

Acumulación de cobre y alteraciones histopatológicas en el ostión *Crassostrea angulata*Accumulation of copper and histopathological alterations in the oyster *Crassostrea angulata*A. Rodríguez de la Rúa<sup>1</sup>J.M. Arellano<sup>1</sup>M.L. González de Canales<sup>1</sup>J. Blasco<sup>2</sup>C. Sarasquete<sup>2\*</sup><sup>1</sup> Departamento de Biología

Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, UCA

Cádiz, Spain

<sup>2</sup> Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía, CSIC

Polígono Río San Pedro

Apartado oficial

11510, Puerto Real, Cádiz, Spain

\* E-mail: carmen.sarasquete@icman.csic.es,

Recibido en septiembre de 2003; aceptado en enero de 2005

**Resumen**

Ejemplares de ostión *Crassostrea angulata* fueron expuestos a concentraciones subletales de cobre (200 y 600  $\mu\text{g L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ ) durante un periodo de 2 a 30 días. Se cuantificó la concentración de cobre, así como las alteraciones histopatológicas inducidas en branquias, glándula digestiva y corazón. Las concentraciones más elevadas de cobre correspondieron a las branquias, con valores alrededor de 2  $\text{mg g}^{-1}$  peso seco en los organismos expuestos a la concentración más alta, al final del periodo de exposición (día 30). En la glándula digestiva la concentración alcanzada fue del orden de 1  $\text{mg g}^{-1}$  peso seco. La tasa de bioconcentración ( $BC_t$ ), definida como la diferencia entre la concentración en el tejido a una concentración de exposición a tiempo  $t$  y la concentración media del control a lo largo del experimento, dividida por el tiempo de exposición, disminuyó en ambos tejidos. Los valores variaron en el intervalo entre 392 y 57  $\mu\text{g g}^{-1} \text{d}^{-1}$  en las branquias y entre 133 y 18  $\mu\text{g g}^{-1} \text{d}^{-1}$  en la glándula digestiva. En branquias de ejemplares tratados con una concentración de 200  $\mu\text{g L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$  se observó una desorganización del tejido conjuntivo, alteraciones en la porción apical de las células ciliadas e hiperplasia y fusión de laminillas, pudiendo llegar incluso a la pérdida de estas laminillas a 600  $\mu\text{g L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ . En la glándula digestiva (hepatopáncreas) de ejemplares sometidos a 600  $\mu\text{g L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$  se detectó un adelgazamiento del epitelio y, en algunos casos, oclusión de la luz de los túbulos digestivos y dilatación de los conductos digestivos. En el corazón de los organismos expuestos a concentraciones subletales de cobre se observó un adelgazamiento del epitelio de las aurículas y del ventrículo, un incremento de las células marrones (*brown cells*) en las paredes de las aurículas, así como una distensión de las fibras musculares y destrucción del tejido conectivo de soporte, tanto en las aurículas como en el ventrículo.

*Palabras clave:* acumulación, alteraciones histopatológicas, cobre, *Crassostrea angulata*.

**Abstract**

Specimens of *Crassostrea angulata* were exposed to sublethal copper concentrations (200 and 600  $\mu\text{g L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ ) during 2 to 30 days. The accumulation of copper and histopathological effects on the gills, digestive gland and heart were studied. The highest copper concentrations were found in the gills, with values over 2  $\text{mg g}^{-1}$  dry weight for organisms exposed to the highest concentration at the end of the exposure period (day 30). In the digestive gland, the concentration was 1  $\text{mg g}^{-1}$  dry weight (highest exposure on day 30). The rate of bioconcentration ( $BC_t$ , defined as the concentration in the tissue at an exposure concentration at time  $t$  minus the mean concentration of the control throughout the experiment, divided by the exposure time) decreased in both tissues. The values ranged from 392 to 57  $\mu\text{g g}^{-1} \text{day}^{-1}$  for gills and from 133 to 18  $\mu\text{g g}^{-1} \text{d}^{-1}$  for the digestive gland. In the gills, specimens exposed to 200  $\mu\text{g L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$  showed disorganization and apical alterations of the cilia cells and hyperplasia, lamellar fusion and lamellar loss in organisms exposed to 600  $\mu\text{g L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ . In the digestive gland, specimens exposed to 200  $\mu\text{g L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$  showed hemocytic infiltration in the underlying connective tissue and numerous brown cells compared to the control specimens. On the other hand, thinning of the epithelium of the digestive tubules, occlusion in the lumen

of some primary tubules and dilation of the digestive ducts occurred in organisms exposed to  $600 \mu\text{g L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ . The heart of oysters exposed to copper showed thinning of the epithelium of the auricles and ventricle and an increase in brown cells on the walls of the auricles, as well as connective tissue destruction in the auricles and ventricle.

*Key words:* accumulation, histopathological alterations, copper, *Crassostrea angulata*.

## Introducción

Los metales engloban a un amplio conjunto de elementos que, en líneas generales, se caracterizan por ser no degradables, tener una elevada persistencia en el medio y ser susceptibles de ser incorporados y acumulados por los organismos (Allen-Gil *et al.*, 1997). Desde la década de los ochenta, se ha extendido el uso de biomarcadores en programas de monitorización de la contaminación ambiental. Entre los organismos biomonitores se han usado diferentes especies de moluscos bivalvos y peces (Blasco *et al.*, 2003), y como biomarcadores utilizados destacan, entre otros biomarcadores, métodos bioquímicos (actividades enzimáticas, lisosomas, peroxidación lipídica, proteínas de estrés, metalotioneínas, citocromo P<sub>450</sub>, etc.) y aproximaciones celulares (Moore, 1985; Cajaraville *et al.*, 1990, 2000; Soto y Marigómez, 1995; Marigómez *et al.*, 1995; Bernet *et al.*, 1999; Blasco *et al.*, 1999, 2003; Sarasquete y Segner, 2000; Sarasquete y Gutiérrez, 2004).

La histología (Capeta da Silva, 1997; Ortiz-Delgado *et al.*, 1999; Arellano *et al.*, 1999, 2001; Cargnin-Ferreira *et al.*, 2003; Arufe *et al.*, 2004; Hampel *et al.*, 2004), complementada con métodos específicos de histoquímica e inmunocitoquímica (Arellano *et al.*, 1999, 2001; Sarasquete y Segner, 2000; Ortiz-Delgado y Sarasquete, 2004), permite localizar daños tisulares, y conocer la distribución subcelular e inducción de biomarcadores específicos en tejidos diana.

El cobre es un elemento traza esencial para la vida de los organismos. Forma parte de la estructura de más de 30 enzimas y de otras moléculas (oxidases, hidrolasas, hemocianina, metalotioneínas, etc.) (Harris, 1991). Sin embargo, dependiendo de la especie, determinadas concentraciones de cobre pueden ser tóxicas para los organismos, produciendo considerables alteraciones fisiológicas e histopatológicas (Sarasquete *et al.*, 1992, 1997; Arellano *et al.*, 1999; Ortiz-Delgado *et al.*, 1999).

Diferentes especies de moluscos bivalvos (*Crassostrea angulata*, *Scrobicularia plana*, *Venerupis* sp., *Mytilus* sp.) han sido usados como biomonitores de la contaminación acuática (Blasco *et al.*, 1993, 1999, 2003; Díaz-Méndez *et al.*, 1998; López-Barea y Pueyo, 1998; DelValls *et al.*, 1999; Cajaraville *et al.*, 2000). Los bivalvos son indicadores adecuados de contaminación ambiental *in situ*, ya que poseen las siguientes y adecuadas características: son organismos sedentarios, muestran una alta capacidad de bioacumulación, son abundantes, de vida media larga, manejables y fácilmente aclimatables a las condiciones experimentales.

El ostión *Crassostrea angulata* Lamarck, 1819 es un molusco bivalvo de gran importancia en la región sudatlántica española, tanto desde el punto de vista ecológico como

## Introduction

Metals comprise a diverse group of elements that, in general terms, are non-degradable, are highly persistent in the environment and are readily incorporated and accumulated by organisms (Allen-Gil *et al.*, 1997). Since the 1980s, bioindicators have been widely used in environmental monitoring programs. Different species of bivalve molluscs and fishes have been used as biomonitoring organisms (Blasco *et al.*, 2003), and biochemical methods (enzymatic activities, lysosomes, lipid peroxidation, stress proteins, metallothionein, cytochrome P<sub>450</sub>, etc.) and cell approximations, among others, have been used as biomarkers (Moore, 1985; Cajaraville *et al.*, 1990, 2000; Soto and Marigómez, 1995; Marigómez *et al.*, 1995; Bernet *et al.*, 1999; Blasco *et al.*, 1999, 2003; Sarasquete and Segner, 2000; Sarasquete and Gutiérrez, 2004).

Histology (Capeta da Silva, 1997; Ortiz-Delgado *et al.*, 1999; Arellano *et al.*, 1999, 2001; Cargnin-Ferreira *et al.*, 2003; Arufe *et al.*, 2004; Hampel *et al.*, 2004), together with specific histochemical and immunocytochemical methods (Arellano *et al.*, 1999, 2001; Sarasquete and Segner, 2000; Ortiz-Delgado and Sarasquete, 2004), allow the identification of tissue damage and of subcellular distribution and induction of specific biomarkers in target tissues.

