



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Avaluació de biomarcadors com indicadors d'estrès oxidatiu a bivalves

Miguela Méndez Garcia

Grau de Bioquímica

Any acadèmic 2013-14

DNI de l'alumne: 41571558R

Treball tutelat per Silvia Tejada Gavela
Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut

S'autoritza la Universitat a incloure el meu treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línea, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Paraules clau del treball:

Biomarcadors, estrès oxidatiu, enzims antioxidants, sistema de detoxificació, metalls pesants, *Mytilus galloprovincialis*, activitat catalítica, transcripció gènica.

Agraïments

Encara que aquest treball tenguí el meu nom, darrera ell hi ha tot un conjunt de persones que han fet possible que pugui realitzar-lo, ja sigui de forma directe, ajudant-me al laboratori i a l'hora de redactar la memòria, o de forma indirecta, ja que hi ha hagut moltes persones que, sabessin o no el que realment estava fent, m'han donat ànims en tot moment.

En primer lloc he de donar les gràcies a la meva tutora, Silvia, perquè sempre que he tengut qualsevol dubte ha estat allà per ajudar-me i donar-me consell. Estic molt agraïda de tot el que has fet per jo, de la teva atenció i, sobretot, dels ànims que hem donaves cada cop que et deia que havia acabat un treball o que un examen m'havia anat bé. També per la infinitat d'e-mails que t'he enviat i dels que sempre he rebut resposta, i per les hores que hauràs dedicat per ajudar-me a dur a terme aquest treball.

Per altra banda, he d'agrair la feina feta per en Toni Sureda i en Xavi Capó a nivell de laboratori, ja que han estat els que m'han guiat un poc pel laboratori i els que m'han ajudat quan hi ha hagut qualque problema de lab. També vull donar les gràcies a n'Alberto, na Marga i n'Alex per la seva "mà d'obra" a l'hora d'homogeneïtzar les mostres i per la seva companyia al laboratori, i, com a darrera incorporació dins el laboratori, he d'agrair l'ajuda per part de n'Ainhoa a l'hora de dur a terme procediments llargs al laboratori.

Finalment, agrair els ànims que he rebut per totes les altres persones, tant per companys i amics de classe, Lida, Raquel, Pere, Andrea, Patri, Lidia,...com per part dels meus familiars, sobretot els meus pares, el meu germà i la meva parella, que sense saber ben bé el que estava fent, m'han donat ànims en tot moment i s'han preocupat per l'avanç del meu treball demanant-me pràcticament dia a dia: "com dus el treball? ".

Encara que no hagin tengut res a veure amb el treball, jo crec que he arribat fins aquí gràcies a tots els professors que han format part d'aquesta segona generació del Grau de Bioquímica, ja que, ara que he arribat al meu darrer curs, m'he adonat que realment han valgut la pena aquests 4 anys d'esforç i que, ara mateix, em sent ben formada per seguir endavant amb la meva carrera, moltes gràcies a tots.

Resum

Els biomarcadors permeten dur a terme estudis de biomonitorització de la contaminació marina, en aquest cas, a *Mytilus galloprovincialis* per dur a terme un estudi comparatiu entre tres zones de Sicília, Priolo, on hi ha una refinaria, i dues zones netes, Brucoli i Messina. L'estudi ha permès determinar l'estat oxidatiu dels musclos mitjançant tota una sèrie de biomarcadors, així com, el dany oxidatiu ocasionat com a conseqüència de l'augment de la producció de les espècies reactives d'oxigen (ROS) generades pel sistema de detoxificació. S'ha dut a terme la determinació de l'activitat enzimàtica de la catalasa (CAT), com enzim constituent del sistema antioxidant, i de la glutatió-S-transferasa (GST), com a component del sistema de detoxificació de xenobiòtics de fase II, mitjançant tècniques espectrofotomètriques. Per altra banda, s'ha realitzat l'estudi de la citocrom P4501A, constituent del sistema de detoxificació de fase I, mitjançant la determinació de la seva expressió amb la realització d'un PCR a temps real (PCR-RT). Juntament amb aquest, s'ha dut a terme la determinació de l'expressió dels gens de la CAT i la GST, així com de les metal·lotioneïnes (MT10 i MT20) per observar la seva inducció per metalls pesants. Finalment, s'ha estudiat el dany oxidatiu observant els canvis en la peroxidació lipídica, determinant la concentració de malondialdehid (MDA) i, per altra banda, determinant l'activitat de l'acetilcolinesterasa (AChE), ambdues mitjançant tècniques espectrofotomètriques. Els resultats obtinguts mostren com els musclos de la zona contaminada (Priolo) presenten un major estrès oxidatiu, mostrant una elevació dels enzims del sistema de defensa antioxidant i de detoxificació, així mateix, també han mostrat una elevació del nivell de MTs i dels indicadors de dany oxidatiu, fet que indica que l'augment del sistema de defensa antioxidant no ha estat suficient per fer front a la producció dels ROS.

Abstract

Biomarkers are able to realize marine pollution biomonitoring assays, in this case, in *Mytilus galloprovincialis* to perform a comparative study of tree locations in Sicily, Priolo, where there is a refinery, and two clean zones, Brucoli and Messina. This study has enabled to determinate the oxidative status of the mussels, using a group of biomarkers, and the oxidative damage produced as a consequence of the production increase of the reactive oxygen species (ROS) that are generated by the detoxification system. It has been performed the enzymatic activity determination of catalase (CAT), as an antioxidant system constituent, and glutathione-S-transferase (GST), as a phase II detoxification system constituent, by means of spectrophotometric methods. Otherwise, it has been performed a gene expression determination of cytochrome P4501A, as a constituent of the phase I detoxification system using a real time PCR (RT-PCR). Furthermore, it has been determined the gene expression of CAT and GST, and metallothioneins (MT10 and MT20) in order to observe the metal induction of the last ones. Finally, it has been studied the oxidative damage, concretely the lipid peroxidation variation, determining the malondialdehyde (MDA) concentration, and the acetylcholinesterase (AChE) activity variation, both by spectrophotometric techniques. Results obtained shown an increase of the oxidative stress in the mussels of the polluted location (Priolo), with an increase of the defense and detoxification enzymes levels, MTs levels and in the oxidative damage indicators that showed that the rise in antioxidant capacity to remove the excess production of ROS was not enough to avoid oxidative damage.

Índex

Introducció.....	6
Objectiu.....	11
Disseny experimental.....	12
Materials i mètodes.....	14
Resultats.....	18
Discussió.....	22
Conclusió.....	26
Bibliografia.....	27

Introducció

L'ecosistema marí es troba afectat per la contaminació des dels inicis de la civilització humana, afectant a tota la biodiversitat present. Hi ha diferents fonts de contaminació, entre les que trobem els pesticides, fàrmacs, olis i metalls pesants (Gonzalez-Rey and Bebianno, 2013; Shahidul Islam and Tanaka, 2004). El Mar Mediterrani representa tan sols un 0,82% de l'àrea oceànica del món, però els organismes marins que hi trobem formen part d'un 4-18% de les espècies marines presents a tot el món, llavors trobem un elevat nombre d'espècies si es té en compte la petita part que representa aquest mar.

Avui dia hi ha una elevada urbanització a la zona litoral que comporta una pressió antròpica a l'ecosistema degut a un augment de la contaminació, la sobrepesca, la destrucció d'hàbitats i la introducció de noves espècies alienes. Tot això dóna lloc a pensar que el Mediterrani és un dels mars amb major impacte degut a l'efecte de tots aquests factors i del canvi climàtic, pel qual també es veu afectat. Tots aquests fets fan que el Mar Mediterrani estigui considerat com un punt geogràfic amb elevat interès d'investigació (Lejeune et al., 2010).

Per altra banda, cal considerar la importància de la presència de petroquímiques, on els productes del petroli constitueixen un conjunt de contaminants ambientals que acaben arribant al medi marí. Els productes derivats del petroli consisteixen en hidrocarburs no policíclics, hidrocarburs cíclics, hidrocarburs olefínics, hidrocarburs aromàtics, composts sulfurats, composts de nitrogen-oxigen i metalls pesants, els quals poden variar segons el seu origen. Un cop entren al medi marí, aquests pateixen alteracions físiques, químiques i biològiques modificant la toxicitat i els efectes ecotoxicològics d'aquests contaminants ambientals. D'entre aquests composts, cal destacar els hidrocarburs aromàtics policíclics (PAHs), els quals són els productes més tòxics que s'obtenen, ja que al ser composts hidrofòbics presenten una elevada facilitat per interaccionar amb molècules cel·lulars unint-se a llocs lipofílics, de manera que, si interaccionen amb una molècula clau del procés cel·lular, s'indueix una resposta tòxica que finalment podria arribar a comprometre la integritat de l'organisme desencadenant processos apoptòtics (Châtel et al., 2011; Lima et al., 2007).

Els bivalves, i més concretament els musclos, s'utilitzen molt sovint per la monitorització de l'estat ambiental coster i com marcadors de contaminació; de fet, *Mytilus* spp. ha estat emprat en un gran nombre d'estudis de contaminació marina, ja que es tracta d'un bon bioindicador degut a diverses raons donant tota una sèrie d'avantatges. En primer lloc, per la seva mida i la seva vida sedentària, ja que és fàcil de recol·lectar i identificar; la seva àmplia distribució dins tota la Mar Mediterrània, pel fet de garantir una quantitat suficient de teixits per estudiar; per presentar una bona tolerància i capacitat d'adaptació a un ampli rang de condicions ambientals; i per ser un animal filtrador de metabolisme lent i alt ràtio de filtració, la qual cosa dóna lloc a una bioacumulació de substàncies químiques als seus teixits (Box et al., 2007; Farcy et al., 2013; Fernández et al., 2011; Kamel et al., 2012).

