



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

II. IKERGAZTE NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2017ko maiatzaren 10, 11 eta 12
Iruñea, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

**Erantzun Modulagarriak Cd
Estresaren Pean Magurio
Arruntean (Littorina littorea)**

*Denis Benito Fernandez,
Michael Niederwanger,
Reinhard Dallinger, Urtzi Izagirre
eta Manu Soto*

130-137 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.ii.05.19>

ANTOLATZAILEA:



ELKARLANEAN:



LAGUNTZAILEAK:



Erantzun Modulagarriak Cd Estresaren Pean Magurio Arruntean (*Littorina littorea*)

Denis Benito¹, Michael Niederwanger², Reinhard Dallinger², Urtzi Izagirre¹, Manu Soto¹

¹CBET Research Group, Research Centre for Experimental Marine Biology and Biotechnology (PiE-UPV/EHU), University of the Basque Country UPV/EHU, Areatza Pasalekua, 48620 Plentzia –Bizkaia, Basque Country, ²Institut für Zoologie (Abteilung Zoophysiology), Technikerstraße 25, A-6020 Innsbruck, Austria.

denis.benito@ehu.eus

Laburpena

Itsas ingurunean hainbat kutsatzaileek sortutako toxizitatea sakonki izan da ikertua hainbat espezie zentinelen bidez (Moluskuak, beste batzuen artean). Ikerketa hauek, antolamendu biologikoko maila desberdinetan toxizitate mekanismoak argitzen lagundu dute, maila molekularretik, ekosistema mailaraino. Hala ere, gehiengo diseinu esperimentaletan, kutsatzaile kontzentrazioak ingurugiroan aurki daitezkeenak baino askoz ere altuagoak izan ohi dira. Ikerketa honen helburua kadmio kontzentrazio subletal (0.25 eta 1 mg Cd/l) 21 eguneko esposiziopean magurio arruntean (*Littorina littorea*) sortzen diren ondorio biologikoen determinazioa da. Hauen segida tenporala zehazteko helburuarekin, organo desberdinak (liseri-guruin/gonada konplexua eta zakatzak) diseinatu ziren 0, 4 eta 12 ordu eta 1, 3, 7, 14 eta 21 esposizio egunen ostean eta 12 eguneko detoxifikazio periodo baten ondoren. Biomarkatzaile desberdinak erabili dira maila zelularrean (metalen metaketa intralisosomikoa, aldaketa estrukturalak sistema lisosomikoan) eta ehun mailan (liseri-zelulen eta zelula basofiloen arteko proportzio erlatiboaren aldaketak, liseri-epitelio eta arnas epitelioaren aldaketa morfologikoak). Biomarkatzaileetan alterazio esanguratsuk segida tenporal desberdinetan gertatu ziren Cd esposizioaren ondorioz aipatutako erantzun biologikoetan. Honela, aldaketa histopatologiko azkarrak (egun 1) zakatzetan eman ziren, ehun mailako biomarkatzaileetan berriz beranduago gertatu ziren (7 egun). Horregatik, alerta goiztiarreko parametroa kontsideratu daiteke iragazketaz elikatzen ez diren organismoetan ere, betiere urpean mantentzen badira. Erabilitako biomarkatzaileak oso sentikorak izan dira Cd kontzentrazio ez hilgarrietara mantendutako *Littorina littorea* magurioetan eta erantzun zelularrak oso denbora tarte laburretan izan dira ikusgai (<1 egun). Espero bezala, antolamendu biologiko konplexuagoko erantzunak beranduago izan dira ikusgai (1-7 egun). Kontrol eta talde esperimentalen arteko desberdintasun esanguratsuko puntu kritikoa sistema osoan 7. egunean ezarri da.

Biomarkatzaileak, Ingurumen Toxikologia eta Kutsadura, Kadmioa, Histopatologia.

Abstract

*The toxicity produced by a vast number of pollutants in marine environments has been extensively studied for many years using different sentinel species (i.e. molluscs). These works have contributed to the better understanding of the toxicity mechanisms at different levels of biological complexity, from molecular up to ecosystem level. However, the concentrations used in the majority of the experimental setups were far above environmental levels of pollutants. The aim of the present work is to determine the onset of biological effects in periwinkles (*Littorina littorea*) that were exposed to sublethal cadmium concentrations (0.25 and 1 mg Cd/l) for 21 days. In order to study the time-course effects produced by the selected Cd concentrations, different organs (digestive gland / gonad complex and gills) were dissected out after 0, 4 and 12 hours; and 1, 3, 7, 14 and 21 days of exposure and after a subsequent 12 days detoxification period. Different endpoints were measured at cell (intralysosomal metal accumulation, lysosomal structural changes) and tissue level (changes in the relative proportion of digestive and basophilic cells, morphological alterations in digestive and respiratory epithelia). Significant alterations in biomarkers occurred at different time courses after exposure to Cd for the*

