



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultat de Ciències Biològiques

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA FUNCIONAL I ANTROPOLOGIA FÍSICA

**MECANISMES IMPLICATS EN EL METABOLISME I DESINTOXICACIÓ
DELS METALLS EN PEIXOS DE LA MAR MEDITERRÀNIA**

Maria Rosario Siscar Sendra

Burjassot, València

2014

Aquesta tesi s'acull a l'article 8 del Reglament sobre depòsit, avaluació i defensa de la Tesi Doctoral de la Universitat de València, relatiu a l'elaboració de la tesi per compendi de publicacions i ha sigut realitzada dintre del Programa de Doctorat Contaminació, Toxicologia i Sanitat Ambientals regulat pel R.D.1393/2007.

Memòria presentada per Maria Rosario Siscar Sendra per a optar al grau de Doctora en Ciències Biològiques.

Signat: Maria Rosario Siscar Sendra

València, 9 de Decembre del 2014

TESI DOCTORAL DIRIGIDA PER:

Na *Amparo Torreblanca Tamarit*

Na *Montserrat Solé Rovira*

Signat: Amparo Torreblanca Tamarit

Signat: Montserrat Solé Rovira

A la meua família

“The problems are global and require global action, but will most often
require local response and local management tools”

UNESCO

AGRAÏMENTS

Aquesta Tesi Doctoral ha estat un camí molt llarg, i a vegades complicat on moltes persones m'han ajudat a seguir endavant.

Primerament he d'agrair la confiança depositada en mi a Amparo i Montse, ja que malgrat no gaudir de cap beca m'han permès fer el què més m'agrà, a més d'ajudar-me en tot. De les dues he après moltes coses, Montse m'ha transmès la seva constància, i Amparo el seu perfeccionisme.

En la realització d'aquesta Tesi ha sigut indispensable l'ajuda de José del Ramo, qui sempre ha estat disposat a ajudar-me per a millorar aquest treball.

Durant aquest trajecte he comptat amb l'amistat i l'ajuda de Rocío i Olga, les quals van passar de ser unes companyes de despatx a unes molt bones amigues. Els seus consells sempre m'han servit a millorar i les seves ensenyances sobre mostres i anàlisis de dades que sempre em serviran.

Vull també agrair a les meues amigues, sobretot a Maribel i Cristina el poder contar sempre amb elles, poder xarrar a qualsevol hora i ajudar-me sempre amb les seues paraules. A Inma per fer-me aquesta fabulosa portada.

També a la meua cosina Elena que totes les setmanes m'ha trucat per a preguntar-me com estava i per animar-me en dies de pocs ànims, sempre donant-me la seva visió positiva de les coses.

A Joana, la qual m'ha permès distreure'm junt a Laia i xarrar quan més ho necessitava, a més de corregir-me el Valencià d'aquesta Tesi Doctoral.

A Ana, qui sempre m'ha transmès la seua energia i sempre m'ha resolt tots els dubtes gramàtics que m'han anat sorgint durant aquest trajecte.

No puc oblidar a la meua família, Elias, Maria José, i els petits, Elies i Ferran, els quals m'han preguntat i s'han interessat per mi, i per aquesta Tesi, sempre intentant ajudant-me en tot el que han pogut. No tindrè mai prou paraules per agrair tot el que han fet per mi.

Una persona molt important que m'ha acompanyat durant tot aquest camí, tant en els bons moments com en els roïns ha sigut Pascual, el qual sempre m'ha animat a seguir, i no m'ha deixat mai sola.

I sobre tot, aquesta Tesi ha estat possible pel recolzament dels meus pares, els quals sempre m'han animat i m'han espentat a no tirar mai la tovallola, d'ells he après moltes coses que em serviran per a tota la vida.

Aquesta Tesi Doctoral no havera estat possible sense vosaltres. Moltíssimes gràcies.

RESUM

El medi marí està exposat a canvis físics i químics que principalment són antropogènics. Cal destacar alguns canvis com l'augment de la temperatura de l'aigua i la presència de metalls els quals poden afectar negativament l'estat de salut dels organismes residents. Les particulars característiques del Mar Mediterrani en quant a l'elevada densitat de població costanera i reduïda circulació d'aigua, entre altres, fa d'aquesta mar un lloc molt vulnerable front als contaminants. La heterogeneïtat que per la presència de contaminants en general, i metalls tòxics en particular, representa la proximitat a la costa o la profunditat fa necessari estudiar la contaminació i els seus efectes en cadascú dels nínxols marins. Els animals presenten mecanismes desintoxicants per als metalls, com la unió a metal·lotioneïna (MT) i al seleni (Se). Aleshores, és molt important saber fins a quin grau el peixos del Mar Mediterrani utilitzen aquests mecanismes per tal d'evitar els efectes nocius dels metalls, a més també cal esbrinar quin òrgan contribueix en major mesura a la desintoxicació, o si cada espècie utilitza de forma preferencial un d'aquests mecanismes.

L'objectiu de la present Tesi Doctoral és abordar l'estudi dels mecanismes implicats en el metabolisme i desintoxicació dels metalls en peixos teleostis marins presents en la Mar Mediterrània en distints contextos. Açò dona lloc a plantejar tres objectius concrets:

- a) investigar els mecanismes que permeten als peixos abissals (*Alepocephalus rostratus*, *Bathypterois mediterraneus*, *Coelorinchus mediterraneus*, *Lepidion lepidion*, *Mora moro*, *Nezumia aequalis* i *Trachyrhynchus scabrus*) que habiten els canons submarins en la Mar Mediterrània, i els quals pertanyen a eslavons elevats de la cadena tròfica, tolerar concentracions potencialment tòxiques de metalls en els seus teixits.
- b) determinar el contingut de metalls i els mecanismes de protecció presents en el ronyó, a més d'estudiar la possible afectació que presenten els exemplars del gènere *Solea* (*S. solea* i *S. senegalensis*) mostrejats en distintes àrees de la costa Catalana amb la mesura de biomarcadors i
- c) determinar l'efecte de la temperatura d'aclimatació en condicions controlades de laboratori sobre l'acumulació i distribució de metalls en els teixits (fetge i ronyó) de *S. senegalensis* i sobre els mecanismes implicats en la desintoxicació dels metalls presents en els esmentats teixits.

Aquests objectius han sigut objecte de tres treballs que componen aquesta Tesi doctoral.

Els teixits dels peixos dels estudis de camp varen ser proporcionats pels membres dels equips dels projectes respectius. Els llenguados dels estudis de laboratori procedien de les instal·lacions d'aqüicultura de l'empresa Stolt Sea Farm de La Corunya i foren transportats i mantinguts en la Planta de Aquaris del SCSIE de la Universitat de València. Una vegada adaptats a les noves instal·lacions, en quatre dels tancs es baixà la temperatura (1°C/dia) fins arribar a 15°C i en uns altres quatre es mantingueren a 20°C. Després d'un i 60 dies d'aclimatació es sacrificaren els animals. Els teixits (fetge i ronyó) foren immediatament disseccionats, congelats amb nitrogen líquid i conservats a -80°C. Paràmetres biològics, com el pes total i la mida foren mesurats per a poder obtenir el factor de condició (CF), l'índex hepatosomàtic (HSI) i el coeficient Q10 per al creixement. Totes les manipulacions amb els animals han estat d'acord amb la regulació establerta pel Consell Espanyol d'investigacions Científiques (CSIC) i la Directiva 2010/63/EU. La determinació metàl·lica es realitzà a partir de 0,2 grams de cada tipus de mostra a analitzar (fetge, ronyó, pinso i aigua). Les mostres es digeriren amb àcid nítric al 65% i la determinació de la concentració dels metalls es realitzà mitjançant un equip d'espectrofotometria. Els nivells de metal·lotioneïna als teixits (MT) es determinaren mitjançant el mètode polarogràfic. Les activitats AChE i LDH, així com els nivells de peroxidació lipídica i la concentració de proteïnes, foren mesurades espectrofotomètricament. Per a l'anàlisi estadístic de les dades s'ha emprat el test ANOVA d'una o més vies i com anàlisi a posteriori el Test de Bonferroni. L'anàlisi de correlacions s'ha realitzat amb tècniques paramètriques com la correlació de Pearson, o per tècniques no paramètriques amb la correlació de Spearman. També s'han realitzat anàlisis de components principals (PCA) per esbrinar les regles que establien el agrupament de les dades.

El resultat obtingut permeten arribar a les següents conclusions:

- a) Existeix una elevada diversitat en el contingut metàl·lic total i en el contingut de cadascun dels metalls analitzats en el fetge de les espècies de peixos abissals capturats al canó de Blanes. Aquestes diferències poden estar determinades pels hàbits alimenticis i per la fisiologia pròpia de cadascuna de les espècies, no habent-se trobat cap patró comú d'acumulació dels metalls entre les espècies que pertanyen a la mateixa família.
- b) Les elevades concentracions de mercuri en el fetge dels peixos abissals capturats al canó de Blanes, en comparació amb peixos de les mateixes espècies capturades a l'Oceà Atlàntic, són indicatives d'una elevada contaminació per mercuri dels animals que habiten sistemes abissals del Mediterrani.
- c) El fet que les concentracions de metal·lotioneïna i seleni siguin concomitants a l'abundància de metalls com el mercuri, el cadmi i l'argent en el fetge dels peixos abissals i en el ronyó i en el fetge de *S. senegalensis* i *S. solea* indica un paper important d'aquestes substàncies com mecanismes de desintoxicació.

- d) La metal·lotioneïna i el seleni es troben en el fetge dels peixos de les fondaries del canó de Blanes en quantitats relatives superiors a la concentració dels metalls (ratios superiors a 1) la qual cosa representa una capacitat protectora de reserva front a la toxicitat dels metalls.
- e) *S. senegalensis* presenta una intensa incorporació i emmagatzemament de seleni des de la dieta tant en el fetge com en el ronyó, que pot contribuir a la protecció front a la toxicitat de alguns metalls no essencials.
- f) La temperatura d'aclimatació modifica la concentració de metalls en el fetge i el ronyó de *S. senegalensis*. Una temperatura elevada promou l'acumulació de cobalt, crom, coure i ferro en el ronyó respecte del fetge, la qual cosa podria facilitar l'excreció per via urinària.
- g) L'aclimatació a la variació de temperatura té una influència moderada sobre les concentracions de metal·lotioneïna al fetge de *S. senegalensis*.
- h) La capacitat d'acumulació de metalls pel ronyó de *S. solea* i *S. senegalensis*, a partir de baixos nivells ambientals, donaria suport a la utilitat d'aquest teixit en estudis de contaminació per metalls, en zones on els nivells de contaminants són baixos o moderats.
- i) A pesar de les limitacions dels estudis de camp, l'anàlisi dels teixits permet obtenir informació molt valuosa respecte al metabolisme de metalls i els sistemes de desintoxicació.

ABSTRACT

The marine environment is exposed to physical and chemical changes, mostly of anthropogenic character. Some changes, such as increase in water temperature and the increase in the presence of toxic metals, can negatively affect the health of the organisms living there. The particular characteristics of the Mediterranean Sea, in terms of high population density and limited coastal water circulation, among others, make this sea particularly vulnerable to contaminants. In addition the heterogeneous characteristic of pollutants, in general, and toxic metals in particular, in relation to its proximity to the coast and in relation to depth, makes necessary to study pollution and its effects on each of the individual marine niches.

Animals have several mechanisms for detoxifying metals, such as metal binding to metallothionein (MT) and selenium (Se). Consequently, it is very important to know to what extent the Mediterranean Sea fish use these two main mechanisms to prevent harmful effects of metals. In addition, it must also be investigated at what extent each organ contributes to body detoxification, or whether one of these mechanisms is used preferentially for any given species.

The aim of this Thesis is to approach the study of the mechanisms involved in the metabolism and detoxification of metals in marine teleost fish in the Mediterranean Sea in different contexts. This leads to consider three specific objectives:

- a) to investigate the mechanisms that allow abyssal fish (*Alepocephalus rostratus*, *Bathypterois mediterraneus*, *Coelorinchus mediterraneus*, *Lepidion lepidion*, *Mora moro*, *Nezumia aequalis* and *Trachyrhynchus scabrus*) that inhabit submarine canyons in the Mediterranean Sea and belong to high levels of the food chain, to tolerate high concentrations of potentially toxic metals in their tissues.
- b) To determine the metal content and the role of the metal protective mechanisms present in kidney in benthic fish of the genus *Solea* (*S. solea* and *S. senegalensis*) sampled in different areas of the Catalan coast and its relationship with other measured biomarkers of general stress and,
- c) to determine temperature acclimation effects under controlled laboratory conditions on the accumulation and distribution of metals in two tissues (liver and kidney) of *S. senegalensis*, and the relative role of the mechanisms involved in metal detoxification in the afore mentioned tissues. These objectives have been the subject of three publications that make up this Thesis.

The fish tissue from field studies was provided by members of the respective project teams. The fish sole for laboratory studies came from the aquaculture facilities of the Stolt Sea Farm in La Coruna and were transported and kept in the aquarium plant facilities (SCSIE) in the University of Valencia. Once adapted to the new conditions, they were distributed in four tanks with a decrease in temperature at the rate 1 ° C / day to achieve the desired 15°C. Others were maintained at 20 ° C.

After one and 60-days acclimatization, fish were sacrificed. The tissues (liver and kidney) were immediately dissected, frozen with liquid nitrogen and stored at -80° C. Biological parameters such as total weight and size were measured in order to obtain the condition factor (CF) hepatosomatic index (HSI) and the coefficient Q10 for growth. All manipulations with animals were in accordance with the regulations established by the Spanish National Research Council (CSIC) and Directive 2010/63 / EU. Metal determination was made from 0.2 grams of each type of sample to be analyzed (liver, kidney, feed and water). Samples were digested with nitric acid at 65% and the determination of the concentration of metals was carried out by spectrophotometry. Metallothionein (MT) levels in tissues were determined by a polarographic method. Acetylcholin esterase (AChE) and lactate dehydrogenase (LDH) activities, as well as levels of lipid peroxidation (LP) and total protein concentration, were measured using spectrophotometric methods. For the statistical analysis of the data, ANOVA test of one or more tracks and Bonferroni test as a posteriori analysis were applied. The correlation analysis was performed with parametric techniques as Pearson correlation and with non-parametric techniques by Spearman correlation coefficients. Principal components analysis (PCA) was used in order to find out the rules that established the pooling of data.

From the results obtained, the following conclusions can be reached:

- a) In the liver of the fish species caught in the abyssal Blanes canyon there was a high diversity in metals presence as well as in the total content of each metal analyzed. These differences may be dictated by the kind of dietary habits and physiology characteristic of each species. No common pattern of accumulation of metals between species belonging to the same family was found.
- b) High mercury concentrations in the liver of abyssal fish caught in Blanes canyon, in comparison to the same species of fish caught in the Atlantic Ocean are indicative of a high mercury contamination of fish that live in the Mediterranean abyssal systems.
- c) The fact that the concentrations of metallothionein and selenium were concomitant with the abundance of metals such as mercury, cadmium and silver in the liver of the abyssal fish and in kidney and liver of *S. senegalensis* and *S. solea*, are indicative of the important role of these substances as detoxification mechanisms.
- d) Metallothionein and selenium concentrations found in the liver of the fish from Blanes canyon in relative amounts exceeding the concentration of metals (ratios greater than 1) represent a protective reserve capacity to deal with metal toxicity.

- e) *S. senegalensis* showed an intense incorporation and storage of selenium from the diet in the liver and the kidney, which can aid them to face toxicity by non-essential metals.
- f) The temperature acclimation modifies metal concentration in liver and kidney of *S. senegalensis*. High temperature promoted the accumulation of cobalt, chromium, copper and iron in liver compared to kidney, which could facilitate the excretion via urine.
- g) Acclimation temperature had a moderate influence on metal concentrations and metallothionein in liver of *S. senegalensis*.
- h) The ability of metal accumulation in kidney of *S. solea* and *S. senegalensis*, from low environmental levels, supports the usefulness of this tissue in the study of metal contamination in areas where pollution levels are low or moderate.
- i) Despite limitations in field studies, the analysis of metal tissue levels provides valuable information in relation to metal metabolism and detoxification systems of fish.

INDEX

INDEX

1. INTRODUCCIÓ GENERAL	31
1.1. ORGANITZACIÓ DE LA TESI DOCTORAL	33
1.2. JUSTIFICACIÓ DE LA TEMÀTICA	34
1.2.1. Reptes en la conservació del medi marí.	34
1.2.2. Importància dels programes de monitorització.	36
1.2.2.1. <i>La contaminació en zones marines costaneres i profundes.</i>	38
1.2.2.2. <i>Biomarcadors de contaminació.</i>	40
1.2.2.3. <i>Especies sentinella.</i>	42
1.2.3. Metabolisme dels metalls en peixos: essencialitat i toxicitat.	47
1.2.3.1. <i>Incorporació dels metalls pels peixos</i>	48
1.2.3.2. <i>Òrgans implicats en el metabolisme dels metalls</i>	48
1.2.3.3. <i>La transferència tròfica dels metalls</i>	49
1.2.3.4. <i>Mecanismes implicats en l'homeòstasi i desintoxicació de metalls</i>	50
1.2.3.4.1. <i>El paper de la metal·lotioneïna en la desintoxicació metàl·lica.</i>	50
1.2.3.4.2. <i>El seleni i la toxicitat d'altres metalls.</i>	51
1.2.3.4.3. <i>El zinc en la protecció front a la toxicitat d'altres metalls.</i>	54
1.3. HIPÒTESI I OBJECTIUS	54
1.4. PRESENTACIÓ DELS TREBALLS	55
1.4.1. El paper de la Metal·lotioneïna i el Seleni en la detoxificació metàl·lica en fetge de peixos abissals del nord-oest de la Mar Mediterrània.	56
1.4.2. Nivells de metalls i mecanismes de detoxificació en <i>Solea solea</i> i <i>Solea senegalensis</i> en zones pesqueres del nord-oest del mediterrani.	57
1.4.3. Modulació de la metal·lotioneïna i la distribució metàl·lica en fetge i ronyó en <i>Solea senegalensis</i> després d'aclimatació a llarg termini a dues temperatures ambientals.	59
1.5. ARTICLES PUBLICATS	61
1.5.1. Article 1	61
1.5.2. Article 2	80
1.5.3. Article 3	102
2. METODOLOGIA	123
3. RESULTATS I DISCUSSIÓ GENERAL	129
3.1. DIVERSITAT INTERESPECÍFICA EN CONTINGUT I METABOLISME DELS METALLS	131
3.2. L'EFECTE DE LA QUALITAT AMBIENTAL	134
3.3. LA DISTRIBUCIÓ DELS METALLS ENTRE EL FETGE I EL RONYÓ	136
3.4. L'EFECTE DE LA TEMPERATURA	137
3.5. MECANISMES DE DESINTOXICACIÓ DE METALLS	137
4. CONCLUSIONS	143
5. BIBLIOGRAFIA	147

1. INTRODUCCIÓ GENERAL

1.1. ORGANITZACIÓ DE LA TESI DOCTORAL

Aquesta Tesi Doctoral s'ha escrit atenent a les disposicions legals vigents publicades per la Universitat de València en l'article 8 del Reglament sobre dipòsit, avaluació i defensa de la tesi doctoral: "Tesi doctoral presentada com a compendi de publicacions". Amb la finalitat de complir amb tota la normativa, aquesta Tesi Doctoral s'ha dividit en 5 capítols, que s'expliquen a continuació. D'acord amb l'anomenat article, en la Tesi Doctoral ha de constar una introducció general, que presente els treballs compendiats, en justifique la temàtica i explique l'aportació original de l'autor. Amb aquest propòsit, com a primer punt, s'ha elaborat una introducció on s'introdueix el tema, amb la descripció i anàlisi dels reptes als que ha de fer front la humanitat per a millorar l'estat mediambiental del planeta en general i, més concretament, dels mars i dels oceans. Es destaca la importància dels estudis i programes de biomonitorització del medi marí i es descriuen breument els projectes amb financiació pública dintre dels quals s'ha realitzat la present Tesi Doctoral. A continuació s'ofereix una exposició de l'estat actual de les investigacions d'aquells aspectes en què la present Tesi Doctoral aprofundeix, des de la contaminació marina fins els mecanismes de desintoxicació de metalls. Seguidament es presenten els objectius generals de la Tesi. Seguint la normativa abans referida, dintre d'aquesta introducció es presenten els tres treballs publicats d'una forma molt resumida i donant rellevància a allò més significatiu dels estudis, seguit dels articles publicats. El segon punt descriu de forma general la metodologia utilitzada. El tercer punt d'aquesta Tesi Doctoral d'acord amb l'article 8 és un resum global dels resultats obtinguts, de la discussió de aquells resultats i de les conclusions finals. Com que els treballs publicats contenen el resultat complet i una extensa discussió, s'ha considerat pertinent discutir els resultats globals al mateix temps que es presentaven per tal d'evitar repeticions. En aquest apartat de la Tesi Doctoral s'ha buscat analitzar conjuntament les principals troballes dels tres articles. Així doncs, primer s'analitzen les diferències interespecífiques en l'acumulació dels metalls de les espècies estudiades, seguidament es té en compte la situació geogràfica i la qualitat ambiental dels llocs de mostreig. Posteriorment s'exposen els efectes de la temperatura en l'homeòstasi de metalls. L'anàlisi i discussió de la valuosa informació obtinguda sobre la importància relativa de la MT i el Se com a mecanismes protectors front als metalls, en el context dels tres treballs

presentats, és una de les parts centrals d'aquesta Tesi Doctoral. El quart punt tractat, tal i com indica la normativa, són les conclusions. Finalment, s'aporta un llistat de les referències que componen la bibliografia .

1.2. JUSTIFICACIÓ DE LA TEMÀTICA

1.2.1. Reptes en la conservació del medi marí

El canvi climàtic, la fragmentació i pèrdua d'hàbitats, l'acció d'espècies invasores, la contaminació i la sobreexplotació pesquera són els cinc impactes que nomena la UNESCO (Organització de Nacions Unides per a l'Educació, la Ciència i la Cultura) com a causants dels principals canvis en el medi marí que afecten de forma molt contundent a les seues poblacions biològiques i, al mateix temps, influeixen hui en dia sobre un bilió de persones (<http://www.unep.org>). Segons la UNESCO: "Conservar la diversitat de la Terra i la salut dels oceans és crític per a mantenir el benestar del humans i els recursos essencials, els quals estan sotmesos a un risc directe per les pràctiques insostenibles. Un desenvolupament sostenible no s'assoleix sols amb solucions tecnològiques, regulacions polítiques o instruments financers. Cal canviar la forma de pensar i d'actuar" (<http://www.unesco.org>).

Aquesta Tesi Doctoral es centra en la contaminació marina i, més concretament, en l'estudi dels metalls, per les repercussions tant econòmiques com biològiques que pot produir sobre les espècies pesqueres i sobre els ecosistemes marins. Malgrat que cada vegada la humanitat és més conscient, cal prendre mesures per tal d'evitar la destrucció dels hàbitats i la pèrdua considerable de la biodiversitat, però fins ara això no ha estat suficient. Entre les mesures adoptades destaquem els estudis de monitorització. Aquests programes són el resultat d'una conscienciació social i política que permet dur a terme projectes que aporten un coneixement sobre l'estat ecològic del medi, i a més, documenta els canvis produïts al llarg del temps (degradació i/o recuperació), trauen a la llum vessaments il·legals, pràctiques pesqueres perjudicials, etc.

El terme contaminació marina ha estat definit per diversos organismes i autors. Segons l'Agència Europea del Medi Ambient la contaminació marina és l'entrada directa o indirecta de substàncies o energies al medi marí , donant com a resultat un efecte negatiu sobre els recursos vius, la salut humana, la qualitat de l'aigua i activitats marines, com per exemple, la pesca (<http://glossary.eea.europa.eu>). La contaminació és un mot molt emprat hui en

dia, per la qual cosa, es troben distintes definicions. A continuació es recullen diferents definicions d'aquesta paraula: 1) la contaminació és la introducció de contaminants en un medi natural, provocant en aquest un efecte advers (<http://www.merriam-webster.com>); 2) la contaminació és la reducció de la qualitat de l'aigua, l'aire i el sòl per substàncies que són dolentes per als organismes vius (<http://www.ahdictionary.com>); 3) contaminació és la introducció de substàncies o productes dolents en el medi ambient (<http://m.dictionary.com/encyclopedia>). Huí en dia es coneixen molts contaminants de diferent naturalesa: orgànics (restes d'éssers vius o els seus productes de rebuig), químics (com fertilitzants, plaguicides, herbicides, dioxines i polifenils), metalls pesants (com Hg, Cd, Cr, Pb,...), petroli i els seus derivats (com plàstics, partícules de CO₂, SO_x, NO_x), o formes d'energia (com el so, la calor, la llum o la radioactivitat).

A nivell global, els humans són, en gran part, els responsables de canviar l'ús i la coberta del sòl, de contaminar i degradar els sòls i les aigües, de contaminar l'aire, del desviament d'aigües cap a ecosistemes gestionats pels humans o cap a nuclis urbans, de la fragmentació d'hàbitats, l'explotació selectiva d'espècies, de la introducció d'espècies no autòctones, de l'esgotament de l'ozó estratosfèric...(Gitay et al, 2002 (IPCC)).

Un factor de caire abiòtic, com és la temperatura, pot afectar de forma considerable a la supervivència de moltes espècies del nostre planeta. Aquest factor és especialment rellevant en organismes poiquiloterms, ja que es veuran afectats pels canvis que puguen produir-se en el seu habitat, ja que la seua temperatura corporal depèn de la temperatura ambiental i, per tant, el seu metabolisme (Moyes i Schulte, 2007). En un escenari de canvi climàtic com el que estem vivint, on s'estima que la temperatura global del planeta haurà pujat de 1,8 a 4,0°C a finals del segle (Gitay et al, 2002 (IPCC)), és de vital importància estudiar com els organismes podran fer front a aquests canvis i com la temperatura afectarà a la disponibilitat dels contaminants. Noyes et al. (2009), entre altres autors, aporten proves que indicarien que en conjunt, un augment de la temperatura pot augmentar la biodisponibilitat i toxicitat dels contaminants persistents orgànics (POPs). A més un augment de la temperatura pot afavorir un metabolisme més accelerat i, al mateix temps, dona com a resultat una major ingesta d'aliment, el qual, si està contaminat, afavoreix la concentració de substàncies nocives dins l'organisme.

Aleshores, és de vital importància l'estudi dels distints sistemes ecològics per poder prevenir o fer front als efectes negatius que comporta l'exposició a contaminants ara i en el futur (en un possible escenari d'augment de temperatura) i ser conscients que tota la humanitat ha de fer front a aquest problema per preservar les poblacions i els hàbitats on viuen.

1.2.2. Importància dels programes de monitorització

L'evident degradació del medi ambient durant l'últim segle, va ocasionar que a partir dels anys 60 s'iniciaren estudis sobre els efectes de substàncies fabricades per l'home en els ecosistemes aquàtics i terrestres. Aquesta inquietud va donar com a resultat que a partir dels anys 70 aparegueren les primeres agències nacionals de protecció del medi ambient, com l'EPA (US Environmental Protection Agency) l'any 1970, i en l'any 1971 EC (Environment Canada). A partir d'aleshores s'han establert programes de monitorització del medi marí i terrestre, permetent la detecció de signes que indiquen possibles modificacions en l'ecosistema. En l'actualitat, hi ha diversos programes de monitorització internacionals, com el GMES (Seguiment Global del Medi ambient i la Seguretat). Aquesta és una iniciativa conjunta de la Comissió Europea junt amb l'Agència Espacial Europea per a monitoritzar a nivell mundial el medi ambient i mantenir la seguretat de la ciutadania. Un altre programa de monitorització és el coordinat per l'EPA, anomenat EMAP (Environmental Monitoring and Assessment Program), el qual ha permès recopilar dades de camp des del 1990 fins el 2006, any en que acabà aquest programa.

En el cas de la Mediterrània també s'han establert distints programes de monitorització, ja que aquesta mar presenta uns trets particulars que la fan molt vulnerable a la contaminació. En concret, l'any 1975 es va iniciar un pla d'acció pel Mediterrani (MAP) i es crearen sis centres d'activitat regional (RACs), els quals eren responsables d'augmentar la capacitat de supervisió de la MAP. A més, es va adoptar el *Compromís Mediterrani* per a protegir el medi ambient, mentre es promovia el desenvolupament sostenible; també es va refermar dins d'aquest programa un nou pla estratègic per a controlar la contaminació a partir d'activitats en terra ferma (SAP, adoptat en 1997). Aquest pla donà un termini de 25 anys per a reduir la contaminació del continent. Un altre programa creat més recentment (2003) es centra en la concervació de la diversitat biològica del mediterrani (<http://www.unep.org>).

Per a veure l'evolució dels programes descrits anteriorment caldrà monitoritzar el medi ambient. "La monitorització es basa en l'observació repetitiva d'elements tant químics com biològics que han estat establerts per a aquest fi, en unes condicions de temps i espai definides i usant mètodes estandarditzats, la qual cosa permet la comparació entre les variables mesurades" (Van der Oost et al., 2003). Dels cinc aspectes descrits: químic, de bioacumulació, d'efecte biològic, de la salut i dels ecosistemes proposats i descrits en la revisió realitzada per Van der Oost (2003) dos d'ells han estat objecte d'estudi en aquesta Tesi Doctoral: monitorització de bioacumulació i d'efecte biològic.

Aquesta Tesi Doctoral s'ha desenvolupat dintre del marc de dos projectes d'investigació, finançats pel Ministeri d'Economia i Competitivitat (MINECO), dins del pla I+D+I. El primer d'ells, el projecte PROMETEO (estudi integrat de canons i talussos PROFunds de la MEdiTERRania Occidental: un hàbitat essencial). És un projecte d'investigació pluri- i multidisciplinar, que abasta l'estudi del medi marí profund des d'uns 300 metres de fondària, fins a profunditats de 1500 metres en l'interior de canons marins. La finalitat d'aquest projecte és: 1) caracteritzar les condicions abiòtiques d'aquests hàbitats; 2) establir les relacions entre les condicions abiòtiques i l'estructura espai-temporal de les poblacions de meio-, micro- i macrofauna; 3) i, per últim, avaluar els impactes antropogènics en les zones més profundes. Part d'aquesta Tesi Doctoral ha estat dedicada a aquest darrer objectiu. Es coneix que algunes espècies de peixos abissals presenten elevades concentracions de metalls tòxics com el Hg (Choy et al., 2009; Storelli et al., 2002). De fet, Koenig et al. (2012) en estudis inclosos dins del projecte PROMETEO van trobar elevades concentracions de mercuri (Hg) en el múscul de espècies de peixos abissals algunes de les quals podrien arribar a tenir un interès per als humans per ser potencialment espècies comercials.

Es d'interès conèixer els mecanismes de desintoxicació que fan que les espècies abissals toleren aquestes altes concentracions de mercuri així com els mecanismes de desintoxicació i homeòstasi d'altres metalls tòxics i essencials. A partir dels teixits obtinguts en les campanyes de mostreig per l'equip investigador oficial del projecte nomenat s'ha realitzat l'estudi d'anàlisi i interpretació dels resultats que es presenta dintre d'aquesta Tesi Doctoral.

El segon projecte amb el que està vinculada aquesta Tesi Doctoral té per acrònim DEPURAMAR (Avaluació de l'impacte de vessaments antropogènics, a través de DEPURAdores, en la MAR Mediterrània en un context de canvi climàtic). La finalitat d'aquest estudi és establir la relació entre els vessaments antropogènics amb alteracions a distints nivells d'organització biològica en organismes de l'espècie *S. solea* i *S. senegalensis* que habiten zones properes a la desembocadura dels rius. Aquesta Tesi Doctoral es correspon amb les investigacions centrades en la homeòstasi i desintoxicació de metalls realitzades, dintre de l'estudi de camp, en una zona costanera mediterrània sotmesa a l'acció de vessaments humans en distint grau; així com amb l'estudi de la influència de la temperatura d'aclimatació en la resposta dels mecanismes de desintoxicació i homeòstasi de metalls.

Encara que els estudis que es presenten en aquesta Tesi Doctoral pertanyen a dos projectes diferents, en tots dos casos tenen com a objectiu general augmentar el coneixement sobre l'ecofisiologia de les espècies marines objecte d'estudi i la seva capacitat per fer front als contaminants presents en el medi, ja siguin com contaminants químics (metalls) o formes d'energia com la temperatura.

1.2.2.1. *La contaminació en zones marines costaneres i profundes*

Els fons marins litorals s'estenen des de la marea més baixa, sobre la plataforma continental, fins al límit de la zona eufòtica on penetra la radiació solar i són possibles els fenòmens fotosintètics. Aquestes zones estan molt afectades per les activitats humanes. A més la mar Mediterrània presenta unes condicions particulars, ja que presenta en les zones costaneres una elevada densitat de població, una dilatada història d'explotació dels recursos marins i una reduïda circulació d'aigua que fa d'aquesta mar un lloc molt vulnerable front a contaminants (Gomez-Gutierrez et al., 2007). Les zones litorals són les principals afectades per l'acció antropogènica, ja sigui per l'assentament humà prop de zones costaneres, pel vessament moltes restes orgàniques contaminants al medi marí, per l'ús recreatiu de la zona litoral, per la contaminació procedent de rius, per l'intensa activitat d'explotació pesquera, etc.

Per contra, les zones profundes com que estan a més de 1000 metres de fondària, no estan sotmeses a una pressió antròpica tant gran com els marges continentals d'oceans i mars, (Tecchio et al., 2013). Però, tot i així, l'esforç

pesquer en les zones profundes ha augmentat en els darrers anys, fet que ha originat que s'establesquen programes de protecció del mar profund. Un clar exemple d'aquesta protecció és la prohibició de la pesca a fondàries superiors als 1000 metres en la Mar Mediterrània (EC Regulation 1967/2006). No obstant, les zones profundes no estan exemptes de contaminació, ja que en el cas de la mar Mediterrània la contaminació antropogènica per metalls afecta no sols a les zones costaneres i la plataforma continental, sinó també els sediments del talús continental connectats amb les zones costaneres a través dels canons submarins (Palanques et al., 2008). Aquests ecosistemes marins profunds han estat objecte d'estudi i per això se sap que l'àrea geogràfica, la profunditat, els hàbits alimentaris i el nivell en l'escala tròfica de l'organisme tenen una clara influència sobre l'acumulació de metalls en les espècies marines que hi habiten (Cronin et al., 1998; Kress et al., 1998; Mormede et al., 2001; Martins et al., 2006; Company et al., 2010; Koenig et al., 2012).

Les grans masses d'aigua juguen un paper molt important en el cicle biogeoquímic de molts metalls. Un dels metalls que ha pres molta importància recentment és el mercuri per l'augment dels nivells d'aquest metall en els últims segles (Horowitz et al., 2014). Segons un recent estudi publicat en la revista *Nature*, dos tercers parts del mercuri present en l'aigua quedaria localitzat en les aigües més superficials d'oceans (Lamborg et al., 2014). No obstant això, estudis dels nivells de Hg en els organismes que habiten distintes profunditats han mostrat que quant major és la profunditat a la qual habiten els organismes major és el contingut de Hg en el teixit analitzat (Choy et al., 2009). No abunden el treballs que estudien els efectes que podria produir un calentament de les aigües sobre el metabolisme dels metalls en els animals marins. Segons treballs recents duts a terme amb diferents espècies de peixos (Guinot et al 2012; Dijkstra et al., 2013) l'augment de la temperatura pot afectar considerablement el metabolisme de metalls, ja que pot augmentar la bioacumulació i la transferència tròfica a través de les cadenes alimentícies, degut a una acceleració metabòlica. No obstant això, el fet que l'ecofisiologia dels peixos telostis respecte a la temperatura varie molt de unes espècies respecte d'altres, dóna lloc que no es pugui generalitzar i siga necessari estudiar la resposta en cadascuna de elles.

1.2.2.2. Biomarcadors de contaminació

Com s'ha esmentat anteriorment, la monitorització és de gran importància per avaluar l'estat dels ecosistemes. Segons el tipus de monitorització haurem d'utilitzar distintes ferramentes; per a la monitorització de l'efecte biològic els marcadors biològics o biomarcadors són una eina fonamental. Els biomarcadors es defineixen com: mesures realitzades en fluids del cos, cèl·lules o teixits, que indiquen canvis o modificacions cel·lulars produïdes per la presència de tòxics en l'ambient (NRC, 1987). Aleshores, ens indiquen que els tòxics han entrat en contacte amb l'organisme, s'han distribuït pels teixits, i estan produint un efecte tòxic a les seues dianes (McCarthy i Shugart, 1990).

Segons la revisió de Van der Oost et al. (2003), els biomarcadors poden dividir-se en tres categories:

- Biomarcadors d'exposició són aquells que detecten i mesuren una substància exògena, el seu metabolit o el producte de la interacció entre l'agent contaminant i les molècules que s'identifiquen en un compartiment de l'organisme. Els biomarcadors d'exposició poden ser al mateix temps de *dosi interna* o de *dosi biològicament efectiva*. Aquests marcadors ens permetran una intervenció primerenca o realitzar una vigilància de l'estat del medi ambient.
- Biomarcadors d'efecte: inclouen la mesura d'agents químics, fisiològics o altres alteracions en els teixits o fluids del cos d'un organisme on es pot reconèixer una possible alteració de la salut, aquests poden classificar-se en crítics i subcrítics.
- Biomarcadors de susceptibilitat: senyalen factors genètics o adquirits que existeixen prèviament i independentment de l'exposició, aquests influeixen en la probabilitat que desenvolupar la malaltia sigui el resultat de l'exposició a un tòxic.

L'ús de biomarcadors per a monitoritzar la qualitat de l'ambient ha progressat de forma considerable a l'hora de valorar les condicions químiques costaneres en tot el món (Viarengo et al., 2007), degut a això hi ha actualment gran nombre de biomarcadors validats.

En aquesta Tesi Doctoral, a més de l'estudi dels metalls també s'ha volgut esbrinar com aquests nivells metàl·lics afecten a l'organisme, per aquest motiu s'han analitzat tres biomarcadors: les activitats acetilcolinesterasa i lactat deshidrogenasa i els nivells de peroxidació lipídica, els quals queden descrits posteriorment.

