

Effects of exposure to arsenic in *Corbicula fluminea*:  
Evaluation of the histological, histochemical and biochemical responses

Efectos de la exposición al arsénico en *Corbicula fluminea*:  
Evaluación de las respuestas histológicas, histoquímicas y bioquímicas

MS Diniz<sup>1\*</sup>, HM Santos<sup>2</sup>, PM Costa<sup>1</sup>, I Peres<sup>1</sup>, MH Costa<sup>1</sup>, S Alves<sup>3</sup>, JL Capelo-Martinez<sup>2</sup>

<sup>1</sup> IMAR-Instituto do Mar, Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Quinta da Torre-2829-516 Caparica, Portugal. \* E-mail: mesd@fct.unl.pt

<sup>2</sup> Requimte-Centro de Química Fina e Biotecnologia, Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Quinta da Torre-2829-516 Caparica, Portugal.

<sup>3</sup> Centro de Química Estrutural, Instituto Superior Técnico da Universidade Técnica de Lisboa, Avenida Rovisco Pais, 1049-001 Lisboa, Portugal.

### Abstract

Arsenic (As) is a common element in aquatic environments and it is originated from both anthropogenic and natural processes. It is a toxic metalloid, especially in the trivalent form (arsenite), to humans and wildlife, and consequently its contamination of aquatic environments (especially groundwater and drinking water) is a serious public health problem in several regions around the globe, particularly in Asia, since it is known to cause cancer and other types of pathologies. The main goal of the present study was to assess the toxicological effects, bioaccumulation and ability to regulate As in *Corbicula fluminea* (Muller 1744), exposed to different concentrations of As in the water. One hundred fresh-water bivalves ( $1.6 \pm 0.3$  g) from the Minho River (Portugal) were randomly distributed in ten 20-L tanks and exposed to different nominal concentrations of As (100, 300, 500, and  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ ) for 28 days. A tank with tap water free of chlorine was used as control. The assay was performed in duplicate, at a constant temperature of  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . The results showed a significant increase ( $P < 0.01$ ) of As in the total concentration and cytosolic fraction after 28 days of exposure in all treatments. A significant increase ( $P < 0.01$ ) in metallothionein concentration was also detected in bivalves exposed to the different concentrations of As, in comparison with the controls. The histological and histochemical evaluation provided clear evidence that As accumulated in tissues, especially in the digestive gland, and caused tissue alterations in 50% of the organisms.

*Key words:* accumulation, arsenic, biomarkers, *Corbicula fluminea*, histopathology.

### Resumen

El arsénico (As) es un elemento común en los ambientes acuáticos y se origina de procesos tanto antropogénicos como naturales. Es un metaloide tóxico, especialmente en su forma trivalente (arsenito) para los organismos vivos, incluidos los humanos. La contaminación por As de los recursos hídricos, especialmente el agua subterránea y potable, es un problema serio de salud pública en varias regiones del mundo, particularmente en Asia, donde ha sido identificado como promotor de cáncer y otros tipos de patologías. El objetivo principal del presente estudio fue evaluar los efectos toxicológicos, la bioacumulación y la capacidad reguladora del bivalvo *Corbicula fluminea* expuesto a diferentes concentraciones de este elemento en el agua. Cien individuos de *C. fluminea* de agua dulce ( $1.6 \pm 0.3$  g) del Río Miño (Portugal) fueron distribuidos aleatoriamente en 10 tanques de 20 L y expuestos a diferentes concentraciones nominales de As (100, 300, 500 y  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ ) por 28 días. Se utilizó como control un tanque con el mismo tipo de agua (libre de cloruros), pero sin As. El experimento se realizó por duplicado, a una temperatura constante de  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . Los resultados mostraron un aumento significativo ( $P < 0.01$ ) del As en la concentración total y en la fracción citosólica después de 28 días de exposición en todos los tratamientos. También se detectó un incremento significativo ( $P < 0.01$ ) en la concentración de metalotioneínas en los bivalvos expuestos a las diferentes concentraciones de As, en comparación con los controles. La evaluación histológica e histoquímica proporcionó clara evidencia de que el As es acumulado en los tejidos, especialmente en la glándula digestiva, y que causó alteraciones de los tejidos en 50% de los organismos.

*Palabras clave:* acumulación, arsénico, biomarcadores, *Corbicula fluminea*, histopatología.

### Introduction

Bivalves have been recognized as useful sentinel organisms in aquatic ecosystems because they provide accurate and

### Introducción

Los bivalvos han sido reconocidos como organismos centinelas de ecosistemas acuáticos porque dan información precisa

integrated information about the environmental impact and bioavailability of chemicals (Bilos *et al.* 1998). *Corbicula fluminea* (Muller 1744) is a fresh-water bivalve from Southeast Asia that has progressively spread worldwide, having colonized several countries outside its original biota, including the United States of America and, more recently, many European countries. This bivalve appeared on the European continent about 1980, having been observed for the first time in France (Dordogne River) and Portugal (Tagus River) (Mouthon 1981). It presents an invasive dynamics when colonizing rivers, channels and lakes, living buried in the surface layers of the sediment (Mouthon 2001). It feeds on phytoplankton and seston but is able to collect organic material from the sediment using pedal-feeding (Mouthon 2003), which contributes to make *C. fluminea* a potential candidate as a fresh-water sentinel mollusc for environmental monitoring programs (Vidal *et al.* 2002). According to Baudrimont *et al.* (1997), from an ecotoxicological point of view, *C. fluminea* is a very interesting model because it lives buried in the upper sediment layers, filtering large volumes of water (about 10 L clam<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>), and consequently is capable of bioaccumulating large quantities of metals.

Arsenic (As) is a common element widely distributed in many different geographical regions around the world, contaminating the aquatic environments and, therefore, constituting a potential risk for the health of the human population and wildlife. In some Asiatic regions such as Bangladesh, As poses as a severe public health problem, being the cause of several types of pathologies, including cancer (WHO 2001, Vahter 2002). Moreover, anthropogenic activities and point pollutant discharges, such as those that have occurred along the NE Atlantic continental shelf involving the transport of oil and its derivatives, have dumped large amounts of metals (e.g., Cd, Cu, Pb, Mo, Ni) and metalloids (As) into the marine environment (Fernández *et al.* 2006, Prego *et al.* 2006). With respect to Portugal, there are some localities where As levels frequently exceed drinking water standards (e.g., Alpiarça, Valbom, Vila Flôr, Ponte de Sôr) (IRAR 2005). Several studies have reported elevated levels of As in marine bivalves such as oysters and mussels (Valette-Silver 1999), marine polychaetes (Waring and Maher 2005), crabs (Martín-Díaz *et al.* 2006), and fish (Mason *et al.* 2000, Besada *et al.* 2006). This metalloid has been subjected to many toxicological studies; however, gaps of knowledge still remain regarding its effects on living organisms, in particular those living in fresh-water ecosystems.

