

---

# LAS METALOTIONINAS COMO BIOMARCADORES MOLECULARES DE LA CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS EN ORGANISMOS ACUÁTICOS

ROSA E. REYES GIL

---

Los metales pesados esenciales como el zinc y el cobre, son requeridos por los sistemas biológicos como componentes estructurales y catalíticos de proteínas y enzimas; así como cofactores esenciales para el crecimiento y el desarrollo normal de los organismos. En exceso, estos micronutrientes y otros metales pesados relacionados como el cadmio, el mercurio y el plomo, pueden ser extremadamente tóxicos para las células (Vallee y Ulmer, 1972; Visviki y Rachlin, 1994 a, b). Los efectos tóxicos de los metales no esenciales son probablemente causados por la tendencia que tienen de sustituir al cobre y el zinc y por competir eficientemente por los ligandos específicos de estos cationes dentro de la célula. De encontrarse a altas concentraciones, estos metales pueden unirse a ligandos no específicos de los iones metálicos, ocupando así espacios celulares o receptores cuya función es bloqueada por la presencia de esos metales (Viarengo, 1989; Viarengo y Nott, 1993).

Entre los posibles mecanismos de tolerancia que los organismos acuáticos han podido desarrollar para enfrentar el exceso de metales pesados en sus células, se encuentran: (1) unión del metal a la pared celular impidiendo su entrada al interior de la célula; (2) reducción del transporte a través de la membrana celular; (3) incremento en la salida o eflujo de metales hacia el exterior celu-

lar; (4) compartimentalización del metal una vez que entra en la célula, almacenándolo en estructuras lisosomales o vacuolares, eliminándolo así del resto de las actividades celulares; (5) formación de complejos con proteínas (metalotioninas), compuestos orgánicos (citrato, malato, aminoácidos) o inorgánicos (sulfuros), de manera de atrapar el metal disminuyendo su concentración en forma libre en la célula; (6) síntesis de proteínas o metabolitos de estrés, protectoras o reparadoras de los daños celulares producidos por el metal; y (7) formación de precipitados insolubles en forma de gránulos de Ca/Mg o Ca/S (Tomsett y Thurman, 1988; Simkiss y Taylor, 1989; Viarengo y Nott, 1993; Neumann *et al.*, 1944).

Estos mecanismos varían en eficiencia entre los diferentes organismos y entre las células del mismo organismo. Actualmente las evidencias experimentales indican que, sin excluir los otros, la expresión de las metalotioninas podría explicar en gran parte la resistencia o tolerancia de las células animales y vegetales a altas concentraciones de metales pesados (Hammer, 1986; Rauser, 1990). En este contexto, la exposición y los efectos tóxicos de los metales pesados y otros contaminantes, pueden ser medidos en términos de respuestas bioquímicas de los organismos; estas respuestas son conocidas como "Biomarcadores Moleculares" (Livingstone, 1993). Es ampliamente aceptado que los efectos

de los contaminantes en un ecosistema se inician con una reacción bioquímica del organismo (Melacon, 1995). Esta respuesta inicial es una indicación reversible más sensible que aquellas que tienen lugar a altos niveles de organización biológica, como individuo, población o comunidad, y preceden al encendido de efectos más serios e irreversibles en estos niveles superiores (Bucheli y Fent, 1995). Por estas razones, los biomarcadores a nivel bioquímico o biomarcadores moleculares son también conocidos como "señales de alarma temprana" para la evaluación de la salud ambiental (Payne *et al.*, 1987).

Este trabajo tiene como objetivo presentar a las metalotioninas, proteínas que unen metales y proteínas de estrés, entre otros, como los principales biomarcadores moleculares que se inducen en los organismos acuáticos como respuesta a la contaminación por metales pesados.

## Biomarcadores Moleculares Inducidos por Metales Pesados

Los biomarcadores moleculares inducidos por metales pesados en organismos acuáticos más conocidos son las metalotioninas (MT). Según Kojima (1991), el término "Metalotionina" fue introducido por Kagi y Vallee (1960) para designar proteínas ricas en azufre que contenían Cd, Zn, Cu, y provenían del córtex renal del caballo. Estas

---

**PALABRAS CLAVE / Biomarcadores Moleculares / Metales Pesados / Metalotioninas / Proteínas de Estrés / Proteínas Enlazadoras de Metales /**

---

Rosa Reyes Gil. **Bióloga con Maestría y Doctorado en Ciencias Biológicas. Su experiencia se centra en el área de Toxicología en Ambientes Acuáticos, con énfasis en los efectos de los metales pesados sobre organismos autótrofos marinos. Universidad Simón Bolívar, Departamento de Biología de Organismos, Apartado 89.000, Caracas 1086-A, Venezuela. E-mail: rereyes@usb.ve**

---

proteínas fueron caracterizadas como sigue (1) bajo peso molecular (6 - 12 KD); (2) alto contenido metálico; (3) composición característica de aminoácidos (alto contenido de cisteína y ausencia de histidina y de aminoácidos aromáticos); (4) secuencia única de aminoácidos, con una distribución característica de los residuos de cisteína en la forma Cys - X - Cys; y (5) características espectroscópicas propias de uniones mercaptilo (azufre - metal). También se ha publicado la presencia de polipéptidos con pesos moleculares superiores a los característicos de las MT, que igualmente son sintetizados por los organismos acuáticos en respuesta a la exposición a metales pesados (Stone y Overnell, 1985; García, 1993; García y Reyes, 1996); a estas proteínas se le ha denominado "Proteínas enlazadoras de metales". Un interesante grupo de proteínas cuya síntesis es inducida ante perturbaciones ambientales, son las llamadas "Proteínas de estrés" (PE) (Lingquist, 1986; Vierling, 1991), las cuales recientemente han sido relacionadas con la presencia de metales pesados en ecosistemas acuáticos (Sanders, 1993).

