



ZIENTZIA ETA TEKNOLOGIA FAKULTATEA. LEIOA

GRADU AMAIERAKO LANA

BIOTEKNOLOGIA

METALOTIONEINEN MAILAK ETA
METALEN BANAKETA Ag ETA Cu PEAN
MANTENDUTAKO OSTRETAN

Ikaslea: *Peña Cearra, Ainize*

Data: Iraila, 2014

Zuzendaria
Dr. Beñat Zaldibar Aramburu

Ikasturte akademikoa
2013/14

AURKIBIDEA

I. LABURPENA	II
1. SARRERA	1
1.1 OSTRAK.....	3
1.1.1 Digestio-guruinaren histologia.....	4
1.2 METAL ASTUNAK.....	5
1.2.1 Cu eta Ag ingurumenean	5
1.2.1.1 Zilarra (Ag)	5
1.2.1.2 Kobrea (Cu)	6
1.2.2 Metal astunak ostretan	7
1.2.2.1 Metalen xurgapen zelularra	7
1.2.2.2 Metalen garraioa ehunetan eta odolean zehar.....	7
1.3 BIOMARKATZAILEAK.....	11
1.3.1 Metalotioneinak (MT).....	12
1.3.2 Autometalografia eta zilarraren bidezko metalen detekzioa.....	14
2. HIPOTESIA ETA HELBURUAK	16
2.1 HIPOTESIA.....	16
2.2 HELBURUAK.....	16
3. MATERIALAK ETA METODOAK	17
3.1 DISEINU ESPERIMENTALA	17
3.2 METALOTIONEINEN KOPURUAREN NEURKETA	19
3.3 METALEN DETEKZIOA AUTOMETALOGRAFIAREN BITARTEZ..	21
3.4 ANALISI ESTADISTIKOAK	22
4. EMAITZAK	23
4.1 METALOTIONEINAK.....	23
4.2 AUTOMETALOGRAFIA.....	26
5. EZTABAIDA	29
5.1 METALOTIONEINAK.....	29
5.2 AUTOMETALOGRAFIA.....	32
6. ONDORIOAK	34
7. BIBLIOGRAFIA	35

I. LABURPENA

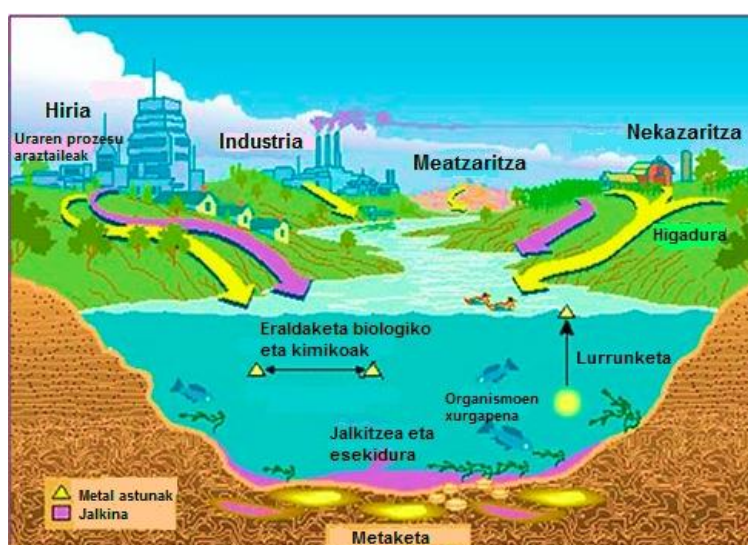
Ikerlan hau itsasoaren kutsaduran zentratzen da, itsasoak arriskutsuak eta kaltegarriak diren substantziak jasotzen dituelako, bai ibaietako ekarpenarengatik, baita zuzeneko karguetatik. Organismo behale gisa ostrak erabiliko dira, izaki iragazleak izanik elikagaien irenstearen ondorioz medio urtsutik kutsatzaileak metatzen dituztelako eta gainera, ingurugiroan dauden mailen gainetik kontzentratzen dituztelako. Ostretan zilarra (Ag) eta kobrea (Cu) bezalako metalen eragina aztertuko da, horretarako, metalen aurreko esposizio biomarkatzaileak erabiliko dira. Besteak beste, autometalografia erabiliko da metalen mailak eta banaketa ostren ehunetan neurtzeko eta metalotioneinen mailak ere neurtzeko dira. Ostrek metalekiko izan duten esposizio denborak 0, 6, 7, 13 eta 14 egunetakoak izan dira, bai itsasoko eta bai estuarioko uretan mantenduz. Emaitzak ikusita behatu da estuarioko laginek, normalean, metal kontzentrazio baxuagoak aurkezten dituztela, eta zenbait kasutan kontrolek metalen pean jarritako laginak baino metal kontzentrazio handiagoak erakutsi dituzte aste bat igaro eta gero. Bigarren astean, metal mailen jaitsiera bat behatu da. Beste alde batetik, metalotioneinetan neurtutako indukzio mailak oso baxuak izan dira. Metalen distribuzioa ehun desberdinetan aldeztatik beste molusku batzuetan deskribatutakoen oso antzekoa izan da ostretan.

Gako-hitzak: Ostrak, zilarra, kobrea, digestio-guruina, metalotioneinak, autometalografia.

1. SARRERA

Ingurugiro-kutsadura terminoak airea, ura eta lurzoruetako kutsadurak barne hartzen ditu. Ikerlan hau itsasoaren kutsaduran zentratzen da. Itsasoak arriskutsuak eta kaltegarriak diren substantziak jasotzen ditu, bai ibaietako ekarpenarengatik, baita zuzeneko karguetatik, hala nola, atmosferatik depositzioa. Itsas kutsadura honela definitu daiteke: “Energiadun substantziak gizakiaren jarduerengatik itsasora isurtzea, modu zuzenean zein zeharka, gizakiaren osasunean, baliabide bizidunetan eta ekosistema itsastarretan kaltegarriak direnak, instalazioak kaltetuz edo itsasoaren beste erabilera legitimoak oztopatuz” (OSPAR batzordea 2000).

Azken urteotan, kutsatzaileen mailak itsasoan aktibitate antropogenikoei esker igo dira. Hala ere, kutsadura eragiten duten faktore naturalak ere badaude, besteak beste, ingurugiro-istripuak eta fenomenoak, adibidez, euri-tanten bidez ibai edo itsasora arrastatutako partikula solidoak eta gas atmosferikoak. Itsas kutsaduraren iturri nagusiak tokian tokiko kutsadura, industrian eta nekazaritzan sortutako hondakinak, hondakin-urak, fuel olioaren, gasa eta solido mineralen ustiapena, turismoa, itsasogarraioa, ustekabeko fuel olioaren isurketak eta legarra eta harearen ustiapena dira (1. irudia) (Zorita, 2006). Gizakiaren jardueren ondorioz itsasoan agertzen diren kutsatzaileak honako hiru taldeetan banatu daitezke: hidrokarburo halogenatuak, hidrokarburo ez-halogenatuak eta metalak, azken hauek lan honetan landuko dira.



1. irudia. Metalen eta hondakinen isurketa uretan sektore ezberdinengatik (Corina, 2012-tik moldatuta).

Kutsatzaileek ingurugiroan kaltea eragiten dute. Besteak beste, itsasoan dauden komunitateen egitura eta funtzioa aldatu dezakete, ugalketa geldiaraziz edo portaera aldatuz. Gainera, maila molekularrean ere eragin dezakete, minbiziak eta mutazioak sortuz edo sistema endokrinoan aldaketak sortuz (GESAMP 2001). Baina kutsatzaileek ez dute soilik itsasoko organismoei eragiten, elikadura-katearen ondorioz, gizakiek hauek jaten dituzte eta kutsadura jasotzen dute.

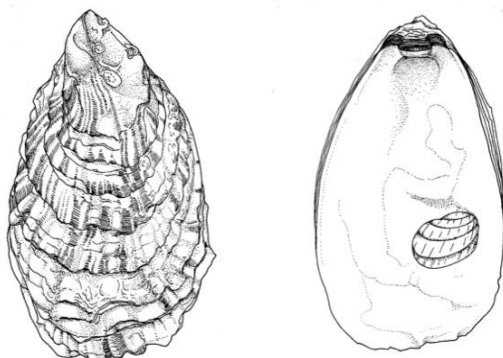
Osasun arriskua ebaluatzeko itsasoko organismoen erabilera egokiena da, organismo mailako erantzunek denboran eta espazioan zeharreko kutsatzaileen kontzentrazio erlatiboaren eta bioeskuragarritasunaren informazioa barne hartzen dutelako (McCarthy eta Shugart, 1990). Normalean, organismo behale gisa moluskuak erabiltzen dira, eta beraien artean muskuiluak eta ostrak dira erabilienak. Moluskuen erabilpena, bereziki bibalbioena, oso interesgarria da, izaki iragazleak izanik elikagaien irenstearen ondorioz medio urtsutik kutsatzaileak metatzen dituztelako eta gainera, ingurugiroan dauden mailen gainetik kontzentratzen dituztelako.

Biomarkatzaileak, antolaketa biologikoko maila baxuenetan (molekularra eta zelularra) ematen diren aldaketak dira, eta beraz maila altuagoetan (populazio edo ekosistema) eman daitezkeen aldaketak aurrerako tresna baliagarriak dira (Cajaraville *et al.*, 1998). Ikerlan honetan metalen aurreko esposizio biomarkatzaileak erabiliko dira zilarra eta kobrea bezalako metalen eragina aztertzeko bai estuarioko eta bai itsasoko giroan mantendutako ostretan. Besteak beste, autometalografia erabiliko da metalen mailak eta banaketa ostren ehunetan neurtzeko eta metalotioneinen mailak ere neurtuko dira.

1.1 OSTRAK

Ostrak *Ostrea* molusku bibalbio itsastarren generoa, Ostreoida ordenekoa, eta Ostreidae familiaren barruan sailkatzen da. Ostren espezie desberdinen artean lan honetan erabiliko dena *Crassostrea gigas* (*C. Gigas*) da. *C.gigas* berez ozeano Bareko kostalde Asiatikoetakoa da, baina gaur egun munduko beste zonalde ezberdinetara barreiatu da.

Ostrea generoko moluskuak itsatsi egiten diren bi maskor obal erdizirkular dituzte, hau da, eskuinekoa eta ezkerrekoa. Maskor hauek irregularrak dira eta lotailuaren bidez elkartuta daude. Maskorrak lehen esan bezala ezberdinak dira, ezkerreko maskorra (edo behekoa) ahurra da, hau da, gehienetan sakona da, eta maskor honen bidez substratuarekin finkatzen da eta eskuinekoa (edo goikoa, 2. irudia) lauagoa da, protuberantzia txikia dauka gontzetik gertu eta estalki funtzioa betetzen du. Nahiz eta ostra espezie ezberdinetan maskorrek aldakortasuna handia izan, zenbait ezaugarri konstanteak dira (Galtsoff, 1964).



2. irudia: *C. Gigas* ostra espeziearen maskorrak. Gutxi-gorabehera 14 cm-ko luzera eta 9 cm-ko zabalera dute. Ezkerraldean dagoen maskorra goiko maskorraren kanpoko partea da eta eskuinaldean dagoena goiko maskorraren barruko partea da (Galtsoff, 1964).

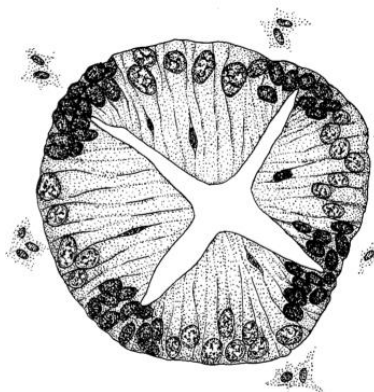
Arnasketa zakatzen bidez gertatzen da, ostrek oxigenoa finkatzen dute eta mediora karbono dioxido gasa isurtzen dute. Bestalde, ostretan bi ugalketa-sistema daude: espezie ez-inkubatzaileak edo obiparoak eta inkubatzaileak edo larbiparoak. *Crassostrea gigas* espezie ez inkubatzailea denez ernalketa organismotik at gertatzen da, beraz, arrautzak kanpoaldera jariatzen dira. Espezie inkubatzaileetan aldiz, ernalketa zakatzetako barrunbeetan gertatzen da eta larbak ez dira kanporatzen garapen nahikoa eskuratu arte (Galtsoff, 1964).

