

Review

Metalotioneínas en bivalvos marinos

Mairin Lemus^{1,2}, Raquel Salazar^{1,3}, Byron Lapo⁴ & Kyung Chung⁵

¹Programa Prometeo Senescyt, Ecuador

²Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela

³Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela

⁴Unidad de Ciencias Químicas y de la Salud, Universidad Técnica de Machala, Ecuador

⁵Departamento de Biología Marina, Instituto Oceanográfico de Venezuela

Universidad de Oriente, Venezuela

Autor correspondiente: Mairin Lemus (mlemus88@gmail.com)

RESUMEN. Las metalotioneínas (MTs) son proteínas muy particulares con masa molar entre 6-7 kDa, alto contenido de cisteínas (30%) y ausencia de aminoácidos aromáticos. Se encargan de mantener la homeostasis del Zn y Cu e intervienen en la desintoxicación de metales no esenciales, como Cd y Hg. Son barredores de radicales libres, principalmente de hidroxilos libres y superóxidos. Estas proteínas participan en una gran cantidad de procesos fisiológicos que han sido estudiados detalladamente en organismos vertebrados. Sin embargo, en invertebrados el estudio no ha avanzado a la misma velocidad. En los moluscos bivalvos, los estudios de estas proteínas surgen como una respuesta fisiológica ante la exposición a metales pesados, por lo que han sido utilizados ampliamente como biomarcadores de metales pesados, lo cual sustentó su validación como herramienta para determinar ambientes contaminados. Más recientemente, se han aislado y caracterizado isoformas de las MTs en moluscos bivalvos. En algunas especies se ha determinado la función de cada una de ellas en diferentes etapas del ciclo de vida y se han establecido asociaciones entre la inducción de MTs y factores ambientales. Los estudios han demostrado que en bivalvos existe gran polimorfismo de las MTs y mientras algunas pueden ser inducidas por metales pesados, otras sólo se asocian a procesos fisiológicos. Esta revisión trata las características y funciones de las MTs partiendo del amplio conocimiento que se tiene en vertebrados y los alcances en los estudios realizados en bivalvos.

Palabras clave: metalotioneínas, bivalvos, biomarcadores, estrés oxidativo, contaminación, metales pesados.

Metallothioneins in marine bivalves

ABSTRACT. Metallothioneins (MTs) are very particular proteins with a molar mass between 6-7 kDa, rich in cysteine (30%) and absence of aromatic amino acids. They undertake the maintenance of homeostasis of Cu and Zn and the detoxification of non-essential metals as Cd and Hg, and they are scavengers of free radicals, mainly of free hydroxyl and superoxides. These proteins are involved in a large number of physiological processes that have been studied in detail in vertebrate organisms. However, in invertebrates the study has not advanced at the same rate. Studies of MTs in bivalve mollusks have increased as a physiological response to heavy metal exposure. These invertebrates have been used widely as biomarkers of heavy metals, which supported their use as a tool to determine contaminated environments. More recently, isoforms of the MTs on bivalve mollusks have been isolated and characterized. Different functions of these isoforms have been proposed at different stages of the life cycle. Additionally environmental and xenobiotic factors modulate the expression and function of these proteins. The studies have demonstrated that there is a great polymorphism of MTs in bivalves, Some MTs can be induced by heavy metals, other are only associated with physiological processes. This revision deals about the characteristics and function of MTs, starting from the wide available knowledge in vertebrates and less knowledge in invertebrates.

Keywords: metallothionein, bivalves, biomarkers, oxidative stress, contamination, heavy metals.

INTRODUCCIÓN

Las metalotioneínas (MTs) fueron aisladas por primera vez en la corteza de riñón de caballo como una proteína que enlaza zinc y cadmio, y su nombre se atribuye al elevado contenido de metal y grupos sulfidrilos, carece de aminoácidos aromáticos y tiene una masa molar entre 6-7 Kda (Margoshes & Vallee, 1957; Kägi & Vallee, 1960).

Los estudios han determinado que las MTs están presentes en todas las formas de vida, desde las bacterias hasta los mamíferos (Capdevilla & Atrian, 2011), con una variación en el contenido de cisteína que puede oscilar entre 25 y 30% y debido a la falta de aminoácidos aromáticos y regiones hidrófobas, son proteínas estables al calor (Klaassen *et al.*, 2009). Hasta enero de 2015, más de 9800 secuencias de nucleótidos se han registrado en la base de datos de nucleótidos de la NCBI como MTs y sólo 155 secuencias se han determinado en 38 especies de bivalvos. De los invertebrados marinos, los bivalvos son los organismos más estudiados y la razón que ha permitido un mayor estudio de las MTs en estos invertebrados está dada por la asociación que se estableció entre los metales tóxicos y las MTs, una vez que fueron aisladas enlazadas al Cd (Kägi & Vallee, 1960). Por consiguiente estas proteínas se han relacionado con la desintoxicación de metales.

Por otro lado, la necesidad de buscar respuestas ante la gran capacidad que tienen los bivalvos de bioconcentrar metales en órdenes de magnitud muy superiores a su entorno, causaron un incremento de las investigaciones en esta dirección. Los estudios han señalado un aumento en los niveles de MTs como una respuesta a la contaminación por metales, y es por ello que aún son ampliamente utilizadas en organismos biomonitores. Adicionalmente, los bivalvos se han establecido como los modelos más idóneos para evaluar contaminación en ambientes acuáticos, porque presentan poco desplazamiento, son organismos filtradores, se encuentran en casi todos los ambientes, tienen gran importancia comercial y son fácilmente mantenidos en condiciones de confinamiento para estudios de toxicidad. Todo lo anterior ha sustentado que estos organismos sean los mejores representantes para estudios de MTs.

El análisis de las MTs en bivalvos ha estado dirigido en su mayoría a la cuantificación de esta proteína como biomarcador de contaminación ambiental, particularmente por la presencia de metales pesados, al considerar que elevadas concentraciones de metales inducen la expresión de las proteínas, como lo demuestran numerosos estudios realizados bajo condiciones de laboratorio (Baudrimont *et al.*, 1997; Geret & Cosson, 2002). No obstante, el uso de esta proteína como herramienta para valorar el impacto de

metales en los ecosistemas ha sido controversial, pues no siempre se han determinado asociaciones entre los niveles de metales y la expresión de la proteína (Viarengo *et al.*, 1999; Monserrat *et al.*, 2007; Machreki-Ajmi *et al.*, 2008). Esto ha permitido establecer que los mecanismos de inducción de estas moléculas, están modulados por factores bióticos como la etapa de desarrollo, sexo, estado reproductivo, tasa de crecimiento y también por factores abióticos como: la temperatura, salinidad, oxígeno disuelto, intensidad de luz y otros (Ladhar-Chaabouni *et al.*, 2012; Lemus *et al.*, 2013).

La variación anual de los factores ambientales en los ecosistemas marino-costeros determinan variaciones metabólicas que modulan los ciclos reproductivos de los bivalvos (Martínez-Castro & Vázquez, 2012; Castillo-Durán *et al.*, 2013) y los procesos fisiológicos asociados al desarrollo de tejido germinativo, maduración y desove. Estas etapas de reproducción implican la movilización de sustratos exógenos y endógenos (Hurtado *et al.*, 2012; Ke & Li, 2013), regulados por la activación y síntesis de proteínas requeridas para la proliferación del tejido germinativo, crecimiento y desove. En este sentido, los trabajos efectuados sobre la relación entre las MTs y el ciclo reproductivo han señalado algunas asociaciones entre la madurez gonadal y los niveles de esta proteína (Baudrimont *et al.*, 1997), mientras que otros sugieren un relación con los factores ambientales, principalmente disponibilidad de alimento y temperatura y las MTs (Cotou *et al.*, 2001; Leiniö & Lehtonen, 2005).

Por otro lado, las MTs juegan un papel fundamental como barredoras de radicales libres, los cuales se producen por la metabolización incompleta de los sustratos energéticos en la mitocondria y que pueden ser modulados por factores ambientales, como la temperatura, salinidad, pH y otros (Abele *et al.*, 2002; Heise *et al.*, 2003).

Es por ello, que el conocimiento sobre el papel fisiológico de las MTs en la homeostasis de los elementos esenciales, mecanismos de transducción de señales, barredor de especies reactivas de oxígeno y sus implicaciones en daños en los procesos celulares, (apoptosis y necrosis celular), revisten mucha importancia en el conocimiento del papel de las MTs en el ciclo de vida de los bivalvos.

El presente trabajo es una revisión de los aspectos fundamentales de estas proteínas considerando los estudios realizados con vertebrados y el conocimiento actual sobre estas proteínas en bivalvos.