Els biomarcadors ens permeten determinar de forma quantitativa els canvis que tenen lloc a nivell cel·lular, bioquímic, molecular o fisiològic, a partir de les cèl·lules, fluids corporals o

òrgans dels organismes. D'aquesta manera podem obtenir informació sobre l'estat de l'organisme i sobre l'efecte que puguin tenir els canvis ambientals damunt ell, obtenint una avaluació integrada de l'efecte de l'exposició a contaminants als sistemes biològics (Vidal-Liñán and Bellas, 2013). Els biomarcadors d'estrès es troben actualment en ús a diferents nivells, tant per estudis humans com animals. Hi ha diversos biomarcadors, com els biomarcadors d'exposició, que són indicatius d'estrès ambiental, i els biomarcadors d'efectes, indicatius de l'exposició a contaminants, que s'empren per determinar l'estrès dels organismes aquàtics exposats a contaminants ambientals (Chatel et al., 2010). A musclos hi ha tot un conjunt d'enzims que han estat emprats durant els darrers anys com biomarcadors, ja que, degut a que aquests organismes poden tolerar altes concentracions de contaminants, permeten l'estudi del seu estat oxidatiu front aquests, podent així dur a terme estudis de monitorització de la contaminació marina (Banni et al., 2005; Giuliani et al., 2013; Vidal-Liñán and Bellas, 2013; Vlahogianni et al., 2007).

En els darrers anys s'ha progressat en la identificació de nous biomarcadors a bivalves, encara que hi ha una considerable variació en la resposta dels biomarcadors bioquímics segons el tipus i la quantitat de l'agent al que s'exposa, l'espècie, el teixit i el moment del mostreig. A més dels biomarcadors bioquímics, trobem altres tipus de biomarcadors com immunomarcadors cel·lulars (Cotou et al., 2013). Entre els principals biomarcadors de monitorització de la contaminació marina emprats a bivalves, més concretament a *M. galloprovincialis*, trobem enzims antioxidants, com la catalasa (CAT); enzims de detoxificació, com el citocrom P450 (CYP) i la glutatió-S-transferasa (GST); enzims marcadors de neurotoxicitat, com l'acetilcolinesterasa (AChE); metabòlits marcadors de lipotoxicitat, com el malondialdehid (MDA); i marcadors de contaminació per metalls pesants, com les metal·lotioneïnes (MTs), entre d'altres (Banni et al., 2005; Gonzalez-Rey and Bebianno, 2013; Kamel et al., 2012; Knapen et al., 2007; Lionetto et al., 2003; Snyder, 2000).

És important que hi hagi un balanç entre les espècies prooxidants i els antioxidants a les cèl·lules per mantenir la homeòstasi cel·lular (Vlahogianni et al., 2007). La producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS) té lloc en condicions normals als organismes aerobis com a subproductes de processos naturals com, per exemple, la respiració cel·lular (Livingstone, 2001; Vidal-Liñán and Bellas, 2013). Però aquesta situació es troba compensada pel propi sistema antioxidant de l'organisme, el qual protegeix les cèl·lules i els organismes front els efectes de la generació de ROS, mantenint estable l'estat redox cel·lular i uns nivells relativament baixos de ROS.

A pesar d'això, hi ha situacions en les que la producció de ROS augmenta degut a la presència de xenobiòtics, fet pel qual és necessari que els organismes marins també presentin un sistema antioxidant que els hi permeti dur a terme processos d'eliminació de compost tòxic procedents de la contaminació. Aquests composts estimulen la producció de ROS mitjançant diversos processos com són les reaccions redox amb oxigen o la autooxidació (Livingstone, 2001). Llavors els contaminants poden donar lloc a un desequilibri entre la producció de ROS i els sistemes de defensa antioxidant, de forma que la producció de ROS supera la seva

eliminació, constituint-se un desbalanç que du a un estat d'estrès oxidatiu. Aquest estrès oxidatiu, en el que els radicals lliures poden reaccionar amb els diferents elements cel·lulars (com són proteïnes, lípids i ADN), pot donar lloc a un dany oxidatiu que pot concloure amb la mort cel·lular (Boscolo Papo et al., 2013; Vidal-Liñán and Bellas, 2013).

El sistema de defensa antioxidant es troba format per antioxidants enzimàtics, com la superòxid dismutasa (SOD), que converteix el radical lliure anió superòxid en peròxid d'hidrogen; la CAT, capaç de transformar el peròxid d'hidrogen en aigua; i la glutatió peroxidasa (GPX), que també redueix el peròxid d'hidrogen oxidant el glutatió reduït i actua sobre els hidroperòxids lipídics (veure figura 1); i antioxidants no enzimàtics, com el glutatió, la vitamina E i l'ascorbat (Valavanidis et al., 2006). Ambdós tipus són els responsables de l'eliminació tant de les ROS endògenes com les exògenes. Als organismes marins, sobretot als bivalves, els nivells d'expressió dels enzims antioxidants canvien considerablement quan es troben en un ambient on hi ha un augment de substàncies tòxiques, és a dir, en un medi contaminat, cosa que permet estudiar l'efecte dels contaminants sobre aquests; llavors, s'empren com a biomarcadors d'estrès oxidatiu (Kamel et al., 2012; Vlahogianni et al., 2007).

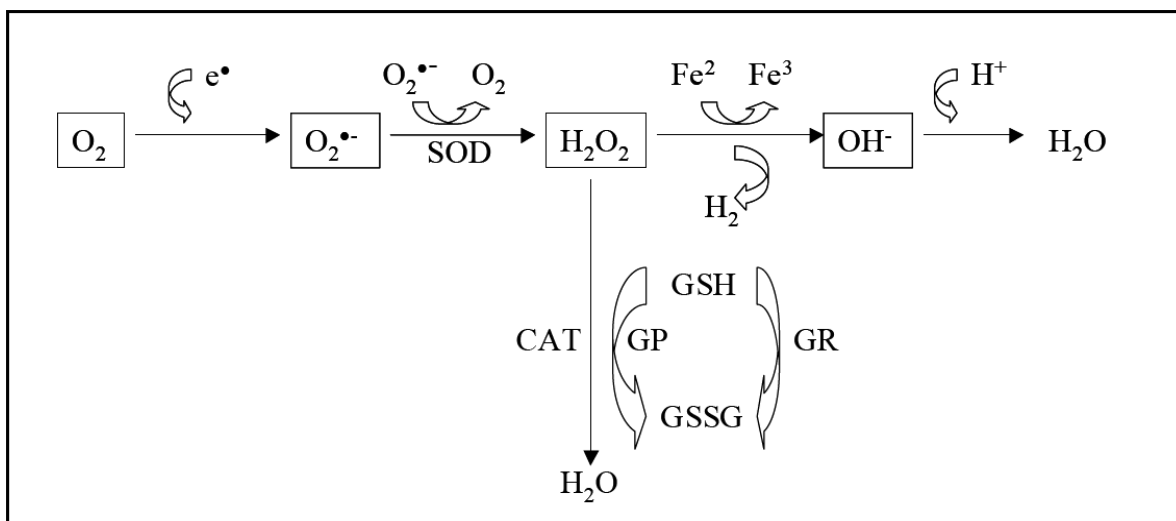


Figura 1. Principals espècies reactives d'oxigen (ROS) i enzims antioxidants

Però, a més, l'eliminació dels xenobiòtics procedents de la contaminació es du a terme mitjançant processos de biotransformació, procés que consisteix en la transformació de composts orgànics per fer-los més hidrofílics i així poder-los eliminar més fàcilment mitjançant reaccions de tipus I, entre les quals destaquen les dutes a terme pels enzims del sistema CYP, i de tipus II, on podem destacar la família de les GST.

La biotransformació a partir d'enzims de fase I, propis del sistema de les CYP, es realitza a partir de reaccions d'hidroxilació, deaminació oxidativa i epoxidació, entre d'altres. Els productes d'aquests es conjuguen amb enzims de fase II donant lloc finalment a les ROS. Llavors, aquest procés també comporta la formació d'espècies tòxiques com són les ROS, les quals l'organisme intenta eliminar mitjançant processos de defensa antioxidant (Giuliani et al., 2013; Snyder, 2000).

Dins el sistema del CYP s'han reconegut varies subfamílies que són actives front diversos substrats, des de drogues o substàncies contaminants fins a esteroides o neurohormones. La subfamília P4501A del citocrom (CYP1A) presenta un paper important en la biotransformació de composts contaminants com els PAHs, llavors la presència d'aquests induïx al CYP1A mitjançant el receptor citosòlic Ah (AhR), el qual és enviat al nucli en presència de PAHs, on s'uneix a l'element de resposta a dioxina (DRE) iniciant la transcripció de tot un conjunt de gens entre els que trobem el CYP1A i la GST, entre d'altres. Per aquest fet, la determinació dels nivells d'expressió gènica d'aquests s'empra per la monitorització de contaminants ambientals, ja que al augmentar la presència de contaminants com els PAHs, s'indueix la resposta d'aquests gens, de forma que es dona un augment de la seva expressió (Boscolo Papo et al., 2013; Cajaraville et al., 2000; Regoli et al., 2011; Regoli and Principato, 1995).

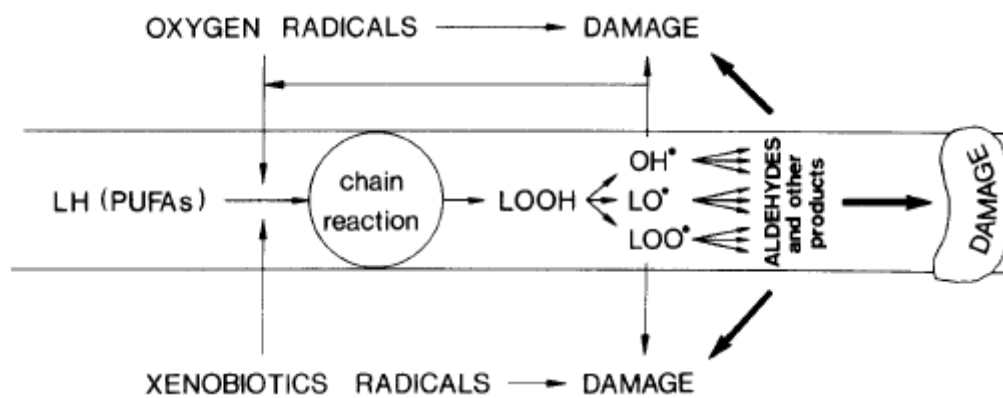


Figura 2. Procés de formació d'aldehids i altres productes que donen lloc a un dany oxidatiu mitjançant la lipoxidació dels àcids grassos poliinsaturats (PUFAs) (Esterbauer et al., 1991).