The tolerance to metal load in bivalves is usually attributed to the action of detoxifying mechanisms (Couillard *et al.* 1993). A specific cellular response of the organisms to an environment polluted by metals is the induction of metallothioneins (MTs). This hypothesis is still under debate (Romero-Isart and Vasák 2002) since there are other agents that may induce MTs (e.g., reactive oxygen species, physical stress, infection); however, the level of induction by other agents is usually lower than that caused by metals (Kagi 1993), so the use of MTs was proposed as a potential biomarker in environmental monitoring

y global sobre el impacto ambiental y la biodisponibilidad de compuestos químicos (Bilos *et al.* 1998). *Corbicula fluminea* (Muller 1744) es un bivalvo de agua dulce del sureste de Asia que se ha dispersado progresivamente a nivel mundial, colonizando varios países fuera de su biota original, incluyendo los Estados Unidos de Norteamérica y, más recientemente, algunos de Europa, donde fue observado por primera vez alrededor de 1980 en Francia (Río Dordoña) y Portugal (Río Tajo) (Mouthon 1981). Presenta una dinámica invasiva al colonizar ríos, canales y lagos, donde vive semienterrado en las capas superficiales del sedimento (Mouthon 2001) y se alimenta de fitoplancton y seston, pero también es capaz de recolectar material orgánico del sedimento (Mouthon 2003), lo cual contribuye a que *C. fluminea* sea un serio candidato para ser utilizado como molusco centinela de agua dulce en programas de monitoreo ambiental (Vidal *et al.* 2002). Según Baudrimont *et al.* (1997), desde un punto de vista ecotoxicológico, *C. fluminea* es un modelo muy interesante ya que vive enterrado en los sedimentos superficiales, filtrando grandes volúmenes de agua (cerca de 10 L almeja<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>), y consecuentemente puede bioacumular grandes cantidades de metales.

El arsénico (As) es un elemento que se puede encontrar en distintas regiones geográficas alrededor del mundo, contaminando los recursos hídricos y, por tanto, representa un riesgo potencial para la salud humana y la fauna silvestre. En algunas regiones de Asia, como Bangladesh, el envenenamiento crónico por As constituye un serio problema de salud pública asociado con varios tipos de patologías, como por ejemplo el cáncer (WHO 2001, Vahter 2002). Además, las actividades antropogénicas y descargas puntuales de contaminantes, como las ocurridas sobre la plataforma continental del Atlántico NE por el transporte del petróleo y sus derivados, han vertido grandes cantidades de metales (e.g., Cd, Cu, Pb, Mo, Ni) y metaloides (As) al ambiente marino (Fernández *et al.* 2006, Prego *et al.* 2006). En Portugal existen algunas localidades donde los niveles de As exceden los estándares para el agua potable (e.g., Alpiarça, Valbom, Vila Flôr, Ponte de Sôr) (IRAR 2005). En algunos estudios se han encontrado niveles elevados de As en bivalvos marinos como ostiones y mejillones (Valette-Silver 1999), poliquetos marinos (Waring and Maher 2005), cangrejos (Martín-Díaz *et al.* 2006) y peces (Mason *et al.* 2000, Besada *et al.* 2006). Aunque este metaloide ha sido sujeto de muchos estudios toxicológicos, aún existen incógnitas en cuanto a sus efectos en organismos vivos, especialmente en los que viven en ecosistemas de agua dulce.

La resistencia de los bivalvos a la toxicidad causada por los metales es atribuida normalmente a la acción de mecanismos de destoxicación (Couillard *et al.* 1993). Una respuesta celular específica del organismo a un ambiente contaminado por metales es la inducción de metalotioneínas (MTs). Esta hipótesis aún está en discusión (Romero-Isart y Vasák 2002) ya que existen otros contaminantes que pueden inducir la producción de MTs (e.g., especies reactivas del oxígeno, estrés físico, o una infección). No obstante, la producción de MTs causada por otros agentes generalmente es menor que la causada por los

of metal exposure in aquatic organisms (Roesijadi 1999, Oliver and Fisher 1999, Domouhssidou *et al.* 2004). First described by Margoshes and Vallee (1957) in equine renal cortex, MTs have been identified in many other organisms (e.g., fish, molluscs, crustaceans) but share common properties such as low molecular weight, high content of cystein residues, no aromatic amino acids, and heat and acid stability (Carpéne 1993, Stillman 1995, Bebianno *et al.* 2004).

The objective of this study was to determine the bioaccumulation of total As in the whole soft tissues of *C. fluminea* after four weeks of exposure to different concentrations in water. In addition, we aimed to study the distribution of As in soft tissues and processed cytosolic fractions for MT quantification to determine the correlation between the induction of MT-like proteins and the As concentrations in both fractions. This study also evaluated the ability of *C. fluminea* to regulate this metalloid and neutralize the potential toxic effects.

## Material and methods

### Experimental procedure

The biological material used to carry out the experiments was the fresh-water mollusc *C. fluminea*. Animals were collected from the Minho River (northern Portugal) in December 2005 and then maintained under laboratory conditions in a system of tanks with recirculated, filtered, and continuously aerated tap water, at a constant temperature of  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . After a two-week period of acclimatization, 100 individuals (soft body mass =  $1.6 \pm 0.3$  g; shell length =  $1.9 \pm 0.2$  cm) were randomly distributed in ten 20-L polyvinyl tanks and exposed to different nominal concentrations of trivalent As (0, 100, 300, 500, and  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ ) added to the water in each tank at the beginning of the experiment. A solution was prepared from standard inorganic trivalent As purchased from Aldrich (St. Louis, MO, USA), to which distilled water was added to obtain a final concentration of  $100 \text{ mg L}^{-1}$ . Aliquots of this solution were added to test tanks according to the nominal concentrations intended. The assay was static and carried out over 28 days, in duplicate, at  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , using dechlorinated tap water, with continuous aeration and constant photoperiod (12 h light:12 h dark). Two tanks with tap water (chlorine free) were used as control. Some physicochemical parameters were monitored daily: temperature and pH using an Orion potentiometer (model 290, Orion Research Inc., USA), and electrical conductivity using an Orion conductivity-salinity meter (model 140, Orion Research Inc., Germany). The bivalves were fed minced fish pellets daily (Dibaq, Spain). Organisms were sampled after 28 days of exposure, and soft tissues were removed using a scalpel to cut the adductor muscles and force open the valves. Fresh soft tissues were weighed (fresh weight) and dried in a forced air oven at  $60^\circ\text{C}$  for five days (dry weight), and then stored at  $-80^\circ\text{C}$  for further analysis. The length of the shell was also recorded. Samples of water from each tank were taken at the beginning and end of the assay for the determination of the total As concentration.

metales (Kagi 1993), por lo que se ha propuesto el uso de las MTs como un biomarcador potencial en el monitoreo ambiental de organismos acuáticos expuestos a metales (Roesijadi 1999, Oliver y Fisher 1999, Domouhssidou *et al.* 2004). La producción de MTs fue descrita por primera vez por Margoshes y Vallee (1957) en la corteza renal de equinos; desde entonces ésta ha sido identificada en otros organismos como peces, moluscos y crustáceos, con las siguientes propiedades comunes: bajo peso molecular, alto contenido de residuos de cisteína, ausencia de aminoácidos aromáticos, y estabilidad térmica y ácida (Carpéne 1993, Stillman 1995, Bebianno *et al.* 2004).

El objetivo de este trabajo fue determinar la bioacumulación de As total en los tejidos blandos de *C. fluminea* después de cuatro semanas de exposición a diferentes concentraciones de este elemento en agua. Además, se estudió la distribución de As en los tejidos blandos y las fracciones citosólicas procesadas para la cuantificación de las MTs a fin de determinar la correlación entre la inducción de proteínas similares a las MTs y las concentraciones de As en ambas fracciones. También se evaluó la capacidad de *C. fluminea* para regular este metaloide y neutralizar su potencial tóxico.