L'enzim acetilcolinesterasa (AChE, CE 3.1.1.7) quan es veu afectat per algun compost dóna lloc a una disfunció del sistema nerviós. Els principals compostos que causen la inhibició d'aquest enzim són les pesticides organofosforats o els carbamats, però en els darrers anys, s'ha observat que aquest enzim respon a un ventall molt ampli de compostos, entre ells els metalls (Payne et al., 1996; Vieira et al., 2009). Aquest enzim és considerat un biomarcador d'exposició, ja que l'acetilcolina (ACh) és un neurotransmissor. L'enzim AChE actua en la fenedura sinàptica catalitzant la degradació de l'ACh a colina i acetat, la qual cosa permet cessar l'impuls nerviós donant lloc al repòs. Quan aquesta activitat queda inhibida, la ACh no deixa d'excitar-se, produint, consegüentment, una sobreexcitació, que vessarà en convulsions i tetanització.

Un altre biomarcador molt utilitzat és la lactat deshidrogenasa (LDH, EC 1.1.1.27). Aquest enzim catalitza l'oxidació de L-lactat a piruvat amb el dinucleòtid nicotnamida-adenina (NAD)⁺ com acceptor d'hidrògen, sent aquest l'últim pas en la cadena anaeròbia de la glicolisis. Aquesta reacció és reversible, però l'equilibri tendeix principalment cap a la reducció del piruvat a lactat, així i tot dependrà de les concentracions dels substrats i els productes. Quan un òrgan o teixit està sent lesionat l'LDH és vessada a la sang, augmentant la seua concentració en el plasma sanguini sent un símptoma de danys tissulars (Nemcsök i Benedeczky, 1995; Drent et al., 1996). Estudis fets amb aquest enzim han mostrat que l'exposició a altes concentracions de metalls produeixen un augment de la producció d'energia per les rutes anaeròbies (Vieira et al., 2009), i per tant, un augment de l'activitat LDH.

La peroxidació lipídica (LP) pot ser utilitzada com a biomarcador d'efecte, ja que mesura la resposta a un agent estressant mitjançant un augment en l'oxidació dels lípids a conseqüència d'una major presència d'espècies reactives de l'oxígen. És un procés, a través del qual els radicals lliures capturen electrons dels lípids en les membranes cel·lulars. Aquest procés s'inicia per un mecanisme de reacció en cadena d'una espècie reactiva d'oxigen. En la majoria dels casos afecta als àcids grassos poliinsaturats, degut a què contenen múltiples dobles

enllaços entre els quals es troben els grups metilè (-CH₂-), presentant hidrògens particularment reactius. La reacció s'aturarà quan la unió de dos radicals done com a resultat una espècie no radical. Els organismes vius presenten molècules i enzims que acceleren el procés d'aturada (Lushchak, 2011; Livingstone, 2001). La mesura de la LP reflexa l'acció de les espècies d'oxigen reactiu sobre els lípids, açò pot ser mesurat per la presència de metabolits lipídics com el malondialdehid (MDA). Les espècies reactives d'oxigen poden formar-se per processos biològics naturals que impliquen l'oxigen, però també poden ser induïts per l'exposició a substàncies contaminants (Livingstone, 2001).

1.2.2.3. *Espècies sentinella*

Les espècies sentinella són aquelles que ens permeten demostrar la presència i indicar el grau d'exposició a contaminants presents en el medi que habiten. Perquè una espècie siga bona com a sentinella ha de complir uns requisits com ara: 1) tenir una ampla distribució geogràfica i ecològica, la qual cosa permet realitzar comparacions; 2) ser espècies sedentàries, per informar de la contaminació local, i amb una població suficientment nombrosa, 3) ser sensibles a les exposicions de contaminants que es pretén evaluar. En el medi aquàtic moltes espècies, de distints grups zoològics, serien idònies com a sentinella.

Llenguados

Llenguado comú o *Solea solea* (Quensel, 1806) és un teleosti, de la família dels Pleuronectiformes (Fig. 1).



Fig. 1. Il·lustració de l'espècie *Solea solea*. Font: <http://www.ictioterms.es>

Presenta una ampla distribució per les zones est de la costa atlàntica d'Europa i les costes de la mar Mediterrània. Aquesta espècie està molt present a l'oest de la mar Bàltica. És una espècie bentònica, la qual habita zones amb fons d'arena o fang, a una distància màxima de la costa d'uns 300m. *Solea solea* és usat com a peix sentinella per a estudis mediambientals perquè és un peix pla que viu en zones concretes, és a dir, habita zones poc disperses (Ribecco et al., 2012).

Solea senegalensis, és comú de la mar Mediterrània i d'aigües del sud de l'oceà Atlàntic. És molt semblant a *Solea solea*, la qual està més present en zones més del nord com ja s'ha dit abans. Les larves de les dues espècies són molt complicades de distingir, a més, les dues són espècies gonocòriques, i les femelles maduren a l'edat de 3 mesos en *S. senegalensis* i 4 mesos en *S. solea*. La longitud total per a *S. senegalensis* és de 32cm, mentre que *S. solea* presenta una grandària menor (27-30cm). En quant a l'alimentació, *S. solea* s'alimenta principalment de amfípodes i *S. senegalensis* de poliquets (Vinagre et al., 2006).

L'època reproductiva per a *S. solea* és de gener a març, mentre que per a *S. senegalensis* és a la primavera, de març-abril fins a juny. Els cicles vitals de les dues espècies són molt semblants. *S. senegalensis* està molt adaptada a climes càlids. Actualment, està augmentant la seua cria en captivitat al llarg de les costes del sud de Portugal i Espanya. Per aquest motiu l'estudi de la reproducció en captivitat de *S. senegalensis* ha sigut la base de molts treballs des dels anys 80 (Dinis et al., 1999).

Peixos abissals

En una part d'aquesta Tesi Doctoral (treball 1, Siscar et al., 2014a) s'han analitzat els fetsges de sis espècies de peixos mostrejats a una mateixa fondària de 1200 metres. L'àrea de mostreig ha estat el canó de Blanes, situat a nord-oest de la Mar Mediterrània, aquest canó presenta una orientació NW-SE, la zona més elevada del canó està a menys de 4Km, de la línia de costa i té una profunditat inicial de 60m, a partir de la qual progressivament va augmentant la seua fondària (Zúñiga et al., 2009). Les espècies allí mostrejades es descriuen a continuació:

Alepocephalus rostratus

A. rostratus (Fig. 2) és un actinopterigi de la família alepocephalidae que habita en un rang de fondària que va des dels 300 metres fins als 2250 metres (Carrassón i Matallanas, 1998), poden arribar a mesurar 45 centímetres i viure 23 anys (Morales-Nin et al., 1996). Presenten una distribució des del nord-est de l'Atlàntic i l'oest del Mediterrani fins a Cabo Verde. S'alimenta principalment de crustacis pelàgics (Macpherson et al., 1987).



Fig. 2. Il·lustració d'un exemplar d'*Alepocephalus rostratus*. Font: <http://www.fishbase.org>

Bathypterois mediterraneus

Aquesta espècie habita una profunditat d'entre 800 i 3300 metres, encara que presenta una major abundància entre els 1500 i 2000 metres (d'Onghia et al., 2004). És una espècie no migradora que s'alimenta de plàncton bentopelàgic (Carrassón i Matallanas, 2001).



Fig. 3. Il·lustració de *Bathypterois mediterraneus*. Font: <http://www.fishbase.org>

Coelorinchus mediterraneus

C. mediterraneus (Fig. 4) pertany a la família macrouridae. Aquesta espècie pot trobar-se a fondàries que van des dels 800 fins als 1200 metres. El seu hàbitat es troba en la Mar Mediterrània i la Mar Adriàtica (Iwamoto i Ungaro, 2002). S'alimenta d'organismes del bentos com poliquets i amfípodes, però també d'organismes bentopelàgics com són els copèpodes (Carrassón i Matallanas, 2002)



Fig. 4. Il·lustració d'un exemplar de *Coelorinchus mediterraneus*. Font: <http://www.fishbase.org>

Lepidion lepidion

L. lepidion (Fig. 5) és una espècie autòctona de la zona nord-oest del Mediterrani. Pertany a la família moridae i habita una fondària que varia entre el 500 i 2230 metres, sent més abundant a la profunditat de 750 metres. S'alimenta principalment d'organismes bentònics, però se sap que presenta distintes estratègies alimentàries, abarçant organismes tant del supra- com del epibentos (Carrassón et al., 1997)



Fig. 5. Il·lustració de l'espècie *Lepidion lepidion*. Font: Imatge cedida pel Doctor D. Lloris.

Mora moro

M. moro (Fig. 6) pertany a la família dels mòrids. Viu en aigües que van dels 450 als 2500 metres (Cohen, 1986). Presenta una ampla distribució per la costa est de l'Atlàntic, el Mediterrani occidental, l'oceà Índic i el sud de l'oceà Pacífic des d'Austràlia fins a Xile. S'alimenta de peixos, crustacis, mol·luscs i altres invertebrats, encara que no rebutja la matèria orgànica que li arriba des del continent (Cohen et al., 1990)



Fig. 6. Il·lustració de l'espècie *Mora moro*. Font: Imatge cedida pel Doctor D. Lloris.

Nezumia aequalis

N. aequalis (Fig. 7) pertany a la família macrouridae, dins de l'ordre dels Gadiformes. Aquest peix bentopelàgic habita a profunditats que varien des dels 200 fins als 2320 metres (Geistdoerfer, 1990). Es distribueix en zones profundes de l'Atlàntic i el Mediterrani. S'alimenta d'organismes pelàgics i bentònics com amfípodes, copèpodes i poliquets (Geistdoerfer, 1986).

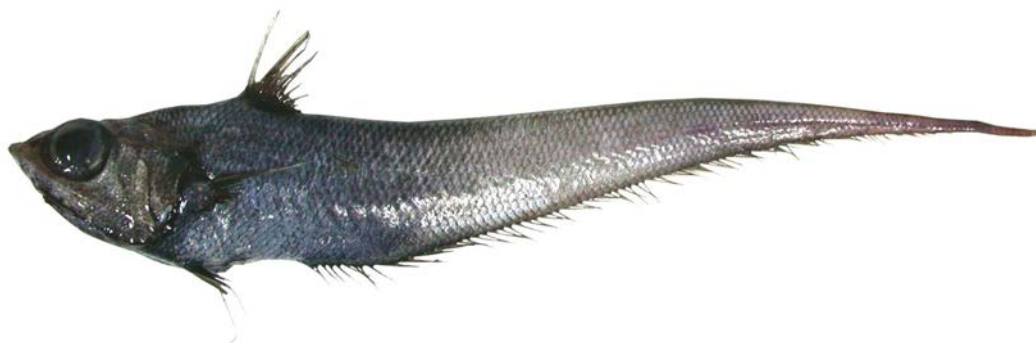


Fig. 7. Il·lustració de un espècimen de l'espècie *Nezumia aequalis*. Font: Imatge cedida pel Doctor D. Lloris.

Trachyrhynchus scabrus

Aquesta espècie al igual que *N. Aequalis* i *C. mediterraneus* pertany a la família macrouridae. Es localitza en un rang de fondàries que varia dels 350 fins als 1500 metres. La seua distribució geogràfica abasta des de la Mar Mediterrània, l'Atlàntic oriental fins les Illes Britàniques i Senegal. S'alimenta principalment d'infauna, al igual que *C. Mediterraneus* (Cartes et al., 2002).



Fig. 8. Il·lustració d'un organisme de l'espècie *Trachyrhynchus scabrus*. Font: Imatge cedida pel Doctor D. Lloris.

1.2.3. Metabolisme de metalls en els peixos: essencialitat i toxicitat.

Al contrari d'altres contaminants, com els sintètics, els metalls són elements que sempre han estat presents en el nostre planeta. Així doncs, fenòmens naturals com les erupcions volcàniques o l'activitat produïda en les fumaroles hidrotermals han aportat al medi quantitats importants d'aquests elements. És però des de l'època de la revolució industrial fins ara quan la major aportació i dispersió de metalls als medi ha tingut lloc per causes antropogèniques.

És coneguda la participació de molts metalls en reaccions metabòliques com a cofactors o integrats com a part d'enzims. En canvi, dels metalls no essencials no es coneix la seua participació en cap mecanisme fisiològic vital. Però com han arribat alguns metalls a ser essencials per als éssers vius? Segons una hipòtesi plantejada per Nielsen (2000), quan va començar la vida en els oceans i en els sistemes hidrotermals, la importància biològica dels elements és correlacionava amb l'abundància o disponibilitat d'aquets elements en el medi. Després d'un procés de selecció natural aquests elements és convertiren en essencials per al manteniment de la vida gracies a la seva capacitat per millorar les funcions vitals. Però tot element essencial en elevades quantitats pot produir efectes nocius (estrés oxidatiu, inhibició d'enzims,...). Per això tots els organismes vius han desenvolupat paral·lelament mecanismes de protecció i desintoxicació per tal de mantenir l'homeòstasi.

La present Tesi Doctoral està centrada en l'estudi en distintes espècies piscícoles marines i del comportament d'elements metàl·lics tant essencials com no essencials. Els metalls, una vegada són extrets dels minerals, es dispersen pel medi ambient i degut a la seua persistència, toxicitat i la tendència a acumular-se en matrius com l'aigua i el sediment, poden arribar a ser tòxics per a tots els organismes vius (Castro-Gonzalez i Mendez-Armenta, 2008).

1.2.3.1. *Incorporació dels metalls en peixos*

Les rutes d'incorporació de metalls en els organismes marins estan directament relacionades amb l'aigua i amb l'aliment. Els peixos teleostis d'aigua salada, al contrari que els d'aigua dolça, es veuen obligats a beure com una estratègia d'osmoregulació per tal de mantenir els fluids del cos hipotònics respecte a l'aigua que els envolta. Per això, la principal via d'entrada de metalls és la digestiva seguida de la branquial. S'han descrit almenys tres rutes diferents per a l'entrada de metalls a través de les brànquies: (1) l'entrada aprofitant els transportadors específics de metalls essencials que permeten la captació de metalls que estan presents en l'aigua en baixes quantitats, (2) per mimetisme iònic, quan un metall es fa passar per un ió en les rutes de transport actiu destinades a l'entrada de nutrients, i (3) quan els metalls difonen simplement a través de l'epiteli branquial, conduïts pel gradient electroquímic de l'aigua a la sang (Wood, 2012). Aquestes mateixes vies d'entrada són utilitzades pels metalls per a travessar l'epiteli intestinal. En general, els transportadors intestinals permeten absorbir de forma molt eficient els nutrients presents en el quim, però a més, els metalls poden unir-se a aminoàcids i aprofitar llurs transportadors (Wood, 2012).

Altres vies alternatives d'entrada de metalls cap a l'organisme és a través de la pell i pel sistema olfatiu. Aquestes vies no reben massa atenció perquè la quantitat de metall que penetra en l'organisme d'aquesta manera és inferior, si es compara amb la ingesta i per les brànquies (Perry i Wood, 1985; Tjälve i Henriksson, 1999).

1.2.3.2. *Órgans implicats en metabolisme dels metalls*

Una vegada els metalls ja estan incorporats al torrent sanguini es distribueixen en funció de les característiques pròpies de cada teixit. Des d'un punt de vista fisiològic, quan els nivells de metalls essencials són més elevats del que cal, es converteixen en substàncies tòxiques. Aleshores l'organisme ha de fer

front a aquestes majors concentracions de metalls posant en funcionament mecanismes d'homeòstasi que regulen les quantitats de metalls òptimes i que permeten a l'organisme mantenir totes les seues funcions vitals. L'excés de metalls, tant essencials com tòxics, són distribuïts principalment entre el fetge i el ronyó (Kalman et al., 2010), per contra, les concentracions destinades al múscul solen ser menors (Usero et al., 2003; Türkmen et al., 2009; Ureña et al., 2007), i en cervell són encara menors gràcies a la barrera sang-cervell. Així doncs, els principals òrgans implicats en el metabolisme metàl·lic són el fetge i el ronyó, els quals participen en les principals vies d'excreció que són, en primer lloc la via urinària i en segon lloc la biliar. Molts metalls hauran de passar prèviament pel ronyó per a poder ser excretats (Barbier et al., 2005). Per contra, el fetge degut a la seua gran activitat metabòlica presenta molts enzims, els quals depenen molt estretament dels metalls per a ser funcionals, aleshores, aquest òrgan distribueix i alhora acumula grans quantitats de metalls. Aquests enzims, no són els únics que permeten mantenir l'homeòstasi i regular els nivells de metalls, sinó que proteïnes com la metal·lotioneïna (MT) o metal·loides com el Se tenen també un important paper en la regulació metàl·lica. Recentment, s'ha demostrat en peixos que la MT present en fetge transporta els metalls cap a la bilis (Hausser-Davis et al., 2014), així doncs, els metalls incorporats en el fetge també poden ser excretats per via fecal (Wood, 2012).

1.2.3.3. *La transferència tròfica dels metalls*

De forma general, s'entén com bioacumulació de metalls, o altres contaminants, la quantitat d'aquestes substàncies que incorpora i reté l'ésser viu per la ingesta i per l'exposició a aigua contaminada al llarg de la seua vida. El factor de bioacumulació (BAF), calculat segons la concentració d'un contaminant analitzat en l'organisme (C_{fss}), en relació a les concentracions del mateix en sediment (C_{sed}) o en l'aliment contaminat (C_{food}), $BAF = C_{fss}/C_{sed}$; $BAF = C_{fss}/C_{food}$; $BAF = C_{fss}/C_{water}$ (Dabrowska et al, 1996), ens permet quantificar la transferència de contaminants produïda des de l'aliment, el sediment o l'aigua, respectivament. Des d'un punt de vista ecològic té gran importància la transferència de metalls en la cadena tròfica. Les cadenes tròfiques descriuen els processos pels quals hi ha una transferència de substàncies nutritives a través de les distintes espècies d'una comunitat biològica en la qual cadascú s'alimenta del precedent i és l'aliment del següent. Malgrat que l'augment de la concentració del metall en el teixit dels éssers vius en cada esglau de la cadena tròfica no és

un tret comú a tots els metalls, existeixen estudis que demostren que aquest fenomen conegut com biomagnificació pot ocórrer amb determinades espècies de metalls com és el cas del metilmercuri (Wiener et al., 2003).

1.2.3.4. *Mecanismes implicats en la homeòstasi i desintoxicació de metalls*

Els organismes marins que habiten zones amb una elevada presència de metalls tant essencials com no essencials, per a poder coexistir amb ells sense comprometre la seua salut, és de gran importància la capacitat que tinguin de regular l'acumulació de metalls en òrgans concrets i llur excreció. Hi ha distintes vies de regulació i manteniment de l'homeòstasi de metalls com són: (1) l'eliminació presistèmica; (2) la unió a albúmina; (3) l'eliminació del cos a través de la bilis o l'orí y (4) l'acció de la MT i el Se per segrestar i minimitzar l'acció negativa de certs metalls o altres substàncies (Casarett i Doull's, 2013). Les dues últimes vies son objecte de estudi en la present Tesi Doctoral.

1.2.3.4.1. *El paper de la metal·lotioneïna en la desintoxicació metàl·lica*

Les metal·lotioneïnes (MTs), descobertes l'any 1957, han estat ampliament estudiades en tots els grups d'animals. Són proteïnes de baix pes molecular, d'aproximadament 6-7kDa i estan compostes per 60-63 residus d'aminoàcids. Presenten un alt contingut en cisteïna (16-20 residus cys), sense residus aromàtics, aquests residus de cisteïna presenten amb una elevada repetició de les seqüències cys-x-cys, cys-cys o cys-x-y-cys, on "x" i "y" són aminoàcids diferents de la cisteïna. La MT és una proteïna termoestable i soluble en aigua. Està present, principalment, en el citoplasma cel·lular però també ha estat detectada en el nucli i en els lisosomes. Les MTs estan presents en molts teixits, però en vertebrats les trobem principalment en el fetge i el ronyó, presentant dues isoformes que són expressades en la majoria d'òrgans. En peixos, però s'ha detectat una major expressió de la isoforma MT-A en els teixits respecte a la isoforma MT-B (Wood, 2012).

La síntesi de MT pot ser induïda per molts estímuls, ja siguen metalls, hormones, toxines o l'estrès, però són els metalls els inductors més potents. La inducció en peixos necessita de la participació de seqüències específiques del DNA, que reben el nom d'elements de resposta als metalls (MREs), aquests elements estan presents en la regió 5' dels gens que codifiquen la MT. Els MREs s'activen per un factor de transcripció metall dependent sensible a Zn (MTF-1). Al

mateix temps, el promotor del gen MT augmenta la transcripció quan s'uneix a elements de resposta a glucocorticoids (GRE) o elements que són activats per l'STAT (Signal transducers and activators of transcription), i elements de resposta a antioxidants (Ruttkay-Nedecky et al., 2013). Per tant la síntesi de MT es veu influenciada per diversos factors, però sembla ser que el Zn juga un paper molt important ja que és clau per al procés d'inducció de la síntesi (Wood, 2012; Ruttkay-Nedecky et al., 2013)

Les MTs són més conegudes pel seu paper en la desintoxicació de metalls pesants, com el Hg i el Cd però també intervenen en el manteniment de l'homòstasi de metalls essencials com el Cu i el Zn (Roesijadi, 1996; Creti et al., 2010). La MT participa en importants processos del metabolisme dels metalls. Mentre que en peixos el paper de la MT en el segrest de metalls està ben establert, al igual que la seua inducció per l'exposició a una gran varietat de metalls (Cd, Cu, Zn, Hg, Co, Ni, Bi i Ag) (Creti et al., 2010; Serafim et al., 2002; Roesijadi, 1996), llur participació en l'eliminació de metalls ha estat menys estudiada. Per contra en mamífers s'ha descrit àmpliament la utilització de la via renal i biliar en l'excreció (Brenner et al., 1986; Mohan et al., 1995; Barbier et al., 2005). També en peixos s'ha comprovat recentment l'existència d'una ruta d'excreció biliar pels metalls que inclou la participació de la MT (Hausser-Davis et al., 2014).

La MT ha estat adoptada com un bon biomarcador d'exposició a metalls, ja que en molts estudis en peixos s'ha observat que la MT, generalment, augmenta quan l'organisme ha estat exposat a metalls (Roesijadi, 1996; Van der Oost et al., 2003).

Malgrat els avanços en el coneixement dels mecanismes cel·lulars implicats en la síntesi de la MT i la seva unió a metalls, la seua participació i la seua rellevància en processos globals en els ecosistemes marins ha rebut menys atenció i és objecte del present treball.

1.2.3.4.2 *El seleni i la toxicitat d'altres metalls*

El Se és un dels elements que des dels orígens de la vida ha sigut capaç d'interaccionar amb les molècules dels organismes vius fins arribar a ser necessari per a la supervivència dels mateixos (Nielsen, 2000). S'incorpora específicament a proteïnes com la selenocisteïna. Se sap que les selenoproteïnes

en peixos estan involucrades en la defensa antioxidant i en el metabolisme de l'hormona tiroidea (Janz, 2012).

Les concentracions naturals de Se en el medi aquàtic tant fluvial com marí solen ser baixes ($0,01-0,1 \mu\text{gL}^{-1}$). Però com a resultat de moltes activitats antròpiques han augmentat aquestes xifres en els ecosistemes aquàtics, ocasionant que el Se arribi a ser tòxic per als peixos al estar en excés. Això és degut a la estreta distancia que hi ha entre l'essencialitat i toxicitat per aquest metall.

El major risc toxicològic associat a l'exposició a Se es basa en la seua eficient incorporació a les cadenes alimentàries pels productors primaris, depenent sempre de la seua biodisponibilitat, i la subseqüent transferència als nivells tròfics superiors. Treballs molt recents (Ostertag et al., 2014) descriuen la correlació positiva entre el Se i el Hg, la qual cosa dóna indicis del rellevant paper protector del Se des del punt toxicològic.

El Hg va ser més àmpliament estudiat arrel del vessament de Minamata, al Japó, en els anys 50. De forma natural el Hg gas (Hg^0) pot depositar-se en els sistemes orgànics, l'aigua, la superfície dels vegetals i ser respirat pels essers vius. Per contra la seua forma catiònica (Hg^{+2}) és soluble en l'aigua i pot ser ràpidament absorbida pels teixits. Aquesta darrera espècie de mercuri és assimilada per bacteris que el biotransformen metilant-lo (CH_3Hg^+), el qual és volàtil i molt tòxic. Tant les formes orgàniques com inorgàniques del Hg són tòxiques, per la seua alta afinitat per enzims i proteïnes que contenen grups tiol, el que dóna lloc als efectes tòxics del Hg en totes les seues formes. El Hg inorgànic és preferentment nefrotòxic, a més, també afecta als enzims responsables de la protecció cel·lular front la peroxidació, ocasionant situacions d'estrés oxidatiu a nivell mitocondrial i produint danys renals. El Hg en estat gasós ràpidament és oxidat a Hg inorgànic en la sang, però el major efecte neurotòxic el causa el Hg orgànic. El metilHg, que és capaç de travessar la barrera sang-cervell gràcies a transportadors L-aminoàcids neurals. A més, el metilHg també presenta la capacitat de travessar la barrera placentària en mamífers afectant al sistema nerviós del fetus (Kidd i Batchelar, 2012).

Estudis amb animals han demostrat que els efectes tòxics del metilHg depenen altament dels nivells de Se ingerits amb la dieta (Raymond et al., 2009); hi ha per tant una estreta relació entre el Se i el Hg (Khan y Wang, 2009). S'ha

proposat una forma de quantificar aquesta relació mitjançant la relació molar d'aquests dos elements en els teixits d'animals marins (Beijer et al., 1978). Distints autors han proposat que una bona protecció del Se respecte al Hg es dona quan la ràtio molar és de 1:1 o major (Burger et al., 2013). Inicialment molts estudis sols contemplaven la mesura del ràtio molar Se:Hg en múscul, per tractar-se del principal teixit que consumim els humans. En l'actualitat s'aplica aquesta relació en distints teixits/òrgans per a avaluar la capacitat protectora del Se en cada compartiment biològic, i per a conèixer el comportament d'un metall respecte a l'altre (Sormo et al., 2011).

S'han descobert distints mecanismes d'actuació del Se front al Hg. Així doncs, s'ha descrit que un excés de Se fa augmentar la producció de selenoproteïna P, els residus de selenocisteïna de la qual actuen com a trampes per al MeHg, apartant-lo de la circulació i evitant que entre en els òrgans (Branco et al., 2012).

Diversos estudis han demostrat una major afinitat del Hg pel Se, respecte la que presenta pel sulfur (Wessjohann et al., 2007; Berry i Ralston, 2008). Això comporta que el Se segreste el Hg, formant complexos Se-Hg, els quals redueixen la toxicitat del Hg, però també poden ocasionar una deficiència de Se (Raymond i Ralston, 2009). També es poden formar complexos MeHg-Se, però l'afinitat del Hg inorgànic pel Se és major que la del MeHg (Khan i Wang, 2009). El Se participa en el procés de desmetilació del metilHg, malgrat que aquesta desmetilació en si no disminueix la seua toxicitat ja que el Hg inorgànic és encara més tòxic que el metilHg. Malgrat açò, si aquest Hg inorgànic s'uneix a selenits formant el complex Hg-Se o el més estable Hg-Se-complexos proteïcs, la neurotoxicitat o nefrotoxicitat sí que es veu reduïda (Branco et al., 2012; Khan i Wang, 2009).

Una altra possibilitat és que gràcies al Se es redistribuïra el Hg cap a òrgans d'eliminació com són el fetge o el ronyó. Sembla ser que el Se indueix l'alliberació de Hg inorgànic originalment unit a MT de baix pes molecular en les cèl·lules roges de la sang i les dirigeix cap a proteïnes de major pes molecular. Alguns autors assumeixen que el Se podria afectar a la transferència de compostos de Hg des dels mercàptids cap al glutatió o d'una altra manera inhibeix la formació del complex Hg-metal·lotioneïna. Aquesta distribució mitjançada per Se encara no està massa acceptada en peixos (Raymond i Ralston, 2009).

Actualment s'està valorant el paper del Se com a detoxificador d'altres metalls com el Cd, Ag, Cu i altres. Estudis fets en mamífers i aus aquàtiques han descobert una afinitat, molt semblant a la del Hg pel Se, entre el Se i la Ag en fetge (Ikemoto et al., 2004). Des d'aleshores hi ha treballs que corroboren que el Se redueix la toxicitat del Cd en mamífers (Newairy et al., 2007; Garcia-Sevillano et al., 2014). Altres autors com Jihen et al. (2008, 2009) van més enllà i apunten a la formació d'un complex Se-Zn que afavoreix la protecció del fetge front als possibles efectes tòxics del Cd en rates. En peixos, segons Damiano et al. (2011), el Se donaria una immunitat natural front a la toxicitat dels metalls. En aquesta Tesi Doctoral s'estudia el paper protector del Se front als metalls tòxics en peixos.

1.2.3.4.3. *El zinc en la protecció front a la toxicitat d'altres metalls*

El Zn és un metall essencial per a totes les cèl·lules i organismes que es coneixen. A més, després del ferro (Fe), és l'element traça més abundant en molts vertebrats. Aquest element essencial per a una gran quantitat de processos biològics, és també cofactor per al 10% de les proteïnes i de les substàncies de senyalització intracel·lulars i intercel·lulars (Hogstrand, 2012). Recentment s'ha estudiat el paper del Zn com a un mecanisme de protecció de la toxicitat causada per metalls. Segons Jihen et al. (2008; 2010) el Zn redueix l'absorció de Cd a nivell intestinal i facilita la seua acumulació en ronyó. A més, cal afegir que el Zn, juntament amb el Cd ocasionen la inducció de la síntesi de MT, augmenten el contingut de glutatió, el qual a la seua vegada inhibeix la peroxidació lipídica i redueix la toxicitat del Hg (Fukino et al., 1984). Al mateix temps, pareix ser que la cooperació Zn-Se protegeix contra l'acció tòxica del Cd en fetge (Jihen et al., 2008), com ja s'ha esmenat anteriorment. La present Tesi Doctoral explora el paper menys conegut del Zn en la protecció front a danys produïts per l'exposició a metalls en peixos.

1.3. HIPOTESI I OBJECTIUS

La present Tesi Doctoral té com a punt de partida la hipòtesi general que les mesures dels paràmetres químics (metalls) i biològics (biomarcadors) en els teixits dels peixos, ja siga mostrejats en el seu ambient o sotmesos a condicions experimentals, aporten informació útil per a interpretar les condicions ambientals i els mecanismes usats pels peixos per a fer front als canvis en dites condicions.

L'objectiu de la present Tesi Doctoral és abordar l'estudi dels mecanismes implicats en el metabolisme i desintoxicació dels metalls en peixos teleostis marins presents en la Mar Mediterrània en distints contextos. Açò dóna lloc a plantejar tres objectius concrets.

1. Investigar els mecanismes que permeten als peixos abissals que habiten els canons submarins en la Mar Mediterrània, els quals pertanyen a eslavons elevats de la cadena tròfica, tolerar concentracions potencialment tòxiques de metalls en els seus teixits.

2. Determinar el contingut de metalls i els mecanismes de protecció presents en el ronyó, a més d'estudiar la possible afectació que presenten els exemplars del gènere *Solea* (*S. solea* i *S. senegalensis*) mostrejats en distintes àrees de la costa Catalana amb la mesura de biomarcadors.

3. Determinar l'efecte de la temperatura d'aclimatació, en condicions controlades de laboratori, sobre l'acumulació i distribució de metalls en els teixits (fetge i ronyó) de *Solea senegalensis* i sobre els mecanismes implicats en la desintoxicació dels metalls presents en els esmentats teixits.

1.4. PRESENTACIÓ DELS TREBALLS

En aquesta Tesi Doctoral s'aborda l'estudi de la concentració de metalls tant essencials com tòxics en teixits de peixos. També s'analitza la relació de la concentració d'aquests metalls entre ells i amb altres molècules i elements que participen com a mecanismes detoxificadors. Tot açò és realitza en tres contextos ambientals diferents com són: (1) els canons del Mediterrani com hàbitat de peixos abissals, (2) les zones de pesca costaneres on trobem espècies del gènere *Solea* i, (3) l'aclimatació de *S. senegalensis* sota condicions de laboratori a distintes temperatures.

1.4.1. El paper de la Metal·lotioneïna i el Seleni en la desintoxicació metàl·lica en fetge de peixos abissals del nord-oest de la Mar Mediterrània

En el primer treball es mostrejaren set espècies de peixos abissals en l'àrea del Canó de Blanes a una profunditat d'uns 1200 metres. En aquests peixos es determinaren les concentracions en fetge de metalls, així com els nivells de metal·lotioneïna. Cal remarcar que hi ha molt pocs treballs sobre metalls en peixos abissals i menys encara en espècies de la mar Mediterrània. A més, molt pocs estudis sobre espècies piscívores de les profunditats han considerat conjuntament l'acumulació de Hg, Se, Zn i el contingut de MT.

Aquest estudi demostra la variabilitat interespecífica que presenta la composició metàl·lica del fetge, inclús amb exemplars pescats a la mateixa zona i època. Cal prestar una atenció especial als nivells de Hg, ja que són molt més alts en comparació amb altres estudis fets amb espècies abissals i, fins i tot, costaneres. En particular l'espècie *C. mediterraneus* presenta el major nivell de Hg mesurat en fetge d'animals de la mar Mediterrània fins ara. Això es deu possiblement al fenomen de biomagnificació, ja que sols s'han obtingut concentracions tant elevades en mamífers marins de l'oceà Pacífic (Endo et al., 2002) i en un peix batipelàgic anomenat *Aphanopus carbo* habitant de l'oceà Atlàntic (Bebianno et al., 2007) el qual s'alimenta de peixos macrourids, morids i alepocephalids, que són espècies de la mateixa família que els analitzats en este estudi.

En quant als nivells de MT mesurats, aquests varien segons l'espècie estudiada, sent *T. scabrus* qui presenta la major concentració, seguit de *C. mediterraneus*. Els nivells de MT es correlacionen amb les concentracions de Zn, Ag, Cu i Cd en algunes espècies, sent aquests metalls considerats bons inductors de la MT (Cosson et al., 1994). Al comparar els nivells de MT presents amb els obtinguts en altres estudis, ens fa pensar que en els organismes de la Mediterrània la MT no seria suficient com a mecanisme protector contra els metalls tòxics, i en aquest cas el Se proporcionaria també una important protecció. Això es dedueix en aquestes espècies arran de la bona correlació trobada entre els nivells de Se i Hg.

Sembla ser que cada espècie en particular utilitza en diferent grau les dues estratègies defensives nombrades. En algunes de les espècies estudiades es veu una clara relació entre els nivells de Se amb els nivells de Hg i Cd, i també entre la concentració de MT i altres metalls tòxics com el Cd.

Aquest treball aporta evidències que els organismes que habiten zones profundes utilitzen mecanismes per a fer front a elevades concentracions de metalls. Aquests mecanismes no es basen solament amb la intervenció de la MT, si no que el Se presenta un paper molt important en la regulació i homeòstasi d'altres metalls, però sobretot del Hg. A més, la relació de ràtios molars entre el Se i altres metalls és una de les primeres vegades que s'analitza en peixos teleostis abissals, i en aquest treball ha donat suport a un potencial paper protector del Se front al Hg, la Ag i el Cd.

Aquest estudi ha permès ampliar el coneixement sobre els mecanismes utilitzats pels organismes, en concret peixos, que habiten en zones profundes per a fer front a elevades concentracions de metalls en els seus teixits. S'aporten evidències d'un important paper del Se en la regulació del metabolisme dels metalls. En els peixos abissals, d'acord amb els resultats obtinguts en l'anàlisi de les correlacions i les ràtios molars, el Se no sols estaria implicat de forma molt important en la protecció front a la toxicitat del Hg, si no que també podria jugar un paper molt important en la protecció front al Cd i la Ag.

1.4.2. Nivells de metalls i mecanismes de detoxificació en *Solea solea* i *Solea senegalensis* en zones pesqueres del nord-oest del mediterrani.

En aquest segon treball s'han mostrejat organismes del gènere *Solea* en distints punts de la costa catalana. S'ha mostrejat aquestes espècies perquè són un important recurs econòmic de la Mediterrània (Imslund et al., 2003), i a més, actualment estant sent molt utilitzats com a sentinelles del medi marí (Henry et al., 2012; Costa et al., 2012; Ribocco et al., 2012). En aquest estudi s'han mostrejat distintes zones al llarg de la costa catalana, sent les zones nord i sud on predominen les activitats turístiques i agràries, per contra, les zones més centrals presenten una pressió antropogènica, per ser un àrea urbana i industrial.

En aquest estudi l'anàlisi de metalls es va fer en ronyó i va mostrar que la zona de mostreig on les espècies presentaven majors nivells de metalls bioacumulats era Garraf, seguida de Maresme, però no es veié cap concordança entre els nivells metàl·lics mesurats en ronyó i els de sediment. Aquest treball posa de manifest l'important paper del ronyó com a òrgan emmagatzemador i en el metabolisme metàl·lic en les espècies *S. solea* i *S. senegalensis*. A més, en aquest teixit (ronyó) també actuen conjuntament i de forma eficaç mecanismes protectors front a la contaminació metàl·lica com són la MT i el Se. En el ronyó s'ha trobat una bona correlació entre els nivells de MT i les concentracions de metalls no essencials (Cd, Ag...). Aquest treball també confirma la utilitat dels organismes del gènere *Solea* com a bons sentinelles, ja que en els anàlisis multidimensionals de components principals (PCA) considerant totes les variables, es poden discriminar els distints llocs de mostreig. Al comparar les concentracions de metalls en ronyó de les dues espècies estudiades en una mateixa àrea (Garraf) veiem que *S. solea* presenta uns majors nivells de Ag, Cu i Hg, mentre que *S. senegalensis* presenta una elevada concentració de Pb. Les diferències observades en la concentració de metalls segons l'espècie mostrejada podria deures a particularitats en els seus hàbits alimentaris i els distints tipus de substrats on predominen (Vinagre et al., 2006).

De l'anàlisi de les correlacions i del càlcul dels ràtios molars que relacionen la MT, Se i la resta de metalls, es pot inferir l'existència de mecanismes de desintoxicació on participen la MT i el Se. Així doncs, també s'obtingué una bona correlació entre les concentracions de MT amb Cd, Cu i Hg en ambdues espècies. En *S. senegalensis* també foren significatives les correlacions entre el Se i els metalls tòxics com el Cd i el Hg. Cal destacar que el nivell d'altres metalls com el Zn, el qual presenta majors nivells quan la concentració de metalls tòxics en el teixit analitzat són baixos i s'apreciava una menor afecció indicada per l'anàlisi d'altres biomarcadors bioquímics analitzats. Al mesurar els ràtios molars hi ha diferències significatives per a MT:Hg, Se:Hg i Se:Ag, sent aquests majors en *S. senegalensis* respecte a *S. solea* per una mateixa zona de mostreig. Aquestes dades corroboren el paper protector del Se i de la MT en aquestes espècies costaneres, així com l'existència de diferències interespecífiques.