Copper is an essential trace element for all living organisms. It forms part of the structure of more than 30 enzymes and of other molecules (oxidases, hydrolases, hemocianine, metallothioneins, etc.) (Harris, 1991). Nevertheless, depending on the species, certain concentrations of copper can be toxic to organisms, producing significant physiological and histopathological alterations (Sarasquete *et al.*, 1992, 1997; Arellano *et al.*, 1999; Ortiz-Delgado *et al.*, 1999).

Different species of bivalve molluscs (e.g., *Crassostrea angulata*, *Scrobicularia plana*, *Venerupis* sp. and *Mytilus* sp.) have been used as biomonitors of aquatic pollution (Blasco *et al.*, 1993, 1999, 2003; Díaz-Méndez *et al.*, 1998; López-Barea and Pueyo, 1998; DelValls *et al.*, 1999; Cajaraville *et al.*, 2000). Bivalves are suitable indicators of *in situ* environmental contamination because they possess the following characteristics: they are sedentary organisms, abundant, show high bioaccumulation capacity, have a long life span, and are easily handled and acclimated to experimental conditions.

The oyster *Crassostrea angulata* Lamarck, 1819 is an important bivalve mollusc in the Spanish South Atlantic region, from both an ecological and commercial point of view. The high concentrations of copper often found in oysters (Galtsoff, 1964; Establier, 1977; George *et al.*, 1978; Capeta da Silva, 1997; Blasco *et al.*, 1999), compared with other bivalves

comercial. Las altas concentraciones de cobre que, a menudo, presentan los ostiones (Galtsoff, 1964; Establier, 1977; George *et al.*, 1978; Capeta da Silva, 1997; Blasco *et al.*, 1999) en relación a otros bivalvos (Establier, 1977; Blasco *et al.*, 2003) puede ser explicada por la gran capacidad que posee esta especie para acumular cobre en sus diferentes compartimentos celulares, neutralizar sus efectos tóxicos, y excretar/eliminar el contaminante mediante diferentes estrategias fisiológicas (López-Artíguez *et al.*, 1989; Cheung y Wong, 1992; Capeta da Silva, 1997; Sarasquete *et al.*, 1997; Rodríguez de la Rúa, 1999). Aunque precisamente por estas características (biodisponibilidad, biomagnificación, concentraciones ambientales, etc.) algunos autores desaconsejan su uso como bioindicadores, trabajos recientes (DeValls *et al.*, 1999) realizados experimentalmente mediante trasplantes, ponen de manifiesto un incremento de la acumulación de metales con el tiempo de exposición, y con la concentración ambiental, sugiriendo la adecuada utilidad del ostión en programas de biomonitorización ambiental.

El objetivo de este trabajo fue estudiar las alteraciones histopatológicas en branquias, glándula digestiva y corazón de ejemplares de *C. angulata* expuestos a concentraciones subletales de cobre (200 y 600  $\mu\text{g L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ ) y determinar la cinética de acumulación de cobre en estos órganos, teniendo en cuenta el tiempo de exposición al contaminante (de 2 a 30 días), con el fin de establecer la relación toxicidad-bioacumulación.

## Material y métodos

Los ejemplares de ostión *C. angulata* utilizados (peso fresco:  $9.94 \pm 0.36$  g; longitud máxima:  $3.37 \pm 0.11$  cm) fueron recogidos en el medio natural en salinas de la Bahía de Cádiz (Sancti Petri, Chiclana), en zonas alejadas de fuentes de contaminación (Garrido, 2002).

Hasta el momento de su utilización, los ostiones se mantuvieron en acuarios de cristal, con un flujo de agua de mar convenientemente aireada. Tras una semana de aclimatación, se expusieron durante 30 días a cobre (200 y 600  $\mu\text{g L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ ) en acuarios de 10 L, renovando 0.66 del volumen de agua cada 24 h. De forma paralela se mantuvieron ejemplares control. Durante los días 2, 7, 15 y 30, se recogieron muestras de cada grupo experimental ( $n = 10$ ) para el análisis cuantitativo de cobre y estudios histopatológicos. Durante todo el período experimental, los ejemplares fueron alimentados con microalgas (*Tetraselmis chuii* y *Nannochloropsis gaditana*). Las condiciones del agua durante el periodo experimental han sido: temperatura 18–20°C, pH 8.2 y 8.3, y salinidad 35.

Para la determinación de las alteraciones histopatológicas, las muestras (branquias, glándula digestiva y corazón) previamente fijadas en formol tamponado con fosfatos 0.1 M (pH 7.2) se incluyeron en parafina y se tiñeron con hematoxilina-eosina y hematoxilina/VOF (Verde Luz, Orange G y Fucsina Ácida) (Gutiérrez, 1967). Por otro lado, las branquias

(Establier, 1977; Blasco *et al.*, 2003), can be explained by their great capacity to accumulate this metal in different cellular compartments, neutralize its toxic effects and excrete/eliminate the pollutant through diverse physiological strategies (López-Artíguez *et al.*, 1989; Cheung and Wong, 1992; Capeta da Silva, 1997; Sarasquete *et al.*, 1997; Rodríguez de la Rúa, 1999). Though some authors advise against using them as bioindicators precisely because of these characteristics (bioavailability, biomagnification, environmental concentrations, etc.), recent experimental transplant studies (DeValls *et al.*, 1999) have shown an increase in the accumulation of metals with exposure time and with environmental concentration, suggesting the usefulness of oysters in biomonitoring programs.

This study aimed to determine the histopathological alterations in the gills, digestive gland and heart of *C. angulata* specimens exposed to sublethal concentrations of copper (200 and 600  $\mu\text{g L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ ), and to determine the kinetics of copper accumulation in these organs, taking into consideration the time of exposure to the pollutant (from 2 to 30 days), in order to establish the relation between toxicity and bioaccumulation.

## Materials and methods

Specimens of the oyster *C. angulata* (wet weight:  $9.94 \pm 0.36$  g; maximum length:  $3.37 \pm 0.11$  cm) were collected from the natural environment, from salt beds in Cádiz Bay (Sancti Petri, Chiclana), in areas far from polluting sources (Garrido, 2002).

The oysters were first kept in glass aquaria with aerated flowing seawater. After one week of acclimation, they were then exposed for 30 days to copper concentrations (200 and 600  $\mu\text{g L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ ) in 10-L aquaria, renewing 0.66 of the water volume every 24 h. Control specimens were maintained concurrently. On days 2, 7, 15 and 30 of the experiment, samples were collected from each group ( $n = 10$ ) for the quantitative analysis of copper and histopathological studies. The specimens were fed microalgae (*Tetraselmis chuii* and *Nannochloropsis gaditana*) throughout the experimental period. Water conditions during the experiment were: temperature 18–20°C, pH 8.2 and 8.3, and salinity 35.

To determine the histopathological alterations, the samples (gills, digestive gland and heart) previously fixed in 0.1 M phosphate-buffered formol (pH 7.2) were placed in paraffin and stained with hematoxylin-eosin and hematoxylin-VOF (Verde Luz, Orange G and Acid Fuchsin) (Gutiérrez, 1967). On the other hand, the gills were fixed in 2.5% sodium cacodylate-buffered glutaraldehyde (0.1 M), followed by the postsettlement, dehydration, drying and coating of the samples according to Bozzola and Russel (1992), for observation under a scanning electron microscope.

The tissue samples were digested according to the method described by Amiard *et al.* (1987). Concentrated  $\text{HNO}_3$  is added to one aliquot of dry tissue (0.1–0.2 g dry weight), which is then placed in a heating block at 95°C for 1 h. Subsequently, the samples are leveled to a final volume of 5 mL.

fueron fijadas en glutaraldehído al 2.5% tamponado con cacodilato de sodio (0.1 M), procediéndose a la postfijación, deshidratación, secado y recubrimiento de muestras según Bozzola y Russel (1992), para la observación a microscopía electrónica de barrido.

Las muestras de tejido fueron digeridas según la metodología descrita por Amiard *et al.* (1987). A una alícuota de tejido seco, con un peso seco entre 0.1 y 0.2 g, se le adicionó HNO<sub>3</sub> concentrado, y se colocó en un bloque calefactor a 95°C durante 1 h. Posteriormente, las muestras se enrasaron a un volumen final de 5 mL. El análisis se llevó a cabo por espectrofotometría de absorción atómica de llama (FAAS), y los resultados se validaron mediante el empleo de material de referencia (DORM1, NRC Canadá), mostrando una buena concordancia ( $5.22 \pm 0.33$  y  $5.45 \mu\text{g g}^{-1}$  peso seco) con los valores certificados (Blasco *et al.*, 1999, 2003).

El tratamiento estadístico se realizó mediante el programa Statgraphics-plus 6.0, utilizándose la prueba múltiple de Student-Newman-Keuls (95%).

## Resultados

### Alteraciones histopatológicas

#### Branquias

Las branquias del ostión, como de otras especies de bivalvos (Galtsoff, 1964; Kennedy *et al.*, 1996), están constituidas por dos pares de láminas branquiales formadas por filamentos ciliados, recubiertos por laminillas branquiales, dispuestas paralelamente entre sí (figs. 1, 2a).

