

## Efectos del cadmio sobre el desarrollo de un anfibio

Effects of cadmium on the development of an amphibian

CRISTINA S. PEREZ-COLL<sup>1</sup>, JORGE HERKOVITS y ALFREDO SALIBIAN<sup>2</sup>

Instituto de Biología de la Reproducción y Desarrollo Embrionario,  
Universidad Nacional de Lomas de Zamora,  
Casilla de Correo 95 (1832), Lomas de Zamora, Buenos Aires

The effects of continuous treatment with cadmium on *Bufo arenarum* embryos from the 2-cell stage onwards, were evaluated by light and scanning electron microscopy.

Damages were concentration-dependent (between 0.03 and 4.00 mg Cd<sup>++</sup>/L in 10% Holtfreter's solution) and ranged between teratogenic effects and lethality.

In the 0.50-4.00 mg Cd<sup>++</sup>/L range high mortality, delayed development and significant alterations in the gastrulation and neurulation processes were observed.

In embryos maintained at concentrations between 0.03 and 0.25 mg Cd<sup>++</sup>/L, lethality was considerably lower and development proceeded to more advanced stages. In this group of embryos the toxicity signs were: retarded growth rate, reduced body size, behavioral disorders and a variety of malformations such as microcephaly, underdevelopment of gills and abnormal fins. The ectodermal tissue exhibited predominance of ciliated cells and/or atypical distribution of them.

These findings were compared with the effect of cadmium and other heavy metals on embryos, larvae and adults of several amphibian, fish and mammalian species. The findings were interpreted on the basis of known biochemical effects of cadmium.

El cadmio es un metal pesado poco frecuente en la naturaleza, con eventuales funciones biológicas aún muy discutidas. Se lo extrae de los depósitos de zinc, plomo y cobre, con los que coexiste en pequeñas cantidades. La contribución del Cd a la contaminación ambiental es consecuencia del amplio espectro de usos que encuentra en la actualidad (baterías, pinturas, centrales nucleares, etc., Lucas, 1980) y a la ausencia de medidas para evitar o neutralizar su incorporación a los ecosistemas. El Cd, como otros contaminantes ambientales, podría comprometer la sobrevivencia de los ecosistemas, principalmente por un fenómeno de bioamplificación que alcanzaría en el nivel de los consumidores primarios valores de 13-15 veces mayores que en los productores (Dmowsky y Karolewsky, 1979).

Existe una amplia variedad de efectos deletéreos del Cd, los que fueron descritos tanto para organismos autótrofos (Dog-

mann y Nürnberg, 1982) como heterótrofos (Smith *et al.*, 1982; Cheng *et al.*, 1979; Manson y O'Flaherty, 1978; Martoja *et al.*, 1982; Hutton, 1982; Machermer y Lorke, 1981), incluido el hombre (Fassett, 1975; Fox, 1982; Jennette, 1981).

En vertebrados adultos, el Cd hace un primer impacto sobre hígado y riñón, aunque si la intoxicación es crónica casi todos los sistemas son afectados. La capacidad de detoxificación de este metal estaría a cargo de las metalotioninas, proteínas con elevada afinidad para los metales pesados sintetizadas por varios órganos, principalmente hígado y riñón, siendo el Cd almacenado en estos últimos órganos (Danielson *et al.*, 1982; Jacobson y Turner, 1980; Noël-Lambot, 1976; Ouellette *et al.*, 1982).

El Cd también afecta los procesos de desarrollo embrionario, habiéndose descrito disminución en la sobrevivencia, deformidades en la columna vertebral (Rehwoldt y Kariamian-Teherani, 1976; Dethlefsen *et al.*,

<sup>1</sup> Becaria de la Comisión de Investigaciones Científicas de la provincia de Buenos Aires (CIC).

<sup>2</sup> Miembro de la Carrera del Investigador Científico Tecnológico, CIC.

1976) y detrimento en la talla (Rombough y Garside, 1982) de embriones de peces, así como alteraciones en el potencial de regeneración de los miembros de urodelos (Manson y O'Flaherty, 1978).

En el caso particular de los anfibios, cabe mencionar que son ampliamente utilizados como indicadores de contaminación ambiental (Bandó, 1976) y como animales prueba para determinar la toxicidad de pesticidas (Cooke, 1977; Cooke, 1981). Este grupo, especialmente en etapas tempranas de su desarrollo, es muy sensible a las sustancias tóxicas (Herkovits y Fernández, 1979), motivo por el cual consideramos de interés estudiar el impacto del Cd sobre embriones de *Bufo arenarum*, utilizándolos como modelo para describir el efecto de dicho metal sobre uno de los componentes de los ecosistemas acuáticos continentales. Para ello, evaluamos la sobrevida y los efectos teratogénicos a nivel de microscopía de luz y electrónica de barrido.