1.1.1 Digestio-guruinaren histologia

Ostretan elikagaien digestioa eta xurgapena digestio-guruinean gertatzen diren prozesu intrazelularrengatik ematen da. Yonge¹k 20. hamarkadan hainbat esperimentu egin zituen moluskuen elikagaien metabolismoa ulertzeko eta elikagai partikula txikiak digestio-zelulek (3. irudia) xurgatzen dituztela ikusi zuen baina diatomeak eta tamaina handiko algak aldiz, ahalmen fagozitikoa zuten zelulek digeritzen dituztela ikusi zuen (Yonge, 1926).

Digestio-guruina urdaila eta hestearen parte bat inguratzen duen eta kolore marroia duen masa trinkoa da eta digestio intrazelularra aurrera eramaten duten adarkatutako dibertikuluz osatuta dago. Digestioa estrazelularra izan daiteke, lumenean dauden entzimengatik, baina funtsean prozesu intrazelularra da (Bardales, 2008).

Bibalbioen, eta zehatzago, ostren digestio-guruina urdailarekin komunikatzen dituen tubuluak dituzte. Digestio-tubuluaren epitelioan bi zelula nagusi daude: digestio-zelulak eta zelula basofilikoak. Digestio-epitelioan dauden zelula ugariak digestio-zelulak dira, oso garatuta dagoen sistema endolisosomikoa daukate eta elikagaien zelula barruko digestioan parte hartzen dute. Hain ugariak ez diren zelula basofilikoak aldiz, zelula kanpoko digestioan eta erregulazio metabolikoan parte hartzen dute. Digestioa urdailean dauden entzima hidrolitikoaren bidez ere gertatzen da eta prozesu jarraia da.



3.irudia. Elikagaiak digeritzen dituen digestio-tubuluaren irudia. Nukleo oso iluna dituzten zelulak zelula basofilikoak dira eta nukleoa argiagoa dituztenak digestio-zelulak dira (Galtsoff, 1964).

1.2 METAL ASTUNAK

1.2.1 Cu eta Ag ingurumenean

Metal astunek itsasoko ura kutsatu dezakete. Mineralen meategien lurrek eta garbiketa urek metal astunen edo beste oligoelementuen kopuru altuak izan ditzakete eta hauek ibai zein itsasoko uretara igaro daitezke. Gainera, gaur egun prozesu industrial askoren bitartez metal astunek ingurugiroan amaitzen dute, hala gertatzen da petrolioaren finketan eta burdinaren galdaketan.

Metal astunak erreferentzia egiten dio dentsitate erlatibo altua duen eta kontzentrazio baxuetan toxikoa edo pozoitsua den edozein elementu metalikori. Gainera, metal astunak metal arriskutsuenak dira, biodegradagarriak ez direnez hain kaltegarriak ez diren osagaietan transformatu ezin direlako eta gainera ingurumenean milaka urtez mantendu daitezke (Nordberd *et al.*, 2007).

1.2.1.1 Zilarra (Ag)

Trantsiziozko metal zuria, biguna, distiratsua eta xaflakorra da. Normalean solido egoeran dago eta bere itxura kristalinoa kubikoa da. Bere ezaugarri fisiko eta kimikoak hauek dira: 47-ko zenbaki atomikoa, 107.868g/mol-eko pisu atomikoa, 10,5 g/cm³-ko dentsitatea (20°C-tan), 2212°C-ko irakite-puntua, 961,93°C-ko urtze-puntua eta +1 eta +2 oxidazio-egoerak. Zilarra zitosolean pisu molekular handiko proteinetara lotzen da eta zilar purua da metal guztien artean konduktibitate elektriko eta termala altuena duena (Nordberd *et al.*, 2007).

Gizakietan zilarra aurkitu daiteke metal kontzentrazio baxua duten organismo itsastarrak jateagatik edo hortzeko enpasteen ondorioz kantitate baxuan askatzen den zilarrarengatik.

Itsasoko urek oso zilar kontzentrazio aldakorrek erakusten dituzte (0,055-1.5 µg/L bitartean), ozeano Antartikoan eta Pazifikoan garatutako lanen arabera (Schutz eta Turekian, 1965). Hala ere, azkeneko urteetan burutako zenbait ikerlanek zilarraren kontzentrazio altuak erakutsi dituzte Bizkaiko Golkoko uretako zenbait tokitan (Lanceleur *et al.*, 2011).

Zilarra ere atmosferan eta lurlean aurkitu daiteke baina bere kontzentrazioak oso aldakorrek dira konposizio geologikoaren eta lekuaren arabera.

1.2.1.2 Kobrea (Cu)

Gorritzka kolorea duen trantsiziozko metala, elektrizitate-eroale ona, xaflakorra eta harikorra da. Organismo baten organo guztietan aurkitu daitekeen elementu traza esentziala da. Entzima batzuek kobrea dute kofaktore gisa, ferroxidasa adibidez. Propietate fisiko eta kimikoei dagokienez 29-ko zenbaki atomikoa, 63.54 g/mol-eko pisu atomikoa, 8.94 g/cm³-ko dentsitatea (20°C-tan), 2595°C-ko irakite-puntua, 1083°C-ko urtze-puntua eta 0, +1, +2 eta +3-ko oxidazio egoera du.

Kobrea oso metal erreaktiboa da eta zelulenzako kaltegarria da ioi askeetan agertzen denean. Kobrearen maila intrazelularrak zorrozki kontrolatzen dira mintzaren garraiatzaile integralekin. Kobre metaketa altuak gertatzen badira, oso kaltegarria izan daiteke, gizakietan adibidez, hesteetan alterazioak deskribatu dira, kobreak batzuetan ere giltzurrunetan eta giblean kalteak sor ditzake eta kobreak arnasketa traktuan narritadura eta ke metalikoen sukarra eragin dezake (Nordberd *et al.*, 2007).

Ikerketa ezberdin askoren arabera itsasoko uretan kobre kontzentrazioak 1 µg/L baino txikiagoak direla ikusi da (Bruland, 1980; Haraldsson eta Westerlund, 1988). Baina kobre maila altuagoak ikusi dira kostaldean eta estuarioetan (Cabrera *et al.*, 1987). Hala ere, kobre kontzentrazio altuenak lakuetan eta ibaietan aurkitu dira (Parrish eta Uchirin, 1990; Hurley *et al.*, 1996). Kontuan izan behar da kontzentrazio hauek aldagarriak direla zonalde geologikoaren arabera. Airean eta lurlean ere ikerketak egin dira eta urarekin bezala azalera geologikoen arabera kobre kontzentrazioak desberdinak dira.

1.2.2 Metal astunak ostretan

1.2.2.1 Metalen xurgapen zelularra

Edozein metalen xurgapena metala duen forma fisiko eta kimikoaren arabera da, adibidez, ioi hidratatu askeak, konplexu organiko eta inorganikoak eta ioi-bikoteak bai soluzioan eta bai solido egoeran ez dira modu berdinean zelulen barnean metatzen. Metalaren forma bakoitza muga fisiko eta kimiko ezberdinak izango ditu, ondorioz, forma batzuk onartzen diren bitartean beste batzuk baztertzen dira (Abbe eta Sanders, 1990). Gainera, agente kelatzaileek ioi metalikoen eskuragarritasunari eragin diezaiokete. Ingurune baldintzek ere (tenperaturak, pH-ak, gazitasunak eta errebox baldintzek, besteak beste) eragina izango dute metalen eskuragarritasunean.

Aipagarria da 2013-ko Lancelleur *et al*-ek ikertutakoa. Hauek Gironde estuarioko gazitasun ezberdineko urak aztertu zituzten, metalak metatzeko dinamikak ezberdinak izanik. Ikerlan honetan uretan gazitasuna handiagoa den heinean zilar kopurua baxuagoa dela ondorioztatu zuten.

Metalen mintz plasmaticoaren zeharkapena normalean difusio erraztuaren bidez (Carpene eta George, 1981) edo energia behar duten prozesuen bidez gertatzen da (Rainbow eta Dallinger, 1993). Uste da molusku itsastarretan ioi metaliko edo katio askeek energia kostu gabe mintz zelularra zeharkatzen dutela. Hala ere, ur gezako moluskuek oso aktiboak diren Ca^{+2} ponpak dituzte. Hauek maskor kaltzifikatuak eratu behar dituztelako ingurune hipotoniko batean.

Uretako moluskuen zakatzak uretan disolbatuta dauden ioi metalikoen xurgapenerako oso garrantzitsuak dira. Molusku urtarrak metala janarian dagoen material partikulatuaren bidez ere barneratzen dute nagusiki (Amiard eta Amiard-Triquet, 1979).

1.2.2.2 Metalen garraioa ehunetan eta odolean zehar

Odola oso garrantzitsua da ehunen arteko metalen garraioa burutzeko (4. irudia). Hemozitoak (odol-zelulak) metalak garraiatuko dituzte proteina zitosolikoekin lotuta edo lisosometan barneratuta. Gainera, odol-plasmako proteinak metalak lotzen dituzte inespezifikoki (Robinson eta Ryan, 1988). Arnasketa-pigmentuak metalentzako ligando aipagarriak dira. Molusku gehienetan, hemozianina proteina odolean dagoen proteinarik ugariena da eta daukan Cu metal aktiboak Ba, Ca, Cd, Fe, Mg, Sr eta Zn-ri lotzeko gai da. Nahiz eta odola ligando asko izan, baldintza normaletan ez da metalen biltegitate konpartimendu nagusia (Robinson eta Ryan, 1988). Hala ere, moluskuak metalen eraginpean egon ostean, odolean metal gehiago dago esposizioa gertatu denetik ordu bat igaro denean, ehunean esposizio gertatu denetik 24 ordu igaro direnean baino (*Mercenaria mercenaria*-an ikusitakoa) (Robinson eta Ryan, 1988). Beraz, nahiz eta odola metalen metatze leku nagusia ez izan, baldintza berezietan bere garrantzia izan dezake.

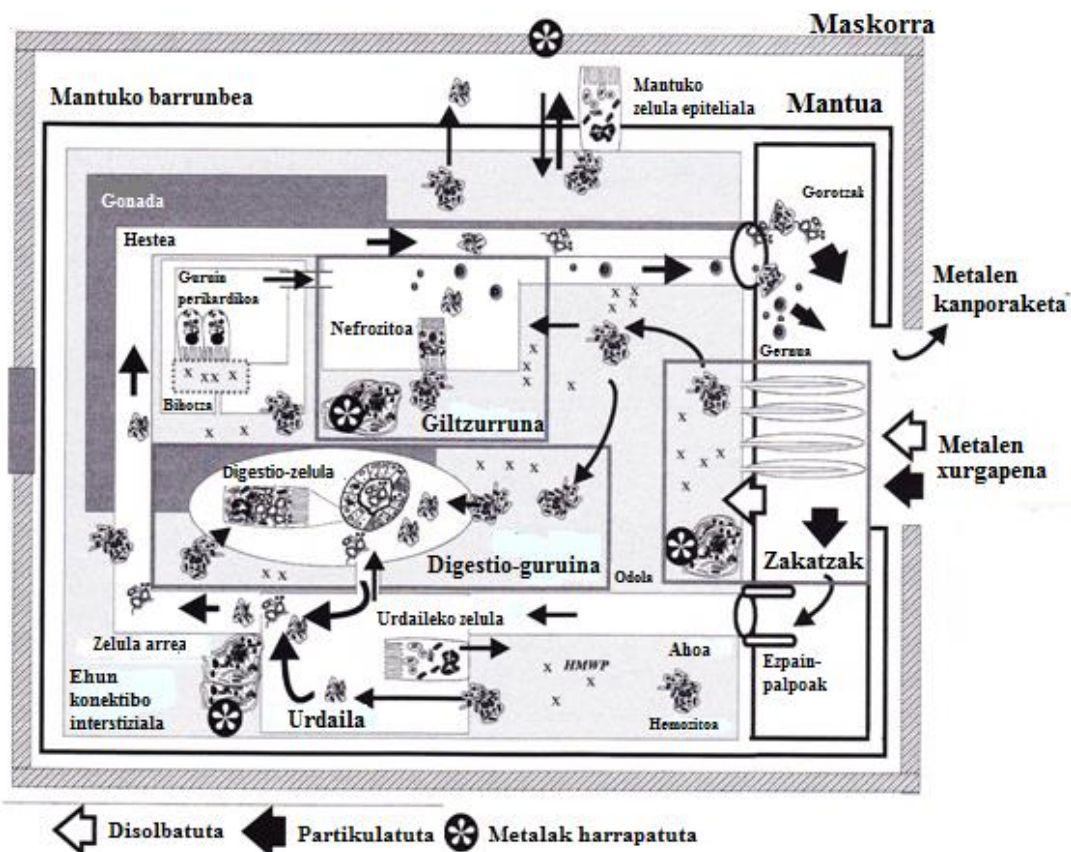
Metalak osagarriak diren era desberdinetan iraiak daitezke organismotik. Zirkulatzan ari diren hemozitoek eta poro-zelulek metalak metalen detoxifikazioan eta ezabapenean parte hartzen duten itu-zeluletara garraiatzen dituzte, adibidez, nefrozitoak eta digestio-guruineko zelulak. Gainera, hemozitoek eta rogozitoek (poro-zelulak) metalen ezabapenean zuzenean parte hartzen dute. Hauek diapedesi bidez askatzen dira mantuko, traktu digestiboaren eta giltzurruneko epitelioa zeharkatuz.

