

Trabajo Original

Ecotoxicología

Efecto del cadmio sobre la respuesta celular celómica de *Pyura vittata* (Stimpson, 1852)

Luis Arredondo¹, Roseulys Benítez¹, Mairin Lemus^{1,2}

¹Laboratorio de Biología Celular, Departamento de Biología, Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente, Sucre, Venezuela.

²Laboratorio de Ecofisiología, Departamento de Biología Marina, Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, Sucre. Venezuela. Autor de correspondencia mlemus88@gmail.com

Resumen

Los ecosistemas marinos y terrestres se encuentran expuestos a muchos tipos de contaminantes entre los que se destacan los metales pesados, por su alta persistencia, no degradabilidad y toxicidad. Es por ello que muchos organismos se han utilizado para evaluar la presencia de estos elementos a niveles tóxicos. En el presente trabajo se utilizó *Pyura vittata* para evaluar el efecto de una dosis subletal de cadmio sobre la población celular celómica durante exposición crónica. Se estimó la dosis subletal a 96 h según la metodología propuesta por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, posteriormente se seleccionó una dosis subletal de 0,015 mg/l de Cd para la realización de los ensayos durante 21 días. Se determinó la incorporación del metal en el músculo hepatopáncreas, túnica y branquias. Se tomaron muestras de la fracción celómica a los 3, 7,15 y 21 días de exposición para evaluar la fracción de los celomocitos. Se obtuvo la fracción celómica y se realizó el conteo total de células, porcentaje de células viables y porcentaje de cada uno de los tipos celulares. La dosis letal media para *P. vittata* expuesta a cadmio fue de 0,02 mg.L⁻¹. Los resultados determinaron que el cadmio induce un incremento del número de celomocitos en períodos cortos de exposición, particularmente de las células tipo anillos, sin embargo, durante la exposición crónica de 21 días los organismos tienden a normalizar el número de células.

Palabras claves: *Pyura vittata*, cadmio, bioensayo crónico, células celómicas, bioacumulación

Abstract

Effect of cadmium on the coelomic cellular response of Pyura vittata (Stimpson, 1852)

The marine and terrestrial ecosystems are exposed to many types of contaminants in which protrude the heavy metals by their high persistence, non-degradability and toxicity. Many organisms have been used to assess the presence of these elements. In this paper *Pyura vittata* was used to evaluate the effect of a sublethal dose of cadmium on the coelomic cell population. Sublethal dose was estimated at 96 h following the methodology proposed by the Environmental Protection Agency of the United States later sublethal dose was selected for conducting chronic tests for 21 days. We determined the incorporation of metal in the hepatopancreas muscle, tunic and gills. Samples were taken from the coelomic fraction at 3, 7.15 and 21 days of exposure to assess the fraction of celomocitos. Coelomic fraction was obtained and performed total cell count, percentage of viable cells and percentage of each cell type. The median lethal dose for *P. vittata* exposed to cadmium was 0.02 mg/l. The results determined that cadmium induces an increase in the number of celomocitos in short periods of exposure, three days, however during chronic exposure of 21 days, the organisms tend to standardize the cell number.

Key words: *Pyura vittata*, cadmium, chronic bioassay, coelomic cells, bioaccumulation

Introducción

Como consecuencia de la industrialización y el crecimiento demográfico se han incrementado los niveles de cadmio en todos los componentes de la biosfera, pero en particular los cuerpos de agua son los más vulnerables, hasta tal punto que han llegado a constituir un problema de contaminación para organismos marinos y donde muchos sirven de alimento al hombre, pudiendo ocasionar efectos tóxicos a corto o largo plazo ⁽¹⁰⁾.

El cadmio es un metal abundante en el medio acuático y terrestre, debido a que ingresa a estos ecosistemas a través de los desechos industriales urbanos. El valor límite legal en organismos acuáticos es 1 ppm, valores superiores son considerados altamente tóxicos ⁽²⁹⁾. Además, la concentración de cadmio en el agua varía ampliamente, las más altas se han observado en ríos lagunas y zonas costeras, que reciben aguas contaminadas por industrias electrónicas y metalúrgicas ^(12, 14) La toxicidad del cadmio es muy compleja y se basa en las múltiples posibilidades que tiene para enlazarse específica e inespecíficamente a moléculas, así como la capacidad de reemplazar otros metales que desempeñan un papel importante en la actividad enzimática, reaccionando con grupos activos como carboxilo, fenol y otros, dependiendo de las condiciones redox del sedimento y de su especiación ⁽⁸⁾.