Tal com s'ha dit anteriorment, quan la producció de ROS supera la seva eliminació hi ha un estat d'estrès oxidatiu, de forma que les ROS interactuen amb les biomolècules de l'organisme. Quan les ROS interaccionen amb els lípids es diu que té lloc una lipoxidació, en la qual els àcids grassos poliinsaturats (PUFAs) donen lloc a peròxids de lípids, els quals són inestables i es descomponen formant diferents composts, entre els que podem trobar composts carbonils reactius com el MDA, aldehyd amb una alta toxicitat degut a la seva afinitat específica per les proteïnes i l'ADN (Figura 2). Llavors, el MDA és útil com a biomarcador de lipoxidació, sobretot en estats d'estrès oxidatiu induït per metalls, ja que s'ha vist que l'exposició a certs metalls a múscols afecta a l'activitat dels enzims antioxidants i augmenta la peroxidació lipídica. Aquesta lipoxidació i els danys resultants es troben regulats pels sistemes antioxidants i per les metal·lotioneïnes (Boscolo Papo et al., 2013; Farcy et al., 2013; Valavanidis et al., 2006).

Les metal·lotioneïnes són un tipus de proteïnes solubles de baix pes molecular que es troben a nivell citosòlic, nuclear i lisosomal, i que tenen la capacitat d'unir-se de forma selectiva a certs metalls gràcies a la seva composició rica en cisteïnes. Es troben implicades en la homeòstasi dels metalls pesants essencials com el coure (Cu) o el zinc (Zn), la detoxificació

de cations metàl·lics tòxics com el cadmi (Cd) i el mercuri (Hg), la protecció front a l'estrès oxidatiu i la regulació de l'expressió de certs gens. A més, es caracteritzen per ser induïbles a diverses espècies aquàtiques després de la seva exposició a metalls, de forma que s'incrementen els nivells d'aquestes de forma significativa. Aquest fet permet la seva utilització a programes de biomonitorització per determinar el nivell de contaminació per metalls a l'ambient, mitjançant, per exemple, la determinació de l'expressió gènica de les MTs, proposat com a biomarcador sensible i eficient per aquest tipus de biomonitorització (Banni et al., 2007; Cajaraville et al., 2000; Knapen et al., 2007; Valavanidis et al., 2006). A musclos s'han descrit dos tipus principals de metal·lotioneïnes, MT10 i MT20, que s'uneixen a l'excés de metalls procedents de la contaminació, els quals s'acumulen a les cèl·lules, protegint a l'organisme front la toxicitat que comporta la seva acumulació (Banni et al., 2007).

L'AChE és un enzim implicat en la transmissió de l'impuls nerviós que du a terme la hidròlisi del neurotransmissor acetilcolina en colina i àcid acètic. Aquest enzim es troba normalment a les membranes, tant de vertebrats com d'invertebrats, controlant el transport iònic i jugant un paper essencial a les sinapsis colinèrgiques i els processos de conducció nerviosa a unions neuromusculars. L'activitat de l'AChE es veu afectada per la presència de pesticides organofosfatats i carbamats, i de metalls, que inhibeixen la seva activitat unint-se de forma reversible o irreversible al seu centre catalític de forma que hi ha una disrupció de la neurotransmissió colinèrgica que dona lloc a un deteriorament del funcionament del sistema nerviós. Aquest fet també dona lloc a repercussions a funcions determinants per la supervivència com l'alimentació i la capacitat de fer front a l'exposició d'espècies tòxiques. Llavors, aquest enzim també s'empra com a bioindicador de contaminació ambiental, ja que en presència d'aquests composts s'observa una disminució de la seva activitat (Farcy et al., 2013; Lionetto et al., 2003; Vidal-Liñán and Bellas, 2013; Vieira et al., 2008).

La determinació de l'activitat dels enzims o de la concentració de proteïnes no enzimàtiques per dur a terme els estudis de biomonitorització de contaminació ambiental es poden realitzar mitjançant tècniques espectrofotomètriques, ja sigui determinant la seva activitat o la seva concentració, mitjançant estudis del nivell de proteïna per western blot o a nivell d'expressió mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa a temps real (RT-PCR).

Objectiu

L'objectiu general del present treball va ser la determinació de diferents biomarcadors de l'estat oxidatiu als múscols *Mytilus galloprovincialis* a zones netes i contaminada per avaluar els efectes sobre paràmetres bioquímics i avaluar la seva validesa i utilitat com indicadors de contaminació.

Aquest objectiu general es pot dividir en altres objectius més concrets:

- Posar a punt la metodologia mitjançant la prova de les diferents tècniques amb diferents quantitats d'homogenat de la mostra dels múscols per determinar la quantitat necessària que dóna un rang de valors apropiats.
- Veure els efectes sobre els mecanismes antioxidants i dany oxidatiu estudiant diferents enzims implicats en aquest procés i el seu canvi front a una situació d'estrès oxidatiu, així com, les conseqüències del seu desbalanç, que dóna lloc a dany oxidatiu a diferents nivells.
- Veure els efectes sobre mecanismes de detoxificació mitjançant l'estudi de dos enzims implicats a les diferents fases d'aquest mecanisme i els canvis en la seva activitat i expressió front a un augment de l'estrès oxidatiu.
- Posar a punt l'activitat de l'acetilcolinesterasa per tècniques espectrofotomètriques mitjançant la recerca d'estudis en els que s'ha emprat aquesta metodologia i la creació d'un protocol, així com la prova de la metodologia per determinar la quantitat d'homogenat adequada a emprar per l'obtenció de resultats òptims.

Disseny experimental

1. Selecció de l'organisme i espècie apropiada

Els musclos bivalves són organismes marins que presenten tota una sèrie de característiques que permeten la seva utilització per dur a terme estudis de monitorització de la contaminació marina a llocs concrets gràcies al seu estil de vida sedentari. A més, el fet que siguin filtradors i que siguin capaços d'acumular diferents contaminants, tant orgànics com inorgànics, podent sobreviure front a elevades concentracions de productes tòxics, permet dur a terme un estudi a zones que presenten elevades concentracions de contaminants, on altres organismes no podrien sobreviure. Per altra banda, la seva mida i la seva facilitat de recol·lecció permeten que el treball de camp sigui menys complicat, sent suficient la mida dels òrgans per dur a terme les diferents determinacions (Bocchetti et al., 2008; Box et al., 2007; Gonzalez-Rey and Bebianno, 2013; Sureda et al., 2011).

L'espècie *Mytilus galloprovincialis* ha estat escollida per la seva àmplia distribució al llarg de la Mar Mediterrània, lloc en el qual es du a terme l'estudi, més concretament, a Sicília (Cajaraville et al., 2000; Sureda et al., 2011).

2. Selecció dels biomarcadors apropiats

Els biomarcadors seleccionats s'han escollit de forma que es contemplin els canvis a conseqüència de l'augment de l'estrès oxidatiu induït pels contaminants presents, a tots els sistemes implicats i afectats. La catalasa representa un enzim dins els sistema antioxidant, el citocrom P450 i la glutatió-S-transferasa són dos dels enzims constituents del sistema de detoxificació i biotransformació dels xenobiòtics de fase I i II, respectivament. Per altra banda, l'estudi de les metal·lotioneïnes permet observar l'efecte dels metalls pesants presents al medi marí, i el malondialdehid i l'acetilcolinesterasa permeten estudiar dos tipus de dany oxidatiu, originats com a conseqüència del desbalanç causat per la presència dels diferents contaminants.

A més, el fet d'emprar tot aquest conjunt de biomarcadors permet dur a terme una visió més completa dels efectes dels contaminants sobre aquests organismes marins, ja que l'estudi d'uns pocs no permet dur a terme un estudi complet dels efectes de la contaminació, mentre que en conjunt si representen un bon mètode de biomonitorització (Cajaraville et al., 2000; Farcy et al., 2013; Vidal-Liñán and Bellas, 2013).

3. Teixit de l'organisme idoni

L'hepatopàncrees ha estat seleccionat pel fet de ser l'òrgan encarregat dels processos de detoxificació i biotransformació dels xenobiòtics, de forma que és el lloc on s'espera una major formació d'espècies reactives d'oxigen (ROS) com a conseqüència d'aquest procés, que conduiran a una elevació dels enzims implicats en el sistema antioxidant, així com, a un possible dany oxidatiu com a conseqüència de l'augment de les ROS (Benedetti et al., 2009; Lionetto et al., 2003; Regoli et al., 2011).

4. Tècniques emprades

La utilització de tècniques espectrofotomètriques permet dur a terme la determinació de l'activitat de diversos enzims d'una manera relativament ràpida, fàcil i econòmica. A més, la seva utilització s'ha donat a varis estudis de monitorització, obtenint-se tot un conjunt de resultats òptims. Llavors, la seva utilització és troba estesa a un ampli rang d'estudis de biomonitorització de la contaminació marina (Akcha et al., 2000; Banni et al., 2005; Bocchetti et al., 2008; Lau and Wong, 2003; Sarkar et al., 2006).

Per altra banda, aquestes tècniques s'han complementat amb la utilització de la PCR a temps real per poder dur a terme un estudi més apurat i poder observar la correlació entre l'activitat i la inducció de l'expressió d'alguns dels gens d'estudi.

Materials i mètodes

1. Lloc de mostreig

El mostreig es va dur a terme a tres zones del sud d'Itàlia, concretament 3 zones a Sicília (Figura 3). Messina ($38^{\circ} 11' 0''$ N, $15^{\circ} 33' 0''$ E) va ser la zona considerada com a zona control, per altra banda, Priolo ($37^{\circ} 10' 0''$ N, $15^{\circ} 11' 0''$ E), a on es troba una refineria que suposa un impacte ambiental a la zona, va ser la regió on es van recollir els musclos de la zona considerada com a contaminada, i finalment, a Brucoli ($37^{\circ} 17' 3''$ N, $15^{\circ} 11' 16''$ E) que va ser la considerada com a zona neta.