Metalen pean jarritako moluskuetan zelula arreen eta poroko zelulen kopuruaren handipena bultzatzen dela behatu da, bai mantuaren zein urdailaren epitelioaren beheko partean, hau da, ehun konektibo interstizialean, albeolo digestiboaren artean (Soto *et al.*, 1996a).

Giltzurrunari dagokionez, molusku gehienek nefrozitoetan, odolean eta gernu primarioan metalotioneinei (ikusi aurrerago) loturik dauden metalak endozitatzen dira (izatez, proteina-metal konplexuak endozitatzen dira). Hauek lisosometan metatzen dira eta bertan dagoen iraizketa konkrezioekin lotuko dira proteina-metal konplexuak. Konkrezio hauen giltzurruneko lumenaren zakuan estrusioa gertatzen denean metalen ezabapenena gertatzen da, hau da, metalek gernuaren bidea jarraitzen dute. Gainera, prozesu hau organismoak metalen pean daudenean emendatzen da. Cd edo Cu-aren esposizioek adibidez, giltzurruneko iraizketa konkrezioen estrusio masiboa zuzentzen dute (Regoli *et al.*, 1992).

Digestio-guruinari dagokionez, metal-detoxifikazioa gorotzen bidea jarraituz gertatzen da (Recio *et al.*, 1988) edota xafla basalaren askapenaren bidez lor daiteke. Azken bide honetan hemozitoek parte hartze handia dute. Honela, xafla basalean metatzen den metala, ehun konektiboan dauden hemozitoetara garraiatzen da (Ballan-Dufrançais *et al.* 1985) eta bertatik giltzurrunera. Metalak digestio-tubuluen lumenean ikusi zirenetik, digestio-zeluletara apikalki sartzen direla proposatu da (Davies *et al.*, 1997). Hala ere, lumenean dauden metal gehienak mintz-besikuletan agertzen dira eta horrek digestio-zeluletatik askatu direla adierazten du. Digestio-tubuluen lumenean metal ezberdinen (Hg, Cu, Cd, Fe, Zn) presentzia deskribatu da, antza denez gorotzetan txertatzeko prest (Marigómez *et al.*, 1986a). Nahiz eta digestio-guruina metalen xurgapenerako iturri gune handiena dela onartu, azken metatzaile bezala kontsidera daiteke eta ez metalen xurgapenaren lehen metatzailea. Gainera, digestio-guruinetan ez dira soilik elikagaietatik datozen metalak metatzen baizik eta beste ehun batzuetatik datozen metalak digestio zeluletan sar daitezke azkenean gorotzen bidez iraizteko. Moluskuak metaletara esposatzen badira gorotzetara bideratuko den kantitatea handiagoa izango da. Honek digestio eta epitelioaren berriztapen mekanismo naturalen azelerazioa eragin dezake eta Marigómez *et al.* (1986a) ondorioztatu zuten *A. ater* bareak kobreak pean jarritz digestio-guruineko zelula epitelialen iraizketa jardura emendatzen dela. Handipen honek epitelioaren zahartze goiztiarra gertatzea bultzatu dezake.

Kontuan izan behar da metal ezberdinak zelula mota ezberdinetan agertzen direla eta metal bakoitzaren kokapena aldatu daitekeela esposizio denborarekin eta kontzentrazio dietarioarekin.



4. irudia. Metalen baneraketa, bahiketaren eta kanporaketaren eskema (*Mytilus galloprovincialis* muskuiluan Mari Gómez *et al.*, 2002-tik moldatuta).

4. irudian adierazten den bezala, disolbatutako metalak zakatzetan sartzen dira eta partikulatutako metalak aldiz, urdailean. Zakatzetan, mantuan, urdailean eta oinean metalak hemozitoetan eta zelula arreetan sartzen dira zuzenean plasmako ligandoekin lotuta, adibidez, pisu molekular altuko proteinekin (HMWP: High Molecular Weight Proteins). Sartzen diren partikulatutako metal gehienak janariarekin batera urdailera garraiatzen dira, azkenean digestio-zeluletan prozesatzeko. Zakatzetatik hemozitoen bitartez sartzen diren metalak, poro-zelulen bitartez eta odol plasmarekin batera garraiatzen dira giltzurrunera (nefrozitoetara) edo digestio-guruineko digestio zeluletar.

HMWP-rekin elkartuta dauden metalak bihotzaren ultrafiltrazioaren ostean giltzurrunera sartu daitezke. Ondoren, metalak hiru bide ezberdinen bidez ezabatzen dira. Lehenengo bidea iraiketa konkrezioekin batera ezabatzea da, metala metatu eta jariatuak diren nefrozitoak genuaren parte izanik. Bigarren bidea gorotzen konposatu bezala eta digestio-zelulen lisosomen barruan iraketa eta hirugarren eta azkeneko bidea genuaren eta gorotzen bidez iraketa, hemozitoen eta poroko zelulen diapedesisaren bidez giltzurrunaren, digestio-guruinaren eta urdailaren epitelioa zeharkatuz. Metalen detoxifikaziorako beste bide bat metalen immobilizazioan datza. Prozesu honetan zelula arreak metalak bahitzen dituzte eta ondoren zelula hauek talde handietan metatzen dira oineko, urdaileko, digestio-guruineko eta hestearen ehun konektibo interstizialean (Marigómez *et al.*, 2002).

1.3 BIOMARKATZAILEAK

Biomarkatzaileen definizioa 1990-an argitaratutako Jonh F. McCarthy eta Lee. R. Shugart-en “Biomarkers of enviromental contamination” izenburua duen liburutik hartuta hurrengo izango litzateke: “Biomarkatzaileak gorputzaren jariakinen, zelulen edo ehunen neurketak dira eta termino biokimiko edo zelularrean kutsatzaileen presentzia edo ostalariaren erantzuna adierazten dute”. Biomarkatzaileak ingurugiroko kutsatzaileek eragiten duten aldaketa biologikoen alarma goiztiar bezala erabili daitezke nahiz eta efektu biologikoak denbora luzean irauten duten. Beraz, biomarkatzaileak epe luzerako efektuak dituzten epe laburreko adierazletzat ere har daitezke (Zorita, 2006).

Orokorrean, maila biologiko baxuetan ematen diren erantzunak espezifikagoak, sentikorragoak eta atzemateko errazagoak dira, baina aldi berean aldaketa ekologikoekin eta beraien esanahiarekin uztartzeko zailagoak. Goi mailako erantzunetan, aldiz, ekosistemaren osasunaren adierazle zuzenak dira eta ondorioz, ingurugiro kudeaketan oso garrantzitsuak dira. Hala ere, erantzunak determinatzeko zailagoak, espezifikotasun baxuagokoak eta soilik urrats berantiarretan agertzen dira, ingurugiroan jada kalteak gertatu direnean eta zenbait kasutan kalte horiek dagoeneko itzulezinak izan daitezkeenean (Zorita, 2006).

1.3.1 Metalotioneinek (MT)

Metalotioneinek proteina jarduera entzimatikoko gabeko proteinak dira eta metalei lotzen zaizkie afinitate handiz zisteina hondarrak dituzten tiol (-SH) taldeei esker. Metalotioneinek erretikulu endoplasmatikokoan sintetizatzen dira eta ostean Golgi aparatua bideratu eta bertan metatzen dira. Zenbait kasutan zitoplasmara ere garraiatzen dira eta hor funtzionalak izango dira. Metalotioneinek pisu molekular baxuko (6000-7000 Da bitartean), disolbagarriak, termoezkonkorak eta sufreak aberatsak diren proteinak dira. Gainera, ez dute inolako aminoazido aromatikorik (Zorita, 2006). Zisteina kopuru oso altua dute, zenbait kasutan %30a edo gehiago eta berezitasun horrek tiolato konplexuak eratzea baimentzen dizkie. Beraien funtzio nagusia metalen zelulen barneko eraenketa da zeluletan dauden ioi metaliko askeen mailak baxuak mantenduz. Nahiz eta gehienetan zitoplasman egon, MTak nukleoan eta lisosometan ere detekta daitezke (Ye *et al.*, 2001). Hauek espezifikoki lotzen dira Cd, Cu, Hg, Ag eta Zn ioiei eta metal astunen aurreko molekula erregulatzaileak edo sistema detoxifikatzailearen parte kontsidera daitezke (Mao *et al.*, 2012).

Gaur egun MTen funtzio fisiologikoak ez daude guztiz finkaturik. Hala ere, oinarrizko metalen (Cu, Zn) kontrol homeostatikoan parte hartzen dutela nahiko argi dago. Hau da, metal esentzialak biltegitzen dituzte eskaera metaboliko eta entzimatikoko asetzeko. Oinarrizko metalen eta oinarrizkoak ez diren metalen detoxifikazioan parte hartzen dute, izan ere metalen aurreko tolerantzia altua eta MTen indukzioaren arteko erlazioak deskribatu dira (Zarogian eta Jackim, 2000). Gainera, MT-ek kaltegarriak diren agenteen aurkako eta oxidazio aldaketekiko prozesu babesgarrietan eta zelulen hazkuntzan, desberdintzapenean eta ugalketan parte hartzen dute (Mao *et al.*, 2012).

Metalotioneinek neurtzeko teknika desberdinak garatu dira, adibidez, metalotioneinen RNA mezulari mailak aztertu daitezke PCR (Polymerase Chain Reaction) bezalako teknikak aplikatuz. Teknika hauek oso sentikorak direla erakutsi duten arren teknika hauek zenbait kasutan ezin dira aplikatu besteak beste duten kostua dela eta edota oraindik ere ikertzen ari den espeziaren metalotioneinen sekuentzia nukleotidikoa ezagutzen ez delako (Zorita, 2006).

Metalotioneinen kopurua ehun biologikoetan neurtzeko bestelako teknikak ere badaude, besteak beste, proteinetara lotzen den metal kantitatea neurtuz edota metalotioneinek duten ezaugarri fisiko (absortzio neurketak) edo kimikoetan (sulfidriko taldeak edo afinitate immunokimikoak neurtu) oinarrituz.

Metalotioneinen indukzioa, metal astunek ez ezik, bestelako faktore batzuek ere eragin dezakete (1. taula). Izan ere egiaztatu da proteina hauen mailen emendioa eragin dutela zenbait hormonak, zitosina batzuek, hazkuntza-faktore batzuek, zenbait tumore-promotorek edo beste konposatu kimiko batzuek (Kägi, 1991). Beraz, metalen eraenketa burutzeaz gain, proteina hauek ere bestelako hainbat bidezidor metabolikoetan parte hartzen dute.