## Materiales y métodos

### Procedimiento experimental

El material biológico usado para realizar los experimentos fue el molusco de agua dulce *C. fluminea*. Los individuos de esta especie se recogieron del Río Miño (norte de Portugal) en diciembre de 2005 y se llevaron al laboratorio donde se mantuvieron en tanques de agua con recirculación, filtrada y continuamente aireada, a una temperatura constante de  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . Después de un periodo de aclimatización de dos semanas, 100 individuos (masa de tejido =  $1.6 \pm 0.3$  g; longitud de concha =  $1.9 \pm 0.2$  cm) se distribuyeron al azar en 10 tanques de polivinilo de 20 L y fueron expuestos a diferentes concentraciones nominales de As (III) (0, 100, 300, 500 y  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ ), añadido al principio de cada experimento. Las soluciones de As fueron preparadas a partir de una solución de As inorgánico trivalente estándar Aldrich (St. Louis, MO, EUA), diluida con agua destilada hasta una concentración final de  $100 \text{ mg L}^{-1}$ . Se agregaron alícuotas de esta solución a los tanques experimentales según las concentraciones nominales requeridas. El experimento fue estático, y se realizó por duplicado a  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , durante 28 días usando agua potable sin cloro y un fotoperiodo constante (12 h luz:12 h oscuridad). Se usaron dos tanques con agua de la llave (sin cloro) como control, en los que diariamente se monitorearon temperatura y pH con un potenciómetro Orion 290 (Orion Research Inc., EUA), y conductividad eléctrica mediante un medidor de conductividad y salinidad Orion 140 (Orion Research Inc., Alemania). Los bivalvos fueron alimentados diariamente con ración para peces (Dibaq, España). Después de 28 días de exposición al As, los organismos se sacaron de los tanques y, después de usar un bisturí para cortar los

### *Histology and histochemistry*

Subsamples of *C. fluminea* soft tissues were taken and fixed in Bouin-Hollande's solution for 48 h. The samples were processed using the standard histological procedures described by Martoja and Martoja (1967). After paraffin inclusion, sections 5–7  $\mu\text{m}$  thin were stained with haematoxylin and eosin, and mounted for microscope observation. The histochemistry was performed according to Castel's method as described by Lillie (1965) to reveal As granules in the tissues. The effects on the tissues were assessed through histological and histochemical observation, using an optical microscope (Leica-ATC 2000, Wetzlar, Germany).

### *Quantification of metallothioneins*

The procedures adopted to determine MTs were previously described by Olafson (1981), and Thompson and Cosson (1984). Briefly, MTs were extracted by homogenizing the soft tissues from *C. fluminea* in Tris-HCl (0.02 M, pH = 8.6) in a volume ratio of 1:4 (tissue:buffer), in an ice-bath, using a rotor equipped with a TFE pestle (Heidolph-RZR 2100, Heidolph Elektro GmbH & Co. KG, Kelheim, Germany). Subsamples were then taken for wet:dry weight ratio determinations and metal analysis. The remaining homogenate (3 mL) of each sample was centrifuged ( $30,000 \times g$  at  $4^\circ\text{C}$ ) for 1 h. The cytosol (supernatant) was separated from the pellet, placed in a  $80^\circ\text{C}$  water bath for 10 min to denature high molecular weight and non-heat stable proteins, followed by centrifugation ( $30,000 \times g$  at  $4^\circ\text{C}$ ) for 1 h. The cytosolic fractions obtained were stored at  $-80^\circ\text{C}$  for MT determination. The quantification of MTs in the heat-treated cytosolic fraction was carried out by differential pulse polarography for thiolic ( $-\text{SH}$ ) compounds, using the Brdička reaction. The determination was carried out using a Metrohm 694 stand and 693 processor (Metrohm Ltd., Herisau, Switzerland), with a static mercury drop electrode, according to the methods described by Thompson and Cosson (1984) and Olafson and Olsson (1991). The three-electrode system consisted of a bevelled capillary mercury electrode, a platinum counter electrode, and an Ag/AgCl reference electrode. The Brdička supporting electrolyte was prepared weekly according to the method proposed by Palecek and Pechan (1971) and Thompson and Cosson (1984), and contained 1 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1 M  $\text{NH}_4\text{OH}$ , and 2 mM  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ , being stored at  $4^\circ\text{C}$ . Triton x-100 (Sigma, St. Louis, MO, USA) at an appropriate concentration of  $2.5 \times 10^{-2} \%$  (v/v) was used to suppress secondary maxima and minima and eliminate baseline noise (Bebiano and Langston 1989). Given the absence of a molluscan MT, a rabbit liver MT (forms I and II, Sigma, St. Louis, MO, USA) was used as a standard, prepared to a working standard solution of 10 mg  $\text{L}^{-1}$  in deionized water. The measurements were performed by adding 20 mL of supporting electrolyte directly into the polarographic cell, together with 250  $\mu\text{L}$  of Triton x-100 and aliquots of standard solution of rabbit MT (250  $\mu\text{L}$ ) and sample (25–150  $\mu\text{L}$ ). The cell was

músculos aductores y abrirlos, se les extrajeron los tejidos blandos. Estos fueron pesados (peso húmedo) y secados en una estufa de aire forzado a  $60^\circ\text{C}$  durante cinco días (peso seco), y luego se almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su posterior análisis. Se registró la longitud de la concha de cada individuo y se tomaron muestras de agua de cada tanque al principio y al final del experimento para determinar la concentración total de As.

### *Histología e histoquímica*

Se fijaron submuestras del tejido de *C. fluminea* en una solución de Bouin-Hollande por 48 h, que fueron tratadas usando los procedimientos histológicos estándares descritos por Martoja y Martoja (1967). Después de su inclusión en parafina, se tiñeron secciones de 5 a 7  $\mu\text{m}$  de espesor con hematoxilina y eosina, y se montaron para su observación al microscopio. La histoquímica se realizó siguiendo el método de Castel según lo descrito por Lillie (1965) para observar los gránulos de As en los tejidos. La investigación histológica e histoquímica de los efectos del As en los tejidos se hizo usando un microscopio óptico (Leica-ATC 2000, Wetzlar, Alemania).

### *Cuantificación de las metalotioneínas*

El procedimiento para determinar las MTs fue previamente descrito y utilizado por Olafson (1981) y Thompson y Cosson (1984). Brevemente, se extrajeron las MTs mediante la homogeneización del tejido blando de *C. fluminea* en Tris-HCl (0.02 M, pH = 8.6) en una proporción 1:4 (tejido:tampón), en un baño de hielo, usando un rotor equipado con un martillo TFE (Heidolph-RZR 2100, Heidolph Elektro GmbH & Co. KG, Kelheim, Alemania). Subsecuentemente se tomaron submuestras para las determinaciones de las razones de peso húmedo:seco y el análisis del As. Una fracción del homogeneizado (3 mL) de cada muestra se centrifugó ( $30,000 g$  a  $4^\circ\text{C}$ ) durante 1 h. Se separó el citosol (sobrenadante) del sedimento y se colocó en un baño de agua a  $80^\circ\text{C}$  por 10 min para desnaturalizar las proteínas de alto peso molecular y las térmicamente inestables, seguido por centrifugación ( $30,000 g$  a  $4^\circ\text{C}$ ) durante 1 h. La fracción citosólica así obtenida fue guardada a  $-80^\circ\text{C}$  para la determinación de las MTs. La cuantificación de las MTs en la fracción citosólica tratada térmicamente fue hecha utilizando polarografía de pulso diferencial para los grupos tiólicos ( $-\text{SH}$ ), usando la reacción de Brdička. La determinación fue realizada usando una base Metrohm 694 y un procesador 693 (Metrohm Ltd., Herisau, Suiza), con un electrodo de gota de mercurio, siguiendo los métodos descritos por Thompson y Cosson (1984) y Olafson y Olsson (1991). El sistema de triple electrodo estaba compuesto por un electrodo capilar de mercurio, un electrodo de platino, y un electrodo de referencia de Ag/AgCl. El electrolito soporte de Brdička se preparó semanalmente siguiendo el método propuesto por Palecek y Pechan (1971) y Thompson y Cosson (1984), consistente en  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1 M,  $\text{NH}_4\text{OH}$  1 M y  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$  2 mM, y se almacenó a  $4^\circ\text{C}$ . Se usó Triton x-100 ( $2.5 \times 10^{-2} \%$  (v/v) Sigma, St. Louis, MO, EUA) para eliminar la línea máxima secundaria y la