Las laminillas branquiales presentan unas estructuras de soporte denominadas varillas quitinosas y un epitelio ciliado constituido por distintos tipos celulares. En la zona más alejada de la base, donde se sitúan los cilios frontales, se encuentran células de tamaño uniforme, relativamente pequeñas y ciliadas. A cada lado de estas células existe una célula laterofrontal con un cirro. Las células latero-frontales son grandes y tienen un pequeño núcleo situado basalmente. A continuación, avanzando hacia la base de las laminillas, se observan mucocitos y un tipo de células grandes con cilios laterales.

En las branquias de ostiones expuestos a  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  de cobre durante 30 días, con una concentración en el tejido de  $784 \mu\text{g g}^{-1}$  peso seco, se observa desorganización del epitelio e infiltración hemocitaria a nivel del tejido conjuntivo. En los filamentos branquiales se detecta una alteración de las porciones apicales de los cilios (figs. 1, 2b) y una pérdida de la ciliatura. En los ejemplares sometidos a concentraciones de  $600 \mu\text{g L}^{-1}$  Cu<sup>2+</sup> a partir de los 15 días de exposición, la concentración en el tejido fue de  $1650 \mu\text{g g}^{-1}$  peso seco. Se observa además hiperplasia, fusión y pérdida de laminillas branquiales (fig. 2c). En consecuencia, en los tejidos se detecta un incremento del daño celular cuanto mayor es la acumulación de cobre.

Flame atomic absorption spectrophotometry (FAAS) was used for the analysis and the results were validated using reference material (DORM1, NRC Canada), showing good agreement ( $5.22 \pm 0.33$  and  $5.45 \mu\text{g g}^{-1}$  dry weight) with the certified values (Blasco *et al.*, 1999, 2003).

For the statistical treatment of the data, the Statgraphics-plus 6.0 program was used, applying the Student-Newman-Keuls (95%) test.

## Results

### Histopathological alterations

#### Gills

The gills of oysters, like those of other bivalves (Galtsoff, 1964; Kennedy *et al.*, 1996), are composed of two pairs of lamellae formed by ciliated filaments, covered by smaller gill lamellae, arranged parallel to one another (figs. 1, 2a).

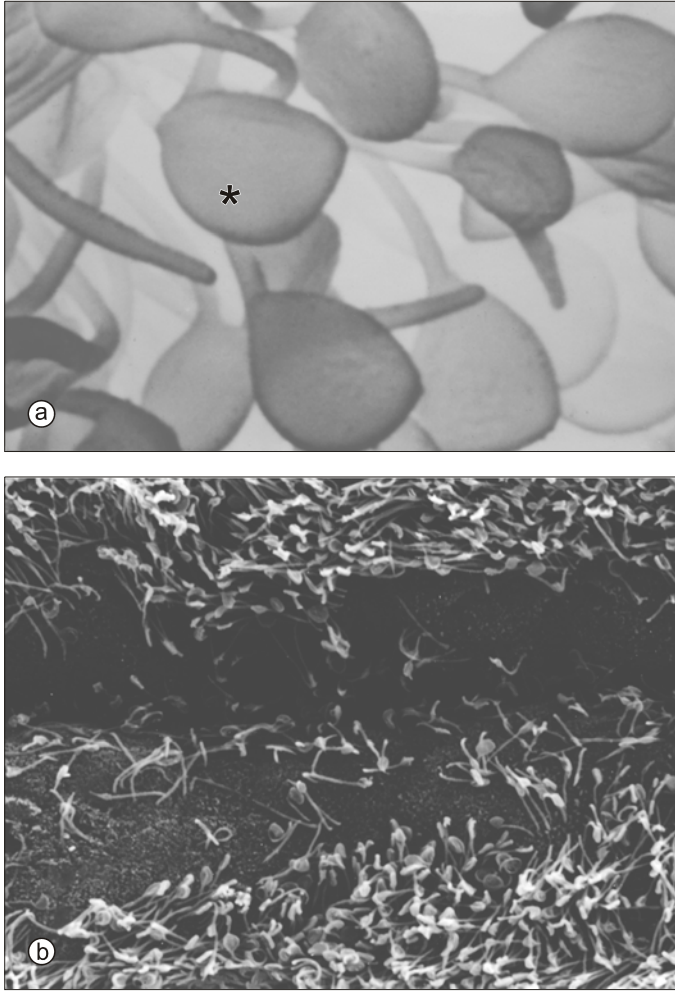
Gill lamellae have support structures called chitinous rods and a ciliated epithelium composed of different types of cells. In the part farthest from the base, where the frontal cilia are located, relatively small and ciliated cells of uniform size are found. A laterofrontal cell with a cirrus occurs on either side of these cells. The laterofrontal cells are large and have a small, basally situated nucleus. Advancing towards the base, mucocytes and a type of large cells with lateral cilia are observed.

In the gills of oysters exposed to  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  Cu<sup>2+</sup> for 30 days, with a tissue concentration of  $784 \mu\text{g g}^{-1}$  dry weight, there is epithelium disorganization and hemocyte infiltration around the conjunctive tissue. The gill filaments show alteration of the apical portions of the cilia (figs. 1, 2b) and a loss of ciliature. In specimens exposed to  $600 \mu\text{g L}^{-1}$  Cu<sup>2+</sup>, after 15 days the tissue concentration was  $1650 \mu\text{g g}^{-1}$  dry weight. Hyperplasia is also observed, as well as lamellar fusion and loss (fig. 2c). Consequently, the tissues show increased cell damage with greater accumulation of copper.

#### Digestive gland

The digestive gland or hepatopancreas of *C. angulata*, like that of other ostreids (Galtsoff, 1964; Cargnin-Ferreira *et al.*, 2003), is the large compact mass surrounding the stomach and most of the intestine. Food particles are selected in the stomach through the primary ducts/tracts that divide into multiple secondary ducts and end in masses of blind tubules or digestive diverticula (fig. 3a).

The digestive ducts appear rounded with irregular lumen entering and exiting, like a star, with an epithelium composed of a ciliated area and a non-ciliated one. The digestive tubules are formed by two types of easily-differentiated cells: the digestive cells, which are columnar, have a well-developed lysosomal digestive system and participate in the intracellular digestion; and the basophile cells, which are triangular, have an abundant rugose endoplasmatic reticulum and are related to protein synthesis.



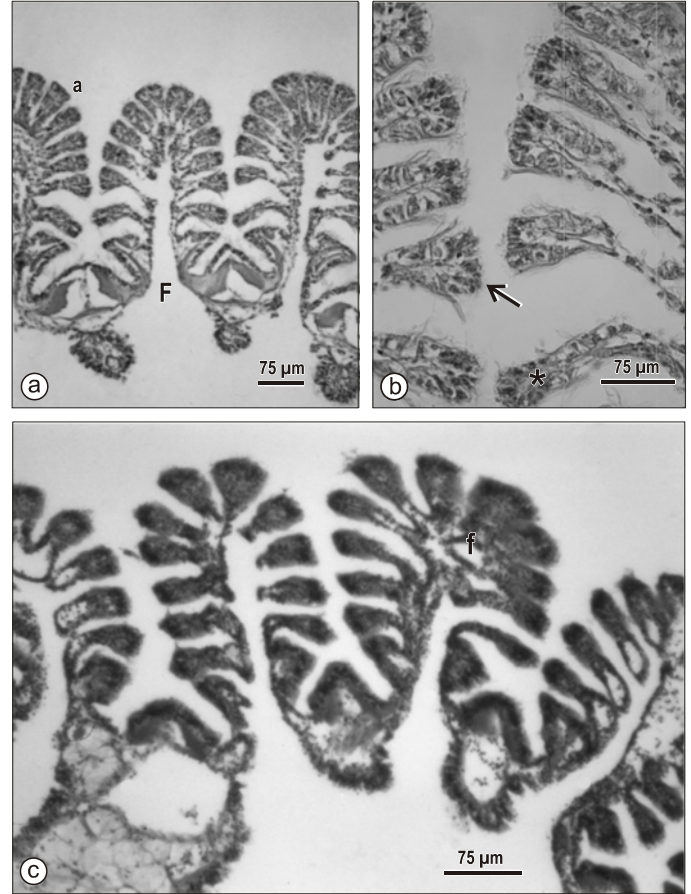
**Figura 1.** Secciones de branquias de ejemplares tratados con cobre ( $200 \mu\text{g L}^{-1}$ ), a microscopía electrónica de barrido (MEB), donde se detecta: (a) alteración de los filamentos branquiales en las porciones apicales de los cilios (\*) ( $\times 4500$ ) y (b) pérdida de la ciliatura ( $\times 850$ ).

**Figure 1.** Gill sections of specimens exposed to copper ( $200 \mu\text{g L}^{-1}$ ), under scanning electron microscope, showing: (a) alteration of the gill filaments in the apical portions of cilia (\*) ( $\times 4500$ ) and (b) loss of cilia ( $\times 850$ ).

### Glándula digestiva

La glándula digestiva o hepatopancreas de *C. angulata*, como la de otros ostreidos (Galtsoff, 1964; Cargin-Ferreira *et al.*, 2003), es la gran masa compacta que rodea al estómago y a gran parte del intestino. Las partículas alimenticias son seleccionadas en el estómago a través de los ductos/conductos primarios que se ramifican en múltiples conductos secundarios y finalizan en masas de túbulos ciegos o divertículos digestivos (fig. 3a).