Para monitorear la contaminación por metales en los ecosistemas marinos se han usado ciertas especies de organismos entre las que se encuentran las ascidias, sin embargo, entre los biomonitores marinos son los menos estudiados para evaluar toxicidad^(3,4). Dado a que estas especies son capaces de regular las trazas de estos metales y sobrevivir en ambientes contaminados por diferentes mecanismos tales como metalotioninas, gránulos, entre otros⁽²⁰⁾, cambios en las proteínas asociadas a estrés y metabolizaciones en el retículo endoplásmico⁽¹⁶⁾.

La ascidia *Pyura vittata* es un tunicado solitario, perteneciente a la familia Pyridae, clase Ascidiaceae, se localiza ampliamente en el Mar Caribe⁽²⁸⁾ y se han reportado en la zona costera del estado Sucre, específicamente en la bahía de Mochima, y al sur del

Golfo de Cariaco a profundidades de 0,5 y 10 metros. Algunos trabajos sobre *P. vittata* en el país se han dirigido hacia su morfología y distribución⁽⁵⁾, sin embargo, no existen estudios toxicológicos para Venezuela.

Los tunicados presentan una importancia significativa debido a su posición filogenética en comparación con los demás vertebrados, tienen un mecanismo de defensa que es análogo al sistema inmune adaptativo de los mamíferos, siendo la fagocitosis y la citotoxicidad celular probablemente la respuesta protectora de estos animales⁽²¹⁾.

En este estudio se persigue determinar el efecto tóxico del cadmio sobre las células celómicas de *Pyura vittata* a través del uso de una dosis subletal y su mecanismo de defensa ante la exposición crónica.

Materiales y métodos

Captura de ejemplares

Los ejemplares de *P. vittata* se colectaron frente a la zona del Peñón, extremo oeste del golfo de Cariaco, estado Sucre, Venezuela, utilizándose buceo autónomo a profundidades entre 4 a 8 metros, luego se trasladaron los organismos al laboratorio de Biología Pesquera del Instituto Oceanográfico de Venezuela, en recipientes plásticos que contenían agua de mar y aireación, se aclimataran por una semana en acuarios de 25 l de capacidad debidamente aireados, temperatura 25 ± 2 °C, salinidad 36‰, pH 8-8,3).

Determinación del Límite de tolerancia media (DL₅₀)

Después del período de aclimatación de los ejemplares, se procedió a la determinación del DL₅₀ para el cadmio, para lo cual se utilizaron concentraciones que van desde 0,00225 mg/l a 2,25 mg/l siguiendo la metodología de Stephan⁽²⁷⁾. En base a estos resultados, se tomo como dosis subletal 0,02 mg/l, concentración que garantizó la sobrevivencia de los organismos por un período de 21 días.

Bioensayos de toxicidad

Los ejemplares de *P vittata* fueron colocados a una dosis subletal de 0,015 mg/l, utilizando un modelo de bioensayo estático de larga duración con renovación de metal cada 24 h, con el que se evaluó la incorporación de cadmio en los diferentes tejidos y la respuesta celular en los días 0, 3, 7, 15, y 21, una vez comenzado el bioensayo.

Análisis de celomocitos

Para los análisis celulares se extrajeron células del fluido celómico, y luego se colocaron en una cámara de Neubauer y fueron contadas según la metodología APHA⁽¹⁾, tomando en cuenta sólo los campos periféricos utilizados para contar el número de leucocitos. Se cuantificaron utilizando la fórmula: $N^{\circ} = \text{Total de células/ml de los 4 campos} \times 10^4/4$. Se determinó el porcentaje de células viables utilizando una coloración de azul de tripano, estas células se midieron por conteo diferencial, aquellas que presentaran tinción se tomaron como muertas y las que no como vivas. Se realizaron frotis para establecer los tipos de células siguiendo la metodología señalada por Fuke⁽¹³⁾.