different organs responses. Hence, quick histopathological changes (1 d) occurred in the gills while changes in tissue-level biomarkers were later on (7 d) observed in the digestive gland/gonad complex. Therefore, gill integrity can be considered as an early warning parameter even in non filter feeder organisms but forced to be continuously immersed. The battery of biomarkers were highly sensitive to sublethal exposure concentrations of Cd in Littorina littorea and cell responses could be observed at very short time-courses (< 1d). As expected, responses at higher levels of biological complexity were slightly delayed (1- 7 d). The critical point of significant differentiation between the exposed groups and the control group in the whole system has been established at 7 d of exposure.

Biomarkers, Environmental pollution and toxicology, Cadmium, Histopathology.

1. Sarrera eta motibazioa

Azken hamarkadetan metalek eragindako toxizitatea zientziak sakonki ikertu duen kutsadura mota izan da. Kadmioa (Cd) metalik arriskutsuenetarikoa dugu (Eisler, 1985), ikerketa eta esperimendu asko egin dira honen toxizitate altu eta ubikuitatea direla eta, izan ere, prozesu askotan era masibo eta desegokian erabili ondoren ingurunera isurtzen da (Poon, 1984). Beraz, Cd-ak sortzen dituen efektu biologikoak oso ikertuak izan dira, horregatik, eredu-kutsatzaile kontsideratzen da (ikus berrikuspenua: Marigómez 1989; Goering et al., 1995).

Biomarkatzaileak, ingurune kutsatzaileen eragin biologikoen arrisku adierazle moduan erabiltzen dira (Wu et al., 2005). Muskuilu eta magurio arruntetan (*Littorina littorea*), Cd-a, liseri guruinaren integritate orokorrean eta hau osatzen duten organo desberdinen funtzionalitatean eragiteagatik da ezaguna (Marigómez, 1989). Horretaz gain, molusku liseri-zelulen sistema lisosomikoan (Izagirre et al., 2009), liseri-epitelioko morfologian (Vega et al., 1989), zelula basofilikoen eta liseri zelulen arteko proportzioan (Zaldibar et al., 2007) eta arnas-epitelioan (Marigomez et al., 1990) eragindako aldaketak ikertu dira orokorrean moluskuetan, eta magurio arruntean ere, eskuarki.

Littorina littorea edo magurio arrunta, ikuspuntu desberdinetatik sakonki ikertu da, kutsadura maila subletalen eragina zein den analizatzeko. Beste analisi askoren artean, gure ikerketa taldeak behaketa histopatologikoak, analisi histokimikoak, ikerketa autometalografikoak eta (mikro) analisiak egin ditu urteetan zehar, emaitza egokiak lortuz (Marigómez, 1989; Cajaraville et al., 1990; Soto, 1995; Soto et al., 1996; 2002; Marigómez et al., 2002; Zaldibar et al., 2007), Kadmioak eragindako erantzunak eta kutsadura mekanismoak zeintzuk diren aztertzeko konplexutasun biologikoko maila desberdinetan.

Jakina da moluskuak metalak metatzeko gai direla, ehunetan kontzentrazio altuak lortuz (Bryan, 1983). Hori dela eta, itsas metal kutsaduraren indikatzaile biologikotzat hartu daitezke. Gastropodoen liseri-guruina zehazki, Cd metaketa gunea da, honen akumulazio eta detoxifikazio prozesuetan inplikatur egonik (Marigómez et al., 2002). Metal honen prozesamendu metabolikoa maila biokimiko eta zelular desberdinetako erantzun estrategia anitz (askotan aldiberekoak) aktibatuz gauzatu dezakete gastropodoek.

Orokorrean, molusku liseri-guruina tubulu itsuez osatutako organo lobulatua da. Tubulu horiek, ehun konektiboz eta muskulu zuntzez lotuak daude, eta sinu biszeraletik datorren odolez irriatuak daude. Tubuluak urdailarekin duktu bitartez konektatur daude. Duktuen kopurua aldagarria izan daiteke espezie batetik bestera, eta tubuluetako zelula motak, orokorrean, liseri-zelulak eta zelula basofilikoak dira, baina morfologia orokorra antzekoa da molusku espezie gehienetan (Robinson, 1983). Bibalbioen kasuan ez bezala, *Littorina littorea*-ren liseri-tubuluek antzeko morfologia dute liseriketa prozesuan zehar (Marigómez, 1989). Liseri-tubuluen antolaketaren patroia estrukturala alde batera utziz, bai bibalbioetan eta gastropodoetan, liseri-zelulen altuera erreduzitu egiten dela eta zelula basofilikoen eta liseri-zelulen arteko proportzioa hazi egiten dela ingurugiroko kutsatzaileen eraginez deskribatua izan da lehenago (Vega et al., 1989; Marigómez et al., 1998; Soto et al., 2002; Zaldibar et al., 2007). Liseri-tubuluen liseri-zelulen sistema-lisosomikoaren erantzunak erlaxionatuta daude lisosomen handitzearekin eta mintz lisosomikoaren ezegonkortzearekin kutsatzailepean (Izagirre et al., 2009). Lipofuzinen presentziak liseri-zeluletan, ingurugiroan kutsatzaileen presentzia adierazi