Los conductos digestivos presentan una forma externa redondeada con una luz irregular con entrantes y salientes, de forma estrellada, con un epitelio constituido por una zona ciliada y otra no ciliada. Los túbulos digestivos están formados por dos tipos celulares fácilmente diferenciables entre sí: las células digestivas, columnares, con un sistema lisosómico



**Figura 2.** Secciones histológicas de branquias de *Crassostrea angulata*. (a) Estructura de branquias de un organismo control, mostrando filamentos (F) y laminillas branquiales (a). (b) Branquias de organismos expuestos durante 30 días a  $200 \mu\text{g L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ , donde se observa vacuolización, descamación, pérdida de las células epiteliales ( $\rightarrow$ ) e hipertrofia de la porción final de las laminillas (\*). (c) Branquias de ejemplares expuestos durante 15 días a concentraciones de  $600 \mu\text{g L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$  donde se observa pérdida de su estructura regular y fusión de laminillas branquiales (f). Hematoxilina-eosina.

**Figure 2.** Histological sections of gills of *Crassostrea angulata*. (a) Gill structure of a control organism, showing filaments (F) and lamellae (a). (b) Gills of organisms exposed for 30 days to  $200 \mu\text{g L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ , showing vacuolation, desquamation, loss of epithelial cells ( $\rightarrow$ ) and hypertrophy of the end portion of the lamellae (\*). (c) Gills of specimens exposed for 15 days to  $600 \mu\text{g L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ , showing loss of the regular structure and lamellar fusion (f). Hematoxylin-eosin.

Different histopathological alterations are observed in the digestive gland of oysters exposed to copper. The supporting connective tissue of specimens after 30 days of exposure ( $770 \mu\text{g g}^{-1}$  dry weight) to  $200 \mu\text{g L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$  shows hemocyte infiltration and an increase in brown cells, which are scarce in the control specimens. Oysters exposed to  $600 \mu\text{g L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$  show, after 7 days ( $638 \mu\text{g g}^{-1}$  dry weight), thinning of the digestive gland epithelium and occlusion in the lumen of some digestive diverticula (fig. 3b). Some specimens also show focal necrosis of conjunctive tissue cells that, in some cases, ends in

digestivo muy desarrollado, las cuales participan en la digestión intracelular del alimento, y las células basófilas, triangulares, con abundante retículo endoplasmático rugoso y relacionadas con la síntesis de proteínas.

En la glándula digestiva de ostiones expuestos a cobre se observan diferentes alteraciones histopatológicas. En el tejido conectivo de soporte de los ejemplares sometidos a  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  de cobre, a los 30 días de exposición ( $770 \mu\text{g g}^{-1}$  peso seco) se observó una infiltración hemocitaria y un aumento de células marrones (*brown cells*), las cuales son escasas en los ejemplares control. En los ostiones expuestos a  $600 \mu\text{g L}^{-1}$  de cobre, a partir de los 7 días de exposición ( $638 \mu\text{g g}^{-1}$  peso seco) se observa un adelgazamiento del epitelio de la glándula digestiva y oclusión en la luz de algunos divertículos digestivos (fig. 3b). En algunos ejemplares se observa, además, una necrosis focal de células del tejido conjuntivo que, en algunos casos, finaliza con una necrosis masiva del tejido conectivo de soporte. En el sistema vascular se observa una obstrucción de la luz de algunos vasos, la cual es invadida por numerosos hemocitos. Conforme aumenta el tiempo de exposición al cobre, y por tanto un incremento de la concentración en los tejidos, se observa un incremento en el número de células basófilas de los túbulos digestivos (fig. 3b).

#### Corazón

La histofisiología del corazón de ostreidos ha sido ampliamente descrita (Galtsoff, 1964; Kennedy *et al.*, 1996). De forma similar, en *C. angulata*, el corazón está constituido por un ventrículo y dos aurículas. El ventrículo, más grande y voluminoso, presenta sus paredes constituidas por un armazón de gruesas fibras musculares rodeadas por tejido conjuntivo. La superficie externa del ventrículo está cubierta por una capa de tejido epitelial constituido por delgadas células que presentan núcleos visibles. Las paredes de las aurículas, más finas y claras que las del ventrículo, también están formadas por un armazón de tejido conjuntivo. Las aurículas están recubiertas externamente por un alto epitelio columnar.

Las alteraciones histológicas observadas en el corazón aumentan progresivamente con la concentración de cobre y con el tiempo de exposición. En general, se observa un adelgazamiento del epitelio de las aurículas, del ventrículo y un incremento de las células marrones en las paredes de las aurículas, así como una distensión de las fibras musculares y necrosis del tejido conectivo de soporte, tanto en las aurículas (fig. 4) como en el ventrículo. En los ostiones expuestos a cobre ( $200$  y  $600 \mu\text{g L}^{-1}$ ), el incremento de células marrones es paralelo y progresivo con el tiempo de exposición.

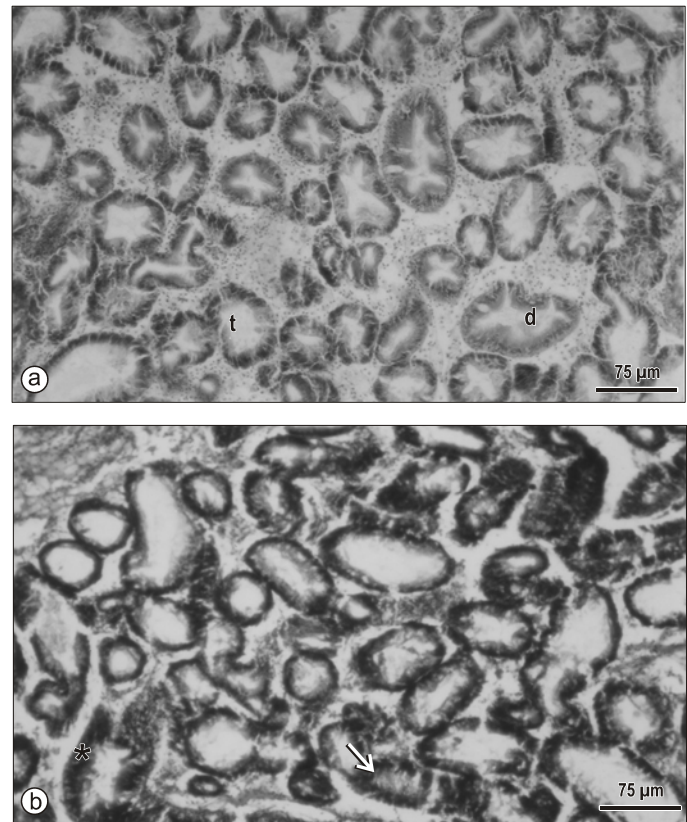
#### Acumulación de cobre

En las figuras 5 y 6 se muestran los niveles de cobre en las branquias y glándula digestiva de ejemplares de *C. angulata* control y sometidos a  $200$  y  $600 \mu\text{g L}^{-1}$   $\text{Cu}^{2+}$ . Debido a la escasez de muestras de corazón y ante la imposibilidad de disponer

massive necrosis of the supporting connective tissue. Obstruction in the lumen of some vessels, invaded by numerous hemocytes, is observed in the vascular system. As the time of exposure to copper increases and there is greater tissue concentration, an increase is observed in the number of basophile cells of the digestive tubules (fig. 3b).

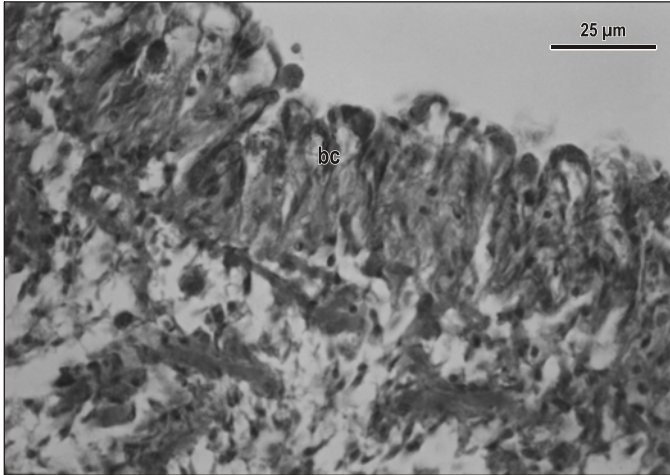
#### Heart

The histophysiology of the heart of ostreids has been extensively described (Galtsoff, 1964; Kennedy *et al.*, 1996). The heart of *C. angulata* is composed of one ventricle and two auricles. The ventricle is larger and more voluminous, and its walls consist of a frame of thick muscular fibres, surrounded by conjunctive tissue. The external surface of the ventricle is covered by a layer of epithelial tissue consisting of thin cells



**Figura 3.** Cortes histológicos de glándula digestiva de *Crassostrea angulata*. Hematoxilina-eosina. (a) Glándula digestiva de un organismo control compuesta por túbulos o divertículos digestivos (t) y conductos digestivos (d). (b) Ejemplares expuestos durante 7 días a  $600 \mu\text{g L}^{-1}$   $\text{Cu}^{2+}$ , donde se observa oclusión en la luz de algunos divertículos digestivos (→), y adelgazamiento del epitelio de los conductos digestivos (\*).