Análisis estadísticos

Se realizaron análisis de varianza de una vía entre las variables estudiadas con respecto al tiempo de exposición al Cd, también se realizó un análisis de varianza para evaluar el contenido de cadmio en los tejidos. Cuando las diferencias resultaron ser significativas se realizaron pruebas *a posteriori* aplicando el paquete estadístico de STATGRAPHICS 5.0.

Resultados y discusión

Los resultados de la prueba de toxicidad de la dosis letal media (DL₅₀) a 96 horas de exposición a Cd, fue de 0,02 mg/l, lo cual denota la gran sensibilidad de esta especie para el metal. Esto coincide con los patrones reportados por Reish en 1984 para algunas especies marinas expuestas al mismo metal: poliquetos (0,02-12) mg/l; moluscos (2,2-

35) mg/l. y crustáceos (0,01-47) mg/l. El límite DL₅₀ presentado en este trabajo demuestra baja tolerancia de la especie *P vittata* al cadmio, con un concentración media tóxica ubicada en el límite inferior señalado por Reish⁽²²⁾ en la literatura para poliquetos.

La incorporación de cadmio presentó diferencias significativas entre los tejidos analizados (Tabla 1), el hepatopáncreas y las branquias presentaron la mayor bioacumulación con concentraciones de $3,834 \pm 1,403$ y $4,067 \pm 1,337$ µg/g de masa seca respectivamente, mientras que el músculo presentó la menor tasa de incorporación. La cinética de incorporación de metales en invertebrados ha demostrado que los tejidos parenquimatosos presentan siempre las mayores concentraciones del metal, principalmente en los branquias y hepatopáncreas y esto se ha atribuido a que los mismos pueden metabolizar estos elementos a través del enlazamiento a proteínas de alto y bajo peso molecular como por ejemplo proteínas ricas en cisteínas no metalotioninas y metalotioninas^(24,25).

Por otro lado, la cinética de incorporación de cadmio en todo el tejido blando de los ejemplares, demostró un incremento creciente a lo largo del tiempo de exposición, llegando a alcanzar una concentración media en el organismo de $0,393 \pm 0,267$ µg/g de masa seca a los 15 días de exposición. Concentración que se mantiene en el mismo orden hasta los 21 días de exposición. Esta cinética de incorporación demuestra que el organismo al final del bioensayo estabiliza los niveles del metal en los tejidos, pudiendo estar asociado a la capacidad de carga que puede tolerar el organismo y a la activación de mecanismos de depuración (Fig 1).

El número total de células de *P. vittata* presentaron diferencias significativas ($F_s = 5,82$; $P = 0,0019$) durante los días de exposición al metal (0, 3, 7, 15 y 21), con valores comprendidos entre 193,792 hasta 351,25 células (Fig 2). Este último se correspondió con el número de células determinados durante el tercer día de exposición, siendo este día significativamente mayor al resto de los días evaluados. Estos resultados demuestran que hubo un aumento en la actividad celomopoyética, como respuesta a la presencia del metal en cortas exposiciones (3 días), sin embargo, al continuar la exposición al metal los organismos logran alcanzar concentraciones similares a las iniciales. Esto demuestra

que las respuestas a este nivel son las primeras en manifestarse, como mecanismo de defensa ante la presencia de cadmio.

Los resultados obtenidos en la respuesta inmune en diferentes organismos ha sido controversial ya que algunos autores han determinado disminución del número de células cuando los organismos son expuestos a metales pesados, pero otros no muestran cambios. En estudios realizados con el poliqueto *Eurythoe complanata* expuestos a compuestos orgánicos, mostraron una inmunosupresión⁽¹⁷⁾ durante cortas exposiciones, sin embargo, para algunos bivalvos se ha determinado que no existe variación en el número de hemocitos, pero si en algunos tipos celulares⁽¹⁴⁾. Tal como ha sido señalado por varios autores, las respuesta a nivel de las células de la hemolinfa o el celoma constituyen respuestas inespecíficas⁽²⁾ ante la presencia de cualquier cuerpo extraño y estas varían ampliamente de acuerdo al toxico.