purged with purified nitrogen for 120 sec before analysis (Thompson and Cosson 1984). The MT concentrations were determined using the standard additions method according to Bebianno and Langston (1989), and the results are expressed as  $\text{mg g}^{-1}$  dry weight whole body homogenate.

#### Determination of arsenic

Soft tissue samples were dried at  $60^{\circ}\text{C}$  for five days, followed by digestion with concentrated nitric acid (5 mL of  $\text{HNO}_3^-$  Suprapur, Merck, Darmstadt, Germany) in pressurized Teflon cells over 24 h at room temperature. The samples were then heated at  $100^{\circ}\text{C}$  for 4 h, before adding 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Bryan *et al.* 1985). After waiting 1 h, digested samples were diluted in 25 mL of ultrapure water (Milli-Q plus).

Water samples ( $n = 3$  per each experimental condition) were collected in polyethylene bottles at the beginning and the end of the assay and acidified with  $10 \mu\text{L mL}^{-1}$   $\text{HNO}_3$  (Suprapur, Merck, Darmstadt, Germany). Samples were stored at  $4^{\circ}\text{C}$ . Arsenic was determined by electrothermal atomic absorption spectrometry (GFAAS) with Zeeman correction and matrix modifier ( $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , Fluka), using a graphite tube atomizer (AAS, Thermoptec M6Solaar), without filtration, after dilution with ultrapure water. Standard solutions were prepared from a commercial inorganic As standard for atomic absorption (N 206962,  $1 \text{ g L}^{-1}$ , Aldrich, USA). The total As concentration was determined using a standard calibration curve. The detection and quantification limits were 3.1 and  $9.3 \mu\text{g L}^{-1}$ , calculated according to the  $3\sigma$  and  $10\sigma$  criteria, respectively.

Quantification of total As in digested tissue samples was achieved by electrothermal atomic absorption using the same procedure aforesaid. The reference material DOLT 3 (NRC-CNRC, Canada) and blanks were analyzed in order to validate the analytical procedure analysis, using the same analytical procedure as for the samples. The total As measured from the digested samples of reference material ( $9.4 \pm 0.3 \text{ mg kg}^{-1}$ ;  $n = 2$ ) showed good agreement with the certified values ( $10.2 \pm 0.5 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Concentrations are expressed on a dry tissue weight basis ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ).

#### Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the nonparametric Mann-Whitney  $U$  test to determine differences between treatment and control samples. Correlations were performed using the nonparametric Spearman rank-order correlation coefficient ( $R$ ). The Statistica 5.0 software (StatSoft Inc., USA, 1995) was used in all statistics using a 0.01 level of significance.

#### Results

Throughout the 28-day experimental period no mortality was registered regardless of treatment. The physicochemical parameters were stable and showed good values during the

mínima y para eliminar la línea de base (Bebianno y Langston 1989). Debido a la falta de un estándar de MT específicamente de molusco, se utilizó como estándar MT de hígado de conejo (formas I y II, Sigma, St Louis, MO, EUA), preparada en agua desionizada a una concentración de  $10 \text{ mg L}^{-1}$ . Para realizar las mediciones se agregaron 20 mL del electrolito soporte directamente en la celda polarográfica, junto con 250  $\mu\text{L}$  de Triton x-100 y alícuotas de la solución estándar de MT de conejo (250  $\mu\text{L}$ ) y de muestra (25–150  $\mu\text{L}$ ). La celda fue purgada con nitrógeno purificado por 120 seg antes del análisis (Thompson y Cosson 1984). Se determinaron las concentraciones de MTs mediante el método de adiciones estándar según Bebianno y Langston (1989), y los resultados se expresaron en  $\text{mg g}^{-1}$  de peso seco del material homogeneizado.

#### Determinación del arsénico

Las muestras de tejido blando se secaron a  $60^{\circ}\text{C}$  por cinco días, siendo después disueltas en bombas de digestión presurizadas durante 24 h con ácido nítrico concentrado (5 mL de  $\text{HNO}_3^-$  Suprapur, Merck, Darmstadt, Alemania) en celdas de Teflón a temperatura ambiente. Después las muestras se calentaron a  $100^{\circ}\text{C}$  por 4 h, antes de añadir 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Bryan *et al.* 1985). Después de esperar 1 h, las muestras fueron diluidas en 25 mL de agua ultrapura (Milli-Q plus).

Las muestras de agua ( $n = 3$  por cada condición experimental) se recogieron en botellas de polietileno al principio y final de cada experimento y se acidificaron con  $10 \mu\text{L mL}^{-1}$   $\text{HNO}_3$  (Suprapur, Merck, Darmstadt, Alemania), almacenándose a  $4^{\circ}\text{C}$ . El As se determinó mediante espectrometría de absorción atómica electrotermal (GFAAS) con corrección por efecto Zeeman y modificación de matrices ( $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , Fluka), usando un atomizador de tubo de grafito (AAS, Thermoptec M6Solaar), sin filtración, después de ser diluidas con agua ultrapura. Se prepararon soluciones estándar a partir de un estándar de As inorgánico comercial para absorción atómica (N 206962,  $1 \text{ g L}^{-1}$ , Aldrich, EUA). La concentración total de As se determinó mediante una curva de calibración estándar. Los límites de detección y cuantificación fueron 3.1 y  $9.3 \mu\text{g L}^{-1}$ , calculados con los criterios de  $3\sigma$  y  $10\sigma$ , respectivamente.

La cuantificación del As total en las muestras de tejido disueltas se realizó mediante absorción atómica electrotermal usando el mismo procedimiento que para las muestras de agua. Se analizaron el material de referencia DOLT 3 (NRC-CNRC, Canadá) y los blancos para validar el método analítico siguiendo el mismo procedimiento analítico que para las muestras. El As total medido en el material de referencia ( $9.4 \pm 0.3 \text{ mg kg}^{-1}$ ;  $n = 2$ ) concordó en buena medida con los valores certificados ( $10.2 \pm 0.5 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Las concentraciones se expresaron en relación a peso de muestra seca ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ).

#### Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el test no paramétrico  $U$  de Mann-Whitney para determinar las diferencias entre las

Table 1. Total As concentrations (mean  $\pm$  SD) measured in water samples at the beginning and end of the experiment ( $n = 3$ , each replicate).

Tabla 1. Concentraciones de As total (media  $\pm$  DE) medidas en las muestras de agua al principio y al final del experimento ( $n = 3$ , cada réplica).