dezakete. Zakatzak, nahiz eta liseri-guruinarekin erlazionaturik ez egon, uretan disolbatutako Cd-arentzako sarrera puntu nagusia direla uste da (Janssen and Ertelt-Jansen, 1983), egestura hau interesgarria egiten duena epe laburreko Cd bidezidoren analisisirako.

Lan honen helburua *Littorina littorea*-n aurreko lanetan baino baxuagoak diren Cd kontzentrazio subletalek (0.25 and 1 mg Cd/l) sortzen dituzten ondorio biologikoak deskribatzea da. Denbora tarte laburrak eta luzeak kontutan hartu dira, laginak epe motzean (ordu tarteak) eta epe luzetan hartuz (21 egun arte), azkenik 12 eguneko detoxifikazio denbora ere egin zen. Ikerketaren helburua lortzeko, sistema lisosomikoaren aldaketak, liseri tubuluen zelula motaren ordezkapena, lipofuszinaren metaketa, liseri-zelulen eta zakatzaren osotasunaren galera aztertu dira. Gainera, Cd-aren barneratze-bideen analisisia egin da autometalografiaren bitartez.

Kutsatzaile baten esposizioak sortzen dituen erantzun biologikoen denborak ulertzea, diseinu esperimental eta biomarkatzaileen interpretazio hobetoetara eramanez lezake, horrela, estres eragileak populazio naturalan edo komunitateetan sortutako kalteen ebaluazio zehatzagoak lortu daitezke. Lortuko diren emaitzak esperimentu berean lortuko diren maila molekularreko beste datuekin bateratzean, toxizitate mekanismoen ulermenaren handipena ekarriko du.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Nahiz eta kadmioak magurioetan sortutako erantzun biologikoak era integratzailean lehenago izan diren ikertuak, sortzen diren efektu biologikoak antzemateko ikuspuntu orokor bat lortzearentzat, epe labur eta epe luze denborak eta errekuerazio epe bat barneratzen dituen ebaluazioa beharrezkoa da. Hare gehiago, esfortzu bereziak egin behar dira litzateke Cd kontzentrazio subletalaren ondorioz sortzen diren lehen orduetako efektuak argitzeko. Beraz, lan honen hipotesia efektu toxikoen hasiera *Littorina littorea*-ren itu-organoetan Cd kontzentrazio subletalaren ondorioz sortuak, denbora tarte oso laburretan determinatu daitezkeela eta detoxifikazio periodo baten ondoren desagertu ahal direla da.

Lan honen helburuak hurrengoak dira:

- 1) Konplexutasun biologiko desberdineko biomarkatzaile bateria bat aplikatzea bi Cd kontzentrazio subletalek sortutako toxizitatea ebaluatzeko 21 egunetan tratatutako magurioetan.
- 2) Aztertutako parametro biologikoen errekuerazioa aztertzea 12 egunetako detoxifikazio epe baten ondoren.

3. Ikerketaren muina

Material eta metodoak:

Aste bateko aklimatazio epe baten ondoren, jatorri komertzialeko 175 magurio aukeratu ziren talde esperimental bakoitzerako, hauek kontrol taldea, CdL taldea (0,25ppm kadmiora esposatuak) eta CdH taldea (1ppm kadmiora esposatuak) izanik. Talde bakoitza 40 litroko esperimentazio edukiontzietan kokatu ziren eta ur gainazalean sare bat jarri zen magurioak uretatik ateratzea saihesteko, esposizio jarrai bat lortuz.

Itu-ehunen disezioak hurrengo esposizio denboratan egin ziren: 0 egun (D0), 4 ordu (H4), 12 ordu (H12), egun 1 (D1), hiru egun (D3), 7 egun (D7), 14 egun (D14), 21 egun (D21) eta 12 egunetako detoxifikazio epearen ondoren (DT).