Se caracterizaron cuatro tipos celulares de acuerdo a la clasificación señalada por Fuke⁽¹³⁾, los cuales son amebocitos no granulares (hialinos), amebocitos granulares, morula y anillos. Las células tipo anillo son las células más abundantes en relación a los hialinos y la mórula (Fig 3)

El conteo diferencial celular no mostró diferencias significativas en relación con los días de exposición crónica al metal ($F_s=0,13$; $p=0,967$), sin embargo, mostraron diferencias entre los tipos celulares ($F_s=58,64$; $p=0,000$), los anillos presentaron la mayor proporción (75,40 %) y los amebocitos hialinos la menor (0,40 %). Por el contrario, Biggs y Swinehart (1979) encontraron que los amebocitos en la *Ascidia ceratodes* presentaron el mayor porcentaje, seguido por los anillos, indicando que los amebocitos están involucrados en el metabolismo de los metales o cualquier otro tipo de xenobiótico. Los tipos de células de los tunicados presentan características externas muy diferentes al compararlas entre ellos⁽¹³⁾, no obstante, los grupos celulares encontrados en *P. vittata* coinciden con el patrón reportado por algunos autores^(7, 23, 26).

Aunque no se evidenciaron diferencias significativas en los tipos celulares durante los tiempos de exposición al cadmio, se pudieron apreciar tendencias en los tipos celulares (Fig 4) Las células tipo anillos se incrementaron de acuerdo al tiempo de

exposición a cadmio, mientras que los amebocitos decrecieron. Las células tipo mórula se incrementaron hasta el día 7 y luego comenzaron a descender hasta el final del ensayo.

Al tercer día de exposición a Cd el número total de células se incremento significativamente producto del aumento de las células tipo anillo y las mórulas y una disminución de los amebocitos. Cuando los ejemplares alcanzan los 21 días de exposición los amebocitos han disminuido aún mas y los anillos son la principal célula de la hemolinfa para este período, llegando a alcanzar el 83% del total celular, lo que demuestra una activa participación ante la presencia de Cd, por otro lado existe una supresión de los amebocitos que también podrían estar involucrados en la toxicidad del cadmio tal como lo señala Biggs y Swinehart⁽⁶⁾.

El conteo diferencial celular se ha empleado en muchos anélidos como parámetro celular en ensayos toxicológicos. Rodríguez-Grau *et al.*⁽²³⁾, estudiando el efecto de PCB sobre *Lumbricus terrestris*, observaron que las subpoblaciones celulares eran afectadas (basófilas, acidófilas y transicionales) e indican que la población de células basófilas decrece después de estar sometidas por 5 días al xenobiótico. De la misma manera, ocurre con las funciones inmunológicas fagocitosis y formación de rosetas "E" y "S". Es importante destacar que la población de células basófila ha sido identificada como la más activa subpoblación inmune^(9,18).

Se determinaron diferencias significativas ($F_s = 3,135^{**}$; 0,032) entre la viabilidad celular durante los días de exposición. La viabilidad celular mostró valores desde 91,1667 % hasta 98,333 %. (Tabla 2). Aunque se evidenciaron diferencias significativas, estas no parecen estar asociadas a la presencia del metal, pues la menor viabilidad de las células se presenta durante el periodo previo a la incorporación del cadmio, de tal forma que el metal no parece afectar la viabilidad de las células a las dosis aplicadas en la presente investigación. Sin embargo, algunos trabajos han demostrado disminución de la viabilidad ante la presencia de metales y otros tipos de xenobioticos en tunicados⁽²¹⁾.