	Control	Treatment ( $\mu\text{g As L}^{-1}$ )			
		100	300	500	1000
Initial concentration	$<3 \mu\text{g L}^{-1}$	$98 \pm 6$	$297 \pm 5$	$495 \pm 8$	$993 \pm 5$
Final concentration	$<3 \mu\text{g L}^{-1}$	$94 \pm 3$	$289 \pm 3$	$475 \pm 5$	$971 \pm 4$

Limit of detection:  $3.1 \mu\text{g L}^{-1}$

experiments: temperature,  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ; pH,  $7.0 \pm 0.2$ ; and conductivity,  $545 \pm 10 \mu\text{S cm}^{-1}$ . The measurements of total As in water samples at the beginning and at the end of the experiment are shown in table 1.

The results obtained for total As accumulated in soft tissues from *C. fluminea* are shown in figure 1. The highest average level ( $145 \pm 26 \mu\text{g g}^{-1}$  d.w.) was determined in soft tissues from organisms exposed to  $1000 \mu\text{g As L}^{-1}$ . The lowest average level ( $0.7 \pm 0.1 \mu\text{g g}^{-1}$  d.w.) was measured in the cytosolic fraction of the control group. The statistical analysis of the results showed that total As concentrations determined in exposed organisms were significantly different ( $P < 0.01$ ) from those of the controls in all treatments and in whole tissues, as well as the cytosolic fraction. The quantified levels of MTs for the different exposure concentrations are also shown in figure 1. The average MT concentrations per test ranged from  $6.8 \pm 1.2 \text{ mg g}^{-1}$  (d.w.), in the control group, to  $19.1 \pm 3.7 \text{ mg g}^{-1}$  (d.w.), in organisms exposed to  $100 \mu\text{g As L}^{-1}$ . The statistical analyses showed that MT-like protein induction was significantly different ( $P < 0.01$ ) from controls in all treatments. Statistics showed a significant correlation ( $R = 0.6$ ,  $P < 0.01$ ) between cytosolic As and MT-like proteins; however, only a marginally significant correlation ( $R = 0.3$ ,  $P = 0.09$ ) was

muestras y los controles. Las correlaciones se hicieron usando el test no paramétrico "Spearman Order Rank Correlations  $R$ ". Para toda la estadística se usó el paquete Statistica 5.0 (StatSoft Inc., EUA, 1995), con un nivel de significancia de 0.01.

### Resultados

Independientemente del nivel de As estudiado no se registró mortandad en los ensayos a lo largo del periodo experimental de 28 días. Los parámetros fisicoquímicos se mantuvieron estables con buenos valores durante todo el experimento (temperatura,  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ; pH,  $7.0 \pm 0.2$ ; conductividad,  $545 \pm 10 \mu\text{S cm}^{-1}$ . En la tabla 1 se presentan las medidas de As total en las muestras objeto de estudio al principio y final del experimento.

Los resultados obtenidos para la acumulación de As total en los tejidos blandos de *C. fluminea* se muestran en la figura 1. El mayor valor medio ( $145 \pm 26 \mu\text{g g}^{-1}$  p.s.) fue obtenido en los tejidos blandos de organismos expuestos a  $1000 \mu\text{g As L}^{-1}$ . El menor valor medio ( $0.7 \pm 0.1 \mu\text{g g}^{-1}$  p.s.) se midió en la fracción citosólica del grupo control. El análisis estadístico de los resultados mostró que las concentraciones de As total determinadas en los organismos expuestos en todos los tratamientos fueron significativamente diferentes ( $P < 0.01$ ) a las de los organismos controles no expuestos. Este resultado se verificó para todo los niveles de As estudiados y para los dos tipos de muestra, tejido completo y fracción citosólica. En la figura 1 también se muestran los valores de MTs para los diferentes niveles de exposición al As. Las concentraciones medias de las MTs por experimento variaron de  $6.8 \pm 1.2 \text{ mg g}^{-1}$  (p.s.) en el grupo control, a  $19.1 \pm 3.7 \text{ mg g}^{-1}$  (p.s.) en los organismos expuestos a  $100 \mu\text{g As L}^{-1}$ . Los análisis estadísticos mostraron que la inducción de MTs en las muestras problemas fue significativamente diferente ( $P < 0.01$ ) de los controles en todos los tratamientos. Se encontró una correlación significativa ( $R = 0.6$ ,  $P < 0.01$ ) entre el As presente en la fracción citosólica y las MTs. No obstante, sólo se encontró una correlación marginalmente significativa ( $R = 0.3$ ,  $P = 0.09$ ) entre las muestras de tejido completo y las proteínas MTs. De cualquier manera se encontró una correlación significativa ( $R = 0.7$ ,  $P < 0.01$ ) entre el As presente en los tejidos y el As encontrado en la fracción citosólica. Los porcentajes de As total determinados en la fracción citosólica variaron de 5.5% en los controles a 17.3% en los organismos expuestos a  $100 \mu\text{g As L}^{-1}$  en relación con el As en los tejidos (fig. 2).

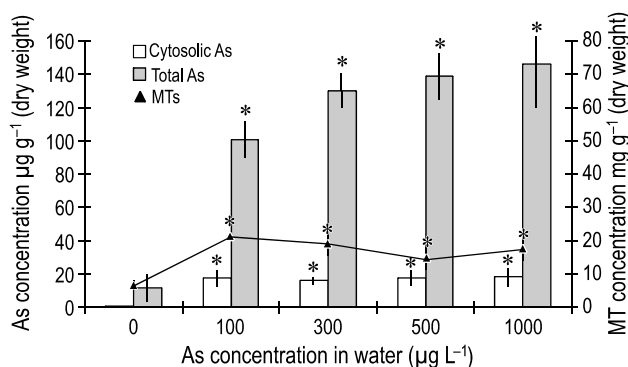
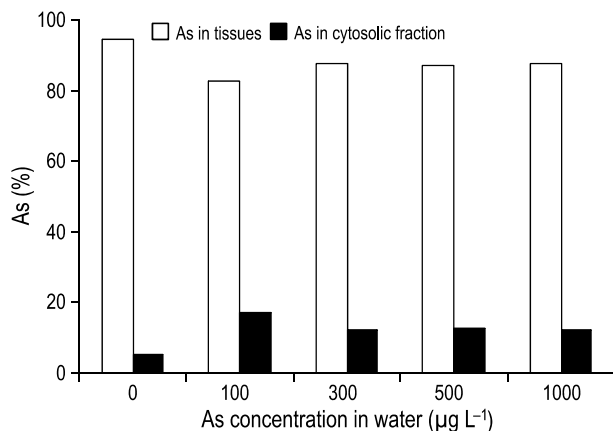


Figure 1. Concentration of metallothioneins (mean  $\pm$  SD  $\text{mg g}^{-1}$  dry weight), and concentration of As in the soft tissues and in the cytosolic fraction (mean  $\pm$  SD  $\mu\text{g g}^{-1}$  dry weight) of tested organisms. \* Significant differences from controls ( $P < 0.05$ ).

Figura 1. Concentración de metalotioneínas (media  $\pm$  DE  $\text{mg g}^{-1}$  peso seco) y de As en los tejidos blandos y en la fracción citosólica (media  $\pm$  DE  $\mu\text{g g}^{-1}$  peso seco) de los organismos estudiados. \* Diferencias significativas en relación con los controles ( $P < 0.05$ ).