Estructura de la MT

Las MTs son proteínas que no poseen aminoácidos aromáticos y voluminosos como la tirosina, triptofano,

fenilalanina y leucina, por lo que carecen de una estabilidad estructural. Esta propiedad estructural es determinada por los enlaces metal-tiolados. Los iones metálicos divalentes se unen formando una estructura tetraédrica, mientras que para el Cu puede ser tetraédrica o triagonal de acuerdo a su estado de oxidación (Coyle *et al.*, 2002; Capdevilla *et al.*, 2010). El enlazamiento del Cu y Cd a la molécula, muestra una mayor constante de estabilidad que el Zn, lo que ha determinado que metales como Cu, Cd y Hg tengan mayor capacidad de desplazar al Zn de la MT y en consecuencia formar complejos más estables de CdMt, CuMt y HgMt (Sabolic *et al.*, 2010).

A pesar de las diferencias específicas, estas proteínas presentan un elevado grado de similitud en su secuencia de aminoácidos y una posición muy conservada de los residuos de cisteína, con alta repetición de las secuencias Cis-x-Cis, Cis-Cis y Cis-x-y-Cis, donde x e y son aminoácidos distintos a la cisteína (Hamer, 1986), tal como se observa en la alineación realizada por Wong *et al.* (2009), en algunas especies (Fig. 1).

Se han identificado dos arreglos en las MTs para el enlazamiento de los iones metálicos divalentes. El dominio β conformado por tres iones metálicos y 9 cisteínas (M3Cys9) y el dominio α por 4 metales y 11 cisteínas (M4Cys11). La longitud total de la proteína y su contenido de cisteína varían significativamente entre especies (Syring *et al.*, 2000; Moltó *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2007) (Fig. 2).

Clasificación de las metalotioneínas

La clasificación tradicional de las MTs, que ha sido más ampliamente utilizada se basa en las características de la estructura primaria. La Clase I, incluye todas las formas de MTs de vertebrados y también de otra fila, con estructura primaria muy similar a la MT de caballo (<biblio>). En la Clase II, se encuentran los polipéptidos que presentan poca homología con las secuencias de aminoácidos de las MTs de mamíferos. Finalmente, la Clase III, está constituida por una familia de péptidos de cadena corta; se han definido como atípicas y tienen la capacidad para unir iones metálicos formando complejos estables intracelulares. Estos últimos polipéptidos están constituidos por unidades (-Glu-Cys) n X3, donde n varía entre once y doce veces, dependiendo del organismo y X es frecuentemente glicina o alanina. Estas moléculas, cadistinas y fitoquelatinas, fueron aisladas en las vacuolas de células de levaduras y de células de plantas superiores, respectivamente (Murasugi *et al.*, 1981; Zenk, 1996).

Otra clasificación fue la propuesta por Binz & Kagi (1999), la cual se basa en la definición de familias y subfamilias, considerando su relación evolutiva y se

describen 15 familias de MTs, de las cuales muchas ya han sido estudiadas y se ha establecido la estructura de coordinación con los metales. También está la clasificación realizada por Valls *et al.* (2001), basada en la preferencia de las MTs por conformar complejos homo metálicos y correctamente plegados al unir, ya sea, metales divalentes (Zn^{+2} o Cd^{+2}) o monovalentes (Cu^{+1}) y MTs intermedias que por un extremo son Zn-tioneínas y por el otro son Cu-tioneínas (Bofill *et al.*, 2009). Estas últimas, se han caracterizado como proteínas con propiedades intermedias, como es el caso de la MT4 de mamíferos que funciona con preferencias metálicas ambivalentes (Bofill *et al.*, 2009).

Se han señalado variaciones en la estructura primaria de MTs, que pueden ser fácilmente identificadas de acuerdo a la carga total de la proteína y se les denomina isoformas de MTs. Estas isoformas se han clasificado considerando la nomenclatura de la IUPAC-IUB (Nomenclature of Multiple Forms of Enzymes), siendo numeradas de acuerdo con la secuencia de elución de las resinas de intercambio iónico (MT-1, MT-2, MT-3, etc.), las subisoformas son representadas por letras (MT-1a, MT-1b, etc.). Las isoformas son una indicación de polimorfismo genético (Kägi & Kojima, 1987).

Las MTs son muy peculiares, ya que carecen de una estructura terciaria y se define en sus formas apo-MTs, los péptidos que carecen de metal y se les ha llamado tioneínas, mientras que la coordinación con el metal, determina la estructura 3D, y muestran diferentes plegamientos, dependiendo del tipo y la cantidad de iones metálicos coordinados. Por lo tanto, las MTs constituyen un sistema muy complejo, con el mismo péptido se forman diferentes plegamientos 3D, y a su vez están relacionados con distintos roles funcionales (Blindauer & Leszczyszyn, 2010).

Inducción de la síntesis de MTs por metales

La expresión de las MTs es controlada a nivel de la transcripción y puede ser inducida por una gran variedad de agentes fisiológicos, estresores ambientales y metales de transición (Juárez-Rebollar & Méndez-Armenta, 2004). Los sitios promotores del gen de la MTs presentan elementos de respuesta a metal (MRE) que contienen secuencias de siete pares de bases (TGRCNC) y están presentes en múltiples copias en las regiones promotoras de todas las MTs inducidas por metales (Culotta & Hammer, 1989). Una proteína denominada factor de transcripción de MTs (MTF-1) actúa como mediador para iniciar la expresión de gen MT. Este factor, MTF-1 requiere una elevada concentración de Zn para la unión al ADN (Westin & Schaffner, 1988). Los estudios en mamíferos (Heuchel *et al.*, 1994; Günes *et al.*, 1998), señalan que MTF-1 es



Figura 1. Secuencia de aminoácidos de MTs de bivalvos. Los residuos idénticos se representan en negro, mientras que en gris los conservados (Wong *et al.*, 2009).

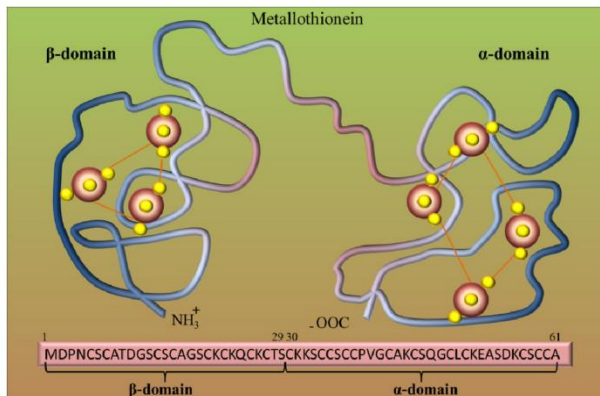


Figura 2. Dominios y enlazamiento de metales a la metalotioneína (Stillman, 1995).

una proteína ubicua que contiene seis dominios de zinc y algunos dominios de activación trans, rica en aminoácidos ácidos, prolina y serina/treonina, los cuales son requeridos para la traducción inducible por el metal. La forma activa de MTF-1 es inhibida inicialmente por un inhibidor sensible al Zn, denominado inhibidor de la transcripción de metal (MTI). En presencia de Zn y Zn-iones, los complejos MTF-1 y MTI se disocian. Esta condición permite que MTF-1 interactúe con el MRE en el sitio promotor de la MT para activar la transcripción. La unión de la MT recién sintetizada al Zn, promueve la formación del complejo MTF-1/MTI (Palmiter, 1998).

Las MTs tienen la capacidad de interactuar con radicales, particularmente el oxígeno reactivo, el anión superóxido y óxido nítrico (Atif *et al.*, 2006). De tal manera, que las MTs al reaccionar con estos radicales,

oxidan los cluster metal-tioles; quedando los iones metálicos disponibles (Kang, 2006; Gagné *et al.*, 2008). Bajo estas condiciones las MTs puede existir en el citoplasma celular en una forma oxidada libre de metal y reducida enlazada al metal. La forma oxidada o reducida de la MTs es modulada por la relación GSH/GSSG (Chen & Maret, 2001; Maret, 2008).

Adams *et al.* (2002), han propuesto un modelo en el cual la regulación de la transcripción de la MTs vía MTF-1/MRE es controlada por múltiples cascadas de transducción de señales que afectan la fosforilación de MTF-1. Este modelo está basado en que la MTF-1 contiene algunos sitios potenciales de fosforilación conservados, por ejemplo se ha evidenciado que cuando la proteína quinasa C, está inhibida, los niveles de la MTs disminuyen (Yu *et al.*, 1997), también algo similar se ha observado con la casein quinasa II y tirosina quinasa.