**Figure 3.** Histological cuts of the digestive gland of *Crassostrea angulata*. Hematoxilin-eosin. (a) Digestive gland of a control organism composed of digestive tubules or diverticula (t) and digestive ducts (d). (b) Specimens exposed for 7 days to  $600 \mu\text{g L}^{-1}$   $\text{Cu}^{2+}$ , showing occlusion in the lumen of some digestive diverticula (→), and thinning of the epithelium of the digestive ducts (\*).



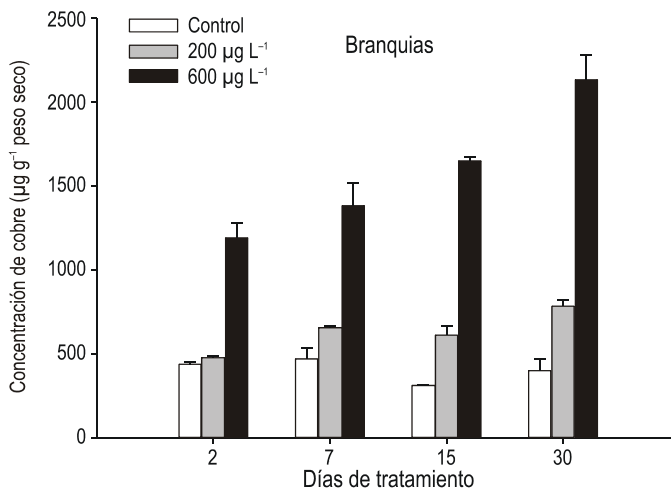
**Figura 4.** Corte histológico de corazón de ejemplares de *Crassostrea angulata* expuestos a una concentración de cobre de  $600 \mu\text{g L}^{-1}$  durante 30 días. Detalle del epitelio de la aurícula donde se ponen de evidencian las células marrones (bc). Hematoxilina-eosina.

**Figure 4.** Histological cut of the heart of *Crassostrea angulata* exposed to  $600 \mu\text{g L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$  for 30 days. Detail of the epithelium of the auricle showing the brown cells (bc). Hematoxilin-eosin.

de replicados, no se presentan los datos de acumulación de cobre en el corazón.

#### Branquias

En las branquias, tanto de ejemplares sometidos a  $200 \mu\text{g L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$  como a  $600 \mu\text{g L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ , se observan diferencias significativas en los niveles de cobre acumulados ( $P < 0.005$ ), siendo el incremento de cobre progresivo con el tiempo de



**Figura 5.** Concentración de cobre ( $n = 10$ ) en branquias de ejemplares control y expuestos a  $200 \mu\text{g L}^{-1}$   $\text{Cu}^{2+}$  y  $600 \mu\text{g L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ . Los resultados se expresan como  $\mu\text{g g}^{-1}$  peso seco.

**Figure 5.** Concentration of copper ( $n = 10$ ) in gills of control specimens and organisms exposed to  $200 \mu\text{g L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$  and  $600 \mu\text{g L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ . The results are given in  $\mu\text{g g}^{-1}$  dry weight.

with visible nuclei. The walls of the auricles are finer and clearer than those of the ventricle and also consist of a frame of conjunctive tissue. The auricles are externally covered by a high columnar epithelium.

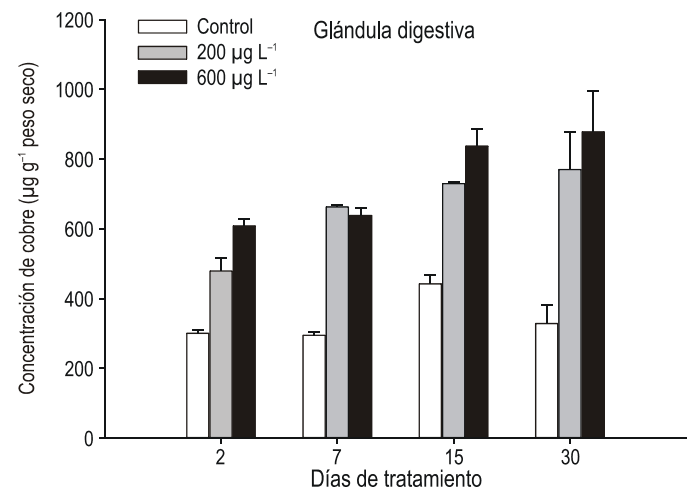
The histological alterations observed in the heart increase progressively as the copper concentration and exposure time increase. In general, there was thinning of the auricular and ventricular epithelium, an increase in the brown cells of the auricular walls, as well as distension of the muscular fibres and necrosis of the supporting connective tissue, both in the auricles (fig. 4) and the ventricle. In oysters exposed to  $200$  and  $600 \mu\text{g L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ , the increase in brown cells is progressive and concurrent with exposure time.

#### Copper accumulation

Figures 5 and 6 show the levels of copper in the gills and digestive gland of the *C. angulata* specimens used as control and those exposed to  $200$  and  $600 \mu\text{g L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ . Due to the lack of heart samples and replicates, the data on copper accumulation in the heart are not presented.

#### Gills

Significant differences were observed in the levels of copper accumulated in the gills of specimens exposed to both  $200$  and  $600 \mu\text{g L}^{-1}$  of this metal ( $P < 0.005$ ), the levels increasing progressively with exposure time (fig. 5). The highest levels, however, were observed in the organisms exposed to  $600 \mu\text{g L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ , with concentrations of about  $2200 \mu\text{g g}^{-1}$  dry weight after 30 days of exposure. The copper levels in the control specimens were  $<500 \mu\text{g g}^{-1}$ . A decrease was observed in the rate of bioconcentration ( $BC_{t, \text{issue}}$ ), defined



**Figura 6.** Concentración de cobre ( $n = 10$ ) en glándula digestiva de ejemplares control y expuestos a  $200 \mu\text{g L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$  y  $600 \mu\text{g L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ . Los resultados se expresan como  $\mu\text{g g}^{-1}$  peso seco.

**Figure 6.** Concentration of copper ( $n = 10$ ) in the digestive gland of control specimens and organisms exposed to  $200 \mu\text{g L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$  and  $600 \mu\text{g L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ . The results are given in  $\mu\text{g g}^{-1}$  dry weight.

exposición (fig. 5). Por otra parte, los mayores niveles de cobre se observaron en los organismos expuestos a concentraciones de  $600 \mu\text{g L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ , obteniéndose concentraciones alrededor de  $2200 \mu\text{g g}^{-1}$  de peso seco a los 30 días de exposición. Los niveles de cobre en los ejemplares control han sido  $<500 \mu\text{g g}^{-1}$ . La tasa de bioconcentración ( $BC_r$ )<sub>tejido</sub>, definida como la diferencia entre la concentración en el tejido ( $C_t$ ) a una concentración de exposición a tiempo  $t$  y la concentración media del control ( $\bar{C}_0$ ) a lo largo del experimento, dividida por el tiempo de exposición,

$$[BC_r]_{\text{tejido}} \approx \frac{C_t - \bar{C}_0}{t}$$

disminuyó y sus valores variaron en el intervalo entre 392 y  $57 \mu\text{g g}^{-1} \text{d}^{-1}$  en las branquias.

#### Glándula digestiva

En la glándula digestiva los resultados obtenidos muestran un incremento de los niveles de cobre, al aumentar la concentración y el tiempo de exposición, observándose concentraciones de cobre de  $880 \mu\text{g g}^{-1}$  peso seco a los 30 días de exposición en ostiones expuestos a  $600 \mu\text{g L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ , siendo los niveles de cobre en ejemplares control de  $340 \mu\text{g g}^{-1}$  peso seco. En la glándula digestiva, la tasa de acumulación varió entre  $133$  y  $18 \mu\text{g g}^{-1} \text{d}^{-1}$ .

#### Discusión

La gran capacidad que presentan los ostreoides para acumular cobre en sus tejidos les confiere, cuando la concentración supera valores umbrales, un ligero y característico olor metálico y una fuerte coloración verde, principalmente en manto y branquias (Establier, 1977; George *et al.*, 1978; Sarasquete *et al.*, 1997). Según diferentes autores (Establier, 1977; López-Artíguez *et al.*, 1989; Bou-Olayan *et al.*, 1995; Sarasquete *et al.*, 1997; Blasco *et al.*, 2003) estos bivalvos pueden acumular metales en sus órganos/tejidos en proporción paralela al grado de contaminación ambiental.

En vertebrados e invertebrados acuáticos las branquias son los órganos directamente expuestos y los más susceptibles a las variaciones ambientales, siendo por ello un órgano diana para diferentes contaminantes (Cheung y Wong, 1992; Arellano *et al.*, 1999, 2001). Las branquias, además, constituyen el principal órgano implicado en la respiración, manteniendo una corriente constante; filtrando el agua y recolectando y reteniendo partículas alimenticias. Una vez que filtran el agua, las partículas atrapadas son absorbidas por el mucus branquial. Si estas partículas atrapadas han estado expuestas a metales, el tejido branquial mostrará un alto contenido de dichos contaminantes (Cheung y Wong, 1992).