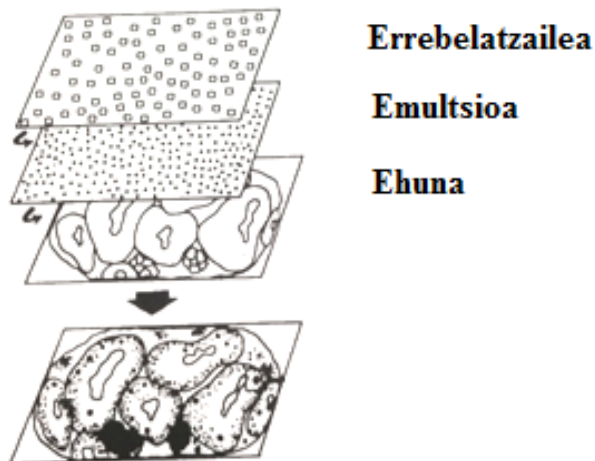
1. taula. Metalotioneinen sintesia eragiten duten faktoreek bai *in vivo* eta bai *in vitro*. (Kägi, 1991)

Ioi metalikoak	Cd, Zn, Cu, Au, Ag, Co, Ni, Bi
Hormonak eta bigarren mezulariak	Progesterona, estrogenoa, adenosina, glukagona, cAMP, Ca ⁺² , diazilglizerol
Hazkuntza-faktoreak	Intsulina eta hazkuntza-faktore epidermikoa (EGF)
Hanturaren agenteak	Endotoxina, dextranoa, karragenanoa, interleukina-1 eta 6, interferoi α eta γ eta lipopolisakaridoak (LPS)
Tumoreen promotoreak	<i>ras</i>
Bitaminak	Azido askorbikoa
Antibiotikoak	Mitomizina
Agente zitotoxikoak	Etanola, isopropanola, formaldehidoa, butiratoa, gantz-azidoak, EDTA, bromobentzenoa, kloroformoa
Estresa eragiten duten agenteak	Hantura, infekzioa, gosea, X izpiak, izpi ultramoreak

1.3.2 Autometalografia eta zilarraren bidezko metalen detekzioa

Metal atomoen sakabanaketa sekzio biologikoetan fotografiaren oinarriko printzipioak aplikatuz detektatzeko metodo autoinduzitzailea da. Gaur egun, metalak detektatzeko erabiltzen den autometalografia metodoa erraza, sentikorra eta errentagarria da (Soto, 1995).

Autometalografia bezalako teknikan ebaki histologikoetan dauden metalak errebelatzaile fotografikoak erabiliz errebelatzen dira. Horretarako, zilar bromuroa duten emulsio fotografikoa erabiliz portetan dauden ehunaren sekzio batzuk estaltzen dira. Sekzioetan dauden metalak zilar bromuroa erreduzitu eta zilar ioietan transformatzen dituzte, zilar ioi hauek errebelatzaile kimikoak erabiliz ikustarazten dira. Behin emulsioaren errebelazioa burutu denean, erreakzioa geldiarazi eta azkenean fixatzaile fotografikoekin fixatzen da (5. irudia). Emaitza bezala, ebaki histologikoan zilar ioi hauspeakin marroi-beltzak agertzen dira ehunetan metalen presentzia adieraziz (Soto *et al.* 1998; Danscher eta Stoltengerg, 2006).



5. irudia. Errebelatzaile kimikoa eta emulsio fotografikoa erabiltzen duen autometalografia metodoaren oinarria (Soto *et al.*, 1998-tik moldatuta).

Gaur egun teknika immunohistokimikoek izan dituzten aurrerapenak direla eta dagoeneko KIT komertzialak daude. Oinarri kimiko berdintsuetan (metalen bidezko zilarraren erredukzioa) oinarritutako KIT hauei esker emulsio fotografikoak erabiltzeari utzi zaio.

KIT komertzial hauek besteak beste argiarekiko sentikorrek ez direnez (emultsio fotografikoarein gertatzen ez dena) baldintza errezagoetan lan egitea baimentzen dute eta gainera errebelazio denborak zuzenean mikroskopioan kontrolatu ahal direnez, lortzen diren emaitzak zehatzagoak eta seinale/zarata erratio altuagoa erakutsiko dute.

Autometalografia erabiliz zein KIT komertzialak erabiliz, ehunetako metalak hauspeakin ilun (marroi-beltz) bezala behatuko dira eta ondoren irudi-analisi programak erabiliz ehunek duten metalen distribuzioa aztertzeaz gain, beraien kopurua ere kuantifikatu daiteke ingurumen metal presentziaren adierazle fidagarria izanik (Soto eta Marigómez, 1997).

2. HIPOTESIA ETA HELBURUAK

2.1 HIPOTESIA

Ostrak kobrea eta zilarra bezalako metalen pean jartzen direnean neurgarriak diren erantzun biologikoak emango dituzte bai metalotioneinen kopuruari dagokionez, zein metalen sakabanapenari dagokionez. Erantzun edo aldaketa horiek, gainera, desberdinak izango dira bai itsasoko eta zein estuarioko uretan, gazitasuna ezberdina delako eta baita metalak konbinaturik agertzen direnean.

2.2 HELBURUAK

Hipotesia egiaztatzeko hurrengo helburuak finkatu dira:

1. Metal pean jarritako eta gazitasun desberdineko uretan mantendutako ostretan metalen sakabanaketa nolakoa den aztertzea.
2. Metal pean jarritako eta gazitasun desberdineko uretan mantendutako ostretan metalotionein mailak nola aldatzen diren aztertzea.

3. MATERIALAK ETA METODOAK

3.1 DISEINU ESPERIMENTALA

Crassostrea gigas ostrak gutxi kutsatuta dagoen estuario batean kokatuta dagoen ostra-haztegi batetik hartu ziren (Ostranor S.L, San Vicente de la Barquera, Kantabria, Espainia) eta Euskal Herrian dagoen Plentziako Itsas-Estaziora (PIE) eramán ziren 2013ko apirilean. Ostrekin esperiméntua hasi aurretik, 150 litrotako ontzi handi batean ostrak girora moldatu eta araztu ziren iragazitako itsasoko ur naturalarekin (17°C, 28 psu) eta aire-fluxu jarraituarekin lau egunetan zehar. Ostrak, giro-tenperatura konstantean mantendu ziren (17°C) eta 12 orduz argiaren pean mantendu ziren (goizeko 9-etatik gaueko 9-ak arte).

Giro-tze denbora igaro ondoren, talde esperiméntal bakoitzeko ostrak iragazitako itsasoko ur naturala duen 20L-ko propileno-zko akuario ezberdinetan banatu ziren aire-fluxu jarraituarekin eta 12 orduz argiaren pean mantenduz. Hemen ostrak girora moldatzeko erabili diren tenperatu eta gazitasun baldintza berdinetan mantendu ziren (17°C, 28 psu). Ondoren, ostrak ^{107}Ag eta ^{63}Cu kontzentrazio desberdinen pean jarri ziren 14 egunetan zehar. Zazpi talde esperiméntal zehaztu ziren: kontrola, 50ng $^{107}\text{Ag}/\text{L}$ + 1000ng $^{63}\text{Cu}/\text{L}$ (A), 500ng $^{107}\text{Ag}/\text{L}$ + 1000ng $^{63}\text{Cu}/\text{L}$ (B), 50ng $^{107}\text{Ag}/\text{L}$ + 2000ng $^{63}\text{Cu}/\text{L}$ (D), 500ng $^{107}\text{Ag}/\text{L}$ + 2000ng $^{63}\text{Cu}/\text{L}$ (E), 2000ng Cu/L (F) eta 500ng Ag/L (G). Azken bi kontzentrazio hauetarako zilar eta kobre isotopikoa erabili beharrean, AgNO_3 eta $\text{CuCl}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ erabili ziren. Zazpigarren taldea kontrol bezala mantendu zen eta ostra horiek ur garbitan mantendu ziren.

Beste alde batetik, haztegi horretatik hartutako beste ostra batzuk laborategian egindako estuario uretan sartu ziren. Medio hau prestatzeko ostren deposituaren herena ur destilatuz bete zen eta beste bi herenak itsasoko ur gazi naturalaz. Itsasoko ur naturalarekin iragazitako ostrekin konparatuz estuarioaren medio artifizialaren gazitasuna baxuagoa da. Hau da, itsasoko urak 28 psu-ko gazitasuna zuen bitartean estuarioko uretan 18.18 psu neurtu ziren. Itsasoko ur naturalean mantendutako ostren prozedura berdina jarraituz estuarioko uretan hiru talde esperiméntal zehaztu ziren: kutsatzailerik gabeko talde kontrola, 2000ng Cu/L (H) eta 500ng Ag/L (I). Itsasoko urarekin bezala azken bi kontzentrazio hauetarako, AgNO_3 eta $\text{CuCl}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ erabili ziren.

Kutsatzaileen sarrera janariarekin interakziorik sortzen ez zuela ziurtatzeko, egun bakoitzean ostrak 4 orduz ateratzen ziren kutsatutako akuarioetatik eta akuario garbitan janaria ematen zitzaien. Ornogabe itsastarrentzako janaria, komertziala den janari nahasketa bat da (Marin Coraliquid, Sera® Ltd.) eman zitzaien jateko. Ostrak elikatzen ziren bitartean, kutsatuta zeuden akuarioak garbitu eta ostrak, berriro bakoitzari dagokion talde esperimentalaren akuariora sartu ziren iragazitako itsasoko ur garbiaz bete eta gero. Azkenean, garbitutako akuario horiek kutsatzaileekin berriro ere aberastu ziren. Laburbilduz, egunean 20 orduz jartzen ziren ostrak kutsatzaileen eraginpean eta 4 orduz kutsatu gabeko ur garbiko akuarioetan jaten.

Talde esperimental bakoitzetik 10 ostra hartu ziren esperimentuaren 6. eta 13. egunetan estuarioko uretan sartutako ostretan eta esperimentuaren 7. eta 14. egunetan itsasoko uretan mantendutako ostretan. Beste alde batetik, esperimentua hasi aurretik ere 10 ostra hartu ziren ikerketetarako (0 denbora). Bolumen kutsatzaile erlazioa beti berdina mantentzeko ostrak ateratzen ziren heinean tankean zegoen ur bolumena jaisten zen.

Metalen sakabanaketa ehunetan eta MT mailak neurtzeko, ostren disezioa burutu zen. Horretarako, ostrak ireki eta ehun bigunetan zehar bisturiarekin ebaki bat burutu zen. Ebaki horretan digestio-guruina, zakatzak eta gonada zeudela ziurtatuz. Ebaki hori, itsasoko uretan indargetutako formaldehidotan fixatu zen eta histologian ohikoak diren urratsak jarraituz prozesatu zen. Azkenean mikrotomoko ebakiak portetan itsatsita izan arte. Ondoren, metalak tindatzeko histokimika burutu zen ebaki horietan (ikusitako aurrerago). Beste alde batetik, geratzen zen ehun zatia, berriz ere disezionatu zen eta digestio-guruin zatia atera zen. Zati hori nitrogeno likidotan izoztu eta -80°C-tan mantendu zen.

3.2 METALOTIONEINEN KOPURUAREN NEURKETA

Metalotioneinen mailak neurtzeko UNEP/RAMOGÉ (United Nations Environmental Program) proposatutako eta 1997-ko Viarengo *et al.*-tik eraldatutako prozedura erabili zen jarraian azalduko den moduan.

Digestio-guruinak izotzetan mantendu eta homogeneizatu ziren. Horretarako, laginak pisatu eta silika bolatxoekin eta homogeneizazio tanpoiarekin batera homogeneizazio saiodian sartzen dira. Homogeneizazio tanpoiaren 50ml egiteko, 0.5M sakarosa, 20mM TRIS pH 8.6, 150 μ l leupeptina, 75 μ l PMSF (Fenimetilsulfonilo fluoruroa) eta 5 μ l β -merkaptetanola nahastu behar dira. Laginaren pisuarekiko hirukoitza zuen bolumena erabiliz homegeneizatu ziren.

Laginak homogeneizadorean sartu ostean Pasteur pipetarekin homogeneizatu den likidoa hartu eta ultrazentrifugako saiodietan sartzen da. Saiodiak kalibratu eta 18000rpm-etan, 20 minutuz eta 4 gradutan zentrifugatuko dira. Behin zentrifugaturik saiodi bakoitzeko gainjalkin mililitro bat hartu eta zentrifugazio saiodietan sartuko dira.

Hurrengo urratsean pisu molekular handiko proteinak hauspeatzeko etanol prezipitazioa egingo da. Aurreko urratsean hartutako mililitro bateko gainjalkinari 1.05ml-ko etanol absolutua (-20°C) eta 80 μ l kloroformo gehitzen zaizkie. Saiodiak zentrifugatuko dira 10 minutuz, 8000rpm-ko abiadurarekin eta 4°C-tan. Ondoren, gainjalkina hartu, saiodietan sartu eta 40 μ l %37 HCl, 10 μ l RNA eta -20°C-tan dagoen 5.55ml etanol absolutua gehituko zaio.