Els musclos, *Mytilus galloprovincialis*, de $5,3 \pm 0,1$ cm de llarg i $2,7 \pm 0,07$ cm d'ample, es van recollir a Messina l'octubre de 2013, a Priolo al desembre de 2013 i a Brucoli al gener de 2014, i tots van ser immediatament congelats.

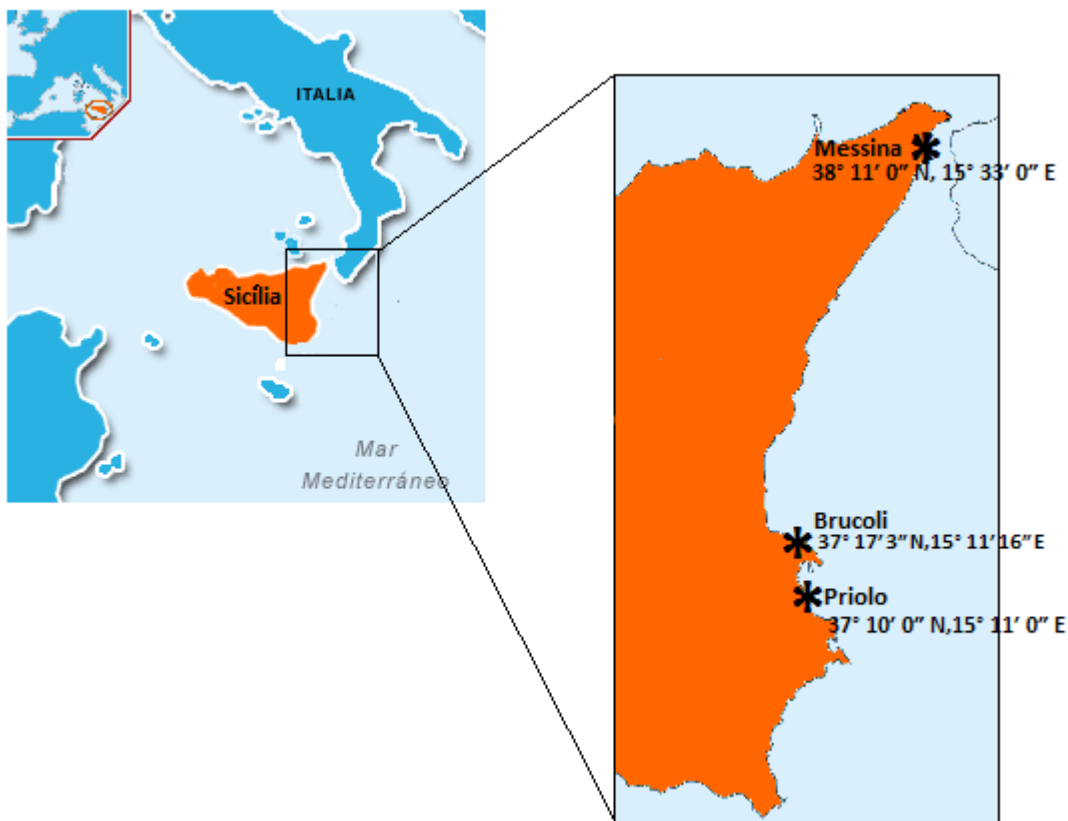


Fig. 3: Esquema de les zones de mostreig seleccionades a Sicília. Messina com a zona control, Priolo com a zona contaminada i Brucoli com a zona neta.

2. Característiques dels musclos

Els musclos emprats per l'obtenció de les mostres de teixit van ser seleccionats un per un tenint en compte les seves mesures, tant la llargària com l'amplària, amb la intenció d'aconseguir un conjunt de mostres homogeni que fos comparable. D'aquesta manera es poden evitar possibles variacions en les determinacions dutes a terme posteriorment, que podrien ser degudes a diferències en les seves mides (veure taula 1).

Taula 1: Mesures dels musclos

Zona de procedència dels musclos	Llargària(cm)	Amplària(cm)
Zona control	5,3 ± 0,1	2,6 ± 0,06
Zona neta	5,4 ± 0,1	2,7 ± 0,09
Zona contaminada	5,2 ± 0,1	2,6 ± 0,05

Mesures tenint en compte la llargària i l'amplària dels musclos *M. galloprovincialis* de les zones control, neta i contaminada. Els valors representen la mitja ± S.E.M.

3. Preparació de l'extracte de teixit

Per dur a terme els diferents anàlisis es va extreure l'hepatopàncrees de cada espècimen i es va separar en dos tubs *ependorfs*, un per dur a terme les determinacions bioquímiques i l'altre per l'extracció de ARN.

Per dur a terme les determinacions bioquímiques les mostres es van homogeneïtzar en 10 volums (w/v) de tampó Tris-HCl 50 mM pH 7,4 diluït 1/100. Llavors es van centrifugar a 9000 x g a 4°C durant 15 minuts i es va recollir el sobrenedant per les determinacions bioquímiques.

Per altra banda, l'altre fragment de mostra es va processar per dur a terme l'extracció de ARN amb Tripure (Roche Diagnostics[®], Alemanya).

Tots els resultats foren referenciats amb el contingut total de proteïnes de les mostres (kit Biorad[®] ProteinAssay) emprant albúmina sèrica bovina com a estàndard.

4. Determinació malondialdehid

La concentració de malondialdehid (MDA) es va analitzar mitjançant un kit colorimètric específic per la determinació de MDA segons les instruccions del fabricant (Calbiochem[®], San Diego, California, USA), que es basa en la unió del MDA al N-metil-2-fenilindol donant lloc a la formació d'un cromòfor amb absorbància a 586 nm (Esterbauer et al., 1991), de forma que mesurant a aquesta absorbància podem conèixer la quantitat de MDA present, la qual serà proporcional a la quantitat d'absorbància obtinguda.

Finalment, la concentració de MDA es va calcular emprant una corba estàndard de concentració coneguda.

5. Determinació de les activitats enzimàtiques

La determinació de les activitats enzimàtiques es va dur a terme espectrofotomètricament mitjançant l'espectrofotòmetre Shimadzu UV-2100 a 25°C, variant la longitud d'ona segons la determinació.

L'activitat de la catalasa es va determinar pel mètode establert per Aebi (1984), el qual es basa en l'avaluació de la desaparició del H₂O₂ a 240 nm. Per dur a terme la determinació es van emprar cubetes de quars en les quals es van afegir 2 ml de tampó fosfat 50 mM a pH 7, 50 µl d'homogenat del teixit, 1 ml de H₂O₂ al 3,4%, i, a continuació, es dugué a terme la lectura a 240 nm.

Per altra banda, l'activitat de la glutatió-S-transferasa (GST) es va determinar emprant glutatió reduït (GSH) i 1-cloro-2,4-dinitrobenzè (CDNB) com a substrats. En aquest cas es van afegir 750 µl de tampó fosfat 100 mM a pH 6,5, 100 µl de GSH 4 mM, 50 µl d'homogenat, 50 µl de CDNB 1 mM i, a continuació, es dugué a terme la lectura a 314 nm.

Finalment, l'activitat de l'acetilcolinesterasa (AChE) es va determinar mitjançant el mètode de Ellman i col·laboradors (1961) que consisteix en la utilització d'àcid-5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoic (DNTB) i acetilcolina com a substrats, els quals donen lloc a la formació de 5-mercapto-2-nitrobenzoat, que presenta coloració groga, de forma proporcional a la quantitat d'enzim present, llavors es mesura l'aparició d'aquest producte a l'espectrofotòmetre. Les passes dutes a terme per la determinació de l'activitat de l'AChE foren les següents: es van afegir a una cubeta 850 µl de tampó fosfat 0,1 M a pH 7,5, 50 µl d'homogenat, 50 µl d'acetilcolina (ACh) 8,25 mM, 50 µl de DNTB 8 mM, i, per acabar, es dugué a terme la lectura a 412 nm.

6. Determinació de l'expressió de gens

L'expressió de l'ARNm de les metal·lotioneïnes (MT10 i MT20), el citocrom P450 (CYP), la catalasa (CAT) i la glutatió-S-transferasa es van determinar mitjançant PCR a temps real (RT-PCR) emprant com a referència l'expressió de l'ARNr 18S. Per dur a terme aquest procés es va dur a terme l'aïllament del ARN total de l'hepatopàncrees de *M. galloprovincialis* mitjançant l'extracció amb Tripure (Roche Diagnostics®, Alemanya).

A continuació, es va dur a terme la transcripció inversa de l'ARN obtingut afegint una *mix* composta per Mg²⁺, inhibidor d'ARNases, nucleòtids marcats (donen lloc a fluorescència quan s'uneixen al canviar la seva conformació), *random* hexàmers i la transcriptasa inversa, mitjançant el termociclador, exposant-los a diferents temperatures: 1 minut a 90°C, 60 minuts a 42°C, després pujà fins a 99°C i ho deixà a 4°C; obtenint-se l'ADNc necessari per dur a terme l'amplificació, la qual es va dur a terme emprant el kit LightCycler DNA SYBR Green (Roche Diagnostics®, Alemanya). Per dur a terme l'amplificació es va afegir a cada pouet 3 µl de l'ADNc i 7 µl d'una mescla que contenia per cada mostra 1,752 µl d'aigua lliure d'ARNases, 0,376 µl de cada *primer* (*reverse* i *forward*) i 5 µl de SYBR Green.

Els ADNc es van amplificar seguint els següents passos: una preincubació de 5 minuts a 95°C, seguida de cicles que consisteixen en períodes de 15 segons a 95°C, 30 segons a 45°C i 20 segons a 72°C, i un cop passats els cicles baixa a 40°C. Cada un es va realitzar amb els seus *primers* corresponents i el nombre de cicles òptims indicats a la taula 2.