Disezioaren ondoren, liseri-guruinaren, oinaren eta mantuaren alikuotak prestatu eta liseriketa azidoarekin prozesatu ziren. Laginen Cd kontzentrazioak neurtu ziren gar edo grafito labeekin, eta absortzio atomikoko espektrofotometriaren bidez, polarizatutako Zeeman bigarren planoko zuzenketa aplikatuz. Cd edukia estatistikoki analizatu zen bi bideko ANOVA-rekin eta Holm-Sidak metodoarekin.

Histopatologiarako eta autometalografiarako liseri-guruin laginak fosfato tanpoian (%4 formaldehido) fijatu ziren. Ehunen prozesamenduaren ondoren, laginak mikrotomoarekin ebaki ziren (5 µm), hematoxilina/eosinarekin tintatu ziren histopatologiarako eta zilar kit nabarmentzaile batekin tintatu ziren autometalografiarako laginak.

Analisi histokimikoetarako laginak nitrogenu likidoan izoztu eta -80°C-tan gorde ziren. 8µm-ko ebaki serialak gauzatu ziren kriotomoarekin (-25°C kabinete tenperaturan) eta β-glucuronidasa aktibitatearen demostraziorako eta lipofuszinaren determinaziorako erabili ziren.

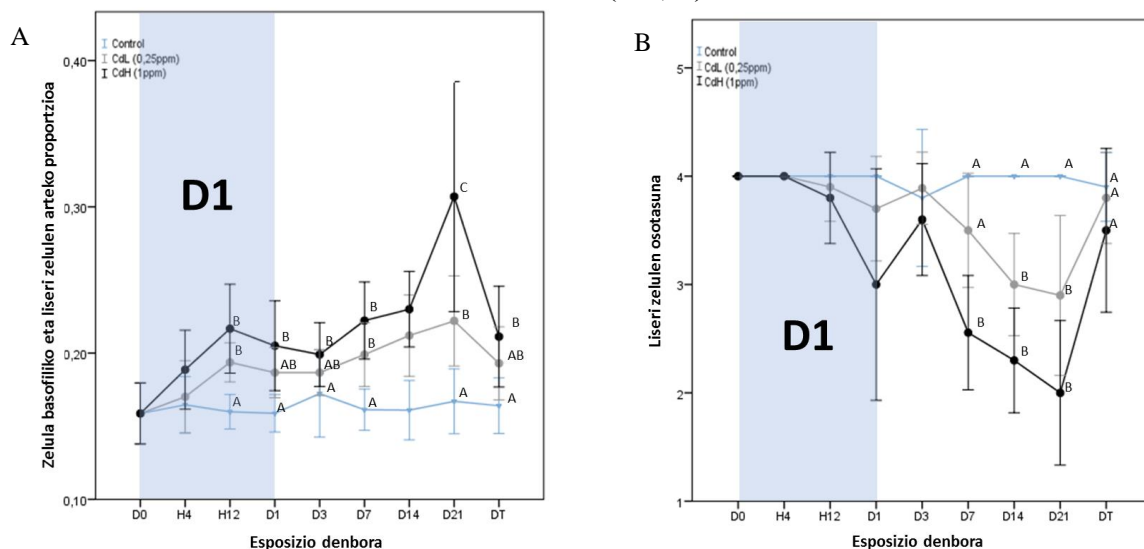
Alterazio histopatologikoak (Zelula basofiliko eta liseri-zelulen arteko proportzioaren aldaketak, liseri-zelulen eta zakatzen osotasunaren galera), analisi autometalografikoa (zilarrezko hauspeakin beltzak) eta lipofuszinaren determinazioak era semikuantitatiboan neurtu ziren eta metodo estatistiko ez parametrikoeekin analizatu ziren.

Lisosomen bolumen dentsitatean (Vv) aldaketak, β-glucuronidasaren aktibitatearen demostrazioaren ondoren, BMS irudi analisi software-a erabiliz neurtu ziren: bide bateko ANOVA eta Duncan-en testa erabili ziren analisi estatistikorako.

Emaitzak eta eztabaida:

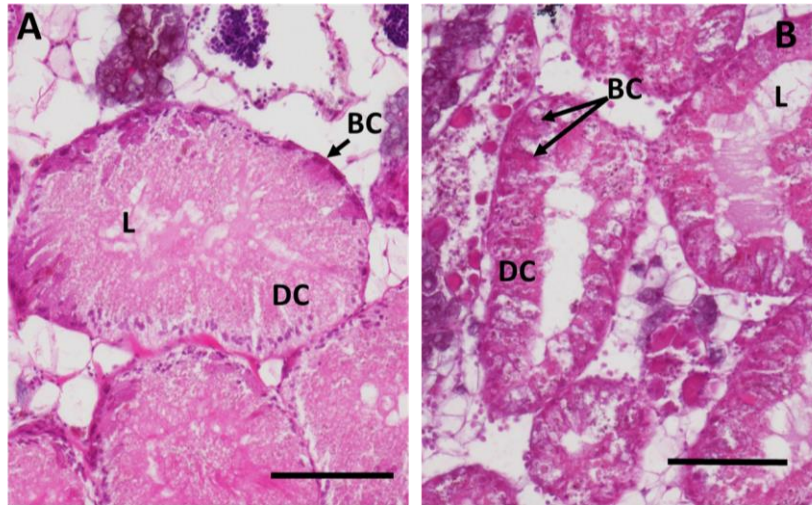
Cd-pean egondako denborak gora egin ahala, zelula basofiliko eta liseri-zelulen arteko proportzioak gora egiten du. Joera hau argiagoa da CdH taldean (1A. eta 2. Irudiak). Detoxifikazio periodoaren ondoren, desberdintasun estatistikoak bakarrik kontrol taldearen eta CdH taldearen artean aurkitu ziren, honek, CdL taldearen errekupeazioa adierazten du.

1.Irudia. A:Zelula basofiliko eta liseri-zelulen arteko proportzioa kontrol, CdL eta CdH taldeetan. B: Liseri-zelulen osotasun galera kontrol, CdL eta CdH taldeetan. Barrek desbiderapen estandarra islatzen dute. Letrek desberdintasun estatistikoak adierazten dituzte (P=0,05) .



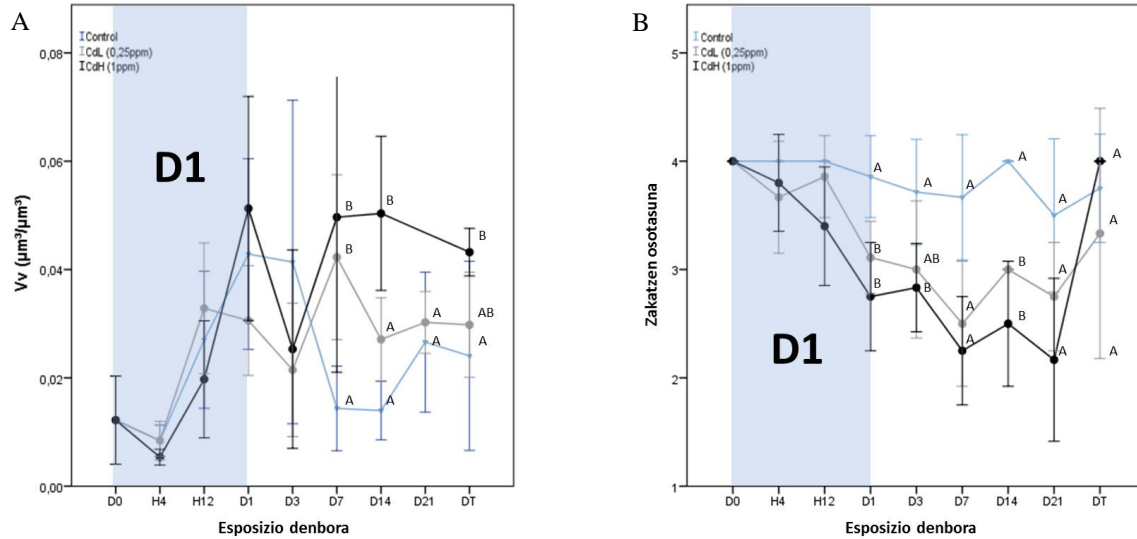
Liseri-zelulen osotasunak behera egiten du Cd dosiarekin eta esposizio denborarekin batera (1B. eta 2. Irudiak). Joera hau argiagoa da dosi altuenaren esposizioaren ondorioz. Detoxifikazio periodoaren ondoren ez dago desberdintasun estatistikorik talde esperimentalen artean, honek, neurtutako parametroaren errekupeazioa adierazten du.

2.Irudia. Kontrol magurio baten (A) eta 21. eguneko CdH taldeko magurio baten (B) Liseri-tubuluaren ebaketan mikrografia hematoxilina-eosinarekin tintatuak. Eskala barrak: 200µm, L: lumena, DC: liseri-zelulak, BC: zelula basofilikoak.