Otros biomarcadores moleculares inducidos por metales pesados son:

- Actividad  $\Delta$ -aminolevulínica hidratasa (ALAD) en eritrocitos y células equivalentes, cuya inhibición por efectos del Pb ha sido demostrada en numerosos estudios con humanos, peces y aves (Johansson y Larsson, 1979; Scheuhammer, 1987).
- Actividad de las enzimas involucradas en el sistema oxidativo de las células (glutación oxidasa, catalasa, peroxidasa, entre otras) la cual es indicativa del daño oxidativo causado por los metales pesados y otros xenobióticos (Kehser *et al.*, 1988).
- Alteración de la inmunidad específica o no-específica (pruebas de fagocitosis, muerte de macrófagos o actividad citosólica de las células T), que también ha sido publicada como consecuencia de la exposición a metales pesados, entre otras causas (Chen *et al.*, 1991).

### **Metalotioninas y Otras Proteínas Enlazadoras de Metales**

#### *Nomenclatura y Distribución*

En base a sus características estructurales, las MT fueron clasificadas en tres clases (Fowler *et al.*, 1987):

Clase I: Polipéptidos con la ubicación de los residuos de

cisteína en forma similar a las MT descritas en el riñón del caballo. Reportadas en los peces *Salmo gairdneri* (Bonham *et al.*, 1987), *Pleuronectes platessa* (George *et al.*, 1989) y *Pseudopleuronectes americanus* (Chan *et al.*, 1989); en el bivalvo *Mytilus edulis* (MacKay *et al.*, 1990), el cangrejo *Scylla serrata* (Lerch *et al.*, 1982) y en la langosta *Homarus americanus* (Brouwer *et al.*, 1989).

Clase II: Polipéptidos con la ubicación de los restos de cisteína en forma ligeramente similar a las MT descritas en el riñón del caballo. Publicadas en el erizo *Strongylocentrus purpuratus* (Nemer *et al.*, 1985; Wilkinson y Nemer, 1987) y el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Imagawa *et al.*, 1990).

Clase III: Polipéptidos atípicos metal-tiolados con síntesis no asociada directamente con genes estructurales. Se conocen como fitoquelatinas (FQ) y están constituidas por unidades dipeptídicas repetitivas de  $\gamma$ -glutamilcisteína con un residuo carboxilo terminal de glicina o  $\beta$ -alanina. Han sido identificadas en algas (Nagano *et al.*, 1984; Gekeler *et al.*, 1988), levaduras y plantas superiores (Tukendorf y Rauser, 1990; Rauser *et al.*, 1991).

Las MT clases I y II son proteínas codificadas por genes estructurales. Los genes para varios tipos de MT han sido secuenciados en organismos tales como el erizo de mar *Echinoidea sp* (Nemer *et al.*, 1985), la mosca *Drosophila melanogaster* (Maroni *et al.*, 1986), las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (Butt *et al.*, 1984), *Neurospora crassa* (Munger *et al.*, 1987) y en varios mamíferos, incluyendo al hombre (Karin y Richards, 1982). También en dos especies de peces, *Salmo gairdneri* y *Pseudopleuronectes americanus* (Bonham *et al.*, 1987; Chan *et al.*, 1989) y en la ostra *Crassostrea virginica* (Unger *et al.*, 1991).

Las MT están presentes en todos los organismos, incluyendo mamíferos, peces e invertebrados, algas, plantas superiores y microorganismos procariontes y eucariotes (Roesijadi, 1992). La amplia distribución de MT en organismos acuáticos está bien respaldada en la literatura. Las MT fueron señaladas por primera vez para una especie acuática por Olafson y Thompson (1974), quienes describieron la existencia de una proteína de bajo peso molecular que unía Cd en el pez marino *Sebastes seboides*. Este trabajo fue seguido por reportes de MT en otras especies de peces (Bouquegneau *et al.*, 1975; Marfante, 1976) y moluscos marinos como la ostra *Crassostrea virginica* (Casterline y Yip, 1975) y el bivalvo *Mytilus edulis* (Noel, 1976). A

principios de la siguiente década, comienzan a aparecer reseñas de la presencia de proteínas que unen metales identificadas como FQ en las algas *Chlorella pyrenoidosa* (Hart y Bertram, 1980), *C. ellipsoidea* (Nagano *et al.*, 1984), *Euglena gracilis* (Weber *et al.*, 1987) y muchas otras algas dulceacuícolas y marinas (Gekeler *et al.*, 1988).

El mejoramiento de las técnicas de separación de MT, como cromatografía líquida de alta resolución y las técnicas de biología molecular, han introducido progresos en la detección y purificación de las MT. Estas proteínas no tienen función catalítica conocida y su cuantificación está basada en sus altos contenidos de metales pesados, mediante espectrofotometría de absorción atómica o por marcaje con radionucleótidos, y en la cantidad de la proteína misma. En éste último caso, los métodos de separación más comunes son las cromatografías de exclusión molecular e intercambio iónico, electroforesis en geles de poliacrilamida y HPLC. La absorción a 250 - 254 nm provee una estimación de contenido de proteínas en los eluatos de las columnas (absorción de uniones mercaptilo). En MT de mamíferos se han empleado anticuerpos poli y monoclonales en ensayos de inmunodifusión, inmunoelectroforesis y radioinmunoensayos (Hammer, 1986). Estos métodos son rápidos y particularmente útiles para detectar bajas concentraciones de MT y para estudios de localización intracelular por inmunofluorescencia (Bradly y Ward, 1989).