Debido a que la viabilidad celular en *P. vittata* se mantuvo sin efectos atribuibles a la presencia del metal se puede señalar que existe una buena capacidad de inmunocompetencia, ya que existen trabajos que indican que esta característica es

favorable para la evaluación toxicológica sobre respuestas humorales y celulares del sistema inmunitario y permite estudiar el posible efecto directo sobre el sistema inmunológico de la especie⁽¹¹⁾, particularmente aquellas células que son afectadas significativamente en número y forma. Particularmente en el presente trabajo las células tipo anillos que se incrementaron durante todo el proceso de exposición y los amebocitos granulares que presentaron un comportamiento inverso (Fig 3) son respuestas celulares importantes ante la presencia del Cd. Estas últimas, también llamadas células citotóxicas, están constituidas por gránulos y presentan vacuolas que contienen enzimas oxidativas y sustratos polifenólicos, que generan especies reactivas⁽¹⁹⁾. De esto se deduce que estas células aparentemente están comprometidas con la citotoxicidad del cadmio.

En conclusión, el cadmio causó efectos en las reacciones inmunológicas del tunicado, demostrándose una estimulación en la formación de células tipo Anillo, mórula y una disminución de los amebocitos. La causa de la conexión implícita entre las reacciones inmunes innatas y la defensas antipatogenicas, demuestran la gran capacidad de los tunicados de defenderse de agentes extraños. Muy poco es conocido acerca de las de las respuestas celulares ante la presencia de metales pesados por lo que es necesario llevar a cabo estudios sobre la distribución de cadmio en la fracción celómica de *P. vittata* y las respuestas particulares de cada tipo celular.

Tabla 1.- Bioacumulación de cadmio en los tejidos del tunicado *P. vittata* expuestos a 0,015 mg/l de Cd durante 21 días de exposición. Se presentan los valores promedios \pm la desviación estándar. (Fs = 5,576*, P \leq 0,001)**

Tejidos	Concentración
Músculo	0,186 \pm 0,276
Hepatopáncreas	3,834 \pm 1,403
Branquias	4,067 \pm 1,337
Túnica	0,894 \pm 1,754

Figura 1. Concentración de cadmio en tejido blando de *P. vittata* expuesto a 0,015 mg/l de Cd durante 21 días. La barra indica la desviación estándar, la línea superior e inferior el rango y la línea gruesa la media. (Fs = 13,528*, P \leq 0,000)**

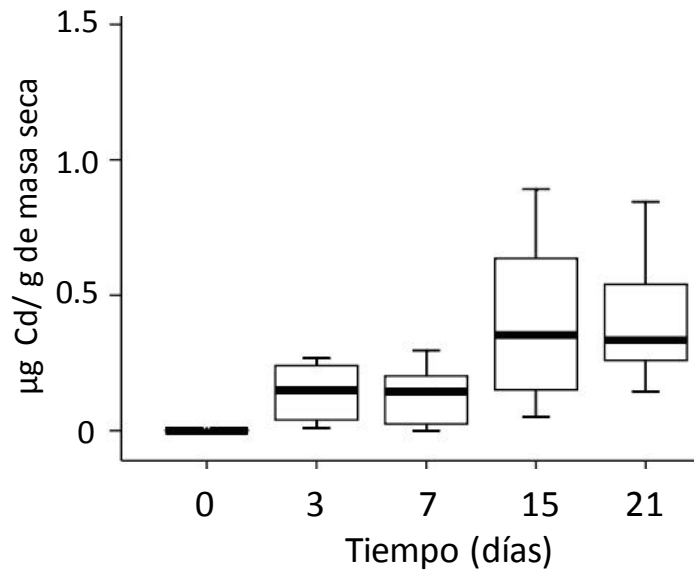


Figura 2. Número total de células de *P. vittata* expuesto a 0,015 mg/l de Cd durante 21 días. La barra indica la desviación estándar, la línea superior e inferior el rango y la línea gruesa la media. (Fs = 5,82; P ≤ 0,002)**