1.4.3. Modulació de la metal·lotioneïna i la distribució metàl·lica en fetge i ronyó en *Solea senegalensis* després d'aclimatació a llarg termini a dues temperatures ambientals.

La rellevància dels canvis fisiològics implicats en l'aclimatació als canvis de temperatura en peixos no ha estat massa estudiat. El present treball s'ha centrat en l'estudi dels canvis en el metabolisme i en els nivells de metalls bioacumulats en juvenils de *S. Senegalensis* sota condicions de temperatura controlades. En aquest estudi s'aclimataren 32 exemplars de llenguado senegalés que foren distribuïts en 4 tancs circulars. Després de mantenir-los 2 mesos (període d'adaptació) en els tancs començà l'aclimatació a dues temperatures diferents (15°C i 20°C). La temperatura inicial era de 20°C i la de 15°C es va aconseguir baixant gradualment la temperatura durant 5 dies (1°C/dia). Un grup de peixos foren mostrejats al assolir les temperatures respectives i l'altre 60 dies més tard. En aquest estudi s'ha considerat tant els nivells de MT com els de Se com a mecanismes desintoxicadors, així com la importància relativa del fetge i el ronyó en aquests processos.

Malgrat haver alguns estudis en distintes espècies aquàtiques que comparen la distribució metàl·lica en distintes teixits, hi ha molt pocs treballs que estudien la distribució i metabolisme metàl·lic sota la influència de la temperatura en condicions experimentals de laboratori en peixos. En el treball de camp anteriorment descrit s'observà que el ronyó jugava un paper important en el metabolisme dels metalls. Així doncs, en aquest estudi es realitza una comparativa del paper del fetge i el ronyó en condicions no contaminants, però sota la influència de dues temperatures estacionals en *S. Senegalensis*. L'elecció d'aquesta espècie es basa en la seua adaptabilitat a condicions de confinament fet que comporta que es tracte d'una espècie molt important en aquicultura.

En aquest estudi on la temperatura pot influir en els processos d'ingesta, de digestió i detoxificadors, volem investigar com es distribueixen els metalls en fetge i ronyó sota distintes temperatures fisiològiques. Metalls com Ag, Cd, Cu i Mn s'ha vist que s'acumulen preferentment en fetge, mentre per contra metalls essencials com Cr, Co, Fe, Se i Zn, i no essencials com el Hg i el Pb s'acumulen principalment en el ronyó. Al comparar amb estudis fets amb altres espècies de peixos s'observa que la distribució metàl·lica entre els teixits és espècie dependent. A més, de forma particular, cada metall presenta més, menys o cap afectació respecte al canvi de temperatura i temps d'exposició, així doncs, no hi

ha un comportament uniforme dels metalls respecte a certes condicions ambientals a que han estat sotmesos.

Es varen calcular també els factors de bioacumulació des de l'aliment en els dos teixits estudiats, a les dues temperatures i després de 60 dies d'aclimatació. Els resultats revelen que en fetge els metalls més acumulats des de la ingesta són Cu i Ag, mentre que en ronyó el metall que més s'acumulà fou Se. Aquest darrer dona un valor de bioacumulació molt semblant en ambdós teixits revelant una acumulació molt eficient del Se en aquesta espècie.

En fetge, la quantitat de MT produïda es va veure afectada tant pel pas del temps com per la temperatura d'aclimatació a la que estan sotmesos els peixos. Per contra, en ronyó no va haver diferències en relació a aquests dos factors. La quantitat de MT en els dos teixits és molt semblant en *S. senegalensis*, a més, al comparar amb altres estudis veiem que la contribució i distribució de MT és específica de cada espècie.

El càlcul dels ràtios molars de MT i Se ens aporta una valuosa informació sobre la capacitat de desintoxicació de cada teixit. D'acord amb els resultats no sembla que la temperatura d'aclimatació done lloc a canvis significatius en la capacitat detoxificadora del fetge i el ronyó, a més pareix que en *S. senegalensis* hi ha una major protecció per part del Se respecte de la MT, tant en fetge com en ronyó, per a fer front a una potencial toxicitat del Hg.

1.5 ARTICLES PUBLICATS

1.5.1 Article 1

Article publicat en Science of the Total Environment 466-467 (2014)898-905

The role of Metallothionein and Selenium in metal detoxification in the liver of deep-sea fish from the NW Mediterranean sea.

Roser Siscar¹; Samuel Koenig²; Amparo Torreblanca¹; Montserrat Solé^{2*}

¹Department of Functional Biology, Faculty of Biological Sciences, University of Valencia. Dr. Moliner, 50, 46100 Burjassot (Valencia). Spain. Phone +34 6 35443378 FAX +34 6 3543202

² Institut de Ciències del Mar (ICM-CSIC). Passeig Marítim de la Barceloneta 37-49, 08003. Barcelona, Spain.

*msole@icm.csic.es (Corresponding author).

Abstract

Seven deep-sea fish species were sampled in the Blanes Canyon area (NW Mediterranean) at a depth of 1200 m during winter. The concentrations of nine metals were determined in the liver of these species by ICP-MS. Furthermore, the metal detoxification potential was determined for each species by analyzing the hepatic metallothionein (MT) content, relations between metals and the molar ratio between MT and/or selected metals. The potential effect of metal content on their physiology was assessed using general stress markers such as the enzyme activities of acetylcholinesterase (AChE) and lactate dehydrogenase (LDH) in muscle.

Levels of metals in the seven Mediterranean deep-sea fish species studied were intermediate to equivalent species of fish either from Atlantic waters or hydrothermal vents. The metal detoxification potential varied among species depending on MT, selenium (Se) or zinc (Zn) as reliable mechanisms to handle potential metal toxicity. The role of Se was especially relevant when the liver content of mercury (Hg) was higher. AChE and LDH activities did seem to be affected by metal loads and thus the activities reported would correspond to baseline activities of the selected species.

Keywords: deep-sea fish, metal detoxification, liver, Metallothionein, Selenium, Zinc.

1. Introduction

The existence of high concentrations of toxic metals, especially mercury (Hg), in some deep-sea environments is well acknowledged (Storelli et al., 2002; Choy et al., 2009). Concerns have been recently raised regarding, in particular, the high levels of Hg in muscle of deep-sea organisms, whose consumption can represent a potential health risk (Drava et al., 2004; Bebianno et al., 2007; Díez, 2009; Koenig et al., 2013). Previous work has addressed the influence of the geographic area, sampling depth, feeding habits and trophic position on the accumulation of metals by deep-sea organisms (Cronin et al., 1998, Kress et al., 1998; Mormede and Davies, 2001; Martins et al., 2006; Company et al., 2010; Koenig et al., 2013). Deep-sea fish and, in particular, those inhabiting areas with high presence of metals, essential and non-essential ones, had to evolve to coexist with high concentration of metals without compromising their health status (Company et al., 2010). In addition to the already well known role of the liver in the metabolism of metals, earlier studies on deep-sea fish showed the importance of the liver, in relation to other tissues, in metal storage and also the utility of liver in order to discriminate between populations that are exposed to different levels of metals in their environment (Company et al., 2010). Another key defence mechanism against metal toxicity is the binding of metals to the cytosolic protein metallothionein (MT) of widespread phylogenetic distribution (Viarengo et al., 1999; Wood, 2012). In fish, metals such as Ag, Cd, Cu and Zn, but also Hg, are reported to induce the synthesis of MT (Cosson, 1994; Huang et al., 2007; Fernandes et al., 2008; Monteiro et al., 2013).

In the case of Hg, the concomitant presence of Se in tissues seems to play an important role in the storage of Hg and its tissue distribution; thus, providing an important protection mechanism against Hg toxicity (Raymond and Ralston, 2009). Studies on the interaction of Se metabolism and toxicity of Hg compounds have shown that Se protects organisms from the toxicity of both inorganic (Hg) and organic (MeHg) forms (Endo et al., 2002; Branco et al., 2012). The high toxicity of Hg, both organic and inorganic, is associated to its high affinity for thiol groups, which causes an efficient binding of Hg to the cysteine residues of many essential proteins and enzymes and therefore affecting their functions (Khan and Wang, 2009). In aid of reducing metal toxicity, the formation of the complex Se-Hg-protein has an important role in preventing the toxicity by inorganic and organic Hg as seen in the liver of marine mammals (Ikemoto et al., 2004). This is due to the fact that Hg has even a greater affinity for Se than it has for sulphur groups of some essential proteins (Wessjohann et al., 2007; Berry and Ralston, 2008). Thus, in order to be able to decrease Hg toxicity, there should be an amount of Se available equal or higher than that of Hg (Raymond and Ralston, 2009). Therefore, if the molar ratio of Se:Hg is greater than 1, it is likely that Se is contributing to the detoxification of Hg (Sørmo et al., 2011). In fact, the ratio Se:Hg in muscle tissue has been established as a good marker to predict the risk for human consumption

(Burguer et al., 2012). In addition to its protective role as Hg chelator, Se is an essential metal necessary for the proper functioning of enzymes that protect the brain and endocrine tissues against oxidative damage and it is a metal present in some antioxidant enzymes (Livingstone, 2001; Raymond and Ralston, 2009). In aquatic systems, the role of Se in mitigating Hg toxicity has not only been documented in mammals (Cuvin-Aralar and Furness, 1991; Hong et al., 2012), but also in fish (Ordiano-Flores et al., 2012).

The presence of Se in tissues not only reduces Hg but also Cd toxicity by storing and reallocating this toxic metals and thus, diminishing its potential adverse effect. The results from an *in vitro* study in rats, on the protective role of Se against Cd exposure, suggested that Se produced a Cd-Se complex at first, which subsequently binds to a selenoprotein P, thus reducing Cd availability (Sasakura and Suzuki, 1998). In the same mammalian species, Se also protected *in vivo* from Cd toxicity (Newairy et al., 2007). To the best of our knowledge, no studies are available on fish. Other transition metals, such as Zn, have also been described to have a protective role against Hg toxicity, at least in mammals (Affone et al., 2000; Orisakwe et al., 2001). In liver of rat, Zn alone, but more significantly together with Se, efficiently protected them from Cd-induced oxidative stress (Jihen et al 2009). In fact, a part of the protective role of Se and Zn, in preventing Hg or Cd toxicity is due to their association with antioxidant enzymes (Livingstone, 2001) such as glutathione peroxidase (Se) and superoxide dismutase (Zn).

Muscular enzymes such as acetylcholinesterase (AChE) and lactate dehydrogenase (LDH) activities have been used in combination as general markers of stress in aquatic organisms, including fish, and have been related to metal exposure in field and lab studies (Wepener et al., 2005; Vieira et al., 2009). AChE acts as a neural transmitter and its activity can be compromised by exposure to many chemicals, mostly pesticides, but also to metals (Gill et al., 1991; Payne et al., 1996; Frasco 2005; 2007). Its inhibition is considered a sign of neurotoxicity. LDH is a key enzyme in the glycolytic cycle; its activity is usually enhanced under stress when there is greater oxygen demand and higher anaerobic oxygen metabolism. Elevated LDH activity levels as response to metal exposure has also been demonstrated in fish (Gill et al., 1990; Vieira et al., 2009).

Due to the lack of knowledge on the mechanisms to deal with high levels of toxic metals of deep-sea fish species, seven benthic fish with a relatively high trophic level ($\delta^{15}\text{N}$ between 9.86-13.78‰) and belonging to four different phylogenetic families (Polunin et al., 2001; Tecchio et al., 2013) were sampled in the NW Mediterranean. Thus, the aims of the present study were: (1) to study the chemical composition of liver in deep-sea fish from the Blanes canyon area, in regard to essential and non-essential metals, and to contrast these values with those obtained in the same species, or similar ones, from other geographical regions, (2) to determine MT and Se concentrations to elucidate if there is an indication of their respective protective role against metal toxicity

and (3) to combine the use of general stress markers, such as AChE and LDH, as endpoints of metal toxicity in the selected species.

2. Material and Methods

2.1. Study area and sample collection

Sampling was carried out onboard the R/V Garcia del Cid in winter (January 2009) at a depth of 1200 m in the Blanes canyon region (Catalan coast, NW Mediterranean Sea). Coordinates were: 41°15'N 2°50'E. Fish were caught using an OTMS otter trawl and their size, weight and sex were immediately recorded. Liver and also a portion of muscle tissue were dissected, frozen in liquid N₂ and stored at -80°C for further analysis.

2.2. Analysis of metals

Individual fish liver samples of about 0.1 g wet weight were digested in concentrated nitric acid 65% (Baker) overnight at room temperature and afterwards heated at 80°C for 2 h. Within each digestion series, appropriate blanks with ultra-pure water were also subjected to the same procedure to account for background contamination levels. After cooling, solutions were transferred to a standard volume with ultra-pure water. Determination of Ag, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Pb, Se and Zn was undertaken by inductively coupled mass spectrometry (ICP-Mass; Elan DRC-I, Perkin-Elmer Sciex). Samples of similar weight of certified reference material (DOLT-3 and LUTS-1, National Research Council of Canada, Ottawa), were digested and analysed during each analytical run. Results are expressed as µg g⁻¹ wet weight of tissue.

2.3. Determination of Metallothionein by differential pulse polarography

About 0.2 g wet weight portions of frozen liver were homogenized using an ultra-turrax in 20 mM Tris-HCl buffer, 1 mM dithiothreitol (DTT) and 0.2 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) at pH 8.6 in an ice bath. The homogenates were centrifuged at 30.000g for 45 min at 4°C. The resulting supernatant was then heated at 80°C for 10 min, in order to denature high molecular weight proteins, and subsequently centrifuged at 30.000 g for 45 min at 4°C. This secondary heat-treated supernatant, containing thermally stable MT, was separated from precipitated proteins and used for MT determination. MT was measured using differential pulse polarography as describe by Bebianno and Langston (1989). An aliquot of the heat-treated supernatant was added to the polarographic cell, containing 20 mL hexammincobalt chloride buffer (the supporting electrolyte), together with Triton-X (0.025% v/v). The cell was purged for 2 min with purified N₂ prior to analysis. The polarographic response was measured during a potential scan between -1.38 V and -1.7 V (Model 757 VA Computrace Analyser, Methrom, Switzerland) in SMDE mode. Quantification of MT was performed by using

the standard addition method with rabbit liver MT I+II (Sigma). Results are expressed as $\mu\text{g g}^{-1}$ wet weight of tissue.

2.4. Molar ratios calculations

Molecular ratios were calculated as described in Company et al., (2010). A molecular weight of 6000 Da for MT and the respective atomic weights for metals were adopted for the conversion of MT and metal content ($\mu\text{g/g w.w}$) into molar content (moles/g.w.w). In this way, the calculated ratios are expressed as moles of MT *per* atom of metal in the hepatic tissue.

2.5. Biochemical determinations

A portion of 0.2 g of axial muscle tissue was homogenised in a 50 mM buffer phosphate pH 7.4 in a 1:5 (w:v) ratio using a polytron® blender. The homogenate was centrifuged at 10.000 g x 30' at 4°C and the supernatant (S10) used for biochemical determinations. Absorbance measurements were performed in triplicate using a TECAN Infinite® microplate reader. Activities were expressed in nmol/min/mg prot.

For AChE determination, assay conditions were 1 mM of acetylthiocholine iodide (ASCh) according to the procedure described (Ellman et al., 1961) and modified to 96-well microplate format. Briefly, 25 μl of sample (conveniently diluted) were pre-incubated in triplicate with 150 μl of 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoate (DTNB; 270 μM) for 2 minutes. After that, the reaction was started by adding 50 μl of the substrate ASCh and the increase in absorbance was read at 405 nm during 5 minutes at 25°C.

LDH activity was assayed according to the method developed by Vassault (1983), modified to 96-well microplate format. A 25 μl aliquot of diluted sample (depending on the species) was mixed with 150 μl NADH (300 μM) and 50 μl pyruvate (4.5 mM) and the decrease in absorbance measured over 3 min at 340 nm.

Total protein content was determined by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard (BSA 0.1-1 mg/ml).

2.6. Statistics

All statistical analyses were performed using the software package SPSS. Data were checked for normality (Kolmogorof-Smirnof test) and homogeneous variance (Levene's test). The results were analysed by one way ANOVA followed by Bonferroni's test for multiple comparisons. Data are presented as mean \pm SEM. Pearson correlation coefficients (*r*) were calculated between MT levels, metal content in liver and AChE and LDH activities, in order to measure the strength of association between these variables. Differences at the 5% significance level were considered significant.

3. Results

Biometric characteristics of the fish selected for the study, their sex ratio and their depth distribution range are detailed in Table 1.

Table 1

Biometric characteristics of the deep-sea species selected for the study. Total length and weight are indicated as mean \pm SD. M:male, F:female, H: hermaphrodite species.

Species	Family	Total length (mm)	Weight (g)	Sex ratio M:F	Depth distribution ^a
<i>Alepocephalus rostratus</i>	Alepocephalidae	308 \pm 45	287 \pm 112	8:2	500-2300m
<i>Mora moro</i>	Moridae	344 \pm 46	536 \pm 237	0:10	800-1300m
<i>Lepidion lepidion</i>	Moridae	158 \pm 17	27.8 \pm 9.7	3:7	1000-2000m
<i>Coelorinchus mediterraneus</i>	Macrouridae	84.6 \pm 7.8 ^b	35.3 \pm 9.7	4:6	1200-1500m
<i>Nezumia aequalis</i>	Macrouridae	45.4 \pm 4.8 ^b	37.6 \pm 10	5:5	650-1500m
<i>Trachyrhynchus scabrus</i>	Macrouridae	143 \pm 16 ^b	130.1 \pm 37	7:3	800-1200m
<i>Bathypterois mediterraneus</i>	Ipnopidae	134 \pm 13	20.0 \pm 6.8	H (10)	800-3300m

^a Cartes et al. (2004).

^b For macrourid species it corresponds to anal length, instead of total length.

3.1. Metal and MT concentrations

Metal concentrations (Ag, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Pb, Se, Zn) and MT content in liver of the different fish species are shown in Fig. 1. Although there were significant differences in metal content between species, there was not a consistent pattern of metal bioaccumulation. In relation to essential metals, *T. scabrus* showed the highest content of Cu (12.3 μ g/g w.w.), *C. mediterraneus* of Fe (911.7 μ g/g w.w.) and *A. rostratus* of Zn (233.0 μ g/g w.w.). Regarding non-essential metals and other elements, the levels of Ag were higher in *L. lepidion* (1.85 μ g/g w.w.) while *C. mediterraneus* showed also high levels of Hg (27.6 μ g/g w.w.) and Pb (2.04 μ g/g w.w.). MT content in the liver of the different fish species is also shown in Fig. 1. The highest MT concentration was displayed by *T. scabrus* (2.63 mg/g w.w.) followed by *C. mediterraneus* (1.73 mg/g w.w.). In the other species values ranged from 1.56 mg/g w.w. in *L. lepidion* to 0.45 mg/g w.w. in *A. rostratus*.

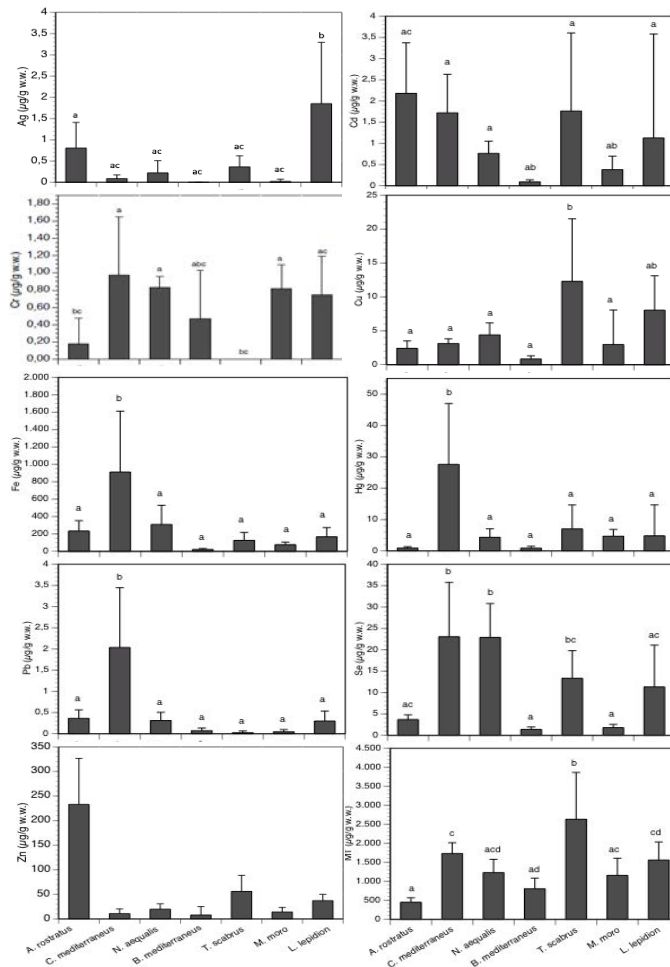


Fig. 1. Metal and metallothionein (MT) content in liver of seven Mediterranean deep-sea species. Data are presented as mean \pm SEM.

3.2. Metal correlations and ratios between metals and MT

Within each species ($n=10$), concentration of Hg and Cd were correlated in all species, except in *A. rostratus* and *M. moro*. That is Pearson correlation coefficients for both toxic metals were: *B. mediterraneus* ($R=0.873$, $p<0.01$); *N. aequalis* ($R=0.771$, $p<0.01$); *C. mediterraneus* ($R=0.791$, $p<0.01$); *L. lepidion* ($R=0.998$, $p<0.001$) and in *T. scabrus* ($R=0.995$, $p<0.001$). Also positive and good correlations were seen between Pb and Cd in the species: *M. moro* ($R=0.798$, $p<0.01$); *N. aequalis* ($R=0.732$, $p<0.05$) and *C. mediterraneus* ($R=0.676$, $p<0.05$).

Interestingly, MT content was also positively correlated to metals (Table 2) such as Zn in the species *M. moro*, *T. scabrus* and *N. aequalis*. Other positive and significant ($p < 0.05$) correlations of MT were with Ag in *L. lepidion* and in *T. scabrus*. MT was related to Cu content in *N. aequalis* and to Cd in *A. rostratus*. Not only MT but also Se content was highly related to Hg ($p < 0.001$) in *L. lepidion*, *M. moro* and *C. mediterraneus*. For the rest of species it ranged between $R = 0.570$ - 0.614 but it did not reach significance ($p > 0.05$). Se content also varied similarly to Cd in *L. lepidion*, *N. aequalis* and *T. scabrus*. Se and Ag were positively related in *C. mediterraneus*.

Molar ratios of MT or Se and some other relevant metals (or their sum) are shown in Table 3 for the seven species analysed and significant differences between deep-sea species were evidenced. The MT and toxic metals ratio was always > 1 . That is MT: Cd ranged from 4:1 to 163:1 and MT:Hg from 2:1 to 31:1. The highest ratio attained in *B. mediterraneus*. The Se:Hg ratio, considered as an indicative of detoxification by Se, was in all species ≥ 1 .

Table 2. Pearson's correlation R^2 (above) and p (below) between metallothionein with some selected metals (Ag, Cd, Cu and Zn) considered MT inducers and between selenium and Ag, Cd and Cu in seven Mediterranean deep-sea species. Significant results are highlighted. N.A. not analysed

Species	Metallothionein				Selenium		
	Ag	Cd	Cu	Zn	Ag	Cd	Hg
<i>Alepocephalus rostratus</i>	0.183	0.679	0.571	-0.233	0.438	0.305	0.592
	0.637	<0.05	0.108	0.546	0.205	0.392	0.071
<i>Mora moro</i>	0.179	-0.035	-0.033	0.829	-0.411	0.201	0.958
	0.620	0.923	0.929	<0.01	0.238	0.578	<0.001
<i>Lepidion lepidion</i>	0.773	0.416	0.619	-0.261	0.531	0.9770	0.978
	0.05	0.306	0.102	0.533	0.176	<0.001	<0.001
<i>Coelorinchus mediterraneus</i>	-0.548	-0.504	-0.372	0.210	0.737	0.626	0.951
	0.126	0.167	0.325	0.587	<0.05	0.053	<0.001
<i>Nezumia aequalis</i>	-0.096	0.517	0.852	0.763	0.359	0.780	0.570
	0.806	0.164	<0.01	<0.05	0.309	<0.01	0.085
<i>Trachyrynchus scabrus</i>	0.684	0.382	0.630	0.808	0.518	0.645	0.614
	0.05	0.276	0.051	<0.01	0.125	<0.05	0.065
<i>Bathypterois mediterraneus</i>		-0.207	0.107	0.256		0.404	0.578
		0.556	0.768	0.475		0.246	0.080

3.3. AChE and LDH activities in fish muscle

In Table 4 muscular AChE and LDH activities for the seven fish species analysed are shown. The highest AChE activity ($p < 0.05$) was seen in *C. mediterraneus* and the lowest corresponded to *M. moro* and *A. rostratus*, while the remaining species displayed intermediate activities. Pearson's correlation coefficient between AChE activity and the nine individual metals analysed showed, in *M. moro*, a negative significant correlation between AChE and Se ($R = -0.637$, $p < 0.05$) and Hg ($R = -0.661$, $p < 0.05$). In contrast, in *B. mediterraneus* it was positive between AChE and Se ($R = 0.758$, $p < 0.05$) and with Zn ($R = 0.956$; $p < 0.01$). As for LDH activity, it was significantly lower in *L. lepidion* and *N. aequalis* while in *M. moro* was the highest. LDH was positively related to Zn content ($R = 0.710$, $p < 0.05$) in *L. lepidion* and to MT content ($R = 0.751$, $p < 0.05$) in *A. rostratus*. In both enzyme activities, the range between the highest and lowest activities was about one order of magnitude.

Table 3. Molar ratios between metallothionein (MT) and/or selenium (Se) and selected metals in seven Mediterranean deep-sea species.

Species	MT:Ag	MT:Cd	MT:Cu	MT:Hg	MT:Zn	MT: Σmetals	Se:Hg	Se:Cd	Se:Ag
<i>A. rostratus</i>	10:1	4:1	2:1	17:1	2:95	2:97	11:1*	2:1	6:1
<i>C. mediterraneus</i>	361:1	19:1	6:1	2:1	2:1	7:9	2:1	19:1	365:1
<i>N. aequalis</i>	99:1	30:1	3:1	9:1	2:3	1:2	13:1*	43:1	140:1
<i>B. mediterraneus</i>	--	163:1	10:1	31:1	1:1	1:1	4:1	21:1	--
<i>T. scabrus</i>	131:1	28:1	2:1	13:1	1:2	2:5	5:1	11:1	50:1
<i>M. moro</i>	986:1	57:1	4:1	8:1	8:9	2:3	1:1	7:1	117:1
<i>L. lepidion</i>	15:1	26:1	2:1	11:1	3:4	1:3	6:1	14:1	8:1

4. Discussion

4.1. Metal and MT concentrations

The comparison of metal content in the livers of deep-sea fish from the Blanes Canyon with that of comparable species (*N. aequalis*, *M. moro* and *Lepidion* sp.) was only possible with data from fish sampled in the Atlantic Ocean, either in the North Atlantic off Scotland (Mormede and Davies, 2001) or in the area of the hydrothermal vents in the Mid-Atlantic Ridge off Azores (Company et al., 2010; Martins et al., 2006), as it is detailed in Table 5. In general, metal concentrations found in the Mediterranean samples were intermediate to the higher values reported for species from hydrothermal vents and the lower concentrations found off Scotland in the Atlantic waters. These results are not surprising as the Mediterranean Sea is a small and enclosed sea with a higher anthropogenic metal input than the open Atlantic Ocean (Angelidis et al., 2011). Hydrothermal vents are, in turn, particular areas with metal-enriched waters (Childress and Fisher, 1992). Comparisons of metal content for particular species from different

locations revealed that the Mediterranean *M. moro* exhibited a one order of magnitude lower content of Cd than the same species from the hydrothermal vent (Company et al., 2010). By contrast, in the Mediterranean *N. aequalis* the Cd concentration was 2.6 fold higher than that of the same species sampled in the Rockall Trough off Scotland (Mormede and Davies, 2001). The same can be also said for essential metals such as Cu and Fe, as the concentration of Cu in *N. aequalis* from the Mediterranean Sea was 2.3-fold higher than that found in the same species off Scotland, whereas Fe content in *M. moro* from the Mediterranean was 6-times lower than in the same species from the hydrothermal vent (Table 5). The results for essential metals are somehow surprising, as it is expected that due to their biological significance they should be tightly regulated in a species dependent manner.

Hg deserves special attention due to its toxicity and high biomagnification capacity as well as for the high levels encountered in the present study in fish liver, but also recently reported in muscle of the same deep-sea species (Koenig et al., 2013) (see Table 5). In the present study, *M. moro* displayed 6.7 fold higher Hg levels than individuals of the same species sampled near the Atlantic hydrothermal vents (Martins et al., 2006). Similarly, Hg levels in liver of *N. aequalis* from the Blanes canyon area clearly exceeded by 54-times those found in Atlantic waters off Scotland (Mormede and Davies, 2001). Within the macrourid species considered in the present work, *C. mediterraneus* had the highest Hg levels in liver. Considering that, although *T. scabrus* and *C. mediterraneus* have been described to have similar feeding habits, both feeding predominantly on infauna (Cartes et al., 2002), the higher trophic level according to $\delta^{15}\text{N}$ values (Polunin et al., 2001) could explain the higher bioaccumulation potential in *C. mediterraneus*. Moreover, since sediment from the deep-sea Mediterranean waters concentrates Hg and other metals in the first centimetres (Angelidis et al., 2011; Kotnik et al., 2007), organisms feeding on animals living within this upper sediment layer will be highly exposed to Hg. In fact, the values found in liver of *C. mediterraneus* in the present study are, as far as we know, among the highest reported in non-experimental fish from the Mediterranean Sea. However, at a larger geographical and phylogenetic scale, values of hepatic Hg concentration as high as 370 $\mu\text{g/g}$ were found in marine mammals (Endo, et al 2002) or of 42.9 $\mu\text{g/g}$ reported in the bathypelagic fish *Aphanopus carbo* sampled in the Madeira Archipelago, Portugal (Bebianno et al 2007). It is important to note that the large predator *A. carbo* feeds on macrourids, morids and alepocephalids, to which families the fish analysed in the present study, belong.

The proportionality of MT and Hg content was presented as evidence for the role of MT in Hg binding, storage and detoxification in the predator fish *A. carbo* (Bebianno et al., 2007). Nevertheless, in the present study no significant correlation between total Hg and MT content in any of the species captured in the Blanes Canyon

(NW Mediterranean) was detected. In fact, a significant relationship between MT levels and Hg content was detected in a few studies on estuarine, coastal and freshwater fish (Ureña et al., 2007; Quirós et al., 2007; Monteiro et al., 2013). Instead, Hg was well correlated with Se in all species and more significantly in *L. lepidion*, *C. mediterraneus* and *M. moro* ($R=0.951-0.978$; $p<0.001$). Moreover, MT was positively correlated to Zn, Ag, Cu and Cd concentrations in some particular deep-sea fish, all considered inducers of MT (Cosson, 1994). These former results are consistent with the existence of several mechanisms of metal detoxification in fish liver, some involving both Se and MT as suggested by Sørmo et al., (2011). According to these authors, MT only responds to the presence of Hg in case of Se deficiency and this does not seem to be the case for the Mediterranean species studied, which presented a molar Se:Hg ratio equal or greater than 1:1. With regard to MT content in liver, levels ranged from 1157 to 1560 $\mu\text{g/g w.w}$ in the moridae species analysed in the present study (i.e. *M. moro* and *L. lepidion*). This protein content was lower than the content (2060-2555 $\mu\text{g/g w.w}$) revealed in other equivalent species (*M. moro* and *Antimora rostrata*) from an hydrothermal vent (Company et al., 2010). Moreover, Mediterranean deep-sea species exhibited much lower MT levels than middle slope species from the NW Iberian peninsula Atlantic shelf despite the fact that metal levels in the liver of the Atlantic species were not higher (Fernandes et al., 2008). This could suggest that deep-sea species might rely to a greater extent on other mechanisms than MT induction for metal protection.

4.2. Defence mechanisms against metal toxicity

Based on the results on the hepatic metal and MT content (Fig 1), the correlations between selected metals and MT as well as Se (Table 2) and the molar ratios between metals, MT and Se (Table 3), several detoxification mechanisms for deep-sea species can be postulated. MT:metal molar ratios were considered as a proxy of metal saturation of the protein. However, many considerations should taking into account such as a differential MT affinity and binding capacity for each particular metal (Wood, 2012).

Analysing each species in particular, *A. rostratus* liver displayed a high content on Cd and specially Zn and, by contrast, low levels of Hg and Se and the protein MT. In fact, in this species the MT: Σ metals ratio, mostly due to high Zn levels, is the lowest from all studied species in the present work, and the same can be said for the Se:Cd molar ratio. Therefore, in this species, it is possible that Zn, more than Se or MT, exerts a main protective role against Cd toxicity. In mammalian species, Zn has been described to protect the liver from structural and functional damage due to Cd exposure (Jihne et al., 2009; Rogalska et al., 2011), however, no information is available on fish. In this study, the significant relationship between MT by Cd ($R=0.679$; $p<0.05$) also supported a certain MT induction as a result of Cd exposure. As Hg levels in liver were of the same

order as those found in muscle of the same species and area, they do not sustain the idea that in this species the liver acts as a sink for Hg storage. Moreover, the relatively high MT:Hg (17:1) and Se:Hg (11:1) ratios in liver give support an additional protective role of MT and Se against potential Hg toxicity. Moreover, antioxidant enzyme activities in this species, including Cu-ZnSOD, were considerably high (Koenig et al., in press).

The morid *M. moro* showed a very strong relationship between Se and Hg content in liver ($R=0.958$; $p<0.001$) and the lowest Se:Hg ratio (1:1), suggesting the complete binding of Hg to Se and a low Se protection capacity against further Hg inputs. In this species, Hg content in the liver was two-fold higher compared to the value reported in muscle for the same species and area, supporting in this case, a certain role of the liver in Hg sequestration and storage. MT was significantly correlated to Zn ($R=0.829$; $p<0.01$), both parameters considered defence mechanisms against toxic metals exposure and confirming the role of MT in Zn transport and homeostasis as seen in other species (Cosson, 1994). The MT:Ag ratio was also the highest from all studied species, reinforcing a high capacity of MT for binding to this metal in *M. moro*. Although no particular defence system was singled out in this species, as metal bioaccumulation was relatively low if compared to the other species, it could be speculated that the different strategies available in this species are enough to face metal exposure. By contrast, the also morid species, *L. lepidion*, presented high levels of Cd, Cu, Se and MT and the highest of Ag. Furthermore, MT and Ag were correlated ($R=0.773$, $p<0.05$) suggestive of MT-Ag binding. In addition, in this species, Se also seemed to display a significant role in Cd ($R=0.977$, $p<0.001$) and Hg ($R=0.978$, $p<0.001$) binding. The above mentioned relationships, together with high Se:Cd (14:1) and Se:Hg (6:1) ratios, support a strong defence capacity of Se against these toxic metals. Moreover, the over 5-fold higher levels of Hg encountered in liver when contrasted to muscle, sustain the role of the liver as a Hg storing organ, probably mediated by MT and Se binding. In addition to the above defence mechanisms, significant antioxidant enzyme activities were seen in this species in contrast to other deep-sea fish (Porte et al., 2000; Koenig et al., in press).

The macrourid *C. mediterraneus* exhibited the highest content of most metals (Fe, Pb, Hg and Cd) and a good correlation between Se and Hg ($R=0.951$; $p<0.001$). In this species, the two main defence mechanisms for Hg protection, Se and MT, were close to saturation as indicated by their respective and low molar ratios (2:1). In addition, the almost 20-fold greater content of Hg in liver compared to muscle tissue reinforces a key role of the liver in metal protection and storage. In a previous study, a strong relationship was observed between Hg content in muscle between deep-sea species (included the ones studied in here) and their trophic level (Koenig et al., 2013), which was not confirmed in the present study on liver. In contrast, another macrouride, *N. aequalis*, presented intermediate levels for most metals, except Se. The role of MT in

handling essential metals, such as Cu and Zn, was reflected in the positive correlations (R=0.852; p<0.01 and R=0.763; p<0.05, respectively). Indeed, the reported high affinity of Se for Cd (Newairy et al., 2007) may be the reason for the strong relationship between them (R=0.780; p<0.01). Moreover, in this species, the high molar ratios of Se:Hg (13:1) but mainly Se:Cd (43:1) confirmed a protective role of Se against Hg, but mostly Cd toxicity. For *N. aequalis*, the mean Hg concentration in liver was 2.4-fold higher than in muscle, suggesting a certain storage capacity of Hg in liver although not as significant as in *C. mediterraneus*. The other macrourid, *T. scabrous*, was singled out for having the highest content in MT, but also metals such as Cu and Cd and Se. In this species, an even stronger correlation between MT and Zn (R=0.808; p<0.01) was detected compared to *N. aequalis*, and also a significant relationship between Cd and Se (R=0.645; p<0.05). Derived from the high values of MT and Se, and intermediate molar ratios of these elements with toxic metals, there appears to be still a buffering capacity of the liver in metal protection. Moreover, hepatic Hg content was over one order of magnitude higher than in muscle, suggesting once more a significant role of the liver in Hg storage.

The smallest and sedentary species, *B. mediterraneus* displayed the lowest contents of toxic metals (i.e. Hg and Cd), but also Se. In this species, antioxidant enzyme activities were also lower in contrast to *L. lepidion* and a macrourid species (Porte et al., 2000), in agreement with a lower reactive oxygen species threat due to lesser toxic metals exposure. In this species, the molar ratios MT:Hg and MT:Cd were the highest, suggesting a high buffering capacity for metal binding of MT proteins. In addition, the similar levels of Hg in liver and muscle do not support a preferential storage of this toxic metal in any of these two tissues.

Table 4.

Muscular activities of acetylcholinesterase (AChE) and lactate dehydrogenase (LDH) in nmol/min/mg protein from seven deep-sea fish species collected at the Blanes Canyon at the 1200 m depth in winter 2009. Different superindexes indicate statistical differences within species (p < 0.05).