Laginak -20°C-tan ordu batez mantentzen dira eta berriro ere 10 minutuz, 8000rpm-ko abiadurarekin eta 4°C-tan zentrifugatu dira. Laginak zentrifugatu ondoren gainjalkina kentzen eta pellet-a garbitzen da 2ml-ko garbiketa tanpoiarekin (87ml etanol absolutua (-20°C), 1ml kloroformo eta 12ml homogeneizazio tanpoia). Laginak berriro zentrifugatuko dira (10 minutu, 8000 rpm-ko abiadurarekin eta 4°C-tan), zentrifugatu ostean gainjalkina kenduko da eta pellet-a 10 minutuz sikatzen utziko da.

Hurrengo urratsean metalotioneinetan aberatsa den frakzioaren berresekidura egingo da. Horretarako, saioidien pellet-ari 0.25M NaCl soluzioaren eta 1N HCl/4mM EDTA (91.7 ml ur destilatu, 8.3 ml HCl eta 0.116 g EDTA) soluzioaren 150 μ l gehitu eta laginak irabiatzen dira. Metalotioneinen kantitatea kalkulatzeko beharrezkoa da glutationan (GSH) oinarritutako zuzen patroia eraikitzea, eta horretarako, 1N HCl/4mM EDTA eta 0.25M NaCl-ko bolumen ezberdinak gehitzen zaizkie saioidi bakoitzari.

Saiodi guztiei 0.43mM DTNB soluzioaren 4.2 ml bota behar zaizkie. DNTB soluzioa prestatzeko fosfato tanpoia (0.2M fosfato tanpoia pH 8-an 2M NaCl-rekin: 5.784g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.53g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 11.688g NaCl eta 100ml ur destilatu) erabiltzen da, hau da, 100ml-ko fosfato tanpoian 17mg DNTB gehitzen dira.

Behin errektibo guztiak gehituta eta saiodiak irabiatuta, laginak 5 minutuz zentrifugatuko dira 8000 rpm-etan eta 4°C-tan. Zentrifugatu ostean lorturiko saioidi bakoitzaren gainjalkinetik 300 μ l-ko 4 erreplika gehitu ziren 96 putzuko plaka batetan.

Amaitzeko, DTNB-ak kolore horia du eta bere absorbatzia maximoa 412nm-tan dagoenez espektrofotometroarekin 412nm-tan egiten da neurketa. Zuzen patroiarri esker metalotioneinen kontzentrazioa zehaztuko da.

3.3 METALEN DETEKZIOA AUTOMETALOGRAFIAREN BITARTEZ

Portetan dauden laginak desparafinatu behar dira eta horretarako, xilenoazko bi bainuetan 5 minutuz mantendu ziren. Ondoren, laginen hidratazioa alkohol kontzentrazio ezberdineko bainuetan eta ur bainu batetan egin zen (100%-ko etanol-bainuan 2 minutuz, berriro ere 100%-ko etanol-bainuan 2 minutuz, %96-ko etanol-bainuan 2 minutuz, %70-ko etanol-bainuan 2 minutuz eta amaitzeko ur-bainuan 5 minutuz). Ondoren, laginak, estufan 37°C-tan mantendu ziren 24 orduz.

Behin laginak desparafinaturik daudela kamara hezean sartzen dira. Argi mikroskopioan metalak ikusteko BBI Solutions enpresaren KIT-a erabili da (Silver enhancing KIT fot light and microscopy batch). KIT honek metalen hauspeakin argi mikroskopioan eta mikroskopio elektronikoan ikustea baimentzen du. KIT honetan bi pote daude, bata abiarazlea (initiator) eta bestea indartzaile (enhancer) izenekoak, eta eppendorf batetan bi pote hauetatik bolumen kantitate berdina bota behar da eta ondoren, nahastu. Soluzioa prestatuta kamara hezean dauden laginei pipeta baten laguntzarekin nahasketa honen tanta bat jartzen da ehun bakoitzaren gainean ehun osoa estaltzen duela ziurtatuz. Kamara hezean laginak errektiboarekin gutxi-gorabehera 10-15 minutu utzi behar dira laginetan eta lagin horietako bat hartuta mikroskopioan erreakzioa jarraitzen da. Mikroskopioan puntu beltzak antzematen direnean ehunaren eta errektiboaren bitarteko erreakzioa gertatu dela adierazten du.

Erreakzioa geldiarazteko, laginak kamara hezetik atera eta urarekin garbitu egiten dira. Ondoren laginak glizerinarekin estaltzen dira matxardaren laguntzarekin. Laginak sikatzeko giro tenperaturan uzten dira egun batez.

Erreakzioa burutu eta gero, tindatutako laginetako metalak kuantifikatzeko BMS (Biological Measurement System, Sevisa, Espainia) programa informatikoa erabiltzen da. Horretarako, laginak kamara duen argi mikroskopioan behatzen dira. Zilarrezko hauspeakin beltzak bestelako ehunarekiko informatikoki banatu zen eta modu horretan zilarrezko hauspeakin beltzen-en dentsitate bolumetrikoa (ingelesez VvBSD; Volume Density of Black Silver Deposits) kuantifikatu zen Delesseren printzipioan oinarrituz. Kuantifikazioa burutzeko lagin bakoitzeko bost zelai ezberdin neurtu dira.

3.4 ANALISI ESTADÍSTIKOAK

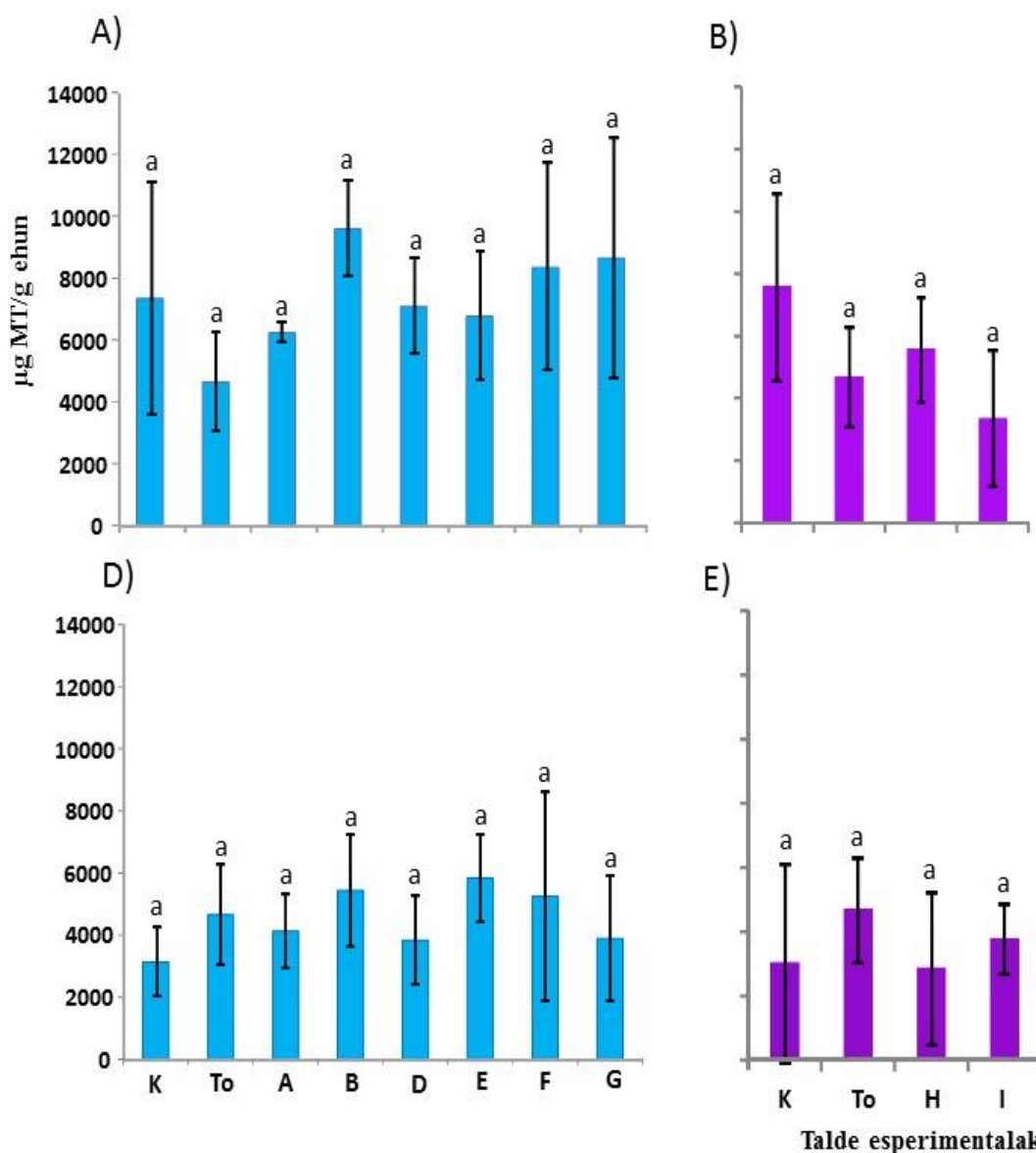
IBM SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) estatistika programaren bitartez bariantza analizatuko da. Hasteko, Levene-ren estatistikoa kalkulatu da bariantzen homogeneitasuna eta normaltasuna aztertzeko. Jarraian, bariantzak normalak eta homogeneoak dituztenekin ANOVA proba eta ondoren Duncan testa egiten da talde esperimentalen arteko ezberdintasunak analizatzeko $p > 0.05$ mailan. Bariantzak homogeneoak eta normalak ez diren kasuetan Kruskal-Wallis-en testa aplikatu da esangarritasuna baita 0.05 mailan ezarri.

4. EMAITZAK

4.1 METALOTIONEINAK

Laginen eta zuzen patroia eraikitzeke prestatutako soluzioen absorbantzia ($A_{412\text{nm}}$) espektrofotometroan neurtu da. Horrela, zuzen patroiarekin metalotioneinen kontzentrazioa zehaztu da.

6. irudian ikusten denez orokorrean MT kopururik altuena itsasoko uretako zazpigarren egunean behatu da (6. A grafikoa). Estuarioko uretan aldiz (6. B grafikoa), H eta I taldeek dituzten MT kopurua askoz baxuagoa da. Orokorrean, zenbat eta denbora gehiago egon (ikerlan honetan aste bat gehiago, estuarioko T_{13} eta itsasoko T_{14}) kutsatzaileen pean (6. D eta 6. E grafikoak) MT maila baxuagoa behatu da.



6. irudia. Metalotioneinen kopurua itsasoko uretan eta estuarioko uretan 0, 6, 7, 13 eta 14 egunetan.

A grafikoak zazpigarren egunean (T₇) itsasoko uretan dagoen metalotioneinen kopurua, B grafikoak seigarren egunean (T₆) estuarioko uretan dagoen metalotioneinen kopurua, D grafikoak hamalagarren egunean (T₁₄) itsasoko uretan dagoen metalotioneinen kopurua eta E grafikoak hamahirugarren egunean (T₁₃) estuarioko uretan dagoen metalotioneinen kopurua zehazten dute. Kolore urdineko grafikoek itsasoko uretako laginak eta kolore moreko grafikoek estuarioko laginak adierazten dute. K, T₀, A, B, D, E, F, G, H eta I diseinu esperimentalean zehaztutako metal kontzentrazio ezberdina duten talde esperimentalak dira non K kontrola, T₀ 0 denbora, A 50ng ¹⁰⁷Ag/L + 1000ng ⁶³Cu/L, B 500ng¹⁰⁷Ag/L + 1000ng ⁶³Cu/L, D 50ng¹⁰⁷Ag/L + 2000ng ⁶³Cu/L, E 500ng¹⁰⁷Ag/L + 2000ng ⁶³Cu/L, F 2000ng Cu/L eta G 500ng Ag/L diren. Baloreak batezbestekoak adierazten dituzte eta segmentu bertikalek desbiderazio estandarra. Zutabeen gainean dagoen letra (a) taldekakapen estatistiko berdinak adierazten ditu %95-eko konfiantza-mailan (p>0.05).