#### *Inducción, Síntesis y Regulación de MT*

Está bien establecido que el incremento en la síntesis de MT clases I y II por metales pesados es iniciada por inducción transcripcional (Hammer, 1986). La estructura y función de los genes que codifican para la posterior síntesis de estas MT, han sido objeto de muchos estudios a fin de obtener un modelo que explique la expresión genética en los organismos vivos. Estudios realizados con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Furst *et al.*, 1988) permitieron proponer un modelo según el cual, los metales pesados se unen a un factor de transcripción que conduce a un cambio conformacional. El complejo es luego competente para unirse al elemento apropiado en el gen de la MT. La transcripción resultante del ARNm sirve como base para incrementar la síntesis de MT, las cuales en su momento, unen a su estructura el exceso de metales pesados. Así, un incremento en la concentración de metales pesados a nivel celular resulta

en interacciones moleculares específicas que llevan al incremento de la síntesis de ligandos de alta afinidad que pueden interceptar efectivamente a los metales pesados. En mamíferos, las MT están codificadas por una familia genética que contiene tanto genes funcionales como pseudogenes no funcionales (Hammer, 1986). Estos genes incluyen tres (3) exones codificantes, interrumpidos por intrones, cuyas posiciones están altamente conservadas (Karin y Richards, 1982). Este arreglo de 3 exones codificantes ha sido reportado en otros organismos deuterostomados (Harlow *et al.*, 1989). Los protostomados estudiados hasta el momento, como *Drosophila melanogaster* (Maroni *et al.*, 1986), poseen dos de tales exones. La regulación transcripcional de las MT, está influenciada por varios factores, incluyendo metales pesados, hormonas e interferón, que interactúan con los elementos de unión en el gen.

En animales acuáticos, las secuencias de ADNc para MT han sido reportadas para dos especies de peces (Bonham *et al.*, 1987; Chan *et al.*, 1989), una de erizo (Nemer *et al.*, 1985) y ostras (Unger *et al.*, 1991). En la trucha arcoiris y en los erizos de mar, la caracterización molecular ha sido extendida al análisis de las secuencias reguladoras y a los componentes estructurales del gen para MT. Los elementos reguladores parecen estar muy conservados en ambas especies y parecen homólogos a los descritos en mamíferos (Roesijadi, 1992). Un gen de la trucha (MT-cloranfenicolacetiltransferasa) fue transfectado a una línea celular humana (HEPG2 hepatoblastoma) e inducida por Cd y Zn (Zafarullah *et al.*, 1989; Imbert *et al.*, 1989). Estas evidencias funcionales indican que existe la similitud de los elementos reguladores en los peces y el hombre, ya que muestran que el promotor para el gen de MT de la trucha responde a un factor de transcripción de las células humanas. La inducción de los ARNm de MT provenientes de células hepáticas de la trucha indica la presencia de elementos que responden a glicocorticoides en los promotores de los genes para MT (Olsson *et al.*, 1990). De acuerdo con lo antes dicho, la regulación de la síntesis de las MT clases I y II parece estar relacionada con la concentración de metales pesados en la célula, entre otros inductores citados.

En lo referente a la síntesis y regulación de las MT clase III, un grupo de evidencias experimentales indican que la biosíntesis de FQ tiene lugar a partir de reacciones anabólicas que ocurren en el citoplasma celular sin la participación directa de genes estructurales en

el núcleo. A este respecto pueden enumerarse: (1) la rápida detección de fitoquelatinas después de la adición del metal (Grill *et al.*, 1986, 1987; Delhaize *et al.*, 1989); (2) los enlaces  $\gamma$ -carboxiamina en las fitoquelatinas, no sintetizados en los ribosomas (Robinson *et al.*, 1988; Robinson, 1989); (3) las secuencias sintéticas de los desoxirribonucleótidos que codifican el sitio de unión del metal no se hibridaron con ARNm proveniente de células de *Datura innoxia* creciendo en exceso de Cd (Delhaize *et al.*, 1989; Rauser, 1990); (4) no existe el triplete codificado para el aminoácido  $\beta$ -alanina, presente en las homo-fitoquelatinas (Grill *et al.*, 1986); (5) la adición de cicloheximida, inhibidor de la síntesis de proteínas, permite la inducción considerable de fitoquelatinas por el ion  $Cd^{2+}$  (Scheeler *et al.*, 1987; Robinson *et al.*, 1988), como si la síntesis de estos polipéptidos no dependiese, al menos al principio, de la síntesis de proteínas nuevas o síntesis *de novo*.