Aunque el factor de bioconcentración y bioacumulación (BCF/BAF) del organismo entero se emplea como un criterio para clasificar el riesgo, éste no es adecuado en el caso de los

as the concentration in the tissue at an exposure concentration ( $C_t$ ) at time  $t$  minus the mean concentration of the control ( $\bar{C}_0$ ) throughout the experiment, divided by the exposure time:

$$[BC_r]_{\text{tissue}} \approx \frac{C_t - \bar{C}_0}{t}$$

The values for the gills ranged from 392 to  $57 \mu\text{g g}^{-1} \text{d}^{-1}$ .

#### Digestive gland

The results obtained for the digestive gland show increased copper levels with increased concentration and exposure time. Specimens exposed to  $600 \mu\text{g L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$  showed concentrations of  $880 \mu\text{g g}^{-1}$  dry weight on day 30 of the experiment, whereas the levels in the control specimens were  $340 \mu\text{g g}^{-1}$  dry weight. The rate of accumulation in the digestive gland ranged from 133 to  $18 \mu\text{g g}^{-1} \text{d}^{-1}$ .

#### Discussion

As a result of the great ability of oysters to accumulate copper in their tissues, when the concentration exceeds some threshold values, they attain a slight and characteristic metallic odour and a strong green colour, mainly in the mantle and gills (Establier, 1977; George *et al.*, 1978; Sarasquete *et al.*, 1997). According to several authors (Establier, 1977; López-Artíguez *et al.*, 1989; Bou-Olayan *et al.*, 1995; Sarasquete *et al.*, 1997; Blasco *et al.*, 2003), these bivalves can accumulate metals in the organs/tissues at a similar proportion to the degree of environmental contamination.

In aquatic vertebrates and invertebrates, the gills are the organs directly exposed and the most susceptible to environmental variations; hence, they are a target tissue for different pollutants (Cheung and Wong, 1992; Arellano *et al.*, 1999, 2001). Moreover, the gills are the main organ involved in respiration, maintaining a constant current, filtering the water and collecting and retaining food particles. Once the water is filtered, the trapped food particles are absorbed by the gill mucus. If these trapped particles have been exposed to metals, the gill tissue will show a high content of these contaminants (Cheung and Wong, 1992).

Though the bioconcentration and bioaccumulation factor (BCF/BAF) of the whole organism is used as criterion to classify the risk, it is not suitable in the case of metals because they are higher at lower concentrations and lower at higher concentrations (McGeer *et al.*, 2003). The gills and digestive gland showed a different behaviour: in the former, BCF was higher when the concentration was higher, whereas in the latter, the BCF value decreased as the concentration increased. Therefore, a relation between BCF and toxicity cannot be established. This behaviour probably occurs because equilibrium conditions have not been attained in the gills and the processes of incorporation are more active than those of



metales, ya que éstos son más elevados a concentraciones bajas y menores a concentraciones más altas (McGeer *et al.*, 2003). Las branquias y la glándula digestiva presentaron un comportamiento diferente; en las branquias BCF era mayor cuando la concentración era más elevada, mientras que en la glándula digestiva el valor de BCF disminuía al incrementar la concentración. Por tanto, no se puede establecer una relación entre BCF y toxicidad. Este comportamiento puede ser consecuencia de que en las branquias no se han alcanzado las condiciones de equilibrio, y los procesos de incorporación son más activos que los de eliminación. En ambos tejidos,  $BC_r$  mostró un descenso, lo que implica que hay una fase inicial, correspondiente al periodo de una semana, donde a la menor concentración ensayada se produce una tasa de acumulación más elevada y constante, mientras que después se produce un descenso. En cambio, a concentraciones elevadas de cobre, el descenso en la tasa de eliminación es continuado. La presencia de transportadores específicos de membrana para este metal ha sido señalada por Percival y Harris (1990). La acumulación de cobre en *Crassostrea virginica* se encuentra condicionada por la presencia de otros metales; así en presencia de Cd, la acumulación de Cu es menor. La elevada concentración de cobre que se encuentra en las ostras, parece que es consecuencia de la falta de mecanismos eficaces de eliminación (Engel, 1999).

En las branquias de *C. angulata* expuestas a 200 y 600  $\mu\text{g L}^{-1}$  de cobre se observó, mediante microscopía electrónica de barrido, una dilatación y engrosamiento en la porción apical de los cilios en forma de raqueta. Durfort *et al.* (1990) han descrito alteraciones ciliares similares en las branquias de almejas, *Tapes decussatus* parasitadas por *Perkinsus* sp. Blasco *et al.* (1997), en las branquias de ejemplares de *Ruditapes philippinarum* expuestos al tensioactivo aniónico (alquilbenzeno sulfonato lineal, LAS) observaron descamación del epitelio branquial y signos de reacción inflamatoria con infiltración de hemocitos; alteraciones que relacionaron con una respuesta del organismo a los efectos estresantes e irritantes del LAS.

En la glándula digestiva de ejemplares de *C. angulata* expuestos a concentraciones subletales de cobre se producen diferentes alteraciones que se incrementan, de forma general, con la concentración y con el tiempo de exposición al contaminante. Entre las alteraciones observadas destacan: un aumento del número de células marrones; adelgazamiento del epitelio de la glándula digestiva; oclusión en la luz de algunos divertículos; dilatación de los conductos digestivos e incremento del número de células basófilas de los túbulos digestivos. Cajaraville *et al.* (1990) señalaron que la variación de células basófilas era un buen biomarcador celular de exposición a contaminantes orgánicos. Moore (1988), en la glándula digestiva de *Mytilus edulis* sometidos a contaminación por hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs), observó un incremento de células marrones y una dilatación y degeneración de los túbulos digestivos. Por otra parte, en el epitelio de la glándula digestiva de ejemplares de *M. edulis* contaminados por PCBs, PAHs y metales, Lowe (1988) observó un incremento de

eliminación. In both tissues,  $BC_r$  decreased, indicating that there is an initial phase, corresponding to a one-week period, during which the rate of accumulation is higher and constant at the lowest concentration tested, and then it decreases. At high copper concentrations, however, the decrease in the rate of elimination is continuous. The presence of specific membrane transporters for this metal have been reported by Percival and Harris (1990). The accumulation of copper in *Crassostrea virginica* is conditioned by the presence of other metals, so in the presence of cadmium, copper is lower. The high concentration of copper found in oysters seems to be related to the lack of efficient mechanisms of elimination (Engel, 1999).

Scanning electron microscopy of the gills of *C. angulata* exposed to 200 and 600  $\mu\text{g L}^{-1}$   $\text{Cu}^{2+}$  showed dilation and thickening of the apical portion of racket-shaped cilia. Durfort *et al.* (1990) described similar alterations of the cilia in the gills of the clam *Tapes decussatus* parasitized by *Perkinsus* sp. In the gills of *Ruditapes philippinarum* specimens exposed to an anionic surfactant, linear alkylbenzene sulphonate (LAS), Blasco *et al.* (1997) observed desquamation of the gill epithelium and signs of inflammatory reaction with hemocyte infiltration, alterations associated with a response of the organism to the stressing and irritating effects of LAS.

In the digestive gland of *C. angulata* specimens exposed to sublethal copper concentrations, different alterations are produced that, in general, increase with the concentration and time of exposure to the contaminant. The most notable alterations observed were an increase in the number of brown cells, thinning of the epithelium, occlusion in the lumen of some diverticula, dilation of the digestive ducts and an increased number of basophile cells of the digestive tubules. Cajaraville *et al.* (1990) indicated that the variation of basophile cells was a good cellular biomarker of exposure to organic pollutants. In the digestive gland of *Mytilus edulis* exposed to contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), Moore (1988) observed an increase in brown cells and dilation and degeneration of the digestive tubules. On the other hand, in the epithelium and digestive gland of *M. edulis* specimens contaminated by PCBs, PAHs and metals, Lowe (1988) recorded an increase in lipids and associated it with an increase in secondary lysosomes. Lipid variations/lipid peroxidation and changes in the activity of lysosomal enzymes have been observed in different species of bivalves exposed to copper and cadmium (Sarasquete *et al.*, 1992), as well as in specimens of the toadfish *Halobatrachus didactylus* exposed to sublethal concentrations of lead (Campana *et al.*, 2003).

The digestive gland of *C. angulata* shows copper accumulation as the concentration and exposure time increase. Lower concentrations of copper were found in the digestive gland than in the gills, possibly because the former has more efficient mechanisms to eliminate the metals, such as neutralization/excretion/elimination (via digestive lysosomes and/or residual bodies, metallothioneins, faeces, urine, etc.) (Cheung and

lípidos que relacionó con un aumento de lisosomas secundarios. Variaciones lipídicas/peroxidación lipídica y cambios en la actividad de enzimas lisosomales han sido observados en diferentes especies de bivalvos expuestos a cobre y cadmio (Sarasquete *et al.*, 1992), así como en ejemplares del pez sapo, *Halobatrachus didactylus*, expuestos a concentraciones subletales de plomo (Campana *et al.*, 2003).

En la glándula digestiva de *C. angulata* se observa una acumulación de cobre conforme aumenta la concentración y el tiempo de exposición, observándose menores concentraciones de cobre en la glándula que en branquias, debido posiblemente a que la glándula digestiva presenta mecanismos más eficaces para eliminar los metales como neutralización/excreción/eliminación (vía lisosomas digestivos y/o cuerpos residuales, metalotioneínas, heces, orina, etc.) (Cheung y Wong, 1992; Dallinger, 1995; Marigómez *et al.*, 1995). Sin embargo, Duquense y Coll (1995), en almejas *Tridacna crocea* expuestas a cobre observaron las mayores concentraciones de este metal en la glándula digestiva. Los mecanismos de incorporación, acumulación y eliminación de metales son específicos de las especies, las cuales parecen disponer de diferentes estrategias para la eliminación y/o disminución de la concentración metálica tóxica en el interior del organismo (Cheung y Wong, 1992; Dallinger, 1995).