Sin embargo, a pesar del hecho de que las MTs se han investigado durante casi 50 años, los estudios recientes determinan innumerables funciones fisiológicas que involucran no sólo el metabolismo de los metales esenciales, tóxicos y mecanismos oxidativos sino que se ha determinado que están involucradas en distintos tipos de cáncer (Theocharis *et al.*, 2002; Shimoda *et al.*, 2003; Pedersen *et al.*, 2009; Soo *et al.*, 2011). La gran cantidad de asociaciones entre las MTs y muchas enfermedades en los humanos explica que esta proteína haya sido ampliamente estudiada en vertebrados y sigue siéndolo. No obstante, los estudios en invertebrados marinos son aún reducidos y están dirigidos en la mayoría de las investigaciones al papel que desempeñan en el campo de la toxicología, particular-

mente los metales. Alrededor de 50 especies diferentes de invertebrados acuáticos, la mayoría de los cuales son moluscos bivalvos muestran respuestas a la inducción de las MTs por efecto de metales. Esto ha ocasionado que sean ampliamente estudiados como potenciales biomarcadores de ambientes contaminados, pero, más reducidos son los estudios relacionados con la inducción y su papel fisiológico en los procesos celulares.

Metalotioneínas en moluscos bivalvos

Hasta el año 2015 se han identificado 155 secuencia de nucleótidos de MTs o proteínas relacionadas que corresponden a 38 especies de bivalvos, siendo las cuatro especies más estudiadas: *Crassostrea virginica*, *Mytilus edulis*, *Crassostrea gigas* y *Perna viridis* (Fig. 3). Existe un número mayor de especies a las que no se les ha secuenciado la estructura primaria; sin embargo, se les sigue utilizando como biomonitores en estudios ambientales a través de la determinación de la concentración total de MTs.

El estudio de las MTs en los bivalvos se ha enfocado principalmente a su expresión como respuesta a los metales pesados y es por ello que los niveles de inducción de esta proteína se han asociado a ecosistemas contaminados por metales (Cosson, 2000) y más recientemente a cualquier contaminante que pueda inducir estrés oxidativo (Valavanidis *et al.*, 2006). Bien sea, en condiciones de confinamiento o en ambientes potencialmente contaminados.

Se ha determinado la estructura primaria de las MTs de un gran número de organismos (Tabla 1) y se han establecido los modelos estructurales de la molécula en relación a los metales enlazados. Generalmente se presentan dos dominios de enlazamiento que varían de acuerdo a la especie. La información en relación a la genómica se incrementa significativamente en función de las múltiples isoformas y funciones que tienen las MTs en los invertebrados marinos. Uno de los grupos que ha recibido mayor atención son los mitílidos, debido a su amplia distribución, fácil reproducción y cultivo y su gran uso en las evaluaciones de biomonitorio.

Particularmente, en el bivalvo *M. edulis*, se han reportado dos formas de MTs, la MT-10 y MT-20 (Mackay *et al.*, 1993; Ivankovic *et al.*, 2002). La forma monomérica MT10 de 10 kDa tiene 73 aminoácidos (21 cisteínas) y es inducida a elevadas concentraciones de Zn y Cd. La MT-20 corresponde a la forma dimérica 20 kDa, tiene 72 aminoácidos (23 cisteínas), es inducida por exposición a Cd (Frazier *et al.*, 1985; Isani *et al.*, 2000; Lemoine *et al.*, 2000). En esta última, los residuos adicionales de cisteína podrían aumentar las propiedades de enlazamiento de los metales y crear

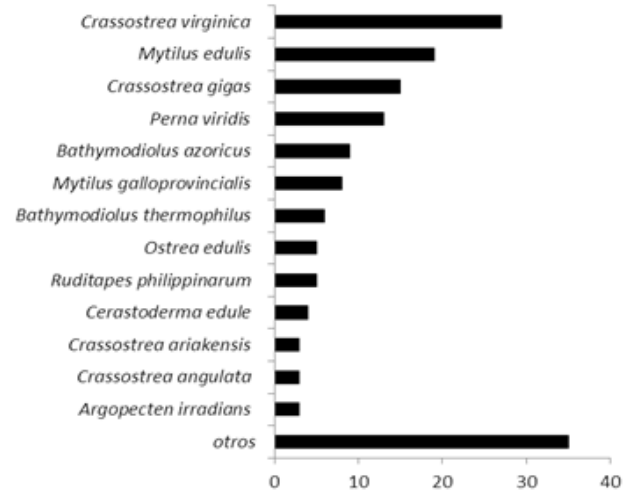


Figura 3. Número de trabajos que evalúan la estructura primaria de las metalotioneínas en bivalvos.

enlaces entre las subunidades monoméricas (Tabla 1). Por otro lado Leung *et al.*, 2014 determinaron 10 isoformas de la MTs, 6 correspondientes a las MT10 I y 4 a las MT0 II (Fig. 4).

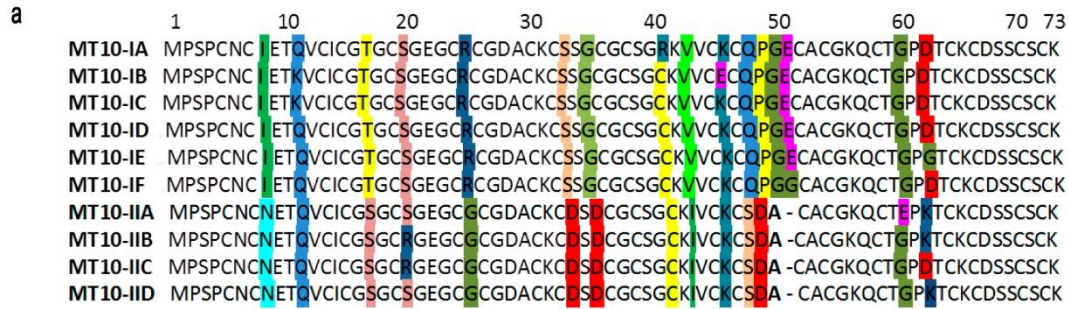
Las isoformas de las MTs en los organismos pueden ser el producto de varios genes o también reflejar el polimorfismo en las poblaciones. En el caso de los mitílidos, la caracterización genómica indica que los genes de las MTs están formados de tres exones y dos intrones (Khoo & Patel, 1999; Leignel & Laulier, 2006). Dos secuencias distintas para las MTs pueden corresponderse a dos genes diferentes, por ejemplo en *P. viridis* la MTI1 tiene 1657 pb y la MTI2 tiene 2045 pb y codifican la misma proteína (Khoo & Patel, 1999).

Esto sugiere que en una población e inclusive dentro de un mismo organismo pueden encontrarse diferentes genes para las MTs. Estos genes contienen regiones regulatorias distintivas inducidas diferencialmente por factores extrínsecos e intrínsecos. En *M. edulis* se han determinado genes que codifican MTs libres de intrón, es el caso de la MT-10 que contiene 66 aminoácidos con un esquema de lectura abierta; una MT similar fue determinada en la especie *Bathymodiolus thermophilus* (Leignel *et al.*, 2005). Posiblemente estas MTs muestren una rápida transcripción en respuesta a la exposición de metales. Si bien, son temas que aún no han sido muy bien detallados, esto ha sido sugerido.

Las MTs de la ostra americana, *C. virginica* muestran la estructura $\alpha\beta$ -dominio característica de moluscos (designado como CvMT-I). Además, presenta una segunda y extensa subfamilia de MTs (CvMT-II) que han surgido aparentemente a partir de una mutación de parada que trunca la proteína después del dominio α ; después de una serie de eventos de dupli-

Tabla 1. Isoformas de metalotioneínas en bivalvos.

