cd. La duración del experimento fue de 2 semanas. Se tomaron individuos de cada acuario a los 7 y 14 días tras la exposición y fueron congelados a -80°C hasta su disección y análisis.

Estudio 3. Exposición crónica a cadmio durante ocho semanas.

Los animales se repartieron de forma aleatoria en tres grupos y fueron sometidos a las siguientes condiciones: A) Grupo control, B) Grupo expuesto a 6 µg/L de Cd y C) Grupo expuesto a 100 µg/L de Cd. La duración del experimento fue de 8 semanas. El agua de los acuarios se renovó semanalmente. Se tomaron 12 individuos de cada acuario tras 1, 2, 4, 6 y 8 semanas de exposición. La concentración de Cd se midió regularmente en el agua de los acuarios obteniéndose valores de $5,3 \pm 0,17$ µg/L y $75,6 \pm 7,7$ µg/L en los acuarios expuestos a un valor nominal de 6 y 100 µg/L respectivamente. El contenido de Cd en el agua del grupo control fue de $0,22 \pm 0,03$ µg/L.

4.2.1.3. Estudios preliminares.

Con el fin de determinar las condiciones óptimas para la cuantificación de MT en los distintos tejidos de *Melanopsis dufouri*, se estudió la acumulación de Cd y la respuesta polarográfica tanto en el complejo visceral, como en el pie del animal. Se rompieron las conchas de los animales con la ayuda de un mortero, y se diseccionó la parte muscular, que llamaremos pie, del resto del animal, que llamaremos complejo visceral o vísceras. En la figura 4.3 se puede observar la anatomía de *Melanopsis dufouri* y los tejidos utilizados para el estudio. Tras la disgregación de los tejidos mediante Ultra-turrax, una parte del homogeneizado se destinó a la determinación de Cd y el resto se procesó siguiendo el procedimiento de la figura 3.2, con el fin de obtener un sobrenadante en el que realizar la determinación de la respuesta polarográfica. Dicha determinación se realiza de forma similar a la descrita para los sobrenadantes procedentes de tejidos de anguila del capítulo 3.

Para la determinación de Cd, el homogeneizado se deshidrató en una estufa a 80 °C durante 24 o 48 horas; una vez seco fue digerido con HNO₃ y llevado a un volumen constante. Se determinó el contenido de Cd a la llama mediante Espectrofotometría de Absorción Atómica, en un equipo modelo 5000 Perkin-Elmer, a una longitud de onda de 228,8 nm. Para ello se prepararon patrones de Cd de 0,1 a 0,8 mg/L a partir de una solución stock de 400 mg/L. Se incluyeron en las digestiones muestras de material de referencia TORT-2 (NCR-CNRC, Ottawa, Canada). La concentración de Cd medida estuvo dentro del rango certificado del material de referencia (27,77±1,89 mg/kg frente a 26,7±0,6 mg/kg del valor certificado).

Un paso previo a la cuantificación de la respuesta polarográfica fue la optimización de la cantidad de muestra a utilizar en cada medida. Se consideraron dos parámetros para obtener una razón óptima respuesta polarográfica/cantidad de muestra. Primero se consideró el número de

individuos utilizados en cada pool, fijándose un número de 4, y posteriormente, se determinó en 25 μL el volumen de sobrenadante tratado con calor a adicionar a la célula polarográfica en cada determinación.

Además, una alícuota del sobrenadante final correspondiente a cada pool de cada tejido fue fraccionada por cromatografía de exclusión molecular. En cada una de las fracciones se midió la señal polarográfica. Se obtuvieron los polarogramas del sobrenadante final antes y después del tratamiento con calor, para comprobar el grado de eliminación de la señal polarográfica, correspondiente a proteínas de alto peso molecular, que interfieren en la cuantificación. Los resultados de estos estudios preliminares se expresan en peso fresco.

4.2.1.4. Aspectos metodológicos en la determinación de metalotioneína en M. dufouri.

Debido a la falta de un método validado para la determinación de MT en esta especie, se realizaron diferentes ensayos preliminares para determinar la forma idónea para su cuantificación.

En primer lugar, se exploró la posibilidad de aplicar el método de saturación con Ag. La aplicación de este método requiere que la Ag quede unida específicamente a la MT (Scheuhammer y Cherian, 1986; Martínez et al, 1993). Para comprobar que se cumplía este requisito se realizó una cromatografía de exclusión molecular del sobrenadante final obtenido, en cuyas fracciones se determinó la concentración de Ag. Tras diseccionar el complejo visceral de 4 individuos control se obtuvo un homogeneizado, el cual se sometió a los procesos descritos en la figura 1.2. El sobrenadante final obtenido se fraccionó en la columna de exclusión molecular. Se prepararon unos patrones de Ag de 0 a 20 $\mu\text{g/L}$. En todas las soluciones se determinó la concentración de Ag en cámara de grafito, mediante un

espectrofotómetro de absorción atómica modelo Zeeman ZL4100 Perkin-Elmer, a 328,1 nm.

Posteriormente, nos planteamos probar distintos tratamientos de la muestra con la finalidad de eliminar la señal polarográfica procedente de componentes de alto peso molecular que permanecían en el sobrenadante cuando se utilizaba el procedimiento habitual descrito por Bebianno y Langston (1989). Estos ensayos se realizaron en el complejo visceral de animales control. La preparación de la muestra se realizó siguiendo el esquema de la figura 3.2.

1) **Tratamiento térmico.** El experimento que aquí se describe se realizó con la finalidad de comprobar si un tratamiento del primer sobrenadante con una temperatura superior a la utilizada durante el procedimiento habitualmente descrito (figura 3.2) era suficiente para desnaturalizar las proteínas de alto peso molecular que presentan señal polarográfica, de forma que éstas precipitaran durante la centrifugación, y de esta forma quedaran eliminadas del sobrenadante final en el que se realiza la determinación polarográfica. Para ello, se homogeneizó el complejo visceral de un conjunto de 5 animales. Tras la centrifugación, se tomaron dos alícuotas del sobrenadante, una fue calentada a 80 °C (tubo A) y la otra calentada a 100°C (tubo B). Posteriormente se continuó según el procedimiento descrito en la figura 3.2. Tras obtener el sobrenadante final, se cuantificó la respuesta polarográfica y se fraccionó una alícuota del tubo A y otra del tubo B, por cromatografía de exclusión molecular, midiendo en cada una de ellas la señal polarográfica.

2) **Tratamiento con agente reductor.** La sospecha de que las fracciones con alta señal polarográfica, correspondientes a compuestos de peso molecular mucho más elevado que las MTs, fueran agregados de MT formados mediante el establecimiento de puentes disulfuro entre las diferentes moléculas (Suzuki y Yamamura, 1980) nos llevó a ensayar

durante la homogeneización de los tejidos, el TCEP (Tris (2-carboxietil) fosfito) como agente reductor, y comparar su acción con la del DTT (Ditiotreitol). Dicho agente reductor presenta mayor estabilidad y selectividad por los puentes disulfuro, no reaccionando con otros grupos funcionales, y produce una reducción más completa que el DTT (Ruegg y Rudinger, 1977; Burns et al., 1991). Tras homogeneizar el complejo visceral de un conjunto de 5 individuos, el homogenizado se separó en dos fracciones distintas. Una fracción fue tratada con 1 mM de DTT y la otra con 2mM de TCEP. Posteriormente se continuó según el procedimiento de la figura 3.2. La columna cromatográfica fue equilibrada de forma previa, con tampón Tris-HCl 20 mM pH 8,6, 1 mM de DTT, para fraccionar la muestra tratada con DTT, y se equilibró con el tampón Tris-HCl 20 mM pH 8,6, 2 mM de TCEP, para fraccionar la muestra tratada con TCEP. En cada una de las fracciones recogidas de ambos tratamientos, se midió la señal polarográfica.

3) **Separación mediante ultrafiltración.** Otra estrategia que se ensayó fue la separación, mediante ultrafiltración, de los componentes de alto peso molecular que permanecían en el sobrenadante después del tratamiento térmico y la centrifugación. Se utilizó para ello filtros YM-100 Microcon (Amicon, Millipore). El objetivo de estos experimentos fue comprobar: A) si conseguíamos eliminar la mayor parte de compuestos de alto peso molecular que interfieren en la medida y B) si mediante estos filtros obtenemos una buena recuperación de MT. Para acometer el primer objetivo se tomaron 12 caracoles y tras diseccionar el complejo visceral, se procedió según el esquema de la figura 3.2. Una vez obtenido el sobrenadante final, se tomó una alícuota y se hizo pasar a través de los filtros YM-100 Microcon. Estos filtros se caracterizan por tener una membrana capaz de retener el 95 % de proteínas de peso molecular mayor a 156.000 daltons y el 80 % de proteínas de 97.400 daltons,

dejando pasar proteínas de pesos moleculares menores. La fuerza necesaria para conseguir que el líquido atravesase el filtro se consigue mediante la fuerza centrífuga de una centrifuga de mesa refrigerada, que obliga a que el líquido pase de un compartimento superior del dispositivo a uno inferior, atravesando para ello el filtro. El dispositivo se centrifugó 12 minutos a 25 °C a 14.000 g. De esta forma, se pueden distinguir tres sobrenadantes: sobrenadante total (ST), que es el obtenido después del procedimiento habitual, antes de ser filtrado; el sobrenadante después de ser filtrado (SF), el cual no se concentra y pasa a la misma concentración a la que se encontraba en el ST, y el sobrenadante retenido y concentrado (SR). Se tomó una alícuota del sobrenadante SF y otra del SR, diluyendo previamente el SR tantas veces como se había concentrado con el filtro. Los sobrenadantes SF y SR fueron fraccionados mediante cromatografía de exclusión molecular. En cada una de las fracciones se midió la señal polarográfica. Para el estudio de recuperación (objetivo B) realizamos una prueba con la misma MT comercial de hígado de conejo que utilizamos como patrón para las determinaciones polarográficas de MT mediante adiciones estándar. Para ello filtramos tres soluciones de MT de distintas concentraciones conocidas (0,016, 0,033 y 0,05 µg/µL), utilizando dispositivos YM-100. Las distintas concentraciones se realizaron a partir de un stock de 5 mg/100 mL de MT patrón. Después de una centrifugación a 14.000 g a 25 °C durante 12 minutos se cuantificó la MT en el SF mediante PPD.

4.2.1.5. Evaluación de la exposición crónica a cadmio en la salud del individuo, acumulación de metal y contenido en metalotioneína.

A los individuos del estudio 3, se les midió la longitud con un pie de rey. Con la ayuda de un mortero se les rompió la concha y cada animal fue

pesado de forma individual. Se determinó el índice de condición de cada individuo, obteniendo la razón entre el peso del individuo sin concha y la longitud de la concha elevado al cubo (g/cm^3). Posteriormente, se diseccionó el complejo visceral y la parte muscular fue desechada. Cada muestra estaba constituida por los complejos viscerales de 4 individuos y fue procesada según el esquema de la figura 4.5. La señal polarográfica se cuantificó tanto en el sobrenadante total ST, como en el sobrenadante filtrado SF (que consideraremos constituido en su mayor parte por MT). También se determinó la concentración de Cd, Cu y Zn del homogeneizado total por ICP-Masas. Se tomó una alícuota del sobrenadante total de los grupos A (control), B (expuesto a 6 $\mu\text{g}/\text{L}$ de Cd) y C (expuesto a 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ de Cd) de individuos expuestos durante 8 semanas, y se fraccionó por cromatografía de exclusión molecular. En cada fracción se determinó las concentraciones de Cd, Cu y Zn por ICP-masas.

4.2.1.6. Determinación de metalotioneína por polarografía (PPD).

El procesado de las muestras se realizó siguiendo el esquema de la figura 4.5 y la determinación de MT se realizó tal y como queda descrito en el apartado 3.2.1.2. Dado los aspectos metodológicos descritos anteriormente y a la vista de los resultados mostrados en el apartado 4.3.2, al procedimiento habitual utilizado para la determinación de MT se añadió una modificación, o paso adicional, que es la ultrafiltración mediante dispositivos YM-100, como queda esquematizado en la figura 4.5. Se determinó la respuesta polarográfica en el sobrenadante total ST y en el filtrado SF. Por lo tanto, del sobrenadante final (ST) se tomó una alícuota de 500 μL y se pasó a los filtros YM-100 Microcon, y tras la centrifugación de dichos filtros a 14.000 g a 25 °C durante 12 minutos se recogió el filtrado (SF).

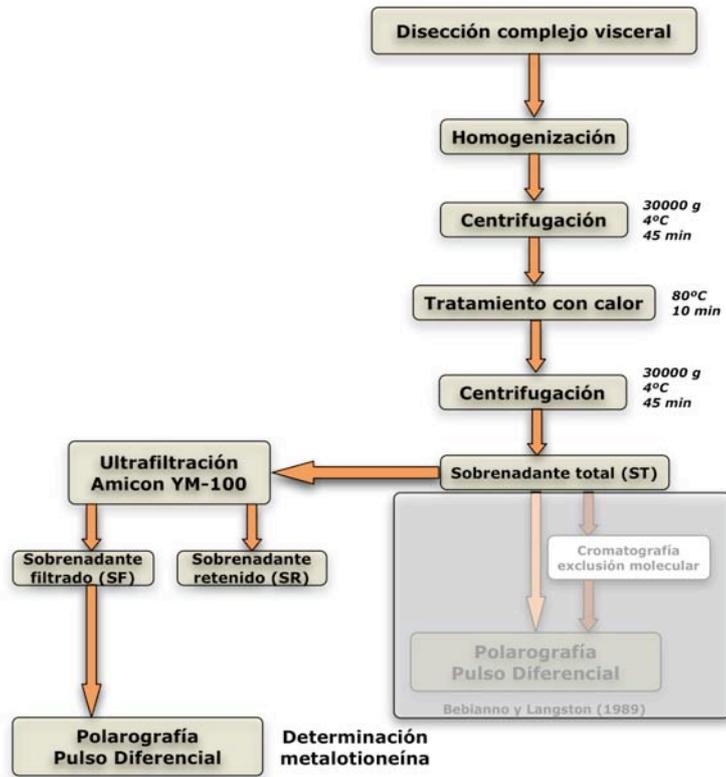


Figura 4.5. Procedimiento de determinación de MT con modificación por ultrafiltración.

4.2.1.7. Determinación de metales.

Se tomaron alícuotas de homogeneizado de complejo visceral (750 μL) y se digirieron con 150 μL de HNO_3 al 65%. Para ello se mantuvo el homogeneizado con el ácido nítrico a temperatura ambiente durante la noche y dos horas a 80°C . Una vez enfriadas las muestras se diluyeron con agua ultrapura hasta un volumen final constante. Junto con las muestras se realizaron blancos para asegurarnos que no había contaminación. La determinación de concentración de metales (Cd, Cu y Zn) se realizó usando

un equipo ICP-Masas modelo ELAN 6000 Perkin-Elmer en los Servicios científico-técnicos de la Universidad de Barcelona. Muestras de material de referencia de peso similar se digirieron y analizaron en paralelo (TORT-2, National Research Council of Canada, Ottawa). En el caso de las fracciones cromatográficas, se añadió un volumen constante de HNO₃ al 65% a cada una de ellas previamente a la determinación de los metales. Las concentraciones de metales medidas estuvieron dentro del rango certificado del material de referencia (26,9±0,38 mg/kg de Cd frente a 26,7±0,6 mg/kg del valor certificado; 184,5±8,4 mg/kg de Zn frente a 180±6 mg/kg del valor certificado; 107,9± 3,07 mg/kg de Cu frente a 106±10 mg/kg del valor certificado).

4.2.1.8. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó utilizando el mismo paquete estadístico que en estudios anteriores. Se analizó la normalidad de todas las variables consideradas y se realizaron las transformaciones más adecuadas en aquellas variables que no presentaban una distribución normal. La transformación realizada en cada parámetro queda indicado en las gráficas y tablas presentadas. Con el fin de establecer las posibles diferencias debidas al tratamiento con cadmio y al tiempo de exposición al mismo se realizó un ANOVA de doble vía para cada una de las variables consideradas en las tres exposiciones a dicho metal y se empleó el test de Bonferroni como test *a posteriori*. Se realizó un análisis de correlación para las distintas parejas de variables, mediante el test de Pearson. Los valores de p menores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Además se realizó un test de la t para comparar las concentraciones de MT y respuesta polarográfica total.

4.2.2. Purificación parcial de metalotioneína.

Se diseccionó el complejo visceral de 53 individuos control, se homogeneizó en un volumen de tampón de 5 mL y el homogeneizado resultante se procesó siguiendo el procedimiento de la figura 3.2. El sobrenadante obtenido fue concentrado y dializado mediante dispositivos YM-3 Centriprep (Amicon, Millipore), los cuales presentan un peso molecular de exclusión de 3000 Daltons. Para ello pasamos el sobrenadante a estos dispositivos y centrifugamos a 3.000 g a 25 °C durante 95 minutos. El volumen filtrado se desechó y repetimos este paso hasta concentrar la muestra a 1 mL. Este sobrenadante concentrado se fraccionó por cromatografía de exclusión molecular. En las fracciones recogidas se midió la señal polarográfica.

Se juntaron las fracciones que respondieron polarográficamente y cuyo volumen de elución correspondía con la MT I-II de hígado de conejo, y la solución obtenida se concentró y dializó por ultrafiltración con dispositivos YM-3 (muestra A), tal y como se ha descrito anteriormente. Se procedió de la misma forma con las fracciones polarográficamente activas que eluyeron en el volumen vacío, y que corresponden a componentes de alto peso molecular (muestra B). Las muestras A y B se fraccionaron por cromatografía de intercambio iónico.

4.2.2.1. Cromatografía de intercambio iónico.

La columna de intercambio iónico (Hi prep 16/10 DEAE FF, Amersham) fue equilibrada con Tris-HCl 20 mM pH 8,6 como tampón de inicio, seguido por un gradiente de 20-800 mM. Se estableció un flujo de 180 mL/h y se determinó un tiempo para cada fracción tal que se recogieran 3 mL por fracción. Una vez formado el gradiente se midió la absorbancia a 220 nm de cada una de las fracciones recogidas. Posteriormente, fraccionamos las

muestras de *Melanopsis* procedentes de la columna de exclusión molecular descritas en el apartado anterior. Ambas muestras, A (asociada a MT) y B (asociada a componentes de alto peso molecular), se fraccionaron en un gradiente de Tris-HCl 20-800 mM y se midió la señal polarográfica de las fracciones obtenidas. Las fracciones correspondientes a los diferentes picos que se detectaron polarográficamente en ambas muestras (A y B), se juntaron, concentraron y dializaron por ultrafiltración. Con las diferentes soluciones obtenidas, se realizó una electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). En el caso de las soluciones procedentes de la muestra B se procesaron todos los picos, y en el caso de las procedentes de la muestra A se tomó el pico de mayor señal polarográfica para la realización del gel. Además, se tomó una alícuota en solución de los picos procedentes de la muestra asociada a MT (A) para la determinación de su peso molecular.

4.2.2.2. Electroforesis.

En el análisis electroforético de MTs, la carboximetilación de los residuos de cisteínas es indispensable para prevenir su agregación, por lo que las muestras fueron carboximetiladas como describe Otsuka et al. (1988), con ligeras modificaciones. Las muestras asociadas a componentes de alto peso molecular también fueron carboximetiladas, dado que presentan un alto contenido en grupos -SH. Una alícuota de la muestra (10 µL) se mezcló con 10 µL de tampón Tris-HCl 100 mM pH 8,8, que contenía 60 mM de DTT, 40 mM de EDTA, 4 % de SDS y 25 % de glicerol. Se calentaron las muestras a 100°C durante 5 minutos para romper los puentes disulfuro. Después se añadió 5 µL de Iodoacetamida (25 mg/mL) y se calentaron a 50 °C durante 15 minutos para impedir la agregación de los puentes disulfuro. Finalmente, se añadieron 2 µL de azul de bromofenol al 1 %.