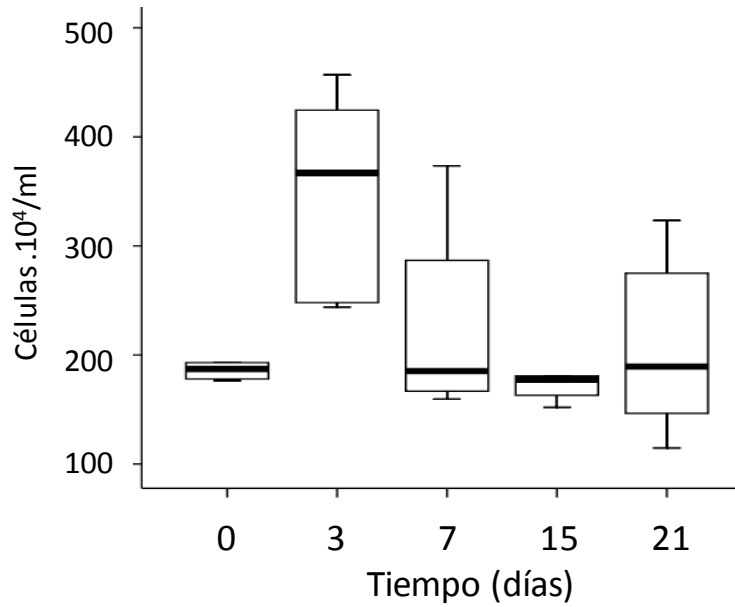


Figura 3.- Tipos células de la hemolinfa de *P. vittata*. Clasificación de acuerdo a Fuke (1979).

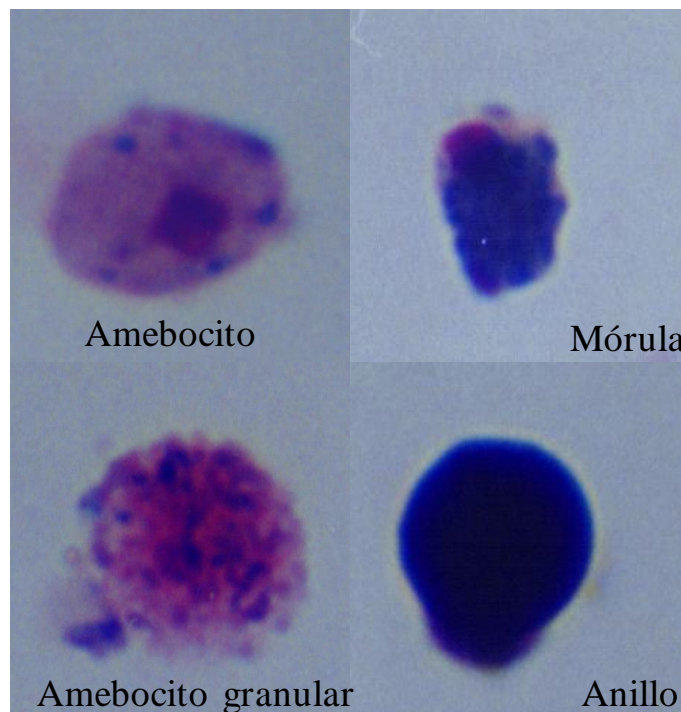


Figura. 4. Variación en porcentaje de los tipos de células del tunicado *P. vittata* expuestos a 0,015 mg/l de Cd durante 21 días. (tipos de células, Fs cél. = 7,221*, P ≤ 0,05; tiempo de exposición Fs = 0,13ns, P=0,967).**