Especie	Isoformas de MTs	Número de aminoácidos	Autor
<i>Mytilus edulis</i>	MT 10-IV	73	Mackay <i>et al.</i> (1993)
	MT 10-Ia	73	
	MT 10-II	73	
	MT 10-III	73	
	MT 20-II	72	
	MT 10-Ib	73	
	MT 20-I isoforms A y B	71	
	MT 20-III isoform A	72	
	MT MT1 MT2	73	
	MT 20-III isoform B	71	
	MT MT-20	72	
	MT MT-20	73	
	MT MT-10A(2)	74	
	<i>Mytilus sp.</i>	MT 20-II	
MT 20-III isoform A		72	Ceratto <i>et al.</i> (2002)
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	MT MT-20MT-20 IV	69	Aceto <i>et al.</i> (2011)
	MT 20-IV MT-20-IV	72	Dondero <i>et al.</i> (2005)
	MT MT-10 MT-10 III	73	Aceto <i>et al.</i> (2011)
	MT IA MT-IA	75	Jenny <i>et al.</i> (2004)
	MT IID MT-IID	149	Jenny <i>et al.</i> (2004)
	MT IIG MT-IIG	204	
	MT IIE MT-IIE	149	
	MT IIIH MT-IIIH	200	
	MT IIF MT-IIF	145	
	MT IIC MT-IIC	94	Jenny <i>et al.</i> (2004)
	MT IB MT-IB	75	Jenny <i>et al.</i> (2004)
	MT IVB MT-IVB	83	Jenny <i>et al.</i> (2006)
	MT IIIA MT-III A	62	Jenny <i>et al.</i> (2006)
	MT IIA MT-IIA	43	Jenny <i>et al.</i> (2004)
MT IIB MT-IIB	43		
<i>Crassostrea gigas</i>	MT mt, mt2, CGI_10021194		Tanguy & Moraga (2001)
	MT MT	75	Tanguy & Moraga (2001)
	MT-10bMT-10c, MT-10b	73	Hardivillier <i>et al.</i> (2004)
<i>Bathymodiolus azoricus</i>	MT MT-20	69	Hardivillier <i>et al.</i> (2004)
	MT, isoform MT-10a	73	Hardivillier <i>et al.</i> (2004)
<i>Bathymodiolus thermophiles</i>	MT MT-10Bt(2)	70	Leignel <i>et al.</i> (2005)
	MT MT-10Bt(1)	70	
	MT MT-20	69	
<i>Ruditapes decussatus</i>	MT MT	72	Ladhar-Chaabouni <i>et al.</i> (2009)
<i>Laternula elliptica</i>	MT 10b	73	Park <i>et al.</i> (2007)
	MT 10a	73	Park <i>et al.</i> (2007)
<i>Perna viridis</i>	MT IID MT	72	Leung <i>et al.</i> (2014)
	MT IIB MT	72	
	MT IB MT	73	
	MT IC MT	73	
	MT IF MT	73	
	MT IIC MT	72	
	MT IA MT	73	
MT IIA MT	72		



b

Isoformas	MT10 Isoforma I						MT10 isoforma II			
	IA	IB	IC	ID	IE	IF	IIA	IIB	IIC	IID
Masa molecular (Da)	7301	7249	7248	7248	7190	7176	7183	7180	7167	7111
Número de aminoácidos	73	73	73	73	73	73	72	72	72	72
Punto Isoeléctrico teórico	7,77	6,06	7,75	7,24	7,75	7,75	5,09	7,24	5,03	6,00
Número de Cisteínas	20	21	21	21	21	21	21	21	21	21
Cisteína (%)	(27,4)	(28,8)	(28,8)	(28,8)	(28,8)	(29,2)	(29,2)	(29,2)	(29,2)	(29,2)
Glicina (%)	15,1	15,1	15,1	15,1	16,4	16,4	12,5	13,9	13,9	13,9
Índice de hidropatía	-0,141	-0,045	-0,051	-0,045	-0,003	-0,003	-0,136	-0,144	-0,139	-0,093

Figura 4. Isoformas de la MT10 I y la MT10 II de *Perna viridis*, a) secuencia de aminoácidos, b) resumen de las características de las isoformas (Leung *et al.*, 2014).

cación y recombinación han dado origen a las isoformas que contienen entre uno a cuatro α -dominios y carecen de un dominio β (Jenny *et al.*, 2004). La CvMT-II muestra bajos niveles basales de expresión en tejidos de larvas y adultos. Una tercera familia de MTs, CvMT-III se caracteriza por presentar dos dominios β y ausencia de dominios α , es la isoforma dominante durante el desarrollo larval y muestra una moderada inducibilidad por metales tanto en larvas como en adultos (Jenny *et al.*, 2006). La cuarta isoforma CvMT-IV se aisló de hemocitos una vez que los organismos fueron expuestos a una mezcla de bacterias. De acuerdo a la distribución de las cisteínas de esta isoforma, parece estar relacionada con las MTs $\alpha\beta$ dominios. No obstante, presenta una serie de sustituciones de aminoácidos en cuatro cisteínas adicionales que dan lugar a una secuencias Cys-Cys y tres secuencias Cys-Cys-Cys (Jenny *et al.*, 2006). Esta isoforma presenta una moderada expresión en larvas y adultos, pero inducible por la presencia de metales.

La secuencia de la MT de *C. gigas* CgMT4, presenta similitud a las descritas en el gen que codifica para la MT de *C. virginica*, conocida como CvMT-IV (Jenny *et al.*, 2006) y el análisis filogenético revela que la secuencia se alinea con este grupo CvMT-IV mejor que con otras secuencias CgMT. Este gen al igual que los señalados anteriormente también contiene tres exones, mientras que la CgMT3T, no muestra intrones (Tanguy

& Moraga, 2001; Tanguy *et al.*, 2001) al igual que una MT10 de *M. edulis* (Leignel & Laulier, 2006). En *C. gigas* se han determinado 7 formas polimórficas de CgMT1 que ocurren en el exón 2 con tres tipos A, B y C y que está presente en el 80% de la población (Tanguy *et al.*, 2002).

El conocimiento de la estructura de las MTs, y su plasticidad ante la presencia de múltiples factores externos y xenobióticos en los cuerpos de agua, contribuirá a una mejor comprensión sobre las funciones de estas proteínas. Los estudios señalados anteriormente demuestran la existencia de una gran cantidad de genes con un número variado de aminoácidos, que han sufrido mutaciones como mecanismo adaptativo a los cambios externos. Adicionalmente, el conocimiento de las diferentes agrupaciones de los dominios α y β permitirá establecer funciones de estas moléculas (Jenny *et al.*, 2004).

Función de las MTs

Se ha señalado en muchos de los trabajos publicados, que las MTs juegan un papel clave en la homeostasis de los metales esenciales y en la depuración de aquellos que no lo son, o aquellos que aun siendo esenciales se encuentren en los sistemas biológicos en concentraciones tóxicas. La MT es la principal proteína intracelular que enlaza el Zn (Miles *et al.*, 2000) en mayor proporción que otras proteínas. Mason & Jekins

(1995), proponen que las MTs son en primer lugar un depósito de Zn y Cu, disponible para cumplir con las demandas enzimáticas para la síntesis de metaloenzimas y mantenimiento de la homeostasis de muchos procesos celulares y en segundo lugar reducen la unión no específica de los metales no esenciales dentro de las células, disminuyendo su potencial tóxico. Estudios más recientes muestran una gran participación de las MTs en muchos mecanismos celulares que inducen la activación del AMPc, calcio y la proteína quinasa C (PKC), que forman parte de las cascadas de señalización. De hecho, el análisis de las secuencias promotoras de las MTs muestra que estas secuencias contienen elementos de respuesta para una gran cantidad de estímulos que regulan el ciclo celular. Ejemplos de ellos son los glucocorticoides, ROS y citosinas, lo que determina la participación de las MTs en más de un proceso celular (Davis & Cousins, 2000), que aún no han sido descritos.

En algunos invertebrados, particularmente los gasterópodos cuentan con una isoforma de MTs responsable de mantener la homeostasis de los metales Cu y Zn, en las células que sintetizan la hemocianina, jugando un papel fundamental en la distribución de Cu en esta molécula transportadora de oxígeno, la cual contiene Cu en su estructura a diferencia de la hemoglobina que contiene Fe. (Dallinger *et al.*, 2005)

Capdevilla & Atrian (2011), señalan que es muy difícil establecer la función de las MTs porque no hay un papel biológico único para las MTs ya que, están involucradas en decenas de procesos fisiológicos, y sus funciones varían de un organismo a otro, e incluso entre isoformas, por lo que, en síntesis, sus funciones son de enlazamiento de metales y la actividad redox, siendo necesario realizar mayor número de estudios en este campo para obtener una definición más amplia de esta proteína.

En los invertebrados, las funciones fisiológicas de las MTs, se han estudiado más recientemente y han estado dirigidas a la identificación de las diferentes isoformas y al papel que desempeñan en el desarrollo y ciclo de vida, particularmente en los bivalvos, que han sido los más estudiados. Muchos de los procesos de inducción de las diferentes isoformas de MTs ocurren de manera indirecta, pues la temperatura, salinidad, pH, niveles de oxígeno, disponibilidad de alimento, modulan los procesos fisiológicos de los ciclos reproductivos, la incorporación de metales y el estado redox de la célula.