**Figure 2.** Distribution of As in soft tissues and in the heat-treated cytosolic fraction.

**Figura 2.** Distribución del As en los tejidos blandos y en la fracción citosólica tratada con calor.

found between whole tissue As and MT-like proteins. Nonetheless, a better significant correlation ( $R = 0.7$ ,  $P < 0.01$ ) was observed between As in tissues and cytosolic As. The percentages of total As determined in the cytosolic fraction ranged from 5.5% in controls to 17.3% in organisms exposed to 100 µg As L<sup>-1</sup> relative to As in soft tissues (fig. 2).

The histochemical evaluation results support the bioaccumulation results, revealing that As granules are present in the tissues of *C. fluminea* exposed to the different As concentrations, mainly in the cells of the digestive gland (fig. 3). The histological observations also showed that organisms, especially those exposed to 1000 µg As L<sup>-1</sup>, have degeneration of the cells from the digestive gland.

## Discussion

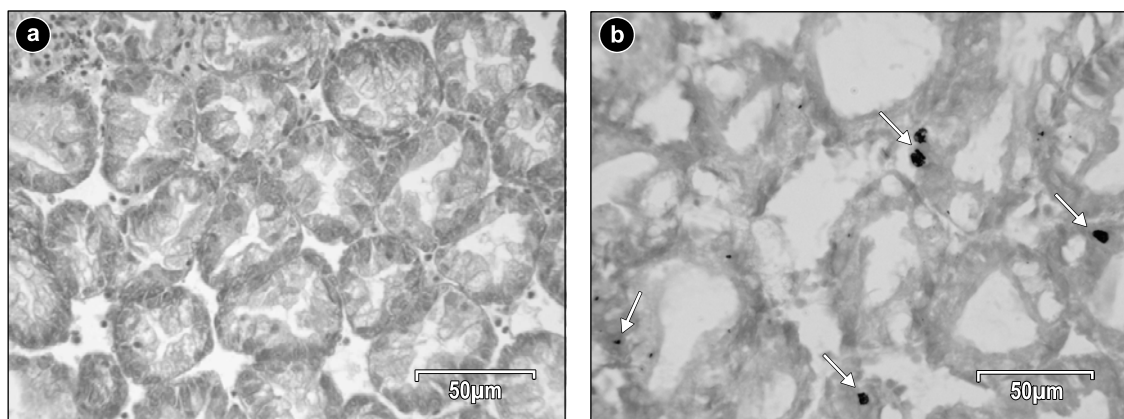
The total As concentrations found in the tissues of the control organisms are in agreement with the levels reported by

Los resultados de la evaluación son consistentes con el fenómeno de bioacumulación, encontrándose gránulos de As en los tejidos de individuos de *C. fluminea* expuestos a diferentes concentraciones de As, principalmente en las células de la glándula digestiva (fig. 3). Las observaciones histológicas también mostraron que los bivalvos, especialmente los expuestos a 1000 µg As L<sup>-1</sup>, presentaron degeneración de las células de la glándula digestiva.

## Discusión

Las concentraciones de As total encontradas en los tejidos de los organismos control son del orden de las encontradas por otros autores en las mismas especies (Johns y Luoma 1990), y también en otras especies de bivalvos tales como ostras, almejas y otro tipo de bivalvos (Suñer *et al.* 1999, Valette-Silver *et al.* 1999, Argese *et al.* 2005, Orescanin *et al.* 2006, Santos *et al.* 2007). Las concentraciones de As encontradas en las muestras de tejido mostraron un incremento significativo ( $P < 0.01$ ) después de 28 días de exposición según los diferentes tratamientos estudiados. De igual manera, los niveles de As total encontrados en las fracciones citosólicas indicaron un incremento significativo ( $P < 0.01$ ) y mostraron una buena correlación con el As presente en las muestras de tejidos ( $R = 0.7$ ,  $P < 0.01$ ). Los niveles de As encontrados en el agua mostraron una disminución al final del periodo experimental para todas las concentraciones estudiadas. Esta diferencia puede atribuirse a la bioacumulación del As y, eventualmente, a la adsorción del As en las paredes de los tanques.

Las MTs han sido usadas como biomarcadores de exposición a niveles elevados de metales, donde su inducción normalmente se asocia con elevaciones en la concentración de metales en los tejidos, lo que sugiere una correspondencia entre los metales bioacumulados y la inducción en la producción de MTs (Bebianno y Langston 1993, Roesijadi 1994). La detección e identificación de MTs en tejidos de *C. fluminea* es



**Figure 3.** (a) Digestive gland cells of a control organism and (b) histochemical detection of As granules within digestive gland cells of an organism exposed to 1000 µg As L<sup>-1</sup>. → As granules.

**Figura 3.** (a) Células de la glándula digestiva de un organismo control y (b) detección histoquímica de los gránulos de As dentro de células de las glándulas digestivas de un organismo expuesto a 1000 µg As L<sup>-1</sup>. → Gránulos de As.

other authors for the same species (Johns and Luoma 1990), as well as for other bivalve species such as oysters, clams, and mussels (Suñer *et al.* 1999, Valette-Silver *et al.* 1999, Argese *et al.* 2005, Orescanin *et al.* 2006, Santos *et al.* 2007). The results of total As accumulated in whole soft tissues showed a significant increase ( $P < 0.01$ ) after 28 days of exposure according to the different treatments. Similarly, total As levels found in the cytosolic fractions registered a significant increase ( $P < 0.01$ ) and showed a good correlation with As in whole soft tissues ( $R = 0.7$ ,  $P < 0.01$ ). The levels of total As found in the water samples showed a decrease at the end of the experimental period for all tested concentrations. This difference can be due to As bioaccumulation and eventually to As adsorption on the tank walls.

The MT-like proteins have been used as biomarkers of exposure to high levels of metals, where an induction is usually associated with elevations in tissue metal concentration, suggesting a correspondence between bioaccumulated metals and MT-like protein induction (Bebianno and Langston 1993, Roesijadi 1994). The detection and identification of MT-like proteins from *C. fluminea* tissues is a common procedure and has been done in previous studies (Baudrimont *et al.* 1997, Marie *et al.* 2006, Diniz *et al.* 2007), showing protein fractions consistent with the typical size of dimeric MTs (10–20 kDa) found in many aquatic invertebrate organisms. In addition, the same authors showed that this bivalve species is able to induce MT-like proteins when exposed to high metal concentrations. Our results show a significant increase in MT-like proteins for all tests when compared to controls but no significant differences were found between treatments, which may suggest that the capacity to sequester the metalloid is diminished as the result of an excess of total As, as also suggested by Baudrimont *et al.* (2003). The increase in total As concentrations observed in whole soft tissues was accompanied by a significant induction of MT-like proteins in comparison to the controls; however, the best correlation was found between the cytosolic fraction As and MT-like proteins ( $R = 0.6$ ,  $P < 0.01$ ), indicating a close relationship between the metalloid present in the cytosol and MT induction. These results suggest that, most probably, other detoxification mechanisms are involved in the neutralization of the toxic effects of As, by reducing the intracellular metal availability. Some of those mechanisms may be related to intracellular storage and sequestration of metals by vesicle-bound granules and other non-MT cytosolic proteins (Roesijadi and Robinson 1994, Baudrimont *et al.* 1999, Cecilio *et al.* 2006). Sebesvari *et al.* (2005) showed that this species is capable of actively regulating As, while Marie *et al.* (2006) reported that *C. fluminea* has more efficient detoxification mechanisms than another fresh-water bivalve, *Dreissena polymorpha*, even under exposure to higher concentrations of metals (namely Cd and Zn), probably due to a more efficient adaptive response. Moreover, the low percentages of total As found in the cytosol supports this hypothesis, suggesting that for the concentrations tested, *C. fluminea* is capable of regulating the excess of metalloid, at least to some extent,