Species	AChE	LDH
<i>Alepocephalus rostratus</i>	13.1±1.3 ^a	955.1±192.8 ^{bc}
<i>Mora moro</i>	10.2±1.8 ^a	1228.5±97.1 ^b
<i>Lepidion lepidion</i>	44.7±4.7 ^c	118.1±10.9 ^a
<i>Coelorinchus mediterraneus</i>	89.3±12.5 ^b	770.9±104.7 ^{bc}
<i>Nezumia aequalis</i>	28.5±3.1 ^{ac}	370.5±34.3 ^a
<i>Trachyrynchus scabrus</i>	30.2±3.6 ^{ac}	920.5±94.9 ^{cb}
<i>Bathypterois mediterraneus</i>	49.8±7.8 ^c	729.7±62.3 ^c

4.3. AChE and LDH activities in fish muscle

AChE activity had no clear relationship with regard to phylogenetic groups or any of the investigated ecological parameters of the species. However, on a interspecies level, a negative relationship was observed between the mean fish weight and AChE activity of the different species ($AChE=50.772e^{-0.003(\text{weight})}$; $R=0.7489$). A negative relationship between AChE activity and fish weight was described for a marine species, *Merluccius merluccius*, although inhabiting shallower depths (Solé et al., 2006). LDH activity, in turn, was positively related to fish weight ($LDH=226.51\ln(\text{weight})-253.89$; $R=0.5938$). In deep-sea fish, LDH has been associated with the locomotory performance of a species, including benthic species from deep-sea environments although most clearly evidenced in pelagic ones (Drazen and Seibel, 2007). Thus, it would be expected that species with higher motility need would also exhibit higher LDH activity. In this study, however, no clear association could be established between LDH and their mobility performance as the most sedentary *B. mediterraneus* displayed LDH activity similar to more active species such as *T. scabrus* and *A. rostratus*. Neither could the LDH activity be related to phylogenic traits as the distantly related morid *L. lepidion* and the macrourid *N. aequalis* were species with similar and the lowest LDH activities. As all fish were collected from the same site and depth and no relationship was seen between the enzymatic activities and their trophic level and/or their hepatic metal content, it can be predicted that the activities reported in this study reflect baseline enzymatic activities for these muscular parameters.

Table 5.

Comparison of metal content in liver of selected dee-sea fish species. Family indicated in brackets besides species name. Mn and Ni levels were not detailed in text but were included for contrat with ther studies. ND not detected inour deep-sea species. NA not available. Data from foodnote^c corresponds to max +min/2

Species and Site	Ag	Cd	Cr	Cu	Fe	Hg	Hg muscle	Mn	Ni	Zn
Rockall Trough Scotland(NE Atlantic Ocean)										
<i>Nezumia aequalis</i> (Macrouridae) ^a	NA	0.29	NA	1.92	NA	0.08	0.15	NA	NA	16.18
<i>Lepidion eques</i> (Moridae) ^a	NA	0.27	NA	3.07	NA	0.05	0.08	NA	NA	15.05
MAR hydrothermal area Azores (Atlantic Ocean)										
<i>Mora moro</i> (Moridae) ^b	0.08	3.03	6.68	4.05	452.02	0.70 ^b	1.20 ^b	0.97	3.58	NA
<i>Antimora rostrata</i> (Moridae) ^c	0.20	0.83	1.29	8.38	38.00	0.40 ^b	1.10 ^b	0.24	0.62	NA
Blanes Canyon Spain (NW Mediterranean Sea)										
<i>Alepocephalus rostratus</i> (Alepocephalidae) ^d	0.94	3.20	0.37	2.64	261.57	0.78	0.64 ^e	1.02	ND	282.47
<i>Mora moro</i> (Moridae) ^d	0.07	0.47	1.04	8.90	78.41	4.23	2.40 ^e	1.48	ND	16.36
<i>Lepidion lepidion</i> (Moridae) ^d	2.10	3.65	0.88	11.05	224.67	14.72	0.94 ^e	1.74	ND	30.07
<i>Coelorrhinus mediterraneus</i> (Macrouridae) ^d	0.92	2.03	0.80	2.95	1426.29	29.46	1.46 ^e	1.66	0.23	6.48
<i>Nezumia aequalis</i> (Macrouridae) ^d	0.41	0.75	ND	5.18	508.52	5.50	1.79 ^e	3.23	0.10	20.38
<i>Trachyrhynchus scabrus</i> (Macrouridae) ^d	0.49	3.42	1.06	19.20	205.26	13.94	0.65 ^e	2.80	ND	61.11
<i>Bathypterois mediterraneus</i> (Ipnopidae) ^d	0.05	0.09	1.19	2.01	20.39	0.91	1.23 ^e	1.41	ND	25.51

^a Mormede et al. (2001)

^b Martins et al. (2006)

^c Company et al. (2010)

^d Present study

^e Koenig et al. (2013a)

In conclusion, from the little data available for comparison, metal concentrations in liver of the deep-sea Mediterranean species were intermediate between those same species in the Atlantic hydrothermal vents and those from NE Atlantic waters off Scotland. Derived from the associations between metals and MT and their molar ratios it seems that both MT and Se are important parameters involved in metal detoxification processes of Mediterranean deep-sea fish. The relative role of each mechanism was species-dependent but the Se pathway was more significant in the species with higher Hg content in liver. In addition, results suggested that MT Se and Zn also play a role in metal protection in the analysed species. Physiological stress parameters in muscle, such as AChE and LDH enzyme activities, were not clearly related to metal content in liver, thus suggesting that the activities reported probably reflect baseline levels as fish were sampled at the same time and location.

Acknowledgements

The present study was funded by the Spanish Science and Technology Ministry project PROMETEO (CTM2007-66316-C02-02/MAR). Samuel Koenig holds a PhD grant (AFR 08/067) from the Fonds National de la Recherche (FNR), Luxembourg.

5. References

- Afonne OJ, Orisakwe OE, Ndubuka GI, Akumka DD, Ilondu N. Zinc protection of mercury-induced hepatic toxicity in mice. *Biol Pharm Bull* 2000;23:305-8.
- Angelidis MO, Radakovitch O, Veron A, Aloupi M, Heussner S, Price B. Anthropogenic metal contamination and sapropel imprints in deep Mediterranean sediments. *Mar Pollut Bull* 2011;62:1041-52.
- Bebiano MJ, Langston WJ. Quantification of metallothionein in marine invertebrates using differential pulse polarography. *Port Electrochim Acta* 1989;7:511-24.)
- Bebiano MJ, Santos C, Canário J, Gouveia N, Sena-Carvalho D, Vale C. Hg and metallothionein-like proteins in the black scabbardfish *Aphanopus carbo*. *Food. Chem. Toxicol.* 2007;45:1443-52.
- Berry MJ, Ralston NVC. Mercury Toxicity and the Mitigating Role of Selenium. *EcoHealth* 2008;5:456-9.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
- Branco V, Canário J, Lu J, Holmgren A, Carvalho C. Mercury and selenium interaction in vivo: Effects on thioredoxin reductase and glutathione peroxidase. *Free Radical Biol. Med.* 2012;52:781-93.
- Burger J, Gochfeld M, Jeitner C, Donio M, Pittfield T. Interspecific and intraspecific variation in selenium:mercury molar ratios in saltwater fish from the Aleutians: Potential protection on mercury toxicity by selenium. *Sci Total Environ* 2012;431:46-56.

- Cartes JE, Abello P, Lloris D, Carbonell A, Torres P, Maynou F, de Sola LG. Feeding guilds of western Mediterranean demersal fish and crustaceans: an analysis based on a spring survey. *Sci. Mar.* 2002;66:209-20.
- Cartes JE, Maynou F, Moranta J, Massuti E, Lloris D, Morales-Nin B. Patterns of bathymetric distribution among deep-sea fauna at local spatial scale: comparison of mainland vs. insular areas. *Prog Oceanogr* 2004;60:29-45.
- Childress JJ, Fisher CR. The biology of hydrothermal vent animals: physiology, biochemistry, and autotrophic symbioses. *Oceanography and Marine Biology: an annual review*. Vol.30 1992:337-441.
- Choy CA, Popp BN, Kaneko JJ, Drazen JC. The influence of depth on mercury levels in pelagic fishes and their prey. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2009; 106:13865-9.
- Company R, Felícia H, Serafim A, Almeida AJ, Biscoito M, Bebianno MJ. Metal concentrations and metallothionein-like protein levels in deep-sea fishes captured near hydrothermal vents in the Mid-Atlantic Ridge off Azores. *Deep-Sea Res Part I* 2010; 57:893-908.
- Cosson RP. Metallothionein Induction in the Liver of Carp after Contamination by Silver, Cadmium and Mercury Following or not Pretreatment by Zinc. *Biometals* 1994;7:9-19.
- Cronin M, Davies IM, Newton A, Pirie JM, Topping G, Swan S. Trace metal concentrations in deep sea fish from the North Atlantic. *Mar Environ Res* 1998;45:225-38.
- Cuvin-Aralar MLA, Furness RW. Mercury and selenium interaction: A review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 1991;21:348-64.
- Díez S. Human Health Effects of Methylmercury Exposure. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 2009; 198:111-32.
- Drava G, Capelli R, Minganti V, De Pellegrini R, Orsi Relini L, Ivaldi M. Trace elements in the muscle of red shrimp *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) (Crustacea, Decapoda) from Ligurian sea (NW Mediterranean): variations related to the reproductive cycle. *Sci Total Environ* 2004; 321:87-92.
- Drazen JC, Seibel BA. Depth-related trends in metabolism of benthic and benthopelagic deep-sea fishes. *Limnol. Oceanogr.* 2007; 52:2306-16.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres jr. V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961;7:88-95.
- Endo T, Haraguchi K, Sakata M. Mercury and selenium concentrations in the internal organs of toothed whales and dolphins marketed for human consumption in Japan. *Sci. Total. Environ.* 2002; 300:15-22.
- Fernandes D, Bebianno MJ, Porte C. Hepatic levels of metal and metallothioneins in two commercial fish species of the Northern Iberian shelf. *Sci Total Environ* 2008; 391:159-67.
- Frasco MF, Fournier D, Carvalho F, Guilhermino L. Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. *Biomarkers* 2005;10: 360-74.

- Frasco MF, Colletier JP, Weik M, Carvalho F, Guilhermino L, Stojan J, Fournier D. Mechanisms of cholinesterase inhibition by inorganic mercury. *FEBS Journal* 2007;274:1849-61.
- Gill TS, Tewari H, Pande J. In vivo and In vitro Effects of Cadmium on selected Enzymes in Different Organs of the Fish *Barbus-Conchonus Ham* (Rosy Barb). *Comp Biochem Physiol C* 1991; 100:501-5.
- Gill TS, Tewari H, Pande J. Use of the fish enzyme system in monitoring water quality: Effects of mercury on tissue enzymes. *Comp. Biochem Physiol C* 1990;97:287-92.
- Hong YS, Hunter S, Clayton LA, Rifkin E, Bouwer EJ. Assessment of mercury and selenium concentrations in captive bottlenose dolphin's (*Tursiops truncatus*) diet fish, blood, and tissue. *Sci. Total. Environ.* 2012; 414:220-6.
- Huang ZY, Zhang Q, Chen J, Zhuang ZX, Wang XR. Bioaccumulation of metals and induction of metallothioneins in selected tissues of common carp (*Cyprinus carpio* L.) co-exposed to cadmium, mercury and lead. *Appl. Organomet Chem* 2007;21:101-107.
- Ikemoto T, Kunito T, Tanaka H, Baba N, Miyazaki N, Tanabe S. Detoxification Mechanism of Heavy Metals in Marine Mammals and Seabirds: Interaction of Selenium with Mercury, Silver, Copper, Zinc and Cadmium in liver. *Arch. Environ Contam. Toxicol* 2004;47:402.
- Jihen EH, Imed M, Fatima H, Abdelhamid K. Protective effects of selenium (Se) and zinc (Zn) on cadmium (Cd) toxicity in the liver of the rat: Effects on the oxidative stress. *Ecotoxicol Environ Saf* 2009; 72:1559-64.
- Khan MAK, Wang F. Mercury-selenium compounds and their toxicological significance: Toward a molecular understanding of the mercury-selenium antagonism. *Environ Toxicol Chem* 2009; 28:1567-77.
- Koenig S, Solé M, Fernández-Gómez C, Díez S. New insights into mercury bioaccumulation in deep-sea organisms from the NW Mediterranean and their human health implications. *Sci Total Environ* 2013; 442:329-35.
- Koenig, S., Fernández, P., Company, J. B., Huertas D., Solé M. Are deep-sea organisms dwelling within a submarine canyon more at risk from anthropogenic contamination than those from the adjacent open slope? A case study of Blanes canyon (NW Mediterranean). Special Issue "Deep Mediterranean Canyons". *Prog Oceanogr* 2013; 118:249-259
- Kotnik J, Horvat M, Tessier E, Ogrinc N, Monperrus M, Amouroux D et al. Mercury speciation in surface and deep waters of the Mediterranean Sea. *Mar Chem* 2007;107:13-30.
- Kress N, Hornung H, Herut B. Concentrations of Hg, Cd, Cu, Zn, Fe and Mn in deep sea benthic fauna from the southeastern Mediterranean sea: A comparison study between fauna collected at a pristine area and at two waste disposal sites. *Mar Pollut Bull* 1998;36:911-21.
- Livingstone DR. Contaminant-stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms. *Mar Pollut Bull* 2001;42:656-66.
- Martins I, Costa V, Porteiro FM, Colaço A, Santos RS. Mercury concentrations in fish species caught at Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2006; 320:253-8.

- Monteiro DA, Rantin FT, Kalinin AL. Dietary intake of inorganic mercury: bioaccumulation and oxidative stress parameters in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicology* 2013; 22: 446-56.
- Mormede S, Davies IM. Trace elements in deep-water fish species from the Rockall Trough. *Fisheries Research* 2001;51:197-206.
- Newairy AA, El-Sharaky AS, Badreldeen MM, Eweda SM, Sheweita SA. The hepatoprotective effects of selenium against cadmium toxicity in rats. *Toxicology* 2007;242:23-30.
- Ordiano-Flores A, Rosiles-Martínez R, Galván-Magaña F. Biomagnification of mercury and its antagonistic interaction with selenium in yellowfin tuna *Thunnus albacares* in the trophic web of Baja California Sur, Mexico. *Ecotoxicol Environ Saf* 2012;86:182-7.
- Orisakwe OE, Afonne OJ, Nwobodo E, Asomugha L, Dioka CE. Low-dose mercury induces testicular damage protected by zinc in mice. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001;95:92-6.
- Payne JF, Mathieu A, Melvin W, Fancey LL. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Mar Pollut Bull* 1996; 32:225-31.
- Polunin NVC, Morales-Nin B, Pawsey WE, Cartes JE, Pinnegar JK, Moranta J. Feeding relationships in Mediterranean bathyal assemblages elucidated by stable nitrogen and carbon isotope data. *Mar Ecol Prog Ser* 2001; 220:13-23.
- Porte C, Escartin E, Garcia LM, Sole M, Albaiges J. Xenobiotic metabolising enzymes and antioxidant defences in deep-sea fish: relationship with contaminant body burden. *Mar Ecol Progr Ser* 2000;192:259-66.
- Quiros L, Pina B, Solé M, Blasco J, Lopez MA, Riva MC Barceló D, Raldúa D. Environmental monitoring by gene expression biomarkers in *Barbus graellsii*: Laboratory and field studies. *Chemosphere* 2007;67:1144-54.
- Raymond LJ, Ralston NVC. Selenium's importance in regulatory issues regarding mercury. *Fuel Process Technol* 2009;90:1333-8.
- Rogalska J, Pilat-Marcinkiewicz B, Brzówska MM. Protective effect of zinc against cadmium hepatotoxicity depends on this bioelement intake and level of cadmium exposure: A study in a rat model. *Chem Biol Interact* 2011;193:191-203.
- Sasakura C, Suzuki K T. Biological interaction between transition metals (Ag, Cd and Hg), selenide/sulfide and selenoprotein P. *J Inorg Biochem* 1998;71:159-62.
- Solé M, de la Parra LMG, Alejandro-Grimaldo S, Sardá F. Esterase activities and lipid peroxidation levels in offshore commercial species of the NW Mediterranean Sea. *Mar Pollut Bull* 2006;52:1708-16.
- Sørmo EG, Ciesielski TM, Øverjordet IB, Lierhagen S, Eggen GS, Berg T et al. Selenium moderates mercury toxicity in free-ranging freshwater fish. *Environ Sci Technol* 2011;45:6561-6.
- Storelli MM, Giacomini-Stuffler R, Marcotrigiano GO. Total and methylmercury residues in cartilaginous fish from Mediterranean Sea. *Mar Pollut Bull* 2002;44:1354-8.

- Tecchio S., Van Oevelen D., Soetaert K., Navarro J., Ramírez-Llodra E., 2013. Trophic dynamics of deep-sea megabenthos are mediated by surface productivity. *PLoS ONE* 8(5): e63796.
- Ureña R, Peri S, del Ramo J, Torreblanca A. Metal and metallothionein content in tissues from wild and farmed *Anguilla anguilla* at commercial size. *Environ Int* 2007;33:532-9.
- Vassault A. Lactate dehydrogenase. In: Bergmeyer, M.O. (Ed). *Methods of Enzymatic Analysis, Enzymes: Oxidoreductases, Transferases*. Academic Press, New York; 1983. p. 118-26.
- Viarengo A, Burlando B, Dondero F, Marro A, Fabbri R. Metallothionein as a tool in biomonitoring programmes. *Biomarkers* 1999;4: 455-66.
- Vieira LR, Gravato C, Soares AMVM, Morgado F, Guilhermino L. Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: Linking biomarkers to behaviour. *Chemosphere* 2009;76:1416-27.
- Wepener V, van Vuren JHJ, Chatiza FP, Mbizi Z, Slabbert L, Masola B. Active biomonitoring in freshwater environments: early warning signals from biomarkers in assessing biological effects of diffuse sources of pollutants. *Phys Chem Earth* 2005;30:751-61.
- Wessjohann LA, Schneider A, Abbas M, Brandt W. Selenium in chemistry and biochemistry in comparison to sulfur. *Biol Chem* 2007;388:997-1006.
- Wood CM, Farrell AP, Brauner CJ. Homeostasis and Toxicology of Essential Metals, Volume 31A. *Fish Physiology*: Academic Press; 2012. p. ix-xiii.
- Wood CM. An introduction to metals in fish physiology and toxicology: basic principles. In: Wood CM, Farrell AP, Brauner CJ, editors. *Contents of Homeostasis and Toxicology of Essential Metals, Volume 31A*. *Fish Physiology*: Academic Press; 2012. p. 1-51.

1.5.2 Article 2

Article publicat en la revista Marine Pollution Bulletin 77 (2013) 90-99

Metal concentrations and detoxification mechanisms in

***Solea solea* and *Solea senegalensis* from NW Mediterranean fishing grounds**

R. Siscar¹, A. Torreblanca¹, A. Palanques², M. Solé^{2*}

¹Departamento Biología Funcional y Antropología Física. Universitat de València. Dr. Moliner 50 Burjassot 46100 Valencia, Spain

²Institut de Ciències del Mar (ICM-CSIC). Passeig marítim de la Barceloneta 37-49 08003 Barcelona, Spain.

* Corresponding autor. Tel.: +34 932 30 95 00; fax: +34 932 30 95 55.

E-mail address: msole@icm.csic.es (M. Solé)

Abstract

The common sole, *Solea solea* and the Senegalese sole, *Solea senegalensis* are two important commercial species that coexist in the NW Mediterranean Sea. The present field survey was designed to assess the role of kidney in metal handling and detoxification in the two sole species collected at six fishing grounds along the Catalan coast. Metallothionein (MT) and selenium (Se) were analysed in relation to toxic metal loads in kidney as potential protective mechanisms. Acetylcholinesterase (AChE) and lactate dehydrogenase (LDH) activities as well as lipid peroxidation (LP) levels were measured in several tissues as general markers of toxicity. AChE was measured in brain muscle and gills, LDH in plasma and LP in muscle and gills. The protective role of MT and Se was indicated by the positive correlations with Hg and Cd levels as well as with the high Se:Hg ratio, in a species-dependent way. Principal Component Analysis (PCA) considering all chemical and biomarker variables discriminated individuals collected at the different fishing grounds.

Keywords: Metallothionein, selenium, kidney, acetylcholinesterase, lactate dehydrogenase, lipid peroxidation.

1. Introduction

Metal contamination in coastal marine ecosystems can be due to natural geological processes but, it can also be enhanced as a result of anthropogenic activities; thus, increasing metallic exposure in aquatic organisms. In the NW Mediterranean, presence of essential and non-essential metals in superficial sediment in relation to anthropogenic activities as well as geological events have been thoroughly described (Grousset et al., 1995; Palanques et al., 1998; Palanques et al., 2008; Puig et al., 1999; Roussiez et al 2006). However, as only a fraction of the metals present in sediment are available to aquatic organisms, it is essential to know metallic presence in the biotic fraction as it is the one to potentially affect their health status (Wood et al., 2012). The main routes for metal exposure in aquatic fauna are by respiration through gills and by food transfer, especially in organisms of high trophic level and/or benthic behaviour, characteristics that make them more suitable for pollution monitoring studies (Henry et al., 2012; Costa et al., 2012; Ribocco et al., 2012). Benthic fish, and particularly solea species (*Solea solea* and *Solea senegalensis*), are important economic resources that coexist in the Mediterranean region and are highly appreciated for human consumption (Imsland et al., 2003). Thus, presence of significant levels of toxic metals in these species can not only affect their physiological performance but also negatively affect consumer's health (Castro-González and Méndez-Armenta, 2008). A few studies in the Mediterranean have already reported presence of pesticides, metals and persistent organic pollutants in these fish species (Dierking et al., 2009; Trisciani et al., 2011; Sanchez-Nogué et al., 2013), although the use of sole as sentinel is more significant in Atlantic waters (Costa et al., 2009; 2010; 2012; Fonseca et al., 2011; Oliva et al., 2012; Wessel et al., 2010). The characterisation of organic pollutants present in sediment was recently published (Solé et al., 2013), with extreme Northern and Southern locations more devoted to agricultural/tourism activities but also with a PAHs downward gradient from North to South. Central locations are under a more anthropogenic/industrial influence although the sites selected as fishing grounds did not correspond in any case to "hot spots".

Fish possess several defence mechanisms to prevent metal toxicity. Once in the biotic compartment, metals can be either inactivated and stored in different tissues or excreted. The first tissues to be exposed to metals are gills and from there they are distributed through blood and can end up in the kidney, as the

main excretory organ, although due to the low metal urine excretory capacity of this organ they can also be accumulated in this compartment (Barbier et al., 2005). Thus, some studies in fish evaluating the effects of metallic exposure consider the analysis of several tissues including kidney (Campana et al., 2003; Adams et al., 2010; Ghedira et al., 2010; Mieiro et al., 2011; Branco et al., 2013; Burger et al., 2013). From bloodstream, metals can also reach other important organs such as brain and muscle where they can exert toxic effects.

The use of biomarkers of exposure such as acetylcholinesterase (AChE) inhibition as a marker of neurotoxicity, or lactate dehydrogenase (LDH) as a marker of activated anaerobic glycolytic pathway due to a metabolic stress situation, and the effect marker of oxidative stress damage, lipid peroxidation (LP) levels, have been used in combination in field and laboratory studies to assess metallic pollution (Wepener et al., 2005; Vieira et al., 2009) including in *Solea* species (Oliva et al., 2012). Under field situations and using a multibiomarker approach, there is need to simplify the large number of variables considered by means of using a data reduction technique whereby new variables, principal components (PCA), are calculated from linear combinations of the original variables. The variables that best describe the sources of variance in the data can be identified and their plots reveal the sample clusters and groups and help to interpret complex data.

Metallothionein (MT) is low molecular weight cytosolic protein of wide phylogenetic distribution and constitutes the main detoxification pathway for metal protection, including in fish (Viarengo et al., 1999). They are inducible and their constitutive thiol (-SH) group possess high capacity to bind divalent cations (Wood et al., 2012). In addition to the well-known protective role of Se in front of metal toxicity in mammalian species, more recent studies have also suggested a protective role of Se in fish species (Raymond and Ralston, 2009; Sørmo et al., 2011; Burger et al., 2012; Siscar et al., 2013). In particular the molar Se:Hg ratio has been proposed as a measure of the detoxification efficiency of Se in front of Hg and it has a significant role in terms of fish consumption safety (Berry and Ralston, 2008; Burger et al., 2012; 2013).

Even though MT induction and the part of Se in metal protection have been mostly studied in liver, in some fish species the role of kidney in metal storage and the noteworthy presence of MT in this organ, as means to handle toxic metals, has been highlighted (Campana et al., 2003; Mieiro et al., 2011; Branco

et al., 2012; Burger et al., 2013). In particular, MT presence in *S. senegalensis* liver and kidney was revealed as similar whereas metals accumulated differentially in each organ (own data not published). Thus, kidney and liver in Solea will likely contribute with complementary information as metal detoxification mechanisms and this supports the inclusion of kidney in the study of metal handling.

The aim of the present study was to assess the role of kidney in the metabolism and excretory capacity of metals in a real field situation and relate metal exposure to the general health status of fish by means of biomarkers of general stress. For that, (1) metal exposure was analysed in sediment and kidney, (2) the role of kidney in metal detoxification mechanisms such as MT induction or Se presence was discussed, (3) general stress markers were selected to assess the physiological consequences of metal exposure and (4) the comparison of two closely related soles, *S. solea* and *S. senegalensis* was discussed in terms of metal handling and response mechanisms.

2. Material and methods

2.1. Study area, sediment and fish collection

Six fishing grounds located in the Catalan coast, NW Mediterranean, were selected for sediment and fish sampling. The sites were from North to South: Costa Brava, Maresme, Garraf, Vendrell, Tarragona and Cambrils (Fig. 1). From the same sites where fish were sampled, surface sediment samples were collected using a Van Been Grab and a composite made of 4-5 nearby sites for every sampling location. Sediment was stored at 4°C until further chemical analysis.

Fish sampling was carried out between January and March 2011 using gillnets at the six fishing areas with the collaboration of local artisanal fishermen. After sampling, the fish were immediately transported alive to a nearby laboratory in a refrigerated and aerated recipient container, and once there, biological parameters (total length and total weight) were recorded. Immediately afterwards, blood was taken using heparinized syringes and 1% aprotinin was added to the mix. Plasma was obtained by centrifugation (3.000g, 15 min, 4°C) and stored at -80°C until analysis. Immediately after, fish were dissected and the sex determined. Tissue/organs were frozen in liquid N₂ for further analysis.

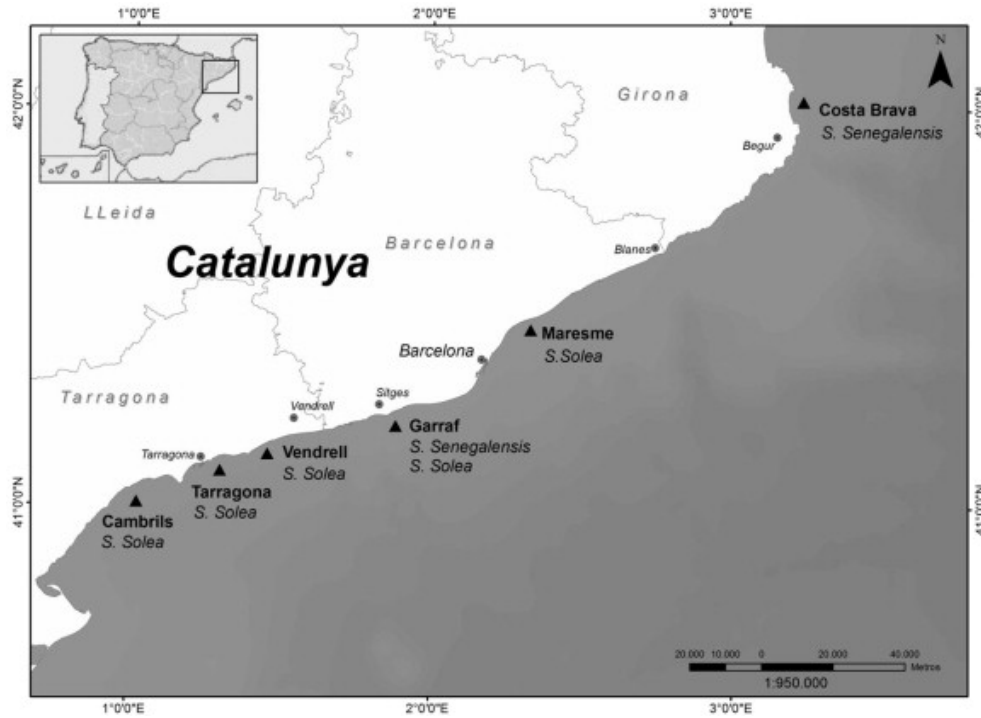


Fig. 1 Map of the six fishing grounds selected for the study with an indication of the solea species sampled at each site: *Solea solea* and *Solea senegalensis*.

2.2. Analysis of metals in sediment and kidney

Sediment grain size analysis was performed by a Sedigraph 5100 (<50 μm fraction) and by a settling tube (>50 μm fraction). The results for both fractions were joined in order to obtain the total grain size distribution and the textural statistical parameters for each sample (Giró and Maldonado, 1985). A total digestion technique was carried out, according to Querol et al (1996), using HNO_3 , HF and HCl suprapure acids. For every 18 samples a blank, a PACS-2 reference material (National Research Council Canada) and a random replicated sample were used for analytical quality control. Major and minor elements were analyzed by ICP-AES, and trace elements (except Hg) by ICP-MS. The overall analytical uncertainty was below 15%, typically between 5 and 10%. For Hg analysis, a LECO AMA254 Mercury Analyzer, which complies with US EPA Method 7473, was used. PACS-2 reference material from the National Research Council

Canada, random-replicated for every 10 samples and blank samples to avoid memory effects were used for analytical quality control. The overall analytical uncertainty was below 2%. Total organic carbon (TOC) was measured with a LECO CN-2000 analyzer (total carbon) and a LECO CC-100 digester (inorganic carbon). The difference between total carbon and inorganic carbon content (expressed in dry weight percentage) accounted for TOC. Every sample had 3 replicates. For analytical quality control, an EDTA reference material was used. Error was below 2%.

Individual fish kidney samples of about 0.1 g wet weight were digested in concentrated nitric acid 65% (Baker) at room temperature overnight and were heated at 80°C for 2 h. Within each digestion series, appropriate blanks with ultra-pure water were also subjected to the same procedure to account for background contamination levels. After cooling, solutions were transferred to a standard volume with ultra-pure water. Determination of Ag, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Pb, Se and Zn was undertaken using an ICP-Mass (Elan DRC-I, Perkin-Elmer Sciex). Samples of similar weight of certified reference material (DOLT-3 and LUTS-1, National Research Council of Canada, Ottawa), were digested and analysed during each analytical run.

2.3. Determination of Metallothionein by differential pulse polarography

About 0.2 g wet weight portions of frozen kidney were homogenized using an ultra-turrax in 20 mM Tris-HCl buffer, 1 mM Dithiothreitol (DTT) and 0.2 mM Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) at pH 8.6 in an ice bath. The homogenates were centrifuged at 30.000g for 45 min at 4°C. The supernatant was heated at 80°C for 10 min in order to denature high molecular weight proteins, subsequently centrifuged at 30.000g for 45 min at 4°C, and the heat-treated supernatant, containing thermally stable MT, was separated from precipitated proteins. MT was measured using differential pulse polarography (Bebianno and Langston, 1989). An aliquot of the heat-treated supernatant was added to the polarographic cell, containing 20 mL hexammincobalt chloride buffer (the supporting electrolyte), together with Triton-X (0.025% v/v). The cell was purged for 2 min with purified N₂ prior to analysis. The polarographic response was measured during a potential scan between -1.38 V and -1.7 V (Model 757 VA Computrace Analyser, Methrom, Switzerland) in SMDE mode. Quantification of MT was performed by using the standard addition method with rabbit liver MT I+II (Sigma). Results are expressed as µg g⁻¹ wet weight of tissue.

2.4. Molar ratios calculations

Molecular ratios were calculated considering an average molecular weight of 6000 Da for MT and the atomic weights for the metals: Se (78.96), Hg (200.5), Cd (112.4) and Ag (107.9) were adopted for the conversion of MT and metal content ($\mu\text{g/g w.w}$) into molar content (moles/g.w.w). In this way, the calculated ratios are expressed as moles of MT per atom of metal in the hepatic tissue. The reported value ratios are calculated for each individual fish and then averaged to get a mean value.

2.5. Sample preparation and biochemical determinations

Individual brains, a portion of muscle and gill were homogenised in a 50 mM buffer phosphate pH 7.4 at a 1:5 (w:v) ratio using a polytron® blender. The homogenate was centrifuged at 10.000 g x 30' at 4°C and the supernatant (S10) used for biochemical determinations. Absorbance measurements were performed in triplicate using a TECAN Infinite® microplate reader.

Acetylcholinesterase (AChE) activity was measured in 1/5 S10 diluted brain, undiluted S10 muscle and gills. In each microplate well, 25 μl of sample were mixed with 150 μl of 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoate (DTNB; 270 μM) and after 2 minutes of pre-incubation, the reaction was started adding 50 μl of the substrate acetylthiocholine (ASCh) according to the Ellman et al., (1961) method. Reading was performed at 405 nm for 5 min at 25°C using a kinetic assay (Magellan software v6.2) in a TECAN Infinite 200 microplate reader.

Lipid peroxidation (LP) was determined using 200 μl of muscle and gill S10 and mixed with 650 μl of 1-methyl-2-phenylindole in methanol:acetonitrile (1:3) and 150 μl of 37% HCl. Incubation was performed at 45°C for 40 min, the reaction was stopped in ice and further centrifuged at 10.000 g x 10 min to precipitate proteins. Absorbance was read at 595 nm versus a standard solution of 1,1,3,3-tetramethoxypropane (MDA) treated in the same manner. LP content was expressed as nmol MDA/g w.w.

Lactate dehydrogenase (LDH) activity was assayed according to the method developed by Vassault (1983), modified to 96-well microplate format. A 25 μl aliquot of plasma was mixed with 150 μl NADH (300 μM) and 50 μl pyruvate (4.5 mM) and the decrease in absorbance measured over 3 min at 340 nm. Activity was expressed in nmol/min/mg prot.

Total protein content was determined by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard (BSA 0.1-1 mg/ml).

2.6. Statistics

All statistical analyses were performed using the software package SPSS. Data were checked for normality (Kolmogorof-Smirnof test) and homogeneous variance (Levene's test) and transformed, when needed, to comply with normality and homocedasticity assumptions. As fish size influenced metal content and most enzyme activities (except AChE in brain) weight was included as covariate (ANCOVA test) to determine significant differences between species and locations. Differences between molar ratios were analysed using one-way ANOVA and Bonferroni *Post-hoc* test. Pearson (parametric) or Spearman (non-parametric) correlation coefficients: r and ρ , respectively were calculated between metals in sediment, metal content in kidney, MT levels and biomarker responses in order to measure the strength of association between these variables. Differences at the 5% significance level were considered significant. A principal component analysis (PCA) was used for two fish species in order to evaluate the relationships between the metal concentrations in kidney, MT levels and enzymatic activities in the two solea species separately.

3. Results

The names of the locations where sediment and fish were collected as well as fish biometrics and sex ratios are described in Table 1. Metal concentrations in sediment and sediment particle characteristics are described in Table 2. In addition, the probable effect level (PEL) based on sediment analysis of 34 substances and their biological effects over marine and estuarine species as defined by MacDonald et al., (1996) was included for contrast. The central sites, north (Maresme) and south (Garraf) of the Barcelona urban area (Fig. 1), presented the highest concentrations of metals although all were well below those defined to cause a potential toxic effect (PEL) to coastal and marine species.

Metal concentrations (Ag, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Pb, Se and Zn) and MT content were analysed in kidney of two sole species sampled from six different sites along the Catalan coast (Fig. 2). Molar ratios between MT and metals as well as between Se and selected metals are presented in Table 3. Correlations between MT and the known MT inducers: Cd, Cu, Hg, and Zn, but also between Se and Cd, Ag and

Hg, were calculated for each species separately and presented in Table 4. Biomarker responses such as AChE activity in brain, muscle and gills, levels of LP in muscle and gills and LDH activity in plasma are depicted in Fig. 3.

Table 1

Sampling sites corresponding to the six fishing grounds (from North to South) where sediment and fish were sampled. Fish species, number of individuals sampled (n), biométries (total length and weight) as mean \pm SD and sex ratios (male:female).

Site	Species	n	Total length (mm)	Total weight (g)	Sex ratios (M:F)
Costa Brava	<i>S. senegalensis</i>	13	320-450	325-920	9:4
Maresme	<i>S. solea</i>	13	320-435	290-890	2:11
Garraf	<i>S. senegalensis</i>	9	330-390	330-585	7:2
	<i>S. solea</i>	10	345-450	350-870	3:7
Vendrell	<i>S. solea</i>	13	320-430	290-880	4:9
Tarragona	<i>S. solea</i>	4	305-350	208-351	3:1
Cambrils	<i>S. solea</i>	9	270-375	160-480	6:3

Table 2

Superficial sediment metal concentration (in $\mu\text{g/g}$ dry weight) from six fishing grounds in the NW Mediterranean. Total organic carbon (TOC) and sediment size fractions in percentage (%). n.a. data not available.

Metal	PEL ^a	Sites					
		Costa Brava	Maresme	Garraf	Vendrell	Tarragona	Cambrils
Cd	4.21	0.09	0.15	0.20	0.21	0.18	0.15
Cr	160	37.53	53.420	64.52	66.09	48.18	32.80
Cu	108	12.12	25.53	26.81	23.54	17.56	14.88
Fe	n.a.	20565	3616	19961	21064	17540	17273
Hg	0.7	0.03	0.38	0.52	0.52	0.34	0.45
Pb	112	21.80	59.83	43.42	43.66	36.46	28.86
Zn	271	68.48	153.17	94.77	92.85	83.95	72.99
TOC%		0.72	1.18	0.79	0.90	0.74	0.71
Sand (>63 μm)%		46.38	57.22	30.12	13.87	31.34	33.25
Silt (4-63 μm)%		43.88	36.11	55.59	72.78	50.81	57.57
Clay (<4 μm)%		7.93	6.34	10.79	13.34	12.46	9.14

^aProbable effect level (PEL) MacDonald et al. (1996)

3.1. *Solea solea*

Adults of *S. solea* were sampled in five out of the six fishing grounds considered (Fig. 2; clear bars). The highest levels of non-essential metals such as Ag, Cd and Pb ($p < 0.05$) corresponded to fish from Garraf station. In relation to Hg, the highest levels were recorded in fish from Maresme. In regard to essential metals, fish from the southern site Cambrils displayed higher levels of Cr and Se. Fish from Garraf also presented the highest levels of essential Cu and Fe while those sampled off Tarragona and Cambrils presented higher levels of Zn ($p < 0.05$).