En ejemplares de ostión expuestos a cobre, se detecta un incremento de células marrones en la glándula digestiva y corazón, como observaron Galtsoff (1964) y Zaroogian y Yevich (1993) en *C. virginica*. En el interior de estas células que muestran actividad lisosomal se han observado gránulos de lipofuschina, residuos de cistina y cisteína, etc. (Capeta da Silva, 1997; Sarasquete *et al.*, 1997). Las células marrones constituyen la primera línea de defensa para la degradación y desintoxicación de los metales pesados (Zaroogian y Yevich, 1993). Sarasquete *et al.* (1997), en ejemplares de *C. angulata* con una intensa coloración verde, observaron numerosas células marrones en la pared de las aurículas y dispersas por el tejido conjuntivo. El número de estas células marrones se incrementa cuando el organismo es sometido a determinados agentes patógenos y/o agresiones ambientales (Gutiérrez, 1977).

En el corazón de los ostiones expuestos a diferentes concentraciones subletales de cobre (200 y 600  $\mu\text{g L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ ) se observa un incremento de células marrones en las aurículas, que además es superior en los ejemplares expuestos a las mayores concentraciones de cobre (600  $\mu\text{g L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ ). La eliminación de cobre en diferentes moluscos bivalvos puede realizarse, entre otros sistemas, a través de cuerpos residuales que contienen lipofuscinas, a través del sistema macrófago, etc. (Galtsoff, 1964; George *et al.*, 1978; Sarasquete *et al.*, 1992). En las ostras, las paredes de las aurículas se encuentran recubiertas por un alto epitelio columnar que contiene numerosas células glandulares y pigmentadas y constituyen parte del sistema excretor (Galtsoff, 1964; Kennedy *et al.*, 1996). En ejemplares de zonas relativamente contaminadas, la hemolinfa

Wong, 1992; Dallinger, 1995; Marigómez *et al.*, 1995). Duquense and Coll (1995) observed higher concentrations of copper in the digestive gland of the clam *Tridacna crocea*. The mechanisms of incorporation, accumulation and elimination of metals depend on the species, which seem to have different strategies to decrease and/or eliminate the toxic metallic concentration from the organism (Cheung and Wong, 1992; Dallinger, 1995).

An increase was observed in the number of brown cells in the digestive gland and heart of oysters exposed to copper, as was also detected in *C. virginica* by Galtsoff (1964) and Zaroogian and Yevich (1993). Within these cells showing lysosomal activity, lipofuchsin granules, cystine and cysteine residuals, etc., have been found (Capeta da Silva, 1997; Sarasquete *et al.*, 1997). The brown cells are the first line of defense for degradation and detoxification of heavy metals (Zaroogian and Yevich, 1993). In *C. angulata* specimens with an intense green colour, Sarasquete *et al.* (1997) observed numerous brown cells on the walls of the auricles and scattered among the conjunctive tissue. The number of these brown cells increases when the organism is exposed to certain pathogenic agents and/or environmental aggressions (Gutiérrez, 1977).

The heart of oysters exposed to different sublethal concentrations of copper (200 and 600  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) shows an increase in brown cells in the auricles, which was higher in the specimens exposed to the higher concentration (600  $\mu\text{g L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ ). Different bivalve molluscs eliminate copper by diverse mechanisms, such as through residual bodies containing lipofuscins, through the macrophage system, etc. (Galtsoff, 1964; George *et al.*, 1978; Sarasquete *et al.*, 1992). In oysters, the walls of the auricles are covered by a high columnar epithelium that contains numerous glandular and pigmented cells, constituting part of the excretory system (Galtsoff, 1964; Kennedy *et al.*, 1996). In specimens from relatively polluted areas, the hemolymph flows through the auricles and comes into contact with the brown cells where the contaminating material is absorbed, passing inside the lysosomes where the detoxification process occurs. In oysters from highly polluted areas, the brown cells are overloaded and lysosomes abound within them (Zaroogian and Yevich, 1993; Sarasquete *et al.*, 1997). These cells are probably lysed and their material is excreted through the walls of the auricles towards the pericardial cavity. From here, the detoxified material is filtered by the epithelial cells of the renal tubules and is finally excreted through the urogenital pore (Zaroogian and Yevich, 1993).

The results obtained in this work show the utility of using histological approximation, together with analytical techniques (quantification of pollutants), as a suitable tool to evaluate the potential toxic effect of copper, as well as to explain the complex, interspecific mechanisms involved in the processes of accumulation/biomagnification, mobilization and detoxification/excretion of metals among the different organs and target tissues of bivalves, in general, and of the oyster *C. angulata*, in particular.

fluye a través de las aurículas, entra en contacto con las células marrones donde se absorbe el material contaminante, pasando al interior de los lisosomas, donde se realiza el proceso de desintoxicación. En ostras que se encuentran en zonas altamente contaminadas, las células marrones están sobrecargadas y en su interior abundan las lisosomas (Zaroogian y Yevich, 1993; Sarasquete *et al.*, 1997). Estas células son probablemente lisadas y su material es excretado a través de las paredes de las aurículas y hacia la cavidad pericárdica. Desde aquí, el material desintoxicado es filtrado por las células epiteliales de los túbulos renales, siendo finalmente excretado a través del poro urogenital (Zaroogian y Yevich, 1993).

Los resultados de este trabajo ponen en evidencia la utilidad de usar aproximaciones histológicas, en combinación con técnicas analíticas (cuantificación de contaminantes), como herramienta adecuada para evaluar el potencial efecto tóxico del cobre, así como para intentar explicar los complejos mecanismos, interespecíficos, implicados en los procesos de acumulación/biomagnificación, movilización y desintoxicación/excreción de metales entre los diferentes órganos y tejidos diana de bivalvos en general y del ostión *C. angulata*, en particular.

### Agradecimientos

Deseamos expresar nuestro más sincero agradecimiento a Juan B. Ortiz-Delgado por la revisión del trabajo, que ha sido subvencionado por el Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía, CSIC (Unidad Asociada de Calidad Ambiental y Patología, CSIC y UCA).

### Referencias

Allen-Gil, S.M., Gubala, C.P., Dixon, H.L. and Lasorsa, B.K. (1997). Heavy metals accumulation in sediment and freshwater fish in US Arctic lakes. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16(4): 733–741.

Amiard, J.C., Pineau, A., Boiteau, H.L., Metayer, C. and Amiard-Triquet, C. (1987). Application of atomic absorption spectrophotometry using Zeeman effect for the determination of eight trace elements (Ag, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb and Se) in biological materials. *Water Res.*, 21(6): 693–697.

Arellano, J.M., Storch, V. and Sarasquete, C. (1999). Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the Senegalese sole, *Solea senegalensis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 44: 62–72.

Arellano, J.M., Ortiz-Delgado, J.B., González de Canales, M.L. and Sarasquete, C. (2001). Histopathological alterations and CYP1A induction in the liver and gills of the gilthead seabream, *Sparus aurata*, specimens exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-TCDD. *Histochem. J.*, 33: 653–662.

Arufe, M.I., Arellano, J.M., Moreno, M.J. and Sarasquete, C. (2004). Toxicity of a commercial herbicide containing terbutryn and triasulfuron to seabream, *Sparus aurata*, larvae: A comparison with the Microtox® test. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 59: 209–216.

Bernet, D., Schidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P. and Wahli, T. (1999). Histopathology in fish: Proposal to assess aquatic pollution. *J. Fish Dis.*, 22: 25–34.

Blasco, J., Puppo, J., González de Canales, M.L. y Sarasquete, C. (1993). Acumulación y efectos histopatológicos del cobre en *Liza*

### Acknowledgements

We thank Juan B. Ortiz-Delgado for revising the manuscript. This study was financed by the Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía, CSIC (Unidad Asociada de Calidad Ambiental y Patología, CSIC & UCA).

English translation by Christine Harris.

*aurata* L. y *Sparus aurata* L. Series de Química Oceanográfica. Ser. II. Vol 2/3, pp. 159–174.

Blasco, J., Sarasquete, C., González-Mazo, E., y Gómez-Parra, A. (1997). Influencia del alquilbenceno sulfonato lineal sobre algunas actividades enzimáticas de la almeja *Ruditapes philippinarum*. VII Seminario de Química Marina. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cádiz, pp. 149–159.

Blasco, J., Arias, A.M. and Sáenz, V. (1999). Heavy metals in organisms of the River Guadalquivir estuary: Possible incidence of Aznalcóllar disaster. *Sci. Total Environ.*, 242: 249–259.

Blasco, J., Sáenz, V., Arias, A.M., González-Pascual, R., Campana, O., Ransome, T., Moreno-Garrido, I. y Hampel, M. (2003). Efecto del accidente minero sobre los organismos residentes en el estuario del Guadalquivir y en las zonas de la plataforma próxima a la desembocadura. En: J. Forja y A. Gómez-Parra (eds.), Contaminación por Metales Pesados del Estuario del Guadalquivir. Servicio Publicaciones Universidad de Cádiz, España, pp. 165–203.