#### Funciones de las MT:

##### Homeostasis y Depuración

Son muchas las evidencias reseñadas en la literatura sobre la capacidad de las metalotioninas descritas en animales para depurar metales pesados en estos organismos (Beach y Palmiter, 1981; Crawford *et al.*, 1985; Hammer, 1986). Sin embargo, el papel primario de este tipo de metalotioninas parece estar relacionado con el mantenimiento del balance de metales esenciales a niveles normales en la célula (Udom y Brady, 1980; Beltramini y Lerch, 1982). Las metalotioninas clases I y II también parecen estar relacionadas con la adaptación celular a diversos tipos de "stress", como protección contra daños por radiaciones ultravioleta y rayos X, entre otras. Así pues, se puede concluir que estas metalotioninas están involucradas en un complejo arreglo de interacciones para el control del metabolismo y la adaptación al "stress" a nivel celular (Karin, 1985). Dado el complejo papel que desempeñan las metalotioninas descritas en animales, se podría predecir que todos los organismos eucariotes (y quizás también los procariotes) podrían requerir de esta molécula fundamental. Si estas proteínas modulan el metabolismo celular en su papel de proveedores de metales esenciales como se ha sugerido, seguramente los organismos autótrofos también deben necesitar una molécula que realice funciones similares. En efecto, el estudio de las funciones primordiales de las metalotioninas clase III ha sido objeto de interés en recientes investigaciones recopiladas por Tomsett y Thurman (1988), Robinson

(1989), Rauser (1990) y Steffens (1990), entre otros autores.

En general, la utilización de metales pesados como cofactores en reacciones bioquímicas y la asociación de la toxicidad de estos elementos con S, N y O, ligandos predominantes en estructuras biomoleculares (Niebohr y Richardson, 1980), representan aspectos duales de las interacciones biológicas con los metales pesados. Los mecanismos que regulan la disponibilidad intracelular de metales pesados y que protegen a las células contra interacciones inapropiadas y potencialmente dañinas podrían ser ventajosas para funciones bioquímicas eficientes. Las MT funcionan como dadores de Zn ó Cu a las metaloproteínas (Udom y Brady, 1980; Brouwer *et al.*, 1989; Churichich *et al.*, 1989) y son inducidas por la presencia en exceso de estos metales. Los metales pesados no esenciales, con funciones biológicas desconocidas (Cd, Hg), se unen a las MT en lo que representa una función de quelación asociada con la protección contra la toxicidad del metal pesado. Así, las MT han sido descritas como proteínas sintetizadas a niveles basales y han sido involucradas en la depuración de metales pesados no esenciales (Hammer, 1986). Estas proteínas están influenciadas por procesos endógenos asociados con el metabolismo y los procesos reproductivos. Además están asociadas con el funcionamiento normal del organismo o con la respuesta al estrés por metales pesados.

En lo que se refiere a MT clase III, las evidencias experimentales encontradas corresponden a estudios realizados con plantas superiores; nada se ha reportado en especies autótrofas acuáticas en relación con sus funciones. En plantas superiores, las evidencias indican que las fitoquelatinas podrían estar involucradas en el mantenimiento del balance de metales pesados esenciales (Cu, Zn) en las células; en el transporte de formas reducidas del azufre asimilado; en la depuración de los metales pesados presentes en exceso; y en este sentido, las FQ podrían estar relacionadas con la tolerancia de las especies autótrofas a concentraciones crónicas de estos contaminantes (Steffens *et al.*, 1986; Tomsett y Thurman, 1988; Gupta y Goldsbrough, 1990; de Knecht *et al.*, 1992).

##### Proteínas Enlazadoras de Metales Pesados

En general, todas las metalotioninas se caracterizan por presentar bajos pesos moleculares. En organismos autótrofos los valores reportados para algunas metalotioninas clase III son

de 8,5 KD para *Chlorella ellipsoidea* (Nagano *et al.*, 1984), 10 KD para *Lycopersicon esculentum* (Bartolf *et al.*, 1980), *Nicotiana glauca* y *Brassica capitata* (Wagner y Trotter, 1984) y 13,8 KD para *Glycine max* (Carterline y Yip, 1975), entre otras especies estudiadas. Sin embargo, algunos autores han reportado la presencia de péptidos con pesos moleculares superiores a los característicos de las metalotioninas, que igualmente son sintetizadas en respuesta a los metales pesados (Stone y Overnell, 1985). A estas proteínas se les denomina "peptidos enlazadores de metales", incluye las proteínas reportadas en *Euglena gracilis* (> 100 KD; Albergoni *et al.*, 1980), *Escherichia coli* (39 KD; Khzaeli y Mitra, 1981), *Crassostrea virginica* y *C. gigas* (20-70 KD; Siewicki *et al.*, 1983), *Carcinus maenas* (27 KD; Rainbow y Scott, 1979).

En nuestro laboratorio trabajamos con el alga unicelular marina *Acetabularia calyculus* con el fin de analizar los cambios en los patrones de síntesis proteica del alga en presencia de Hg. Las fracciones proteicas citoplasmáticas de las algas tratadas con HgCl<sub>2</sub> (10 ppm, 3 días) y analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida, revelaron la presencia de un polipéptido con peso molecular aparente de 27 KD, el cual no estuvo presente en las algas control (García y Reyes, 1996). Estudios de separación y caracterización de este polipéptido permiten concluir que las proteínas inducidas por el mercurio, unen el metal a su estructura molecular y que la síntesis de las mismas no está asociada directamente con el núcleo celular (García y Reyes, 1998).

### Proteínas de Estrés (PE)

La síntesis de metabolitos o proteínas de estrés (PE) ha sido descrita como un mecanismo de tolerancia importante ante la contaminación por metales pesados en organismos acuáticos (Sanders, 1993; Hightower, 1993). En general, está bien documentado el hecho según el cual los organismos vivos alteran sus patrones de expresión genética cuando son expuestos a altas temperaturas subletales (Linguist y Craig, 1988; Sanders, 1988) y a otros elementos de estrés como algunos metales pesados (Steinert y Pickwell, 1993; Barque *et al.*, 1994; Sanders *et al.*, 1994). La perturbación celular se traduce en la aparición de proteínas de estrés y la supresión, al menos en parte, de la síntesis de proteínas normales. Bajo tales condiciones, los organismos pueden tolerar la perturbación, como resultado de la inducción de las proteínas de estrés.