Taula 2: Primers i cicles emprats a les RT-PCRs

Gen	Primers	Cicles
18S ribosòmic Genebank no. L33452	Fw: 5'-TCGATGGTACGTGATATGCC-3' Rv: 5'-CGTTTCTCATGCTCCCTCTC-3'	40
MT-10 Genebank no. AY566248	Fw: 5'-GGGCGCCGACTGTAAATGTTC-3' Rv: 5'-CACGTTGAAGGYCCTGTACACC-3'	40
MT-20	Fw: 5'-GTGAAAGTGGCTGCGGA-3'	40

Genebank no. AY566247	Rv: 5'-GTACAGCCACATCCACACGC-3'	
CYP3A1	Fw: 5'-TGA ACTCGCAAAAAGAACCA -3'	40
Genebank no. AB479539	Rv: 5'-GGAACACTGGAGCCTTGAAC-3'	
CAT	Fw: 5'-CGACCAGAGACAACCCACC-3'	55
Genebank no. AY743716	Rv: 5'-GCAGTAGTATGCCTGTCCATCC-3'	
GSTpi	Fw: 5'-TCCAGTTAGAGGCCGAGCTGA-3'	55
Genebank no. AF527010	Rv: 5'-CTGCACCAGTTGGAAACCGTC-3'	

Primers emprats indicant per cada un d'ells la seqüència *foward* (Fw) i *reverse* (Rv), així com el codi corresponent de la base de dades Genebank de cada gen i el nombre de cicles de les RT-PCRs òptims emprats per cada un d'ells.

7. Anàlisi estadístic

L'anàlisi estadístic es dugué a terme mitjançant el programa estadístic SPSS (versió 16.0 para Windows®) comparant la significança estadística amb un anàlisi de la variància (ANOVA) tenint en compte els tres grups de mostres (zona control, zona neta, zona contaminada). Prèviament se va dur a terme el test de homogeneïtat de la variància (test de Levene) de les dades. Els resultats s'han expressat com mitja \pm S.E.M., considerant significativa una $p < 0,05$.

Resultats

1. Determinació activitat enzims de detoxificació i defensa antioxidant

L'activitat dels enzims antioxidants catalasa (CAT) i glutatió-S-transferasa (GST), determinats a partir de l'hepatopàncrees dels múscols *Mytilus galloprovincialis* es troben augmentats en els de la zona contaminada comparant amb les zones control basal i neta (Figura 4).

En el cas de la CAT trobem un augment significatiu de l'activitat en els múscols de la zona contaminada respecte els de la zona control ($p < 0,05$); a més, l'activitat en els múscols de la zona neta es manté en uns nivells similars als de la zona control, de forma que també trobem una diferència significativa entre l'activitat de la CAT dels múscols de la zona neta i els de la zona contaminada ($p < 0,05$) (Figura 4A).

Per altra banda, a la GST també s'observa una major activitat en els múscols de la zona contaminada, amb una diferència estadísticament significativa respecte als de la zona control ($p < 0,05$), encara que, els múscols de la zona neta, al presentar uns nivells més elevats de l'activitat de la GST que els múscols de la zona control, no presenten una diferència significativa respecte als múscols de la zona contaminada ($p > 0,05$) (Figura 4B).

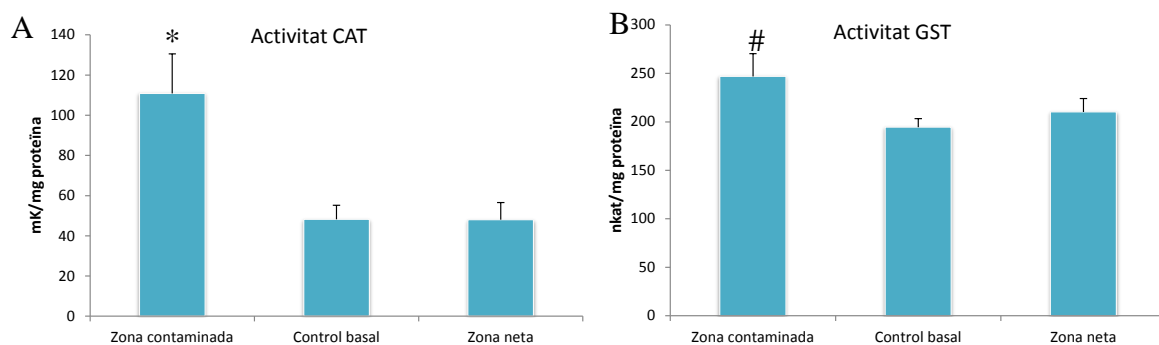


Figura 4: Activitat dels enzims antioxidants: (A) Catalasa (CAT; mk/mg de proteïna) i (B) Glutatió-S-transferasa (GST; nkat/mg de proteïna); ambdós determinats a partir de l'hepatopàncrees de múscols *M. galloprovincialis* de 3 zones diferents: zona contaminada, zona considerada com a control basal i zona neta. $p < 0,05$ (*) representa diferències significatives entre la zona contaminada i les altres zones (control i neta), i (#) representa diferències significatives entre la zona contaminada i el control basal..

2. Determinació de l'expressió de gens

L'expressió de l'ARNm dels gens de les metal·lotioneïnes, tant MT10 com MT20, determinada a l'hepatopàncrees dels múscols *M. galloprovincialis* es pot observar a la figura 5. L'expressió de l'ARNm de les dues isoformes de les metal·lotioneïnes es troba augmentada en els múscols de la zona contaminada, presentant una diferència significativa en ambdós casos respecte els múscols de la zona control basal ($p < 0,05$).

En canvi, quan determinem la diferència en els nivells d'expressió als múscols de la zona neta veiem diferències entre les isoformes, de forma que la diferència d'expressió entre la zona neta i la contaminada a la isoforma MT10 presenta una diferència significativa ($p < 0,05$), mentre que no existeix a la isoforma MT20 ($p > 0,05$).

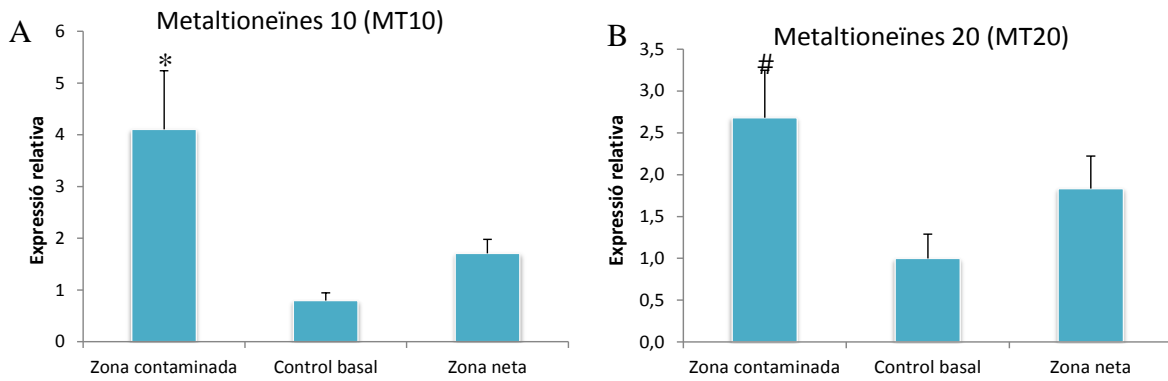


Figura 5: Expressió relativa de l'ARNm de les dues isoformes del gen de les metal·lotioneïnes, (A) MT10 i (B) MT20, determinada a partir de l'hepatopàncrees dels múscols *M. galloprovincialis* de 3 zones diferents: zona contaminada, zona considerada com a control basal i zona neta. $p < 0,05$ (*) indica diferències significatives entre la zona contaminada i les altres zones (control i neta), i (#) indica diferències significatives entre la zona contaminada i el control basal.

Per altra banda, l'expressió de l'ARNm dels gens d'enzims antioxidants, en concret, de la CAT i la GST, es troben representats a la figura 6. En aquest cas també s'observa en ambdós casos un augment a nivell general de l'expressió en els múscols *M. galloprovincialis* de la zona contaminada en comparació a les altres zones estudiades.

A pesar d'això, en el cas de la CAT, aquesta major expressió relativa és molt baixa, de forma que, si ho comparem amb l'expressió que presenten els múscols de la zona de control basal, no trobem diferències significatives. De la mateixa manera, si comparem l'expressió de la CAT dels múscols de la zona control amb els de la zona contaminada tampoc és significativa ($p > 0,05$).

A diferència del que trobem per la CAT, l'expressió d'ARNm dels gens de la GST sí que presenten una diferència significativa tant si considerem l'expressió dels múscols de la zona contaminada respecte de la zona control, com la dels múscols de la zona neta ($p < 0,05$).

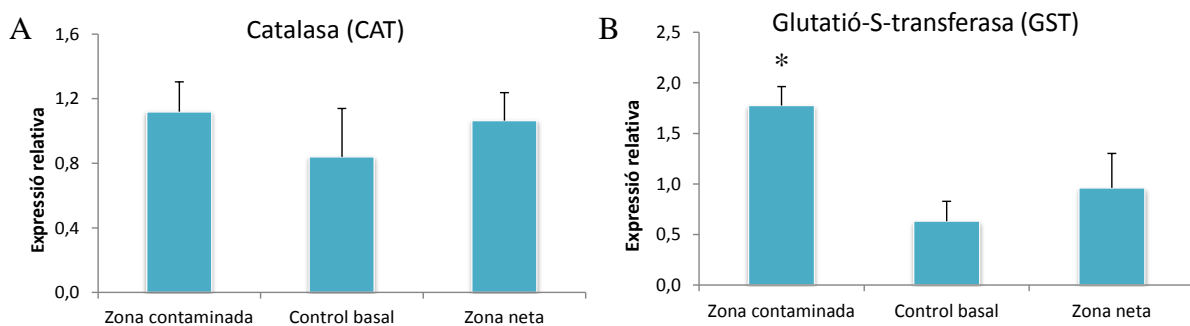


Figura 6: Expressió relativa de l'ARN dels gens dels enzims antioxidants: (A) Catalasa (CAT) i (B) Glutatió-S-transferasa (GST); determinada a partir de l'hepatopàncrees de múscols *M. galloprovincialis* de 3 zones diferents: zona contaminada, zona considerada com a control basal i zona neta. $p < 0,05$ (*) indica diferències significatives entre la zona contaminada i les altres zones (control i neta).