Molar ratios (Table 3) of MT and metals in *S. Solea* differed more significantly in the extreme stations (Maresme and Cambrils) for Cu and Zn. In fact, MT/metal ratios were always greater in the polluted northern site except for Hg. MT/ \sum metals ratio also differed between Maresme (2:1) and Cambrils (1:1). As for the molar ratio between Se and metals (same Table 3) the Se:Hg was higher than 1 to all sampling sites with the highest ratio corresponding to Cambrils (18:1) and the lowest to Maresme fish (4:1). In Table 4, Spearman correlation coefficients (ρ) between MT and metals were significant ($p < 0.05$) and positive for Cd, Cu and Hg ($\rho = 0.336-0.483$). Some toxic metals Cd, Pb, Cu, Hg and Fe in kidney of *S. solea* varied similarly ($\rho = 0.347-0.614$; $p < 0.05$) as well as essential Zn and Se ($\rho = 0.420$; $p = 0.003$).

In relation to biomarker responses in *S. solea*, a decreasing trend of MT content from Maresme (3580 $\mu\text{g/g w.w.}$) towards the Southern sites was seen (Fig. 2). As for other biomarkers (Fig. 3), AChE activity in brain significant differences ($p < 0.05$) were observed between fish from Maresme in respect to Vendrell and Cambrils. By contrast, AChE activity in muscle was higher ($p < 0.05$) in the southern station of Cambrils in respect to the northern stations of Maresme and Garraf. No significant differences were recorded in AChE activity in gills, LP levels in muscle and in gills or plasmatic LDH activity ($p > 0.05$).

3.2. *Solea senegalensis*

Adults from *S. senegalensis* (Fig. 2; dark bars) were sampled in two out of the six stations: Costa Brava (most Northern site) and Garraf (Southern site near Barcelona area). All metals measured, except Cr and Zn, were higher at the vicinity of the urban area of Barcelona. Significant differences were encountered for Cu, Fe, Hg and Se ($p < 0.05$) and being even more significant in the case of Cd and Pb ($p < 0.001$). In regard to MT levels in kidney, site differences were also confirmed ($p = 0.004$) in accordance with a higher metal load (Fig. 2). Molar ratios (Table 3) also supported differences between fish sampled at both sites for MT:Zn and MT: \sum metals. Pearson correlation coefficient between MT and metals (Cd, Cu and Hg) and between Se and the metals Cd and Hg was positive and significant (Table 4). As for enzyme activities (Fig. 3, dark bars), AChE activity varied depending on the tissue analysed: in brain it was similar in fish from both locations, but in gills ($p < 0.05$) and muscle ($p < 0.01$) it was lower in the northern station (Costa Brava). Opposite trends were seen in LP levels, while in muscle

they were more elevated in Garraf ($p < 0.05$), in gills they were lower at this location ($p < 0.05$). LDH activity in plasma did not show site differences.

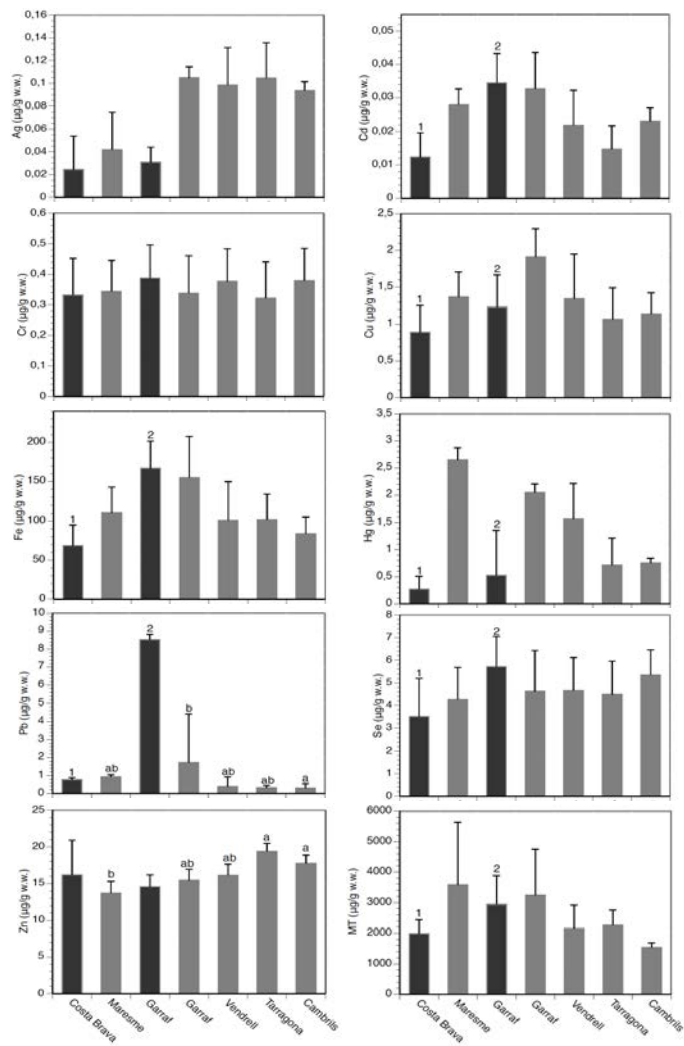


Fig.2. Levels (in $\mu\text{g/g}$ wet weight) of selected metals and metallothionein (MT) in kidney of sole sp. Clear bars *Solea solea* and dark bars *Solea senegalensis*. Values are expressed as mean \pm SEM. Significant differences ($p < 0.05$) are shown by different letters when the species is *S. solea*, numbers when refers to *S. senegalensis* and * between the two species are contrasted in the Garraf site.

Table 3. Molar ratios of metallothionein (MT) with six metals (Ag, Cd, Cu, Hg, Se and Zn) and selenium (Se) with Hg, Cd and Ag in kidney of *S. senegalensis* and *S. solea* captured in the different sites. Significant differences are shown with different superscript letters when the species are *S. solea*; numbers when the species are *S. senegalensis* and * between the two species were contrasted from the same Garraf site.

Site	MT:Ag	MT:Cd	MT:Cu	MT:Hg	MT:Se	MT:Zn	MT:∑metals	Se:Hg	Se:Cd	Se:Ag
Costa Brava (<i>S. senegalensis</i>)	1468:1	3015:1	24:1	248:1	7:1	1:1 ¹	1:1 ¹	33:1	404:1	196:1
Maresme (<i>S. solea</i>)	1541:1	2396:1	28:1 ^a	45:1	11:1 ^a	3:1 ^a	2:1	4:1	217:1	139:1
Garraf (<i>S. senegalensis</i>)	1714:1	1594:1	25:1	188:1*	7:1	2:1 ²	2:1 ²	28:1*	236:1	254:1*
Garraf (<i>S. solea</i>)	557:1	1856:1	18:1 ^{ab}	53:1	9:1 ^a	2:1 ^{ab}	2:1	6:1	201:1	60:1
Vendrell (<i>S. solea</i>)	394:1	1841:1	17:1 ^{ab}	46:1	6:1 ^{ab}	1:1 ^b	1:1	8:1	303:1	65:1
Tarragona (<i>S. solea</i>)	388:1	2861:1	22:1 ^{ab}	106:1	7:1 ^{ab}	1:1 ^b	1:1	16:1	431:1	59:1
Cambrils (<i>S. solea</i>)	295:1	1242:1	14:1 ^b	68:1	4:1 ^b	1:1 ^b	1:1	18:1	330:1	78:1

3.3. Contrasts of *S. solea* and *S. senegalensis*

When comparing metal accumulation in kidney from *S. solea* and *S. senegalensis* sampled at the Garraf site, *S. solea* displayed higher values ($p < 0.05$) for Ag, Cu and Hg while *S. senegalensis* presented the highest level of Pb (Fig 2). The remaining metals and MT levels were similar in both species ($p > 0.05$). Molar ratios (Table 3) also confirmed species differences by higher MT:Hg, Se:Hg and Se:Ag ratios in *S. senegalensis*. Despite these differences, the overall MT:∑metals was the same in both species. AChE activity (Fig 3) in brain was lower ($p < 0.05$) in *S. senegalensis* while in muscle and gill they were similar. LP levels between the two species only differed in muscle. LDH activity was highly variable in specimens of *S. senegalensis* and showed no difference in respect to its counterpart *S. solea*.

Table 4. Correlation coefficients of Spearman (ρ) for *Solea solea* and of Pearson (r) for *Solea senegalensis* and their significance level (p) between metallothionein with some metals (Cd, Cu, Hg, and Zn) and between selenium and Cd, Ag and Hg. Significant differences are highlighted in bold.

Species	Metallothionein				Selenium			
		Cd	Cu	Hg	Zn	Cd	Ag	Hg
<i>S. solea</i> (n=48)	r	0.336	0.483	0.464	-0.247	0.002	-0.002	0.036
	p	0.019	0.001	0.001	0.088	0.991	0.991	0.810
<i>S. senegalensis</i> (n=21)	r	0.583	0.452	0.496	0.087	0.713	0.104	0.600
	p	0.004	0.035	0.019	0.700	0.000	0.644	0.003

3.4. Relationships between metals in sediment, kidney and biomarker responses

Pearson's correlation coefficients (r) were analysed between metals present in sediment of all six sampling sites. The non-essential metals Cd and Hg ($r=0.896$) as well as Cd and Cr ($r=0.823$) were significantly related ($p<0.05$). Cu presence was associated to Pb and Cr ($r=0.884$; $p<0.05$) all of anthropogenic origin. The essential metal Zn, was equally related to Pb and Fe ($r=0.940$; $p<0.01$), to Mn ($r=0.921$; $p<0.05$) and more significantly to TOC ($r=0.970$; $p=0.001$).

Correlations for each individual metal, between concentrations found in sediment and in kidney ($n=6$) were not significant. However, Hg levels in kidney of *S. solea* significantly correlated ($p<0.05$) with the content of Cu ($r=0.904$) and Pb ($r=0.926$) in sediment. As *S. senegalensis* was only collected in two stations, no correlations were attempted.

Spearman correlations (ρ) between enzymatic activities and metal content in *S. solea* ($n=48$) were only significant ($p<0.05$) and negative between the toxic metals (Cd, Hg and Pb) and AChE activity in muscle ($\rho=0.299-0.411$), whereas Zn was positively related to muscular AChE ($\rho=0.560$; $p<0.001$). In specimens of *S. senegalensis* ($n=21$) the relationship between enzyme activities and metal's content revealed that Pb was positively and significantly related ($p<0.01$) to AChE in muscle and gills ($r=0.597-0.641$) while Cu to muscle ($r=0.527$) and Cd to gill ($r=0.443$) AChE ($p<0.05$). LP levels in muscle were positively related to some metals such as Cd and Hg ($r=0.443$, $p<0.05$) but also to Cu, Fe and Mn ($r=0.539-0.622$, $p<0.01$). By contrast LP, in gills was negatively related to metals such as Pb ($r=-0.635$, $p=0.002$) and Cu ($r=-0.473$, $p=0.03$). In *S. senegalensis*, a good and significant correlation was seen between MT in kidney and LP in muscle ($\rho=0.738$; $p=0.001$).

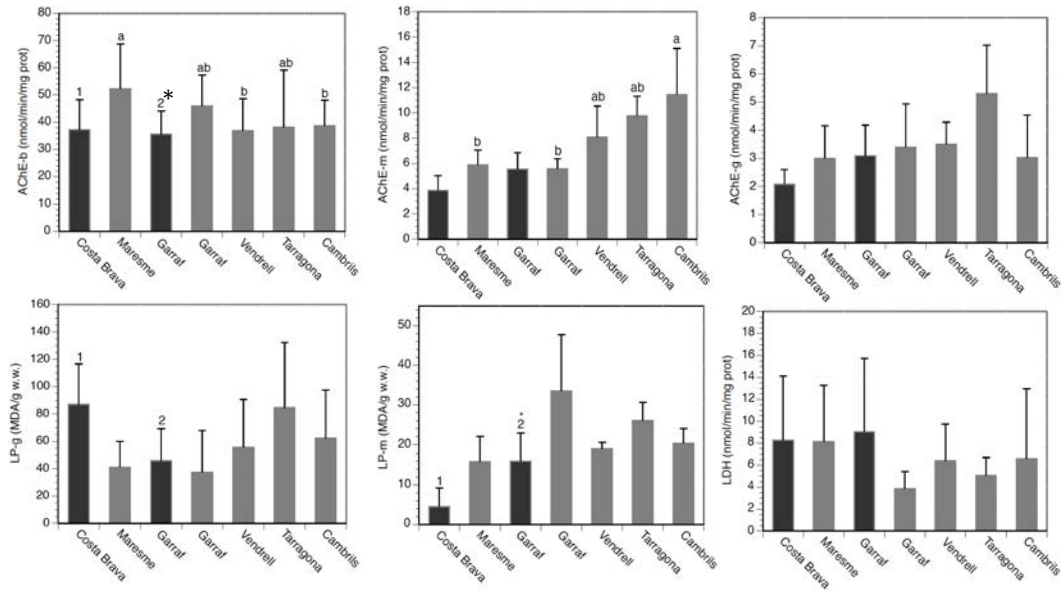


Fig. 3. Activity of Acetylcholinesterase (in nmol/min/mg protein) in brain (AChE-b), gill (AChE-g) and muscle (AChE-m). Levels of lipid peroxidation (in nmol MDA/g w.w.) in gill (LP-g) and muscle (LP-m). Activity of lactate dehydrogenase (in nmol/min/mg protein) in plasma. Values are expressed as mean \pm SEM. Statistical contrasts as in Fig. 2.

3.5. Statistical integration of data

The PCA model for *S. Solea* PC1 (19.71% variance explained) separated two areas: southern (Cambrils, Tarragona and Vendrell) and northern (Garraf and Mataró). PC2 (19.27% variance explained) also separated northern stations: Mataró, Garraf and Vendrell from the Southern ones: Tarragona and Cambrils. Most metals fall also within the positive part of the PC1 as well as LP in muscle, MT, AChE in gills and in brain. In the negative part there are metals such as Se and Zn as well as muscular AChE. PC2 in the positive site contains most metals and in the negative site only Pb and Fe (Fig. 4).

The PCA model for *S. senegalensis* (Fig. 5) clearly separated specimens from the two sites (Garraf and Costa Brava). PC1 (39.38 % explained variation) contained most metals in the positive axis. PC2 (16.64% explained variation) also gathered most metals and biomarkers in the positive axis whereas LP in gills and LDH gathered in the negative site.

PCA Solea solea

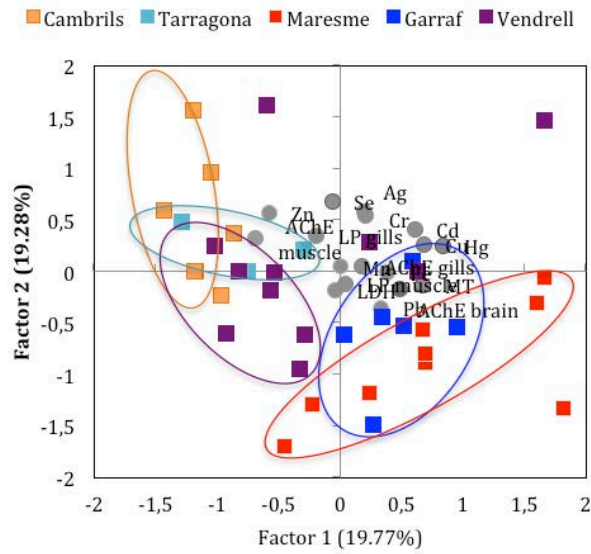


Fig.4. Principal component analysis (PCA) corresponding to *Solea senegalensis* (n=21) including metals in kidney and biomarkers in several tissues. Nomenclature for biomarkers are in Fig.3.

PCA Solea senegalensis

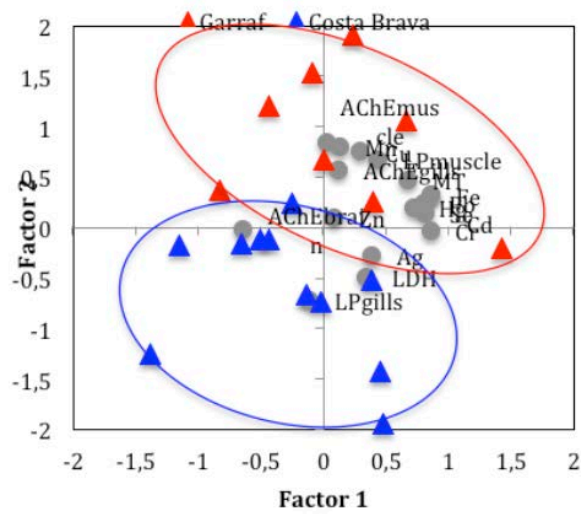


Fig.5. Principal component analysis (PCA) corresponding to *S. solea* (n=48) including metals in kidney and biomarkers in several tissues. Nomenclature for biomarkers as in Fig.3.

4. Discussion

The use of Solea as sentinel species in field studies is well established in the Southern Iberian Peninsula and more recently also in Mediterranean coastal waters, where it probed its adequacy to discriminate pollution sources of organic pollutants and metals (Dierking et al., 2009). In the present field study the use of two sympatric closely related sole, *S. solea* and *S. senegalensis* as sentinels of metal pollution in NW Mediterranean fishing grounds was discussed by means of (1) presence of metals in superficial sediment, (2) levels of metals bioaccumulated in the kidney of adult fish living at these same sites and (3) measurement of biomarkers of metal exposure and physiological stress in several tissues on the two species at six fishing grounds.

In sediment a metal pollution gradient was evidenced with metals increasing from the north towards the central area of Barcelona (maximal concentration in Maresme and Garraf) and then decreasing towards southern sites (Fig. 2). This trend (Table 2) was not fully mirrored in bioaccumulated metals in kidney as correlations between them were not significant and a certain displacement of the pattern of bioaccumulation was seen towards the south with maximal levels usually corresponding to the Garraf site (south of Barcelona). This bell shape was more obvious for anthropogenic metals (Cd, Hg and Pb) but it was also seen for essential Fe and Cu (Fig. 2). In accordance to this shape, MT measured in kidney varied accordingly, as confirmed by the good agreement between those parameters (Table 4). Similarly to the good correlation found between MT and Cd, Cu and Hg in both solea species, a good MT response was also seen in another benthic flatfish species *Lepidorhombus boscii* to the toxic metals Cd and Hg (Fernandes et al., 2008). The PCA model considering all metals and biomarkers discriminated between sites in both species (Fig. 4 and 5), although it was more clear in *S. senegalensis* as individuals of this species were sampled at two distant sites (Costa Brava and Garraf), where the pollution gradient was more pronounced.

In specimens of *S. senegalensis*, in addition to increased MT content in fish from Garraf concomitant to a higher metal load ($r=0.452-0.583$; $p<0.05$), Se content seemed to be also important as derived from its good positive correlation with Cd and Hg. The protective role of Se towards Cd and Hg toxicity has been described in mammalian studies but also more recently in marine fish liver (Raymond and Ralston, 2009; Ordiano-Flores et al., 2012; Siscar et al. 2013) but

also in kidney (Branco et al., 2012; Burger et al., 2013). As far as biomarker responses concerns, AChE response to metals also varied in a tissue dependent manner. While in brain it was similar at both sites, in muscle ($p < 0.01$) and in gills ($p < 0.05$) it was depressed in the northern Costa Brava site. Despite the reported neurotoxic role of some metals in fish studies (Vieira et al., 2009), the presence of other chemical classes (e.g. PAHs) which presence was significantly high in this northern site (Solé et al., 2013) could be responsible for the observed AChE inhibition. An efficient brain AChE compensatory mechanism was also seen in zebrafish under chronic water exposure to metals (Richetti et al., 2011). No indication of toxicity, by elevated plasma LDH, was seen in fish from the Garraf site despite higher metal concentrations in fish kidney. By contrast, under lab exposures, muscular LDH increased in fish exposed to increasing water concentrations of Cu and Hg (Vieira et al., 2009). Nonetheless, in a field situation and under a steeper pollution gradient than the one observed in the current study, muscular AChE in *S. senegalensis* was able to discriminate between reference and polluted sites while LDH did not (Oliva et al., 2012). LP levels, as an effect indicator of oxidative stress damage, also responded differently in both tissues. Whereas elevated muscular LP levels in Garraf could reflect a higher chronic exposure to metals, elevated gill LP levels in Costa Brava could correspond to other chemical's presence (e.g. PAHs) as indicated before. This hypothesis would agree with former observations on *S. senegalensis*, where muscle better reflected chronic exposures while gill indicated recent water-borne ones (Oliva et al., 2012).

In *S. solea*, probably as a consequence of a less clear pollution gradient in the sampling sites, metal and MT correlations were not so strong. Nonetheless, Cd, Cu and Hg presence paralleled MT content (Table 4). In fact, despite metal concentrations in local sediment could be classified from low to moderate in relation to other geographical areas (Costa et al., 2012; Henry et al., 2012), kidney from fish sampled at the Maresme site displayed a mean Hg concentration of up to 2.64 $\mu\text{g/g}$ w.w. This concentration exceeds values reported in spotted seatrout, *Cynoscion nebulosus* (1.12-0.44 $\mu\text{g/g}$ w.w.) (Adams et al., 2010), in bluefish, *Pomatomus saltatrix* (0.57 $\mu\text{g/g}$ w.w.) (Burger et al., 2013), in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* and golden gray mullet, *Liza aurata* (0.60-0.80 $\mu\text{g/g}$ w.w.) as in Mieiro et al., (2011) or Yellow Tuna (0.45 $\mu\text{g/g}$ w.w.) as in Kojadinovic et al., (2007), all measured in kidney. In agreement with

the high Hg presence in kidney of *S. solea* from this northern site (Maresme) the highest MT levels were also recorded, although did not significantly differed from the other sites ($p>0.05$). On the other hand, fish from the southern sites: Tarragona and Cambrils presented higher levels of Zn in relation to the northern site Maresme ($p<0.05$) and the lowest concentrations for Cd, Cr, Cu and Hg, albeit not significant ($p>0.05$). Zn incorporation by metal transporters in kidney has been reported to compete with other metals, including Cd (Barbier et al., 2005). Thus, a lesser competitive scenario could contribute to explain the higher Zn content in kidney from fish at these southern sites. In relation to other biomarker responses, muscular AChE was lower in the most metal contaminated northern sites: Maresme and Garraf and higher in the cleaner southern location of Cambrils. Nonetheless, the muscular trend in AChE activity in muscle was not paralleled in brain. Other recent and presently unknown exposures could be responsible for brain AChE inhibition. Alternatively, it could be due to the action of compensatory mechanisms as described formerly in zebrafish under Hg and Pb chronic exposures (Richetti et al., 2011). Muscular LP levels, as a measure of oxidative stress damage, were also higher in the Garraf site although not significantly ($p>0.05$). Plasmatic LDH activity in this species also failed to reflect a pollution gradient.

In the particular fishing grounds of Garraf, high metallic loads and similar MT protein levels in kidney were registered in the two species. In this site, *S. senegalensis* significantly bioaccumulated Pb (about 5-fold of that of *S. solea*) whereas *S. solea* displayed more Ag, Hg and Cu. As both solea species slightly differ in their feeding habits and substrate preference (Vinagre et al., 2006), particularities in metal accumulation could be partly due to this factor. Kidney of fish has important hematopoietic function and Pb is able to disturb it (Campana et al., 2003). Alterations on Fe homeostasis, in the particular case of *S. senegalensis* from Garraf (in contrast to the same species from Costa Brava) could be attributed to the high levels of Pb reached in this tissue potentially disturbing heme synthesis. As mentioned before, Cd, Cu and Hg correlated significantly with MT in both species, this is in agreement with the protective role of this protein against metal toxicity. However, the higher molar ratios (Se:Hg and Se:Ag) in *S. senegalensis*, in relation to *S. solea* at this same site, and the good correlation of Se and toxic Cd and Hg only detected in *S. senegalensis*, give support to Se as an additional protective mechanism in this particular species.

The occasional maximal high levels of Pb recorded in *S. senegalensis* from Garraf and Hg in *S. solea* from Maresme, were not clearly reflected in any of the biomarker response measured. For Pb, the levels (mean of 8.5 µg/g.w.w) recorded in *S. senegalensis* kidney were experimentally reached in kidney of Prussian carp, *Carassius gibelio*, after 18 months diet exposures to 40 mg/kg of lead in their feed (Luszczek-Trojnar et al., 2013). By contrast, the Hg levels (mean of 2.5 µg/g.w.w) also in kidney were attained in zebra-seabream, *Diplodus cervinos*, kidney after 14 days water exposures of 2 µg/l (Branco et al., 2012). In both laboratory studies, some toxicological responses could be associated to the exposures.

Of all biomarker relationships considered, the only one to mathematically stand out was a positive one between kidney MT and muscular LP in *S. senegalensis* ($p=0.738$; $p=0.001$). It is broadly accepted the protective role of MT in front of metal toxicity, the inhibition of AChE as a target enzyme indicative of neurotoxicity, including by metal exposure, and the occurrence of LP enhancement when the protective mechanisms are overwhelmed. Thus, the present results point out that despite an increase of protective MT in kidney, this was insufficient and a certain degree of oxidative stress damage in muscle of *S. senegalensis* was detected by increased LP levels.

5. Conclusions

The use of kidney as a target tissue in Solea species can be adequate for assessing metal exposure, even in areas where loads corresponded to low and moderately polluted sites. Both species seem equally adequate as sentinels and the fact that one responded better than the other to metal loads was dependent on the magnitude of the gradient they were exposed to. Hg, Cd and Cu correlated very well with MT content in kidney but other defence mechanisms such as Se could contribute to metal detoxification in a species-dependent manner. Biomarkers such as AChE activity and LP levels in some tissues were related to metal exposures, particularly when the metal gradient was more significant.

Acknowledgements

This work was financed by the Ministry of Science and Innovation of Spain (ref CTM2010-16611). S. Soto is acknowledged for drawing the map.

References

- Adams, D.H., Sonne, C., Basu, N., Dietz, R., Nam, D.H., Leifsson, P.S., Jensen, A.L., 2010. Mercury contamination in spotted seatrout, *Cynoscion nebulosus*: An assessment of liver, kidney, blood, and nervous system health. *Sci. Total Environ.* 408, 5808-5816.
- Barbier, O., Jacquillet, G., Tauc, M., Cougnon, M., Poujeol, P., 2005. Effect of heavy metals on, and handling by, the kidney. *Nephron - Physiology* 99, 105-110.
- Bebianno, M.J., Langston, W.J., 1989. Quantification of metallothionein in marine invertebrates using differential pulse polarography. *Port Electrochim Acta* 7, 511-524.)
- Berry, M.J., Ralston, N.V.C., 2008. Mercury Toxicity and the Mitigating Role of Selenium. *EcoHealth* 5, 456-459.
- Branco, V., Canario, J., Lu, J., Holmgren, A., Carvalho, C., 2012. Mercury and selenium interaction in vivo: Effects on thioredoxin reductase and glutathione peroxidase. *Free Radical Bio. Med.* 52, 781-793.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-54.
- Burger, J., Gochfeld, M., Jeitner, C., Donio, M., Pittfield, T., 2012. Interspecific and intraspecific variation in selenium:mercury molar ratios in saltwater fish from the Aleutians: Potential protection on mercury toxicity by selenium. *Sci. Total Environ.* 431, 46-56.
- Burger, J., Jeitner, C., Donio, M., Pittfield, T., Gochfeld, M., 2013. Mercury and selenium levels, and selenium:mercury molar ratios of brain, muscle and other tissues in bluefish (*Pomatomus saltatrix*) from New Jersey, USA. *Sci. Total Environ.* 443, 278-286.
- Campana, O., Sarasquete, C., Blasco, J., 2003. Effect of lead on ALA-D activity, metallothionein levels, and lipid peroxidation in blood, kidney, and liver of the toadfish *Halobatrachus didactylus*. *Ecotox. Environ. Safe.* 55, 116-125.
- Castro-González, M.I., Méndez-Armenta, M., 2008. Heavy metals: Implications associated to fish consumption. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 26, 263-271.
- Costa, P.M., Diniz, M.S., Caeiro, S., Lobo, J., Martins, M., Ferreira, A.M., Caetano, M., Vale, C., DelValls, T.Á., Costa, M.H., 2009. Histological biomarkers in liver and gills of juvenile *Solea senegalensis* exposed to contaminated estuarine sediments: A weighted indices approach. *Aquat. Toxicol.* 92, 202-212.
- Costa, P.M., Caeiro, S., Diniz, M.S., Lobo, J., Martins, M., Ferreira, A.M., Caetano, M., Vale, C., DelValls, T.Á., Costa, M.H., 2010. A description of chloride cell and kidney tubule alterations in the flatfish *Solea senegalensis* exposed to moderately contaminated sediments from the Sado estuary (Portugal). *J. Sea Res.* 64, 465-472.
- Costa, P.M., Caeiro, S., Vale, C., DelValls, T.À., Costa, M.H., 2012. Can the integration of multiple biomarkers and sediment geochemistry aid solving the complexity of sediment risk assessment? A case study with a benthic fish. *Environ. Pollut.* 161, 107-120.
- Dierking, J., Wafo, E., Schembri, T., Lagadec, V., Nicolas, C., Letourneur, Y., Harmelin-Vivien, M., 2009. Spatial patterns in PCBs, pesticides, mercury and cadmium in the common sole in the NW Mediterranean Sea, and a novel use of contaminants as biomarkers. *Mar. Pollut. Bull.* 58, 1605-1614.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres jr. V, Featherstone RM. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95.
- Fernandes, D., Bebianno, M.J., Porte, C., 2008. Hepatic levels of metal and metallothioneins in two commercial fish species of the Northern Iberian shelf. *Sci. Total Environ.* 391, 159-167.
- Fonseca, V.F., França, S., Serafim, A., Company, R., Lopes, B., Bebianno, M.J., Cabral, H.N., 2011. Multi-biomarker responses to estuarine habitat contamination in three fish species: *Dicentrarchus labrax*, *Solea senegalensis* and *Pomatoschistus microps*. *Aquat. Toxicol.* 102, 216-227.
- Giró, S. and Maldonado, A., 1985. Análisis granulométrico por métodos automáticos: Tubo de sedimentación y Sedigraph. *Acta Geol. Hisp.* 20, 95-102.

- Ghedira, J., Jebali, J., Bouraoui, Z., Banni, M., Guerbej, H., Boussetta, H., 2010. Metallothionein and metal levels in liver, gills and kidney of *Sparus aurata* exposed to sublethal doses of cadmium and copper. *Fish Physiol. Biochem.* 36, 101-107.
- Grossset, F.E., Quetel, C.R., Thomas, B., Donard, O.F.X., Lambert, C.E., Guillard, F., Monaco, A., 1995. Anthropogenic vs. lithogenic origins of trace elements (As, Cd, Pb, Rb, Sb, SC, Sn, Zn) in water column particles: northwestern Mediterranean Sea. *Mar. Chem.* 48, 291-310.
- Henry, F., Filipuci, I., Billon, G., Courcot, L., Kerambrun, E., Amara, R., 2012. Metal concentrations, growth and condition indices in European juvenile flounder (*Platichthys flesus*) relative to sediment contamination levels in four Eastern English Channel estuaries. *J. Environ. Monit.* 14, 3211-3219.
- Imsland, A.K., Foss, A., Conceicao, L.E.C., Dinis, M.T., Delbare, D., Schram, E., Kamstra, A., Rema, P., White, P., 2003. A review of the culture potential of *Solea solea* and *S. senegalensis*. *Rev. Fish Biol. Fish.* 13, 379-407.
- Kojadinovic, J., Bustamante, P., Churlaud, C., Cosson, R.P., Le Corre, M., 2007. Mercury in seabird feathers: Insight on dietary habits and evidence for exposure levels in the western Indian Ocean. *Sci. Total Environ.* 384, 194-204.
- Luszczek-Trojnar, E., Drag-Kozak, E., Popek, W., 2013. Lead accumulation and elimination in tissues of Prussian carp, *Carassius gibelio* (Bloch, 1782), after long-term dietary exposure, and depuration periods. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 3122-3132.
- MacDonald, D.D., Carr, R.S., Calder, F.D., Long, E.R., Ingersoll, C.G., 1996. Development and evaluation of sediment quality guidelines for Florida coastal waters. *Ecotoxicology* 5, 253-278.
- Mieiro, C.L., Bervoets, L., Joosen, S., Blust, R., Duarte, A.C., Pereira, M.E., Pacheco, M., 2011. Metallothioneins failed to reflect mercury external levels of exposure and bioaccumulation in marine fish – Considerations on tissue and species specific responses. *Chemosphere* 85, 114-121.
- Oliva, M., José Vicente, J., Gravato, C., Guilhermino, L., Dolores Galindo-Riaño, M., 2012. Oxidative stress biomarkers in Senegal sole, *Solea senegalensis*, to assess the impact of heavy metal pollution in a Huelva estuary (SW Spain): Seasonal and spatial variation. *Ecotox. Environ. Safe.* 75, 151-162.
- Ordiano-Flores, A., Rosiles-Martínez, R., Galván-Magaña, F., 2012. Biomagnification of mercury and its antagonistic interaction with selenium in yellowfin tuna *Thunnus albacares* in the trophic web of Baja California Sur, Mexico. *Ecotox. Environ. Safe.* 86, 182-187.
- Palanques, A., Sánchez-Cabeza, J.A., Masqué, P., Leon, L., 1998. Historical record of heavy metals in a highly contaminated Mediterranean deposit: the Besòs prodelta. *Mar. Chem.* 61, 209-217.
- Palanques, A., Masqué, P., Puig, P., Sanchez-Cabeza, J.A., Frignani, M., Alvisi, F., 2008. Anthropogenic trace metals in the sedimentary record of the Llobregat continental shelf and adjacent Foix Submarine Canyon (northwestern Mediterranean). *Mar. Geol.* 248, 213-227.
- Puig, P., Palanques, A., Sánchez Cabeza, J.A., Masque, P., 1999. Heavy metals in particulate matter and sediments in the southern Barcelona sedimentation system (northwestern Mediterranean). *Mar. Chem.* 63, 311-329.
- Querol, X., Alastuey, A., LopezSoler, A., Mantilla, E., Plana, F., 1996. Mineral composition of atmospheric particulates around a large coal-fired power station. *Atmos. Environ.* 30, 3557-3572.
- Raymond, L.J., Ralston, N.V.C., 2009. Selenium's importance in regulatory issues regarding mercury. *Fuel Process. Technol.* 90, 1333-1338.
- Ribocco, C., Hardiman, G., Sasik, R., Vittori, S., Carnevali, O., 2012. Teleost fish (*Solea solea*): A novel model for ecotoxicological assay of contaminated sediments. *Aquat. Toxicol.* 109, 133-142.
- Richetti, S.K., Rosemberg, D.B., Ventura-Lima, J., Monserrat, J.M., Bogo, M.R., Bonan, C.D., 2011. Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure. *Neurotoxicology* 32, 116-122.

- Roussiez, V., Ludwig, W., Monaco, A., Probst, J.L., Bouloubassi, I., Buscail, R., Saragoni, G., 2006. Sources and sinks of sediment bound contaminants in the Gulf of Lions (NW Mediterranean Sea): a multi-tracer approach. *Cont. Shelf Res.* 26, 1843–1857.
- Sánchez-Nogué, B., Varó, I., Solé, M., 2013. Comparative analysis of selected biomarkers and pesticide sensitivity in juveniles of *Solea solea* and *Solea senegalensis*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 3480-3488.
- Siscar S., Koenig S., Torreblanca A., Solé M. 2013. The role of Metallothionein and Selenium in metal detoxification in the liver of deep-sea fish from the NW Mediterranean sea. *Sci Total Environ.* 466-467, 398-905.
- Solé, M., Manzanera, M., Bartolomé, A., Tort, L., Caixach, J., 2013. Persistent organic pollutants (POPs) in sediments from fishing grounds in the NW Mediterranean: Ecotoxicological implications for the benthic fish *Solea* sp. *Mar. Pollut. Bull.* 67, 158-165.
- Sørmo, E.G., Ciesielski, T.M., Øverjordet, I.B., Lierhagen, S., Eggen, G.S., Berg, T., Jenssen, B.M., 2011. Selenium moderates mercury toxicity in free-ranging freshwater fish. *Environ. Sci. Technol.* 45, 6561-6566.
- Trisciani, A., Corsi, I., Torre, C.D., Perra, G., Focardi, S., 2011. Hepatic biotransformation genes and enzymes and PAH metabolites in bile of common sole (*Solea solea*, Linnaeus, 1758) from an oil-contaminated site in the Mediterranean Sea: A field study. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 806-814.
- US EPA (2007) Method 7473. <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/7473.pdf>.
- Vassault A. Lactate dehydrogenase. In: Bergmeyer, M.O. (Ed). *Methods of Enzymatic Analysis, Enzymes: Oxidoreductases, Transferases*. Academic Press, New York; 1983. p. 118-26.
- Viarengo, A., Burlando, B., Dondero, F., Marro, A., Fabbri, R., 1999. Metallothionein as a tool in biomonitoring programmes. *Biomarkers* 4, 455-466.
- Vieira, L.R., Gravato, C., Soares, A.M.V.M., Morgado, F., Guilhermino, L., 2009. Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: Linking biomarkers to behaviour. *Chemosphere* 76, 1416-1427.
- Vinagre, C., Fonseca, V., Cabral, H., Costa, M.J., 2006. Habitat suitability index models for the juvenile soles, *Solea solea* and *Solea senegalensis*, in the Tagus estuary: Defining variables for species management. *Fish. Res.* 82, 140-149.
- Wepener, V., van Vuren, J.H.J., Chatiza, F.P., Mbizi, Z., Slabbert, L., Masola, B., 2005. Active biomonitoring in freshwater environments: early warning signals from biomarkers in assessing biological effects of diffuse sources of pollutants. *Phys. Chem. Earth* 30, 751-761.
- Wessel, N., Santos, R., Menard, D., Le Menach, K., Buchet, V., Lebayon, N., Loizeau, V., Burgeot, T., Budzinski, H., Akcha, F., 2010. Relationship between PAH biotransformation as measured by biliary metabolites and EROD activity, and genotoxicity in juveniles of sole (*Solea solea*). *Mar. Environ. Res.* 69, Supplement 1, S71-S73.
- Wood, C.M., Farrell, A.P., Brauner, C.J., 2012. *Homeostasis and Toxicology of Non-Essential Metals*, Academic Press, Fish Physiology. Vol. 31B.