Los estudios realizados con proteínas de choque térmico indican una alta homología entre organismos eucariotes y en algunos procariotes (Linguist, 1986). La conservación evolutiva de estos genes sugiere que la producción de las proteínas de estrés constituyen un mecanismo fundamental para la protección de la célula ante perturbaciones externas (Vierling, 1991).

La síntesis de PE es inducida por un conjunto de estresores ambientales, que además de las altas temperaturas y los metales pesados, incluyen pesticidas, compuestos teratogénicos y radiación ultravioleta, entre otros (Sanders, 1993). Las características específicas de la respuesta al estresor, tales como la rapidez de la misma, el nivel de inducción y los tejidos afectados, parecen no ser específicas para el contaminante y probablemente son consecuencia del mecanismo de toxicidad de cada compuesto.

Recientemente las PE han sido propuestas como biomarcadores moleculares generales de la contaminación química en labores de monitoreo ambiental (Sanders y Dyer, 1994; Sanders, 1993; Hightower, 1993; Bucheli y Fent, 1995; Livingstone, 1993; Melacon, 1995). Aunque esta propuesta se encuentra en su fase inicial, muchos de los resultados que se presentan a continuación son prometedores. Varias investigaciones muestran la inducción de PE específicas en peces (Dyer *et al.*, 1993) o líneas celulares de peces (Hightower, 1980; Heikkila *et al.*, 1982; Ryan y Hightower, 1994) después de la exposición a Cd, Zn, Cr, As o compuestos orgánicos. Varios metales pesados fueron reportados como inductores de PE en nemátodos (Stringham y Candido, 1994). El tributil estaño (TBT) conocido inhibidor del sistema de Monooxigenasas de Función Mixta (MFO), induce ciertas PE en rotíferos (Cochrance *et al.*, 1991) y moluscos bivalvos (Steinert y Pickwell, 1993). La acumulación de PE fue observada en tejidos específicos (Sanders *et al.*, 1994; Stringham y Candido, 1994). Es conocido que la inducción de PE ocurre a concentraciones a las cuales no se observan otros efectos adversos (Sanders *et al.*, 1991) y que precede al encendido de reacciones a mayores niveles de organización biológica (Goering *et al.*, 1993). Así, estos biomarcadores pueden ser muy sensibles y exhibir una respuesta rápida. Las preguntas sobre especificidad de las PE a un xenobiótico y sobre la relevancia ecológica de la respuesta, están, sin embargo, sin respuestas y podrían estar sujetas a investigaciones futuras.

Las aplicaciones de estos biomarcadores en trabajos de campo son escasas, pero un número creciente de

laboratorios se están involucrando en este campo de investigación. Anfípodos, bivalvos y peces de sitios contaminados mostraron niveles elevados de PE (Sanders *et al.*, 1994) y la transferencia de bivalvos a áreas contaminadas indujo un cambio en los patrones de síntesis (Veldhuizer *et al.*, 1991).

### Conclusiones

La primera respuesta de los organismos a los contaminantes ocurre a nivel molecular. La detección de esta primera respuesta puede ser muy útil en labores de monitoreo ambiental ya que ocurre rápidamente y es reversible, en tanto que las respuestas a niveles de organización biológica más complejas suelen ser detectadas tras lapsos relativamente largos y suelen resultar en efectos irreversibles. La aplicación de estas respuestas moleculares como biomarcadores de contaminación está, sin embargo, condicionada a la disponibilidad comercial de productos tecnológicos de bajo costo que simplifiquen y agilicen la detección de estos biomarcadores en el laboratorio y en condiciones de campo.

Toda la evidencia experimental revisada lleva a concluir que la exposición a metales pesados induce la expresión de proteínas, como las metalotioninas, que unen metales en su estructura molecular y pueden considerarse como Biomarcadores Moleculares Específicos. Por el contrario, la expresión de proteínas de estrés, los cambios en la actividad de las enzimas del sistema oxidativo celular y alteración de la inmunidad de los organismos, son respuestas moleculares inducidas por un amplio grupo de contaminantes, incluyendo los metales pesados, y son por tanto consideradas como Biomarcadores Moleculares Generales.

### REFERENCIAS

- Albergoni V, E Piccini y O Coppelotti (1980): Response to heavy metals in organisms I. Excretion and accumulation of physiological and non physiological metal in *Euglena gracilis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 67: 121-127.
- Barque J, H Chacum, S Marouby y J Bonaly (1994): Cadmium resistance of achlorophyllous *Euglena gracilis* cells: constitutive overexpression of two heat - shock protein. *Biochem. Biophys. Res. Commu.* 203 (1): 540-544.
- Bartolf M, E Brennau y C Price (1980): Partial characterization of a cadmium-binding protein from the roots of cadmium treated tomato. *Plant Physiol.* 66: 438-441.