Finalment, a la figura 7 trobem representada l'expressió relativa de l'ARNm del gen del citocrom P450 (CYP), el qual podem observar que presenta una major expressió en els músculs *M. galloprovincialis* presents a la zona contaminada.

A pesar d'això, la diferència d'expressió entre els músculs de la zona contaminada i els de la zona control no és significativa ($p > 0,05$). De la mateixa manera, si consideram els nivells d'expressió de la zona neta, tampoc observam una diferència estadísticament significativa entre l'expressió que presenten els músculs de la zona neta respecte els de la zona contaminada, encara que, a nivell general, hi ha una tendència a incrementar en aquesta darrera en comparació a les altres zones ($p > 0,05$).

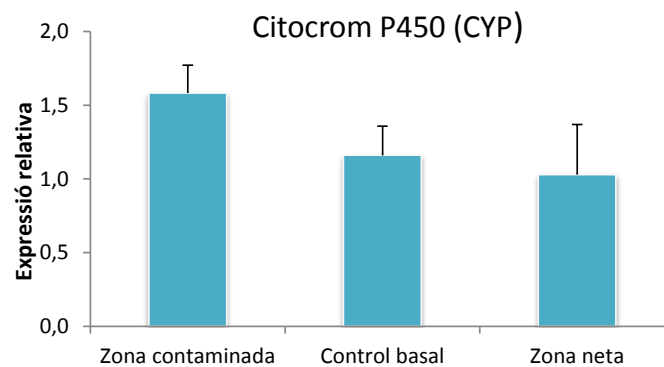


Figura 7: Expressió relativa de l'ARNm del gen del CYP determinada a partir de l'hepatopàncrees de músculs *M. galloprovincialis* de 3 zones diferents: zona contaminada, zona considerada com a control basal i zona neta. Es considera significatiu $p < 0,05$. En aquests cas no existeixen diferències estadísticament significatives. Els nivells d'ARNm es varen calcular en relació a un valor d'1.

3. Determinació malondialdehid (MDA)

La concentració de MDA present a l'hepatopàncrees procedent dels músculs *M. galloprovincialis* de diferents llocs mostra una variació notable tal com es veu representat a la figura 8, on els nivells de MDA dels músculs de la zona contaminada presenten una elevació significativa respecte de la zona considerada com a control basal, així com de la zona neta ($p < 0,05$).

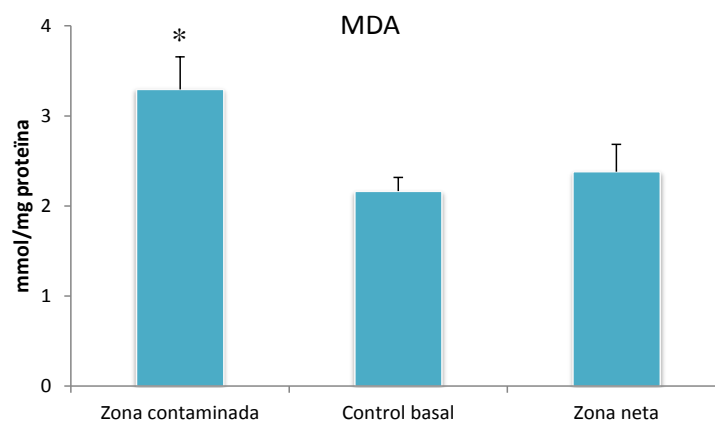


Figura 8: Concentració de MDA (mmol/mg de proteïna), determinada a partir de l'hepatopàncrees de músculs *M. galloprovincialis* de 3 zones diferents: zona contaminada, zona considerada com a control basal i zona neta. $p < 0,05$ (*) representa diferències significatives entre la zona contaminada i les altres zones (control i neta).

4. Determinació acetilcolinesterasa (AChE)

L'activitat de l'AChE, com biomarcador de neurotoxicitat, se mostra a la figura 9. Se pot observar una diferència significativa entre l'activitat present als múscols de la zona contaminada respecte la zona control ($p < 0,05$); en canvi, l'activitat en els múscols de la zona neta no presenta una diferència significativa respecte la zona contaminada i basal ($p > 0,05$). A pesar d'això, tal com es pot observar, a nivell general, l'activitat es troba més disminuïda a la zona contaminada.

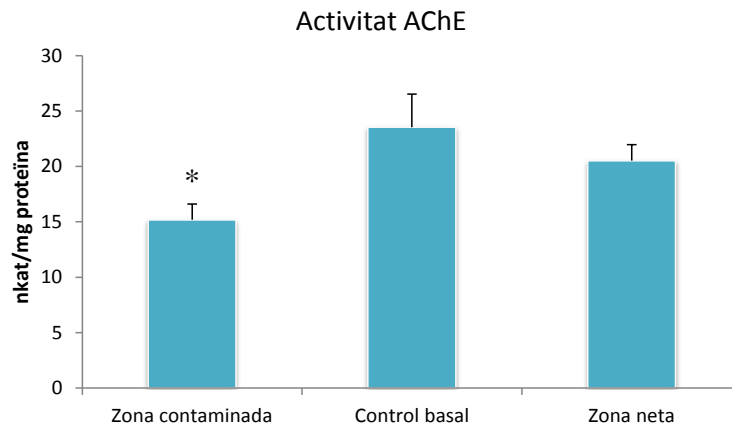


Figura 9: Activitat de l'acetilcolinesterasa (AChE; nkat/mg de proteïna) determinada a l'hepatopàncrees de múscols *M. galloprovincialis* de 3 zones diferents: zona contaminada, zona considerada com a control basal i zona neta. $p < 0,05$ (*) significa diferències significatives entre la zona contaminada i el control basal.

Discussió

El present estudi ha permès observar diferències significatives al músculo *Mytilus galloprovincialis* entre diferents zones de diferent impacte antropogènic. En els resultats obtinguts s'ha observat un augment general als músculs de la zona contaminada de l'activitat dels enzims antioxidants i dels enzims de detoxificació, així com dels nivells d'expressió dels gens que codifiquen per algunes de les proteïnes que constitueixen aquests sistemes. Aquest fet indica que hi ha un augment dels nivells d'estrès oxidatiu a nivell cel·lular, que conduïrien a un augment de les espècies reactives d'oxigen (ROS), les quals donen lloc a certes conseqüències, com la disminució observada de l'activitat de l'acetilcolinesterasa (AChE) degut a un procés de neurotoxicitat, i de l'augment dels nivells de malondialdehid (MDA), com a conseqüència d'un procés de lipotoxicitat.

Les característiques de la zona escollida han permès un estudi sobre el nivell de contaminació a músculs comparant una zona on hi trobem una refineria, a Priolo (Sicília), amb una àrea control, a Messina, i una àrea neta, a Brucoli, ambdues també situades a Sicília, de forma que podem saber l'impacte que té la refineria sobre l'ecosistema marí present a aquest lloc. Per la realització de l'estudi s'han fet servir diferents biomarcadors al músculo *M. galloprovincialis*, ja que les característiques que presenten aquests afavoreixen la seva utilització per dur a terme estudis de biomonitorització de la contaminació de diferents zones (Farcy et al., 2013; Fernández et al., 2011; Kamel et al., 2012). El fet de comparar la zona d'interès amb una zona control i una zona neta ens permet contemplar tant els factors biòtics com abiòtics que poden donar lloc a variacions en els nivells dels biomarcadors, ja que realment els coneixements que es tenen sobre la formació de ROS deguda a factors endògens i exògens a animals marins és limitada i, per tant, és difícil determinar les variacions a biomarcadors que són degudes a factors biològics de les que són degudes a factors ambientals (Narbonne et al., 1999; Regoli et al., 2011; Valavanidis et al., 2006).

Una part dels productes obtinguts de petroquímiques i refineries van a parar al medi marí, on podem destacar tant composts orgànics com inorgànics. Els músculs són capaços d'assimilar els composts presents al medi marí, i, a més, també tenen la capacitat de dur a terme la seva bioacumulació, fet pel qual intenten eliminar-los. Aquests són metabolitzats pels organismes marins mitjançant el sistema de detoxificació, el qual permet la conversió de xenobiòtics lipofílics en composts més solubles en aigua, procés que comporta la formació de ROS, els quals han de ser eliminats a partir dels enzims del sistema antioxidant (Akcha et al., 2000; Bocchetti et al., 2008; Cajaraville et al., 2000; Châtel et al., 2011; Lima et al., 2007; Regoli and Principato, 1995). Els músculs són organismes que es caracteritzen per ser filtradors, amb un estil de vida sedentari i una elevada capacitat per fer front a elevades concentracions de contaminants. A més, tenen la capacitat de dur a terme, com ja s'ha comentat, una bioacumulació de composts orgànics, com els hidrocarburs aromàtics policíclics (PAHs), així com d'inorgànics, com els metalls pesants. Totes aquestes característiques en conjunt permeten el seu ús per dur a terme estudis de biomonitorització marina. *M. galloprovincialis* és un tipus de mol·lusc que trobem de forma abundant al Mar Mediterrani i que, per tant, és un dels més emprats en aquests estudis a la Mar Mediterrània (Fernández et al., 2011; Kamel et al., 2012; Narbonne et al., 1999; Sureda et al., 2011; Vidal-Liñán and Bellas, 2013).

De tots els enzims antioxidants, la catalasa (CAT) pot considerar-se un dels enzims amb major importància biològica dins el sistema antioxidant, ja que és l'encarregada de la transformació del H_2O_2 en H_2O i O_2 , de forma que si el H_2O_2 no es transforma dona lloc al radical hidroxil ($HO\cdot$), una de les formes més tòxica i reactiva de les ROS (Cheung et al., 2004; Kamel et al., 2012; Vlahogianni et al., 2007). Encara que l'estudi de la seva expressió no ha donat diferències significatives entre els músculs de les diferents zones, l'augment en la seva activitat sí que es veu incrementada en els músculs de la zona contaminada, mostrant diferències significatives front a la zona control i neta. El fet que els nivells de missatger no difereixen entre les diferents zones pot ser degut a una diferent evolució temporal de la resposta i/o a un temps de vida curt de l'ARNm corresponent, hipòtesi ja postulada a altres estudis on s'ha observat una elevada activitat però un baix nivell de missatger (Regoli et al., 2011).