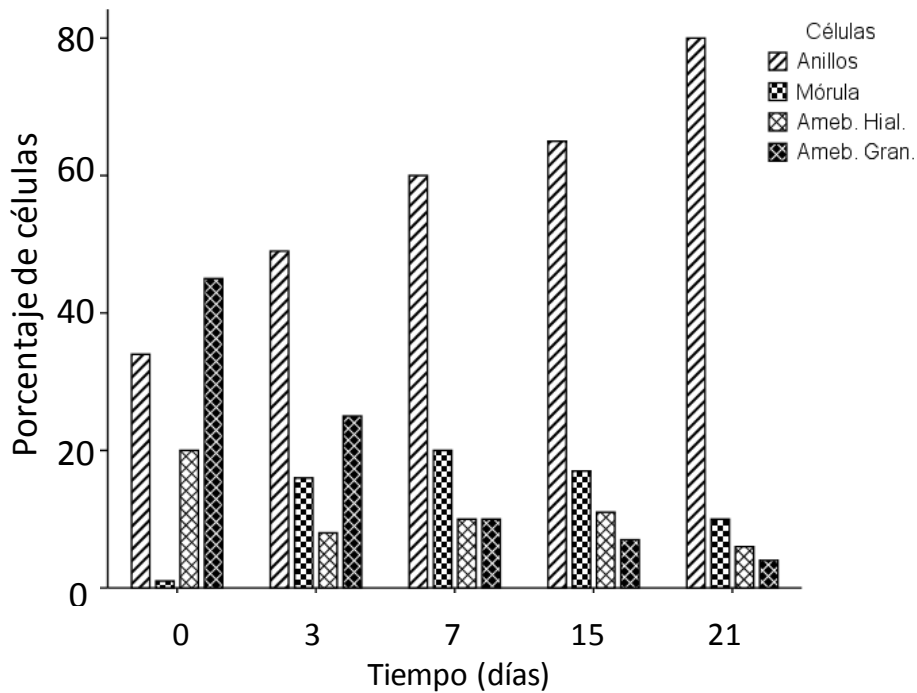


Tabla 2.- Viabilidad celular del tunicado *P. vittata* expuestos a 0,015 mg/l de Cd durante 21 días de exposición. Se presentan los valores promedios ± la desviación estándar. (Fs = 3,135; P ≤ 0,032).**

Días	Viabilidad exposición
0	91,16 ±10,02
3	99,00±1,67
7	97,33±3,20
15	100
21	98,61 ±1,75

Bibliografía

1. American Public Health Association. (1985). Standard methods for examination of water and wastewater, 15th. Ed. APHA, AWWA, WPCF. Washington D.C.
2. Antón M Y, Salazar-Lugo, R. El sistema inmune de los invertebrados. REDVET. 2009; Vol 10: 1-13.
3. Bellas J, Beiras R, Vázquez E. Sublethal effects of trace metals (Cd, Cr, Cu, Hg) on embryogenesis and larval settlement of the ascidian *Ciona intestinalis*. Arch Environ. Contam. Toxicol. 2004; Vol 46(1): 61-66.
4. Bellas J, Vázquez E, Beiras R, Toxicity of Hg, Cu, Cd, and Cr on early developmental stages of *Ciona intestinalis* (Chordata, Ascidiacea) with potential application in marine water quality assessment. Water Res. 2001; Vol 35(12): 2905-2912.
5. Bermúdez I, Grimaldi J. Estudio comparativo de cuatro especies de ascidias de la Bahía de Mochima, Edo. Sucre, Venezuela. Lagena 1975; Vol 35-36: 31-49.
6. Biggs W., Swinehart J. Studies of the blood of *Ascidia ceratodes*. Total blood cells counts, differential blood cells count, hematocrit values, seasonal variations and fluorescent characteristics of blood cells. Experientia, 1979; Vol 35: 1047-1049.
7. Botte L., Scippa M, De Vicentiis M. Ultrastructural localization of vanadium in the blood cells of ascidiacea. Experientia. 1979 ; Vol 35: 1228-1238.
8. Castro-González M, Campos N. H. efecto del cadmio y el cobre sobre el flujo de nitrógeno y fósforo en la interfase agua-sedimento en una laguna Costera tropical. Acad. Colomb. Cienc. 2004; Vol 28 (109): 535-543.
9. Cooper E, Stein, E. Oligochaetes, in: Radife and Roulley (Eds.), Invertebrates blood cells, Academy Press, London .1981.p. 75-140.
10. Díaz O, Encina F, Recabarren E, Del Valle S, Pastene R. Montes S, Figueroa A. Study on arsenic, mercury, lead and phenanthrene concentration in surf clam (*Mesodesma donacium*). Rev. Chil. Nutr. 2008; Vol 35(1): 1-16.