Itsasoko uretako 7. eguneko laginetan (6. A grafikoa), taldeen arteko desberdintasun estatistikorik ez da behatu eta MT kopuru handiena B, F eta G taldeek erakusten dute. Aipatu beharra dago kontrolak beste talde esperimental batzuk baino MT kantitate handiagoa erakutsi duela (To, A, D eta E). Bestalde, aipagarria da desbiderazio handiak behatu direla kontrolean eta F eta G taldeetan.

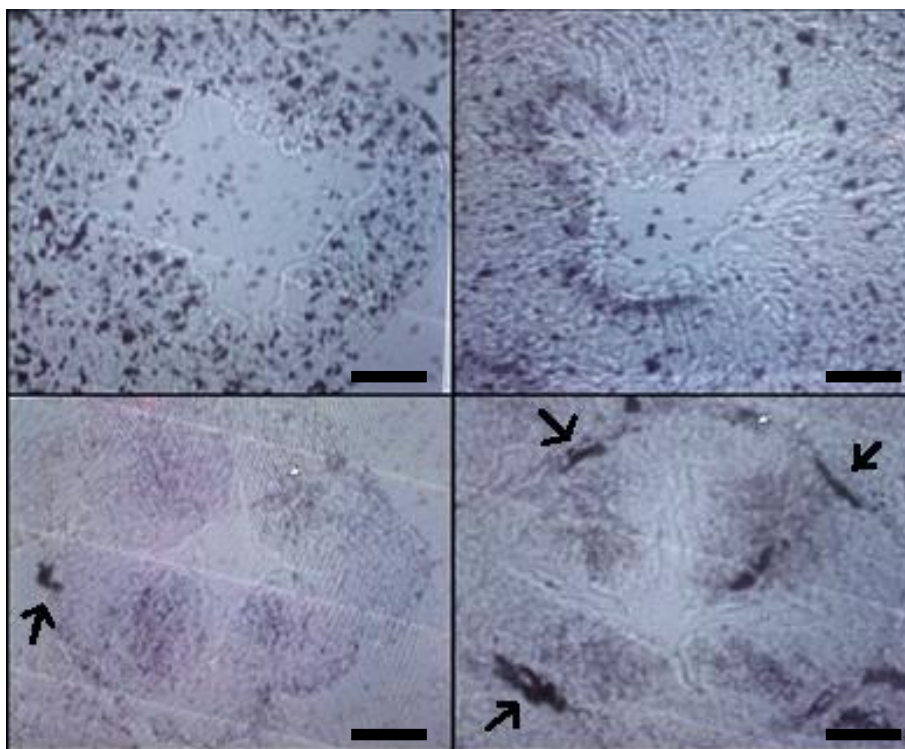
6. eguneko estuarioko uretako laginetan ere ez dira desberdintasun esangarriak aurkitu, hala ere, I laginak 0 denbora eta kontrola baino MT maila baxuagoak erakutsi ditu eta H taldeak kontrola baino MT kopuru baxuagoa eta 0 denbora baino MT kopuru altuagoa erakutsi du (6. B grafikoa). Kasu honetan, kontrola da MT gehien dituen eta gero, H laginak. Desbiderazio handienak kontrolak eta I taldeak dituzte.

Itsasoko uretako 14. egunean (6. D grafikoa) B, E eta F talde esperimentaletan MT kopuru handiena behatu da. Hemen talde esperimental guztiek kontrola baino MT kantitate handiagoa dute eta aipagarria da 0 denborak; A, D eta G taldeek baino MT gehiago dituela. F taldean desbiderazio esangarria behatu da.

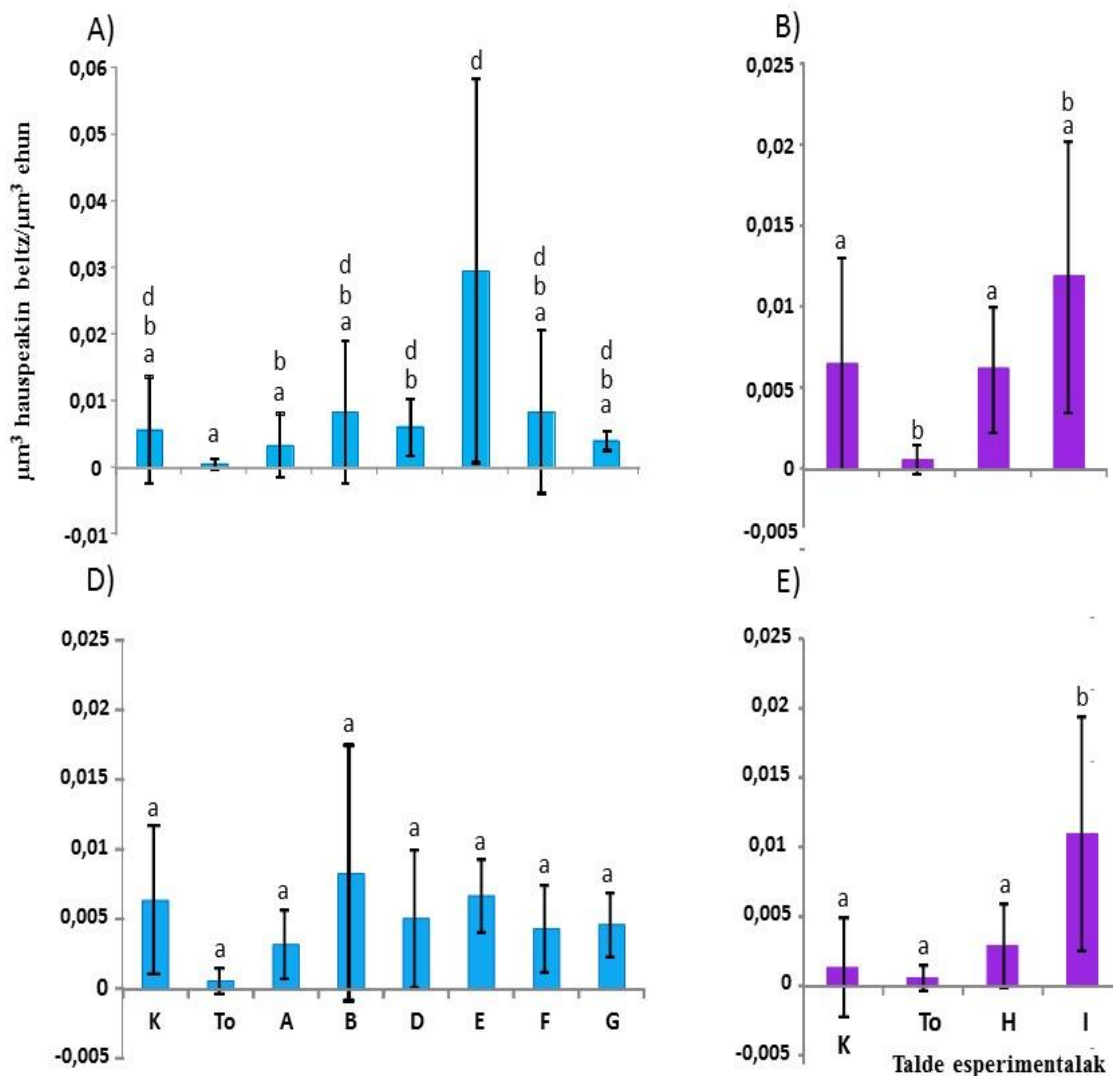
Estuarioko 13. eguneko laginetan (6. E grafikoa) To da MT kantitate handiena duena eta I-k jarraitzen dio. Kontrola eta H taldeek MT kopuru antzekoa daukate eta aipagarria da To-k MT kopuru handiena duela, eta kontrolak eta H taldeak, aldiz, baxuenak. Bestalde, desbiderazio handiak ikusi dira kontrolean eta H taldean.

4.2 AUTOMETALOGRAFIA

Metalen kuantifikazioa, BMS programa informatikoaren bidez egin da eta digestio-tubuluetan dauden hauspeakin beltzen kuantifikazioan oinarritzen da. BMS programa informatikoa metalen kuantifikazioa egiteko laginak kamara duen argi mikroskopiorekin behatu behar dira 7. irudian dauden argazkiak lortzeko.



7. irudia. Metal-kuantifikazioan, argi mikroskopiorekin behatutako digestio-tubulu ezberdinen argazkiak. Geziarekin adierazitako hauspeakin beltzak xafla basalean metatutako metala adierazten du. Eskala-marra= 50 μ m.



8. irudia. Metalen kuantifikazioa itsasoko uretan eta estuarioko uretan 0, 6, 7, eta 14 egunetan. A grafikoak zazpigarren egunean (T_7) itsasoko uretan dagoen metalen kopurua, B grafikoak seigarren egunean (T_6) estuarioko uretan dagoen metalen kopurua eta D grafikoak hamalagarren egunean (T_{14}) itsasoko uretan dagoen metalen kopurua eta E grafikoak hamahirugarren egunean (T_{13}) estuarioko uretan dagoen metalotoneinen kopurua zehazten dute. zehazten dute. Kolore urdineko grafikoek itsasoko uretako laginak eta kolore moreko grafikoek estuarioko laginak adierazten dute. K, T_0 , A, B, D, E, F, G, H eta I diseinu esperimentalean zehaztutako metal kontzentrazio ezberdina duten talde esperimentalak dira non K kontrola, T_0 0 denbora, A $50\text{ng }^{107}\text{Ag/L} + 1000\text{ng }^{63}\text{Cu/L}$, B $500\text{ng }^{107}\text{Ag/L} + 1000\text{ng }^{63}\text{Cu/L}$, D $50\text{ng }^{107}\text{Ag/L} + 2000\text{ng }^{63}\text{Cu/L}$, E $500\text{ng }^{107}\text{Ag/L} + 2000\text{ng }^{63}\text{Cu/L}$, F $2000\text{ng }^{63}\text{Cu/L}$ eta G $500\text{ng }^{107}\text{Ag/L}$ diren. Baloreak batezbestekoak adierazten dituzte eta segmentu bertikalek desbiderazio estandarra. A, B eta E grafikoetan zutabeen gainean dauden letra desberdinek taldekapen estatistiko desberdinak adierazten dituzte %95-eko konfiantza-mailan ($p \leq 0.05$). D grafikoan zutabeen gainean dagoen letra (a) taldekapen estatistiko berdinak adierazten ditu %95-eko konfiantza-mailan ($p > 0.05$).

Zilarrezko hauspeakin beltzen kuantifikazioari dagokionez, itsasoko uretako 7. eguneko E taldeak metal kontzentrazio altuena erakutsi du (8. A grafikoa). Beste talde esperimentalen metal kontzentrazioa antzekoa da baina E taldeak baino metal kontzentrazio baxuagoak erakutsi dituzte. Talde esperimental guztiek To baino metal kantitate gehiago dute baina kontrolak duen metal kopurua, A eta G taldeek dutena baino handiagoa da. Bestalde, zenbait talderen artean ezberdintasun esangarriak ikusi dira, honela To; D eta E taldeekiko ezberdina da eta A eta E taldeek ere elkarren artean desberdinak dira ($p \leq 0,05$). Orokorrean, desbiderazio handiak lortu dira, baina batez ere, B, E eta F taldeetan.

Estuarioko 6. egunean I taldeak metal kopuru handiena erakutsi du (8. B grafikoa). Hala ere, aipagarria da kontrolak 0 denbora eta H taldeak baino metal gehiago metatu dituela modu esangarrian, eta talde guztiek To baino metal gehiago dute. To taldeak, kontrola eta H taldeekiko ezberdina da, baina I-rekiko berdina (b letra) eta kontrola, H eta I berdinak dira (a letra). Aipatzekoa da ere, talde guztietan desbiderazio altuak lortu direla.

14. eguneko itsasoko uretako laginetan (8. D grafikoa), orokorrean, 7. egunean baino metal kopuru baxuagoa kuantifikatu da. Kontrola, B eta E talde esperimentalek metal kopuru altuenak erakutsi dituzte. Lagin guztiek To baino metal gehiago dute, baina kontrolak; A, D, F eta G taldeek baino metal gehiago metatu du. Hala ere, ez daude taldeen arteko ezberdintasunik $p > 0,05$ mailan. Bestalde, desbiderazio esangarriak behatu dira kontrolean eta B eta D taldeetan.