1.5.3 Article 3

Article publicat en la revista Environmental Research 132 (2014): 197-205.

Modulation of metallothionein and metal partitioning in liver and kidney of *Solea senegalensis* after long-term acclimation to two environmental temperatures

R. Siscar¹, A. Torreblanca¹, J. del Ramo¹, M. Solé^{2*}

¹Departamento Biología Funcional y Antropología Física. Universitat de València.

Dr. Moliner 50 Burjassot 46100 València, Spain

²Institut de Ciències del Mar (ICM-CSIC). Passeig marítim de la Barceloneta 37-49 08003 Barcelona, Spain.

* Corresponding author. Tel.: +34 932 30 95 00; fax: +34 932 30 95 55.

E-mail address: msole@icm.csic.es (M. Solé)

Abstract

Juveniles of *Solea senegalensis* were fed with commercial pellets under controlled conditions at two environmental Mediterranean temperatures (15 and 20°C) for two months. After this period, the accumulation of essential and non-essential metals and metallothionein (MT) levels was measured in liver and kidney by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and pulse polarography, respectively. The bioaccumulation factor (BAF) for selected metals in both tissues was calculated in relation to levels present in the feed. Tissue partitioning (liver/kidney) and molar ratios, considering the metal protective mechanisms: MT and Selenium (Se), were included for evaluating the detoxification capacity of each tissue. Ag, Cd, Cu and Mn were preferentially accumulated in the liver whereas Co, Fe, Hg, Se and Zn were found in larger concentrations in the kidney, and higher temperature enhanced the accumulation of some of them, but not all. MT content in liver, but not in kidney, was also influenced by temperature changes and by length of exposure. The BAF revealed that Cu was taken up mainly by the liver whereas Se was efficiently taken up by both tissues. The high molar ratios of MT and most metals denoted the kidney's remarkable spare capacity for metal detoxification through MT binding. Moreover, the potential protective role of Se was also more evident in kidney as a higher Se:Cd and Se:Ag molar ratios were reached in this organ. In contrast to other fish, the storage of Cd in kidney was particularly low.

Keywords: metals, benthic fish, metallothionein, selenium, temperature.

1. Introduction

The marine environment is exposed to physical and chemical changes that can be man-induced. Among these factors, enhanced water temperature and increased metal presence in their habitat can negatively affect the health status of resident organisms. One of these changes is due to climate alterations that are responsible for sustained increases in water temperature (Belkin, 2009). Modifications in temperature can report changes in the physiology of aquatic species as well as in bioavailability and metabolism of chemicals, including metals (Noyes et al., 2009). On the assessment of metal toxicity, several authors have selected fish liver as the organ that best reflects metal storage, and some of them compared it to other tissues, including kidney (Campana et al., 2003; Jeffree et al., 2006; Ureña et al., 2007; Adams et al., 2010; De Boeck et al., 2010; Ghedira et al., 2010; Kamunde and MacPhail, 2011; Luszczek-Trojnar et al., 2013). Nonetheless, there is controversy on which is the preferential tissue for metal accumulation in fish, as both liver and kidney are considered organs involved in metal internal dynamics. Only a few marine fish studies have already addressed the effect of temperature on metal handling (Olsson et al., 1996; Guinot et al., 2012) and even fewer have used kidney as the target tissue. However, in the species of concern for this study, *Solea senegalensis*, kidney was revealed to have a relevant role in metal handling (Siscar et al., 2013).

To prevent the toxic effect of some metals, in fish as well as in most aquatic organisms, two main mechanisms have been described. Firstly, metallothionein (MT) constitutes a family of low-molecular-weight, cysteine-rich proteins functioning in the regulation of essential metals such as Cu and Zn, and in the detoxification of these and other non-essential metals such as Cd and Hg (Wood et al., 2012a; 2012b). Temperature can affect not only the kinetics of uptake, biotransformation and elimination of metal but also MT synthesis in aquatic organisms including fish (Olsson et al., 1996; Baykan et al., 2007; Guinot et al., 2012). Secondly, the protective role of other metals such as selenium (Se) to prevent Hg toxicity has recently also been described in fish (Sørmo et al., 2011; Damiano et al., 2011; Branco et al., 2012, Siscar et al., 2014). In fact, the molar ratio Se:Hg has been proposed as a measure of the potential capacity of Se to face toxic effects of Hg in fish muscle, liver and kidney (Burger et al., 2012; 2013). In rats, evidence was found that Se protects against the toxic effects of Cd and

Ag alone (Newairy et al., 2007) or by forming a complex with Zn, in liver as well as in kidney (Jihen et al., 2008).

Few studies focus on physiological responses of *S. senegalensis* to temperature variation (Castro et al., 2012) and metal accumulation (Oliva et al., 2012a; Arellano et al., 1999). This species has also been broadly used as sentinel in metal pollution monitoring studies (Usero et al., 2003; Kalman et al., 2010; Fonseca et al., 2011; Costa et al., 2011; 2012; Oliva et al., 2012a; 2012b; Galindo et al., 2012; Siscar et al., 2013). However, there is little information on the effect of temperature on accumulation, detoxification and metal homeostasis in *S. senegalensis*.

The aims of this study were: 1) to determine the effect of temperature on the accumulation and distribution of metals between liver and kidney, 2) to find whether the observed differences, if any, are due to modifications in metal assimilation from food, 3) to search for the existence of temperature-driven changes in metal detoxification abilities at background levels of metals.

2. Material and Methods

2.1. Source of fish and laboratory acclimation

S. senegalensis were hatched and reared under aquaculture conditions by the Stolt Sea Farm SA (La Coruña, Spain). Specimens of about 150-200g wet weight were transported and maintained in the University of Valencia facilities. To ensure recovery after transport and adaptation to the new laboratory conditions, animals were kept at 20°C for two months.

2.2. Temperature acclimation experiment

Thirty-two fish were randomly distributed into 8 round tanks of 3 m³ each. Physical water conditions were checked daily and maintained at the desired temperatures. One week before the beginning of the experiment, the temperature of four of the tanks was lowered at a rate of about 1°C/day until the desired temperature of 15°C was reached, which was one day before the start of the experiment. The water parameters from the start of the experiment (t_0) and for a period of up to 60 days (t_{60}) for the 15°C group were : T 15.8 ± 1.8 °C; salinity 29.0 ± 0.9 p.s.u and O₂ $98.3 \% \pm 1.7$ and for the 20°C group: T 19.1 ± 0.6 °C; salinity 29.6 ± 1.2 p.s.u and O₂ $97.8 \% \pm 1.3$. The light regime was 12:12 and fish were fed daily *ad libitum* by hand with commercial Le-5-Elite trout

pellet, Skretting (UK), but fasted for 24 hours prior to the sampling of eight fish (2 from each 4 replicate tanks) for each time and temperature conditions.

2.3. Fish sampling

Fish were sacrificed by severing the spinal cord. Fish were immediately dissected and the organs (liver and kidney) flash frozen in liquid nitrogen. Tissues were stored at -80°C until analysis. Total weight and length were also measured before sacrifice to calculate the Condition factor (CF) as: total length/ (total weight)³ and the hepatosomatic index (HSI) as: (liver weight/total weight)*100. The Q₁₀ coefficient, the relative change of a biological activity as a consequence of increasing the temperature by 10 °C, was used to evaluate the influence of temperature on growth. $Q_{10} = (W_{T2}/W_{T1})^{10/T2-T1}$, where W is the weight gained by fish at either temperature and T1 and T2 the respective acclimation temperatures (15 and 20°C). Handling of the fish was done according to national and institutional regulations of the Spanish Council for Scientific Research (CSIC) and Directive 2010/63/EU.

2.4. Metal content analysis

Individual fish liver and kidney samples of about 0.1 g wet weight were digested in concentrated nitric acid 65% (Baker), at room temperature overnight and were heated at 80°C for 2 h. Within each digestion series, appropriate blanks with ultra-pure water were also subjected to the same procedure to account for background contamination levels. After cooling, solutions were transferred to a standard volume with ultra-pure water. Determination of metals (Ag, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Pb, Se and Zn) was undertaken using an inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) (Elan DRC-I, Perkin-Elmer Sciex). Samples of similar weight of certified reference material (DOLT-3 and LUTS-1, National Research Council of Canada, Ottawa), were digested and analysed during each analytical run. The values of all elements found were in good agreement with the certified values, with the recoveries ranging from 87% to 108%. A sample of water from each tank was analysed for metal content. The food used Le-5-Elite trout pellet, Skretting (UK), was also analysed for metal content.

2.5. Metallothionein determination by differential pulse polarography

About 0.2 g wet weight portions of frozen liver and kidney were homogenized using an ultra-turrax in 20 mM Tris-HCl buffer, 1 mM dithiothreitol (DTT) and 0.2 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) at pH 8.6 in an ice bath. The homogenates were centrifuged at 30,000g for 45 min at 4°C. The supernatant was heated at 80°C for 10 min in order to denature high molecular weight proteins, subsequently centrifuged at 30,000g for 45 min at 4°C, and the heat-treated supernatant, containing thermally stable MT, was separated from precipitated proteins. MT was measured using differential pulse polarography as described by Bebianno and Langston (1989). An aliquot of the heat-treated supernatant was added to the polarographic cell, containing 20 mL hexamminecobalt chloride buffer (the supporting electrolyte), together with Triton-X (0.025% v/v). The cell was purged for 2 min with purified N₂ prior to analysis. The polarographic response was measured during a potential scan between -1.38 V and -1.7 V (Model 757 VA Computrace Analyser, Methrom, Switzerland) in SMDE (Static Mercury Drop Electrode) mode. Quantification of MT was performed using the standard addition method with rabbit liver MT I+II (Sigma). Results are expressed as $\mu\text{g g}^{-1}$ wet weight of tissue.

2.6. Molar ratios and bioaccumulation factor calculations

Molar ratios were calculated considering an average molecular weight of 6000 Da for MT and the atomic weights for the metals: Se (78.96), Hg (200.5), Cd (112.4), Zn (65.4) and Ag (107.9) were adopted for the conversion of MT and metal content ($\mu\text{g/g w.w}$) into molar content (moles/g w.w). In this way, the calculated ratios are expressed as moles of MT per atom of metal in liver and kidney. The reported value ratios were calculated for each individual fish and then averaged to obtain a mean value.

The bioaccumulation factor (BAF) was calculated at the two set times in order to study the effect of temperature on the kinetics of the ten selected metals in the two organs (liver and kidney). This factor was calculated as a ratio between metal concentration in each tissue and metal content in the commercial food pellets.

2.7. Statistics

All statistical analyses were performed using the software package SPSS. Data were checked for normality (Kolmogorof-Smirnof test) and homogeneous variance (Levene's test) and transformed, when necessary, to comply with normality and homocedasticity assumptions. The influence of time and temperature and their interaction was evaluated using the two-way ANOVA test. Differences between pairs of experimental groups were assessed by one-way ANOVA and Bonferroni as a *Post-hoc* test. Spearman correlation coefficient (ρ) was calculated between metals in liver and kidney and their respective MT levels in order to measure the strength of association between these variables with the non-transformed data. Student's t-test was applied to contrast overall kidney and liver differences in MT content. Differences at the 5% significance level were considered significant.

3. Results

3.1. Biological parameters of the fish

In Table 1 the total weight, total length and sex ratios of the fish selected for the study at the start and after 60 days are reported. Fish increased in length and weight ($p < 0.05$) during the two-month experiment, regardless of water temperature. The condition factor (CF) was not influenced by temperature but the hepatosomatic index (HSI) was significantly lower ($p < 0.05$) in fish kept at 20°C for 60 days.

Table 1. Biological parameters of *Solea senegalensis* kept at two temperature regimes (15 and 20°C) up to 60 days. Condition factor (CF) and hepatosomatic index (HSI). One-way ANOVA with post-hoc Bonferroni test for contrasts.

Time (days)	t0		t60	
Temperature (°C)	15	20	15	20
N(M:F)	8 (6:2)	8 (3:5)	8 (4:4)	8 (5:3)
Total length (cm)	23.6 ± 0.5a	23.8 ± 0.8a	25.8 ± 0.6b	26.6 ± 0.4b
Total weight (g)	198.3 ± 10.2a	216.4 ± 11.1a	268.8 ± 15.9b	288.4 ± 12.1b
CF	1.50 ± 0.05a	1.63 ± 0.18a	1.58 ± 0.08a	1.55 ± 0.08a
HSI	0.99 ± 0.05b	0.91 ± 0.06b	1.01 ± 0.06b	0.70 ± 0.04a

Different letters denote statistical significance ($\alpha = 0.05$).

3.2. Metal content in water and foodstuff

Metal content of food pellets (in $\mu\text{g/g w.w}$) was for Ag: 0.007 ± 0.001 , Cd: 0.16 ± 0.01 , Co: 0.123 ± 0.023 , Cr: 2.29 ± 0.29 , Cu: 10.44 ± 0.88 , Fe: 116.02 ± 8.06 , Hg: 0.035 ± 0.001 , Mn: 32.79 ± 1.49 , Pb: 0.67 ± 0.03 , Se: 0.54 ± 0.03 and Zn: 98.05 ± 6.58 . Metal content in the water from the tanks was similar and about or just over the LOD at the two rearing temperatures (data not presented).

3.3. Metal content in liver and kidney

The content of eleven essential and non-essential metals was measured in liver and kidney of fish acclimated to two temperatures. The metals: Ag, Cd, Cu and Mn were accumulated preferentially in liver (Fig. 1) whereas essential Cr, Co, Fe, Se and Zn and non-essential Hg and Pb (data not shown as it was <0.03 ppm in kidney and $<\text{LOD}$ in liver) were more present in kidney (Fig. 2).

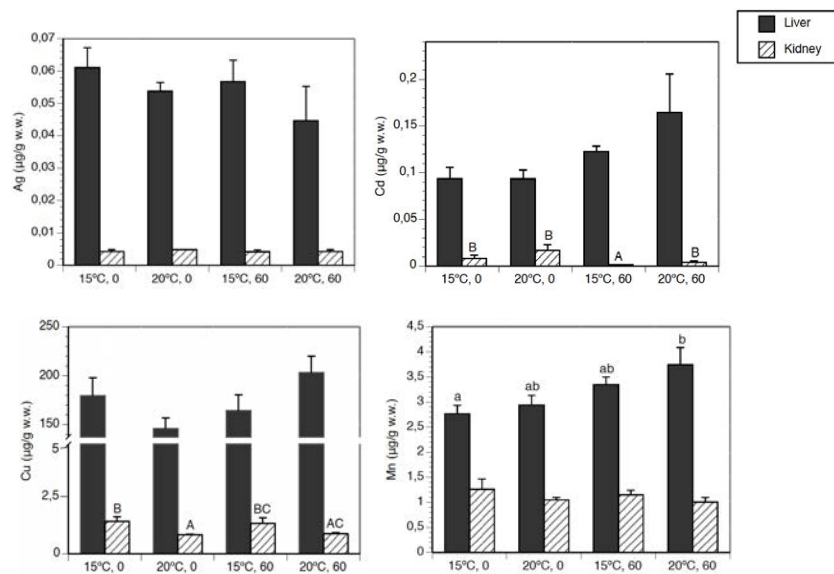


Fig. 1. *Solea senegalensis* (n=32) liver and kidney concentrations (in $\mu\text{g/g wet weight}$) of the metals are higher in the liver at two sampling times (0 and 60 days) and at two acclimation temperatures (15 and 20°C). Different letters denote statistically significant differences between groups ($p < 0.05$). Lower case letters denote liver contrasts, upper case letters refer to kidney contrasts.

As seen in figure 1 and taken from the two-way ANOVA analysis, levels of Ag and Cu in liver did not change over time or as a consequence of the temperature regime. Nonetheless, Cu content in kidney was lower at the higher rearing temperature ($F=20.470$; $p<0.001$). By contrast, Cd ($F=5.180$; $p=0.031$) and Mn ($F=9.424$; $p=0.005$) content in liver increased with time, reaching the highest level in organisms that had been reared at 20°C for 60 days.

The effect of acclimation temperature on metal content was seen for some of the metals more present in kidney as reflected in figure 2. That is, Co in kidney positively varied with temperature ($F=7,553$; $p=0.010$) whereas in liver it was influenced by time ($F=5.706$; $p=0.024$). Fe accumulation in kidney ($F=8.984$; $p=0.006$) and Zn in liver were also temperature dependent ($F=10.605$; $p=0.003$) but in different ways, the former decreased and the latter increased. Interestingly, Cr in liver was preferentially influenced by temperature ($F=7.586$; $p=0.010$) while in kidney it was mostly affected by time ($F=8.472$; $p=0.007$). A positive significant effect of the rearing temperature was also found for Hg in liver ($F=5.784$; $p=0.023$).

To quantify the influence of temperature acclimatization in the internal dynamics of metals, the ratio liver/kidney content for each metal in both tissues was calculated (Table 2). A two-way ANOVA analysis revealed that a higher temperature favoured an increase in the ratio for Co, Cr, Cu and Fe whereas Mn and Zn corresponding ratios increased over time. For the particular case of Cu the ratio was also affected by the interaction of both variables.

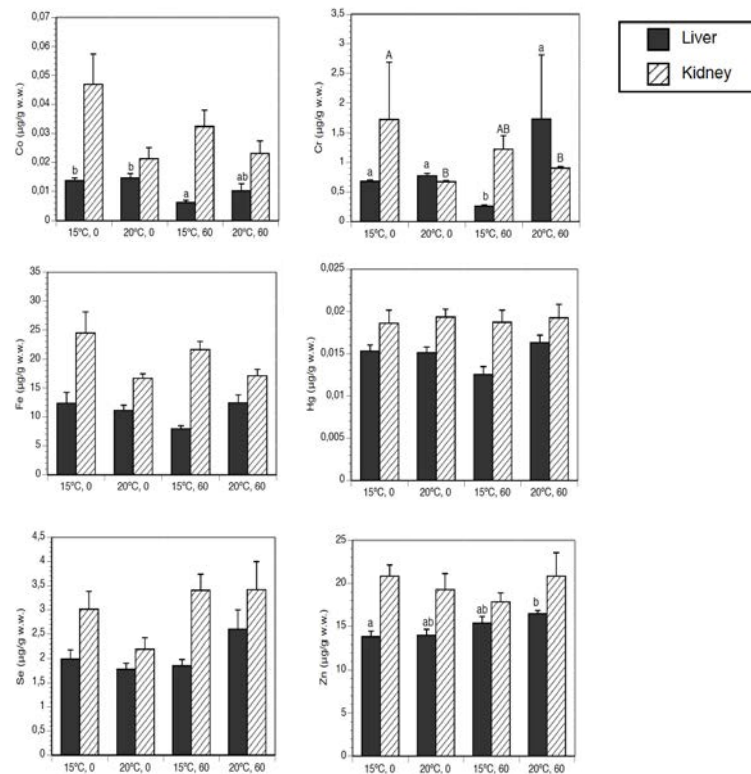


Fig.2. *Solea senegalensis* (n=32) liver and kidney concentrations (in $\mu\text{g/g}$ wet weight) of the metals were higher in the kidney at two sampling times (0 and 60 days) and at two acclimatation temperatures (15 and 20°C). Different letters denote statistically significant differences between groups ($p < 0.05$). Lower case letters denote liver contrasts, upper case letters refer to kidney contrasts.

3.4. BAF in liver and kidney from feed

In table 3, the BAF values obtained for each metal and tissue, in relation to their presence in feed, are presented regardless of time and temperature as they were not revealed as significant factors after the two-way ANOVA test. Thus, the one-way ANOVA contrasts within each tissue showed significant differences among metals. Maximal BAF values were seen in liver for Cu (13.94-19.47) and Ag (6.73-9.21) whereas BAF for Se in kidney (4.05-6.30) and in liver (3.28-4.80) was similar.

Table 2. Liver/kidney ratios bioaccumulated metals (in $\mu\text{g/g}$ w.w.) over time as a response to two acclimation temperatures. Different superscripted letters denote statistical differences in the four groups after one-way ANOVA and *post-hoc* Bonferroni contrasts between the four groups. The influence of each factor as a result of two-way ANOVA is indicated as a F value and the significance as a symbol.

Temp	T	Ag	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Se	Zn
15°C	0	12.10	16.53	0.48 ^{ab}	0.94 ^{ab}	142.98 ^{ab}	0.57 ^{ab}	0.88	2.42 ^{ab}	0.72	0.69
	60	11.13	80.86	0.22 ^a	0.25 ^a	135.09 ^a	0.38 ^a	0.70	0.03 ^a	0.57	0.88
20°C	0	12.02	24.71	0.78 ^b	1.15 ^{ab}	165.13 ^{ab}	0.67 ^{ab}	0.79	2.83 ^{ab}	0.92	0.77
	60	9.62	28.36	0.63 ^{ab}	2.03 ^b	221.28 ^b	0.76 ^b	0.89	3.98 ^b	0.95	0.86
ANOVA (F)	Temp	n.s.	n.s.	7.61 ^{**}	8.39 ^{**}	6.69 [*]	7.72 [*]	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Time	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	6.37 [*]	n.s.	6.86 [*]
	Temp x time	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	4.42 [*]	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

3.5. Metallothionein content in liver and kidney

MT levels were measured at the beginning (t_0) and end of the experimental period (t_{60}) at the two temperatures (15 and 20°C). A two-way ANOVA test considering both time and temperature as factors indicated a significant effect of temperature ($F=6.402$; $p=0.017$) and time ($F=6.298$; $p=0.018$) over MT content in liver but not in kidney. The two groups to significantly differ in liver MT were the one kept at 15°C (t_0) and the one kept at 20°C after 60 days acclimation. In kidney, MT content after 60 days of acclimation differed in both groups ($p<0.05$), being higher at 15°C (Fig. 3). Overall MT levels in kidney and in liver were similar (t -test; $p>0.05$).

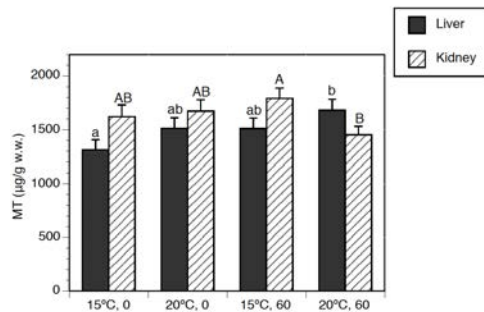


Fig. 3. Metallothionein levels (in $\mu\text{g/g}$ wet weight) in *Solea senegalensis* ($n=32$) liver and kidney at two sampling times (0 and 60 days) and at two acclimation temperatures (15 and 20°C).

Table 3 Bioaccumulation factor (BAF) of selected metals from feed in both tissues (liver and kidney). Data for each tissue corresponds to the mean \pm SEM (n=32) of the values corresponding to two temperatures (15 and 20°C) and two times (0 and 60 days) as no differences were due to temperature or time. Different superscripted letters denote statistical differences at level $\alpha=0.05$ after One-way ANOVA and Bonferroni post-hoc contrasts of all contrasted metals in each tissue.

Tissue	Metals									
	Ag	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Se	Zn
Liver	8.15 \pm 0.53 ^a	0.74 \pm 0.07 ^c	0.09 \pm 0.01 ^b	0.38 \pm 0.12 ^{bcde}	16.59 \pm 0.8 ^a	0.09 \pm 0.01 ^b	0.43 \pm 0.01 ^d	0.10 \pm 0.00 ^b	3.79 \pm 0.24 ^f	0.15 \pm 0.00 ^a
Kidney	0.66 \pm 0.04 ^a	0.05 \pm 0.01 ^b	0.24 \pm 0.03 ^c	0.50 \pm 0.12 ^{abcd}	0.11 \pm 0.01 ^d	0.17 \pm 0.01 ^c	0.55 \pm 0.02 ^a	0.03 \pm 0.00 ^b	5.55 \pm 0.39 ^e	0.20 \pm 0.01 ^c
Liver ¹	NA	0.35 \pm 0.33 ^{ab}	NA	NA	0.19 \pm 0.07 ^{ab}	0.16 \pm 0.06 ^{ab}	0.66 \pm 0.33 ^b	0.03 \pm 0.01 ^a	NA	0.20 \pm 0.05 ^{ab}

¹ Data from Guinot et al. (2012)

3.6. Correlations between metals and MT

In liver (n=32), Zn content was the only metal to significantly correlate with MT concentration ($\rho=0.514$; $p=0.003$). Similarly Co was positively related to Cr and Fe ($\rho=0.611-0.846$; $p<0.001$). In kidney (n=32), MT content was not significantly related to any metal but Cd and Cr content were negatively correlated in this tissue ($\rho=-0.551$; $p=0.001$). Contrasting both tissues, several interesting correlations were found. Cd in liver had a negative significant correlation with its presence in kidney ($\rho=-0.451$; $p=0.010$). A negative correlation was also found between presence of Hg in liver and MT content in kidney ($\rho=-0.371$; $p=0.036$).

Table 4. Molar ratios between metallothionein (MT) and selected metals in liver and kidney of juveniles of *Solea senegalensis* (n=32) acclimated to two temperatures (15 and 20°C) for 60 days in two tissues (liver and kidney). One-way ANOVA contrasts with Bonferroni post-hoc as there was interaction after the 2-way ANOVA test (temperature and time as factors). Data are presented as mean \pm SD (n=8).

Tissue	15°C, 0d (n=8)		20°C, 60d(n=8)		15°C, 60d (n=8)		20°C, 60d (n=8)	
	Liver	Kidney	Liver	Kidney	Liver	Kidney	Liver	Kidney
MT:Ag	416.7 \pm 49.14	6051 \pm 564.99	511.9 \pm 36.01	6234 \pm 298.22	506.3 \pm 35.84	6733 \pm 189.80	577.8 \pm 64.96	5421 \pm 208.96
MT:Cd	288.7 \pm 36.36	5333A \pm 2377.07	314.57 \pm 40.74	7146A \pm 2928.57	233.4 \pm 11.21	20992B \pm 592.42	170.1 \pm 26.79	5833A \pm 1382.99
MT:Cu	0.08 \pm 0.01	12.73A \pm 1.47	0.11 \pm 0.01	20.22B \pm 1.77	0.10 \pm 0.01	15.48AB \pm 0.87	0.09 \pm 0.01	16.75AB \pm 0.74
MT:Hg	2928 \pm 280.93	2872 \pm 253.52	3336ab \pm 227.38	2929 \pm 169.55	4179b \pm 333.63	3314 \pm 223.90	3500ab \pm 192.35	2664 \pm 280.50
MT:Se	9.27 \pm 1.05	7.70 \pm 0.91	11.28 \pm 0.82	11.31 \pm 1.85	11.15 \pm 0.98	7.35 \pm 0.65	10.50 \pm 2.24	7.23 \pm 1.59
MT:Zn	1.04 \pm 0.08	0.88 \pm 0.10	1.14 \pm 0.06	0.98 \pm 0.07	1.09 \pm 0.04	1.12 \pm 0.07	1.11 \pm 0.01	0.84 \pm 0.11
MT: ₂ metals	0.08 \pm 0.01	0.81 \pm 0.10	0.10 \pm 0.01	0.93 \pm 0.06	0.09 \pm 0.01	1.03 \pm 0.05	0.09 \pm 0.01	0.79 \pm 0.10
Se:Hg	326.6 \pm 20.28	408.7 \pm 51.74	305.4 \pm 29.59	292.2 \pm 33.53	392.5 \pm 46.33	471.4 \pm 47.03	403.0 \pm 49.59	461.7 \pm 87.89
Se:Cd	32.99 \pm 5.00	707.3A \pm 262.9	27.87 \pm 3.05	780.6A \pm 347.06	21.91 \pm 1.95	3025B \pm 303.17	19.01 \pm 3.68	981.8A \pm 225.92
Se:Ag	45.59 \pm 2.87	860.2 \pm 112.43	46.25 \pm 3.55	618.6 \pm 62.18	48.58 \pm 6.03	971.7 \pm 99.41	65.77 \pm 11.88	971.7 \pm 165.01

3.7. Molar ratios between MT and metals

In Table 4, molar ratios between MT and selected metals are independently contrasted *per tissue*; in most cases the ratios in kidney were higher than in liver. The integrative molar ratio $MT:\sum\text{metals}$ was also about 10-fold higher in kidney than liver. Results of the two-way ANOVA contrasts (temperature and time as factors) revealed that the interaction of both factors was significant, thus the four groups were contrasted independently. Only two groups significantly differ: (1) the MT:Cu ratio in kidney at the first time-set of the experiment in relation to temperature and (2) the MT:Hg ratio in liver at 15°C over time. Se:Hg molar ratio was similar in the two tissues studied, and values were always much higher than 1 (≈ 300). Se:Cd and MT:Cd were especially high in kidney at 15°C after two months, probably as a consequence of the low level of Cd in this particular group.

4. Discussion

Fish are ectothermic species whose physiological and metabolic processes are modulated by temperature. To see at what extent the rearing temperatures influenced homeostasis of essential metals and the handling of toxic ones, *S. senegalensis* was kept in the lab for two months to simulate two naturally occurring temperatures at their habitat depth in the NW Mediterranean (15°C, late winter) and (20°C, early autumn).

During this period, the fish grew both in length and weight and maintained a similar condition index (CI), but the hepatosomatic index (HSI) was significantly affected by the rearing temperature (Table 1). Likewise, no influence on the CI was seen in aquaculture reared *Sparus aurata* after 3 months acclimation to a maximal temperature gradient of 8°C (Guinot et al., 2012). By contrast, a lower temperature of acclimatization (12°C) caused an elevation in the HSI of *S. senegalensis* after 3 weeks as a consequence of increased lipid deposition in liver (Arjona et al., 2010). In the present study, a lower HSI at the higher temperature could be the result of lipid mobilization to face higher energy demand. It is known that growth may change the concentration of metals in tissues because of a diluting effect. The growth rate in this species is likely to be influenced by the rearing temperature as recently seen in *Solea solea* (Schram et al., 2013); thus, this factor should be taken into consideration. Nonetheless, as calculated from

values of Table 1, Q_{10} for growth rate is close to 1 (1.04) meaning that there would be almost no effect of temperature on total weight for every 10-degree rise in temperature.

Temperature influenced the accumulation of metals in both organs measured as $\mu\text{g/g}$ wet weight. In liver, a higher temperature reported higher values of Hg, Cr and Zn concentration, but it was mostly the combination of temperature and time that significantly influenced the accumulation of Hg, Cu and Fe. Nonetheless, this result should be interpreted with caution as the HSI was reduced at the higher temperature and a dilution effect in this particular organ cannot be ruled out. In kidney, accumulation of Co, Cu and Fe was influenced by temperature itself or by temperature combined with the time factor (Cd). Time alone influenced the bioaccumulation of Cd, Co, Cr and Mn in liver as well as Cr in kidney. Despite the results from the two-way ANOVA test revealing the influence of both factors (temperature and time) in metal distribution, the accumulation trend in relation to temperature in the present study was not as clear as that shown by Guinot et al., (2012) for *S. aurata* where a sharp positive relationship between rearing temperature and metal uptake was attributed to temperature-driven accelerated metabolic processes. A shorter length of exposure and a smaller difference between the tested temperatures (in comparison with the *S. aurata* experiment) may account in part for not having found such a clear response. However, species-specific physiological traits can also account for the particular effects of temperature in metal handling in both species. In some instances ectothermic animals exhibit compensatory mechanisms for environmental temperature changes that comprise changes in enzymatic activities to counteract the Arrhenius effect. Such changes have been reported for *S. senegalensis* (Arjona et al., 2010), while those mechanisms have not been found in *S. aurata* (Ibarz et al., 2010).

A dominant accumulation of Cd and Cu in liver (Fig. 1) is coincident with studies in the same species under field conditions (Galindo et al., 2012) and in *S. aurata* but based on experimental contaminated exposure to these metals (Ghedira et al., 2010). By contrast, in *Anguilla anguilla* under aquaculture conditions, Cd presence was higher in liver whereas Cu was more present in kidney (Ureña et al., 2007). In other fish studies, and contrary to *S. senegalensis* observations, Cd was found mainly in fish kidney (Jeffrey et al., 2006; Ng and Wood, 2008; Huang et al., 2007). When considering the metals found in higher concentrations in

kidney than in liver, Cr deserve special attention since their partitioning among those organs varied drastically with the temperature as revealed by their liver/kidney ratios. Higher Cr concentration was mainly located in kidney at 15°C whereas at 20°C higher levels were present in liver. Little is known on Cr dynamics within the fish and the relative role of liver and kidney in their excretion (Wood et al., 2012a). Not only Cr, but also Co, Cu and Fe partitioning in both tissues (Table 2) was temperature-dependent with a more significant accumulation in liver at higher temperature. As the hepato-biliar and renal routes have both been considered of importance in metal excretion, present results suggest that warm temperatures would favour biliary excretion in comparison to the renal one. Regarding Co distribution, few data are available in fish, however dominance of Co in kidney was coincident with former results from a field survey in *S. senegalensis* (Galindo et al., 2012) and also with freshwater carp, *Cyprinus carpio* (Mukherjee and Kaviraj 2009). Se, Zn and Hg were equally distributed in both tissues regardless of rearing temperature whereas Mn and Zn increased their presence in liver over time. From Fig 1 and 2 and the partitioning ratios of table 2 it can be deduced that when commercial food is the only way of exposure, and thus the metal intake is not high, liver rather than kidney, seems to be the preferred accumulating organ in *S. senegalensis* and this behaviour is enhanced at a higher temperature.

Table 5. Comparative levels of metals and metallothionein analysed in the same method (Bebianno and Langston, 1998). Range of metals and MT in µg/g w.w.

	Tissue	Cd	Cu	Cr	Fe	Hg	Se	Zn	MT	References	
Benthic wild species											
	<i>Lepidionomus boscii</i> *	Liver	0.04-0.28	2.0-5.6	0.2-0.6	20-44	0.01-0.09	NA	16-32	800-1600	Fernandes et al., 2008
	<i>Solea solea</i>	Kidney	0.02-0.04	1.0-1.75	0.3-0.4	75-150	0.7-2.8	4.2-5.1	13-18	1300-3600	Siscar et al., 2014
	<i>Solea senegalensis</i>	Kidney	0.01-0.04	0.8-1.25	0.3-0.4	60-175	0.2-0.5	3.5-5.6	14-17	2000-3000	Siscar et al., 2014
	<i>Solea vulgaris</i>	Liver	0.08-0.43	50.7-129	0.02-0.03	236-326	0.01-0.03	NA	15.0-25.6	NA	Usero et al., 2003
Farmed species											
	<i>Solea senegalensis</i>	Liver	0.09-0.17	150-210	0.5-1.7	7-13	0.01-0.02	1.8-2.8	13-17	1200-1800	This study
	<i>Anguilla anguilla</i>	Kidney	<0.01-0.02	0.01-2.0	0.7-1.8	17-25	0.01-0.02	2.2-3.6	18-21	1600-1800	
	<i>L. boscii</i>	Liver	0.40-3.80	5.4-35.9	NA	147-367	0.08-0.17	NA	18.3-69.8	≈700	Ureña et al., 2007
	<i>L. boscii</i>	Kidney	3.95-35.5	0.34-2.13	NA	59.3-250	0.08-0.38	NA	24.1-42.5	≈1400	
	<i>L. boscii</i>	Liver	0.08-0.22	40-180	NA	NA	NA	NA	6.0-22	540-800	Fernandes et al., 2008
	<i>Sparus aurata</i>	Liver	0.2-0.6	2.0-7.0	NA	30-80	0.05-0.15	NA	30-80	750-2500	Guinot et al 2012

Due to its toxicity, the presence of Hg deserves particular consideration. In the present study Hg presence in liver and kidney of *S. senegalensis* was lower than in other reported farmed fish (Table 5). Other fish studies revealed that toxic

metals such as Hg but also essential Se and Zn do not seem to present a clear preference for an organ/tissue and partitioning is species-dependent (Usero et al., 2003; Mieiro et al., 2011). A slightly higher content of Hg in kidney coincides with observations in other species such as carp, *C. carpio* (Huang et al., 2007), zebra-seabream, *Diplodus cervius* (Branco et al., 2012), bluefish, *Pomatomus saltatrix* (Burger et al., 2013) but differs from those in other marine fish, *Dicentrarchus labrax* and *Liza aurata* (Mieiro et al., 2011) in which Hg concentration was higher in the liver.

Metal content in the food was in the range reported by other authors on commercial pellets (Guinot et al., 2012 and references within). In all, values for Cd, Hg and Pb did not exceed the maximum permitted level in fish feed according to Annex I of the UE Directive 2002/32/EC. Although fish have the potential to incorporate metals via ingested food and via diffusion through the gills or skin, under the present experimental conditions, and as suggested by metal analysis of water and feed, alimentation may be the most significant route. Thus, considering food as the main entry for metals, the bioaccumulation factor (BAF), that allows to quantify the accumulation of metals from the feed, was calculated in liver and kidney of *S. senegalensis* at the two temperatures after 2 months, a period long enough for reaching the steady state. A temperature difference of about 5°C did not significantly influence metal accumulation from feed over the study period for any of the contrasted metals. In a comparable study the same temperature increase enhanced the BAF for Hg by 3-fold in liver of *S. aurata* (Guinot et al., 2012). The BAF values for each metal within an organ were contrasted regardless of time and temperature (Table 3). The most striking finding was a great efficiency in Se accumulation from the diet in both organs, resulting in the highest BAF value in kidney. The BAF in liver of *S. senegalensis* for Cu (16.6) greatly contrasts with that obtained for the same metal and tissue in *S. aurata* (0.19) also reared at a similar temperature (Guinot et al., 2012). By contrast in *S. senegalensis* the BAF of the same metal (Cu) in kidney was two orders of magnitude lower than in liver. Also in table 3, the BAF for other metals (Cd, Fe and Zn) was more in line with that obtained in *S. aurata* reared at 22°C for 3 months and using similar feed (Guinot et al., 2012). Among the metal protective mechanisms of fish, the metal binding to the protein MT and to Se stands out, thus, the potential influence of temperature fluctuations on these mechanisms might be crucial for maintaining metal homeostasis.