- Beach L y R Palmiter (1981): Amplification of the metallothionein I gene in cadmium - resistant mouse cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 78: 2110-2114.
- Beltrami M y K Lerch (1982): Copper transfer between *Neurospora* copper metallothionein and type 3 copper apoproteins. *Febs. Lett.* 142: 219-222.
- Bonham K, M Zafarulla y L Gedamu (1987): The rainbow trout metallothioneins: Molecular cloning and characterization of two distinct cDNA sequences. *DNA* 6: 519-528.
- Bouqueneau J, C Gerday y A Disteché (1975): Fish mercury-binding thionein related to adaptation mechanisms. *Febs Lett.* 55: 173-177.
- Bradly B y J Ward (1989): Detection of a major stress protein using a peptide antibody. *Mar. Env. Res.* 28: 471-475.
- Brouwer M, D Winge y W Gray (1989): Structural and functional diversity of copper-metallothioneins from the american lobster *Homarus americanus*. *J. Inorg. Biochem.* 35: 289-303.
- Bucheli T y K Fent (1995): Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contaminations. *Crit. Rev. Env. Sci y Tech.* 25 (3): 201-268.
- Butt T, E Sternberg, J Gorman, P Clark, D Hamer, M Rosenberg y S Crooke (1984): Copper metallothionein of yeast, structure of the gene, and regulation of expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 3332-3336.
- Casterline J y G Yip (1975): The distribution and binding of cadmium in oyster, soybean, and rat liver and kidney. *Arch. Env. Cont. Tox.* 3: 319-329.
- Chan K, W Davidson, C Hew y G Fletcher (1989): Molecular cloning of metallothionein cDNA and analysis of metallothionein expression in winter flounder tissues. *Can. J. Zool.* 67: 2520-2527.
- Chen S, L Fitzpatrick, A Goven, B Venables y E Cooper (1991): Nitroblue tetrazolium dye reduction by earthworm (*Lumbricus terrestris*) coelomocytes: An enzyme assay for nonspecific immunotoxicity of xenobiotics. *Env. Tox. Chem.* 10: 1037-1991.
- Churchich J, G Scholz y F Kwok (1989): Activation of pyridoxal kinase by MT. *Biochim. Biophys. Acta* 996: 181-186.
- Cochrace B, R Irby y T Snell (1991): Effects of Cu and tributyltin on stress protein abundance in the rotifer *Brachionus picalilis*. *Comp. Bioch. Physiol.* 98C: 385-391.
- Crawford B, M Enger y B Griffith (1985): Coordinate amplification to metallothionein I and II genes in cadmium - resistant chinese hamster cells. *Mol. Cell Biol.* 5: 320-329.
- De Knecht J, P Koevoets, J Verkleij y W Ernst (1992): Evidence against a role for phytochelatin in naturally selected increased cadmium tolerance in *Silene vulgaris*. *New Phytol.* 122: 681-688.
- Delhaize E, P Jackson, L Lujan y N Robinson (1989): Poly ( $\gamma$  - glutamylcysteinyl) glycine synthesis in *Datura innoxia* and binding with cadmium. *Plant Physiol.* 89: 700-706.
- Dyer S, G Brooks, K Dickson, B Sanders y E Zimmerman (1993): Synthesis and accumulation of stress protein in tissues of arsenite-exposed fathead minnows. *Env. Tox. Chem.* 12: 913-924.
- Fowler B, C Hildebrand, Y Kojima y M Webb (1987): Nomenclature of metallothionein. *Experientia.* 52: 19-61, 1987.
- Furst P, S Hu y R Hackett (1988): Copper activates MT gene transcription by altering the conformation of a specific DNA binding protein. *Cell* 55: 705-717.
- García E (1993): The ability of the unicellular giant alga *Acetabularia sp* to bioconcentrate aquatic mercury in whole and anucleated cells. *Tox. Env. Chem.* 39: 29-35.
- García E y R Reyes (1996): Bioconcentration of mercury in *Acetabularia calyculus*: Evidence of a polypeptide in whole cells and anucleated cells. *Tox. Env. Chem.* 55: 11-18.
- García E y R Reyes (1998): Induction of mercury-binding peptides in whole cells and anucleated cells of *Acetabularia calyculus*. *Tox. Env. Chem.* 67: 189-196.
- Gekeler W, E Grill, E Ludwig y M Zenk (1988): Algae sequester heavy metals via synthesis of phytochelatin complexes. *Arch. Microbiol.* 150: 197-202.
- George S, M Leaver, N Frerichs y D Burgess (1989): Fish metallothionein: molecular cloning studies and induction in cultured cells. *Mar. Env. Res.* 28: 173-177.
- Goering P, B Fisher y C Kish (1993): Stress protein synthesis induced in rat liver by Cd precedes hepatotoxicity. *Tox. Appl. Pharmacol.* 122-139.
- Grill E, W Gekeler, E Winnacker y H Zenk (1986): Homo - phytochelatin are heavy metal - binding peptides of homo - glutathione containing fabales. *FEBS Lett.* 205: 47-50.