Estuarioko 13. eguneko laginetan metal gehien duen taldea I da eta H taldeak jarraitzen dio (8. E grafikoa). Kontrolean eta To-n metal kontzentrazio baxuenak lortu dira, azken hau metal kontzentrazio baxuena duelarik. Kontrola, To eta H taldeak berdinak dira (a letra), eta I taldea hiru hauekiko desberdina da (b taldea). Kasu honetan ere desbiderazio esangarriak behatu dira, batez ere, kontrolean eta I taldean.

5. EZTABAIDA

5.1 METALOTIONEINAK

Metalotioneinak pisu molekular baxuko (6-7kDa), jarduera entzimatico gabeko eta ioi metalikoak lotzeko gaitasuna duten proteinak dira. Izan ere, metalak metalotioneinekin elkartu egiten dira hauek dituzten zisteinen hondarrekin tiolato loturak sortuz. Normalean, MT-ek Zn, Cu, edo Cd metal kopuru handia eta oso kontserbatutak diren 18-23 zisteina ondar dituzte. MT-ak oso garrantzitsuak dira, kaltegarriak izan daitezkeen agenteen aurkako prozesu babesgarrietan, baina baita ere zelulen hazkuntzan, desberdintzapenean eta ugalketan parte hartzen dutelako (Mao *et al.*, 2012). Gainera, MT-ek toxikoak diren metalen bahiketan eta detoxifikazioan ere parte hartzen dute, metalen erregulazio homeostatikoaren partaideak dira eta estres oxidatiboaren aurkako babesa eskaintzen dute. MT-ak metalen pean jartzen direnean, espresioa induzigarri altua erakusten dutenez metalen esposizio biomarkatzaile bezala erabiltzen dira metal astunen bidezko itsas-ekosistemen kutsadura neurtzeko (Mao *et al.*, 2012). MT-ak baldintza normaletan proteina zitoplasmatikoak dira, baina metalen presentzia altua dagoenean, lisosometan metatu daitezke eta nukleora zein mitokondriaren mintzen arteko espaziora garraiatu daitezke (Ye *et al.*, 2001).

Templeton eta Cherian (1991) MT-en portaera tiol taldeen kimikaren menpe dagoela aurkitu zuten. Horrela, Cu edo Zn-rikiko ezaugarri estekiometriko antzekoak dituen edozein metalak MT-ei lotu daiteke. Metal astun desberdinen artean, zinka (Zn) MT-en transkripzioaren induzitzaile eraginkorrena da, baina ez bakarra. Bestelako beste zenbait metal astunek ere (Cu, Ag, Cd edota Pb) MT-en indukzio bat sorrarazi dezaketela deskribatu da moluskuetan (Mao *et al.*, 2012). Gehienetan MT-en espresio-maila dosi kopuruaren menpekoa eta metalen kontzentrazioarekiko sentikorra da. Hala ere, metal astunek atari-maila espezifikoa gaintitzen dutenean, MT-en erantzuna metal astunekiko negatiboa izan daiteke (Cheung *et al.*, 2005). Ikerlan honetan erabilitako Cu kontzentrazioek (1000 ng/L eta 2000 ng/L) ingurumenean aurkitu daitezkeen kontzentrazioak dira, eta gure emaitzen arabera, kontzentrazio horiek baxuegiak dira MT-en indukzioa sorrarazteko. Aldez aurretik burututako zenbait saioetan, kobreak MT-en indukzioa sorrarazi du ostretan antzeko

esposizio denboretan (Géret *et al.*, 2002) baina erabilitako kontzentrazioak esangarriki handiagoak izan dira (40 µg/L). Beste esperimentu batzutan ere, MT-en indukzioa eragiten saiatu dira epe laburreko denboratan, baina ingurune garbitik ingurune kutsatura transferitu diren bibalbioek, hilabete askotako esposizioak behar dituzte MT-en kontzentrazioetan igoerak edukitzeko (Couillard *et al.*, 1995). Ondorioz, ikerlan honetako esposizioak epe laburrekoak, eta kontzentrazio esangarri baina baxuetakoak izan direnez (7 eta 14 eguneko esposizioak), ez da MT-en indukzioa ikusi. Beste alde batetik, beste metal astun batzuk bezala zilarrak ornogabe akuatikoen gametoen garapenean eta bideragarritasunean zuzenean eragin dezaketeela deskribatu da (Au *et al.* 2001a,b). Hau egiaztatzen duen beste esperimentu bat egin da zilar nanopartikulekin (AgNP). Esperimentu honetan behatu da AgNP-ko kontzentrazio baxuekin *Crassostrea virginica* ostren garapen enbrionikoa suntsitu daitekeela (Ringwood *et al.*, 2010). Ikerlan honetan Ag pean jarritako ostretan, ordea, ez da MT-en indukziorik ikusi, beharbada erabilitako dosi eta denborak ere ez direlako behar bezain altuak eta luzeak izan.

Bestalde, kontutan hartu beharra dago *C. gigas* ostraren gonadetan gametogenesisian zehar MT maila ezberdinak daudela. Arretan MT-en mailak igotzen dira gonaden garapen-faseetan zehar baina ez horrenbeste heltze-faseetan. Emeetan aldiz, MT mailak areagotzen dira obozitoen heltze prozesuraino (Meistertzheim *et al.*, 2009). MT maila altuagoak behatu dira maiatzean irailean baino, maiatzean ostrek sexu bidezko ugalketaren aktibitate maximoa dutelako, gonada helduak baitituzte. Horrek adierazten du metal batzuk ezinbestekoak direla organoak heltzean. Hau kontuan izanda eta ikerlan honetan ostrak apirilean hartu zirela kontutan hartuta, ostrak ugaltze aldian aurkitzen ziren eta MT-ren frakzio esanguratsu bat ugalketa aparatua bideratuta egon zitekeen eta beraz aukeratutako organoak (digestio-guruina) ez luke indukzio esangarri bat sortzeko bezain beste MT-rik edukiko.

Navarro *et al.* 2011-an muskuilu zebra helduekin lan egitean konturatu ziren zakatzak metalekiko arinago eta modu esangarriago batean erantzuten zutela digestio-guruinak baino. Zakatzak, azken finean, ur kutsatuarekin kontaktu zuzenean daude. Edo metalak iraitzeko helburuarekin askotan zuzenean giltzurrunera bideratzen dira eta ez dira digestio-guruinetan hainbeste behatuko. Beraz, hurrengo

ikerketa batean metala zakatzetan eta giltzurrunetan kuantifikatzea interesgarria izango litzateke.

Askotan ikusi da kontrolek metalen pean jarritako laginak baino MT kantitate handiagoak dituztela. Hau ekiditeko asmoz, etorkizuneko esperimenduetan, kontroleko ura ondo araztuta dagoela ziurtatu beharko litzateke neurketa jarraituagoak burutuz, izan ere, araztutako ur horrek beste metal batzuk izan ditzake eta metal horiek MT-en indukzioa eragin ditzakete.

Normalean, estuarioko laginetan MT kopuru baxuagoak lortu dira. Ikerlan honetan estuarioko ingurugiroa artifizialki sortu da, txorrotako eta itsasoko ur garbiak nahastuz. Baliteke itsasoko ura ondo ez araztu izanak, eta MT-en indukzioa sorrarazten duten beste metal batzuk egotea. Beste alde batetik, zenbait lanek adierazi dute zilarra bezalako metalek konportamendu desberdina erakusten dutela gatz kontzentrazio desberdinetan eta partikulatuko edota disolbatutako frakzioen proportzioa aldatzen dela gazitasun baldintzen arabera (Lanceleur et al., 2013). Horrela, partikulatutako zilarra gazitasuna emendatzen doan heinean fase disolbatura pasatzen da. Ikerlan honetan, eta ostrak izaki iragazleak izanik, posible da partikuletara itsatsita dagoen metala (estuarioko uretakoa) lotuta egonik, MT-ekin erreakzionatzeko aukera gutxiago edukitzea, eta ordea disolbatuago dagonenean (itsasoko ura) erreakzionagarritasuna handiagoa izatea.

5.2 AUTOMETALOGRAFIA

Metal atomoen sakabanaketa sekzio biologikoetan fotografiaren oinarriko printzipioak aplikatuz detektatzeko metodo autoinduzitzailea da. Ehunetan, metalak zilarrezko hauspeakin marroi-beltz moduan agertzen dira eta kamara duen argi mikroskopioaren eta BMS programa informatikoaren laguntzarekin kuantifikatu egin dira.

Kontutan hartu beharra dago autometalografiaren bidez neurtuko diren metal mailak ez direla batere espezifikoak, izan ere, autometalografiak, Cu eta Ag-a detektatzeaz gain bestelako metal guztiak detektatzen dituela eta beraien artean ezin dira ezberdindu (Zorita, 2006).

Emaitzetan ikusi den bezala, 0 denborak metal kopururik baxuena erakutsi du baina kontrolean, batzuetan, beste talde experimental batzuetan baino metal gehiago behatu da. Hori ekiditeko eta aldeztatik aipatu den bezala, etorkizuneko esperimentu batean, kontroleko ura ondo araztuta dagoela ziurtatu beharko litzateke, izan ere, araztutako ur horrek beste metal batzuk izan ditzake eta metal horiek ere, zilarra eta kobreakin batera kuantifikatu daitezke. Metalotioneinetan bezala estuarioko uretako zenbait laginetan metal kantitate baxuagoak lortu dira, eta arrazoia berdina izan daiteke, itsasoko ura ondo araztu ez izanak eta txorrotako ura aldiz, nahiko garbia egotea eta metalen eskuragarritasun ahalmena desberdina izatea uretako gazitasun baldintzak desberdinak direlako. Hala ere, aipatu beharra dago zenbait baldintza esperimentaletan bai itsasoko uretan zein estuarioko uretan, zilarrezko hauspeakin beltzen igoera esangarriak behatu direla esperimentuaren 6 eta 7. egunetan, beraz esan daiteke esposizioa efektiboa izan dela. Gainera, metalen distribuzioa ehun desberdinetan aldeztatik beste molusku batzuetan deskribatutakoen oso antzekoa da. Hau da, nagusiki digestio-lisosometan eta xafla basalean lokalizatu dira metalak (Marigómez et al., 2002). Antzaenez, metal metaketa eta detoxifikazio mekanismoak nahiz eta metal desberdinak izan eta espezie desberdinak izan moluskuetan oso antzekoak dira, eta digestio-guruina funtsezko organoa dela hemen ere berriro ere argi geratzen da.

Itsasoko uretako 14. eguneko ostretan zilarrezko hauspeakin beltzen kopuru baxuagoak behatu dira. Hau MT-ekin behatutako emaitzekin lotuta adieraziko luke erabilitako esposizio kontzentrazio eta denborak ez direla nahikoa izan ostren gainean eragin esangarria sorrarazteko eta ostrek ohiko metabolismoa errekupearatu dutela, metal guztiak digestio-guruinetara bideratu ez direlako (zuzenean giltzurrunera bioderatu direlako hemozitoen bitartez) (Marigómez *et al.*, 2002; Navarro *et al.*, 2011) edota esposizio dosiak oso baxuak izan direlako eta beraz erantzun zelularrak sortzeko nahikoak izan ez direlako. Metalotioneinetan ikusi den bezala, etorkizuneko esperimenduei begira metala zakatzetan eta giltzurrunetan kuantifikatzea interesgarria izango litzateke. Autometalografia burututako ebaki histologikoetan badago zakatzen lagina, eta bestelako molusku batzuekin gertatzen den bezala (muskuiluak) zakatzetan metalak nagusiki hemozitoetan eta gune abfrontalean metatzen dira (Soto, 1995). Hala ere, ikerketa honetan ez da gune abfrontaleko metalen metaketen kuantifikaziorik burutu, beraz etorkizun batean interesgarria izango litzateke gune horretako kuantifikazioa burutzea. Giltzurrunari dagokionez, bere tamaina txikia dela eta, zailagoa da lagin kopuru nahikoa eskuratzea MT-ak neurtzeko eta ebaki histologikoetan behar bezain tamaina handia eskuratzea.