Algunas especies de bivalvos durante su ciclo de vida están expuestas a condiciones de anoxia por largos períodos de tiempo, y han desarrollado un metabolismo anaeróbico muy eficiente que les permite estar expuestos al aire por largo tiempo, modificando el estado redox de la célula y donde los niveles de MTs se

incrementan significativamente, posiblemente como mecanismo para eliminar los radicales libres formados (English & Storey, 2003; Zapata-Vívenes *et al.*, 2014). Sin embargo, aún no están claros los mecanismos anaeróbicos mediante los cuales esto ocurre, y es un tema que requiere mucha discusión debido a la multiplicidad de factores que se ha demostrado pueden inducir la síntesis de las MTs bajo estas condiciones. Sin embargo, la participación de las MTs en el proceso respiratorio ha sido señalada, donde MTs/apoMTs son capaces de modular la respiración controlando los niveles de Zn en la membrana interna de la mitocondria (Ye *et al.*, 2001).

Gatné *et al.* (2010), señalan que el estado de fosforilación de las MTs puede ser afectado de acuerdo a los niveles de contaminación. En tal sentido, plantea que la fosforilación de las MTs en los tejidos de la almeja *Mya arenaria* parece estar relacionada con el catabolismo de MTs en las células. En sus resultados demostró que las MTs fosforiladas se relacionan negativamente con la cantidad total de MTs en las células. El aumento en las MTs fosforiladas también parece estar relacionado con la proporción de MT oxidada en las células. Por otro lado, también se ha demostrado que la MT-fosforilada está estrechamente relacionada con los cambios en la actividad del transporte de electrones mitocondriales y citocromo oxidasa en los tejidos, lo que sugiere que la fosforilación de MTs está acoplada de alguna manera a la actividad mitocondrial de transporte de electrones y/o que las MTs se oxidan por el aumento de las tasas de respiración mitocondrial y luego son fosforiladas para la eliminación, tal vez a través de la vía de la ubiquitina/proteasoma, que aún se desconoce.

Anteriormente, se ha señalado que en los organismos marinos los eventos reproductivos están asociados a variaciones estacionales y existe una estrecha relación funcional entre el sistema digestivo y el desarrollo de las gónadas, y por lo tanto los períodos de abundancia de alimentos y el desarrollo de las gónadas a menudo son coincidentes (Mackie, 1984). En gran número de organismos filtradores las variaciones estacionales de las MTs están asociadas con períodos de surgencia, lo que podría ser el resultado de una mayor incorporación de metales esenciales o no esenciales provenientes del plancton y partículas finas en suspensión.

Además, las MTs podrían incrementarse en respuesta al aumento en la concentración de sustratos energéticos y el desarrollo de los tejidos germinativos. Un ejemplo de ello se puede observar en un estudio sobre las MTs en *M. edulis* y *Macoma balthica*, utilizando un índice estadístico integrado (considerando

temperatura, salinidad, metales pesados y condición reproductiva) se demostró que los organismos están expuestos a una fuerte variabilidad estacional de la temperatura y un período de máxima disponibilidad de alimentos en la primavera, los cuales rigen el ciclo reproductivo de los bivalvos y explican la mayor parte de la variabilidad natural observada en las MTs (Leiniö & Lehtonen, 2005).

En el caso de *Cerastoderma glaucum* donde se evaluó la estacionalidad de los niveles de MTs, los autores demostraron que la concentración de la MT presenta fluctuaciones significativas a lo largo de todo el año, con un valor máximo en verano y a fines de invierno, y sus resultados permitieron establecer que los posibles cambios estacionales en la concentración de metales traza no se pueden explicar por completo con el patrón observado en los niveles de MT. Los cambios fisiológicos causados por el desarrollo de las gónadas y la abundancia de alimento (cambio en la masa de tejido) contribuyen a una variabilidad significativa en los niveles de MT en el berberecho *C. glaucum* y pueden interferir con la fuentes de metales de origen antrópico (Machreki-Ajmi *et al.*, 2011).

Metalotioneínas y estrés oxidativo

Los enlaces tioles de las MTs le confieren actividad redox a los cluster enlazados con Zn. Esto indica que las MTs pueden controlar la distribución celular de Zn como una función del metabolismo energético celular. La función redox de la MTs es dependiente del Zn y sumamente importante para la regulación de los procesos fisiológicos en los cuales el estrés oxidativo moviliza el Zn desde las MTs (Bocchetti & Regoli, 2006).

Las MTs tienen la capacidad de interactuar con radicales, particularmente el oxígeno reactivo, el anión superóxido y óxido nítrico (Atif *et al.*, 2006), liberando los metales de la proteína. De tal manera que la MTs al reaccionar con estos radicales oxidan los cluster metal-tioles, liberando los metales de la proteína (Kang, 2006; Gagné *et al.*, 2008). De esta manera la MT puede existir en el citoplasma celular en una forma oxidada libre de metal y reducida enlazada al metal. La forma oxidada o reducida de la MTs es modulada por la relación GSH/GSSG (Chen & Maret, 2001; Maret, 2008).

El mecanismo de óxido-reducción que modula la afinidad de Zn por los grupos tioles de la MTs, está dado por la capacidad de óxido-reducción de los grupos sulfidrilos de la cisteína y es fuertemente modulado por GSH, GSSG. El óxido nítrico también conduce a la formación de enlaces disulfuro, para formar nitrosotioles-SO, los cuales son subsecuentemente convertidos en enlaces disulfuro (Cis-S-S-Cis), que ocurre

específicamente en el dominio beta de la MT1 de mamíferos.

De esta forma, las cisteínas de los cluster metal tiolados de las MTs confieren propiedades redox, facilitando el potencial de la MTs para participar en vías redox de transducción de señales (Pearce *et al.*, 2000; Viarengo *et al.*, 2000). El Zn como señalizador responde a las fluctuaciones de zinc "libre" y a las constantes de inhibición del zinc en proteínas y son la base para activar o inhibir enzimas en los procesos de la señalización, metabolismo energético citosólico, mitocondrial, y factores de transcripción en la expresión génica (Krężel *et al.*, 2007). Un ejemplo de la participación del Zn en la señalización de los procesos fisiológicos es el papel que juega en los procesos antiinflamatorios (Zangger *et al.*, 2001).

Las MTs en condiciones aeróbicas forman una nueva especie química, que se caracteriza por una masa molecular de aproximadamente dos veces el tamaño de la MT monomérica. Sin embargo, se ha descrito que esta forma monomérica se produce *in vivo* y podría ser sintetizada bajo condiciones de estrés oxidativo. La formación de entrecruzamientos disulfuro intermoleculares entre uno o más residuos de cisteína (Zangger *et al.*, 2001), también puede estar asociado a factores externos y posiblemente a condiciones de anoxia y exposición a metales.

Se ha demostrado que el Cd, puede desempeñar un papel relevante en la producción de especies reactivas de oxígeno dando lugar al estrés oxidativo (Gagné *et al.*, 2008b) que pueda facilitar la dimerización de la MTs. El dímero oxidativo se caracteriza por la formación de un enlace disulfuro intermolecular que implica el dominio α , específicamente la Cys-36. Durante el proceso, la estructura de los grupos de metal-cisteína en ambos dominios de la MTs permanece intacta y no se observa cambio conformacional o modificaciones metal-metal. Esta dimerización oxidativa de las MTs bien podría desempeñar un papel importante como mediadores óxido-reductores en las vías de transducción de señales. Hasta la fecha se conoce que las MTs modulan tres procesos fundamentales: 1) liberación de mediadores gaseosos, tales como el radical hidroxilo o el óxido nítrico, 2) apoptosis y 3) enlazamiento en intercambio de metales tales como Cu, Cd, Zn y Hg.

Metalotioneínas como biomarcadores de contaminación por metales pesados

Una vez descubiertas las MTs asociadas a Cd en la corteza de riñón de caballo, se sugirió que las mismas estarían relacionadas con la contaminación por este metal, razón por la cual gran número de estudios de MTs en invertebrados marinos está dirigido hacia el

campo de la ecotoxicología. Sin embargo, se discute la potencialidad del uso de las MTs como biomarcador de toxicidad para metales, no obstante, se ha incluido en varios programas de biomonitorio y entre los que se encuentra el Programa de Seguimiento de la Contaminación del Mar Mediterráneo (MEDPOL) como una primera señal de alarma de la existencia de efectos biológicos ocasionado por la contaminación por metales (UNEP/RAMOGÉ, 1999).