- Grill E, E Winnacker y M Zenk (1987): Phytochelatin, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 439-443.
- Gupta S y P Goldsbrough (1990): Phytochelatin accumulation and stress tolerance in tomato cells exposed to cadmium. *Plant Cell Reports.* 9: 466-469.
- Hammer D (1986): Metallothioneins *Ann. Rev. Biochem.* 55: 913-951.
- Harlow P, E Watkins, R Thornton y M Nemer (1989): Structure of an ectodermally expressed sea urchin MT gene and characterization at its metal - responsive region. *Mol. Cell. Biol.* 9: 5445-5455.
- Hart B y P Bertram (1980): A cadmium - binding protein in a cadmium tolerant strain of *Chlorella pyrenoidosa*. *Env. Exp. Bot.* 20: 175-180.
- Heikkilä J, G Schultz, K Iatrou y L Gedamu (1982): Expression of a set of fish genes following heat or metal ion exposure. *J. Biol. Chem.* 257 (20): 12000-12005.
- Hightower L (1980): Cultured animal cells exposed to amino acid analogues or puromycin rapidly synthesize several polypeptides. *J. Cell. Physiol.* 102: 407-412.
- Hightower L (1993): A brief perspective on the heat - shock response and stress proteins. *Mar. Env. Res.* 35: 79-83.
- Imagawa M, T Onozawa, K Okumura, S Osada, T Nishimura y M Kondo (1990): Characterization of metallothionein cDNA induced by cadmium in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. J.* 268: 237-240, 1990.
- Imbert J, M Zafarullah, V Cullota y D Hamer (1989): Transcription factor MBF-1 interacts with metal regulatory elements of higher eucaryotic MT genes. *Mol. Cell. Biol.* 9: 5315-5323.
- Johansson M y A Larsson (1979): Effects of inorganic lead on delta-aminolevulinic acid dehydratase activity in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Arch. Env. Cont. Tox.* 8: 419.
- Kagi J y B Vallee (1960): Metallothionein: A cadmium - and zinc containing protein from equine renal cortex. *J. Biol. Chem.* 235: 3460-3465.
- Karin M (1985): Metallothioneins: Proteins in search of function. *Cell* 41: 9-10.
- Karin M y R Richards (1982): Human metallothionein genes: molecular cloning and sequence analysis of the mRNA. *Nucleic Acids Res.* 10: 3163-3165.
- Kehser J, B Mossman, A Sevanian, M Trush y M Smith (1988): Free radical mechanisms in chemical pathogenesis. *Tox. Appl. Pharm.* 95: 349.
- Khazaeli M y R Mitra (1981): Cadmium-binding component in *Escherichia coli* during accommodation to low levels of this ion. *Appl. Env. Microbiol.* 41: 46-50.
- Kojima Y (1991): Definitions and nomenclature of metallothionein. *Met. Enz.* 205: 8-10.
- Lerch K, D Ammer y R Olafson (1982): Crab metallothionein: Primary structures of metallothionein 1 and 2. *J. Biol. Chem.* 257: 2420-2426.
- Linquist S (1986): The heat shock response. *Annu. Rev. Biochem.* 45: 39-72.
- Linquist S y E Craig (1988): The heat shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 22: 631-677.
- Livingstone D (1993): Biotechnology and pollution monitoring: Use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 57: 195-211.
- Mackay E, J Overnell, B Dunbar, I Davidson, P Hunziker, J Kagi y J Fortherrgill (1990): Polymorphism of cadmium-induced mussel metallothionein. *Experientia* 46: A36.
- Marfante E (1976): Binding of mercury and zinc to cadmium-binding protein in liver and kidney of goldfish (*Carassius auratus* L.) *Experientia* 32: 149-150.
- Maroni G, E Otto y D Lastowski (1986): Molecular and cytogenetic characterization of a metallothionein gene of *Drosophila*. *Genetic* 112: 493-504.
- Melacon M (1995): Bioindicators used in aquatic and terrestrial monitoring. En: *Handbook of Ecotoxicology*. Lewis Publisher. Boca Ratón. CRC. Press. Inc. 755 p.
- Munger K, U Germann y K Lerch (1987): The *Neurospora crassa* metallothionein gene. *J. Biol. Chem.* 262: 7363-7367.
- Nagano T, M Miwa, Y Suketa y S Okada (1984): Isolation, physicochemical properties and amino acid composition of a cadmium - binding protein from cadmium - treated *Chlorella ellipsoidea*. *J. Inorg. Biochem.* 21: 61-71.
- Nemer M, D Wilkinson, E Travaglini, E Sternberg y T Butt (1985): Sea urchin metallothionein sequence: Key to an evolutionary diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 4991-4994.
- Neumann D, O Lichtenberg, D Gunther, K Tschiersch y L Nover (1994): Heat - shock proteins induce heavy - metal tolerance in higher plants. *Planta* 194: 360-367.
- Niebohr E y D Richardson (1980): The replacement of the nondescript term (heavy metals) by a biologically and chemically significant