La citocrom P4501A (CYP1A) constitueix el principal enzim de detoxificació de fase I de la biotransformació de xenobiòtics, el qual s'ha demostrat que s'indueix front a contaminants ambientals, podent ser emprat com a biomarcador de contaminació (Boscolo Papo et al., 2013; Cajaraville et al., 2000; Regoli et al., 2011). Els presents resultats mostren un augment significatiu de la seva expressió en els músculs de la zona contaminada, a pesar d'això, no presenta una diferència significativa front als altres. Aquest fet pot ser explicat per l'augment de la presència d'oxiradicals, ja que s'ha vist que l'augment d'aquests pot donar lloc a una inhibició de l'expressió del gen del CYP1A de forma indirecta, degut al fet que aquests són capaços d'activar vies de senyalització de factors de transcripció d'estrès, concretament, factor nuclear potenciador de les cadenes lleugeres kappa de les cèl·lules B activades (NF-kB) i el factor nuclear I (NFI), els quals seran els que duran a terme la inhibició de l'expressió de CYP1A (Leonard et al., 2004; Regoli et al., 2011). Per altra banda, també podria ser degut a la presència de metalls prooxidants, els quals s'ha observat que són capaços de suprimir la inducció de la via de detoxificació mediada pel CYP mitjançant mecanismes post-transcripcionals (Benedetti et al., 2009; Regoli et al., 2011).

Per altra banda, la glutatió-S-transferasa (GST) és un dels principals enzims de biotransformació de fase II dels xenobiòtics, el qual s'encarrega de conjuguar els productes del procés de detoxificació de fase I amb el glutatió evitant, d'aquesta forma, que interaccionin amb els components cel·lulars. La seva expressió és induïble, al igual que la del CYP1A, per agonistes del receptor citosòlic Ah (AhR), com els contaminants orgànics, els quals s'uneixen a aquests potenciant la seva expressió (Regoli et al., 2011). A pesar d'això, els resultats són diversos, de fet, en alguns estudis es veu inhibit i a altres no s'han observat canvis (Cotou et al., 2013; Tsangaris et al., 2010); per exemple, s'ha vist que l'activitat a brànquies de *M. galloprovincialis* es veu significativament disminuïda front a elevats nivells de benzo[a]pirens (Akcha et al., 2000). Els resultats obtinguts al present treball en relació a l'enzim GST mostren un augment, tant de la seva activitat com de la seva expressió, als músculs de la zona contaminada comparada amb els músculs de la zona control, encara que aquest augment no mostra diferències significatives front l'activitat de la GST dels músculs de la zona neta, però els nivells de missatgers sí resulten significatius; per tot això, cabria la possibilitat d'esperar

que si s'ampliés el nombre de mostres s'observaria una diferència significativa en aquesta activitat.

Les metal·lotioneïnes són una família de proteïnes que es troben involucrades en la homeòstasi dels metalls pesants i la seva expressió es troba augmentada a organismes que es troben a ambients que presenten una elevada concentració de metalls pesants, fet pel qual són útils en estudis de biomonitorització de contaminació marina (Banni et al., 2007; Cajaraville et al., 2000; Knapen et al., 2007; Valavanidis et al., 2006; Viarengo et al., 2007). Per altra banda, també cal indicar, que certs estudis han destacat que, a més de la seva inducció per la presència de metalls pesants, en alguns casos aquesta és deguda a composts orgànics aromàtics, els quals donaran lloc a la formació de oxiradicals, afectant sobretot a l'expressió de la isoforma MT20. A aquesta isoforma concreta s'ha observat un gran augment de la seva expressió en presència de Cu i H₂O₂ (Banni et al., 2007; Dondero et al., 2005; Viarengo et al., 2007). La isoforma MT10 mostra nivells elevats a nivell basal a la glàndula digestiva dels musclos i la seva expressió augmenta front a la presència de metalls pesants essencials (Cu, Zn) i no essencials (Cd, Hg) (Banni et al., 2007; Dondero et al., 2005). El present estudi ha mostrat un augment significatiu de les dues isoformes als musclos de la zona contaminada respecte la zona control, mentre que respecte la zona neta sols la isoforma MT10 ha mostrat diferències significatives.

A part dels enzims de detoxificació i de defensa antioxidant, també presenten un paper important en els estudis de biomonitorització de la contaminació marina biomarcadors de lipotoxicitat i neurotoxicitat, com són els estudiats en aquest cas, el MDA i l'AChE, respectivament.

Els enzims antioxidants, com la CAT, intenten fer front a la peroxidació lipídica causada per la presència de ROS la qual dona lloc a la formació de productes secundaris com és el MDA, però quan els nivells de contaminants són elevats, l'activitat d'aquest enzim pot no ser suficient per reduir els nivells de peroxidació lipídica, de forma que es troben augmentats. Aquest fet s'ha pogut observar prèviament mitjançant varis estudis ecotoxicològics en els quals s'ha observat un augment dels nivells de peroxidació lipídica davant l'exposició de contaminants orgànics i metalls pesants a organismes marins (Lau and Wong, 2003; Pampanin et al., 2005; Vlahogianni et al., 2007), on cal destacar l'estimulació de la peroxidació lipídica a estudis amb *M. galloprovincialis* front a l'exposició de metalls cadmi, coure i mercuri (Valavanidis et al., 2006). En aquest estudi s'ha observat un augment significatiu dels nivells de MDA als musclos de la zona contaminada respecte les altres zones, fet que indica que realment els nivells de contaminants presents dins aquesta zona són més elevats, de forma que el sistema antioxidant no és suficient per fer front a la producció de ROS que es du a terme, causant com a conseqüència una lipotoxicitat.

L'AChE té un paper important en el funcionament del sistema nerviós colinèrgic, ja que és l'enzim responsable de la hidròlisi del neurotransmissor acetilcolina en colina i àcid acètic (Gonzalez-Rey and Bebianno, 2013; Lionetto et al., 2003). La seva inhibició es troba directament relacionada amb la presència de pesticides, organofosfats i insecticides carbamats en concentracions elevades. El fet que els musclos puguin sobreviure a elevades

concentracions d'aquests composts, a diferència dels vertebrats que són extremadament sensibles a aquests, fa que puguin ser útils per dur a terme els estudis de biomonitorització de contaminació (Lionetto et al., 2003; Viarengo et al., 2007). Els músculs de la zona contaminada estudiats presenten una inhibició de l'activitat d'aquest enzim que resulta significativa si ho comparem amb la zona control, però que no és significativa amb la zona neta encara que els seus valors s'aproximen més als de la zona control; és a dir, indica que aquest enzim ha estat inhibit per la presència de contaminants, el que podria indicar efectes a nivell neurotòxic.

Tenint en compte tots els paràmetres estudiats, juntament amb el fet de saber que hi trobem una refineria, podem considerar que els contaminants presents a la zona de Priolo són elevats en comparació amb les zones control i neta de Messina i Brucoli, respectivament. Llavors, els nivells elevats dels diferents productes de la refineria donen lloc a un augment dels sistemes antioxidants per fer front a l'eliminació dels composts tòxics, així com, a la formació de ROS que comporten. Tot junt, dona com a resultat, efectes a nivell de lipotoxicitat i neurotoxicitat.

Podem considerar que la utilització de forma conjunta de diverses tècniques que ens permeten determinar per una banda la activitat dels enzims i, per l'altra, l'expressió dels gens corresponents, permet dur a terme de forma més precisa l'estudi, ja que en alguns casos la presència de diversos factors poden donar lloc a variacions en els nivells de biomarcadors, com es el cas de la CAT, en la qual trobem diferències en els nivells d'expressió i l'activitat present a l'hepatopàncrees dels músculs. Per altra banda, veiem com el nivell d'expressió del CYP1A no ha donat resultats significatius, fet que pot ser degut a la influència d'altres contaminants, que inhibeixen la seva activitat impedit que es pugui dur correctament el procés de biotransformació i detoxificació dels contaminants, possiblement degut a una exposició crònica, o simplement per la influència de la presència d'una concentració elevada de metalls pesants que causen efectes directes sobre la seva funció (Benedetti et al., 2009; Leonard et al., 2004). Així mateix, la comparació dels músculs de la zona d'estudi amb una zona control i una zona neta ha permès dur a terme una determinació més precisa dels efectes de la refineria, ja que els factors com la temperatura i la salinitat, els quals en alguns casos poden donar lloc a variacions (Vidal-Liñán and Bellas, 2013), es tenen en compte en els músculs de la zona control i de la zona neta, de forma que obtenim uns resultats més encaminats a la determinació de la variació dels biomarcadors deguda única i exclusivament, dins la mesura del possible, als efectes de la contaminació.

Conclusió

La presència de contaminants a la zona de Priolo ocasiona una situació d'estrès oxidatiu provocant un increment dels sistemes antioxidants i dels mecanismes de detoxificació del músculo *Mytilus galloprovincialis* per fer front al increment de producció de radicals lliures. Així mateix aquest dany oxidatiu s'ha pogut observar degut als increments de la peroxidació lipídica i a la reducció en la activitat de la acetilcolinesterasa, fet que indica que l'elevació dels enzims del sistema antioxidant no ha estat suficient per fer front a l'elevada producció d'espècies reactives d'oxigen que comporten els mecanismes de detoxificació. Dins els contaminants implicats en aquests efectes, podem considerar d'importància la presència dels metalls pesants, la concentració dels quals possiblement tengui un pes important en la contaminació d'aquesta zona tal com s'ha pogut observar amb la inducció de les metal·lotioneïnes.

A més, les tècniques utilitzades han resultat una bona eina per avaluar la situació oxidativa del *M. galloprovincialis*, ja que gràcies als resultats que s'han obtingut en conjunt s'ha pogut dur a terme una valoració de l'estat de contaminació de Priolo, sense que s'obtinguin resultats contradictoris o inconcloents.