Los estudios toxicológicos con bivalvos bajo condiciones de confinamiento, con parámetros muy bien controlados (temperatura, salinidad, fotoperíodo, pH y otros) y el uso de concentraciones de metales muy variadas que van desde valores ambientales realistas hasta concentraciones muy tóxicas e incompatibles con la vida, han sustentado el uso de las MTs como biomarcadores de contaminación por metales, particularmente Cd, Cu y Hg. La mayoría de estos estudios mostraron mecanismos de dosis-respuesta (Ma *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2015). Sin embargo, la historia previa de exposición a metales determina patrones de respuesta variados (Roesijadi & Fellingham, 1987; Lemus *et al.*, 2014). Actualmente se conoce que las MTs responden a un sin número de efectores que pueden inducir su síntesis y que la misma proteína puede estar involucrada en muchos procesos fisiológicos y al mismo tiempo con aquellos xenobióticos que no necesariamente son metales.

La inducción de las MTs por metales tóxicos como el Cd y el Hg en bivalvos ha demostrado que existen isoformas inducibles ante estos xenobióticos, pero otras solo están relacionadas con funciones fisiológicas. En *C. virginica*, la isoforma CvMT-II solo responde moderadamente a la exposición a metales y muestra bajos niveles basales de expresión en tejidos de larvas y adultos, mientras que la CvMT-III se expresa durante el desarrollo larval y es la isoforma dominante en esta etapa de desarrollo, mientras que en los adultos la expresión es baja. En ambos estadios del ciclo de vida, la inducibilidad por metales es baja (Jenny *et al.*, 2006). Las altas concentraciones de Zn y Cd en mitrilidos inducen la síntesis de la forma monomérica MT-10, mientras la forma MT-20 es inducida por la exposición a Cd (Frazier *et al.*, 1985; Isani *et al.*, 2000). Particularmente en *Mytilus edulis* se ha demostrado que el cloruro de cadmio induce la síntesis de elevados niveles de ARNm para la MT 20 (Lemoine *et al.*, 2000).

Todo lo anteriormente señalado, demuestra que se requieren muchos estudios sobre MTs en bivalvos que puedan determinar el rol fisiológico de esta molécula, como se ha demostrado para vertebrados incluyendo el hombre, donde se han determinado un sin número de funciones fisiológicas de estas proteínas.

CONCLUSIONES

Los moluscos, y en particular los bivalvos, son actualmente el tercer grupo más importante de organismos marinos en términos de la producción de acuicultura. Se alimentan en el primer eslabón de la cadena trófica, tienen poco o ningún desplazamiento y su ciclo de vida es determinado por los ciclos estacionales. Por lo tanto, han sido organismos modelos en ecotoxicología ya que pueden representar registros de muchos metales, acumulándolos en órdenes de magnitud superiores a las concentraciones presentes en el agua de mar. Por todo lo dicho, han sido ampliamente utilizados como biomonitores de Cd, Cu y Hg y buenos inductores de la biosíntesis de MTs. Al respecto, la MT se considera un biomarcador válido de exposición a metales en los moluscos marinos, habiéndose reconocido que podría ser un biomarcador útil para la contaminación por metales del medio ambiente marino, a pesar de la falta de un método analítico oficial y la medición precisa de las MTs. Por otro lado, es necesario ampliar el conocimiento del papel fisiológico de las MTs en los aspectos biológicos de la especie y su variación estacional durante los procesos de crecimiento y ciclo reproductivo. Adicionalmente, se debe tener en cuenta los factores ambientales de la zonas donde la especie se reproduce (épocas de sequía, lluvia, surgencia o estacionalidad para las especies de ambientes templados), ya que los factores ambientales sumados a los fisiológicos pueden modular los ciclos de vida y la variación estacional de las MTs.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Proyecto Prometeo de la Secretaría de Educación Superior, Ciencia Tecnología e Innovación de la República del Ecuador, a la Universidad Técnica de Machala y al Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente de la República Bolivariana de Venezuela.

REFERENCIAS

- Abele, D., K. Heise, H.O. Pörtner & S. Puntarulo. 2002. Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. *J. Exp. Biol.*, 205(13): 1831-1841.
- Aceto, S., G. Formisano, F. Carella, G. De Vico & L. Gaudio. 2011. The metallothionein genes of *Mytilus galloprovincialis*: genomic organization, tissue expression and evolution. *Mar. Genomics*, 4(1): 61-68.
- Adams, T.K., N. Saydam, F. Steiner, W. Schaffner & J.H. Freedman. 2002. Activation of gene expression by

- metal-responsive signal transduction pathways. *Environ. Health Perspect.*, 110(5): 813-817.
- Atif, F., M. Kaur, S. Yousuf & S. Raisuddin. 2006. *In vitro* free radical scavenging activity of hepatic metallothionein induced in an Indian freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. *Chem. Biol. Interact.*, 162(2): 172-180.
- Barsyte, D., K.N. White & D.A. Lovejoy. 1999. Cloning and characterization of metallothionein cDNAs in the mussel *Mytilus edulis* L. digestive gland. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 122: 287-296.
- Baudrimont, M., S. Lemaire-Gony, F. Ribeyre, J. Métivaud & A. Boudou. 1997. Seasonal variations of metallothionein concentrations in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*). *Comp. Biochem. Physiol. C*, 118(3): 361-367.
- Binz, P.A. & J.H.R. Kagi. 1999. Metallothionein: molecular evolution and classification. In C. Klaassen (ed.). *Metallothionein*. Basel: Birkhauser, IV: 7-13.
- Blindauer, C.A. & O.I. Leszczyszyn. 2010. Metallothioneins: unparalleled diversity in structures and functions for metal ion homeostasis and more. *Nat. Prod. Rep.*, 27(5): 720-741.
- Bocchetti, R. & F. Regoli. 2006. Seasonal variability of oxidative biomarkers, lysosomal parameters, metallothioneins and peroxisomal enzymes in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* from Adriatic Sea. *Chemosphere*, 65(6): 913-921.
- Bofill, R., M. Capdevila & S. Atrian. 2009. Independent metal-binding features of recombinant metallothioneins convergently draw a step gradation between Zn- and Cu-thioneins. *Metallomics*, 1: 229-234.
- Capdevilla, M. & S. Atrian. 2011. Metallothionein protein evolution: a miniassay. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.*, 16(7): 977-989.
- Capdevilla, M., O. Palacios & S. Atrian. 2010. The Zn-or Cu-thionein character of a metallothionein determines its metal load when synthesized in physiological (metal-unsupplemented) conditions. *Bioinorg. Chem. Appl.*, 2010: 1-6.
- Castillo-Durán, A., A. Castro-Acedo, J.A. Arreola-Lizárraga, F. Hoyos-Chairez, C. Cáceres-Martínez, R. Mendoza-Salgado, L. Martínez-Cordova & J. Chávez-Villalba. 2013. Ciclo gametogénico e índice de condición de la almeja *Chione fluctifraga* en Bahía San Jorge, Golfo de California, México. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.*, 48(1): 59-72.
- Ceratto, N., F. Dondero, J.W. van de Loo, B. Burlando & A. Viarengo. 2002. Cloning and sequencing of a novel metallothionein gene in *Mytilus galloprovincialis* Lam. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 131(3): 217-222.
- Chen, Y. & W. Maret. 2001. Catalytic selenols couple the redox cycles of metallothionein and glutathione. *Eur. J. Biochem.*, 268(11): 3346-3353.
- Cosson, R.P. 2000. Bivalve metallothionein as a biomarker of aquatic ecosystem pollution by trace metals: limits and perspectives. *Cell. Mol. Biol.*, 46(2): 295-309.
- Cotou, E., C. Vagias, T. Rapti & V. Roussis. 2001. Metallothionein levels in the bivalves *Callista chione* and *Venus verrucosa* from two Mediterranean sites. *Zeitsch. Naturforsch. C*, 56(9-10): 848-852.
- Coyle, P., J.C. Philcox, L.C. Carey & A.M. Rofe. 2002. Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS.*, 59(4): 627-647.
- Culotta, V.C. & D.H. Hammer. 1989. Fine mapping of a mouse metallothionein gene metal response element. *Mol. Cell. Biol.*, 9: 1376-1380.
- Dallinger, R., M. Chabicovsky, E. Hödl, C. Prem, P. Hunziker & C. Manzl. 2005. Copper in *Helix pomatia* (Gastropoda) is regulated by one single cell type: differently responsive metal pools in rhogocytes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 289(4): 1185-1195.
- Davis, S.R. & R.J. Cousins. 2000. Metallothionein expression in animals: a physiological perspective on function. *J. Nutr.*, 130(5): 1085-1088.
- Dondero, F., L. Piacentini, M. Banni, M. Rebelo, B. Burlando & A. Viarengo. 2005. Quantitative PCR analysis of two molluscan metallothionein genes unveils differential expression and regulation. *Gene*, 345(2): 259-270.
- English, T.E. & K.B. Storey. 2003. Freezing and anoxia stresses induce expression of metallothionein in the foot muscle and hepatopancreas of the marine gastropod *Littorina littorea*. *J. Exp. Biol.*, 206(14): 2517-2524.
- Frazier, J.M., S.S. George, J. Overnell, T.L. Coombs & J. Kagi. 1985. Characterization of two molecular weight classes of cadmium binding proteins from the mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Comp. Biochem. Physiol. C*, 80(2): 257-262.
- Gagné, F., C. André & C. Blaise. 2008. The dual nature of metallothioneins in the metabolism of heavy metals and reactive oxygen species in aquatic organisms: implications of use as a biomarker of heavy-metal effects in field investigations. *Biochem. Insights.*, 1: 31-41.
- Gagné, F., J. Auclair, P. Turcotte, M. Fournier, C. Gagnon, S. Sauve & C. Blaise. 2008b. Ecotoxicity of CdTe quantum dots to freshwater mussels: impacts on immune system, oxidative stress and genotoxicity. *Aquat. Toxicol.*, 86(3): 333-340.
- Gagné, F., M. Gélinas, C. Gagnon, C. André & C. Blaise. 2010. Change in metallothionein phosphorylation state in *Mya arenaria* clams: implication in metal