un procedimiento frecuente y ya ha sido citada en estudios anteriores (Baudrimont *et al.* 1997, Marie *et al.* 2006, Diniz *et al.* 2007), en los cuales se muestra que este bivalvo es capaz de producir MTs cuando es expuesto a altas concentraciones de metales. Nuestros resultados muestran un incremento significativo en la producción de MTs en todos los experimentos en comparación con los controles, pero no se encontró ninguna diferencia significativa entre los diferentes tratamientos que sugiera que la capacidad para secuestrar As disminuya como resultado de un exceso de As total, como ha sido sugerido por Baudrimont *et al.* (2003). El aumento en las concentraciones de As total en los tejidos blandos estuvo acompañado por una inducción significativa de MTs en comparación con los controles. De cualquier manera, la mejor correlación se encontró entre el As de la fracción citosólica y las MTs ( $R = 0.6$ ,  $P < 0.01$ ), lo que indica una fuerte relación entre el metaloide presente en el citosol y la inducción de MTs. Estos resultados sugieren que, muy probablemente, hay otros mecanismos de detoxificación involucrados en la neutralización de los efectos tóxicos del As, al reducir la disponibilidad intracelular del metal. Algunos de estos mecanismos pueden estar relacionados con el almacenaje intracelular y el secuestro de metales por gránulos pegados a la vesícula y a otras proteínas no MTs citosólicas (Roesijadi y Robinson 1994, Baudrimont *et al.* 1999, Cecilio *et al.* 2006). Sebesvari *et al.* (2005) mostraron que esta especie es capaz de regular el As, y Marie *et al.* (2006) demostraron que *C. fluminea* posee mecanismos de detoxificación más eficaces que otro bivalvo de agua dulce, *Dreissena polymorpha*, incluso en el caso de altas concentraciones de metales (Cd y Zn), probablemente debido a una respuesta adaptativa más eficaz. El bajo porcentaje de As total encontrado en el citosol avala esta hipótesis, sugiriendo que para las concentraciones probadas, *C. fluminea* es capaz de regular el exceso del metaloide, por lo menos en algún grado, empleando diferentes mecanismos de detoxificación que pueden trabajar en conjunto para este propósito. Debe considerarse también que variables tales como tamaño, peso, diferencias fenotípicas, sexo, condiciones fisiológicas y reproductivas pueden influenciar la bioacumulación de metales (Martín-Díaz *et al.* 2006).

La histoquímica reveló la presencia de gránulos de As acumulados en los tejidos blandos de los bivalvos, principalmente en las células del tracto digestivo, lo que concuerda con los altos niveles de As total determinados en dichos tejidos, y que a su vez estuvieron directamente relacionados con las diferentes concentraciones a las que fueron expuestos.

El presente trabajo muestra que *C. fluminea* bioacumula As de acuerdo a las diferentes concentraciones de este metal en el agua. El aumento en la producción de MTs puede ser interpretado como una respuesta de detoxificación a la presión de la presencia de altas cantidades de As en solución. La concentración de As total encontrada en la fracción citosólica es mucho menor que la encontrada en el tejido blando, lo que confirma la hipótesis de que otros mecanismos de detoxificación diferentes a la producción de MTs tienen un papel importante en el proceso de detoxificación, ya que estas últimas son



using different detoxification mechanisms that may also act together for this purpose. In addition, it must be noted that biotic parameters such as body size and/or weight, phenotypic differences, sex, physiological conditions, and reproductive state may influence metal bioaccumulation (Martín-Díaz *et al.* 2006).

The histochemistry revealed the presence of As granules accumulated in the bivalve soft tissues, mostly in cells from the digestive gland, supporting the higher levels of total As determined in tissues according to the different exposure concentrations. These results emphasize the hypothesis of the participation of other detoxifying mechanisms other than As chelating by MTs.

The present study shows that *C. fluminea* bioaccumulates As according to different concentrations of this metalloid in water. The induction of MT-like proteins can be inferred as a detoxifying response to contamination pressure; however, the total As concentrations found in the cytosolic fractions were much lower than the total As found in whole soft tissues, supporting the hypothesis that other detoxifying mechanisms, besides MTs, play an important role in detoxification, since MTs are cytosolic proteins. This study also reinforces the suitability of using *C. fluminea* as a potential biological indicator of As contamination, but highlights the need to develop more studies using, for example, other types of biomarkers (e.g., reactive oxygen species, glutathione-S-transferase, lipid peroxidation) to complement the As ecotoxicologic traits found to this date in this bivalve.

## References

- Argese E, Bettiol C, Rigo C, Bertini S, Colombari S, Ghetti PF. 2005. Distribution of arsenic compounds in *Mytilus galloprovincialis* of the Venice lagoon (Italy). *Sci. Total Environ.* 348: 267–277.
- Baudrimont M, Metivaud J, Maury-Brachet R, Ribeyre F, Boudou A. 1997. Bioaccumulation and metallothionein response in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after experimental exposure to cadmium and inorganic mercury. *Environ. Toxicol. Chem.* 16: 2096–2105.
- Baudrimont M, Andres S, Metivaud J, Lapaquellerie Y, Ribeyre F, Maillat N, Latouche C, Boudou A. 1999. Field transplantation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (River Lot, France). II. Metallothionein response to metal exposure. *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 2472–2477.
- Baudrimont M, Andres S, Durrieu G, Boudou A. 2003. The key role of metallothioneins in the bivalve *Corbicula fluminea* during the depuration phase, after *in situ* exposure to Cd and Zn. *Aquat. Toxicol.* 63: 89–102.
- Bebiano MJ, Langston WJ. 1989. Quantification of metallothioneins in marine invertebrates using differential pulse polarography. *Portugal. Electrochim. Acta* 7: 511–524.
- Bebiano MJ, Langston WJ. 1993. Turnover rate of metallothionein and cadmium in *Mytilus edulis*. *Biometals* 6: 239–244.
- Bebiano MJ, Geret F, Hoarau P, Serafim MA, Coelho MR, Gnassia-Barelli M, Romeo M. 2004. Biomarkers in *Ruditapes decussatus*: A potential bioindicator species. *Biomarkers* 9: 305–330.
- Besada V, González JJ, Schultze F. 2006. Mercury, cadmium, lead, arsenic, copper and zinc concentrations in albacore, yellowfin tuna and bigeye tuna from the Atlantic Ocean. *Cienc. Mar.* 32: 439–445.
- Bilos C, Colombo JC, Presa MJR. 1998. Trace metals in suspended particles, sediments and Asiatic clams (*Corbicula fluminea*) of the Rio de La Plata Estuary, Argentina. *Environ. Pollut.* 99: 1–11.
- Bryan GW, Langston WJ, Hummerstone LG, Burt GR. 1985. A guide to the assessment of heavy-metal contamination in estuaries using biological indicators. *Occas. Publ. Mar. Biol. Assoc. UK* 4: 1–74.
- Carpéne E. 1993. Metallothionein in marine molluscs. In: Dallinger R (ed.), *Ecotoxicology of Metals in Invertebrates*. CRC, Boca Raton, pp. 55–72.
- Cecílio P, Raimundo J, Canário J, Vale C, Sequeira M. 2006. Relationships between total and organic mercury concentrations in tissues and length of common dolphins (*Delphinus delphis*) from the Portuguese coast. *Cienc. Mar.* 32: 379–387.
- Couillard Y, Campbell PGC, Tessier A. 1993. Response of metallothionein concentrations in a freshwater bivalve (*Anodonta grandis*) along an environmental cadmium gradient. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 2: 299–313.
- Diniz MS, Hugo Santos M, Costa PM, Peres I, Costa MH, Capelo JL. 2007. Metallothionein responses in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*) after exposure to trivalent arsenic. *Biomarkers* 12: 589–598.
- Domouhtsidou GP, Dailianis S, Kaloyianni M, Dimitriadis VK. 2004. Lysosomal membrane stability and metallothionein content in *Mytilus galloprovincialis* (L.), as biomarkers: Combination with trace metal concentrations. *Mar. Pollut. Bull.* 48: 572–586.
- Fernández N, Cesar A, González M, DelValls TA. 2006. Level of contamination in sediments affected by the *Prestige* oil spill and impact on the embryo development of the sea urchin. *Cienc. Mar.* 32: 421–427.
- IRAR. 2005. Instituto Regulador das Águas e dos Resíduos: Relatório Anual do Sector das Águas e Resíduos em Portugal (RASARP-2004). Vol. 4. Controlo da Qualidade da Água para Consumo Humano. 238 pp.
- Johns C, Luoma SN. 1990. Arsenic in benthic bivalves of San Francisco Bay and the Sacramento/San Joaquin River. *Sci. Tot. Environ.* 97: 673–684.
- Kagi JHR. 1993. Evolution, structure and chemical activity of class I metallothioneins: An overview. In: Suzuki KT, Imura N, Kimura M (eds.), *Metallothionein III*. Birkhauser Verlag, Switzerland, pp. 29–55.
- Lillie RD. 1965. *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry*. McGraw Hill, New York, 445 pp.
- Marie V, Baudrimont M, Boudou A. 2006. Cadmium and zinc bioaccumulation and metallothionein response in two freshwater bivalves (*Corbicula fluminea* and *Dreissena polymorpha*) transplanted along a polymetallic gradient. *Chemosphere* 65: 609–617.
- Margoshes M, Valee BL. 1957. A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.* 79: 4813–4814.
- Martín-Díaz ML, Riba I, Casado-Martínez MC, DelValls A. 2006. Bioavailability of metals in sediments from Spanish estuaries using *Carcinus maenas*. *Cienc. Mar.* 32: 412–420.