En función de la procedencia de la muestra, se realizaron dos tipos de geles. Para la muestra asociada con MT, se preparó un gel de alineamiento con un 4 % de acrilamida, 0,1 % de SDS y un gel de separación con un 16,5 % de acrilamida, 0,1 % de SDS, 9,8 % de glicerol, con un sistema de tampones de Tris/Tricina/SDS según Schägger y von Jagow (1987). Para las muestras asociadas a componentes de alto peso molecular, se preparó un gel de alineamiento igual al anterior y un gel de separación con un 10 % de acrilamida, un 0,1 % de SDS, con un sistema de tampones de Tris/Glicina/SDS según Laemmli (1970). Se utilizaron diferentes marcadores de pesos moleculares: WMW (Wide molecular weight, Sigma) que contiene proteínas en un rango de 205-6,5 kDa; proteínas estándar color dual (Precision Plus Protein, Bio-Rad) en un rango de 250-10 kDa y MWM Ultra-low (Molecular weight markers ultra-low range, Sigma) con un rango de 26,6-1,06 kDa.

Las electroforesis en gel de poliacrilamida se realizaron en un sistema Mini-Protean 3 (Bio-Rad, Richmond) con un tamaño de gel de 70x80x0,75 mm y se llevó a cabo a 80 mV hasta llegar el frente al gel de alineamiento y se mantuvo a 120 mV hasta finalizar la electroforesis. Los geles fueron teñidos mediante la tinción de proteínas con Azul Coomassie (PhastGel Blue R, Amershan). La solución de tinción se realizó disolviendo una tableta de PhastGel en acético al 10 %. La tinción se realizó incubando los geles durante 10 minutos en la solución de tinción a 90 °C y en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente, el gel se destiñó a través de una serie de lavados con una solución de ácido acético glacial (Panreac) al 10%, de forma que quedasen teñidas únicamente las proteínas.

Las bandas obtenidas en los diferentes geles, así como las proteínas en solución asociadas a MT, fueron enviadas al Centro de Investigación Príncipe Felipe (Valencia) donde se aplicaron las técnicas de Espectrometría de Masas que se detallan a continuación.

4.2.2.3. Determinación del peso molecular.

Las muestras en solución procedentes de la cromatografía de intercambio iónico asociada a MT, se desalaron previamente utilizando micro C4 ZipTips (Millipore, Bedford, MA) y se eluyeron directamente con 5 mg/mL de la solución de la matriz, CHCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico) en 70% acetonitrilo y 0,1% ácido trifluoroacético. Las muestras se analizaron en un espectrómetro de masas 4700 Proteomic Analyzer MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems), para la determinación de su peso molecular.

4.2.2.4. Identificación de proteínas.

Cada una de las bandas obtenidas en ambos geles fueron recortadas de forma manual y se realizó una digestión con tripsina según el siguiente protocolo:

- 1.-Escisión de las bandas: Manual
- 2.-Digestión con tripsina
 - Destinción Coomassie
 - 2x15' H₂O/ACN (acetonitrilo)(1:1, v/v)
 - ACN. Cuando el gel se ha deshidratado sacar el líquido
 - Rehidratar con 0,1M NH₄HCO₃, después de 5' añadir ACN. Esperar 15 min.
 - 1x5' ACN
 - Digestión
 - 1x30' (60°C) 10mM DTT en 0,1M NH₄HCO₃ (80mg/mL)
 - 1x30' (oscuridad) 55mM IAM (iodoacetamida) (10mg/mL) en 0,1M NH₄HCO₃
 - 1x2' H₂O/ACN
 - 1x5' ACN y "Speed-Vac"
 - Tripsina (10-15 ng Ag, 100-150 ng Coomassie) en 10 μ L. Incubar 30' en hielo.
 - Retirar el Sobrenadante.
 - Añadir 20 μ L 50mM NH₄HCO₃
 - "Overnight" 37°C
- 3.-Procesado de la muestra para análisis por EM
 - Doble extracción
 - "Speed vac"
 - Resuspensión a 6 μ L

El control de la digestión se lleva a cabo mediante la digestión en paralelo de una banda de 125 ng de BSA. El control de contaminantes se realiza mediante la inclusión de una alícuota de gel en blanco y un pocillo sin gel. Una vez digeridas las muestras se utilizaron diferentes técnicas de Espectrometría de masas para la identificación de proteínas.

MALDI-MS

Las muestras se analizaron en un espectrómetro de masas 4700 Proteomic Analyzer MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems). Cuando fue necesario se desalaron previamente utilizando micro C18 ZipTips (Millipore, Bedford, MA) y se eluyeron directamente con 5 mg/mL de CHCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico) en 70% acetonitrilo y 0,1% ácido trifluoroacético. Cada espectro de masas es el resultado de acumular 1500 disparos de láser. De cada espectro los cinco picos de mayor intensidad no incluidos en la lista de exclusión se seleccionan para su análisis de MS/MS. Los espectros de MS/MS se adquieren con aire a media presión en la cámara de colisión, y son el resultado de adquirir 300 disparos de láser. Los espectrómetros de masas se calibran antes de cada análisis y la calidad de los espectros obtenidos se comprueba visualmente. La información combinada de MS y MS/MS se envía automáticamente a MASCOT (Matrix Science) a través del programa GPS (Applied Biosystems). El Algoritmo de Búsqueda utilizado es MASCOT http://www.matrixscience.com/search_intro.html y Algoritmo adicional Phenyx si procede.

Cromatografía líquida (LC)-MS/MS

Esta técnica se utilizó únicamente para la muestra de MT aislada en el gel. Para ello, se realizó una cromatografía HPLC en fase reversa usando una columna 75 mm x 150 mm (LC-Packings) y las muestras se inyectaron usando un autoinyector FAMOUS y un sistema Switchos II (LC-Packings). La muestra se carga primero en una precolumna de 1 mm para su desalado en línea y se retroeluye en la columna analítica para la etapa de separación. El eluyente usado en esta etapa es 0,1% ácido trifluoroacético. El gradiente de separación se controla con un Ultimate HPLC System (LC-Packings). El eluyente A era 0,1% ácido fórmico (FA) y el B 95% acetonitrilo 0,1% (ACN). El flujo de trabajo 200 nL/min. El gradiente utilizado fue el siguiente:

0% B → 0% B en 3 min

0% B → 15% B en 2 min

15% B → 50% B en 60 min

50% B → 90% B en 2 min

90% B → 90% B en 15 min

La muestra se eluye directamente en la fuente nanospray del espectrómetro de masas Qstar XL (Applied Biosystems) donde se realiza un análisis IDA ("Information Depending Acquisition") con ciclos de adquisición en modo MS y MS/MS a lo largo de todo el cromatograma. Los espectros de MS/MS obtenidos se envían de forma automatizada a MASCOT a través del programa Mascot Daemon (Matrix Science). El nanoLC se controla mediante la separación, previa a cada análisis, de los péptidos trípticos de citocromo C bovino. La sensibilidad de los análisis se evalúa mediante la identificación de 200 fmoles de mioglobina. Además, los resultados de las búsquedas se analizan de forma visual.

Además, se generó una base de datos a partir de la información obtenida en la literatura sobre la secuencia de aminoácidos de MT de diferentes gasterópodos (figura 4.6). La predicción *in silico* de los péptidos generados por digestión con tripsina de la MT de la base de datos se comparó con los espectros de los péptidos obtenidos a partir de las proteínas de *Melanopsis*.

sp|P55947|MTCU_HELPO Copper-metallothionein (Cu-MT) - *Helix pomatia* (Roman snail) (Edible snail).

**SGRGKNCGGACNSNPCSCGNDCKCGAGCNCDRCSSCHCSNDDCK
CGSQCTGSGSCKCGSACGCK**

sp|P33187|MTCD_HELPO Cadmium-metallothionein (CD-MT) - *Helix pomatia* (Roman snail) (Edible snail).

**SGKGKGEKCTSACRSEPCQCGSKCQCGEGCTCAACKTCNCTSDGCK
CGKECTGPDSCCKGSSCSCK**

sp|P55946|MT_ARIAR Metallothionein (MT) - *Arianta arbustorum* (Land snail).

**SGKGKGDLC TAACKNEPCQCGSKCQCGEGCACASCKTCNCTSDGC
KCGKECTGAASCKCNSSCSCK**

Figura 4.6. Base de datos realizada con la secuencia de aminoácidos de algunos gasterópodos a partir de la información obtenida en la literatura.

4.3. RESULTADOS.

4.3.1. Respuesta de *Melanopsis dufouri* frente a la exposición a cadmio.

4.3.1.1. Acumulación de cadmio y respuesta polarográfica en los estudios preliminares de *M. dufouri*.

En la figura 4.7 se muestra la concentración media de Cd obtenida en el pie y el complejo visceral después de que los caracoles fueran expuestos durante una semana a 3 mg/L de Cd. Como se puede observar, ambos tejidos acumulan Cd, puesto que el test del ANOVA mostró un efecto significativo ($p < 0,001$) de la exposición a cadmio sobre los niveles del metal que presentaban los tejidos. Cabe destacar, que se observa una mayor acumulación de Cd en el complejo visceral respecto del pie del animal.

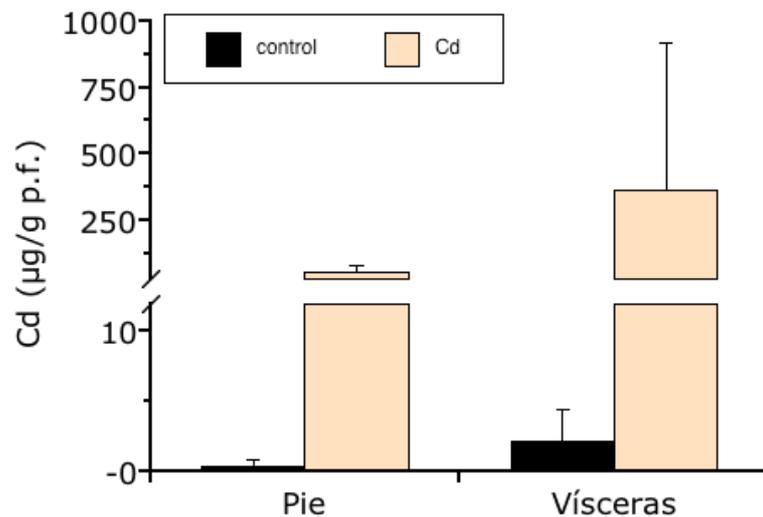


Figura 4.7. Concentración de Cd en el pie y el complejo visceral en animales control y expuestos a 3 mg/L de Cd durante una semana ($n=4$). Los datos se expresan como valor medio \pm D.E.

En la figura 4.8 se muestra la señal polarográfica obtenida en el pie y las vísceras de caracoles controles y expuestos a 3 mg/L de Cd durante una semana. Dado que se realizó adiciones estándar de MT de conejo en cada una de las determinaciones y con el fin de facilitar las comparaciones, la señal se expresa como μg de MT/g. En ambos tejidos se observa una disminución significativa de la respuesta polarográfica después de una semana de exposición a Cd.

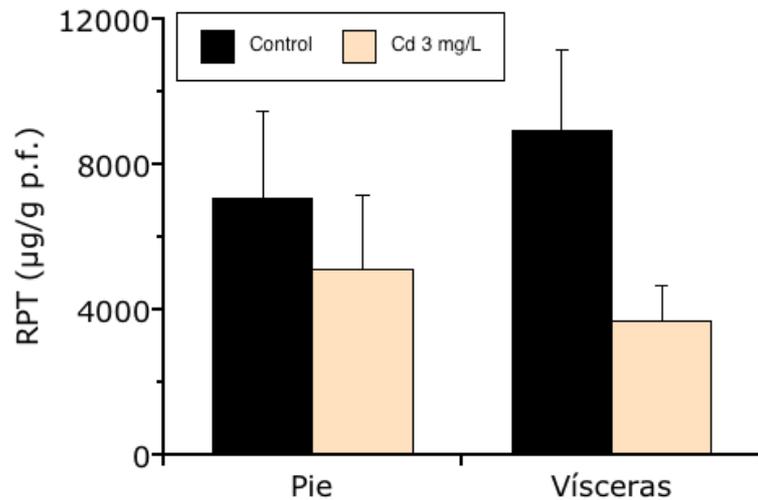


Figura 4.8. Respuesta polarográfica total (RPT) en el pie y el complejo visceral de animales control y expuestos a 3 mg/L Cd durante una semana. Los resultados están expresados como μg de MT/g de peso fresco ($n=4$). Los datos se expresan como valor medio \pm D.E.

Otra información relevante de estos resultados es los altísimos niveles de MT que el método de determinación utilizado asignaba a los tejidos procedentes de individuos control, pero principalmente los observados en el complejo visceral. Por este motivo, y teniendo en cuenta los resultados de trabajos similares realizados con el gasterópodo prosobranquio marino

Littorina littorea (Bebianno et al., 1992), nos planteamos si el método aplicado para la determinación de MT en *M. dufouri* era adecuado. Una de las cuestiones relevantes era conocer si el tratamiento térmico era suficiente para eliminar todas las proteínas polarográficamente activas con excepción de la MT. Por esta razón, obtuvimos polarogramas de los sobrenadantes correspondientes a cada tejido antes y después de que dichos sobrenadantes fueran sometidos a tratamiento térmico, para de esta forma conocer la proporción de señal eliminada durante el tratamiento térmico (figura 4.9).

En el pie de *M. dufouri* se observa que con el tratamiento térmico, hay una disminución apreciable de la señal polarográfica, por lo que se puede considerar que se elimina una gran parte de señal polarográfica procedente de proteínas que no son MT. Sin embargo, en las vísceras los dos polarogramas están muy próximos, indicando que en este tejido se sigue observando una señal polarográfica considerable tras el tratamiento térmico. A la vista de estos resultados, y con el objetivo de saber si la señal polarográfica obtenida tras el tratamiento con calor en ambos tejidos correspondía únicamente a MT, se realizaron las cromatografías de exclusión molecular con los sobrenadantes correspondientes a ambos tejidos, que se muestran en la figura 4.10.

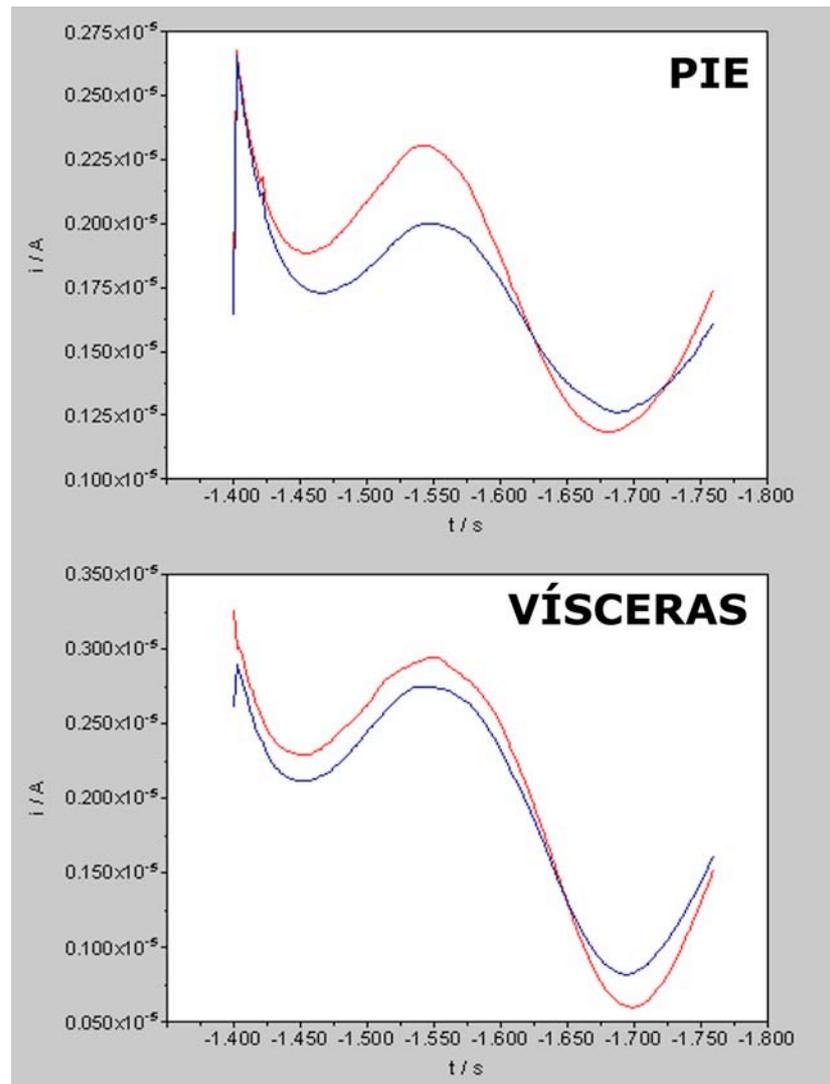


Figura 4.9. Polarogramas de los sobrenadantes del pie y las vísceras. La línea roja corresponde al primer sobrenadante obtenido y la azul al obtenido después del tratamiento térmico.

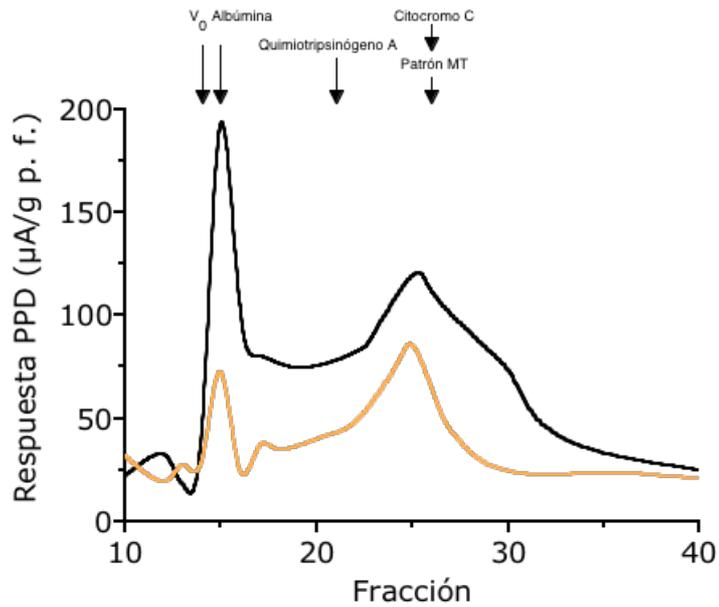


Figura 4.10. Respuesta polarográfica de las fracciones cromatografiadas del sobrenadante tratado con calor del pie (■) y de las vísceras (■) de individuos control de *M. dufouri*.

El perfil de elución cromatográfico del pie y el complejo visceral revela diferencias entre los dos tejidos. El perfil del complejo visceral del grupo control indica que una gran proporción del total de grupos $-SH$ está asociada con las fracciones correspondientes a componentes de alto peso molecular situadas entre la 12 y la 18, a pesar del tratamiento con calor, con cual se esperaba eliminar estas proteínas. Estas fracciones se situarían en el volumen vacío de la columna. Se observa un segundo pico situado entre las fracciones 20-30 que corresponde a MT, que representa aproximadamente el 50% de la respuesta polarográfica total. Al contrario de lo que ocurre en el complejo visceral, en el pie, la mayor parte de la respuesta polarográfica (aproximadamente un 70%) está asociada con las fracciones correspondientes a MT. Aunque en el pie se encuentran componentes de

alto peso molecular que responden polarográficamente, la altura del pico es menor que el observado para MT.

A la vista de los resultados obtenidos, y teniendo en cuenta la disminución de MT debida a la alta concentración de Cd a la que estuvieron expuestos los individuos, realizamos un segundo experimento preliminar en el cual los individuos fueron expuestos a 100 µg/L de Cd durante dos semanas.

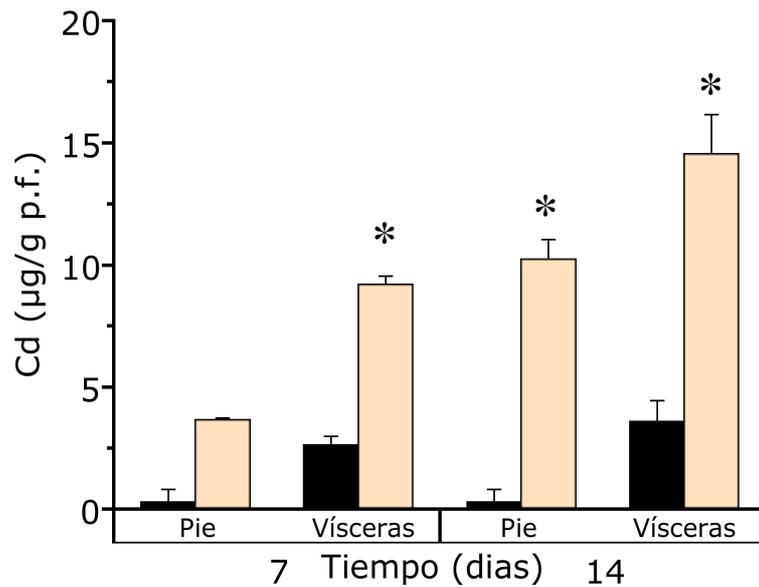


Figura 4.11. Concentración de Cd en el pie y el complejo visceral de individuos control (■) y expuestos a 100 µg/L de Cd (□) durante dos semanas. (*) Diferencias significativas $p < 0,001$ ($n=4$). Los datos se expresan como valor medio \pm D.E.