Seasonal temperature fluctuations were seen to have an important role in the ability of MT to bind metals (Baykan et al., 2007). Only a few studies have tackled this issue in fish under non-toxic conditions (Olsson et al., 1996; Guinot et al., 2012) as most are focussed on toxic metal exposures (Carpené et al., 1992; Olsson et al., 1996; Baykan et al., 2007). The present study revealed that a 5°C variation in temperature did affect MT content in liver of *S. senegalensis* (Fig 3). Guinot et al (2012) also found evidence in the same direction in *S. aurata*, although a higher variation in temperature (10°C) was needed to achieve significance. Similarly, Van Cleef-Toedt et al (2001) reported an over-expression of MT mRNA in liver, gill and intestine of non-spawning *Fundulus heteroclitus* exposed to 26°C compared with those to 19°C. In contrast, the amount of MT in liver increased when the temperature decreased in fish such as *Pleuronectes flesus* (Rotchell et al., 2001) and *Oncorhynchus mykiss* (Olsson et al., 1996). It should be noted that the higher presence of MT in liver after 60 days at the highest rearing temperature coincided with a high bioaccumulation of most metals and by a good Zn and MT content relationship. Regarding the mechanism for MT induction by temperature, as far as we know, there is no information available for fish. Castro et al (2012) reported oxidative stress in the liver of *S. senegalensis* as a consequence of thermal fluctuations. The role of MT in oxidative stress in mammals is well known, with the MT gen transcription being up-regulated by reactive oxygen species (Ruttkay-Nedecky et al., 2013). In rat, some of the metal transport components pathways involved in essential metal and toxic ones (e.g Cu uptake) can be affected by temperature and cell type (Shaikh et al., 1995). Thus, it is difficult to discern if the MT increase is the cause or the consequence of the temperature-driven Cu accumulation in liver. By contrast, in kidney of juvenile *S. senegalensis*, MT could not be statistically related to temperature or any metal present. Nevertheless, in a recent field survey with adults of *S. senegalensis* MT content in kidney was related to the contents of Cd, Cu and Hg (Siscar et al., 2013). It should be noted that although the metal values for Cd and Cu in field specimens were similar to those presented here, Hg was over one order of magnitude higher in wild fish. MT content in the two organs (liver and kidney) of *S. senegalensis* was similar and by comparison to other studies using the same methodology, this distribution is seen to be species-specific (Table 5). Liver and kidney MT measurements in the sympatric sole *S. solea*, revealed that MT prevalence in either tissue was dependent on the metal load of the sampling site (Jebali et al., 2013). In fact, MT

levels analysed in liver and kidney may be influenced by the excretory capacity of each tissue and recent studies have shown the importance of the biliary route in MT excretion (Hauser-Davis et al., 2014).

Molar ratios of MT:metal and Se:metal have been shown to provide more valuable information as a measure of the metal detoxification capacity of a given tissue, than MT and Se content alone. According to the results presented in Table 4, temperature of acclimation did not produce significant changes in metal detoxification capacity in liver or kidney. However, some of the results obtained provide very interesting clues about the importance of MT and Se in metal detoxification in *S. senegalensis*. In a recent study with wild adults of *S. senegalensis* (Siscar et al., 2013), a positive correlation between Hg and MT but also Hg and Se in kidney supported a collaborative participation of both mechanisms in Hg protection. In the present laboratory study where Hg levels are 10 times lower, we did not find any of the above mentioned correlations, suggesting that Se and MT are in excess and still provide spare binding capacity. Despite molar content of MT being 10 times greater than that of Se, in this species, the highest BAF value in kidney recorded for Se cannot be ignored. In addition, the high molar ratios and the coincident presence of Se and Hg in kidney of *S. senegalensis*, in respect to liver, support a prominent role of the renal organ in the overall metal protection available under physiological (uncontaminated) conditions. Contrasting the few data available for Se:Hg molar ratios for liver and kidney in other fish species under no experimental metal-exposure (values ranging from 13 to 44 in Branco et al., (2012) and Burger et al., (2013)), the values reported here for *S. senegalensis* are very high (305 and 471, respectively). Interestingly, the Se:Hg ratio in kidney in the present study (471) was also much higher than that reported for wild specimens of the same species (28-33) (Siscar et al., 2013). Thus, in contrast to other fish or adults of the same species, *S. senegalensis* juveniles seem well protected against Hg toxicity by Se.

5. Conclusions

This work demonstrates that a change of just 5°C in water temperature leads to differences in the accumulation of some metals and in their partitioning between kidney and liver in juveniles of *S. senegalensis*. As a consequence of a higher temperature, MT levels in liver increased moderately but no significant variation of MT was found in kidney. No temperature-driven effects were observed in the BAF efficiency for any metal, or in the molar ratios of MT and Se. MT levels were similar in both tissues but parameters related to other protective mechanisms, such as Se content and Se/Hg ratios, suggested a greater potential Hg detoxification capacity of kidney in relation to liver. Also worth noting is the high BAF of Se in liver and kidney, revealing a remarkable potential capacity of these tissues for Hg detoxification through Se binding.

Acknowledgements

This work was financed by the Ministry of Science and Innovation of Spain (ref CTM2010-16611). S. Piñeiro and L. Cabrera from the SCSIE-University of Valencia are acknowledged for the fish maintenance. A. Hernández is acknowledged for her technical help.

References

- Adams, D.H., Sonne, C., Basu, N., Dietz, R., Nam, D.H., Leifsson, P.S., Jensen, A.L., 2010. Mercury contamination in spotted seatrout, *Cynoscion nebulosus*: An assessment of liver, kidney, blood, and nervous system health. *Sci. Total Environ.* 408, 5808-581.
- Arellano, J.M., Storch, V., Sarasquete, C., 1999. Histological Changes and Copper Accumulation in Liver and Gills of the Senegalese Sole, *Solea senegalensis*. *Ecotox. Environ. Safe.* 44, 62-72.
- Arjona, F.J., Ruiz-Jarabo, I., Vargas-Chacoff, L., del Rio, M.P.M., Flik, G., Mancera, J.M., Klaren, P.H.M., 2010. Acclimation of *Solea senegalensis* to different ambient temperatures: implications for thyroidal status and osmoregulation. *Mar. Biol.* 157, 1325-1335.
- Baykan, U., Atli, G., Canli, M., 2007. The effects of temperature and metal exposures on the profiles of metallothionein-like proteins in *Oreochromis niloticus*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 23, 33-38.
- Bebianno, M.J., Langston, W.J., 1989. Quantification of metallothionein in marine invertebrates using differential pulse polarography. *Port. Electrochim. Acta* 7, 511-524.)
- Belkin, I.M., 2009. Rapid warming of Large Marine Ecosystems. *Prog. Oceanogr.* 81, 207-213.
- Branco, V., Canário, J., Lu, J., Holmgren, A., Carvalho, C., 2012. Mercury and selenium interaction in vivo: Effects on thioredoxin reductase and glutathione peroxidase. *Free Radic. Biol. Med.* 52, 781-793.
- Burger, J., Gochfeld, M., Jeitner, C., Donio, M., Pittfield, T., 2012. Interspecific and intraspecific variation in selenium:mercury molar ratios in saltwater fish from the Aleutians: Potential protection on mercury toxicity by selenium. *Sci. Total Environ.* 431, 46-56.
- Burger, J., Jeitner, C., Donio, M., Pittfield, T., Gochfeld, M., 2013. Mercury and selenium levels, and selenium:mercury molar ratios of brain, muscle and other tissues in bluefish (*Pomatomus saltatrix*) from New Jersey, USA. *Sci. Total Environ.* 443, 278-286.

- Campana, O., Sarasquete, C., Blasco, J., 2003. Effect of lead on ALA-D activity, metallothionein levels, and lipid peroxidation in blood, kidney, and liver of the toadfish *Halobatrachus didactylus*. *Ecotox. Environ. Safe.* 55, 116-125.
- Carpené, E., Camatti, A., Isani, G., Cattani, O., Cortesi, P., 1992. Cd-metlothionein in liver and kidney of goldfish (*Carassius auratus*) - effects of temperature and salinity. *Ital. J. Biochem.* 41, 273-282.
- Castro C, Pérez-Jiménez A, Guerreiro I, Peres H, Castro-Cunha M, Oliva-Teles A., 2012. Effects of temperature and dietary protein level on hepatic oxidative status of Senegalese sole juveniles (*Solea senegalensis*). *Comp. Biochem. Physiol.* 163A, 372-378.
- Costa, P.M., Neuparth, T.S., Caeiro, S., Lobo, J., Martins, M., Ferreira, A.M., Caetano, M., Vale, C., Ángel DelValls, T., Costa, M.H., 2011. Assessment of the genotoxic potential of contaminated estuarine sediments in fish peripheral blood: Laboratory versus in situ studies. *Environ. Res.* 111, 25-36.
- Costa, P.M., Caeiro, S., Vale, C., DelValls, T.À., Costa, M.H., 2012. Can the integration of multiple biomarkers and sediment geochemistry aid solving the complexity of sediment risk assessment? A case study with a benthic fish. *Environ. Pollut.* 161, 107-120.
- De Boeck, G., Eyckmans, M., Lardon, I., Bobbaers, R., Sinha, A.K., Blust, R., 2010. Metal accumulation and metallothionein induction in the spotted dogfish *Scyliorhinus canicula*. *Comp. Biochem. Physiol.* 155A, 503-508.
- Damiano, S., Papetti, P., Menesatti, P., 2011. Accumulation of heavy metals to assess the health status of swordfish in a comparative analysis of Mediterranean and Atlantic areas. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 1920-1925.
- Fernandes, D., Bebianno, M.J., Porte, C., 2008a. Hepatic levels of metal and metallothioneins in two commercial fish species of the Northern Iberian shelf. *Sci. Total Environ.* 391, 159-167.
- Fernandes, D., Zanuy, S., Bebianno, M.J., Porte, C., 2008b. Chemical and biochemical tools to assess pollution exposure in cultured fish. *Environ. Pollut.* 152, 138-146.
- Fonseca, V.F., França, S., Serafim, A., Company, R., Lopes, B., Bebianno, M.J., Cabral, H.N., 2011. Multi-biomarker responses to estuarine habitat contamination in three fish species: *Dicentrarchus labrax*, *Solea senegalensis* and *Pomatoschistus microps*. *Aquat. Toxicol.* 102, 216-227.
- Galindo, M.D., Jurado, J.A., Garcia, M., de Canales, M.L.G., Oliva, M., López, F., Granado, M.D., Espada, E., 2012. Trace metal accumulation in tissues of sole (*Solea senegalensis*) and the relationships with the abiotic environment. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 92, 1072-1092.
- Ghedira, J., Jebali, J., Bouraoui, Z., Banni, M., Guerbej, H., Boussetta, H., 2010. Metallothionein and metal levels in liver, gills and kidney of *Sparus aurata* exposed to sublethal doses of cadmium and copper. *Fish Physiol. Biochem.* 36, 101-107.
- Guinot, D., Ureña, R., Pastor, A., Varó, I., Ramo, J., Torreblanca, A., 2012. Long-term effect of temperature on bioaccumulation of dietary metals and metallothionein induction in *Sparus aurata*. *Chemosphere* 87, 1215-1221.
- Hauser-Davis, R.A., Bastos, F.F., Tuton, B., Chávez Rocha, R., Pierre, T.S., Ziolli, R.L., Arruda, M.A.Z., 2014. Bile and liver metallothionein behaviour in copper-exposed fish. *J. Trace Elem. Med Biol.* 28, 70-74.
- Huang, Z.Y., Zhang, Q., Chen, J., Zhuang, Z.X., Wang, X.R., 2007. Bioaccumulation of metals and induction of metallothioneins in selected tissues of common carp (*Cyprinus carpio* L.) co-exposed to cadmium, mercury and lead. *Appl. Organomet. Chem.* 21, 101-101-107.
- Ibarz, A., Blasco, J., Gallardo, M.A., Fernandez-Borras, J., 2010. Energy reserves and metabolic status affect the acclimation of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) to cold. *Comp. Biochem. Physiol.* 155A, 319-326.
- Imsland, A.K., Foss, A., Conceicao, L.E.C., Dinis, M.T., Delbare, D., Schram, E., Kamstra, A., Rema, P., White, P., 2003. A review of the culture potential of *Solea solea* and *S. senegalensis*. *Rev. Fish Biol. Fish.* 13, 379-407.

- Jebali, J., Sabbagh, M., Banni, M., Kamel, N., Ben-Khedher, S., M'Hamdi, N., Boussetta, H., 2013. Multiple biomarkers of pollution effects in *Solea solea* fish on the Tunisia coastline. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 3812-3821.
- Jeffree, R.A., Warnau, M., Teyszié, J., Markich, S.J., 2006. Comparison of the bioaccumulation from seawater and depuration of heavy metals and radionuclides in the spotted dogfish *Scyliorhinus canicula* (Chondrichthys) and the turbot *Psetta maxima* (Actinopterygii: Teleostei). *Sci. Total Environ.* 368, 839-852.
- Jihen, E.H., Imed, M., Fatima, H., Abdelhamid, K., 2008. Protective effects of selenium (Se) and zinc (Zn) on cadmium (Cd) toxicity in the liver and kidney of the rat: Histology and Cd accumulation. *Food Chem. Toxicol.* 46, 3522-3527.
- Kalman, J., Riba, I., Ángel DelValls, T., Blasco, J., 2010. Comparative toxicity of cadmium in the commercial fish species *Sparus aurata* and *Solea senegalensis*. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 73, 306-311.
- Kamunde, C., MacPhail, R., 2011. Metal-metal interaction of dietary cadmium, copper and zinc in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 74, 658-667.
- Luszczek-Trojnar, E., Drag-Kozak, E., Popek, W., 2013. Lead accumulation and elimination in tissues of Prussian carp, *Carassius gibelio* (Bloch, 1782), after long-term dietary exposure, and depuration periods. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 3122-3132.
- Mieiro, C.L., Bervoets, L., Joosen, S., Blust, R., Duarte, A.C., Pereira, M.E., Pacheco, M., 2011. Metallothioneins failed to reflect mercury external levels of exposure and bioaccumulation in marine fish – Considerations on tissue and species specific responses. *Chemosphere* 85, 114-121.
- Mukherjee, S., Kaviraj, A., 2009. Evaluation of growth and bioaccumulation of cobalt in different tissues of common carp, *Cyprinus carpio* (actinopterygii: cypriniformes: cyprinidae), fed cobalt-supplemented diets. *Acta Ichthyol. Piscat.* 39, 87-93.
- Newairy, A.A., El-Sharaky, A.S., Badreldeen, M.M., Eweda, S.M., Sheweita, S.A., 2007. The hepatoprotective effects of selenium against cadmium toxicity in rats. *Toxicology* 242, 23-30.
- Ng, T.Y., Wood, C.M., 2008. Trophic transfer and dietary toxicity of Cd from the oligochaete to the rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* 87, 47-59.
- Noyes, P.M., McElwee, M.K., Miller, H.D., Clark, B.W., Van Tiem, L.A., Walcott, K.C., Erwin, K.N., Levin, E.D. 2009. The toxicology of climate change: Environmental contaminants in a warming world. *Environ. Int.* 35, 971-986.
- Oliva, M., Vicente, J.J., Gravato, C., Guilhermino, L., Galindo-Riano, M.D., 2012a. Oxidative stress biomarkers in Senegal sole, *Solea senegalensis*, to assess the impact of heavy metal pollution in a Huelva estuary (SW Spain): Seasonal and spatial variation. *Ecotox. Environ. Safe.* 75, 151-162.
- Oliva, M., Perales, J.A., Gravato, C., Guilhermino, L., Galindo-Riano, M.D., 2012b. Biomarkers responses in muscle of Senegal sole (*Solea senegalensis*) from a heavy metals and PAHs polluted estuary. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 2097-2108.
- Olsson, P., Larsson, Å., Haux, C., 1996. Influence of seasonal changes in water temperature on cadmium inducibility of hepatic and renal metallothionein in rainbow trout. *Mar. Environ. Res.* 42, 41-44.
- Rotchell, J.M., Clarke, K.R., Newton, L.C., Bird, D.J., 2001. Hepatic metallothionein as a biomarker for metal contamination: age effects and seasonal variation in European flounders (*Pleuronectes flesus*) from the Severn Estuary and Bristol Channel. *Mar. Environ. Res.* 52, 151-71.
- Ruttikay-Nedecky, B., Nejdil, L., Gumulec, J., Zitka, O., Masarik, M., Eckschlager, T., Stiborova, M., Adam, V., Kizek, R., 2013. The Role of Metallothionein in Oxidative Stress. *Int J Mol Sci*; 14, 6044–6066.
- Sapkota, A., Sapkota, A.R., Kucharski, M., Burke, J., McKenzie, S., Walker, P., Lawrence, R., 2008. Aquaculture practices and potential human health risks: Current knowledge and future priorities. *Environ. Int.* 34, 1215-1226.

- Schram, E., Bierman, S., Teal, L.R., Haenen, O., van de Vis, H., Rijnsdorp, A.D., 2013. Thermal Preference of Juvenile Dover Sole (*Solea solea*) in Relation to Thermal Acclimation and Optimal Growth Temperature. PLoS ONE 8(4): e61357. doi:10.1371/journal.pone.0061357
- Shaikh, Z.A., Blazka, M.E., Endo, T., 1995. Metal transport in cells: cadmium uptake by rat hepatocytes and renal cortical epithelial cells. Environ. Health Perspect. 103, 73–75.
- Siscar, R., Torreblanca, A., Palanques, A., Solé, M., 2013. Metal concentrations and detoxification mechanisms in *Solea solea* and *Solea senegalensis* from NW Mediterranean fishing grounds. Mar. Pollut. Bull. 77, 90-99.
- Siscar, R., Koenig, S., Torreblanca, A., Solé, M., 2014. The role of metallothionein and selenium in metal detoxification in the liver of deep-sea fish from the NW Mediterranean Sea. Sci. Total Environ. 466–467, 898-905.
- Sørmo, E.G., Ciesielski, T.M., Øverjordet, I.B., Lierhagen, S., Eggen, G.S., Berg, T., Jenssen, B.M., 2011. Selenium moderates mercury toxicity in free-ranging freshwater fish. Environ. Sci. Technol. 45, 6561-6566.
- Ureña, R., Peri, S., del Ramo, J., Torreblanca, A., 2007. Metal and metallothionein content in tissues from wild and farmed *Anguilla anguilla* at commercial size. Environ. Int. 33, 532-539.
- Usero, J., Izquierdo, C., Morillo, J., Gracia, I., 2004. Heavy metals in fish (*Solea vulgaris*, *Anguilla anguilla* and *Liza aurata*) from salt marshes on the southern Atlantic coast of Spain. Environ. Int. 29, 949-956.
- Van Cleef-Toedt KA, Kaplan LAE. and Crivello JF., 2001 Killifish metallothionein messenger RNA expression following temperature perturbation and cadmium exposure. Cell. Stress Chaperon. 6, 351–359.
- Wood CM, Farrell AP, Brauner CJ., 2012a. Homeostasis and Toxicology of Essential Metals, Fish Physiology. Vol 31A. Academic Press, pp. 1-520.
- Wood, C.M., Farrell, A.P., Brauner, C.J., 2012b. Homeostasis and Toxicology of Non-Essential Metals, Fish Physiology. Vol. 31B. Academic Press, pp. 1-531.

2. METODOLOGIA

Els exemplars dels peixos utilitzats en els estudis de camp varen ser obtinguts pels membres dels equips dels projectes respectius i el teixits arribaren amb gel sec al Laboratori de la Universitat de València. Els llenguados utilitzats per als tercer estudi procedien de les instal·lacions d'aquicultura de l'empresa Stolt Sea Farm en La Corunya i foren transportats i mantinguts en les Planta de Acuaris del SCSIE de la Universitat de València. Una vegada adaptats a les noves instal·lacions, a quatre dels tancs seleccionats es baixà la temperatura (1°C/dia) fins arribar a 15°C i uns altres es mantingueren a 20°C. Després d'un i 60 dies d'aclimatació es sacrificaren els animals. Els teixits (fetge i ronyó) foren immediatament disseccionats, congelats amb nitrògen líquid i conservats a -80°C. Paràmetres biològics, com el pes total i la mida foren mesurats per a poder obtenir el factor de condició (CF), l'índex hepatosomàtic (HSI) i el coeficient Q10 per al creixement. Totes les manipulacions amb els animals han estat d'acord amb la regulació establerta pel Consell Espanyol d'investigacions Científiques (CSIC) i la Directiva 2010/63/EU.

La determinació metàl·lica es realitzà a partir de 0,2 grams de cada tipus de mostra a analitzar (fetge, ronyó, pinso i aigua). Aquestes mostres es digeriren amb àcid nítric al 65% (Baker) i es mantiniren a temperatura ambient durant tota la nit, per a després sotmetre les mostres a una temperatura de 80°C durant dues hores. Les mostres, una vegada de nou a temperatura ambient, es diluïren amb aigua ultrapura fins un volum final constant. La determinació de la concentració metàl·lica dels distints metalls analitzats es realitzà mitjançant un equip d'espectrofotometria ICP-MS (ELAN DRC-1, Perkin-Elmer Sciex.) en els Serveis Científico Tècnics de la Universitat de Barcelona. Es varen realitzar tres rèpliques per mostra i s'incloueren blancs, així com els digerits de material de referència (DOLT-3 i LUTS-1; national Research Council of Canada, Ottawa). Els nivells de metalls en sediment foren proporcionats pel Dr. Palanques (ICM-CSIC).

Els nivells de metal·lotioneïna (MT) s'ha determinat mitjançant el mètode polarogràfic. Mostres de 0,1 a 0,5 grams foren homogeneïzades en gel amb una Ultra-turrax amb 2,3 mL de tampó Tris-HCl 20 mM i un pH de 8,6, amb 1 mM de DDT (Ditiotretol) i 0,2 mM de PMSF (Fluoruro de fenilmetilsulfonil). Els homogeneïzats foren centrifugats a 30.000 g durant 45 minuts a 4°C, i el sobrenedant obtingut es va transferir a tubs nets que foren sotmesos a temperatures de 80°C durant 10 minuts, amb la finalitat de desnaturalitzar les proteïnes. Després es tornà a centrifugar de nou a 30.000g durant 45 minuts a

4°C, per a precipitar les proteïnes desnaturalitzades i, així recuperar el sobrenedant que conté la MT en la solució, ja que aquesta proteïna és termoestable. La determinació es realitzà mitjançant el mètode de polarografia de Pols Diferencial (PPD) descrit per Bebianno i Langston (1989). S'afegeix una al·líquota de sobrenedant de 25 µL en la cèl·lula polarogràfica que anteriorment contenia 20 mL d'electrolit de suport (clorur d'hexaminocobalt) amb 250 µL de Tritó X-100 a una concentració de 0,025%. La cèl·lula es purga durant dos minuts amb N₂ purificat abans de realitzar cap anàlisi. Posteriorment es mesura la resposta polarogràfica de la mostra durant un escombrat de potencial de -1,38 V fins -1,7 V mitjançant un analitzador model Methrom 757 (VA Computrace, Methrom, Switzerland) en mode SMDE (elèctrode de gotes de mercuri estacionari). La quantificació es realitza utilitzant un mètode d'addicions estàndard amb MT I+II (Sigma), addicionant 250 µL de MT patró amb una concentració de 10 mg/L en aigua destil·lada. El resultat final s'obté de la comparació de les altures de les corbes polarogràfiques de la mostra i les addicions, els resultats s'expressen en µg/g de pes fresc.

Els biomarcadors analitzats foren l'activitat acetilcolinesterasa (AChE), l'activitat lactat deshidrogenasa (LDH) i els nivells de peroxidació lipídica (LP). L'activitat AChE fou mesurada a distintes dilucions segons el teixit. En cada pouet de la microplaca es barregen 25 µL de mostra amb 150 µL de 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoat (DTNB; 270 µM) i després de 2 minuts de preincubació, comença la reacció amb l'adició de 50 µL de substrat d'acetil colina (AsCh) d'acord amb el mètode establert per Ellman et al., (1961). La lectura de la microplaca es realitza a 405 nm durant 5 minuts a 25°C utilitzant un assaig cinètic (Magellan software v6.2) en un lector TECAN Infinite 200. El mètode LDH emprat és el desenvolupat per Vasault (1983), modificat per a microplaca. Una al·líquota de 25 µL de plasma fou barrejada amb 150 µL de NADH (300µM) i 50µL de piruvat (4,5 mM), mesurant l'absorbància després de 3 minuts a 340 nm. Aquesta activitat és expressada en nmol/min/mg de proteïna. La peroxidació lipídica fou determinada utilitzant 200 µL de múscul i brànquia barrejat separatament cada teixit amb 650 µL de 1-metil-2-feniliindol en metanol:acetonitril (1:3) i 150 µL al 37% de HCl. La incubació es realitzà a 45°C durant 40 minuts, la reacció s'atura en gel i es centrifuga a 10.000g durant 10 minuts per a precipitar les proteïnes. L'absorbància és llegida a una longitud d'ona de 595 nm front a una solució estàndard de MDA (1,1,3,4-tetrametoxipropà) tractat de la mateixa manera. Els

nivells de peroxidació lipídica són expressats en nmol MDA/g pes humit. La concentració de proteïna total s'ha determinat pel mètode de Bradford (1976) utilitzant albúmina de sèrum boví com estàndard (BSA 0,1-1 mg/mL).

L'anàlisi estadístic de les dades s'ha realitzat mitjançant el software de IBM SPSS 17. La comprovació de la normalitat de les dades es va fer amb el Test de Kolmogorov-Smirnov, i l'homogeneïtat de la variància mitjançant el Test de Levene. S'han realitzat les transformacions oportunes de les dades en els casos que no es compliren els requisits establerts. S'ha emprat el test ANOVA (amb o sense covariable) d'una o més vies depenent de les dades a comparar i com anàlisi a posteriori el Test de Bonferroni. L'anàlisi de correlacions s'ha realitzat amb tècniques paramètriques com la correlació de Pearson, o per tècniques no paramètriques amb la correlació de Spearman segons les dades a analitzar. També s'han realitzat anàlisis de components principals (PCA) per esbrinar les regles que estableixen l'agrupament de les dades.

3. RESULTATS I DISCUSSIÓ GENERALS

3.1. DIVERSITAT INTERESPECÍFICA EN CONTINGUT I METABOLISME DELS METALLS

Els resultats dels estudis que es presenten han permès esbrinar punts clau del metabolisme de metalls, de l'ecofisiologia i de l'ecotoxicologia de les espècies de peixos estudiades en relació als metalls i d'una forma comparada. La informació obtinguda en els treballs 1 (Siscar et al., 2014a) i 2 (Siscar et al., 2013) ens permet comparar la composició elemental en metalls en teixits d'espècies de peixos que comparteixen el mateix habitat.

Al treball 1, les espècies abissals estudiades no mostren un patró comú d'acumulació de metalls al fetge, aleshores tant la concentració total de metalls com la concentració relativa de cadascun d'ells mostren grans divergències. La figura 9, elaborada a partir de la informació del citat treball, presenta d'una forma resumida aquests valors així com els nivells de MT i Se en el fetge de les diferents espècies. La comparació d'aquests valors amb els publicats per les mateixes espècies, o similars, en zones de l'Atlàntic (Mormede i Davies, 2001; Company et al., 2010; Martins et al., 2006) mostren unes concentracions majors de Hg, les quals estarien en concordança amb els nivells d'aquest metall analitzat en múscul de les mateixes espècies que habiten les zones profundes del Mediterrani (Koenig et al., 2013).

Les diferències interespecífiques en la quantitat de metall acumulat poden explicar-se, al menys en part, pels diferents hàbits d'alimentació que presenten les espècies estudiades (Cartes et al., 2002). A més, algunes d'aquestes espècies presenten un cert grau de mobilitat, tant al llarg de la columna d'aigua, com en l'espai horitzontal, com ja s'ha descrit anteriorment en la introducció, que podria resultar en que encara que les espècies han estat capturades a una mateixa profunditat poden ocupar nínxols diferents. Per altra banda, tampoc, s'ha trobat un patró comú en la composició de metalls entre espècies de la mateixa família, aleshores, no es poden argumentar raons filogenètiques.

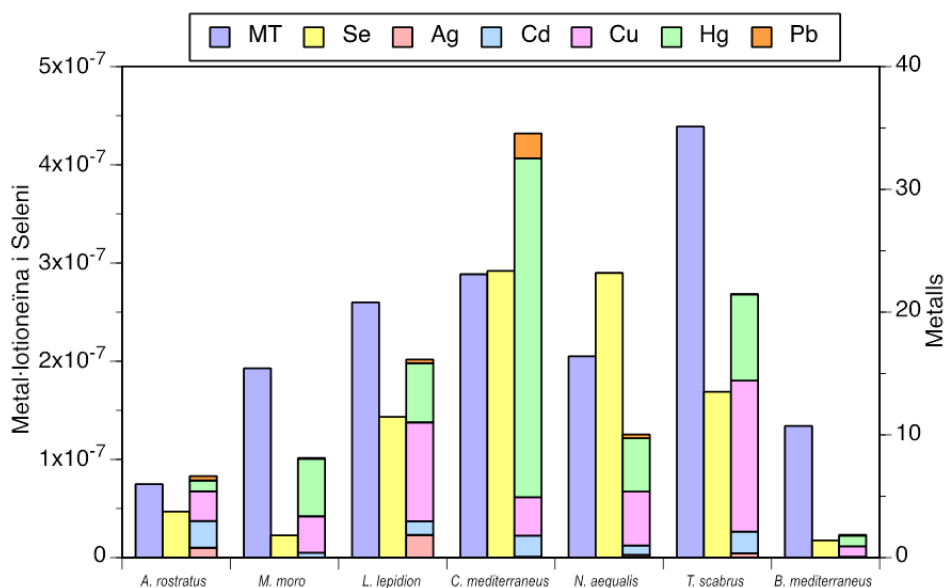


Fig. 9. Gràfic extret a partir de les dades presents en el treball de Siscar et al., 2014a. Les barres violeta indiquen la quantitat de MT (mol/g) i les barres grogues mostren la concentració de Se (mol/g), i les barres amb distints colors mostren la quantitat d'alguns dels metalls analitzats (µg/g). Formen part de la família Macrouridae: *C. mediterraneus*, *T. scabrus* i *N. aequalis*, en canvi *L. lepidion* i *M. moro* pertanyen a la família Moridae.

A l'analitzar conjuntament la concentració de metalls i la quantitat de MT i Se en el fetge de les espècies estudiades (figura 9), es troba com a tendència general que les elevades concentracions de metalls totals es corresponen amb nivells elevats de MT i Se. Malgrat aquest fet, cadascuna de les espècies estudiades sembla utilitzar, preferentment, un o altre mecanisme de protecció front a la toxicitat dels metalls d'acord a les distintes concentracions de MT i Se que presenten els teixits.

Arran de l'anàlisi de biomarcadors s'han trobat diferències en les activitats AChE i LDH mesurades "in vitro" en teixits de diferents espècies de peixos mostrejats en el canó de Blanes. Aquestes diferències poden ser degudes a particularitats en la fisiologia de cadascuna de les espècies. No obstant això, cal destacar que l'activitat AChE en múscul fou major en l'espècie que contenia majors quantitats de metalls en fetge (*C. mediterraneus*). Encara que açò podria entrar en contradicció amb la inhibició d'aquestes activitats per metalls descrit en alguns treballs (Payne et al., 1996; Vieira et al., 2009). Els nostres resultats

recolzarien el fet que es poden acumular concentracions més altes de metalls als teixits augmentat o mantenint l'activitat AChE en aquelles espècies exposades a metalls de forma crònica, com un mecanisme per a compensar la inhibició, tal com va proposar Richetti et al. (2011) per al peix zebra. També és destacable que la relació matemàtica entre les concentracions de Se i l'activitat AChE establerta per l'anàlisi de correlacions no mostra un patró comú, ja que per a l'espècie *M. moro* la correlació obtinguda fou negativa, mentre que, per a *B. mediterraneus* fou positiva. En quant a l'activitat LDH, els nostres resultats no mostren cap relació entre aquesta activitat enzimàtica i la capacitat natatòria específica de l'espècie, a diferència d'allò trobat per altres autors (Drazen i Seibel, 2007; Somero, 2004). Tampoc es troba cap relació filogenètica ni alimentària que condicione aquests resultats.

En el treball 2, també s'ha pogut fer una comparació interespecífica, en quant a l'acumulació de metalls en ronyó, entre les dues espècies de *Solea* estudiades. Els exemplars de les dues espècies del gènere *Solea* mostrejades en la mateixa àrea de la costa Catalana (Garraf) presenten diferències en quant a l'acumulació de metalls en ronyó. Aquestes diferències podrien deure's a la distinta alimentació, ja que mentre *S. solea* s'alimenta principalment de amfípodes, *S. senegalensis* ho fa de poliquets (Vinagre et al., 2006). Per altra banda, atenent a les concentracions de MT i Se al ronyó, l'estatègia de desintoxicació de metalls emprant els dos mecanismes pareix un tret ben conservat dintre del gènere.

Per altra banda en aquest segon treball (Siscar et al., 2013) s'analitzaren els biomarcadors (AChE i LDH) en teixits d'espècies del gènere *Solea*, en distints punts de mostreig de la costa Catalana. Els resultats mostraren diferències entre localitzacions, per a cada teixit estudiat. Els nivells menors d'AChE en branquies foren mesurats en els exemplars de la zona de Costa Brava, cal remarcar que aquests nivells podrien respondre a la presència de contaminants orgànics en la zona (Sole et al., 2013). Arran dels resultats obtinguts sembla que l'activitat LDH en plasma no permet una clara discriminació dels exemplars que viuen en llocs amb distint grau de contaminació química. En canvi, l'anàlisi dels nivells de peroxidació lipídica (LP) en múscul en relació als nivells de MT en ronyó apunten a un dany oxidatiu en el múscul de *S. senegalensis* quan la capacitat segrestadora de metalls per la MT (i altres mecanismes de defensa) es veu superada.

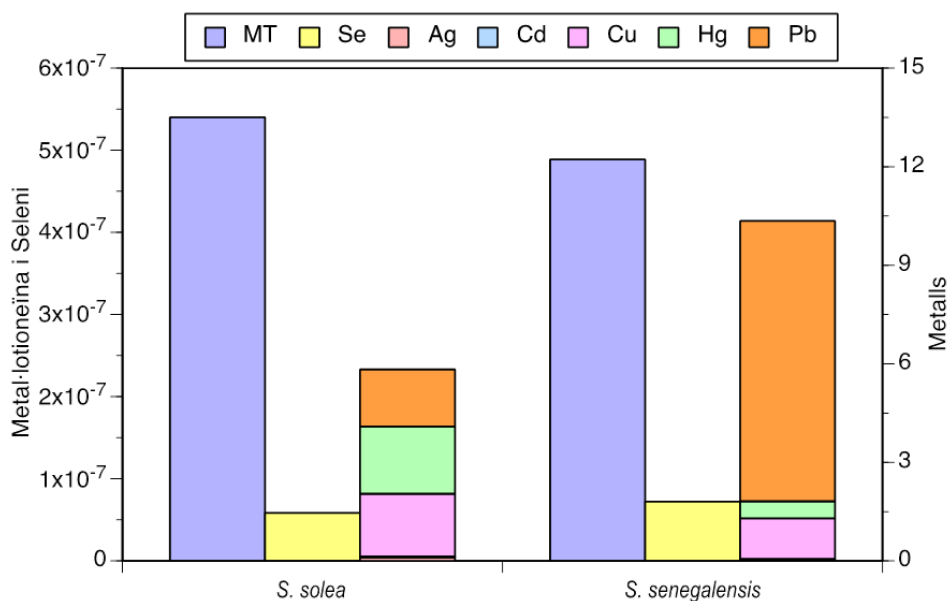


Fig. 10. Figura extreta de les dades del treball de Siscar et al., 2013. El gràfic de barres mostra les concentracions de MT (violeta) i Se (groc) en mol/g. La tercera columna mostra la quantitat dels distints metalls en cada espècie (µg/g).

3.2. L'EFECTE DE LA QUALITAT AMBIENTAL

Tant important com l'alimentació és l'hàbitat en el qual es troben les espècies i el nivell de contaminació metàl·lica de l'àrea d'estudi. Com ja s'ha nomenat anteriorment, les zones profundes de la mar Mediterrània presenten menors nivells de contaminants que les zones més costaneres pel que respecta a sediment (Palanques et al., 2008), però no per això els organismes abissals estan exempts de presentar alts nivells de metalls tòxics en els seus teixits. Així doncs, cal destacar l'elevada concentració de Hg mesurada en el fetge de *C. mediterraneus*, ja que és una de les concentracions més elevades mesurades al fetge en organismes del Mediterrani fins ara descrites.

Per altra banda, les espècies del gènere *Solea* que habiten zones costaneres presenten distints continguts de metalls segons la localització. Com es pot veure a la Figura 11, els nivells de metalls tòxics varien d'uns punts de mostreig a altres. Estudis previs han demostrat que hi ha una corrent marina que es desplaça des de la Mar de Liguria passant pel golf de Lleó cap al sud per la zona costanera Catalana (Rubio, 2006). En analitzar la quantitat de metalls en sediment sí que és evident la major quantitat de metalls d'origen antropogènic (Fig. 11) en les zones

de Garraf i Maresme, i com en allunyar-se d'aquestes zones la quantitat de metalls tòxics es redueix; aleshores sembla que la contaminació queda més retinguda/concentrada en zones costaneres on hi ha nuclis urbans. Encara que no es trobà cap correlació estadísticament significativa entre les concentracions de metalls mesurades en el sediment i els nivells analitzats en el ronyó dels peixos pescats en els diferents llocs de mostreig, sí que s'observa que en els llocs on l'activitat humana i industrial és més intensa, com són les zones de Garraf i Maresme, els nivells de metall en el teixit són majors. Les diferències interespecífiques en composició metàl·lica que s'observen al ronyó (Fig. 11) entre les dues espècies del gènere *Solea* en la zona de Garraf, podria tractar-se, com ja s'ha dit anteriorment, a diferències en l'alimentació o a les característiques del sediment on habiten preferentment cadascuna d'elles (Vinagre et al., 2006).