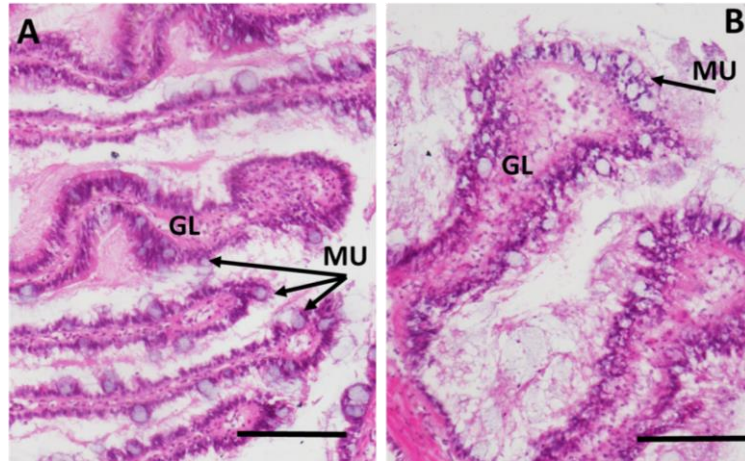
Vv lisosomikoak CdL eta CdH taldeetan ez du desberdintasun estatistikorik islatu kontrol taldearekiko 7. egunerarte (3A. irudia). Detoxifikazio periodoaren ondoren desberdintasun estatistikoak bakarrik CdH eta kontrol taldeen artean aurkitu dira, CdL taldearen errekupeazioa adieraziz.

3.Irudia. A: β -glucuronidasaren aktibitatearen demonstrazioaren bidez neurtutako bolumen dentsitate lisosomikoa (Vv). B: Zakatzen osotasun galera kontrol, CdL eta CdH taldeetan. Barrek desbiderapen estandarra islatzen dute. Letrek desberdintasun estatistikoak errepresentatzen dituzte (P=0,05).



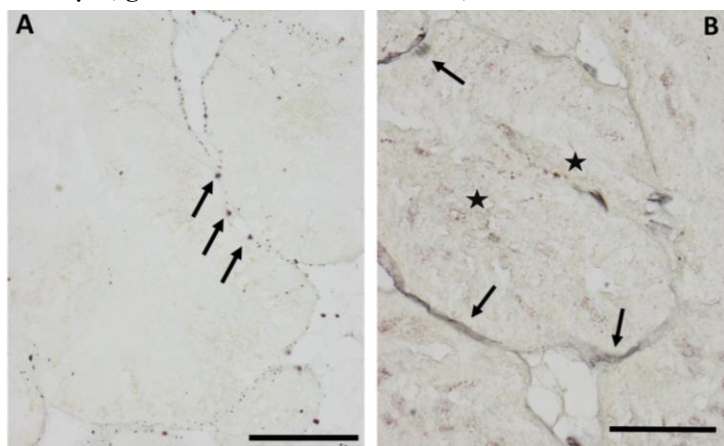
Zakatzen osotasunak behera egiten du Cd-pean egondako denborak eta dosiak gora egin ahala. Joera hau argiagoa da CdH taldean (3B. eta 4. irudiak). Parametro honen emaitzek detoxifikazio epearen 12 egunen ondoren, errekupeazioa adierazten dute.

4.Irudia. Kontrol magurio baten (A) eta 21. eguneko CdH taldeko magurio baten (B) zakatzen ebaketen mikrografia hematoxilina-eosinarekin tintatuak. Eskala barrak: 200µm, GL:Zakatz laminak, MU: Mukozitoak.



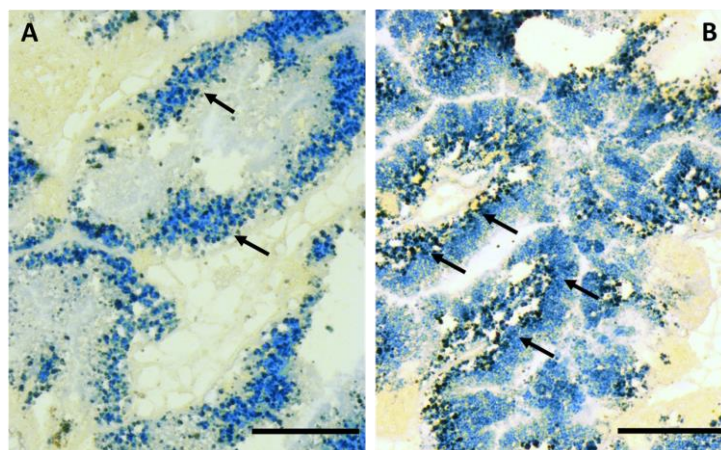
Kontrol taldeko magurioek zilarrezko hauspeakin beltzak (ZHB) zeuzkaten liseri-tubuluen lamina basalean (5. irudia). ZHB-ak liseri-guruineko ehun konektiboan, liseri-traktuaren epitelioan eta zakatzetan banatuak agertzen ziren tratatutako animalietan. Akumulazioak gora egiten du Cd-aren denborak eta dosiak gora egin ahala.

5.Irudia. Tintaketa autometalografikoaren mikrografiak. A: kontrol taldeko banako baten lamina basaleko marka. B: Liseri-dibertiukuletako liseri-zelulen marka 21 eguneko CdH taldeko magurio batean. Eskala barrak: 200µm, geziak: ZHB lamina basalean, izarrak: ZHB liseri-zeluletan.