- classification of metal ions. *Env. Pollut. 1*: 3-26.
- Noel F (1976): Distribution of cadmium, zinc and copper in the mussel *Mytilus edulis*. Existence of cadmium - binding proteins. *Experientia* 32: 324-326.
- Olafson R y J Thompson (1974): Isolation of heavy metal binding proteins from marine vertebrates. *Mar. Biol.* 28: 83-86.
- Olsson P, M Zafarullah, R Foster y L Gedamu (1990): Developmental regulation of MT - mRNA, Zn and Cu levels in rainbow trout. *Eur. J. Biochem.* 193: 229-235.
- Payne J, L Fancey, A Rahimtula y E Porter (1987): Review and perspective on the use of mixed - function oxygenase enzymes in biological monitoring. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 86: 233.
- Rainbow P y A Scott (1979): Two heavy metal-binding proteins in the midgut gland of the crab *Carcinus maenas*. *Mar. Biol.* 55: 143-150.
- Rausser W (1990): Phytochelatin. *Ann. Rev. Biochem.* 59: 61-86.
- Rausser W, R Schupp y H Rennenberg (1991): Cysteine,  $\gamma$ -glutamylcysteine, and glutathione levels in maize seedlings. *Plant Physiol.* 97: 128-138.
- Robinson, N (1989): Algal metallothioneins: Secondary metabolites and proteins. *J. Appl. Phycol.* 1: 5-18.
- Robinson N, R Ratliff, P Anderson, E Delhaize, J Berger y P Jackson (1988): Biosynthesis of poly ( $\gamma$ -glutamylcysteinyl) glycines in cadmium-tolerant *Datura innoxia* (Mill.) cells. *Plant Science* 56: 197-204.
- Roesijadi G (1992): Metallothionein in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquat. Tox.* 22 (2): 81-114.
- Ryan J y L Hightower (1994): Evaluation of heavy-metals ion toxicity in fish cells using a combined stress protein and cytotoxicity assay. *Env. Tox. Chem.* 13: 1231-1237.
- Sanders B (1988): The role of the stress proteins response in physiological adaptation of marine molluscs. *Mar. Env. Res.* 24: 207-210.
- Sanders B (1993): Stress proteins in aquatic organisms: environmental perspective. *Crit. Rev. Tox.* 23 (1): 49-75.
- Sanders B y S Dyer (1994): Cellular stress response. *Env. Tox. Chem.* 13: 1209-1212.
- Sanders B, L Martin, W Nelson, D Phep y W Welch (1991): Relationship between accumulation of a 60 KDa stress protein and scope-for-growth in *Mytilus edulis* exposed to a range of copper concentrations. *Mar. Env. Res.* 31: 81-97.
- Sanders B, L Martin, S Howe, W Nelson, E Hegre y D Phelps (1994): Tissue specific differences in accumulation of stress protein in *Mytilus edulis* exposed to a range of copper concentration. *Tox. App. Pharmacol.* 125: 206-213.
- Scheller H, B Huang, E Hatch y P Goldsbrough (1987): Phytochelatin synthesis and glutathione levels in response to heavy metals in tomato cells. *Plant Physiol.* 85: 1031-1035.
- Scheuhammer A (1987): Erythrocyte delta-aminolevalinic acid dehydratase in birds. I the effects of lead and other metals in vitro. *Toxicology* 45: 155.
- Siewicki T, J Sydlowski y E Webb (1983): The nature of cadmium binding in commercial eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Arch. Env. Cont. Toxicol.* 12: 299-304.
- Simkiss K y M Taylor (1989): Convergence of cellular systems of metal detoxification. *Mar. Env. Res.* 28: 211-214.
- Steffens J, D Hunt y B Williams (1986): Accumulation of non- protein metal binding polypeptides ( $\gamma$ -glutamyl-cysteinyl) n-glycine in selected cadmium- resistant tomato cells. *J. Biol. Chem.* 261: 13879-13882.
- Steffens J (1990): The heavy metal- binding peptides of plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. y Plant Mol. Biol.* 41: 553-575.
- Steinert S y G Pickwell (1993): Induction of HSP70 proteins in mussels by ingestion of tributyltin. *Mar. Env. Res.* 35: 89-93.
- Stone H y J Overnell (1985): Non - metallothionein cadmium binding proteins. *Comp. Biochem. Physiol.* 80c: 9-14.
- Stringham E y E Candido (1994): Transgenic HSP16 - lacZ strains of the soil nematode *Caenorhabditis elegans* as biological monitors of environmental stress. *Env. Tox. Chem.* 13: 1211-1217.
- Tomsett A y D Thurman (1988): Molecular biology of metal tolerances of plants. *Plant Cell y Env.* 11: 383-394.
- Tukendorf A y W Rausser (1990): Changes in glutathione and phytochelatin in roots of maize seedlings exposed to cadmium. *Plant Science* 70: 155-166.
- Udom A y F Brady (1980): Reactivation in vitro of zinc - requiring apoenzymes by rat liver zinc - thionein. *Biochem. J.* 187: 329-335.
- Unger M, T Chem, C Fenselau, C Murphy, M Vestling y G Roesijadi (1991): Primary structure of a molluscan metallothionein deduced from molecular cloning and tandem mass spectrometry. *Biochem. Biophys. Acta.* 1074: 371-377.
- Vallee B y D Ulmer (1972): Biochemical effects of mercury, cadmium, and lead. *Ann. Rev. Biochem.* 41: 91-127.
- Veldhuizer M, D Holwerda, A Bont, A Smaal y D Zandee (1991): A field study on stress indices in the sea mussel, *Mytilus edulis*: Application of the "Stress approach" in biomonitoring. *Arch. Env. Cont. Tox.* 21: 497-504.
- Viarengo A (1989): Heavy metals in marine invertebrates: Mechanisms of regulation a toxicity at the cellular level. *Aquat. Sci.* 1: 295-317.
- Viarengo A y J Nott (1993): Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* 104C: 355-372.
- Vierling E (1991): The role of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 519-620.
- Visviki I y W Rachlin (1994a): Acute and chronic exposure of *Dunaliella salina* and *Chlamydomonas bullosa* to copper and cadmium effects on growth. *Arch. Env. Comp. Toxicol.* 26: 149-153.
- Visviki I y W Rachlin (1994 b): Acute and chronic exposure of *Dunaliella salina* and *Chlamydomonas bullosa* to copper and cadmium effects on ultrastructure. *Arch. Env. Comp. Toxicol.* 26: 154-162.
- Wagner G y M Trotter (1982): Inducible cadmium-binding complexes of cabbage and tobacco *Plant Physiol.* 69: 804-809.
- Weber D, C Shaw y D Petering (1987): *Euglena gracilis* cadmium-binding protein (II) contains sulfide ion. *J. Biol. Chem.* 262 (15): 6962-6964.
- Wilkinson D y M Nemer (1987): Metallothionein genes MTa and MTb expressed under distinct quantitative and tissue specific regulation in sea urchin embryos. *Mol. Cell Biol.* 7: 48-58.
- Zafarullah M, P Olsson y L Gedamu (1989): Endogenous and heavy metal-induced metallothionein gene expression in salmonid tissues and cell lines. *Gene* 83: 85-93.