- 11.** Eyambe G, Gove L, Fitzpatrick B, Venables B, Cooper E. A non-invasive technique for sequential collection of earthworm (*Lumbricus terrestris*) Leukocytes during subchronic immunotoxicity studies. *Lab. Animal.* 1991; Vol 25: 61-67.
- 12.** Figueira E, Lima A, Branco D, Quintino V, Rodrigues AM, Freitas R. Health concerns of consuming cockles (*Cerastoderma edule* L.) from a low contaminated coastal system. *Environ. Int.* 2011; Vol 37(5): 965-72.
- 13.** Fuke, M. Studies on the coelomic cells of some Japanese ascidians. *Mar. Biol.* 1979; Vol 16(1): 143-159.
- 14.** Gagné F, André C, Cejka P, Hausler R, Fournier M, Blaise C. Immunotoxic effects on freshwater mussels of a primary-treated wastewater before and after ozonation: a pilot plant study. *Ecotoxicol. Environ. Saf. Mar.* 2008; Vol 69(3): 366-373.
- 15.** Guéguen M, Amiard JC, Arnich N, Badot PM, Claisse D, Guérin T, Vernoux JP. Shellfish and residual chemical contaminants: hazards, monitoring, and health risk assessment along French coasts. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 2011; Vol 213: 55-111.
- 16.** Leung PT, Wang Y, Mak SS, Ng WC, Leung KM. Differential proteomic responses in hepatopancrea and adductor muscles of the green-lipped mussel *Perna viridis* to stresses induced by cadmium and hydrogen peroxide. *Aquat. Toxicol.* 2011; Vol 105(1-2): 49-61.
- 17.** Menin A, Ballarin L, Bragadin M, Cima FJ. Immunotoxicity in ascidians: antifouling compounds alternative to organotin - II. The case of Diuron and TCMS pyridine. *Environ. Sci Health* . 2008; Vol 43(8): 644-54.
- 18.** Mohrig W, Kanschke E, Ehlers, M. Rosette formation by coelomocytes of the earth worm *Lumbricus terrestris* L. With sheep erythrocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 1984; Vol 111: 860-867.
- 19.** Parrinello N, Arizza V, Chinnici C, Parrinello D, Cammarata M. Phenoloxidases in ascidian haemocytes: characterization of the prophenoloxidase activating system. *Comp. Biochem. Physiol.* 2003; Vol 135(4): 583-591

20. Phillips D, Rainbow P. Strategies of trace metal sequestration in aquatic organisms. Mar. Environ. Res. 1989; Vol 28: 207-210.
21. Raftos D, Hutchinson A. Effects of common estuarine pollutants on the immune reactions of tunicates. Biol. Bull. 1997; Vol 192: 62-72.
22. Reish, D. 1984. Marine Ecotoxicological Tests with polychaetous. in: E Jaspers, C Claus, (Eds.), Annelids. Ecotoxicological Testing for the Marine Environment, State Univ. Ghent. And Inst. Mar. Scient. Res. Bredine, Belgium; 1984. p.140-154.
23. Rodriguez-Grau J, Venables R, Fitzpatrick L, Goven A, Cooper E. Suppression of secretory rosette formation by PBCS in *Lumbriscus terrestris*: earthworm assay for humoral immunotoxicity of xenobiotics. Environ. Toxicol. Chem. 1989; Vol 8: 1201-1207.
24. Satish N, Robinson W. Cadmium binding to a Histidine-Rich Glycoprotein from marine mussel blood plasma: Potentiometric titration and equilibrium speciation modeling. Environ. Toxicol. Chem. 2001; Vol 20 (7): 1596-1604.
25. Serafim A, Bebianno MJ. Effect of a polymetallic mixture on metal accumulation and metallothionein response in the clam *Ruditapes decussatus*. Aquat Toxicol. 2010; Vol 99(3): 370-8.
26. Smith V, Peddie C. Cell cooperation during host defense in the solitary tunicate *Ciona intestinalis*. Biol. Bull. 1992; Vol 183: 211-219.
27. Stephan C. Methods for calculating LC₅₀. in: F Mayer, J Hamelink (Eds.), Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation. American Society for Testing Materials, Philadelphia. 1971; p. 65-48.
28. Van Name A. The ascidians of south Australian I. Spences Gulf. St. Vicent Gulf and Encounter Bay. Trans. R. Soc. Aust. 1945; Vol 96 (1): 37-38.
29. Viarengo A, Nott J. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. Com. Biochem. Physiol. 1992; 1046 (3): 355-372.

Recibido: 08/03/12

Aceptado: 24/03/12