Bibliografia

- Aebi, H. E., 1984, Catalase, *Methods in Enzymatic Analysis*, p. 115-127.
- Akcha, F., C. Izuel, P. Venier, H. Budzinski, T. Burgeot, and J. Narbonne, 2000, Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo: *Aquat Toxicol*, v. 49, p. 269-287.
- Banni, M., F. Dondero, J. Jebali, H. Guerbej, H. Boussetta, and A. Viarengo, 2007, Assessment of heavy metal contamination using real-time PCR analysis of mussel metallothionein mt10 and mt20 expression: a validation along the Tunisian coast: *Biomarkers*, v. 12, p. 369-83.
- Banni, M., J. Jebali, M. Daubeze, C. Clerandau, H. Guerbej, J. F. Narbonne, and H. Boussetta, 2005, Monitoring pollution in Tunisian coasts: application of a classification scale based on biochemical markers: *Biomarkers*, v. 10, p. 105-16.
- Benedetti, M., D. Fattorini, G. Martuccio, M. Nigro, and F. Regoli, 2009, Interactions between trace metals (Cu, Hg, Ni, Pb) and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*: oxidative effects on biotransformation pathway: *Environ Toxicol Chem*, v. 28, p. 818-25.
- Bocchetti, R., D. Fattorini, B. Pisanelli, S. Macchia, L. Oliviero, F. Pilato, D. Pellegrini, and F. Regoli, 2008, Contaminant accumulation and biomarker responses in caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, to evaluate bioavailability and toxicological effects of remobilized chemicals during dredging and disposal operations in harbour areas: *Aquat Toxicol*, v. 89, p. 257-66.
- Boscolo Papo, M., L. Maccatrozzo, D. Bertotto, F. Pascoli, E. Negrato, C. Poltronieri, G. Binato, A. Gallina, and G. Radaelli, 2013, Expression of CYP4 and GSTr genes in *Venerupis philippinarum* exposed to benzo(a)pyrene: *Ann Anat*.
- Box, A., A. Sureda, F. Galgani, A. Pons, and S. Deudero, 2007, Assessment of environmental pollution at Balearic Islands applying oxidative stress biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, v. 146, p. 531-9.
- Cajaraville, M. P., M. J. Bebianno, J. Blasco, C. Porte, C. Sarasquete, and A. Viarengo, 2000, The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach: *Sci Total Environ*, v. 247, p. 295-311.
- Chatel, A., B. Hamer, H. Talarmin, G. Dorange, H. C. Schroder, and W. E. Muller, 2010, Activation of MAP kinase signaling pathway in the mussel *Mytilus galloprovincialis* as biomarker of environmental pollution: *Aquat Toxicol*, v. 96, p. 247-55.
- Cheung, C. C., W. H. Siu, B. J. Richardson, S. B. De Luca-Abbott, and P. K. Lam, 2004, Antioxidant responses to benzo[a]pyrene and Aroclor 1254 exposure in the green-lipped mussel, *Perna viridis*: *Environ Pollut*, v. 128, p. 393-403.
- Châtel, A., B. Hamer, Z. Jakšić, V. Vucelić, H. Talarmin, G. Dorange, H. C. Schröder, and W. E. Müller, 2011, Induction of apoptosis in mussel *Mytilus galloprovincialis* gills by model cytotoxic agents: *Ecotoxicology*, v. 20, p. 2030-41.
- Cotou, E., C. Tsangaris, and M. Henry, 2013, Comparative study of biochemical and immunological biomarkers in three marine bivalves exposed at a polluted site: *Environ Sci Pollut Res Int*, v. 20, p. 1812-22.
- Dondero, F., L. Piacentini, M. Banni, M. Rebelo, B. Burlando, and A. Viarengo, 2005, Quantitative PCR analysis of two molluscan metallothionein genes unveils differential expression and regulation: *Gene*, v. 345, p. 259-70.
- ELLMAN, G. L., K. D. COURTNEY, V. ANDRES, and R. M. FEATHER-STONE, 1961, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity: *Biochem Pharmacol*, v. 7, p. 88-95.

- Esterbauer, H., R. J. Schaur, and H. Zollner, 1991, Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes: *Free Radic Biol Med*, v. 11, p. 81-128.
- Farcy, E., T. Burgeot, H. Haberkorn, M. Auffret, L. Lagadic, J. P. Allenou, H. Budzinski, N. Mazzella, R. Pete, M. Heydorff, D. Menard, F. Mondeguer, and T. Caquet, 2013, An integrated environmental approach to investigate biomarker fluctuations in the blue mussel *Mytilus edulis* L. in the Vilaine estuary, France: *Environ Sci Pollut Res Int*, v. 20, p. 630-50.
- Fernández, B., J. A. Campillo, C. Martínez-Gómez, and J. Benedicto, 2011, Micronuclei and other nuclear abnormalities in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) as biomarkers of cyto-genotoxic pollution in mediterranean waters: *Environ Mol Mutagen*, v. 52, p. 479-91.
- Giuliani, M. E., M. Benedetti, A. Arukwe, and F. Regoli, 2013, Transcriptional and catalytic responses of antioxidant and biotransformation pathways in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to chemical mixtures: *Aquat Toxicol*, v. 134-135, p. 120-7.
- Gonzalez-Rey, M., and M. J. Bebianno, 2013, Does selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) fluoxetine affects mussel *Mytilus galloprovincialis*?: *Environ Pollut*, v. 173, p. 200-9.
- Kamel, N., H. Attig, A. Dagnino, H. Boussetta, and M. Banni, 2012, Increased temperatures affect oxidative stress markers and detoxification response to benzo[a]pyrene exposure in mussel *Mytilus galloprovincialis*: *Arch Environ Contam Toxicol*, v. 63, p. 534-43.
- Knapen, D., H. Reynders, L. Bervoets, E. Verheyen, and R. Blust, 2007, Metallothionein gene and protein expression as a biomarker for metal pollution in natural gudgeon populations: *Aquat Toxicol*, v. 82, p. 163-72.
- Lau, P. S., and H. L. Wong, 2003, Effect of size, tissue parts and location on six biochemical markers in the green-lipped mussel, *Perna viridis*: *Mar Pollut Bull*, v. 46, p. 1563-72.
- Lejeusne, C., P. Chevaldonné, C. Pergent-Martini, C. F. Boudouresque, and T. Pérez, 2010, Climate change effects on a miniature ocean: the highly diverse, highly impacted Mediterranean Sea: *Trends Ecol Evol*, v. 25, p. 250-60.
- Leonard, S. S., G. K. Harris, and X. Shi, 2004, Metal-induced oxidative stress and signal transduction: *Free Radic Biol Med*, v. 37, p. 1921-42.
- Lima, I., S. M. Moreira, J. R. Osten, A. M. Soares, and L. Guilhermino, 2007, Biochemical responses of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* to petrochemical environmental contamination along the North-western coast of Portugal: *Chemosphere*, v. 66, p. 1230-42.
- Lionetto, M. G., R. Caricato, M. E. Giordano, M. F. Pascariello, L. Marinosci, and T. Schettino, 2003, Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area: *Mar Pollut Bull*, v. 46, p. 324-30.
- Livingstone, D. R., 2001, Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms: *Mar Pollut Bull*, v. 42, p. 656-66.
- Narbonne, J. F., M. Daubèze, C. Clérandeau, and P. Garrigues, 1999, Scale of classification based on biochemical markers in mussels: application to pollution monitoring in European coasts, *Biomarkers*, p. 415-424.
- Pampanin, D. M., L. Camus, A. Gomiero, I. Marangon, E. Volpato, and C. Nasci, 2005, Susceptibility to oxidative stress of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in the Venice Lagoon (Italy): *Mar Pollut Bull*, v. 50, p. 1548-57.

- Regoli, F., M. E. Giuliani, M. Benedetti, and A. Arukwe, 2011, Molecular and biochemical biomarkers in environmental monitoring: a comparison of biotransformation and antioxidant defense systems in multiple tissues: *Aquat Toxicol*, v. 105, p. 56-66.
- Regoli, F., and G. Principato, 1995, Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers., *Aquatic toxicology*, p. 143-164.
- Sarkar, A., D. Ray, A. N. Shrivastava, and S. Sarker, 2006, Molecular Biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring: *Ecotoxicology*, v. 15, p. 333-40.
- Shahidul Islam, M., and M. Tanaka, 2004, Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis: *Mar Pollut Bull*, v. 48, p. 624-49.
- Snyder, M. J., 2000, Cytochrome P450 enzymes in aquatic invertebrates: recent advances and future directions: *Aquat Toxicol*, v. 48, p. 529-547.
- Sureda, A., A. Box, S. Tejada, A. Blanco, J. Caixach, and S. Deudero, 2011, Biochemical responses of *Mytilus galloprovincialis* as biomarkers of acute environmental pollution caused by the Don Pedro oil spill (Eivissa Island, Spain): *Aquat Toxicol*, v. 101, p. 540-9.
- Tsangaris, C., K. Kormas, E. Stroglyoudi, I. Hatzianestis, C. Neofitou, B. Andral, and F. Galgani, 2010, Multiple biomarkers of pollution effects in caged mussels on the Greek coastline: *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, v. 151, p. 369-78.
- Valavanidis, A., T. Vlahogianni, M. Dassenakis, and M. Scoullou, 2006, Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants: *Ecotoxicol Environ Saf*, v. 64, p. 178-89.
- Viarengo, A., D. Lowe, C. Bolognesi, E. Fabbri, and A. Koehler, 2007, The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms: *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, v. 146, p. 281-300.
- Vidal-Liñán, L., and J. Bellas, 2013, Practical procedures for selected biomarkers in mussels, *Mytilus galloprovincialis*--implications for marine pollution monitoring: *Sci Total Environ*, v. 461-462, p. 56-64.
- Vieira, L. R., A. Sousa, M. F. Frasco, I. Lima, F. Morgado, and L. Guilhermino, 2008, Acute effects of Benzo[a]pyrene, anthracene and a fuel oil on biomarkers of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae): *Sci Total Environ*, v. 395, p. 87-100.
- Vlahogianni, T., M. Dassenakis, M. J. Scoullou, and A. Valavanidis, 2007, Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece: *Mar Pollut Bull*, v. 54, p. 1361-71.