- Martoja R, Martoja M. 1967. Initiation aux Techniques de l'Histologie Animal. Masson et Cie., Paris, 345 pp.
- Mason RP, Laporte JM, Andres S. 2000. Factors controlling the bioaccumulation of mercury, methylmercury, arsenic, selenium, and cadmium by freshwater invertebrates and fish. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 38: 283–297.
- Mouthon J. 1981. Sur la presence en France et au Portugal de *Corbicula* (Bivalvia, Corbiculidae) originaire d'Asie. Basteria 45: 109–116.
- Mouthon J. 2001. Life cycle and population dynamics of the Asian clam *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Corbiculidae) in the Saone River at Lyon (France). Hydrobiologia 452: 109–119.
- Mouthon J. 2003. Longitudinal and temporal variations of density and size structure of *Corbicula fluminea* (Bivalvia) populations in the Saône and Rhône rivers (France). Ann. Limnol. – Int. J. Lim. 39: 15–25.
- Olafson RW. 1981. Differential pulse polarographic determination of murine metallothionein induction kinetics. J. Biol. Chem. 256: 1263–1268.
- Olafson RW, Olsson PE. 1991. Electrochemical detection of metallothionein. Meth. Enzymol. 205: 205–213.
- Oliver LM, Fisher WS. 1999. Appraisal of prospective bivalve immunomarkers. Biomarkers 4: 510–530.
- Orescanin V, Lovrencic I, Mikelic L, Barisic D, Matasin Z, Lulic S, Pezelj D. 2006. Biomonitoring of heavy metals and arsenic on the east coast of the middle Adriatic Sea using *Mytilus galloprovincialis*. Nucl. Instr. Meth. Phys. Res. B 245: 495–500.
- Palecek E, Pechan Z. 1971. Estimation of nanogram quantities of proteins by pulse polarographic techniques. Anal. Biochem. 42: 59–71.
- Prego R, Cobelo-García A, Marmolejo-Rodríguez J, Santos-Echeandía J. 2006. Trace elements in the *Prestige* fuel-oil spill: Levels and influence on Laxe Ria sediments (NW Iberian Peninsula). Cienc. Mar. 32: 179–186.
- Roesijadi G. 1994. Behavior of metallothionein-bound metals in a natural population of an estuarine mollusc. Mar. Environ. Res. 38: 147–168.
- Roesijadi G. 1999. The basis for increased metallothionein in a natural population of *Crassostrea virginica*. Biomarkers 4: 467–472.
- Roesijadi G, Robinson WE. 1994. Metal regulation in aquatic animals: Mechanisms of uptake, accumulation, and release. In: Malins DC, Ostrander GK (eds.), Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical, and Cellular Perspectives. CRC, Boca Raton, pp. 387–420.
- Romero-Isart N, Vasák M. 2002. Advances in the structure and chemistry of metallothioneins. J. Inorg. Biochem. 88: 388–396.
- Santos HM, Diniz M, Costa PM, Peres I, Costa MH, Alves S, Capelo JL. 2007. Toxicological effects and bioaccumulation in the freshwater clam (*Corbicula fluminea*) following exposure to trivalent arsenic. Environ. Toxicol. 22: 502–509.
- Sebesvari Z, Ettwig F, Emons H. 2005. Biomonitoring of tin and arsenic in different compartments of a limnic ecosystem with emphasis on *Corbicula fluminea* and *Dikerogammarus villosus*. J. Environ. Monit. 7: 203–207.
- Stillman MJ. 1995. Metallothioneins. Coord. Chem. Rev. 144: 461–511.
- Suñer MA, Devesa V, Muñoz O, López F, Montoro R, Arias AM, Blasco J. 1999. Total and inorganic arsenic in the fauna of the Guadalquivir estuary: Environmental and human health implications. Sci. Tot. Environ. 242: 261–270.
- Thompson JAJ, Cosson RP. 1984. An improved electrochemical method for the quantification of metallothioneins in marine organisms. Mar. Environ. Res. 11: 137–152.
- Valette-Silver NJ, Riedel GF, Creelius EA, Windom H, Smith RG, Dolvin SS. 1999. Elevated arsenic concentrations in bivalves from the southeast coasts of the USA. Mar. Environ. Res. 48: 311–333.
- Vahter M. 2002. Mechanisms of arsenic biotransformation. Toxicology 181: 211–217.
- Vidal ML, Bassères A, Narbonne JF. 2002. Seasonal variations of pollution biomarkers in two populations of *Corbicula fluminea* (Muller). Comp. Biochem. Physiol. C 13: 133–151.
- Waring J, Maher W. 2005. Arsenic bioaccumulation and species in marine Polychaeta. Appl. Organomet. Chem. 19: 917–929.
- WHO, World Health Organization. 2001. Arsenic and arsenic compounds. Environ. Health Crit. 224. Monograph, coord. Dr. J Ng, Geneva, pp. 61–167.

Recibido en febrero de 2008;

aceptado en julio de 2008.