Como se puede observar en la figura 4.11, la concentración de Cd aumenta con el tiempo de exposición, tanto en el complejo visceral como en el pie de individuos expuestos a 100 µg/L durante dos semanas. Cabe destacar que los valores que se alcanzan en el complejo visceral son

superiores respecto a los del pie del animal. Los resultados estadísticos del ANOVA de doble vía indican que existe un efecto significativo del tratamiento, del tiempo y de la interacción de ambos factores sobre la concentración de cadmio en los tejidos, tanto en el complejo visceral como en el pie (en todos los casos $p < 0,01$). El test *a posteriori* realizado en el complejo visceral sobre los valores de Cd revela que existen diferencias significativas del grupo expuesto a Cd respecto del grupo control tanto a los 7 días como a los 14 días del experimento ($p < 0,001$); sin embargo, en el pie solamente se encuentra un incremento significativo a los 14 días de exposición ($p < 0,001$). La concentración de Cd en el complejo visceral y el pie de caracoles control permanece sin cambios significativos durante el transcurso del experimento.

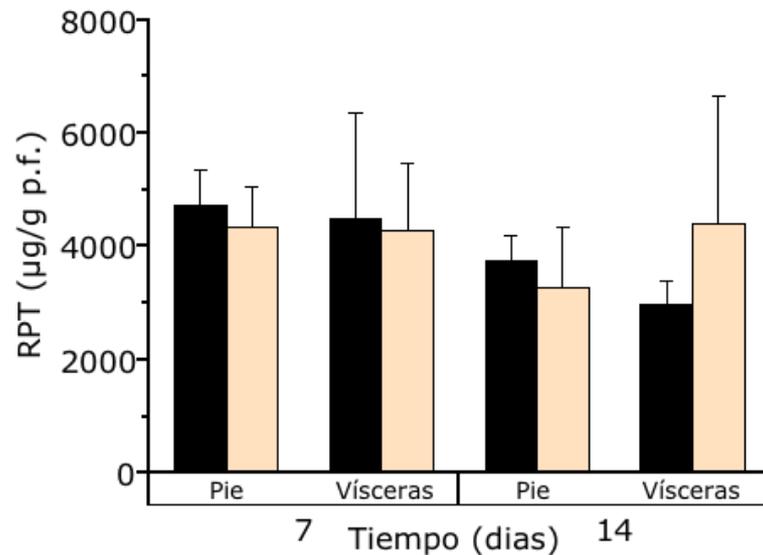


Figura 4.12. Respuesta polarográfica total (RPT) en el pie y el complejo visceral de individuos control (■) y expuestos a $100 \mu\text{g/L}$ de Cd (□) durante dos semanas. Los resultados están expresados como μg de MT/g de peso fresco ($n=4$). Los datos se expresan como valor medio \pm D.E.

Después de dos semanas de exposición a 100 µg/L de Cd, el pie de los individuos expuestos presenta valores de respuesta polargráfica ligeramente inferiores a los de los controles (figura 4.12), lo que sugiere que este tejido no es adecuado para el seguimiento de la contaminación, ya que no muestra inducción de MT, a pesar de los niveles acumulados de Cd. En el complejo visceral se observa un aumento, aunque no significativo, de la respuesta polarográfica respecto al grupo control a las dos semanas de exposición.

Para comprobar la presencia de interferencias procedentes de componentes de alto peso molecular, realizamos las cromatografías de exclusión molecular correspondientes a los sobrenadantes tratados con calor de ambos tejidos pertenecientes a animales expuestos a Cd durante 7 y 14 días.

En el cromatograma presentado de la figura 4.13A, correspondiente al complejo visceral, se observa de nuevo una alta señal polarográfica en las fracciones 12-18, tanto en los individuos control como en los expuestos. La intensidad de la señal varía con el tratamiento y el tiempo de exposición. La señal correspondiente a las fracciones de MT aumenta con la exposición a Cd, principalmente a los 14 días de exposición, lo que está de acuerdo con los resultados mostrados en la figura 4.12. En las fracciones cromatográficas del pie (figura 4.13B) no se observan grandes interferencias polarográficas debidas a componentes de alto peso molecular. La señal polarográfica es principalmente debida a las fracciones correspondientes a MT, sin embargo, no se observa un incremento de señal en estas fracciones con la exposición a Cd y el tiempo de exposición, lo que hace que este tejido no se considere adecuado a la hora de detectar respuestas subletales a metales.

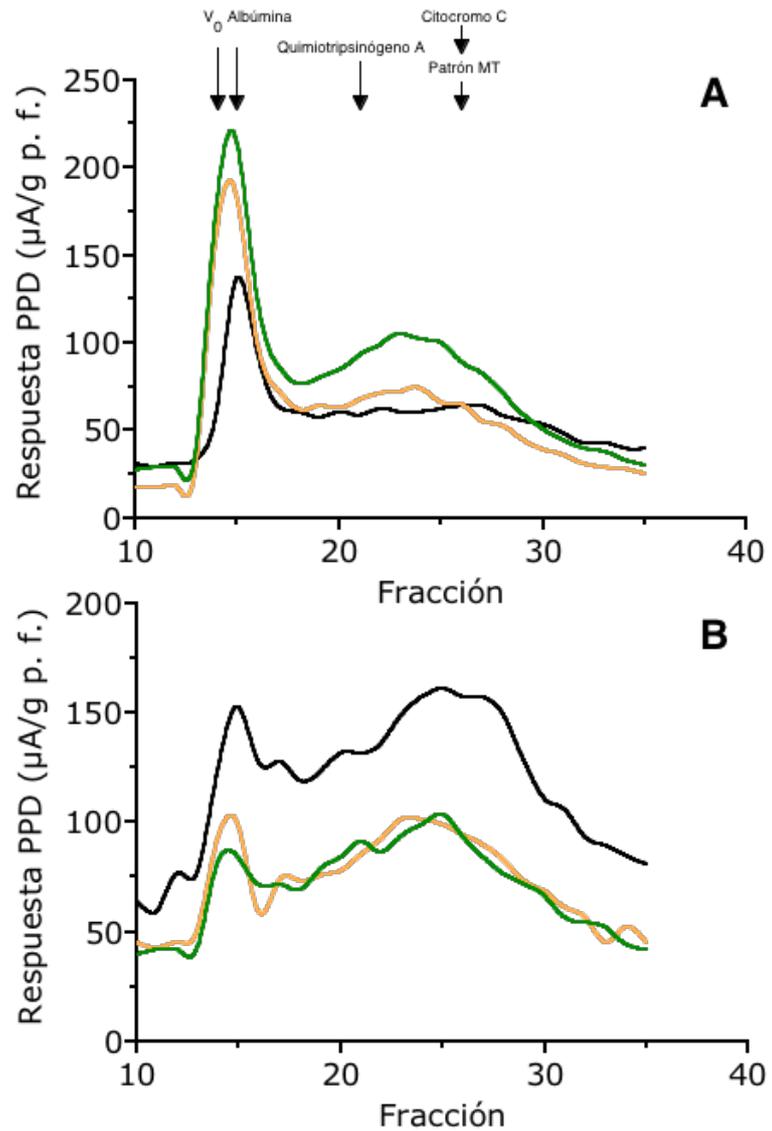


Figura 4.13. Respuesta polarográfica de las fracciones cromatográficas correspondientes al sobrenadante tratado con calor en las vísceras (A) y en el pie (B) de individuos control (■), y expuestos a 100 $\mu\text{g/L}$ de Cd durante una y dos semanas (■) y (■) respectivamente.

A la vista de los resultados de estos experimentos preliminares, consideramos el complejo visceral un tejido más idóneo para el estudio de respuestas a contaminación por metales, ya que es un lugar de mayor acumulación de Cd, en comparación con el pie, y los experimentos preliminares mostraron una tendencia al aumento de concentración de MT con la exposición a cadmio. Sin embargo, las interferencias que suponen los componentes de alto peso molecular termoestables a la hora de determinar el contenido de MT mediante el método polarográfico, nos llevó a plantearnos variaciones en la metodología utilizada para la separación y cuantificación de la MT.

4.3.1.2. Aspectos metodológicos en la determinación de metalotioneína en M. dufouri.

A partir de la concentración de Ag eluída en las distintas fracciones cromatográficas se obtuvo el perfil que se presenta en la figura 4.14. El pico constituido por las fracciones del volumen vacío y que corresponden a plata unida a compuestos de pesos moleculares elevados ($PM \geq 70.000$ Da) es indicativo de la presencia de compuestos termoestables que unen plata y cuyo peso molecular no se corresponde con el de la MT. La presencia de estos compuestos de alto peso molecular con afinidad por la plata no permite la utilización del método de saturación por plata para la determinación de MT en el complejo visceral de *M. dufouri*.

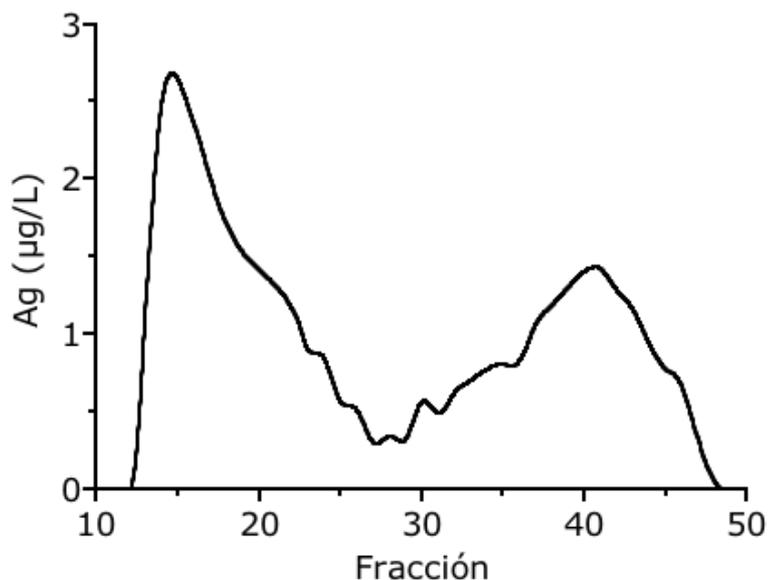


Figura 4.14. Perfil de elución cromatográfica correspondiente al sobrenadante final obtenido tras someter al complejo visceral de *M. dufouri* al proceso que se sigue en el método de determinación de MT mediante saturación con Ag.

Los resultados obtenidos tras aplicar diferentes procedimientos alternativos al método de PPD para la cuantificación de MT, con el fin de eliminar los compuestos de elevado peso molecular que interferían con la señal polarográfica, se muestran en las figuras 4.15, 4.16 y 4.17.

La respuesta polarográfica expresada como µg de MT/g peso fresco, obtenida tras el tratamiento térmico, fue de $2881,8 \pm 387,7$ para el sobrenadante A (calentado a 80°C) y de $842,5 \pm 68,4$ para el sobrenadante B (calentado a 100°C). Observando estos valores podríamos intuir que con el tratamiento térmico eliminamos gran parte de la señal polarográfica, sin embargo, el perfil cromatográfico nos indica que esta reducción en la señal no se debe específicamente a componentes de alto peso molecular.

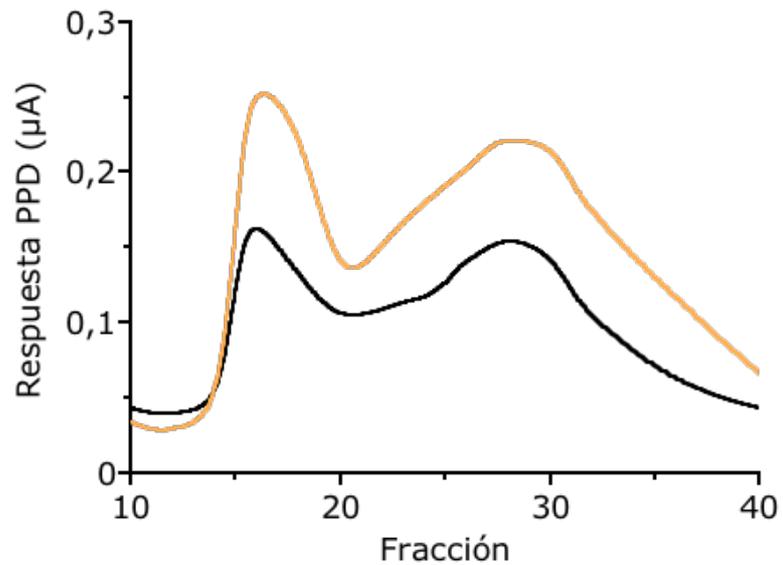


Figura 4.15. Respuesta polarográfica correspondiente al sobrenadante del complejo visceral tratado a 80°C (■) y 100°C (■).

En el perfil de elución cromatográfico de la figura 4.15, se puede observar que el sobrenadante sometido a un tratamiento térmico de 100°C presenta menor señal polarográfica respecto al tratamiento ordinario de 80°C en todas las fracciones, pero no parece que este tratamiento sea suficiente para la eliminación de los compuestos de alto peso molecular que son activos polarográficamente y presentan un carácter termoestable.

Resultados similares a los anteriormente descritos se obtienen al comparar los tratamientos con los dos agentes reductores ensayados (figura 4.16). La señal polarográfica en todas las fracciones de las muestras tratadas con TCEP es considerablemente menor respecto a las tratadas con DTT, pero se sigue observando un pico de respuesta en el rango correspondiente al alto peso molecular, por lo que este tratamiento tampoco puede ser

utilizado para la determinación directa de MT mediante el método polarográfico.

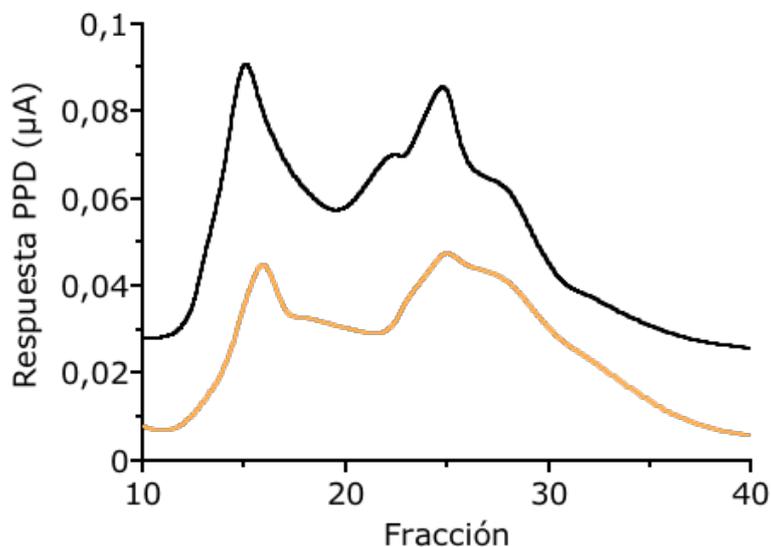


Figura 4.16. Respuesta polarográfica correspondiente al sobrenadante del complejo visceral tratado con TCEP (■) y con DTT (■).

El perfil de elución cromatográfico del ensayo de ultrafiltración utilizando filtros Microcon YM-100 se muestra en la figura 4.17.

El cromatograma correspondiente al sobrenadante retenido muestra que la respuesta polarográfica correspondiente a compuestos de alto peso molecular queda prácticamente en su totalidad retenida en el filtro. Además, observando el cromatograma del sobrenadante filtrado se confirma que la respuesta polarográfica de este pico está prácticamente ausente y se mantiene la respuesta correspondiente a compuestos de peso molecular compatible con la MT. También se observa que en el sobrenadante retenido aparece señal polarográfica en las fracciones correspondientes a la MT y que

es debida a MT que no ha sido filtrada al final del proceso. En este punto hay que tener en cuenta, que el sobrenadante filtrado (SF) no se concentra, y presenta, por tanto, la misma concentración de MT que tendría el sobrenadante total con independencia de que quede MT en la porción retenida. Todo ello apoya la bondad de esta filtración para retirar los compuestos de alto peso molecular. Por lo tanto, se podría utilizar el SF directamente para la cuantificación de MT mediante polarografía en el complejo visceral de *M. dufouri*.

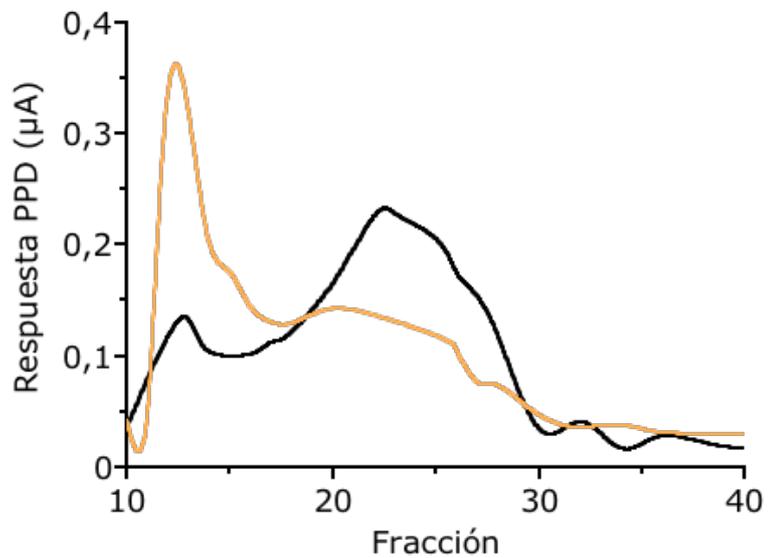


Figura 4.17. Perfiles cromatográficos superpuestos de la respuesta polarográfica del sobrenadante filtrado (SF) (■) y sobrenadante retenido (SR) (■) del complejo visceral utilizando dispositivos YM-100.

Los resultados de la recuperación de MT mediante los dispositivos YM-100 se muestran en la tabla 4.1.

Tabla 4.1. Comparación de la concentración media (\pm D.E.) de MT ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) obtenida tras la ultrafiltración de distintas concentraciones de MT comercial de hígado de conejo y su valor esperado ($n=3$).

Valor obtenido	Valor esperado
0,0158 \pm 0,003	0,016
0,036 \pm 0,006	0,033
0,053 \pm 0,013	0,05

En los resultados de recuperación de MT presentados en la tabla 4.1, se muestra una buena recuperación de MT, de forma que podemos afirmar que la retención de la MT en los filtros es mínima. Estos dispositivos son capaces de filtrar toda la proteína a concentraciones más altas incluso, que las que encontramos en los tejidos, lo cual apoya la idoneidad de estos filtros para la determinación de MT de una forma directa.

4.3.1.3. Efecto de la exposición a cadmio en el índice de condición, acumulación de metal y contenido de metalotioneína.

Los valores encontrados de índice de condición (IC) en los tres grupos experimentales a lo largo de 8 semanas se muestran en la figura 4.18. Tanto en el grupo control como en los dos grupos expuestos a Cd, el índice de condición disminuye, y esta disminución se hace más apreciable a partir de la 4ª y 6ª semana de experimentación, encontrándose un efecto del tiempo significativo sobre el índice de condición según el test del ANOVA ($p<0,05$; tabla 4.2), pero no del tratamiento con Cd. Cabe destacar que los valores medios del grupo expuesto a 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ de Cd son siempre inferiores a los valores medios correspondientes al grupo control.