6. ONDORIOAK

Bai autometalografiarekin lortutako emaitzetan zein metalotioneinen mailen emaitzen kasuan zenbait kontrolek metalen pean jarritako ostrek baino erantzun handiagoak erakutsi dituzte. Maila altuago horiek, beharbada esperimentuan zehar sortutako kutsaduragatik izan daiteke, beraz, hori ekiditeko etorkizuneko esperimentu batean, kontroleko ura ondo araztuta dagoela ziurtatu beharko litzateke. Orokorrean, behatutako indukzioak baxuak izan dira, beraz kontzentrazio altuagoekin eta batez ere esposizio denbora luzeagoekin emaitza esangarriagoak eskuratu zitezkeen. Kontutan hartu beharra dago, ostrek metalak giltzurrunera bideratu ditzaketela han irazitako helburuarekin eta hori dela eta, metalen presentzia digestio-tubuluetan oso mugatua litzateke metal edo MT maila baxuak kuantifikatuz. Ostretan dagoen metal maila 13. eta 14. egunetan, 6. eta 7. egunetan baino baxuagoa dela behatu da, beraz, kobrea eta zilarra metatzeko ahalmen txikia erakutsi dute ostrek. Bestalde, zenbait kasutan 0 denborako ostrek metal maila altuagoak erakutsi dituzte metalen pean egon diren ostrek baino. Hori izan daiteke ostren metabolismoa dela eta metalak jariatu eta bestelako organoetara (giltzurruna adibidez) bideratu dituztelako edota kanpo kutsadura bat gertatu delako 0 denborako animalietan. Ikusi da metalen distribuzioa ehun desberdinetan aldeztatik beste molusku batzuetan deskribatutakoen oso antzekoa dela, hau da, metal metaketa eta detoxifikazio mekanismoak nahiz eta metal desberdinak izan eta espezie desberdinak izan, moluskuetan oso antzekoak dira. Estuarioko uretan metal kontzentrazio baxuagoak lortu dira. Izan ere, ikerlan honetan estuarioko ingurugiroa artifizialki sortu da, txorrotako eta itsasoko ur garbiak nahastuz. Baliteke itsasoko ura ondo ez araztu izanak eta estuarioko ura nahiko garbi egotea eta metalen eskuragarritasun ahalmena desberdina izatea uretako gazitasun baldintzak desberdinak direlako. Hau da, partikulatutako zilarra gazitasuna emendatzen doan heinean fase disolbatura pasatzen denez, estuarioko uretan posible da partikuletara itsatsita dagoen metala lotuta egonik eta itsasoko urarekin konparatuta MT-ekin erreakzionatzeko aukera gutxiagoa izatea.

7. BIBLIOGRAFIA

- Abbe, G.R., Sanders, J.G. 1990. Pathways of silver uptake and accumulation by the American oyster (*Crassostrea virginica*) in Chesapeake Bay. Est. Coast. Shelf Sci. 31: 113-123.
- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C. 1979. Distribution of cobalt 60 in a mollusc, a crustacean and a freshwater teleost: variations as a function of the source of pollution and during elimination. Environ Pollut. 20: 199-210.
- Au, D.W.T., Lee, C.Y., Chan, K.L., Wu, R.S.S., 2001a. Reproductive impairment of sea urchins upon chronic exposure to cadmium. Part I: Effects on gamete quality. Environ. Pollut. 111: 1-9.
- Au, D.W.T., Reunov, A.A., Wu, R.S.S. 2001b. Reproductive impairment of sea urchins upon chronic exposure to cadmium. Part II: Effects on sperm development. Environ. Pollut. 111: 11-20.
- Ballan-Dufrançais, C., Jeantet, A.Y., Feghalli, C., Halpern, S. 1985. Physiological features of heavy metal storage in bivalve digestive cells and amoebocytes: EPMA and factor analysis of correspondence. Biol. Cell. 53: 283-292.
- Bardales, J.R. (2008). Isoformas de la proteína quinasa dependiente de AMPc en el molusco bivalvo *Mytilus galloprovincialis*. Purificación, caracterización funcional y distribución tisular. Universidad de Santiago de Compostela. Galicia. Doktorakuntza-tesia.pp 216.
- Bruland, K.W. 1980. Oceanographic Distributions of Cadmium, Zinc, Nickel, and Copper in the North Pacific. Earth Planet. Sci. Lett. 47(2): 176-198.
- Cabrera, F., Soldevilla, M., Cordon, R., Arambarri, P. 1987. Heavy metal pollution in the Guadamar river and the Guadalquivir Estuary (Southwest, Spain). Chemosphere. 16: 463-468.

- Cajaraville, M.P, Cancio, I., Orbea, A., Lekube, X., Marigómez, I. 1998. Detection, control and monitoring of pollution using early warning cellular biomarkers: conventional and innovative approaches based on biotechnology. *Cuad. Inv. Biol.* 20: 545-548.
- Carpene, E., George, S.G. 1981. Absorption of Cd by gills of *Mytilus edulis* (L). *Mol. Physiol.* 1: 23-34.
- Cheung, L.A.P., Lam, V.K.L., Chan, K.M. 2005. Tilapia metallothionein genes: PCR-cloning and gene expression studies. *Biochim. Biophys. Acta.* 1731: 191-201.
- Corina, E. 2012. Las coyunturas para el cuidado del Agua en Venezuela. Sarrera-data: 2014ko ekainaren 22a. <http://ecorina.blogspot.com.es/2012/03/las-coyunturas-para-el-cuido-del-agua.html>.
- Couillard, Y., Campbell, P.G.C., Tessier, A., Pellerin-Massicotte, J., Auclair, J.C. 1995. Field transplantation of a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*, across a metal contamination gradient. I. Temporal changes in metallothionein and metal (Cd, Cu, and Zn) concentrations in soft tissues. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52: 690-702.
- Danschler, G., Stoltenberg, M. 2006. Autometallography (AMG): Silver enhancement of quantum dots resulting from (1) metabolism of toxic metals in animals and humans, (2) in vivo, in vitro and immersion created zinc-sulphur/zinc-selenium nanocrystals, (3) metal ions liberated from metal implants and particles. *Prog. Histochem. Cytochem.* 41: 57-139.
- Davies, N.A., Taylor, M.G., Simkiss, K. 1997. The influence of particle surface characteristics on pollutant metal uptake by cells. *Environ. Pollut.* 96: 179-184.
- Galtsoff, P.S. 1964. The American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. *Fishery bulletin of the fish and wildlife service*, Vol. 64, USA, pp 456.

- Géret, F., Jouan, A., Turpin, V., Bebianno, M.J., Cosson, R.P. 2002. Influence of metal exposure on metallothionein synthesis and lipid peroxidation in two bivalve mollusks: The oyster (*Crassostrea gigas*) and the mussel (*Mytilus edulis*). *Aquat. Liv. Res.* 15: 61-66.
- GESAMP (IMO/FAO/UNESCO-IOC/WMO/WHO/IAEA/UN/UNEP). 2001. Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection and Advisory Committee on Protection of the Sea. A Sea of troubles. Rep. Stud. GESAMP No. 70, pp 33.
- Haraldsson, C., Westerlund, S. 1988. Trace metals in the water columns of the Black Sea and Framvaren Fjord. *Mar. Chem.* 23: 417-424.
- Hurley, J.P., Shafer, M.M., Cowell, S.E., Armstrong D E., Overdier J.T., Hughes P.E. 1996. Trace metal assessment of Lake Michigan tributaries using low-level techniques. *Environ. Sci. Technol.* 30: 2093-2098.
- Kägi, J.H.R. 1991. Overview of metallothionein. *Methods Enzymol.* 205: 613-626.
- Lanceleur L., Schafer J., Blanc G., Coynel A., Bossy C., Baudrimont M., Gle C., Larrose A., Renault S., Strady E. 2013. Silver behaviour along the salinity gradient of the Gironde Estuary. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20(3): 1352-1366.
- Lanceleur, L., Schafer, J., Bossy, C., Coynel, A., Larrose, A., Masson, M., Blanc, G. 2011. Silver fluxes to the Gironde Estuary - Eleven years (1999-2009) of monitoring at the watershed scale. *Appl. Geochem.* 26: 797-808.
- Mao, H., Wang, D.H., Yang, W.X., 2012. The involvement of metallothionein in the development of aquatic invertebrate. *Aquat.Toxicol.* 110-111: 208-213.
- Marigómez, J.A., Angulo, E., Moya, J. 1986a. Copper treatment of the digestive gland of the slug *Arion ater* L. 1. Bioassay conduction and histochemical analysis. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 36: 600-607.
- Marigómez, I., Soto, M., P. Caravajille, M., Angulo, E., Giamberini, L. 2002. Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microsc. Res. Tech.* 56: 358-292.

- McCarthy, J.F., Shugart, L.R. 1990. Biological markers of environmental contamination. Boca Raton, Lewis publishers, Chelsea, pp 3-14.
- Meistertzheim, A.L., Lejart, M., Goïc, N.L., Thébault, M.T. 2009. Sex-, gametogenesis, and tidal height-related differences in levels of HSP70 and metallothioneins in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 152:234-239.
- Navarro, A., Faria, M., Barata, C., Piña, B. 2011. Transcriptional response of stress genes to metal exposure in zebra mussel larvae and adults. *Environ. Pollut.* 159: 100-107.
- Nordberd, G.F, Fowler, B.A, Nordberg, M., Friberg, L. 2007. Handbook on the toxicology of metals, third edition, Elsevier, Oxford, pp 969.
- OSPAR Commission. 2000. Quality Status Report 2000: Region IV-Bay of Biscay and Iberian Coast. OSPAR Commission, London, UK, pp 134.
- Parrish, C.S., Uchrin, C.G. 1990. Runoff-induced metals in Lakes Bay, New Jersey. *Environ. Toxicol. Chem.* 9: 559–567.
- Rainbow, P.S., Dallinger, R. 1993. Metal uptake, regulation and excretion in freshwater invertebrates. *Ecotoxicology of metals in invertebrates*, Lewis publishers, Boca Raton, pp 119-131.
- Recio, A., Marigómez, I., Angulo, E., Moya, J. 1988. Zinc treatment of the digestive gland of the slug *Arion ater* L. 1. Cellular distribution of zinc and calcium. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 41: 858-864.
- Regoli, F., Nigro, M., Orlando, E. 1992. Effects of copper and cadmium on the presence of renal concretions in the bivalve *Donacilla cornea*. *Comp. Biochem. Physiol.* 102C: 189-192.
- Ringwood, A.H., McCarthy, M., Bates, T.C., Carrol, D.L. 2010. The effects of silver nanoparticles on oyster embryos. *Mar. Environ. Res.* 69: S49-S51.

- Robinson, W.E., Ryan, D.K. 1988. Transport of cadmium and other metals in the blood of the bivalve mollusc *Mercenaria mercenaria*. *Mar. Biol.* 97: 101-109.
- Schutz, D.F., Turekian, K.K. 1965. The distribution of cobalt, nickel, and silver in ocean water profiles around Pacific Antarctica. *J. Geophys. Res.* 70: 5519-5528.
- Soto, M. 1995. Simultaneous quantification of bioavailable metals in molluscs by means of cellular and tissue analysis. UPV/EHU. Leioa. Doctoradutza-Tesia. pp 330.
- Soto, M., Cajaraville, M.P., Angulo, E., Marigómez, I. 1996a. Autometallographic localization of protein-bound copper and zinc in the common winkle, *Littorina littorea*: a light microscopical study. *Histochem. J.* 28: 1-13.
- Soto, M., Marigómez, I. 1997. Metal bioavailability assessment in "Mussel Watch" programmes by automated image analysis of BSD in digestive cell lysosomes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 156: 141-150.
- Soto, M., Quincoces, I., Lekube, X., Marigómez, I. 1998. Autometallographed metal content in digestive cells of winkles: a cost-effective screening tool to monitor Cu and Zn pollution. *Aquat. Toxicol.* 40: 123-140.
- Templeton, D.M., Cherian, M.G. 1991. Toxicological significance of metallothionein. *Meth. Enzymol.* 205: 11-24.
- 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. *Mar. Environ. Res.* 44: 69-84.
- Ye, B., Maret, W., Vallee, B.L. 2001. Zinc metallothionein imported into liver mitochondria modulates respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98(5): 2317-2322.
- Yonge, C.M. 1926. The digestive diverticula in Lamallibranchia. *Trans. Roy. Soc. Edinburgh.* 54: 703-718.

Zarogian, G., Jackim, E. 2000. In vivo metallothionein and glutathione status in an acute response to cadmium in *Mercenaria mercenaria* brown cells. Comp. Biochem. Physiol. 127: 251-261.

Zorita, I. 2006. Development of cellular biomarkers of metal exposure and effects for the assessment of environmental pollution in coastal areas. UPV/EHU. Leioa. Doctoradutza-Tesia. pp 271.