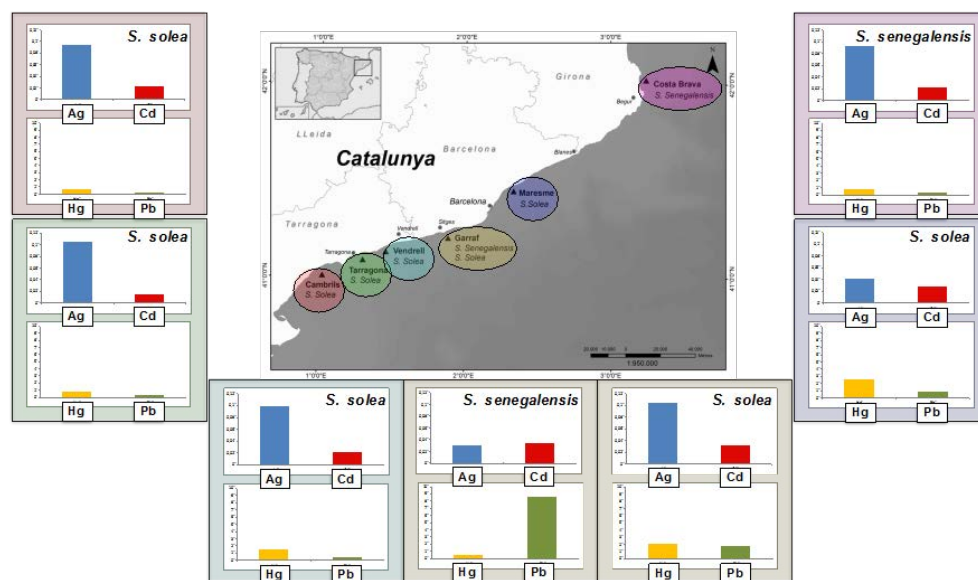


Fig. 11. Mapa de la zona de mostreig. Els gràfics representen els nivells ($\mu\text{g/g}$) d'alguns metalls no essencials (en el ronyó dels peixos de cada àrea per a cadascuna de les espècies estudiades).

3.3. LA DISTRIBUCIÓ DELS METALLS ENTRE FETGE I RONYÓ

Les condicions controlades de l'experiment de laboratori (Siscar et al., 2014b), permeten obtenir informació molt valuosa sobre l'acumulació diferencial dels metalls en el fetge i el ronyó a partir d'una dieta no contaminada. La figura 12 representa quantitativament a través de les superfícies de les figures el grau d'acumulació dels metalls des de l'aliment, en el fetge i el ronyó.

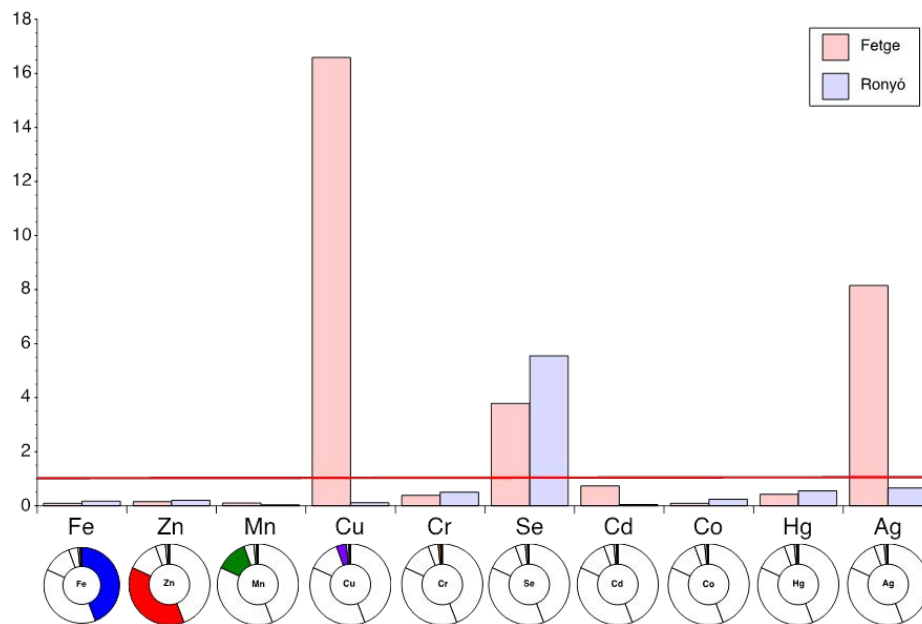


Fig.12. Representació del factor de bioacumulació (BAF) en els dos teixits estudiats en el treball Siscar et al., 2014b. El gràfic de barres representa la BAF en fetge i ronyó. Els gràfics circulars mostren la proporció de cada metall respecte a la quantitat total de metalls mesurada en el pinso.

Com es pot apreciar a la figura 12 el pinso extrusionat comercial (pellets) conté diferent proporció de cadascun dels metalls (gràfics circulars). Una fracció del metall contingut en el pinso acabarà formant part dels teixits analitzats (gràfic de barres). Hi ha metalls (Ag i Cu) que són incorporats als teixits en major concentració que els presents en la dieta. El mateix podem dir del Se. Cal destacar que els metalls se solen distribuir de forma diferencial entre el fetge i el ronyó. En el cas de *S. senegalensis* metalls com la Ag, el Cd, el Cu i el Mn s'emmagatzemen preferencialment en el fetge, per contra altres metalls com són el Co, el Cr, el Fe, el Hg, el Se i el Zn els trobem principalment en el ronyó.

3.4. L'EFECTE DE LA TEMPERATURA

La importància de la temperatura, com un dels factors abiòtics, sobre el metabolisme de metalls en *S. senegalensis* es poguè avaluar a partir de l'estudi presentat en Siscar et al., 2014b. Per una banda, es va veure que l'aclimatació a una temperatura 5 °C més baixa modificava l'acumulació de certs metalls (Co, Cr, Zn, Cd i Cu) en els dos teixits estudiats. Cal indicar que aquest efecte comportava, en ocasions, que la distribució d'un metall particular entre el fetge i el ronyó variara de forma que, al baixar la temperatura augmenta la concentració del metall (Co, Cr, Cu i Fe) en el ronyó en relació a la concentració del mateix en fetge, indicant una lleugera mobilització de metalls des del fetge cap al ronyó. Aquest fet es de gran interès en l'estudi del potencial efecte del calentament global sobre la incorporació de metalls tòxics pels peixos. A diferència d'alguns treballs anteriors, que havien demostrat un augment d'acumulació de Hg als teixits en augmentar la temperatura d'aclimatació en algunes espècies de peixos marins i d'aigua dolça (Guinot et al 2012; Dijkstra et al 2014), en *S. senegalensis* no s'ha trobat cap efecte significatiu de la temperatura d'aclimatació sobre la acumulació de Hg ni al ronyó ni al fetge. Arjona et al. (2010) descrigueren en *S. senegalensis* alguns mecanismes d'aclimatació que podrien ser els responsables de compensar l'augment del metabolisme que es produeix amb la temperatura, la qual cosa explicaria aquesta manca de resposta a la temperatura en l'acumulació de Hg als teixits analitzats.

3.5. MECANISMES DE DESINTOXICACIÓ DE METALLS

La proporció relativa de MT i Se en els teixits de les espècies en els tres treballs presentats en ha permès estimar la potencial protecció que la MT i el Se ofereixen front a la toxicitat dels metalls a través de l'anàlisi de les correlacions i amb el càlcul dels ràtios molars entre aquestes substàncies i els metalls considerats. Les majors concentracions de MT en el fetge d'espècies abissals es varen trobar en *T. scabrus* i *C. mediterraneus*, com es pot veure en la figura 9. Es varen trobar correlacions significatives entre aquesta proteïna i metalls com la Ag, el Cu i el Cd, però no amb el Hg, la qual cosa indicaria que algun mecanisme de desintoxicació alternatiu a la MT podria estar present per tal de permetre elevades concentracions de Hg en els teixits sense provocar efectes tòxics que afectarien la salut de l'organisme. Aleshores les correlacions molt significatives

observades entre el Se i el Hg corroboren la importància del Se per a fer front a la toxicitat del Hg (Fig. 13).

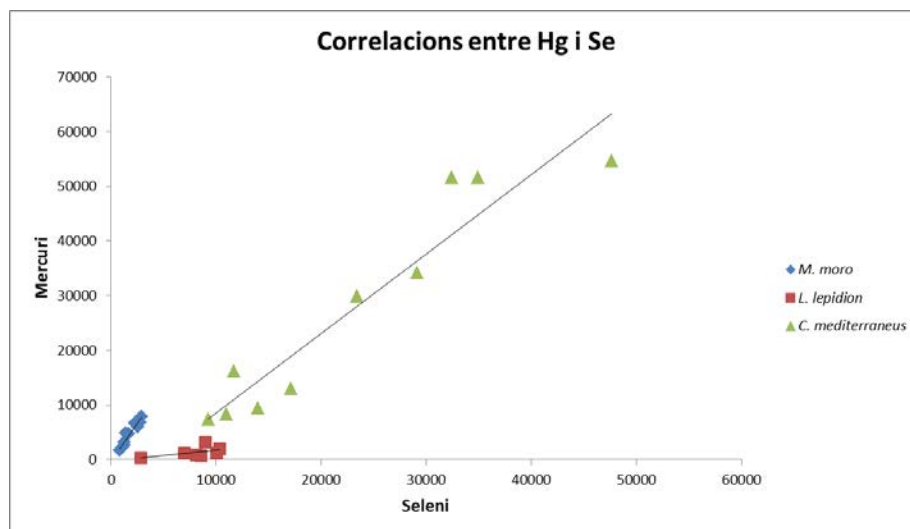


Fig.13. El gràfic mostra la correlació entre el contingut de Hg i el de Se (ng/g pes fresc) en tres de les espècies abissals estudiades (*M. moro* $r=0.96$; *L. lepidion* $r=0.98$; *C. mediterraneus* $r=0.95$).

Correlacions semblants a les anteriorment descrites per els peixos abissals es varen també trobar en el ronyó dels exemplars de les espècies del gènere *Solea*, destacant l'existència d'una correlació positiva significativa entre la MT i el Hg. Aleshores, per a aquestes dues espècies bentòniques, la MT és important per a la protecció front al Hg, tot i que per a *S. senegalensis* els nivells de significància de les correlacions són majors que per a *S. solea*. Això pot deure's a un major gradient de contaminació en els indrets on *S. senegalensis* fou mostrejada.

Cal destacar en l'estudi de laboratori amb *S. senegalensis* (Siscar et al., 2014b) que la concentració total de MT al fetge es veu influïda pels canvi de temperatura, però no passa el mateix amb la quantitat de MT al ronyó. La qual cosa podria indicar que la síntesi de MT està regulada per la temperatura de forma diferent en aquests dos teixits.

És interessant considerar l'efecte de la temperatura sobre el conjunt de mecanismes desintoxicadors en *S. senegalensis*. L'aclimatació a una baixada de temperatura de 5°C comporta disminucions del contingut de MT en fetge que

són com a molt d'un 30% en contrast amb els grans augments (600%) que es produeixen en les activitats d'alguns enzims de biotransformació com a conseqüència de les mateixes condicions d'aclimatació (Solé et al., 2014).

Donat el paper del Se en el metabolisme i la desintoxicació de diversos metalls al fetge de les espècies abissals, suggerit pels resultats del primer treball (Siscar et al., 2014a), es va considerar també oportú incloure l'estudi del paper d'aquest metal·loide en el metabolisme i desintoxicació de metalls no essencials en els següents treballs.

Respecte a l'estudi de camp (Siscar et al., 2013) amb *S. solea* i *S. senegalensis*, s'observà una major quantitat de Se en el ronyó de les espècies que habitaven les zones més contaminades i que presentaven majors concentracions de metalls, la qual cosa apuntà a un important paper del Se en la desintoxicació dels metalls també en aquestes dues espècies. A més, el contingut de Se, a més d'estar correlacionat amb la quantitat de Hg també es veia relacionat matemàticament amb les concentracions d'altres metalls tòxics com el Cd.

Quan s'analitzaren els nivells de Se tant en el ronyó com en el fetge de *S. senegalensis* sota condicions de laboratori (Siscar et al., 2014b), els nivells de Se eren majors en ronyó, a més de presentar una elevada bioacumulació d'aquest metall des de l'aliment (Fig. 12). L'estudi de camp anteriorment esmentat (Siscar et al., 2013) indica que el Se es troba en major concentració en els exemplars que habiten zones més contaminades per metalls, i segons el treball de laboratori (Siscar et al., 2014b) s'emmagatzema preferentment en el ronyó d'aquestes espècies. La importància del Se no es centra sols en la protecció que confereix front als efectes nocius del Hg, sino a la protecció que també pot conferir front als efectes d'altres metalls tòxics. Per a poder afirmar açò amb més rotunditat caldria realitzar més estudis toxicològics i moleculars per a veure la relació i interacció entre el Se i altres metalls a nivell cel·lular i molecular.

El càlcul dels ràtios molars entre la MT o el Se amb altres metalls, individualment o amb la seva suma, ha sigut de gran ajuda per a quantificar la capacitat protectora d'aquests dos mecanismes en relació als metalls. En els tres treballs publicats, els ràtios han estat sempre majors a 1 que, d'acord amb la bibliografia comentada (Burguer et al., 2013), indiquen una bona capacitat protectora front als metalls tòxics.

En les dues espècies de llenguado, *S. solea* i *S. senegalensis*, els ràtios varien segons les distintes àrees de mostreig, sent sempre major el ràtio entre MT i el sumatori de metalls en les zones més contaminades, és a dir, on s'han detectat més metalls en ronyó (Maresme i Garraf). Aquestes dades indicarien un increment en la síntesi de MT, el qual es produeix en excés respecte a les concentracions de metalls als teixits.

En l'experiment de laboratori amb *S. senegalensis* (Siscar et al., 2014b) els ràtios MT:metall i Se:metall determinats són en general molt majors en ronyó que en fetge. Això indicaria que en aquesta espècie i sota condicions d'exposició a la concentració de metalls presents en una dieta comercial, el ronyó presenta una major capacitat desintoxicadora de metalls respecte al fetge, mitjançant el grest dels metalls per unió a MT o Se.

Pel que fa als ràtios calculats entre el Se i altres metalls, tant per als peixos de gran fondària com per a les dues espècies del gènere *Solea*, aquests ràtios ens indiquen que sempre hi ha Se en excés en el fetge, encara que de manera diferencial segons l'espècie. Per altra banda, els valors dels BAF obtinguts en el treball de laboratori en *S. senegalensis* han mostrat una elevada capacitat del fetge i el ronyó d'adquirir i acumular Se des de l'aliment (3,79 pel fetge i 5,55 pel ronyó) (Fig. 12), capacitat que no pareix veure's afectada per la temperatura d'aclimatació.

Quan comparem els nivells de Se en ronyó i la relació Se:Hg en *S. senegalensis* dels treballs de Siscar et al. (2013, 2014b), es pot veure com el contingut de Se en els animals mostrejats a la costa mediterrània és major respecte als exemplars utilitzats en el treball de laboratori, i aço coincideix amb una major presència de Hg en els organismes silvestres.

En totes les espècies estudiades s'ha pogut comprovar que aquests dos mecanismes protectors han estat presents, però cada espècie podria utilitzar preferentment un dels dos. L'aclimatació a la temperatura més baixa a la que s'ha sotmès *S. senegalensis* sols pareix modular la desintoxicació de metalls mitjançant la MT ja que la quantitat de Se no es veu modificada per l'aclimatació.

El tres estudis recolzen el paper de la MT i el Se com a mecanismes protectors front als metalls tòxics en peixos marins, sent el metabolisme metàl·lic una característica específica de cada espècie. Cal destacar també que el Zn s'ha proposat, a vegades, com un agent protector front a la toxicitat d'altres metalls.

La composició metal·lica i de MT determinada en exemplars d' *A. rostratus* pareix apuntar en eixe sentit, però per tal d'aprofundir en aquest aspecte caldria realitzar més estudis.

En general els resultats observats en Solea recolzen l'ús d'espècies d'aquest gènere per a estudis de monitorització de contaminació marina per metalls. Tant el fetge com el ronyó han mostrat la seva capacitat emmagatzemadora del metalls, sent ambdós igual vàlids. No obstant això, el fet que la temperatura afecte els nivells de MT en el fetge fa necessari tindre en compte la influència dels canvis estacionals sobre aquest paràmetre.

4. CONCLUSIONS

1. Existeix una gran diversitat en el contingut metàl·lic total i en el contingut de cadascun dels metalls analitzats en el fetge de les espècies de peixos abissals capturats al canó de Blanes. Aquestes diferències poden estar determinades pels hàbits alimenticis i per la fisiologia pròpia de cadascuna de les espècies, no havent-se trobat cap patró comú d'acumulació dels metalls entre les espècies que pertanyen a la mateixa família.
2. Les altes concentracions de mercuri en el fetge del peixos abissals capturats al canó de Blanes en comparació amb peixos de les mateixes especies de l'oceà Atlàntic són indicatives d'una elevada concentració per mercuri dels animals que habiten sistemes abissals en el Mediterrani.
3. El fet que les concentracions de metal·lotioneïna i seleni siguin concomitants a l'abundància de metalls com el mercuri, el cadmi i l'argent en el fetge dels peixos abissals i en el ronyó i en el fetge de *S. senegalensis* i *S. solea* és indicativa d'un paper important d'aquestes substàncies com a mecanismes de desintoxicació.
4. La metal·lotioneïna i el seleni es troben en el fetge dels peixos de les grans fondaries del canó de Blanes en quantitats relatives superiors a la concentració del metalls (ràtios superiors a 1) la qual cosa representa una capacitat protectora de reserva front a la toxicitat per metalls.
5. *S. senegalensis* presenta una intensa incorporació i emmagatzemament de seleni des de la dieta tant en el fetge com en el ronyó, que pot contribuir a la protecció front a la toxicitat de alguns metalls no essencials.
6. La temperatura d'aclimatació modifica la concentració de metalls en el fetge i en el ronyó de *Solea senegalensis*. Una temperatura elevada promou l'acumulació de cobalt, crom, coure i ferro en el ronyó respecte del fetge, la qual cosa podria facilitar-ne l'excreció per via urinària.
7. L'aclimatació a la variació de temperatura té una influència moderada sobre les concentracions de metal·lotioneïna al fetge i aquesta és menys evident en el ronyó de *S. senegalensis*.
8. La capacitat d'acumulació de metalls pel ronyó de *S. solea* i *S. senegalensis*, a partir de baixos nivells ambientals, donaria suport a la utilitat d'aquest òrgan en estudis de contaminació per metalls, en zones on els nivells de contaminants són baixos o moderats.
9. Malgrat les limitacions dels estudis de camp, l'anàlisi dels teixits implicats en detoxicació permet obtenir informació molt valuosa respecte al metabolisme de metalls i els seus sistemes d'eliminació.
10. Malgrat petites diferències específiques, tant *S. solea* com *S. senegalensis* són adequades pels estudis de contaminació metàl·lica en zones costaneres.

5. BIBLIOGRAFIA

- Barbier, O., Jacquillet, G., Tauc, M., Cougnon, M., Poujeol, P., 2005. Effect of heavy metals on, and handling by, the kidney. *Nephron Physiol.* 99, 105-110.
- Bebianno, M.J., Santos, C., Canário, J., Gouveia, N., Sena-Carvalho, D., Vale, C., 2007 Hg and metallothionein-like proteins in the black scabbardfish *Aphanopus carbo*. *Food Chem. Toxicol.* 45,1443-52.
- Berry, M.J., Ralston, N.V.C., 2008 Mercury Toxicity and the Mitigating Role of Selenium. *EcoHealth* 5,456-9.
- Beijer, K., Jernelöv, A., 1978. Ecological aspects of mercury-selenium interactions in the marine environment. *Environ. Health Perspect.* 25, 43-45.
- Branco, V., Canário, J., Lu, J., Holmgren, A., Carvalho, C., 2012. Mercury and selenium interaction in vivo: Effects on thioredoxin reductase and glutathione peroxidase. *Free Radical Biol. Med.* 52,781-793.
- Bremner, I., Mehra, R.K., Morrison, J.N., Wood, A.N., 1986. Effects of dietary copper supplementation of rats on the occurrence of metallothionein-I in liver and its secretion into blood, bile and urine. *Biochem. J.* 235, 735-739.
- Burger, J., Jeitner, C., Donio, M., Pittfield, T., Gochfeld, M., 2013. Mercury and selenium levels, and selenium:mercury molar ratios of brain, muscle and other tissues in bluefish (*Pomatomus saltatrix*) from New Jersey, USA. *Sci. Total Environ.* 443, 278-286.
- Cassarett and Doull's, 2013. Toxicology, the basic science of poisons. Ed. Curtis and Klassen. 8th edition.
- Carrassón, M., Matallanas, J., Casadevall, M., 1997. Feeding strategies of deep-water morids on the western Mediterranean slope. *Deep-Sea Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.* 44, 1685-1699.
- Carrason, M., Matallanas, J., 1998. Hábitos alimentarios de *Alepocephalus rostratus* en el Mediterráneo occidental. *J.Biol.* 78, 1295-1306.
- Cartes, J.E., Abello, P., Lloris, D., Carbonell, A., Torres, P., Maynou, F., de Sola, L.G., 2002. Feeding guilds of western Mediterranean demersal fish and crustaceans: an analysis based on a spring survey. *Sci. Mar.* 66,209-20.
- Cohen, D.M., 1986. Moridae. En: Whitehead, P.J.P., Bauchot, M.-L., Hureau, J.-C., Nielsen, J., Tortonese, E., eds. Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean, Vol. II, UNESCO, Paris, pp. 713–723.
- Cohen, D.M., Inada, T., Iwamoto, T., Scialabba, N., 1990. Gadiform fishes of the world. An annotated and illustrated catalogue of cods, hakes, grenadiers and other gadiform fishes known to date. In: FAO species catalogue. Vol. 10. FAO fish. Synop. 125 (10), 442.
- Cosson, R.P., 1994. Metallothionein Induction in the Liver of Carp after Contamination by Silver, Cadmium and Mercury Following or not Pretreatment by Zinc. *Biometals* 7,9-19.
- Costa, P.M., Caeiro, S., Vale, C., DelValls, T.À., Costa, M.H., 2012. Can the integration of multiple biomarkers and sediment geochemistry aid solving the complexity of sediment risk assessment? A case study with a benthic fish. *Environ. Pollut.* 161, 107-120.
- Creti, P., Trinchella, F., Scudeiro, R., 2010. Heavy metal bioaccumulation and metallothionein content in tissues of the sea bream *Sparus aurata* from three different fish farming systems. *Environ. Monit. Assess.* 165, 321-329.

- Dabrowska, H., Fisher, S.W., Dabrowski, K., Staubus, A.E., 1996. Dietary uptake efficiency of HCBP in Channel Catfish: the effect of fish contaminant body burden. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 746-749.
- Damiano, S., Papetti, P., Menesatti, P., 2011. Accumulation of heavy metals to assess the health status of swordfish in a comparative analysis of Mediterranean and Atlantic areas. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 1920-1925.
- Drent, M., Cobben, N.A.M., Henderson, R.F., Wouters, E.F.M., van Dieijen-Visse, M., 1996. Usefulness of lactate dehydrogenase and its isoenzymes as indicators of lung damage or inflammation. *Eur. Respir. J.* 9, 1736-1742.
- Dijkstra, J.A., Bucman, K.J., Ward, D., Evans, D. W., Dionne, M., Chen, C. Y., 2013. Experimental and natural warming elevates mercury concentrations in estuarine fish. *PLoS one.* 8, issue 3.
- Dinis, M.T., Ribeiro, L., Soares, F., Sarasquete, C., 1999. A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal. *Aquaculture.* 176, 27-38.
- Drazen, J.C., Seibel, B.A. 2007. Depth-related trends in metabolism of benthic and benthopelagic deep-sea fishes. *Limnol. Oceanogr.* 52,2306-16.
- Endo, T., Haraguchi, K., Sakata, M., 2002. Mercury and selenium concentrations in the internal organs of toothed whales and dolphins marketed for human consumption in Japan. *Sci. Total Environ.* 300,15-22.
- Geistdoerfer, P., 1986. Macrouridae. Fishes of the north-eastern Atlantic and the Mediterranean. Vol. 2. Paris: UNESCO. 644–676.
- Geistdoerfer, P., 1990. Macrouridae. Check-list of the fishes of the eastern Atlantic. En: Quero, J.C., Hureau, J.C., Karrer, C., Post, A., and Saldanha, L., Eds., Paris: UNESCO, 1990, vol. 2, pp. 541–563
- Gitay, H., Suárez, A., Watso, R.T., Dokken, D.J., 2002. Cambio climático y biodiversidad. En: Grupo Intergubernamental de expertos sobre el cambio climático (IPCC). <https://www.ipcc.ch/pdf/technical-papers/climate-changes-biodiversity-sp.pdf>
- Gomez-Gutiérrez, a., Garnacho, E., Bayona, J. M., Albaigés, J. 2007. Assesment of Mediterranean sediments contamination by persistent organic pollutants. *Environ. Pollut.* 148, 396-408.
- Guinot, D., Ureña, R., Pastor, A., Varó, I., del Ramo, J., Torreblanca, A., 2012. Long-term effect of temperature on bioaccumulation of dietary metals and metallothionein induction in *Sparus aurata*. *Chemosphere.* 87, 1252-1221.
- Henry, F., Filipuci, I., Billon, G., Courcot, L., Kerambrun, E., Amara, R., 2012. Metal concentrations, growth and condition indices in European juvenile flounder (*Platichthys flesus*) relative to sediment contamination levels in four Eastern English Channel estuaries. *J. Environ. Monit.* 14, 3211-3219.
- Hogstrand. 2012. Zinc. En: Homeostasis and Toxicology of Essential Metals (Wood, C.M., Farrell, A.P. i Brauner, C.J. eds), *Fish Physiology Volume 31A.* 136-184. Academic Press
- Horowitz, H.M., Jacob, D.J., Amos, H.M., Streets, D.G., Sunderland, E.M., 2014. Historical mercury releases from commercial products: global environmental implications. *Environ. Sci. Technol.* 48, 10242-10250.
- Ikemoto, T., Kunito, T., Tanaka, H., Baba, N., Miyazaki, N., Tanabe, S., 2004. Detoxification Mechanism of Heavy Metals in Marine Mammals and Seabirds: Interaction of Selenium with Mercury, Silver, Cooper, Zinc and Cadmium in liver. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 47:402.

- Imslund, A.K., Foss, A., Conceicao, L.E.C., Dinis, M.T., Delbare, D., Schram, E., Kamstra, A., Rema, P., White, P., 2003. A review of the culture potential of *Solea solea* and *S. senegalensis*. *Rev. Fish. Biol. Fish.* 13, 379-407.
- Iwamoto, T., Ungaro, N., 2002. A new grenadier (Gadiformes, Macrouridae) from the Mediterranean. *Cybiurn* 26(1), 27-32.
- Hogstrand. 2012. Zinc. En: Homeostasis and Toxicology of Essential Metals (Wood, C.M., Farrell, A.P.i Brauner, C.J. eds), *Fish Physiology Volume 31A*. 136-184. Academic Press
- Janz, A.M. 2012. Selenium. En: Homeostasis and Toxicology of Essential Metals (Wood, C.M., Farrell, A.P.i Brauner, C.J. eds), *Fish Physiology.31A*. 329-364. Academic Press
- Jihen, E.H., Imed, M., Fatima, H., Abdelhamid, K., 2008. Protective effects of selenium (Se) and zinc (Zn) on cadmium (Cd) toxicity in the liver and kidney of the rat: Histology and Cd accumulation. *Food Chem. Toxicol.* 46, 3522-3527.
- Jihen, E.H., Imed, M., Fatima, H., Abdelhamid, K., 2009. Protective effects of selenium (Se) and zinc (Zn) on cadmium (Cd) toxicity in the liver of the rat: Effects on the oxidative stress. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72,1559-64.
- Kalman, J., Riba, I., DelValls, A.T., Blasco, J., 2010. Comparative toxicity of cadmium in the commercial fish species *Sparus aurata* and *Solea senegalensis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 306-311.
- Khan, M.A.K., Wang, F., 2009. Mercury-selenium compounds and their toxicological significance: Toward a molecular understanding of the mercury-selenium antagonism. *Environ. Toxicol. Chem.* 28,1567-77.
- Kidd, K., Batchelar, K. Mercury. En: Homeostasis and Toxicology of non-Essential Metals (Wood, C.M., Farrell, A.P.i Brauner, C.J. eds), *Fish Physiology Volume 31B*, 238-284. Academic Press.,
- Koenig, S., Solé, M., Fernández-Gomez, C., Dáez, S., 2013. New insights into mercury bioaccumulation in deep-sea organisms from the NW Mediterranean and their human health implications. *Sci. Total Environ.* 442, 329-335.
- Kress, N., Hornung, H., Herut, B., 1998. Concentrations of Hg, Cd, Cu, Zn, Fe and Mn in deep sea benthic fauna from the southeastern Mediterranean sea: A comparison study between fauna collected at a pristine area and at two waste disposal sites. *Mar. Pollut. Bull.* 36, 911-921.
- Lamborg, C.H., Hammerchmidt, C.R., Bowman, K.L., Swarr, G.J., Munson, K.M., Ohnemus, D.C., Lam, P.I., Heimbürger, L., Rijkenberg, M.J.a., Saito, M.A., 2014. A global ocean inventory of anthropogenic mercury based on water column measurements. *Nature.* 512, 65-68.
- Livingstone, D.R., 2001. Contaminant-stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 656-666.
- Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat.Toxicol.* 101, 13-30.
- Nemcsök, J., Benedeczky, I., 1995. Pesticide metabolism and the adverse effects of metabolites on fishes, En: P.W. Hochachka and T.P. Mommsen, Eds, *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, Elsevier, 5, 313-348
- Newairy, A.A., El-Sharaky, A.S., Badreldeen, M.M., Eweda, S.M., Sheweita, S.A., 2007. The hepatoprotective effects of selenium against cadmium toxicity in rats. *Toxicology* 242,23-30.
- Nielsen, F.H., 2000. Evolutionary events culminating in specific minerals becoming essential for life. *Eur. J. Nutr.* 39, 62-66.

- Noyes, P.D., McElwee, M.K., Miller, H.D., Clark, B.W., Van Tiem, L.A., Walcott, K.C., Erwin, K.N., Levin, E.D., 2009. The toxicology of climate change: Environmental contaminants in warning world. *Environ. Int.* 35,971-986.
- Macpherson, E., Roel, B. A., 1987. Trophic relationships in the demersal fish community of Namibia. *S. Afr. J. Mar. Sc.* 5, 585-596.
- Maher, W., Roach, A., Doblin, M., Fan, T., Foster, S., Garrett, R., Möller, G., Oram, L., Wallschläger, D., 2010. Environmental sources, speciation, and partitioning of selenium. In: Chapman, P.M., Adams, William J., Brooks, Marjorie L., Delos, Charles G., Luoma, Samuel N., Maher, William A., Ohlendorf, Harry M., Presser, Theresa S., Shaw, D. Patrick (Eds.), *Ecological Assessment of Selenium in the Aquatic Environment*. CRC Press, pp. 47–92.
- McCarthy, J.F., Shugart, L.R., 1990. Biomarkers of environmental contamination. Lewis Publishers, 10-25.
- Morales-Nin, B., Massutí, E., Stefanescu, C., 1996. Distribution and biology of *Alepocephalus rostratus* from the Mediterranean sea. *J. Fish Biol.* 48, 1097 -1112.
- Moyes, C.D., Schulte, P.M., 2007. *Principios de fisiología animal*. 1ª ed. Pearson/Addison Wesley.
- Palanques, A., Masqué, P., Puig, P., Sanchez-Cabeza, J.A., Frignani, M., Alvisi, F., 2008. Anthropogenic trace metals in the sedimentary record of the Llobregat continental shelf and adjacent Foix Submarine Canyon (northwestern Mediterranean). *Mar. Geol.* 248, 213-227.
- d'Onghia, G., Lloris, D., Sion, L., Capezzuto, F., Labropoulou, M., 2004. Observations on the distribution, population structure and biology of *Bathypterois mediterraneus* (Bauchot, 1962) in three areas of the Mediterranean Sea. *Sci. Mar.* 68, 53.
- Ostertag, S., Shaw, A.C., Basu, N., Chan, H., 2014. Molecular and neurochemical biomarkers in Arctic beluga whales (*Delphinapterus leucas*) were correlated to brain mercury and selenium concentrations. *Environ. Sci. Technol.* 48 (19), 11551-11559
- Payne, J.F., Mathieu, A., Melvin, W., Fancey, L.L., 1996. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Mar. Pollut. Bull.* 32, 225-231.
- Perry, S. F., and Wood, C. M. (1985). Kinetics of branchial calcium uptake in the rainbow trout: effects of acclimation to various external calcium levels. *J. Exp. Biol.* 116, 411–433.
- Raymond, L.J., Ralston, N.V.C., 2009. Selenium's importance in regulatory issues regarding mercury. *Fuel Process Technol.* 90, 1333-1338.
- Ribocco, C., Hardiman, G., Sasik, R., Vittori, S., Carnevali, O., 2012. Teleost fish (*Solea solea*): A novel model for ecotoxicological assay of contaminated sediments. *Aquat. Toxicol.* 109, 133-142.
- Roesijadi, G., 1996. Metallothionein and its role in toxic metal regulation. *Comp. Biochem. Physiol.* 133C(2),117-123.
- Ruttkey-Nedecky, B., Nejdil, L., Gumulec, J., Zitka, O., Masarik, M., Eckschlager, T., Stiborova, M., Adam, V., Kizek, R., 2013. The role of metallothionein in oxidative stress. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 6044-6066.
- Serafim, M.A., Company, R.M., Bebianno, M.J., Langston, W.J., 2002. Effect of temperature and size on metallothionein synthesis in the gill of *Mytilus galloprovincialis* exposed to cadmium. *Mar. Environ. Res.* 54, 361-365.

- Siscar, R., Torreblanca, A., Palanques, A., Solé, M. 2013. Metal concentrations and detoxification mechanisms in *Solea solea* and *Solea senegalensis* from NW Mediterranean fishing grounds, Mar. Pollut. Bull.77, 90-99,
- Siscar, R., Koenig, S., Torreblanca, A., Solé, M., 2014a. The role of metallothionein and selenium in metal detoxification in the liver of deep-sea fish from the NW Mediterranean Sea. Sci. Total Environ. 467, 898-905.
- Siscar, R., Torreblanca, A., del Ramo, J.J., Solé, M. 2014b. Modulation of metallothionein and metal partitioning in liver and kidney of *Solea senegalensis* after long-term acclimation to two environmental temperatures. Environ. Res.132, 197-205
- Solé, M., Manzanera, M., Bartolomé, A., Tort, L., Caixach, J., 2013. Persistent organic pollutants (POPs) in sediments from fishing grounds in the NW Mediterranean: Ecotoxicological implications for the benthic fish *Solea* sp. Mar. Pollut. Bull. 67, 158-165.
- Solé, M I. Varó, González-Mira, A. Torreblanca, A. 2015. Xenobiotic metabolism modulation after long-term temperature acclimation in juveniles of *Solea senegalensis*. Mar. Biol. En prensa.
- Somero, G.N. 2004. Adaptation of enzymes to temperature: searching for basic "strategies". Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 139, 321-333.
- Sørmo, E.G., Ciesielski, T.M., Øverjorde, I.B., Lierhagen, S., Eggen, G.S., Berg, T., Jenssen, B.M., 2011. Selenium moderates mercury toxicity in free-ranging freshwater fish. Environ. Sci. Technol. 45, 6561-6566.
- Tecchio, S., Coll, M., Christensen, V., Company, J.B., Ramírez-Llodra, E., Sardá, F., 2013. Food web structure and vulnerability of a deep-sea ecosystem in the NW Mediterranean Sea. Deep-Sea Res. Part I-Oceanogr. Res. Pap.75, 1-15.
- Tjalve, H., and Henriksson, J. (1999). Uptake of metals in the brain via olfactory pathways. Neurotoxicology 20, 181–196.
- Türkmen, M., Türkmen, A., Tepe, Y., Töre, Y., Ates, A.,2009. Determination of metals in fish species from Aegean and Mediterranean seas. Food Chem. 113, 233-237.
- Ureña, R., Peri, S., del Ramo, J., Torreblanca, A., 2007. Metal and metallothionein content in tissues from wild and farmed *Anguilla anguilla* at commercial size. Environ. Int. 33, 532-539.
- Usero, J., Izquierdo, C., Morillo, J., Gracia, I., 2004. Heavy metals in fish (*Solea vulgaris*, *Anguilla anguilla* and *Liza aurata*) from salt marshes on the southern Atlantic coast of Spain. Environ. Int. 29, 949-956.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ. Toxicol. Pharmacol. 13, 57-149.
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A., 2007. The use of bioamarkers in biomonitoring: A 2-term approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 146, 281-300.
- Vieira, L.R., Gravato, C., Soares, A.M.V.M., Morgado, F., Guilhermino, L., 2009. Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: Linking biomarkers to behaviour. Chemosphere. 76, 1416-1427.
- Vinagre, C., Fonseca, V., Cabral, H., Costa, M.J., 2006. Habitat suitability index models for the juvenile soles, *Solea solea* and *Solea senegalensis*, in the Tagus estuary: Defining variables for species management. Fish Res. 82, 140-149.

- Wessjohann, L.A., Schneider, A., Abbas, M., Brandt, W., 2007. Selenium in chemistry and biochemistry in comparison to sulfur. *Biol. Chem.*; 388,997-1006.
- Wiener, J. G., Krabbenhoft, D. P., Heinz, G. H., and Scheuhammer, A. M. (2003). Ecotoxicology of mercury. En: *Handbook of Ecotoxicology* (D.J. Hoffman, B.A. Rattner, G.A. Burton, Jr. i J. Cairns, eds), 2nd edn, pp. 409–464. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Wood, C.M. 2012. An Introduction to Metals in Fish Physiology and Toxicology: Basic Principles. En: *Homeostasis and Toxicology of Essential Metals* (Wood, C.M., Farrell, A.P. i Brauner, C.J. eds), *Fish Physiology* 31A,2-40. Academic Press.
- Zúñiga, D., Flexas, M.M., Sanchez-Vidal, A., Coenjaerts, J., Calafat, A., Jordà, G., García-Orellana, J., Puigdefàbregas, J., Canals, M., Espino, M., Sardà, F., Company, J.B., 2009. Particle fluxes dynamics in Blanes submarine canyon (Northwestern Mediterranean). *Prog. Oceanogr.* 82, 239-251.

Pàgines web consultades:

[http://www.unesco.org/\(01/2014\)](http://www.unesco.org/(01/2014))

[http://www.unep.org\(01/2014\)](http://www.unep.org(01/2014))

[http://glossary.eea.europa.eu\(02/2014\)](http://glossary.eea.europa.eu(02/2014))

[http://www.merriam-webster.com\)](http://www.merriam-webster.com)) Pollution, definition from Merriam-Webster on-line dictionary(02/2014)

[http://www.ahdictionary.com\)](http://www.ahdictionary.com)) The American Heritage, Science Dictionary, by Houghton Mifflin Company(02/2014)

[http://m.dictionary.com/encyclopedia\(02/2014\)](http://m.dictionary.com/encyclopedia(02/2014))

<http://www.fisgbase.org>

<http://www.ictioterm.es>