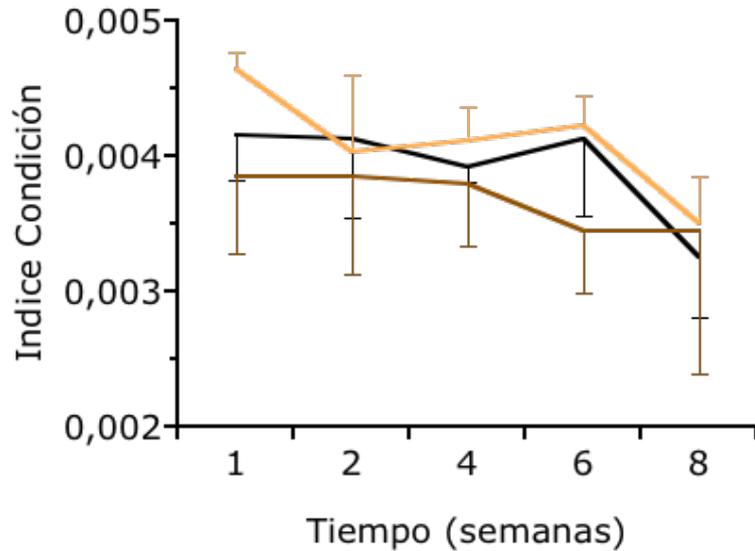


Figura 4.18. Valores de Índice de condición de individuos de *M. dufouri* control (■), y expuestos a 6 y 100 µg/L Cd (■ y ■, respectivamente) (n=3). Los datos se expresan como valor medio±D.E.

En la figura 4.19 se puede observar cómo la concentración de Cd en el complejo visceral aumenta de forma lineal a lo largo de todo el tiempo de exposición en los dos grupos de caracoles expuestos a cadmio. El análisis estadístico indica que existe un efecto significativo de la exposición al metal, del tiempo de exposición y de la interacción de ambos factores sobre la concentración de cadmio ($p < 0,001$; tabla 4.2). El test *a posteriori* indica diferencias significativas de los valores medios correspondientes al grupo expuesto a 100 µg/L de Cd respecto del grupo control en todos los muestreos. Sin embargo, en el grupo expuesto a 6 µg/L de Cd, sólo se encuentran diferencias estadísticamente significativas respecto de los valores del grupo control, en las dos últimas semanas de exposición. La concentración de Cd en el complejo visceral del grupo control permanece sin cambios durante el transcurso del experimento.

Tabla 4.2. Resultados del ANOVA de doble vía.

Parámetro	Efecto	F(g1, g2)	valor P
Factor condición	Tratamiento	F(2, 42) = 2,30	0,1191
	Tiempo	F(4, 42) = 3,00	0,0352
	Tratamiento x Tiempo	F(8, 42) = 0,43	0,8898
MT	Tratamiento	F(2, 42) = 8,04	0,0017
	Tiempo	F(4, 42) = 0,99	0,4275
	Tratamiento x Tiempo	F(8, 42) = 0,38	0,9218
Respuesta total	Tratamiento	F(2, 42) = 0,98	0,3868
	Tiempo	F(4, 42) = 2,34	0,0796
	Tratamiento x Tiempo	F(8, 42) = 2,73	0,0232
Cd	Tratamiento	F(2, 42) = 211,72	<0,0001
	Tiempo	F(4, 42) = 21,07	<0,0001
	Tratamiento x Tiempo	F(8, 42) = 6,12	0,0002
Cu	Tratamiento	F(2, 42) = 1,63	0,2144
	Tiempo	F(4, 42) = 0,45	0,7720
	Tratamiento x Tiempo	F(8, 42) = 1,31	0,2811
Zn	Tratamiento	F(2, 42) = 0,66	0,5266
	Tiempo	F(4, 42) = 0,97	0,4423
	Tratamiento x Tiempo	F(8, 42) = 1,24	0,3152

Las probabilidades estadísticamente significativas se resaltan en negrita.

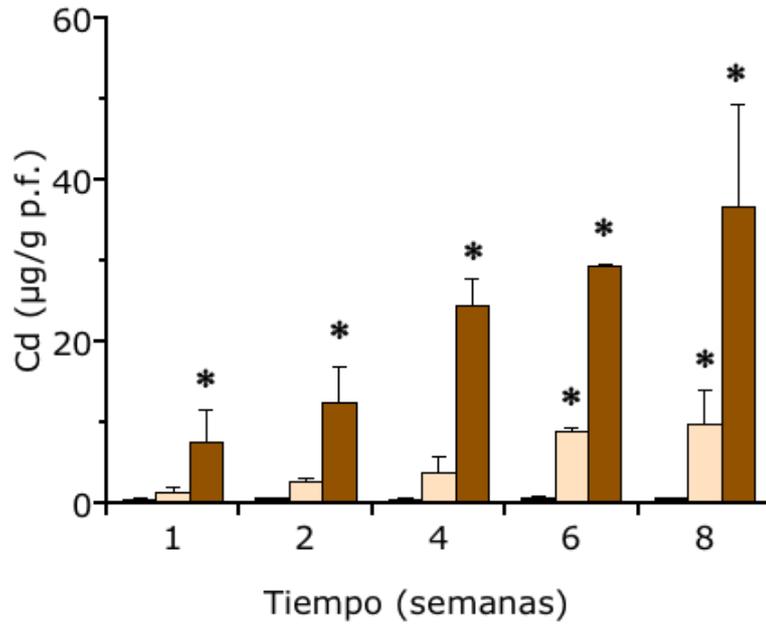


Figura 4.19. Concentración de Cd en el complejo visceral de individuos de *M. dufouri* control (■) y expuestos a 6 y 100 µg/L de Cd (□) y (■) respectivamente. (*) Diferencias significativas $p < 0,05$, ($n=3$). Los datos se expresan como valor medio \pm D.E.

Las concentraciones de Cu y Zn obtenidas en las diferentes semanas del tratamiento con Cd en los tres grupos experimentales se muestran en la tabla 4.3. No se encuentran diferencias significativas en los contenidos de Cu y Zn correspondientes a los grupos control con respecto a los dos grupos expuestos a cadmio (tabla 4.2). Las concentraciones de Zn en los tres grupos considerados varían mucho entre los distintos muestreos. La exposición de Cd produce una redistribución de los contenidos de Cu y Zn a lo largo del tiempo.

Tabla 4.3. Concentraciones de Cu y Zn ($\mu\text{g/g}$ peso fresco) en el complejo visceral de individuos control (C) y expuestos a 6 (T1) y 100 $\mu\text{g/L}$ (T2) de Cd durante 8 semanas ($n=3$). Los datos se expresan como valor medio \pm D.E.

Metal		Tiempo (semanas)				
		1	2	4	6	8
Cu	C	38,8 \pm 6,4	49,5 \pm 10	42,7 \pm 9,9	36,7 \pm 5,2	49,1 \pm 3,4
	T1	45,7 \pm 10,7	37,7 \pm 6,8	26,8 \pm 13,8	42,2 \pm 0,9	36,2 \pm 4,8
	T2	40,5 \pm 10,6	29,0 \pm 12,1	39,7 \pm 12,9	36,7 \pm 1,3	40,5 \pm 18,1
Zn	C	130,0 \pm 46,5	144,5 \pm 52,1	164,3 \pm 12,6	231,8 \pm 122	250,9 \pm 13,7
	T1	163,7 \pm 49,7	183,5 \pm 6,9	122,7 \pm 75,2	184,4 \pm 24,0	152,2 \pm 14,3
	T2	168,3 \pm 69,8	153,1 \pm 14,7	165,5 \pm 35,9	161,4 \pm 37,0	152,6 \pm 43,7

Los valores medios de concentración de MT se presentan en la figura 4.20A. El test del ANOVA mostró un efecto significativo de la exposición a Cd sobre la concentración de MT ($p<0,01$; tabla 4.2). El test *a posteriori* por parejas no mostró diferencias significativas entre los valores medios correspondientes a los tres grupos en ninguno de los muestreos. No obstante, se puede observar que el grupo expuesto a 100 $\mu\text{g Cd/L}$ presenta niveles de MT superiores a los niveles del grupo control en casi todos los casos, no siendo así en el grupo expuesto a 6 $\mu\text{g/L}$ de Cd. En la figura 4.20B se muestran los valores de respuesta polarográfica total expresados como μg de MT. Se puede observar que dichos valores son muy variables tanto en el tiempo de exposición como con el tratamiento de Cd, lo que indica que la señal polarográfica correspondiente a componentes de alto peso molecular no es constante sino que varía con el tiempo y con la exposición a Cd. El análisis estadístico no mostró un efecto significativo de la exposición a Cd sobre los niveles de RPT, aunque si con su interacción con el tiempo ($p<0,05$; tabla 4.2).

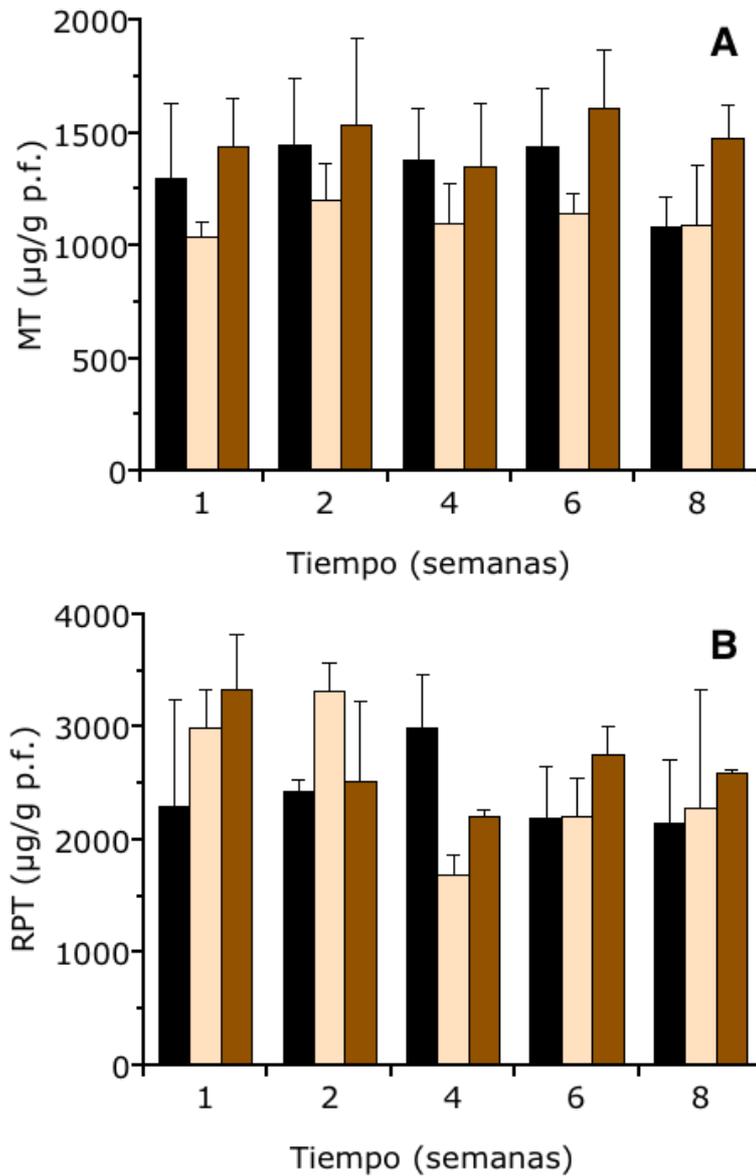


Figura 4.20. Concentración de MT (A) y Respuesta polarográfica total (RPT) (B) expresada como μg de MT/g en el complejo visceral de *M. dufouri* de individuos control (■) y expuestos a 6 y 100 $\mu\text{g/L}$ de Cd (◻ y ◼ respectivamente) ($n=3$). Los datos se expresan como valor medio \pm D.E.

Al comparar la concentración de MT en los diferentes grupos experimentales con los valores correspondientes de respuesta polarográfica total, se observa que en la mayoría de casos los valores de respuesta polarográfica total son muy superiores a las concentraciones de MT. El test de la t pareado muestra diferencias estadísticamente significativas entre los valores de ambas variables en los tres grupos experimentales ($p < 0,0001$).

Estas diferencias entre las dos variables también se reflejan en los resultados del análisis de correlación. Se encuentra una correlación positiva significativa ($p < 0,05$; $r = 0,32$) entre las concentraciones de Cd y los valores de MT determinados en el complejo visceral, sin embargo, los valores de respuesta polarográfica total no se encuentran correlacionados con las concentraciones de Cd.

El perfil obtenido a partir de las concentraciones de Cd determinadas en las fracciones cromatográficas del sobrenadante tratado con calor del complejo visceral de individuos control y expuestos a Cd se muestra en la figura 4.21A. Este perfil muestra que en los individuos expuestos, el Cd se une preferentemente a compuestos que eluyen en las mismas fracciones que lo hace la MT. Además el perfil muestra otro pico de Cd en las fracciones correspondientes al volumen vacío de la columna en el que eluyen sustancias con pesos moleculares superiores a 70.000 Da. Este pico es mayor en los caracoles expuestos a 100 $\mu\text{g/L}$ que en los expuestos a 6 $\mu\text{g/L}$. En el perfil cromatográfico de Cu (figura 4.21B), los picos no son tan definidos, el metal se encuentra más distribuido entre las fracciones. Se observa un pico correspondiente a componentes de alto peso molecular cuya concentración de Cu parece no variar con la exposición a Cd y un pico correspondiente a las fracciones de MT, que en el grupo expuesto a 100 $\mu\text{g/L}$ de Cd presenta una amplitud mayor que el pico presente en el perfil de elución de la concentración de Cd.

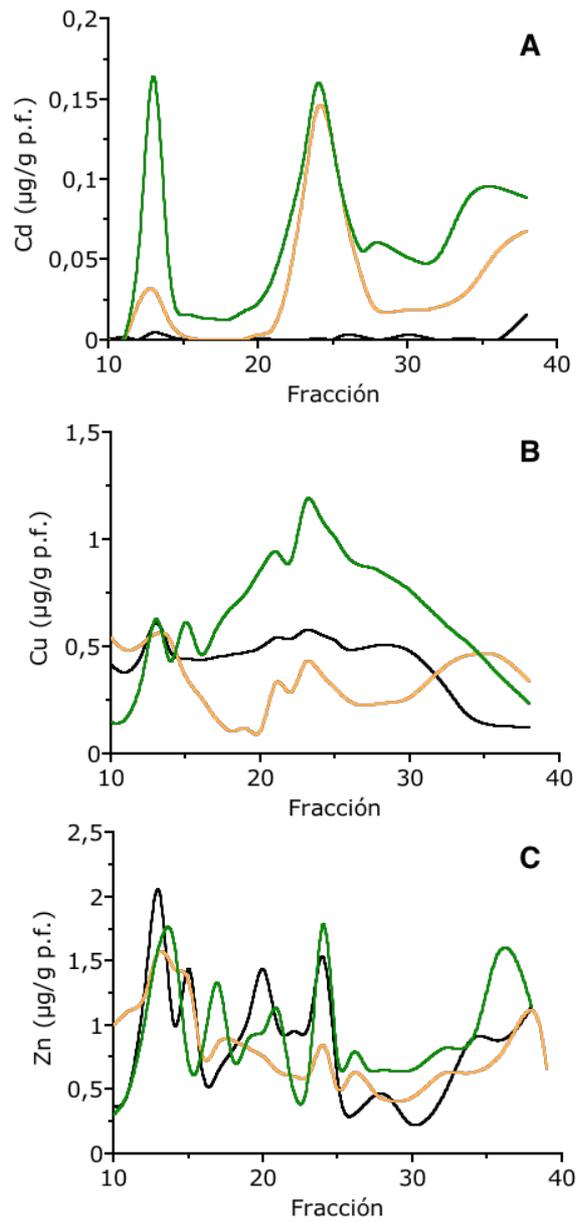


Figura 4.21. Concentraciones de Cd (A), Cu (B) y Zn (C) de las fracciones cromatográficas correspondientes al sobrenadante del complejo visceral tratado con calor de *M. dufouri* de individuos del grupo control (■) y expuestos a 6 y 100 µg/L de Cd (■ y ■ respectivamente). Los datos se expresan como valor medio±D.E.

El perfil de elución de la concentración de Zn (figura 4.21C) muestra diferentes picos en los tres grupos de exposición, indicando que este metal se une a una amplia variedad de proteínas. No obstante, en los tres perfiles se siguen detectando los dos picos correspondientes a componentes de alto peso molecular y de MT.

4.3.2. Purificación parcial de metalotioneína.

En la figura 4.22 se muestra el cromatograma obtenido después de la separación por exclusión molecular del citosol correspondiente al conjunto de 53 complejos viscerales. Se pueden observar los dos picos ya descritos anteriormente, A y B, asociados a MT y a componentes de alto peso molecular, respectivamente. Cabe destacar que la magnitud de la intensidad alcanzada es mucho mayor respecto a otros cromatogramas presentados en este trabajo, debido a la cantidad de muestra utilizada y su concentración mediante los dispositivos YM-3 Centriprep. El peso molecular aparente del pico candidato a ser MT, después de la calibración de la columna con marcadores moleculares, fue de 15.400 Da.

La muestra A, asociada a MT, una vez desalada y concentrada, se fraccionó por cromatografía de intercambio iónico, obteniendo el cromatograma de la figura 4.23.

El perfil de elución cromatográfico presentado en la figura 4.23 muestra dos picos con mayor señal polarográfica. El primero de ellos presenta una mayor intensidad y eluyó entre las fracciones 42 y 55, y el segundo pico que diferenciamos eluyó entre las fracciones 56 y 70. El primero de estos picos fue analizado por electroforesis en condiciones desnaturalizantes en un gel de acrilamida al 16,5 %, obteniendo los resultados que se muestran en la figura 4.24.

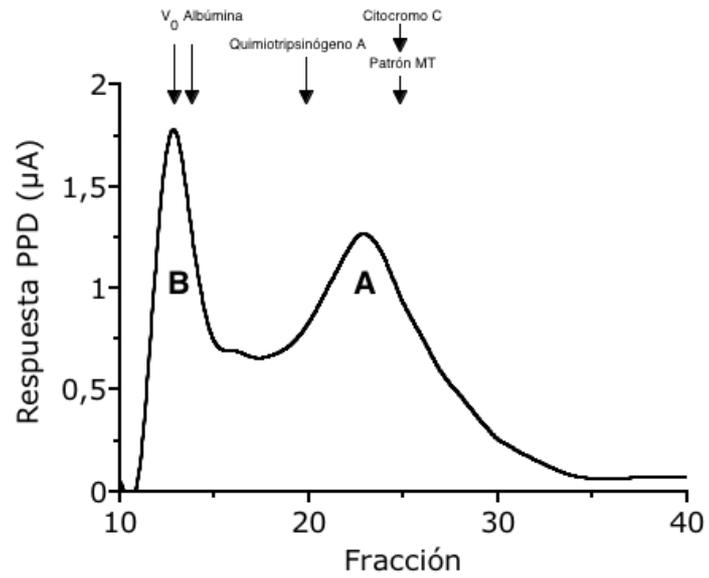


Figura 4.22. Cromatograma de exclusión molecular del extracto obtenido a partir de 53 complejos viscerales de *Melanopsis*. A. fracciones asociadas a MT y B. fracciones asociadas a componentes de alto peso molecular.

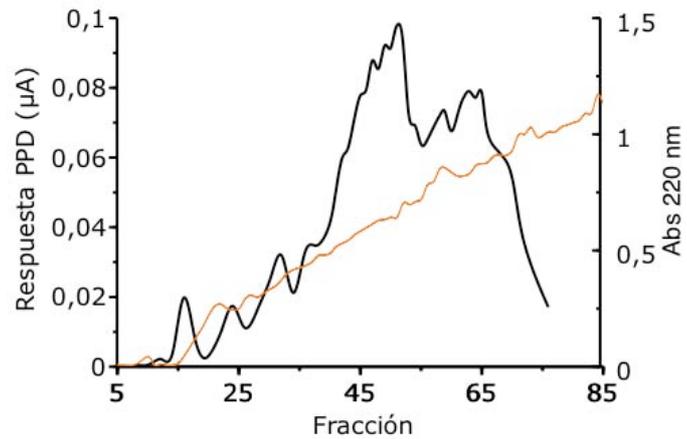


Figura 4.23. Cromatograma de intercambio iónico de la muestra A procedente de la cromatografía de exclusión molecular de la figura 4.22. La línea naranja indica el incremento de concentración de tampón Tris-HCl en un gradiente de 20 a 800mM.