- metabolism and oxidative stress. *J. Invert. Survival*, 7: 22-31.
- Geret, F. & R.P. Cosson. 2002. Induction of specific isoforms of metallothionein in mussel tissues after exposure to cadmium or mercury. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 42(1): 36-42.
- Günes, Ç., R. Heuchel, O. Georgiev, K.H. Müller, P. Lichtlen, H. Blüthmann, S. Marino, A. Aguzzi & W. Schaffner. 1998. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the metal-responsive transcriptional activator MTF-1. *The EMBO J.*, 17(10): 2846-2854.
- Hamer, D.H. 1986. Metallothionein1, 2. *Ann. Rev. Biochem.*, 55(1): 913-951.
- Hardivillier, Y., V. Leignel, F. Denis, G. Uguen, R. Cosson & M. Laulier. 2004. Do organisms living around hydrothermal vent sites contain specific metallothioneins? The case of the genus *Bathymodiolus* (Bivalvia, Mytilidae). *Comp. Biochem. Physiol. C*, 139(1): 111-118.
- Heise, K., S. Puntarulo, H.O. Pörtner & D. Abele. 2003. Production of reactive oxygen species by isolated mitochondria of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* (King and Broderip) under heat stress. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 134(1): 79-90.
- Heuchel, R., F. Radtke, O. Georgiev, G. Stark, M. Aguet & W. Schaffner. 1994. The transcription factor MTF-1 is essential for basal and heavy metal-induced metallothionein gene expression. *EMBO J.*, 13(12): 2870-2875.
- Hurtado, M.A., I.S. Racotta, F. Arcos, E. Morales-Bojórquez, J. Moal, P. Soudant & E. Palacios. 2012. Seasonal variations of biochemical, pigment, fatty acid, and sterol compositions in female *Crassostrea corteziensis* oysters in relation to the reproductive cycle. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 163(2): 172-183.
- Isani, G., G. Andreani, M. Kindt & E. Carpenè. 2000. Metallothioneins (MTs) in marine mollusks. *Cell. Mol. Biol.*, 46(2): 311-330.
- Ivanković, D., J. Pavičić, S. Kozar & B. Raspor. 2002. Multiple forms of metallothionein from the digestive gland of naturally occurring and cadmium-exposed mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Helgol. Mar. Res.*, 56(2): 95-101.
- Jenny, M.J., A.H. Ringwood, K. Schey, G.W. Warr & R.W. Chapman. 2004. Diversity of metallothioneins in the American oyster, *Crassostrea virginica*, revealed by transcriptomic and proteomic approaches. *Eur. J. Biochem.*, 271: 1702-1712.
- Jenny, M.J., G.W. Warr, A.H. Ringwood, D.A. Baltzgar & R.W. Chapman. 2006. Regulation of metallothionein genes in the American oyster (*Crassostrea virginica*): ontogeny and differential expression in response to different stressors. *Gene*, 379: 156-165.
- Juárez-Rebollar, D. & M. Méndez-Armenta. 2014. Aspectos funcionales de la metalotioneina en el sistema nervioso central. *Arch. Neurocienc.*, 19(1): 34-41.
- Kägi, J.H.R. & B.L. Vallee. 1960. Metallothionein: a cadmium and zinc containing protein from equine renal cortex. *J. Biol. Chem.*, 235: 3460-3465.
- Kägi, J.H. & Y. Kojima. 1987. Chemistry and biochemistry of metallothionein. Birkhäuser Basel. pp. 25-61.
- Kang, Y.J. 2006. Metallothionein redox cycle and function. *Exp. Biol. Med.*, 231(9): 1459-1467.
- Ke, Q. & Q. Li. 2013. Annual dynamics of glycogen, lipids, and proteins during the reproductive cycle of the surf clam *Macra veneriformis* from the north coast of Shandong Peninsular, China. *Invert. Reprod. Develop.*, 57(1): 49-60.
- Khoo, H.W. & K.H. Patel. 1999. Metallothionein cDNA, promoter, and genomic sequences of the tropical green mussel, *Perna viridis*. *J. Exp. Zool.*, 284(4): 445-453.
- Klaassen, C.D., J. Liu & B.A. Diwan. 2009. Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 238(3): 215-220.
- Krežel, A., Q. Hao & W. Maret. 2007. The zinc/thiolate redox biochemistry of metallothionein and the control of zinc ion fluctuations in cell signaling. *Arch. Biochem. Biophys.*, 463(2): 188-200.
- Ladhar-Chaabouni, R., M. Machreki-Ajmi & A. Hamza-Chaffai. 2012. Use of metallothioneins as biomarkers for environmental quality assessment in the Gulf of Gabès (Tunisia). *Environ. Monit. Assess.*, 184(4): 2177-2192.
- Ladhar-Chaabouni, R., R. Mokdad-Gargourim, F. Denis & A. Hamza-Chaffai. 2009. Cloning and characterization of cDNA probes for the analysis of metallothionein gene expression in the Mediterranean bivalves: *Ruditapes decussatus* and *Cerastoderma glaucum*. *Mol. Boil. Rep.*, 36(5): 1007-1014.
- Leignel, V. & M. Laulier. 2006. Isolation and characterization of *Mytilus edulis* metallothionein genes. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 142(1): 12-18.
- Leignel, V., Y. Hardivillier & M. Laulier. 2005. Small metallothionein MT-10 genes in coastal and hydrothermal mussels. *Mar. Biotechnol.*, 7(3): 236-244.
- Leiniö, S. & K.K. Lehtonen. 2005. Seasonal variability in biomarkers in the bivalves *Mytilus edulis* and *Macoma balthica* from the northern Baltic Sea. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 140(3): 408-421.
- Lemoine, S., Y. Bigot, D. Sellos, R.P. Cosson & M. Laulier. 2000. Metallothionein isoforms in *Mytilus edulis* (Mollusca, Bivalvia): complementary DNA characterization and quantification of expression in