Bou-Olayan, A.-H., Al-Mattar, S., Al-Yacoob, S. and Al-Hazeem, S. (1995). Accumulation of lead, cadmium, copper and nickel by pearl oyster, *Pinctada radiata*, from Kuwait Marine Environment. *Mar. Pollut. Bull.*, 30(3): 211–214.

Bozzola, J.J. and Russel, L.D. (1992). Electron Microscopy. Principles and Techniques for Biologists. Jones and Bartlett, pp. 40–62.

Cajaraville, M.P., Diez, G., Marogómez, J.A. and Angulo, E. (1990). Responses of basophilic cells of the digestive gland of mussels to petroleum hydrocarbon exposure. *Dis. Aquat. Org.*, 9: 221–228.

Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C. and Viarengo, A. (2000). The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: A practical approach. *Sci. Total Environ.*, 47: 295–311.

Campana, O., Sarasquete, C. and Blasco, J. (2003). Lead effect on ALA-D activity, metallothionein and lipid peroxidation in blood, kidney and liver of the toadfish *Halobatrachus didactylus* (Schneider, 1801). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 55: 116–125.

Capeta da Silva, D. (1997). Efeito do cobre em peixes (*Halobatrachus didactylus*) e moluscos (*Crassostrea angulata*): Quantificação e efeitos histopatológicos. Relatório de estágio do curso de Licenciatura em Biologia Marinha e Pescas. Univ. do Algarve, Portugal, 72 pp.

Cargnin-Ferreira, E., González de Canales, M.L. y Sarasquete, C. (2003). Histología comparada de bivalvos comerciales en la región sudatlántica española. IX Congreso Nacional de Acuicultura, Cádiz, España, mayo, 2003.

Cheung, Y.H. and Wong, M.H. (1992). Trace metal contents of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) purchased from markets in Hong Kong. *Environ. Manage.*, 16(6): 753–761.

Dallinger, R. (1995). Metabolism and toxicity of metals: Metallothioneins. In: M.P. Cajaraville (ed.), Cell Biology in Environmental Toxicology. Press Service. Universidad Pais Vasco, Bilbao, Spain, pp. 171–190.

DelValls, T.A., Sáenz, V., Arias, A.M. and Blasco, J. (1999). Thallium in the marine environment: First ecotoxicological assessments in

- the Guadalquivir estuary and its potential adverse effect on the Doñana European Natural Reserve after the Aznalcóllar mining spill. *Cienc. Mar.*, 25(2): 161–175.
- Díaz-Méndez, F.M., Rodríguez-Ariza, A., Usero-García, J., Pueyo, C. and López-Barea, J. (1998). Mutagenic activation of aromatic amines by molluscs as a biomarker of marine pollution. *Environ. Mol. Mutagen.*, 31(3): 282–291.
- Duquense, S.J. and Coll, J.C. (1995). Metal accumulation in the clam *Tridacna crocea* under natural and experimental conditions. *Aquat. Toxicol.*, 32: 239–253.
- Durfort, M., García-Valero, J. and Montes-Castillo, J. (1990). Modified cilia in epithelia of clams infested by *Perkinsus* sp. (Apicomplexa, Perkinsea). VI Colloque International de Pathologie en Aquaculture Marine. Abstracts, 40 pp.
- Engel, D.W. (1999). Accumulation and cytosolic partitioning of metals in the American oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Environ. Res.*, 47: 89–102.
- Establier, R. (1977). Estudio de la contaminación marina por metales pesados y sus efectos biológicos. *Inf. Téc. Inst. Inv. Pesq.*, 47: 1–36.
- Galtsoff, P.S. (1964). The American oyster. *Fish Wildlife Serv. Fish. Bull.*, 64: 1–480.
- Garrido, M.C. (2002). Criterios de calidad ambiental. Aplicación a aguas limitadas del Golfo de Cádiz. Tesis doctoral, Universidad de Cádiz, España, 460 pp.
- George, S.G., Pirie, B.J.S., Cheyne, T.L., Coombs, T.L. and Grant, P.T. (1978). Detoxification of metals by marine bivalves: An ultrastructural study of the compartmentation of copper and zinc in the oyster *Ostrea edulis*. *Mar. Biol.*, 45: 147–156.
- Gutiérrez, M. (1967). Coloración histológica para ovarios de peces, crustáceos y moluscos. *Inv. Pesq.*, 31: 265–271.
- Gutiérrez, M. (1977). Datos sobre la parasitología e histopatología del ostión, *Crassostrea angulata* Lmk, de la costa sudatlántica de España. *Inv. Pesq.*, 41(3): 543–567.
- Hampel, M., Ortiz-Delgado, J.B., Moreno-Garrido, I., Sarasquete, C. and Blasco, J. (2004). Effects of sodium linear alkylbenzene sulphonate on larvae of the seabream (*Sparus aurata*): Histological approach. *Histol. Histopathol.*, 19: 1061–1073.
- Harris, E.D. (1991). Copper transport: An overview. *Proc. Soc. Exp. Med.*, 192: 130–140.
- Kennedy, U.S., Newell, R.I.E. and Eble, A.F. (eds.) (1996). The Eastern Oyster, *Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant, College Park, Maryland, 233 pp.
- López-Artíguez, M., Soria, M.L. and Repetto, M. (1989). Heavy metals in bivalve molluscs in the Huelva estuary. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 42: 634–642.
- López-Barea, J. and Pueyo, C. (1998). Mutagen content and metabolic activation of promutagens by molluscs as biomarkers of marine pollution. *Mutat. Res. Mar.*, 13(399): 3–15.
- Lowe, D.M. (1988). Alterations in cellular structure of *Mytilus edulis* resulting from exposure to environmental contaminants under field and experimental conditions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 46: 91–100.
- McGeer, J.C., Brix, K.V., Skeaf, J.M., DeForest, D.K., Brigham, S.I., Adams, W.J. and Green A. (2003). Inverse relationship between bioconcentration factor and exposure concentration for metals in the aquatic environment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 22(5): 1017–1037.
- Marigómez, I., Soto, M. and Cajaraville, M.P. (1995). Morphofunctional patterns of tissue systems involved in metal handling and metabolism. In: M.P. Cajaraville (ed.), *Cell Biology in Environmental Toxicology*. Press Service. Universidad Pais Vasco, Bilbao, Spain, pp. 89–134
- Moore, M.N. (1985). Cellular responses to pollutants. *Mar. Pollut. Bull.*, 16: 134–139.
- Moore, M.N. (1988). Cytochemical responses of the lysosomal system and NADPH-ferrihemoprotein in molluscan digestive cells to environmental and experimental exposure to xenobiotics. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 46: 81–89.
- Ortiz-Delgado, J.B. and Sarasquete, C. (2004). Toxicity, histopathological alterations and immunohistochemical CYP1A induction in the seabream, *Sparus aurata* early life stages following waterborne exposure to B(a)P and TCDD. *Histochem. J. Mol. Hist.*, 35: 29–45.
- Ortiz-Delgado, J.B., González de Canales, M.L., Sarasquete, C. (1999). Cuantificación y alteraciones histopatológicas producidas por concentraciones subletales de cobre en *Fundulus heteroclitus*. *Cienc. Mar.*, 25(1): 119–143.
- Percival, S.S. and Harris, E.D. (1990). Copper transport from ceruloplasmin: Characterization of cellular uptake mechanism. *Am. J. Physiol.*, 258, C140.
- Rodríguez de la Rúa, A. (1999). Efecto del cobre en el ostión, *Crassostrea angulata* (Lmk.). Cuantificación y alteraciones histopatológicas e histoquímicas. Tesis de licenciatura, Universidad de Cádiz, España, 133 pp.
- Sarasquete, C. and Segner, H. (2000). Cytochrome P450 1A (CYP1A) in teleostean fishes. A review of immunohistochemical studies. *Sci. Total Environ.*, 247: 313–332.
- Sarasquete, C. and Gutiérrez, M. (2004). New tetrachromic VOF stain (type III-G.S) for normal and pathological tissues. *Eur. J. Histochem.*, 49(2): 105–114.
- Sarasquete, C., González de Canales, M.L. and Gimeno, S. (1992). Comparative histopathological alterations in the digestive gland of marine bivalves exposed to Cu and Cd. *Eur. J. Histochem.*, 36: 223–232.
- Sarasquete, C., González de Canales, M.L., Blasco, J., Capeta Da Silva, D., Arellano, J.M. and Gutiérrez, M. (1997). Histochemical distribution and accumulation of trace metals in the heart of green and normal *Crassostrea angulata* specimens from different southwest Spanish coasts. *Eur. J. Histochem.*, 41: 139–148.
- Soto, M. and Marigómez, I. (1995). Techniques for the study of metals in cell biology. In: M.P. Cajaraville (ed.), *Cell Biology in Environmental Toxicology*. Press Service. Universidad Pais Vasco, Bilbao, Spain, pp. 59–88.
- Zaroogian, G. and Yevich, P. (1993). Cytology and biochemistry of brown cells in *Crassostrea virginica* collected at clean and contaminated stations. *Environ. Pollut.*, 79: 191–197.