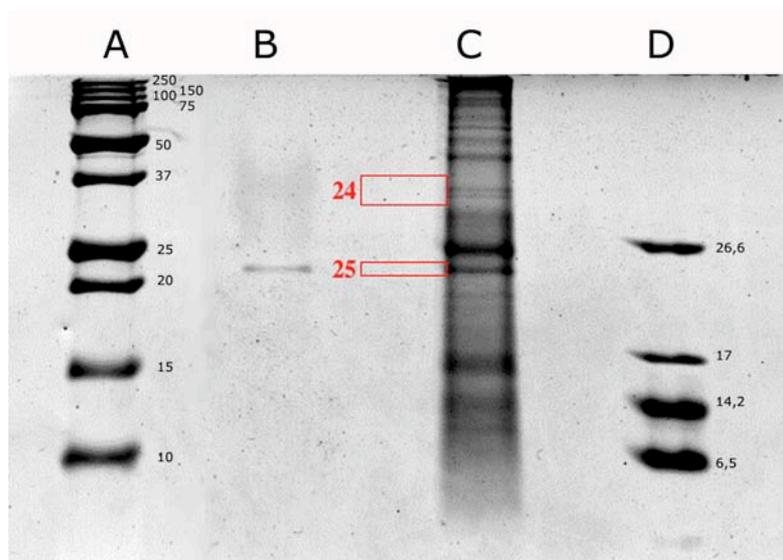


Figura 4.24. Electroforesis en gel de poliacrilamida del pico de mayor señal obtenido en la cromatografía de intercambio iónico de la figura 4.23 procedente de la muestra asociada con MT. Línea A, marcadores moleculares color dual; línea B, fracciones concentradas y desaladas, desde la 42 hasta la 55; línea C, extracto de vísceras de sobrenadante total, y línea D, marcadores moleculares Ultra-low.

En la figura 4.24 se puede observar una banda principal asociada potencialmente a MT procedente de las fracciones 42-55 de la figura 4.23. La calibración de la electroforesis en gel de poliacrilamida con marcadores estándar mostró un peso molecular de 22.000 Da, un valor mayor que el obtenido por cromatografía. En la figura 4.25 se muestran los espectros obtenidos mediante MALDI-MS de las sustancias eluidas en los dos picos del cromatograma presentado en la figura 4.23. En ambos espectros se observa varios picos de diferente intensidad en un rango de 5.000 a 14.000 daltons con un pico de mayor intensidad alrededor de 6.600 daltons.

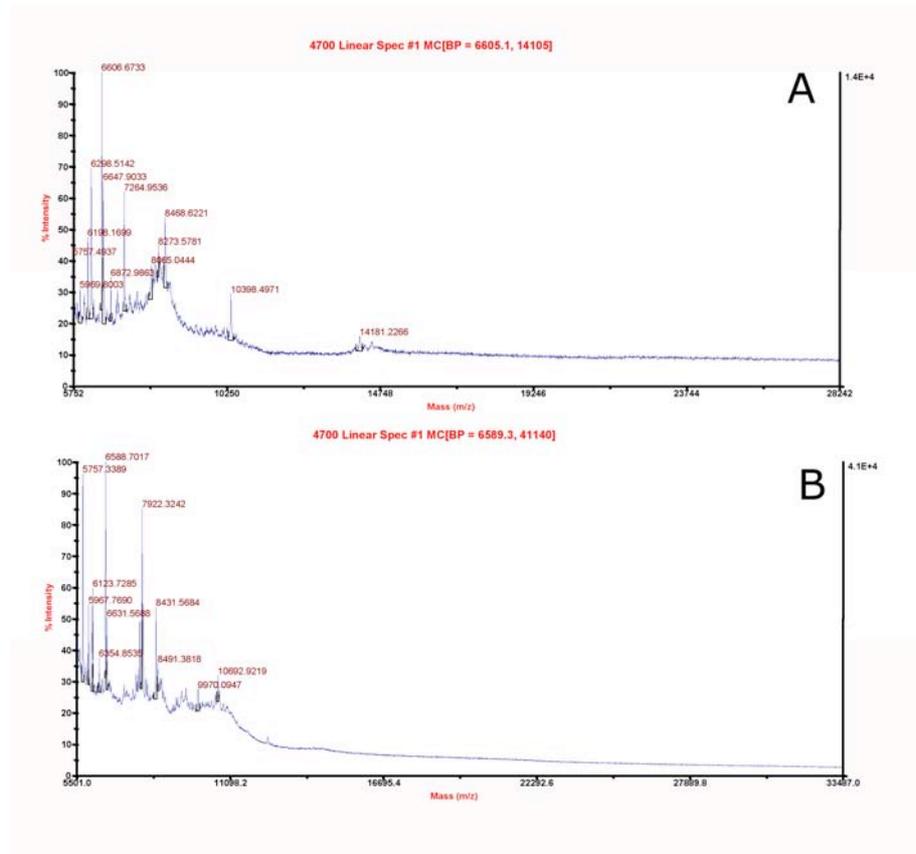


Figura 4.25. Espectros obtenidos por MALDI-MS de los picos procedentes de la cromatografía de intercambio iónico de la muestra asociada a MT. A. Fracciones de la 42 a la 55. B. Fracciones de la 56 a la 70.

En la figura 4.26 se muestra la huella peptídica obtenida a partir de la banda 25. Los espectros de fragmentación (MS/MS) correspondientes a la huella peptídica no pudieron obtenerse dado que no hay en esos espectros ningún pico que pase los criterios de selección (relación señal/ruido). Con los resultados de la búsqueda realizada con MASCOT podemos concluir que no se ha conseguido la identificación de esta proteína. No obstante, se intentó identificar mediante HPLC-MS/MS obteniéndose el cromatograma de

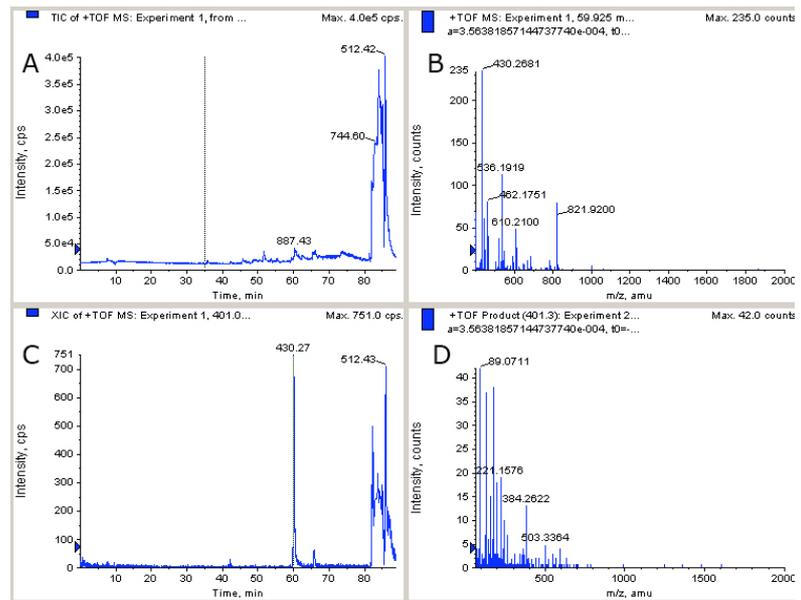


Figura 4.27. Cromatograma de HPLC de la muestra de MT obtenida a partir de la banda 25 después de la digestión con tripsina (A), espectro de fragmentación(B), selección de un ión (C) y su fragmentación (D).

La muestra B, tal como se indica en la figura 4.22, se fraccionó también por cromatografía de intercambio iónico, tal y como se muestra en la figura 4.28.

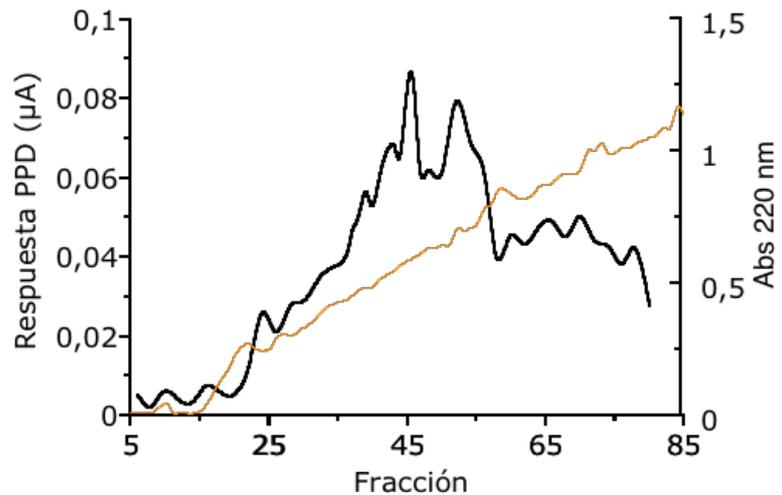


Figura 4.28. Cromatograma de intercambio iónico de la muestra B procedente de la cromatografía de exclusión molecular de la figura 4.22. La línea naranja indica el incremento de concentración de tampón Tris-HCl en un gradiente de 20 a 800mM.

En la cromatografía de intercambio iónico de la figura 4.28 se observan principalmente dos picos de mayor intensidad polarográfica. El primer pico eluyó entre las fracciones 45 y 46, y el segundo pico lo hizo entre las fracciones 52 y 53. Las fracciones correspondientes a ambos picos, una vez desaladas y concentradas, se analizaron mediante una electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), en un gel al 10 % de acrilamida (figura 4.29). Se puede observar que ambos picos dan lugar a diversas bandas de distintos pesos moleculares.

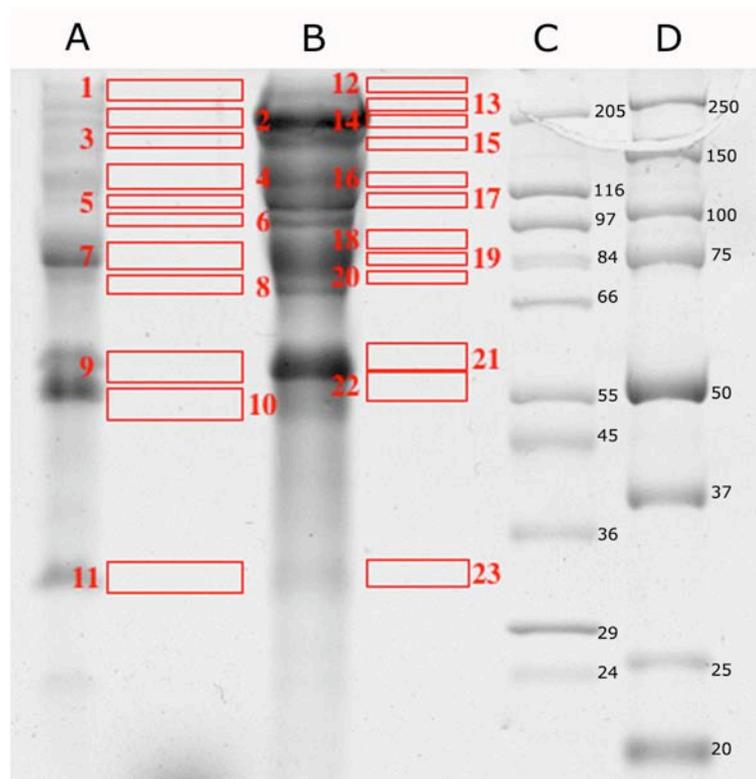


Figura 4.29. Electroforesis en gel de poliacrilamida de los picos obtenidos en la cromatografía de intercambio iónico de la figura 4.28, procedentes de la muestra asociada con componentes de alto peso molecular. Línea A, fracciones 52 y 53; línea B, fracciones 45 y 46; línea C, marcadores moleculares WMW, y línea D, marcadores moleculares color dual.

En la figura 4.30 se muestra la huella peptídica obtenida a partir de la banda 21 y los espectros de fragmentación (MS/MS) que se obtuvieron a partir de los tres péptidos que presentaron mayor intensidad. Este procedimiento se llevó a cabo con las bandas de la 1 a la 23 del SDS-PAGE correspondientes a las fracciones cromatográficas de alto peso molecular, obteniendo en todos los casos espectros similares al presentado en la figura 4.30.

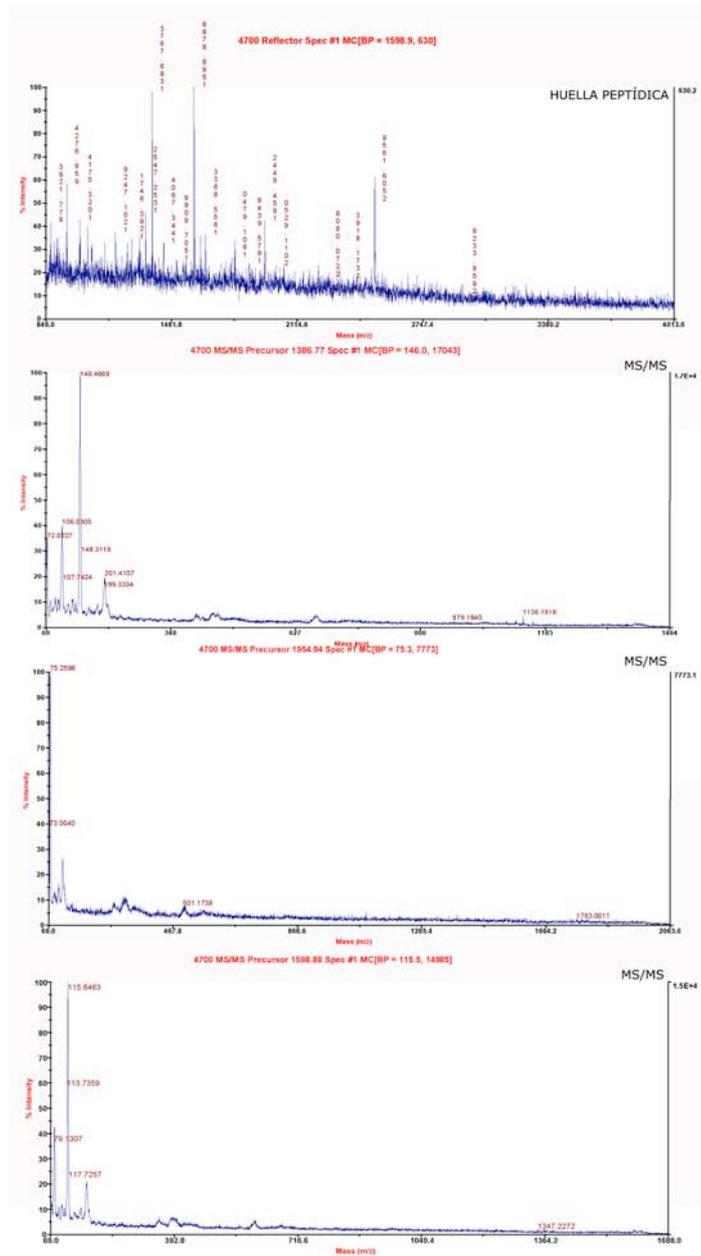


Figura 4.30. Huella peptídica y los espectros de fragmentación de los tres péptidos de mayor intensidad de la muestra de componentes de alto peso molecular obtenida a partir de la banda 21.

Al igual que sucedió en el estudio de la MT, la búsqueda realizada con MASCOT no dio como resultado la identificación de ninguna proteína. No se encontraron tampoco coincidencias entre los espectros obtenidos a partir de las bandas de proteínas de alto peso molecular y los obtenidos a partir de la MT.

4.4. DISCUSIÓN.

De los resultados obtenidos en los estudios 1 y 2 se puede afirmar que ante una exposición a cadmio se alcanzan mayores niveles de cadmio en el complejo visceral que en el pie. Hay que tener en cuenta que el conjunto de tejidos al que denominamos complejo visceral está compuesto por órganos como las branquias, el tracto digestivo, la glándula digestiva y el riñón que constituyen los sitios de entrada, acumulación y destoxificación de los metales en gasterópodos (Bebiano et al., 1992; Bebianno y Langston, 1998; Langston et al., 1998). Por otra parte, la porción del animal a que hemos denominado pie está constituida por tejido muscular y nervioso que tienen mucha menor participación en el metabolismo de metales. Nuestros resultados están en consonancia con los obtenidos por Lam et al. (1997) en el gasterópodo prosobranquio de agua dulce *Brotia hainanensis*, en el que tanto la tasa de captación de Cd como la concentración alcanzada en las vísceras era mucho mayor que los valores encontrados en el pie. Las concentraciones de Cd alcanzadas en el pie y las vísceras de *M. dufouri* estuvieron en relación con el nivel de exposición a cadmio. En el pie se alcanzaron concentraciones de hasta 55,5 µg/g al ser expuestos los caracoles a 3 mg Cd/L, niveles similares a los alcanzados en *Brotia hainanensis* (34,5 µg/g) tras la exposición a 800 µg/L. El contenido máximo de Cd que presentaban las vísceras de *Melanopsis* tras la exposición a la concentración más alta de cadmio fue de 366,8 µg/g, valor que supera a todos los referidos en la literatura para gasterópodos acuáticos (Bebiano et

al., 1992; Lam et al. 1997; Leung et al. 2003), los cuales presentan entre 100-150 µg de Cd/g. Cabe resaltar que las concentraciones a las cuales estaban expuestos los organismos en los citados estudios eran considerablemente menores a los 3 mg/L de Cd aplicados en nuestro experimento (tabla 4.4). Los valores de factor de bioconcentración (BCF) de cadmio alcanzados tras la exposición a 100 µg/L durante dos semanas fueron de 100 a 150 en las vísceras y de 30 a 100 en el pie, alcanzándose valores de hasta 400 en las vísceras de caracoles expuestos a 100 µg/L durante 8 semanas. En otros gasterópodos de agua dulce se han encontrado valores de BCF para el cadmio del mismo orden de magnitud a los calculados en *Melanopsis* en los tejidos estudiados (Cœurdassier et al., 2003).

Atendiendo a los resultados del experimento tres, en el que se realizaba una exposición crónica de 8 semanas a 6 y 100 µg/L de cadmio, se constata una acumulación mantenida durante todo el experimento, dado que el contenido de cadmio aumenta con el tiempo de exposición. Esta acumulación lineal de Cd, también observada en tejidos de otros gasterópodos (Bebianno et al., 1992; Bebianno y Langston, 1995; Lam et al., 1997; Leung et al., 2003), se puede explicar por una extremadamente lenta tasa de eliminación de Cd (Langston y Zhou, 1987; Bebianno y Langston, 1998). Este mecanismo sería responsable de los niveles de cadmio detectados en los individuos del grupo control que pudieron haber sido adquiridos a partir de metal presente en su medio natural o incluso de las trazas presentes en el agua del acuario (Chabicoovsky et al., 2003).

Tabla 4.4. Concentraciones medias de Cd, Cu y Zn determinadas en el presente trabajo, y descritas en la literatura por otros autores.

Especie	Tejido	Origen	Cd	Cu	Zn	Autor
<i>M. dufouri</i>	C visceral	Control 6 µg/L 100 µg/L	0,5 9,8 36,5	49,1 36,3 40,5	250,9 152,2 152,6	Presente estudio
<i>L. littorea</i>	Glándula digestiva	Control 4 µg/L 40 µg/L 400 µg/L	0,95 2,2 14,3 122,7			Bebianno et al., 1992
	Resto tejidos	Control 4 µg/L 40 µg/L 400 µg/L	0,3 1,8 12,4 91,1			
<i>L. littorea</i>	Branquias	Control 400 µg/L	0,54 95			Bebianno et al., 1995
	Riñón	Control 400 µg/L	2,9 150			
<i>P. aspera</i>	Todo animal	Natural	0,43-1,6	0,9-1,6	38,5-74,5	Bebianno et al., 2003
<i>L. stagnalis</i>	Todo animal	Control 0,01µg/L 1000 µg/L	< 2,5 < 2,5 87,5	19,3 10 19	42,5 37,5 60	Leung et al., 2003
<i>N. lapillus</i>	Todo animal	Control 500 µg/L	2,5 145	25 25	137,5 175	Leung y Furness, 1999a
	Branquias	Control 500 µg/L	8,75 25	37,5 7,5	100 12,5	
	Glándula leiblein	Control 500 µg/L	11,3 275	12,5 5	250 700	
	Riñón	Control 500 µg/L	6,3 187,5	31,3 43,8	100 125	
	Glándula digestiva	Control 500 µg/L	7,5 300	100 93,8	100 75	
	Gónadas	Control 500 µg/L	6,3 150	68,8 80	25 50	
<i>L. littorea</i>	Todo animal	Natural	0,13-0,33	12,5-32,5	22,5-45	Leung y Furness, 1999b
<i>N. lapillus</i>	Digestivo gonadal	Natural	1,9-5	12,5-50	100-113	Leung et al., 2001
<i>N. lapillus</i>	Digestivo gonadal	Control 400 µg/L	3-5,3 42,5-95			Leung y Furness, 2001b
<i>N. lapillus</i>	Digestivo Gonadal	Control 500 µg/L	2,6 27,5			Leung et al., 2002
<i>N. lapillus</i>	Todo animal	Natural	1,3-4	6-25	20-108	Leung et al., 2005
<i>H. trunculus</i>	Hepato-pancreas	Natural	9-16,3			Siboni et al., 2004
<i>H. pomatia</i>	Glándula digestiva	Control 36 µg/g	65,6			Berger et al., 1995
<i>C. hortensis</i>	Glándula digestiva	Control 9,2 µg/g 64 µg/g Natural	28,1 225 394 7-112,4			Dallinger et al., 2004a
				2,4-12,7		

(1) Las unidades de metal están expresadas en µg/g peso fresco, excepto las indicadas con asteriscos. * mg/L

(2) Todas las exposiciones a metal aquí recogidas son de Cd, a no ser que se especifique. Las expresadas como µg/g se refieren a g de peso fresco de comida (lechuga).