- different organs after exposure to cadmium, zinc, and copper. *Mar. Biotechnol.*, 2(2): 195-203.
- Lemus, M., E. Eucaris, R. Salazar-Lugo & K. Chung. 2014. Modulación de la síntesis de metalotioninas en *Perna viridis* preexposados a cobre y expuestos a cadmio. *Saber*, 26(1): 10-17.
- Lemus, M., N. Rojas, L.R. Astudillo & K. Chung. 2013. Metalotioninas en *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae): variación estacional y su relación con la biología reproductiva. *Rev. Biol. Trop.*, 61(2): 701-709.
- Leung, P.T., T.J. Park, Y. Wang, C.M. Che & K.M. Leung. 2014. Isoform-specific responses of metallothioneins in a marine pollution biomonitor, the green-lipped mussel *Perna viridis*, towards different stress stimulations. *Proteomics*, 14(15): 1796-1807.
- Li, Y., H. Yang, N. Liu, J. Luo, Q. Wang & L. Wang. 2015. Cadmium accumulation and metallothionein biosynthesis in cadmium-treated freshwater mussel *Anodonta woodiana*. *PLoS ONE*, 10(2): 1-15.
- Lilja, K., A. Prevodnik, J. Gardeström, T. Elfving, M. Tedengren & T. Bollner. 2008. Regional differences in mRNA responses in blue mussels within the Baltic proper. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 148(2): 101-106.
- Ma, W.L., L. Wang, Y.J. He & T. Yan. 2008. Tissue-specific cadmium and metallothionein levels in freshwater crab *Sinopotamon henanense* during acute exposure to waterborne cadmium. *Environ Toxicol.*, 23: 393-400.
- Machreki-Ajmi, M., T. Rebai & A. Hamza-Chaffai. 2011. Variation of metallothionein-like protein and metal concentrations during the reproductive cycle of the cockle *Cerastoderma glaucum* from an uncontaminated site: A 1-year study in the Gulf of Gabès area (Tunisia). *Mar. Biol. Res.*, 7(3): 261-271.
- Machreki-Ajmi, M., I. Ketata, R. Ladhari-Chaabouni & A. Hamza-Chaffai. 2008. The effect of *in situ* cadmium contamination on some biomarkers in *Cerastoderma glaucum*. *Ecotoxicology*, 17(1): 1-11.
- Mackay, E.A., J. Overnell, B. Dunbar, I. Davidson, P.E. Hunziker, J.H. Kägi & J.E. Fothergill. 1993. Complete amino acid sequences of five dimeric and four monomeric forms of metallothionein from the edible mussel *Mytilus edulis*. *Eur. J. Biochem.*, 218(1): 183-194.
- Mackie, G.M. 1984. Bivalves. In: A.S. Tompa, N.H. Verdonck & B. Van Den (eds.). *The Mollusca*. 7. Academic Press, New York, pp. 284-316.
- Maret, W. 2008. Metallothionein redox biology in the cytoprotective and cytotoxic functions of zinc. *Exp. Gerontol.*, 43(5): 363-369.
- Margoshes, M. & B.L. Vallee. 1957. A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.*, 79(17): 4813-4814.
- Martínez-Castro, C. & E. Vázquez. 2012. Reproductive cycle of the cockle *Cerastoderma edule* (Linnaeus, 1758) in the Ria de Vigo (Galicia, Northwest Spain). *J. Shellfish. Res.*, 31(3): 757-767.
- Mason, A.Z. & D. Jenkins. 1995. Metal detoxification in aquatic organisms. In: A. Tessier & D.R. Turner (eds.). *Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*. Wiley, Chichester, pp. 479-607.
- Miles, A.T., G.M. Hawksworth, J.H. Beattie & V. Rodilla. 2000. Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 35: 35-70.
- Moltó, E., E. Bonzón-Kulichenko, N. Gallardo & A. Andrés. 2007. MTPA: a crustacean metallothionein that affects hepatopancreatic mitochondrial functions. *Arch. Biochem. Biophys.*, 467(1): 31-40.
- Monserrat, J.M., P.E. Martínez, L.A. Geracitano, L.L. Amado, C.M.G. Martins, G.L.L. Pinho, I.S. Chaves, M. Ferreira-Cravo, J. Ventura-Lima & A. Bianchini. 2007. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. *Com. Biochem. Physiol. C*, 146(1): 221-234.
- Murasugi, A., C. Wada & Y. Hayashi. 1981. Purification and unique properties in UV and CD spectra of Cd-binding peptide 1 from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 103: 1021-1028.
- Palmiter, R.D. 1998. The elusive function of metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 8428-8430.
- Park, H., I.-Y. Ahn, H.J. Choi, S.H. Pyo & H.E. Lee. 2007. Cloning, expression, and characterization of metallothionein from the Antarctic clam *Laternula elliptica*. *Protein. Expres. Purif.*, 52: 82-88.
- Pearce, L.L., R.E. Gandley, W. Han, K. Wasserloos, M. Stitt, A.J. Kanai, M.K. McLaughlin, B.R. Pitt & E.S. Levitan. 2000. Role of metallothionein in nitric oxide signaling as revealed by a green fluorescent fusion protein. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 97(1): 477-482.
- Pedersen, M.Ø., A. Larsen, M. Stoltenberg & M. Penkowa. 2009. The role of metallothionein in oncogenesis and cancer prognosis. *Prog. Histochem. Cytochem.*, 44(1): 29-64.
- Roesijadi, G. & G.W. Fellingham. 1987. Influence of Cu, Cd, and Zn preexposure on Hg toxicity in the mussel *Mytilus edulis*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 44(3): 680-684.
- Sabolić, I., D. Breljak, M. Škarica & C.M. Herak-Kramberger. 2010. Role of metallothionein in cadmium traffic and toxicity in kidneys and other mammalian organs. *Biometals*, 23(5): 897-926.
- Shimoda, R., W.E. Achanzar, W. Qu, T. Nagamine, H. Takagi, M. Mori & M.P. Waalkes. 2003. Metallo-

- thionein is a potential negative regulator of apoptosis. *Toxicol. Sci.*, 73(2): 294-300.
- Soo, E.T.L., C.T Ng, G.W.C. Yip, C.Y. Koo, M.E. Nga, P.H. Tan & B.H. Bay. 2011. Differential expression of metallothionein in gastrointestinal stromal tumors and gastric carcinomas. *Anat. Record*, 294(2): 267-272.
- Syring, R.A., T.H. Brouwer & M. Brouwer. 2000. Cloning and sequencing of cDNAs encoding for a novel copper-specific metallothionein and two cadmium-inducible metallothioneins from the blue crab *Callinectes sapidus*. *Com. Biochem. Physiol C*, 125(3): 325-332.
- Tanguy, A. & D. Moraga. 2001. Cloning and characterization of a gene coding for a novel metallothionein in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (CgMT2): a case of adaptive response to metal-induced stress? *Gene*, 273: 123-130.
- Tanguy, A., C. Mura & D. Moraga. 2001. Cloning of a metallothionein gene and characterization of two other cDNA sequences in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (CgMT1). *Aquat. Toxicol.*, 55: 35-47.
- Tanguy, A., I. Boutet, F. Bonhomme, P. Boudry & D. Moraga. 2002. Polymorphism of metallothionein genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* as a biomarker of response to metal exposure. *Biomarkers*, 7(6): 439-450.
- Theocharis, S., C. Karkantaris, T. Philipides, E. Agapitos, A. Gika, A. Margeli, C. Kittas & A. Koutselinis. 2002. Expression of metallothionein in lung carcinoma: correlation with histological type and grade. *Histopathology*, 40: 143-151.
- United Nations Environment Programme (UNEP/RAMOGÉ). 1999. Manual on the Biomarkers Recommended for the MED POL Biomonitoring Programme. UNEP, Athens, pp. 1-49.
- Valavanidis, A., T. Vlahogianni, M. Dassenakis & M. Scoullou. 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Safe*, 64(2): 178-189.
- Valls, M., R. Bofill, R. Gonzalez-Duarte, P. Gonzalez-Duarte, M. Capdevila & S. Atrian. 2001. A new insight into metallothionein (MT) classification and evolution. The *in vivo* and *in vitro* metal binding features of *Homarus americanus* recombinant MT. *J. Biol. Chem.*, 276: 32835-32843.
- Viarengo, A., B. Burlando, N. Ceratto & I. Panfoli. 2000. Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cell. Mol. Biol.*, 46(2): 407 pp.
- Viarengo, A., B. Burlando, F. Dondero, A. Marro & R. Fabbri. 1999. Metallothionein as a tool in biomonitoring programmes. *Biomarkers*, 4(6): 455-466.
- Westin, G. & W. Schaffner. 1988. A zinc-responsive factor interacts with a metal-regulated enhancer element (MRE) of the mouse metallothionein-I gene. *EMBO J.*, 7(12): 3763.
- Wong, K., N.A. Mat-Daud & R. Othman. 2009. Identification and characterisation of a copper-inducible metallothionein gene from cockle, *Anadara granosa*. *Sains Malaysiana*, 38(3): 287-294.
- Ye, B., W. Maret & B.L. Vallee. 2001. Zinc metallothionein imported into liver mitochondria modulates respiration. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 98(5): 2317-2322.
- Yu, C.W., J.H. Chen & L.Y. Lin. 1997. Metal-induced metallothionein gene expression can be inactivated by protein kinase C inhibitor. *FEBS Letters*, 420(1): 69-73.
- Zangger, K., G. Öz, E. Haslinger, O. Kunert & I.M. Armitage. 2001. Nitric oxide selectively releases metals from the amino-terminal domain of metallothioneins: potential role at inflammatory sites. *FASEB J.*, 15(7): 1303-1305.
- Zapata-Vívenes, E., M. Tovar-Sánchez O. Nusetti, M. Lemus & G. Sánchez. 2014. Tolerancia a la anoxia y defensas antioxidantes en el mejillón verde *Perna viridis* (Linneus, 1758) bajo exposición aguda al cadmio. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 42(3): 514-522.
- Zenk, M.H. 1996. Heavy metal detoxification in higher plants-a review. *Gene*, 179(1): 21-30.

Received: 12 August 2015; Accepted: 14 January 2016