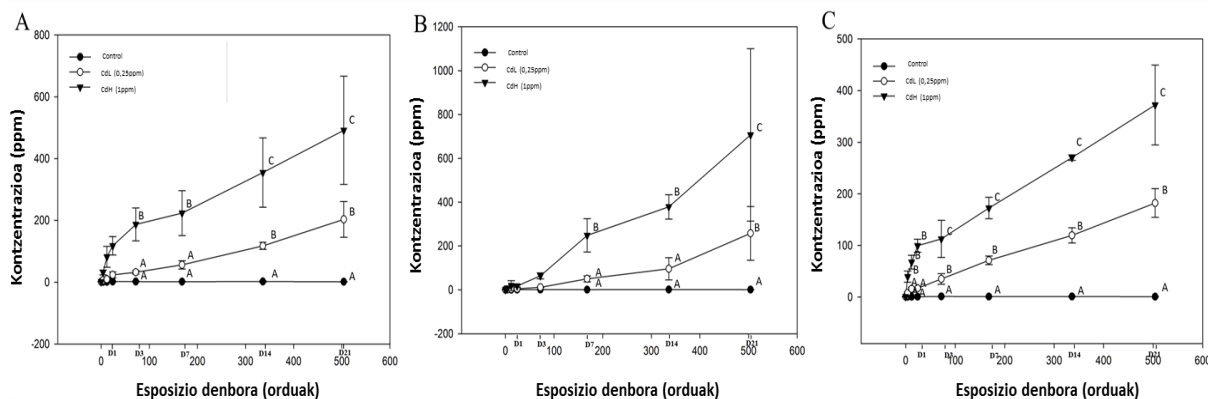
Lipofuszinaren agerpena liseri-guruinean era argi eta gradualean handitu da tratatutako animalietan, eta hare eta agerikoa da CdH taldeko animalietan (6. irudia).

6.Irudia. Lipofuszinaren tintaketaren mikrografiak. A: kontrol taldeko banako baten liseri-guruina. B: 21 eguneko CdH taldeko magurio baten liseri-guruina. Eskala barrak: 200µm, geziak: lipofuszina metaketa.



Cd metaketa garrantzitsuagoa da liseri-guruinean beste organoetan baino, nahiz eta, mantuak eta oinak ere Cd kantitate garrantzitsuak akumulatu duten, liseri-guruinak baino lehenago, gainera. Cd metaketa oso baxua da oinean (7. Irudia).

7. Irudia. Cd neurketak *Littorina littorea*-ren A: Mantuan, B: Liseri-guruinean eta C: Oinean. Barrek desbiderapen estandarra islatzen dute. Letrek desberdintasun estatistikokoak errepresentatzen dituzte (P=0,05). Bi bideko ANOVA-k (P=<0,001) estatistikoki esangarriak diren desberdintasunak daudela demostratzen du denbora eta dosiaren artean aztertutako ehun guztietan.



4. Ondorioak

- 1) Magurioen liseri-guruinean eta zakatzetan kadmio kontzentrazio (0.25 eta 1 mg Cd/l) subletalaren ondorioz sortu diren efektu biologikoak denbora tarte desberdinetan determinatu dira. Efektu biologiko horiek konplexutasun biologikoaren maila desberdinetan ikusten dira tratamendu denbora tarte desberdinekin erlazionatuta.
- 2) Aldaketa histopatologikoak lehenik zakatzetan agertu dira (osotasunaren galera, sekrezio mukosoen areagotzea) eta ehun mailako aldaketak beranduago agertu dira liseri-guruinean. Zakatzen osotasuna alerta goiztiarreko parametroa kontsideratu daiteke filtratzaileak ez diren animalietan urpean egotera behartzen badira.
- 3) Egitura lisosomikoaren aldaketak, metal eta lipofuszina metaketa intralisosomikoak, zelula basofiliko eta liseri-zelulen arteko proportzioaren igoerak eta liseri-zelulen osotasunaren galerak, liseri-prozesuen alterazioa adierazten dute, erreperatuak izan daitezkeenak detoxifikazio epe baten ondoren, gutxienez kontzentrazio erlatiboki baxuetan (<0.25 ppm).

Lan honen tesia *Littorina littorea*-ren itu-organoetan sortutako efektu toxikoen agerpenak determinatuak izan daitezkeela esposizio denbora oso baxuetan, Cd kontzentrazio erlatiboki baxuetan ere, ondo zehaztutako zelula eta ehun mailako biomarkatzaile bateriaren laguntzarekin, eta hau, lagungarria izan daitekeela metalek sortutako efektu biologikoen progresioaren ulergarritasuna areagotzeko.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

“Metal Metabolism in Animals II” International Journal of Molecular Sciences aldizkariko ale berezian agertuko den argitalpena prestatze prozesuan dago.