Tabla 4.4. (Continuación).

Especie	Tejido	Origen	Cd	Cu	Zn	Autor
<i>H. pomatia</i>	Glándula digestiva	1,2 µg/g 933 µg/g	0,005 0,3			Chabicoovsky et al., 2004
<i>P. aspera</i>	Todo animal	Natural	0,25-2,3	0,9-3,8	9-43	Cravo et al., 2004
<i>B. tentaculada</i>	Todo animal	Natural	0,07-0,65	22,3-121,5	36-132,5	Flessas et al., 2000
<i>P. gyrina</i>	Todo animal	Natural	0,09-1,9	23,5-92,3	19,8-51,3	
<i>H. ulvae</i>	Todo animal	Natural	0,03	33,8	15,3	Sokolowski et al., 2003
<i>P. columbiana</i>	Todo animal	Natural	9,2-35,5*			Lefcort et al., 2000
<i>L. stagnalis</i>	Pie	80 µg/L	3			Cœurdassier et al., 2003
	Visceras	160 µg/L	10,5			
		80 µg/L 160 µg/L	7,5 27,5			
<i>L. palustris</i>	Pie	80 µg/L	0,75			
	Visceras	160 µg/L	4,3			
		80 µg/L 160 µg/L	0,25 250			
<i>B. hainanensis</i>	Pie	800 µg/L	34,5			Lam et al., 1997
	Visceras	800 µg/L	121,8			
<i>H. pomatia</i>	Glándula digestiva	Control	2,81	5,5		Dallinger et al., 2004b
		68 µg/g Cd 132 µg/g Cu	36,5 4,2	5,5 13,5		
	Manto	Control	1,3	7,9		
		68 µg/g Cd 132 µg/g Cu	5,6 1,5	8,1 19		
<i>H. pomatia</i>	Glándula digestiva	Natural	1,4-21			Dallinger et al., 2004c
	Manto	Natural		2,9-7,9		
<i>H. pomatia</i>	Glándula digestiva	Control		20,6		Dallinger et al., 2005
		115 µg/g Cu		47,7		
	Manto	Control		22,3		
		115 µg/g Cu		54,1		
Pie	Control		25,4			
	115 µg/g Cu		65,9			
<i>L. brevicula</i>	Complejo visceral	Control 400 µg/L	0,6 22,1			Park et al., 2002

(1) Las unidades de metal están expresadas en µg/g peso fresco, excepto las indicadas con asteriscos. * mg/L

(2) Todas las exposiciones a metal aquí recogidas son de Cd, a no ser que se especifique. Las expresadas como µg/g se refieren a g de peso fresco de comida (lechuga).

La discusión de los resultados relacionados con el contenido e inducción de metalotioneína en los tejidos de *Melanopsis* durante los experimentos de exposición a cadmio, requiere tener en cuenta los estudios que, dentro del presente trabajo, se han realizado sobre la metodología de determinación de dicha proteína. Inicialmente se utilizó el método PPD para la determinación de metalotioneína. A la vista de las cromatografías obtenidas a partir de los sobrenadantes de los tejidos estudiados (figuras 4.10 y 4.13) el método PPD no se puede utilizar de la forma inicialmente ensayada, dada la existencia de compuestos termoestables de elevado peso molecular que presentaban señal polarográfica. Estos compuestos termoestables, que aparecen como un pico de señal en el volumen vacío de la columna, constituyen un porcentaje alto de la respuesta polarográfica total, que varía con el tiempo y nivel de exposición a cadmio. Atendiendo a esta variabilidad en el componente de alto peso molecular, creemos que es mejorable la solución propuesta a este mismo problema en *Littorina littorea*, y que consistía en sustraer un porcentaje fijo de la respuesta polarográfica total para obtener la respuesta debida a la metalotioneína (Bebianno et al., 1992). Inicialmente se sospechó que los componentes termoestables de alto peso molecular eran debidos a la producción de artefactos durante la preparación de la muestra. Estos artefactos serían el resultado de la formación de uniones disulfuro entre los grupos tiólicos de las moléculas de MT, produciéndose su polimerización. Se buscaron alternativas para la determinación de metalotioneína. El método de saturación por plata, utilizado en gasterópodos (Leung y Furness, 1999a, 1999b, 2001a, 2001b, Leung et al., 2001, 2002, 2003 y 2005), a la vista de la cromatografía 4.14, no es adecuado para la determinación de MT en *Melanopsis dufouri*, puesto que aparece plata asociada a compuestos termoestables de alto peso molecular, y por tanto no se encuentra unida de forma exclusiva a la MT.

Ni con el tratamiento térmico ni con el tratamiento con un agente reductor más agresivo, conseguimos eliminar el pico de señal polarográfica correspondiente al alto peso molecular. Resultados similares obtuvo Bebianno et al. (1992) en la glándula digestiva y en branquias (Bebianno y Langston, 1995) de *Littorina littorea*, tejidos que parecen contener proteínas tiólicas de alto peso molecular, estables al calor, que interfieren en la determinación directa de la concentración de MT. En estos trabajos también se probaron el uso de un antioxidante, mercaptoetanol, tanto en la homogeneización, como en los tampones de elución, así como altas velocidades de centrifugación y el uso de etanol como una alternativa para la desnaturalización de proteínas de alto peso molecular, sin obtener ningún cambio significativo en la distribución de grupos tiólicos.

La ultrafiltración de las muestras de forma previa a la determinación de MT por PPD mejora la especificidad de dicha determinación en *Melanopsis*, como se desprende de los siguientes resultados:

- 1) Los componentes de alto peso molecular quedan retenidos casi en su totalidad en este dispositivo, como se observa en la figura 4.17.
- 2) La filtración permite una recuperación satisfactoria, como se observa en la tabla 4.1.
- 3) Mediante este proceso, al eliminar una parte muy significativa de la señal polarográfica correspondiente a componentes que interfieren en la medida, se obtienen valores de MT en los tejidos que son estadísticamente inferiores a los valores correspondientes a la respuesta polarográfica total medida en las mismas muestras.
- 4) La determinación de MT tras la ultrafiltración es más consistente con la esperable relación entre los niveles de MT y la exposición a cadmio. El tratamiento con cadmio tiene un efecto significativo sobre la MT y no sobre la respuesta polarográfica total (tabla 4.2), hecho que queda

corroborado por la existencia de una correlación positiva significativa entre el contenido de cadmio en los tejidos y los niveles de MT, correlación que no existe entre el contenido de cadmio y la respuesta polarográfica total.

La disminución de MT (respuesta polarográfica total) encontrada en el pie y las vísceras de *Melanopsis* tras la exposición a 3 mg de Cd/L podría ser una manifestación de la toxicidad del cadmio a esas altas concentraciones. El rango de los niveles de Cd presentes en ambientes dulceacuícolas varía entre 0,01 a 0,1 µg de Cd por litro (Martín et al., 1980), llegándose a alcanzar valores de 8,8 µg/L de Cd en sitios muy contaminados por metales (Solà et al., 2005). Un hecho bastante generalizado en algunas exposiciones de laboratorio a concentraciones muy elevadas de metales, es una reducción en el contenido de MT, probablemente como resultado de un efecto tóxico que afecta al metabolismo general de las células (Amiard et al., 2006). Martínez et al. (1996) encontraron en el crustáceo de agua dulce, *Echinogammarus echinosetosus*, inducción de MT en un rango de concentración de Cd de 100 a 1000 µg/L, sin embargo, en los individuos expuestos a 2 mg/L, los niveles que encontraron fueron menores que los encontrados a 1 mg/L de Cd.

En los experimentos posteriores, donde los individuos fueron expuestos a 100 µg/L de Cd, no se observa esta disminución de MT y/o respuesta polarográfica total en el complejo visceral. No hemos encontrado una clara inducción de MT, ya que el análisis estadístico mostró que no existían diferencias significativas en los valores de MT de los grupos expuestos a Cd respecto del grupo control, sin embargo, los valores de MT en el complejo visceral de individuos expuestos a 100 µg/L de Cd fueron superiores, en casi todos los casos, a los obtenidos en el grupo control. Otros autores han obtenido resultados similares en otros gasterópodos. En *Littorina littorea* no se encontró inducción de MT en la glándula digestiva tras una exposición a

40 y 400 µg/L de Cd (Bebiano et al., 1992), y de la misma forma ocurrió con *Nucella lapillus* tras una exposición a 500 µg/L de Cd (Leung y Furness, 1999a). Otros autores no sólo no encuentran inducción, sino que observan una importante disminución en los valores de MT tras una exposición a Cd, en *Patella vulgata*, y tras exposiciones a Cd y Cu, en *Patella aspera* (Bebiano et al., 2003; Brown et al., 2004). Sin embargo, en diversos estudios, otros autores (Berger et al., 1995; Chabicovsky et al., 2004; Dallinger et al., 2004a, 2004b, 2004c, 2005) sí encuentran inducción de MT tras diferentes exposiciones a Cd en gasterópodos terrestres, pero cabe destacar que dicha inducción está asociada a una isoforma de MT específica de Cd, mientras que la isoforma asociada a Cu no se induce tras exposiciones a Cd o Cu. Estas isoformas se cuantifican con métodos específicos para cada una de ellas (Cd-chelex y TTM), mientras que la PPD nos da valores de concentración de metalotioneína total.

A pesar del considerable incremento de la concentración de Cd en el complejo visceral de *M. dufouri*, hay un pequeño aumento de la señal polarográfica correspondiente a MT. Estos resultados apoyan el argumento propuesto por Bebianno et al. (1992) donde se sugiere que la mayoría de Cd es secuestrado por los altos niveles de MT inherentes en este tejido bajo condiciones normales, posiblemente por desplazamiento de otros metales. El valor medio de MT encontrado en los grupos control fue de 1.329 ± 149 µg/g. Este dato es considerablemente alto si lo comparamos con valores encontrados en otras especies, como peces o crustáceos (Amiard et al., 2006; Lavado et al., 2006). Como se puede observar en la tabla 4.5 los valores de MT encontrados en *M. dufouri* son del mismo orden de magnitud que los determinados mediante el método PPD por otros autores en gasterópodos, y superiores a los obtenidos utilizando métodos distintos.

Tabla 4.5. Concentraciones medias de MT determinadas en el presente trabajo y descritas en la literatura en gasterópodos, así como los métodos de determinación utilizados.

Especie	Tejido	Método	Origen	Valores	Inducción	Autor	
<i>M. dufouri</i>	C visceral	PPD	Control 6 µg/L 100 µg/L	1084,3 1089,5 1474,4	No No	Presente estudio	
<i>L. littorea</i>	Glándula digestiva	PPD	Control 4 µg/L 40 µg/L 400 µg/L	2500 3375 2000 2650	No No No	Bebiano et al., 1992	
	Resto tejidos		Control 4 µg/L 40 µg/L 400 µg/L	825 800 1125 1000	No Si Si		
<i>L. littorea</i>	Branquias	PPD	Control 400 µg/L	587,5 1985	Si	Bebiano et al., 1995	
	Riñón		Control 400 µg/L	960 2565	Si		
<i>P. aspera</i>	Todo animal	PPD	Natural	1225-2450	No	Bebiano et al., 2003	
<i>L. stagnalis</i>	Todo animal	Saturación Ag	Control 0,01 µg/L 1000 µg/L	125 150 375	No Si	Leung et al., 2003	
<i>N. lapillus</i>	Todo animal	Saturación Ag	Control 500 µg/L	192 756	Si	Leung y Furness, 1999a	
	Branquias		Control 500 µg/L	500 650	No		
	Glándula leiblein		Control 500 µg/L	400 1875	Si		
	Riñón		Control 500 µg/L	775 2025	Si		
	Glándula digestiva		Control 500 µg/L	800 900	No		
	Gónadas		Control 500 µg/L	875 975	Si		
<i>L. littorea</i>	Todo animal	Saturación Ag	Natural	125-250			Leung y Furness, 1999b
<i>N. lapillus</i>	Glándula leiblein	Saturación Ag	Natural	100-500			Leung et al., 2001
<i>N. lapillus</i>	Glándula leiblein	Saturación Ag	Control 500 µg/L	270 430	Si		Leung y Furness, 2001a
<i>N. lapillus</i>	Glándula leiblein	Saturación Ag	Control 400 µg/L	250 1300	Si		Leung y Furness, 2001b

(1) Todas las exposiciones a metal aquí recogidas son de Cd, a no ser que se especifique. Las expresadas como µg/g se refieren a g de peso fresco de comida (lechuga).

(2) Las unidades de MT están expresadas en µg/g peso fresco, excepto las indicadas con asteriscos.

* ng MT/mg proteína

** intensidad fluorescencia

Tabla 4.5. (Continuación).

Especie	Tejido	Método	Origen	Valores	Inducción	Autor
<i>N. lapillus</i>	Digestivo -gónadas Glándula leiblein	Saturación Ag	Control	22	Si	Leung et al., 2002
			500 µg/L	70		
<i>N. lapillus</i>	Todo animal	Saturación Ag	Control	52	No	Leung et al., 2005
			500 µg/L	105		
<i>I. obsoleta</i>	Todo animal	Inmuno- químico ELISA	Control	14*	Si	Downs et al., 2001
			560 µg/L	52*		
<i>H. trunculus</i>	Hepatopancreas	Fluorescencia. Cu-MT	Natural	70,2*	Si	Siboni et al., 2004
			5600 µg/L	400**		
<i>M. tuberculata</i>	Todo animal	Espectrofotométrico	Natural	0,02-0,04	No	Wepener et al., 2005
<i>P. vulgata</i>	Todo animal	Espectrofo- tométrico	Control	30	No	Brown et al., 2004
			6,1 g/L Cu	20		
<i>H. pomatia</i>	Glándula digestiva	Cd-chelex	Control	294	Si	Berger et al., 1995
			36 µg/g	756		
<i>C. hortensis</i>	Glándula digestiva	Cd-chelex	Control	325	Si	Dallinger et al., 2004a
			9,2 µg/g	2925		
			64 µg/g	4550		
			Natural	130-1300		
<i>H. pomatia</i>	Glándula digestiva	Cd-chelex	1,2 µg/g	285	Si	Chabicoovsky et al., 2004
			933 µg/g	2380		
<i>H. pomatia</i>	Glándula digestiva	Cd-chelex	Control	406	Si	Dallinger et al., 2004b
			68 µg/g Cd	1382		
	132 µg/g Cu	325	No			
	Control	487,5				
Manto	TTM	Control	406	No		
		132 µg/g Cu	568			
<i>H. pomatia</i>	Glándula digestiva	Cd-chelex	Control	325	Si	Dallinger et al., 2004c
			933 µg/g	2112		
	Manto	Control	552,5	No		
	Glándula digestiva	1216 µg/g Cu	732			
Manto	TTM	Natural	325-1218	No		
		Control	550-570			
<i>H. pomatia</i>	Glándula digestiva	TTM	Control	373,8	No	Dallinger et al., 2005
			115 µg/g Cu	406,3		
	Manto	TTM	Control	503,8	No	
			115 µg/g Cu	552,5		
Pie	TTM	Control	455	No		
		115 µg/g Cu	406,3			

(1) Todas las exposiciones a metal aquí recogidas son de Cd, a no ser que se especifique. Las expresadas como µg/g se refieren a g de peso fresco de comida (lechuga).

(2) Las unidades de MT están expresadas en µg/g peso fresco, excepto las indicadas con asteriscos.

* ng MT/mg proteína

** intensidad fluorescencia

Los valores de respuesta polarográfica total determinados en el complejo visceral y expresados como equivalentes de MT, son significativamente superiores a los valores de MT. El valor medio de RPT en los grupos control fue de $2.412 \pm 339 \mu\text{g/g}$, valor que casi duplica la concentración de MT determinada en los mismos grupos. Es importante destacar que no existe paralelismo en la evolución de los niveles de MT y de RPT ni con el tiempo ni con la exposición a Cd, siendo más variables los correspondientes a RPT. Todo ello viene a indicar que la señal correspondiente a componentes de alto peso molecular no es constante, sino que varía con el tiempo y la exposición a Cd, y explica porqué la adecuada separación de MT, mediante la utilización de dispositivos YM-100, es necesaria para encontrar una correlación matemática de los niveles de esta proteína con la concentración de Cd en el tejido y ésta no se da cuando se considera la respuesta polarográfica total.

Como ya vimos en el apartado de resultados, en todos los grupos experimentales el índice de condición de *M. dufouri* disminuye con el tiempo de forma estadísticamente significativa. A pesar de que los valores medios del grupo expuesto a $100 \mu\text{g/L}$ de Cd son siempre inferiores a los valores medios correspondientes al grupo control, no se encontró un efecto significativo de la exposición a cadmio. Leung y Furness (2001b) en *Nucella lapillus* tampoco encontraron un efecto significativo de la exposición a $400 \mu\text{g/L}$ de Cd durante 80 días sobre los valores de IC. Estos mismos autores en otros dos trabajos (Leung y Furness, 1999a, 2001a) encuentran en *N. lapillus*, al igual que nosotros en *M. dufouri*, que los valores de IC disminuyen con el tiempo de exposición tanto en el grupo control como en los expuestos a Cd, siendo los valores de IC menores en el grupo control que en los expuestos.

Los valores de Cu en el complejo visceral de los tres grupos de exposición se presentan en un rango de 30 a $50 \mu\text{g/g}$, que son valores

similares a los encontrados en otros gasterópodos muestreados de su medio natural (Leung y Furness, 1999b; Flessas et al., 2000; Leung et al., 2001) o expuestos a Cd en el laboratorio (Leung et al., 1999a, 2003). De la misma forma, las concentraciones de Zn encontradas en el complejo visceral de *M. dufouri* (130–200 $\mu\text{g/g}$) son del mismo orden a los presentados en la bibliografía (tabla 4.4), aunque ligeramente superiores (Leung y Furness, 1999b; Leung et al., 1999a, 2001, 2003; Flessas et al., 2000).

Aunque el test del ANOVA no mostró diferencias significativas en las concentraciones de Zn entre los tres grupos experimentales, cabe señalar que la concentración media de Zn en los animales expuestos a cadmio al finalizar el experimento es inferior a la obtenida en el grupo control, presentando desviaciones estándar que no se solapan. Esto podría indicar que la exposición a Cd produce una redistribución del contenido de Zn.

Tal como se observa en la figura 4.21, las concentraciones de Cd determinadas en la cromatografía de exclusión molecular dan lugar a perfiles cromatográficos que difieren entre los animales sometidos a distintas condiciones de exposición a cadmio. El hecho de que tras la exposición a las concentraciones de cadmio ensayadas (6 $\mu\text{g/L}$ y 100 $\mu\text{g/L}$) los cromatogramas presenten un pico de cadmio unido a MT de igual magnitud indica la no inducción de MT en el complejo visceral de esta especie, y corrobora los resultados obtenidos mediante la determinación de MT por PPD. El pico de cadmio que se observa en el volumen vacío (alto peso molecular), y que es mucho mayor en los individuos expuestos a la concentración más elevada de Cd, podría ser consecuencia del denominado efecto "spillover" (Langston y Zhou, 1986; Chabicoovsky et al., 2004), indicativo del estado de "agotamiento" de la capacidad de la MT para unir metales. Los metales no unidos a MT acaban estando disponibles para unirse a otros ligandos, situación que se ha relacionado con una

manifestación de la toxicidad al interactuar de forma inespecífica con otras proteínas.

En los animales expuestos a la concentración más alta de cadmio los perfiles cromatográficos de cadmio y cobre son muy diferentes entre sí. Mientras que el cadmio da lugar a un pico bien definido en las fracciones correspondientes a MT, el cobre aparece distribuido entre muchas fracciones a pesar de que presenta también un máximo en la zona de la MT. Esto podría estar relacionado con la existencia de dos isoformas, tal como se ha descrito para *Helix pomatia* (Dallinger et al., 1997, 2005; Gehring et al., 2000), presentando la isoforma de cobre mucha más tendencia a la oxidación.

La pureza de las fracciones asociadas a MT obtenidas por cromatografía de intercambio iónico se confirmó mediante la electroforesis en gel y mediante la determinación de peso molecular por espectrometría de masas. A pesar del comportamiento anómalo de la MT durante su separación en SDS-PAGE y en cromatografía de exclusión molecular, soportes en los que la MT presenta un mayor peso molecular al esperado (Park et al., 2002; Ryu et al., 2003; Simes et al., 2003) la espectrometría de masas confirmó que el peso molecular de la sustancia purificada era compatible con la MT. La termoestabilidad, junto con la elevada respuesta polarográfica, la capacidad de unir metal y el peso molecular determinado por espectrometría, permiten confirmar el aislamiento y purificación de MT de *Melanopsis dufouri*.

En base al distinto comportamiento de elución de las fracciones que constituyen los dos picos de señal polarográfica, se pensó que podrían corresponder a dos isoformas de MT. Sin embargo los espectros de masas determinados muestran un peso molecular similar para las sustancias que constituyen los dos picos. Como ya se expuso en el apartado 1.1, se han descrito al menos dos isoformas de MT en gasterópodos. La masa molecular de la MT de *Melanopsis* es similar a las isoformas encontradas por Dallinger

et al. (2004b) para la isoforma MT-Cd (6.620 Da) y para la isoforma MT-Cu (6.247 Da) del pulmonado *Helix pomatia*. Sin embargo, en el prosobranquio *Littorina brevicula* se han descrito MT con masas moleculares de 9800 Da. para la isoforma de cadmio y 11380 Da para la isoforma de cobre.

Hay que hacer notar que los espectros MALDI-MS obtenidos a partir de MT contienen varios picos de señal correspondientes a distintas masas moleculares. Esto es el reflejo de la presencia de una gran variedad de complejos, dado que puede variar el grado de saturación de la MT con metales, el grado de oxidación del cobre unido, así como el número de puentes disulfuro (Gehring et al., 2000). Este último punto es de gran importancia para la purificación, aislamiento e identificación de MT de gasterópodos, tal como mostraron Dallinger et al. (2005), dado que ambas isoformas, aunque especialmente la de cobre, son altamente susceptibles a la oxidación. La razón para la rápida oxidación de la isoforma Cu-MT es que el cobre (I) que tiene unido se oxida muy fácilmente a Cu(II) dando lugar a la desintegración e inestabilidad del cluster metálico. Estos autores recomiendan realizar el aislamiento, purificación y análisis mediante espectrometría de masas de la MT de gasterópodos en el mismo día, para minimizar la oxidación. Nuestros espectros muestran un perfil compatible con un cierto grado de oxidación. Dada la metodología utilizada en el presente estudio y la necesidad de acudir a servicios externos a nuestro laboratorio para el análisis de espectrometría de masas, fue imposible seguir la recomendación anterior.

A pesar del tratamiento de la muestra mediante carboximetilación, con el fin de reducir todos los puentes disulfuro y la presencia de agentes reductores en todas las etapas de purificación, no se consiguió evitar cierto grado de oxidación de la MT, fenómeno que dificulta la identificación de la proteína mediante la huella peptídica y mediante sus espectros de fragmentación. El perfil de fragmentación, y por tanto la calidad del

espectro, se ve afectado por las características estructurales de algunos péptidos. Los puentes disulfuro intramoleculares que se forman por la oxidación de la cisteína modifican el patrón de fragmentación del péptido. Aún en el caso de que el puente de cisteína se forme entre aminoácidos próximos y en un extremo de la secuencia, la serie de iones que contiene estas cisteínas presentarán valores de masa dos unidades inferiores a los esperados. Nos encontraremos con problemas de secuenciación, tanto por búsqueda en bases de datos como de novo (Quin y Chait, 1995; Tsaprailis y Nair, 1999), ya que la fragmentación de estos péptidos no sigue el patrón típico.

Con respecto a los compuestos de alto peso molecular que presentan respuesta polarográfica, ni el análisis de la huella peptídica ni el análisis de fragmentación de cada una de las bandas presentadas en el gel de la figura 4.29, permitió la identificación de ninguna proteína; posiblemente, por la misma razón ya descrita para la identificación de MT, dada la presencia de numerosos grupos -SH. Una de las proteínas candidatas a aparecer dentro de este conjunto de sustancias termoestables, de alto peso molecular y con señal polarográfica era la hemocianina. Existen trabajos que demuestran que algunas hemocianinas presentan fragmentos muy termoestables (Sterner et al., 1995) y presentan residuos de cisteína así como puentes disulfuro (Gielens et al., 2005). Además esta proteína une cobre y posee un elevado peso molecular. Por ello se ensayó la respuesta polarográfica de la hemocianina pura disponible comercialmente del prosobranquio *Megathura crenulata* y no se obtuvo respuesta polarográfica. Otra hipótesis es la existencia entre dichos compuestos de agregados de MT, puesto que lo único que diferencia estos compuestos de la MT es su elevado peso molecular.

4.5. BIBLIOGRAFÍA.

- Amiard, J.C.; Amiard-Triquet, C.; Barka, S.; Pellerin, J.; Rainbow, P.S. (2006) "Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers". *Aquatic Toxicology*. **76**: 160-202.
- Bebianno, M.J.; Langston, W.J. (1989) "Quantification of metallothionein in marine invertebrates using Differential Pulse Polarography". *Portugaliae Electrochimica Acta*. **7**: 511-24.
- Bebianno, M.J.; Langston, W.J.; Simkiss, K. (1992) "Metallothionein induction in *Littorina littorea* (Mollusca: Prosobranchia) on exposure to cadmium". *Journal Of The Marine Biological Association Of The United Kingdom*. **72**: 329-42.
- Bebianno, M.J.; Langston, W.J. (1995) "Induction of metallothionein synthesis in the gill and kidney of *Littorina littorea* exposed to cadmium". *J Mar Biol Assn Uk*. **75**: 173-86.
- Bebianno, M.J.; Langston, W.J. (1998) "Cadmium and metallothionein turnover in different tissues of the gastropod *Littorina littorea*". *Talanta*. **46**: 301-13.
- Berger, B.; Dallinger, R.; Thomaser, A. (1995) "Quantification of metallothionein as a biomarker for cadmium exposure in terrestrial gastropods". *Environ Toxicol Chem*. **14**: 781-91.
- Burns, J.; Butler, J.; Moran, J.; Whitesides, G.M. (1991) "Selective reduction of disulfides by tris(2-carboxyethyl)phosphine". *J. Org. Chem*. **56(8)**: 2648-50.
- Chabicoovsky, M.; Niederstatter, H.; Thaler, R.; Hodl, E.; Parson, W.; Rossmannith, W.; Dallinger, R. (2003) "Localization and quantification of Cd- and Cu-specific metallothionein isoform mRNA in cells and organs of the terrestrial gastropod *Helix pomatia*". *Toxicol Appl Pharmacol*. **190**: 25-36.
- Chabicoovsky, M.; Klepal, W.; Dallinger, R. (2004) "Mechanisms of cadmium toxicity in terrestrial pulmonates: programmed cell death and metallothionein overload". *Environ Toxicol Chem*. **23**: 648-55.
- Cœurdassier, M.; De Vauflery, A.; Badot, P.M. (2003) "Bioconcentration of cadmium and toxic effects on life-history traits of pond snails (*Lymnaea palustris* and *Lymnaea stagnalis*) in laboratory bioassays". *Arch Environ Contam Toxicol*. **45**: 102-09.
- Dabrio, M.; Rodriguez, A.R.; Bordin, G.; Bebianno, M.J.; De Ley, M.; Sestakova, I.; Vasak, M.; Nordberg, M. (2002) "Recent developments in quantification methods for metallothionein". *J Inorg Biochem*. **88**: 123-34.
- Dallinger, R.; Berger, B.; Hunziker, P.; Kagi, J.H. (1997) "Metallothionein in snail Cd and Cu metabolism". *Nature*. **388**: 237-38.
- Dallinger, R.; Lagg, B.; Egg, M.; Schipflinger, R.; Chabicoovsky, M. (2004a) "Cd accumulation and Cd-metallothionein as a biomarker in *Cepaea hortensis* (Helicidae, Pulmonata) from laboratory exposure and metal-polluted habitats". *Ecotoxicology*. **13**: 757-72.

- Dallinger, R.; Chabicoovsky, M.; Berger, B. (2004b) "Isoform-specific quantification of metallothionein in the terrestrial gastropod *Helix pomatia*. I. Molecular, biochemical, and methodical background". *Environ Toxicol Chem.* **23**: 890-901.
- Dallinger, R.; Chabicoovsky, M.; Lagg, B.; Schipflinger, R.; Weirich, H.G.; Berger, B. (2004c) "Isoform-specific quantification of metallothionein in the terrestrial gastropod *Helix pomatia*. II. A differential biomarker approach under laboratory and field conditions". *Environ Toxicol Chem.* **23**: 902-10.
- Dallinger, R.; Chabicoovsky, M.; Hodl, E.; Prem, C.; Hunziker, P.; Manzl, C. (2005) "Copper in *Helix pomatia* (Gastropoda) is regulated by one single cell type: differently responsive metal pools in rhogocytes". *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **289**: R1185-95.
- Flessas, C.; Couillard, Y.; Pinel-Alloul, B.; St-Cyr, L.; Campbell, P.G.C. (2000) "Metal concentrations in two freshwater gastropods (Mollusca) in the St. Lawrence River and relationships with environmental contamination". *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **57 (Suppl. 1)**: 126-37.
- Gehrig, P.M.; You, C.; Dallinger, R.; Gruber, C.; Brouwer, M.; Kagi, J.H.; Hunziker, P.E. (2000) "Electrospray ionization mass spectrometry of zinc, cadmium, and copper metallothioneins: evidence for metal-binding cooperativity". *Protein Sci.* **9**: 395-402.
- Geret, F.; Rainglet, F.; Cosson, R.P. (1998) "Comparison between Isolation Protocols Commonly Used for the Purification of Mollusc Metallothioneins". *Marine Environmental Research.* **46**: 545-50.
- Gielens, C.; Idakieva, K.; Van den Bergh, V.; Siddiqui, N.I.; Parvanova, K.; Compennolle, F. (2005) "Mass spectral evidence for N-glycans with branching on fucose in a molluscan hemocyanin". *Biochem Biophys Res Commun.* **331**: 562-70.
- Ivankovic, D.; Pavicic, J.; Raspor, B.; Falnoga, I.; Tusek-Znidaric, T. (2003) "Comparison of two SH-based methods for estimation of metallothionein level in the digestive gland of naturally occurring mussels, *Mytilus galloprovincialis*". *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* **83**: 219-31.
- Laemmli, U.K. (1970) "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature.* **227**: 680-85.
- Lam, P.K.S.; Yu, K.N.; Ng, K.P.; Chong, M.W.K. (1997) "Cadmium uptake and depuration in the soft tissues of *Brotia hainanensis* (Gastropoda: Prosobranchia: Thiaridae): A dynamic model". *Chemosphere.* **35**: 2449-61.
- Langston, W.J.; Zhou, M. (1986) "Evaluation of the significance of metal-binding proteins in the gastropod *Littorina littorea*". *Marine Biology.* **92**: 505-15.
- Langston, W.J.; Zhou, M. (1987) "Cadmium accumulation, distribution and elimination in the bivalve *Macoma balthica*: neither metallothionein nor metallothionein-like proteins are involved". *Marine Environmental Research.* **21**: 225-37.

- Langston, W.J.; Bebianno, M.J.; Burt, G.R. (1998) "Metal handling strategies in molluscs". En: *Metal Metabolism in Aquatic Environments*. Langston, W.J.; Bebianno, M.J. (Ed). Chapman & Hall, London
- Lavado, R.; Ureña, R.; Martin-Skilton, R.; Torreblanca, A.; Del Ramo, J.; Raldua, D.; Porte, C. (2006) "The combined use of chemical and biochemical markers to assess water quality along the Ebro River". *Environ Pollut.* **139**: 330-39.
- Leung, K.M.; Furness, R.W. (1999a) "Induction of metallothionein in dogwhelk *Nucella lapillus* during and after exposure to cadmium". *Ecotoxicol Environ Saf.* **43**: 156-64.
- Leung, K.M.Y.; Furness, R.W. (1999b) "Effects of animal size on concentrations of metallothionein and metals in periwinkles *Littorina littorea* collected from the Firth of Clyde, Scotland". *Mar Pollut Bull.* **39**: 126-36.
- Leung, K.M.; Furness, R.W. (2001a) "Metallothionein induction and condition index of dogwhelks *Nucella lapillus* (L.) exposed to cadmium and hydrogen peroxide". *Chemosphere.* **44**: 321-25.
- Leung, K.M.; Furness, R.W. (2001b) "Survival, growth, metallothionein and glycogen levels of *Nucella lapillus* (L.) exposed to subchronic cadmium stress: the influence of nutritional state and prey type". *Mar Environ Res.* **52**: 173-94.
- Leung, K.M.Y.; Morgan, I.J.; Wu, R.S.S.; Lau, T.C.; Svavarsson, J.; Furness, R.W. (2001) "Growth rate as a factor confounding the use of the dogwhelk *Nucella lapillus* as biomonitor of heavy metal contamination". *Marine Ecology Progress Series.* **221**: 145-59.
- Leung, K.M.Y.; Svavarsson, J.; Crane, M.; Morritt, D. (2002) "Influence of static and fluctuating salinity on cadmium uptake and metallothionein expression by the dogwhelk *Nucella lapillus* (L.)". *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.* **274**: 175-89.
- Leung, K.M.Y.; Ibrahim, H.; Dewhurst, R.E.; Morley, N.J.; Crane, M.; Lewis, J.W. (2003) "Concentrations of metallothionein-like proteins and heavy metals in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* exposed to different levels of waterborne cadmium". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **71**: 1084-90.
- Leung, K.M.; Dewhurst, R.E.; Halldorsson, H.; Svavarsson, J. (2005) "Metallothioneins and trace metals in the dogwhelk *Nucella lapillus* (L.) collected from Icelandic coasts". *Mar Pollut Bull.* **51**: 729-37.
- Margalef, R. (1982) "Ecología". Omega, S.A., Barcelona.
- Martin, J.H.; Knauer, G.A.; Flegal, A.R. (1980) "Cadmium in natural waters". En: *Cadmium in the Environment, Part I. Ecological Cycling*. Nriagu, J.O. (Ed). John Wiley & Sons, New York
- Martínez, M.; Torreblanca, A.; Del Ramo, J.; Pastor, A.; Díaz-Mayans, J. (1993) "Cadmium Induced Metallothionein in Hepatopancreas of *Procambarus clarkii* - Quantification by a Silver-Saturation Method". *Comp Biochem Physiol [C]*. **105**: 263-67.

- Martínez, M.; Del Ramo, J.; Torreblanca, A.; Pastor, A.; Díaz-Mayans, J. (1996) "Cadmium toxicity, accumulation and metallothionein induction in *Echinogammarus echinosetosus*". *J. Environ. Sci. Health.* **A31**: 1605-17.
- Otsuka, F.; Koizumi, S.; Kimura, M.; Ohsawa, M. (1988) "Silver staining for carboxymethylated metallothioneins in polyacrylamide gels". *Analytical Biochemistry.* **168**: 184-92.
- Park, J.S.; Chung, S.; Park, I.S.; Kim, Y.; Koh, C.; Lee, I.S. (2002) "Purification and characterization of metallothionein-like cadmium binding protein from Asian periwinkle *Littorina brevicula*". *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* **131**: 425-31.
- Pujante, A.M. (1987) "*Melanopsis dufouri* Ferussac, 1823 (Mollusca, Prosobranchia, Thiaridae): Análisis taxonómico, morfología, anatomía interna y autoecología". Tesis Doctoral, Universitat de València, Valencia.
- Pujante, A.M.T., G.; Martinez, F. (1998) "Los moluscos de los ríos de la Comunidad Valenciana (España)." *Iberus.* **16 (1)**: 1-19.
- Quin, J.; Chait, B.T. (1995) "Preferential fragmentation of protonated gas-phase peptide ions adjacent to acidic amino acid residues". *J.Am.Chem.Soc.* **117**: 5411.
- Ruegg, U.T.; Rudinger, J. (1977) "Reductive cleavage of cystine disulfides with tributylphosphine". *Methods Enzymol.* **47**: 111-16.
- Ryu, S.K.; Park, J.S.; Lee, I.S. (2003) "Purification and characterization of a copper-binding protein from Asian periwinkle *Littorina brevicula*". *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* **134**: 101-07.
- Schagger, H.; von Jagow, G. (1987) "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa". *Analytical Biochemistry.* **166(2)**: 368-79.
- Scheuhammer, A.M.; Cherian, M.G. (1986) "Quantification of Metallothioneins by a Silver-Saturation Method". *Toxicology and Applied Pharmacology.* **82**: 417-25.
- Simes, D.C.; Bebianno, M.J.; Moura, J.J. (2003) "Isolation and characterisation of metallothionein from the clam *Ruditapes decussatus*". *Aquat Toxicol.* **63**: 307-18.
- Solà, J.; Toja, M.; Plans, M.; Prat, N. (2005) "Evolution of heavy metal concentrations in water, sediment, plankton, biofilms and macroinvertebrates in the Guadiamar river after the Aznalcóllar incident". En: *Integrated Assessment and management of the ecosystems affected by the Aznalcóllar mining spill (SW, Spain)*. Del Valls, T.A.; Blasco, J. (Ed). UNESCO Unitwin: Wicop, Cádiz
- Sterner, R.; Vogl, T.; Hinz, H.J.; Penz, F.; Hoff, R.; Foll, R.; Decker, H. (1995) "Extreme thermostability of tarantula hemocyanin". *FEBS Lett.* **364**: 9-12.
- Suzuki, K.T.; Yamamura, M. (1980) "Isolation and characterization of metallothionein dimers". *Biochemical Pharmacology.* **29**: 689-92.

- Tsaprailis, G.; Nair, H. (1999) "Influence of secondary structure on the fragmentation of protonated peptides". *J.Am.Chem.Soc.* **121**: 5142.
- Wepener, V.; van Vuren, J.H.J.; Chatiza, F.P.; Mbizi, Z.; Slabbert, L.; Masola, B. (2005) "Active biomonitoring in freshwater environments: early warning signals from biomarkers in assessing biological effects of diffuse sources of pollutants". *Physics and Chemistry of the Earth.* **30**: 751-61.
- Zorita, I.; Strogyloudi, E.; Buxens, A.; Mazon, L.I.; Papathanassiou, E.; Soto, M.; Cajaraville, M.P. (2005) "Application of two SH-based methods for metallothionein determination in mussels and intercalibration of the spectrophotometric method: laboratory and field studies in the Mediterranean Sea". *Biomarkers.* **10**: 342-59.

5. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES.

5. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES.

5.1. DISCUSIÓN GENERAL.

Los resultados obtenidos en los diferentes estudios ponen de manifiesto que la viabilidad de la utilización de la metalotioneína como biomarcador de contaminación depende, en gran medida, de la especie y del órgano seleccionado, así como de una metodología adecuada para su determinación. En todas las especies consideradas, la concentración de metal en los tejidos refleja la contaminación por metales en su medio, sin embargo, no siempre sucede así con los niveles de metalotioneína.