6. Erreferentziak

Bryan, G.W., 1983. Brown seaweed, *Fucus vesiculosus*, and the gastropod, *Littorina littoralis*, as indicators of trace-metal availability in estuaries. *Science of The Total Environment*. 28 (1-3), 91-104.

- Cajaraville, M.P., Marigómez, I., Angulo, E., 1990. Short-term toxic effects of 1-naphthol on the digestive gland–gonad complex of the marine prosobranch *Littorina littorea* (L.): a light microscopic study. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 19, 17–24.
- Eisler, R. 1985. Cadmium hazards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review. *U.S. Fish and Wildlife Service Biological Report* 85.
- Goering, P.L., Waalkes, M.P., Klaassen, C.D., 1995. Toxicology of Cadmium. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 115, 189-214.
- Izagirre, U., Ruiz, P., Marigómez, I., 2009. Time-course study of the early lysosomal responses to pollutants in mussel digestive cells using acid phosphatase as lysosomal marker enzyme. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 149C, 587–597.
- Janssen, H.H., Ertelt-Jansen, V., 1983. Cytochemical demonstration of cadmium and iron in experimental blue mussel (*Mytilus edulis*). *Mikroskopie (Wien)* 40, 32-340.
- Marigómez, I., 1989. *Aportaciones cito-histológicas a la evaluación ecotoxicológica de niveles subletales de cadmio en el medio marino: estudios de laboratorio en el gasterópodo prosobranquio Littorina littorea (L.)*. Doktorego Tesi Europearra. Euskal Herriko Unibertsitatea. 430pp.
- Marigómez, I., Cajaraville, M.P., Angulo, E., 1990. Cellular distribution of cadmium in the common winkle *Littorina littorea* (L.) determined by X-ray microprobe analysis and histochemistry. *Histochemistry* 94, 91-199.
- Marigómez, I., Cajaraville, M.P., Soto, M., Lekube, X., 1998. Cell-type replacement, a successful strategy of mollusks to adapt to chronic exposure to pollutants. *Cuad. Invest. Biol.* 20, 411–414.
- Marigómez, I., Soto, M., Cajaraville, M.P., Angulo, E., Giamberini, L., 2002. Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microsc. Res.Tech.* 56, 358–392.
- Poon, C.P.C. 1984. Removal of cadmium from wastewaters, *Experientia*, 40 (2), 127-136.
- Robinson, W. E., 1983. Assessment of bivalve intracellular digestion based on direct measurements. *J. Mollusc Stud.* 49, 1-8.
- Soto, M. 1995. *Simultaneous quantification of bioavailable heavy metals in molluscs by means of cellular and tissue analysis. Implications for monitoring metal pollution in water quality assessment*. Doktorego Tesi Europearra. Euskal Herriko Unibertsitatea. 330 pp.
- Soto, M., Cajaraville, M.P., Angulo, E., Marigomez, I., 1996. Autometallographical localisation of protein-bound copper and zinc in the common winkle, *Littorina littorea*: a light microscopical study. *Histochem. J.* 28, 689-701.
- Soto, M., Zaldibar, B., Cancio, I., Taylor, M.G., Turner, M., Morgan, A.J., Marigómez, I., 2002. Subcellular distribution of cadmium and its cellular ligands in mussel digestive gland cells as revealed by combined autometallography and X-ray microprobe analysis. *Histochem. J.* 34, 273–280.
- Vega, M.M., Marigómez, I., Angulo, E., 1989. Quantitative alterations in the structure of the digestive cell of *Littorina littorea* on exposure to cadmium. *Mar. Biol.* 103, 547–553.
- Wu, R.S.S., Siu, W.H.L., Shin, P.K.S., 2005. Induction, adaptation and recovery of biological responses: implications for environmental monitoring. *Mar. Pollut. Bull.* 51, 623–634.
- Zaldibar, B., Cancio, I., Marigómez, I., 2007. Reversible alterations in epithelial cell turnover in digestive gland of winkles (*Littorina littorea*) exposed to cadmium and their implications for biomarker measurements. *Aquatic Toxicology* 81, 183–196.

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau Euskal Herriko Unibertsitatearengatik -UPV/EHU (UFI 11/37) eta Eusko Jaurlaritzarengatik, ikerketa talde kontsolidatuen bitartez (IT810-B) izan da finantziatua. Innsbruck eta Bilboren elkarlanaren parte bat Austrian Science Foundation (FWF)-ek finantziatutako I 1482-N28 (DACH) zenbakia duen proiektuaren bitartez finantziatu da.