Hay que hacer notar que la MT es una proteína que interviene en la homeostasis y la detoxificación de metales. El metabolismo de los metales está regulado por mecanismos complejos y, en muchos casos, dichos mecanismos implican un aumento de la concentración de proteína al aumentar la concentración de un metal en el tejido. Este hecho se aprovecha para la utilización de los niveles de MT como biomarcador. Dada la especialización funcional de los distintos órganos y tejidos es fácil entender que los tejidos respondan diferencialmente, en cuanto a la concentración de metalotioneína, cuando el animal se enfrenta a concentraciones elevadas de metal en el medio. Además, la toxicocinética de un metal explica que los niveles alcanzados en los distintos tejidos varíen considerablemente. Según los resultados obtenidos en *A. anguilla*, la metalotioneína renal muestra una mayor respuesta ante la exposición a metal, y sus niveles están más correlacionados con los niveles de metal alcanzados, que la MT de otros tejidos. Así hubiera sido interesante disponer de muestras de riñón en el estudio de carpas y barbos del río Ebro, puesto que su análisis podría haber indicado si la bondad de la MT renal como biomarcador también se da en estas especies.

Además, para la utilización de la MT como biomarcador es conveniente evaluar la respuesta en cada especie bajo distintas circunstancias, dado que en los estudios de bioseguimiento no siempre va a estar disponible la mejor especie centinela. Esto ocurre en muchos ríos de la Comunidad Valenciana, en los que su escaso e intermitente caudal no permite la utilización de peces como especies centinela, pero sí la utilización de gasterópodos. La respuesta encontrada en los niveles de MT de los diferentes estudios realizados, hace pensar que la posible aplicación de la MT en programas de bioseguimiento no puede basarse en la existencia de niveles críticos o umbrales de MT, sino que en todo caso podría incluirse en estudios estadísticos multivariantes donde se tuvieran en cuenta otros biomarcadores o respuestas. Otro aspecto importante para la utilización de MT como biomarcador es la elección de la metodología adecuada para cada especie. Los resultados del programa de intercalibración BEQUALM, así como los obtenidos en la validación del método polarográfico en anguila, ponen de manifiesto que los métodos para la determinación de MT utilizados en la presente memoria cumplen los criterios de calidad para ser utilizados en programas de bioseguimiento utilizando peces como organismo centinela.

La problemática metodológica encontrada en la determinación de MT mediante el método de PPD en *M. dufouri*, y descrita también en *Littorina littorea*, deja patente la necesidad de estudiar el fraccionamiento cromatográfico de la muestra a analizar en cada tejido y especie para confirmar la especificidad de respuesta. De no presentarse esta especificidad, la ultrafiltración ha demostrado ser útil para eliminar las interferencias en la determinación.

5.2 . CONCLUSIONES:

- 1) La elevada concentración de cadmio y mercurio en el hígado de carpas y barbos capturados en las estaciones F y M del río Ebro indican la existencia de contaminación por metales en las estaciones mencionadas.
- 2) Los niveles de metalotioneína de hígado de *Cyprinus carpio* y *Barbus graellsii* no reflejan la contaminación del río por cadmio o mercurio lo que limita su potencial como biomarcador.
- 3) El patrón de distribución de metales entre los diferentes órganos de *Anguilla anguilla*, así como la concentración de los mismos, varía en función de las condiciones en las que se desarrollan.
- 4) El contenido de metales en el músculo de anguila no superó los niveles máximos permitidos por la legislación actual.
- 5) El riñón de *A. anguilla* se propone como órgano de elección en los estudios de bioseguimiento de contaminación en que se considere la metalotioneína como biomarcador.
- 6) La exposición subletal a plomo produce variaciones en las concentraciones de metalotioneína y de metales esenciales, así como en la actividad ácido δ -aminolevulínico deshidratasa de los tejidos de *A. anguilla*.
- 7) En todas las especies de peces estudiadas existe una alta correlación entre los niveles de cobre y metalotioneína hepática, mostrando la importancia de esta proteína en el metabolismo del cobre en el hígado.
- 8) Dada la acumulación lineal del cadmio en *M. dufouri* durante la exposición crónica, esta especie ofrece un gran potencial en el bioseguimiento de contaminación por cadmio.

- 9) La introducción de la ultrafiltración, como un paso adicional en el procedimiento para la determinación de metalotioneína por polarografía de pulso diferencial, permite eliminar los compuestos de alto peso molecular termoestables que interfieren en dicha determinación.
- 10) Las propiedades fisicoquímicas de la proteína aislada y purificada en el complejo visceral de *M. dufouri* indican que se trata de metalotioneína.

**ANEXO 1: RESULTADOS DEL EJERCICIO DE
INTERCALIBRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE
METALOTIONEÍNA.**

ANEXO 1: RESULTADOS DEL EJERCICIO DE INTERCALIBRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE METALOTIONEÍNA.

1. INTRODUCCIÓN.

Como ya explicamos en el apartado 1.2.3, en el presente trabajo se incluye la participación en un ejercicio de intercalibración, financiado por la Unión Europea dentro del programa BEQUALM. El objetivo fue determinar la concentración de MT por el método de saturación con plata en hígado de tres especies de peces, lenguado (*Limanda limanda*), bacalao (*Gadus morhua*) y platija (*Platichys flexus*). Las muestras podían ser de peces no expuestos, procedentes de aguas limpias; expuestos de forma natural, procedentes de zonas contaminadas por metales o expuestos experimentalmente en laboratorios a elevadas concentraciones de metales.

2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

Se suministraron muestras de hígado en polvo de las tres especies a nuestro laboratorio y al resto de laboratorios que participaron en el programa de intercalibración, bajo unos códigos identificativos sin más información. Las determinaciones se debían realizar por triplicado y repetir en días diferentes. En la tabla 1 se muestra los métodos que usaron los participantes. Nosotros eramos el laboratorio 1.

Tabla 1. Métodos usados por los laboratorios participantes en el proyecto Bequalm.

Método	Lab ID	Número
Polarografía de pulso diferencial (PPD)	lab 3, lab 4, lab 6, lab 8, lab 9, lab 13	6
ELISA	lab 4, lab 10, lab 13	3
Saturación con plata	lab 1	1
Saturación con Cd hemoglobina	lab 7	1
Cd-chelex	lab 12	1
Tetratiomolibdato	lab 12	1

Las muestras de hígado fueron procesadas siguiendo el esquema de la figura 1.2. Se realizó el análisis de proteína, utilizando el método de Lowry para poder expresar la concentración de MT en términos de proteína total.

3. RESULTADOS.

Una vez realizadas las medidas de MT, se enviaron los resultados a la Comisión de Intercalibración y Control de Calidad. Posteriormente, nos enviaron el valor asignado de MT de cada una de las muestras, así como el tipo de exposición y la especie que correspondía a cada código. Los datos fueron estandarizados mediante Z-scores obteniendo una puntuación para cada muestra. Los Z-scores representan los valores de la variable desde una distribución normal con una media cero y una desviación estándar de uno. En la tabla 2 se muestra un resumen de los resultados obtenidos por los distintos laboratorios, así como el valor asignado a cada muestra.

Tabla 2. Resultados obtenidos de MT en hígado por todos los laboratorios con los diferentes métodos. Todos los resultados están expresados en μg MT/ mg proteína, excepto los ensayos de saturación con Ag, Cd-Chelex y Tetratiomolibdato que están en mg MT/ g peso fresco.

Lab	Muestra	Media	Valor asignado	Método
1	Bacalao expuesto experimentalmente	2,52	2,36	Saturación Ag
1	Bacalao expuesto naturalmente	0,62	0,66	Saturación Ag
1	Bacalao no expuesto	0,46	0,48	Saturación Ag
1	Platija expuesto experimentalmente	1,34	1,19	Saturación Ag
1	Platija expuesto naturalmente	0,57	0,61	Saturación Ag
1	Platija no expuesto	0,35	0,36	Saturación Ag
1	Lenguado expuesto experimentalmente	1,53	1,20	Saturación Ag
1	Lenguado expuesto naturalmente	0,31	0,36	Saturación Ag
1	Lenguado no expuesto	0,20	0,25	Saturación Ag
3	Bacalao expuesto experimentalmente	17,6	50,6	PPD
3	Bacalao expuesto naturalmente	6,1	17,4	PPD
3	Bacalao no expuesto	3,2	10,1	PPD
3	Platija expuesto experimentalmente	10,8	27,9	PPD
3	Platija expuesto naturalmente	6,3	15,4	PPD
3	Platija no expuesto	3,6	8,17	PPD
3	Lenguado expuesto experimentalmente	12,1	34,5	PPD
3	Lenguado expuesto naturalmente	3,0	8,9	PPD
3	Lenguado no expuesto	2,7	5,8	PPD

Tabla 2. (continuación)

Lab	Muestra	Media	Valor asignado	Método
4	Bacalao expuesto experimentalmente	46,5	50,6	PPD
4	Bacalao expuesto naturalmente	13,6	17,4	PPD
4	Bacalao no expuesto	11,1	10,1	PPD
4	Platija expuesto experimentalmente	37,5	27,9	PPD
4	Platija expuesto naturalmente	28,3	15,4	PPD
4	Platija no expuesto	9,4	8,17	PPD
4	Lenguado expuesto experimentalmente	NR	34,5	PPD
4	Lenguado expuesto naturalmente	7,7	8,9	PPD
4	Lenguado no expuesto	6,5	5,8	PPD
4	Bacalao expuesto experimentalmente	16,7	50,6	ELISA
4	Bacalao expuesto naturalmente	36,8	17,4	ELISA
4	Bacalao no expuesto	38,0	10,1	ELISA
6	Bacalao expuesto experimentalmente	39,5	50,6	PPD
6	Bacalao expuesto naturalmente	17,4	17,4	PPD
6	Bacalao no expuesto	14,4	10,1	PPD
6	Platija expuesto experimentalmente	22,1	27,9	PPD
6	Platija expuesto naturalmente	13,5	15,4	PPD
6	Platija no expuesto	12,1	8,17	PPD
6	Lenguado expuesto experimentalmente	25,5	34,5	PPD
6	Lenguado expuesto naturalmente	8,7	8,9	PPD
6	Lenguado no expuesto	7,8	5,8	PPD

Tabla 2. (continuación)

Lab	Muestra	Media	Valor asignado	Método
7	Bacalao expuesto experimentalmente	65,4	50,6	Cd hemoglobina
7	Bacalao expuesto naturalmente	10,0	17,4	Cd hemoglobina
7	Bacalao no expuesto	7,2	10,1	Cd hemoglobina
7	Platija expuesto experimentalmente	15,7	27,9	Cd hemoglobina
7	Platija expuesto naturalmente	7,6	15,4	Cd hemoglobina
7	Platija no expuesto	42,6	8,17	Cd hemoglobina
7	Lenguado expuesto experimentalmente	26,0	34,5	Cd hemoglobina
7	Lenguado expuesto naturalmente	9,6	8,9	Cd hemoglobina
7	Lenguado no expuesto	8,1	5,8	Cd hemoglobina
8	Bacalao expuesto experimentalmente	139,3	50,6	PPD
8	Bacalao expuesto naturalmente	66,9	17,4	PPD
8	Bacalao no expuesto	63,6	10,1	PPD
8	Platija expuesto experimentalmente	119,3	27,9	PPD
8	Platija expuesto naturalmente	725,8	15,4	PPD
8	Platija no expuesto	179,3	8,17	PPD
8	Lenguado expuesto experimentalmente	122,5	34,5	PPD
8	Lenguado expuesto naturalmente	65,6	8,9	PPD
8	Lenguado no expuesto	34,8	5,8	PPD
9	Bacalao expuesto experimentalmente	75,5	50,6	PPD
9	Bacalao expuesto naturalmente	29,8	17,4	PPD
9	Bacalao no expuesto	34,1	10,1	PPD
9	Platija expuesto experimentalmente	56,4	27,9	PPD
9	Platija expuesto naturalmente	34,8	15,4	PPD
9	Platija no expuesto	22,7	8,17	PPD
9	Lenguado expuesto experimentalmente	61,4	34,5	PPD
9	Lenguado expuesto naturalmente	31,3	8,9	PPD
9	Lenguado no expuesto	23,8	5,8	PPD

Tabla 2. (continuación)

10	Bacalao expuesto experimentalmente	2,2	50,6	ELISA
10	Bacalao expuesto naturalmente	1,9	17,4	ELISA
10	Bacalao no expuesto	3,1	10,1	ELISA
12	Bacalao expuesto experimentalmente	1,0	2,36	Cd Chelex
12	Bacalao expuesto naturalmente	0,4	0,66	Cd Chelex
12	Bacalao no expuesto	0,4	0,48	Cd Chelex
12	Platija expuesto experimentalmente	0,7	1,19	Cd Chelex
12	Platija expuesto naturalmente	0,4	0,61	Cd Chelex
12	Platija no expuesto	0,3	0,36	Cd Chelex
12	Lenguado expuesto experimentalmente	0,7	1,20	Cd Chelex
12	Lenguado expuesto naturalmente	0,3	0,36	Cd Chelex
12	Lenguado no expuesto	0,3	0,25	Cd Chelex
12	Bacalao expuesto experimentalmente	1,4	2,36	Tetratiomolibdato
12	Bacalao expuesto naturalmente	0,5	0,66	Tetratiomolibdato
12	Bacalao no expuesto	0,4	0,48	Tetratiomolibdato
12	Platija expuesto experimentalmente	1,1	1,19	Tetratiomolibdato
12	Platija expuesto naturalmente	0,7	0,61	Tetratiomolibdato
12	Platija no expuesto	0,4	0,36	Tetratiomolibdato
12	Lenguado expuesto experimentalmente	1,3	1,20	Tetratiomolibdato
12	Lenguado expuesto naturalmente	0,4	0,36	Tetratiomolibdato
12	Lenguado no expuesto	0,4	0,25	Tetratiomolibdato
13	Bacalao expuesto experimentalmente	53,8	50,6	PPD
13	Bacalao expuesto naturalmente	16,9	17,4	PPD
13	Bacalao no expuesto	9,7	10,1	PPD
13	Platija expuesto experimentalmente	29,7	27,9	PPD
13	Platija expuesto naturalmente	15,2	15,4	PPD
13	Platija no expuesto	7,9	8,17	PPD
13	Lenguado expuesto experimentalmente	33,9	34,5	PPD
13	Lenguado expuesto naturalmente	8,7	8,9	PPD
13	Lenguado no expuesto	6,1	5,8	PPD

En las figuras 1, 2 y 3 se muestra el Z-score obtenido por los diferentes laboratorios, en bacalao, platija y lenguado respectivamente. Los resultados del análisis de MT mediante el método ELISA están excluidos.

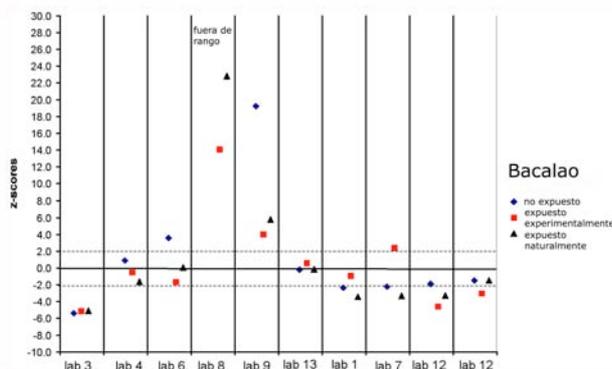


Figura 1. Z-scores para el análisis de MT en hígado de bacalao, obtenido por los diferentes laboratorios. El método que cada laboratorio ha utilizado está en la tabla 1.

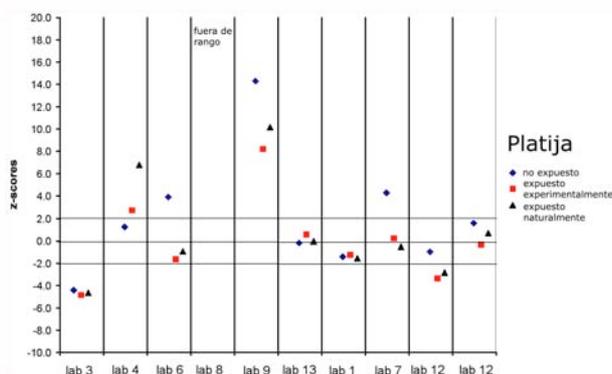


Figura 2. Z-scores para el análisis de MT en hígado de platija, obtenido por los diferentes laboratorios. El método que cada laboratorio ha utilizado está en la tabla 1.

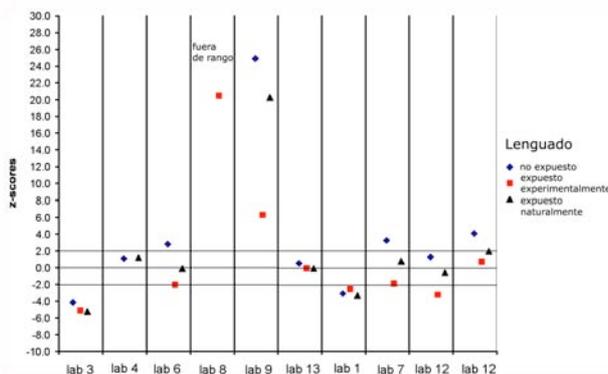


Figura 3. Z-scores para el análisis de MT en hígado de lenguado, obtenido por los diferentes laboratorios. El método que cada laboratorio ha utilizado está en la tabla 1.

A pesar de que nuestros resultados son consistentes y reflejan claramente la variación de concentración entre las muestras, obtuvimos unos resultados más bajos que el valor asignado, en un rango desde el 12,5% al 42,5%. Aunque los valores fueron inferiores a los valores asignados, lo fueron para todas las muestras, esto es, la diferencia en los niveles de concentración de MT está dentro de la misma área de concentración. Esto es debido a que los resultados estandarizados se expresaron referidos a la concentración de proteína, y los valores de proteína variaron mucho entre los diferentes laboratorios, siendo una importante fuente de error al analizar la MT. De hecho, si observamos la tabla 2, y comparamos los valores obtenidos en términos de peso fresco, vemos que nuestros resultados se aproximan más, y presentan mucha menor variación comparados con el valor asignado, ya que eliminamos el error cometido en las medidas de proteína total. Cabe destacar que los valores asignados por la organización fueron determinados mediante el método PPD (laboratorio 13). A la vista de los resultados, podemos afirmar

que el método de la plata para la determinación de MT en hígado de pez resulta comparable o mejor que otros métodos de los empleados en la intercalibración.

Los Z-scores indican que el método de PPD dio variaciones mayores que otros métodos, en las tres especies de peces. El laboratorio 8, por ejemplo, que utilizó el método PPD, tuvo altas variaciones comparado con los valores asignados, obteniendo Z-scores fuera de rango. Esto puede ser debido a que este método fue utilizado por más laboratorios, y la varianza de los datos obtenidos por este método será mucho mayor comparado con el valor asignado. Además, los parámetros aplicados en el método, como la temperatura del electrolito o el tipo de electrodo de mercurio, pueden variar entre los diferentes laboratorios. Cabe destacar, que las variaciones son mayores cuando calculamos la concentración de MT en términos de concentración de proteína, así como los posibles errores cometidos. Omitiendo los resultados de los laboratorios 3, 8 y 9, que fueron los más alejados del valor asignado, el resto de laboratorios que utilizaron el método PPD, incluido el laboratorio de referencia, obtuvieron valores muy similares al resto de laboratorios.

El laboratorio 12 realizó dos ensayos, el de Cd-chelex y el del tetratiomolibdato. En el ensayo de Cd-chelex se obtienen, como es de esperar, concentraciones más bajas que en el ensayo de TTM, debido a que solamente mide MT unida a Cd y Zn, mientras que el de tetratiomolibdato mide MT unida a otros metales como el Cu.

Las variaciones más grandes se obtuvieron con el método ELISA, comparado con los valores asignados. Además, los resultados no reflejan la variación en la concentración entre las distintas muestras, como se observa en la tabla 2. En esta tabla también se puede observar, que el método Cd hemoglobina dio unos resultados con desviaciones que variaban desde la subestimación a la sobreestimación, comparado con los valores asignados, a

pesar de ello, los resultados reflejan la variación en la concentración de MT entre las muestras.

A la vista de los resultados de la intercalibración queda de manifiesto que los métodos utilizados en esta Tesis, el de saturación con Ag y el de la PPD son válidos y apropiados para la determinación de MT en estudios de contaminación ambiental. Además, queda patente la necesidad de validar los diferentes métodos existentes para la determinación de MT con el fin de reducir las variaciones entre laboratorios y poder comparar los resultados obtenidos por diferentes grupos de investigación.