Una comunicación preliminar de este trabajo fue recientemente presentada (Pérez-Coll et al., 1983).

#### MÉTODOS

Los embriones de *Bufo arenarum* se obtuvieron fecundando *in vitro* ovocitos con un macerado testicular. La ovulación se indujo administrando aproximadamente 16-24 horas antes una hipófisis homóloga (Pisanó, 1956), 1.000 UI de gonadotropina coriónica (Endocorion) y 200 UI de gonadotropina sérica (Eleagol, Elea). Los embriones mantenidos en solución de Holtfreter al 10% (S.H.), al alcanzar el estadio de dos blastómeros (Del Conte y Sirlin, 1951) fueron desgelatinizados con una solución de ácido tioglicólico al 2% neutralizado con NaOH a pH = 7,2. El efecto del Cd ( $\text{Cl}_2\text{Cd} \cdot 2 \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$ , Mallinckrodt) se estudió colocando grupos de treinta embriones cada uno en forma continua a partir del estadio de dos blastómeros, en soluciones de diferente concentración de Cd. La sal fue disuelta en S.H. hasta alcanzar las siguientes concentraciones: 0,03; 0,06; 0,12; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00 y 4,00 mg Cd<sup>++</sup>/L, en las que desarrollaron 60, 90, 60, 120, 120, 120 y 120 embriones, respectivamente. Como controles se utilizaron embriones desarrollados en S.H., sin Cd. Los experimentos se realizaron entre 18-20°C. Las soluciones fueron cambiadas diariamente y los individuos muertos fueron registrados y removidos de inmediato. Las observaciones se hicieron con un microscopio estereoscópico Wild. Los embriones destinados al estudio con microscopía electrónica de barrido se fijaron con glutaraldehído al 2% en buffer fosfato 0,1 M, se lavaron con el mismo buffer, se deshidrataron con soluciones de concentración creciente de acetona y fueron tratados según la técnica del punto crítico. Las observaciones se realizaron con un microscopio electrónico JEOL JSM/U3 operado a 5 kw.

#### RESULTADOS

Los embriones tratados con 4,00 mg Cd<sup>++</sup>/L y los controles hasta blástula final no presentaron diferencias. Sin embargo, el desarrollo de los embriones experimentales se detuvo entre ese estadio y el de labio dorsal del blastoporo, comenzando a disociarse aproximadamente 3 horas después de su detenimiento. Las células del endo y del ectodermo se disociaron en forma paulatina: primero se afectaron zonas focalizadas, luego áreas más amplias y, finalmente, todo el embrión resultó desintegrado. Durante este proceso la superficie apical de las células se presentó muy abovedada, a diferencia de la de los controles, que fue aplanada.

Los embriones tratados con 2 mg Cd<sup>++</sup>/L prosiguieron su desarrollo hasta gástrula inicial o media y presentaron disociación celular con las características ya mencionadas aproximadamente 4 horas después de detenerse.

Aproximadamente el 70% de los embriones tratados con 1,00 mg Cd<sup>++</sup>/L alcanzaron el estadio de placa neural. El 30% de los embriones restantes formaron un canal neural corto y con pliegues longitudinales en su interior. En ambos casos, 6 horas después que los embriones se hubieran detenido, se observó disociación celular.

Con 0,50 mg Cd<sup>++</sup>/L se observó que solamente el 10% de los individuos logró concretar sin alteraciones la neurulación. Aproximadamente el 40% de los embriones presentó un cierre incompleto del tubo neural y el 50% se detuvo en placa-canal neural, presentando los pliegues longitudinales antes mencionados. Además, en el 30% de los embriones se comprobó tapón vitelino persistente. Sin lograr avanzar estadios y antes de verificarse la disociación celular se observó en todos los casos la formación de mamelones ectodérmicos y en un 20% tendencia a la hidropesía.

El desarrollo de los embriones tratados con 0,25 mg Cd<sup>++</sup>/L fue sincrónico con el de los controles hasta el estadio de tubo neural, retrasándose subsiguientemente de tal forma que el último estadio alcanzado, latido cardíaco (E.19), se verificó cuando los controles estaban en boca abierta (E.21). En cuanto a las malformaciones observadas

hubo hidropesía en el 35% de los casos y el mismo porcentaje de individuos con desviación en el eje de la aleta. El 100% de los embriones presentó disminución tanto en el desarrollo de las branquias como de la aleta. Un resumen de los resultados se representa en la Tabla 1.

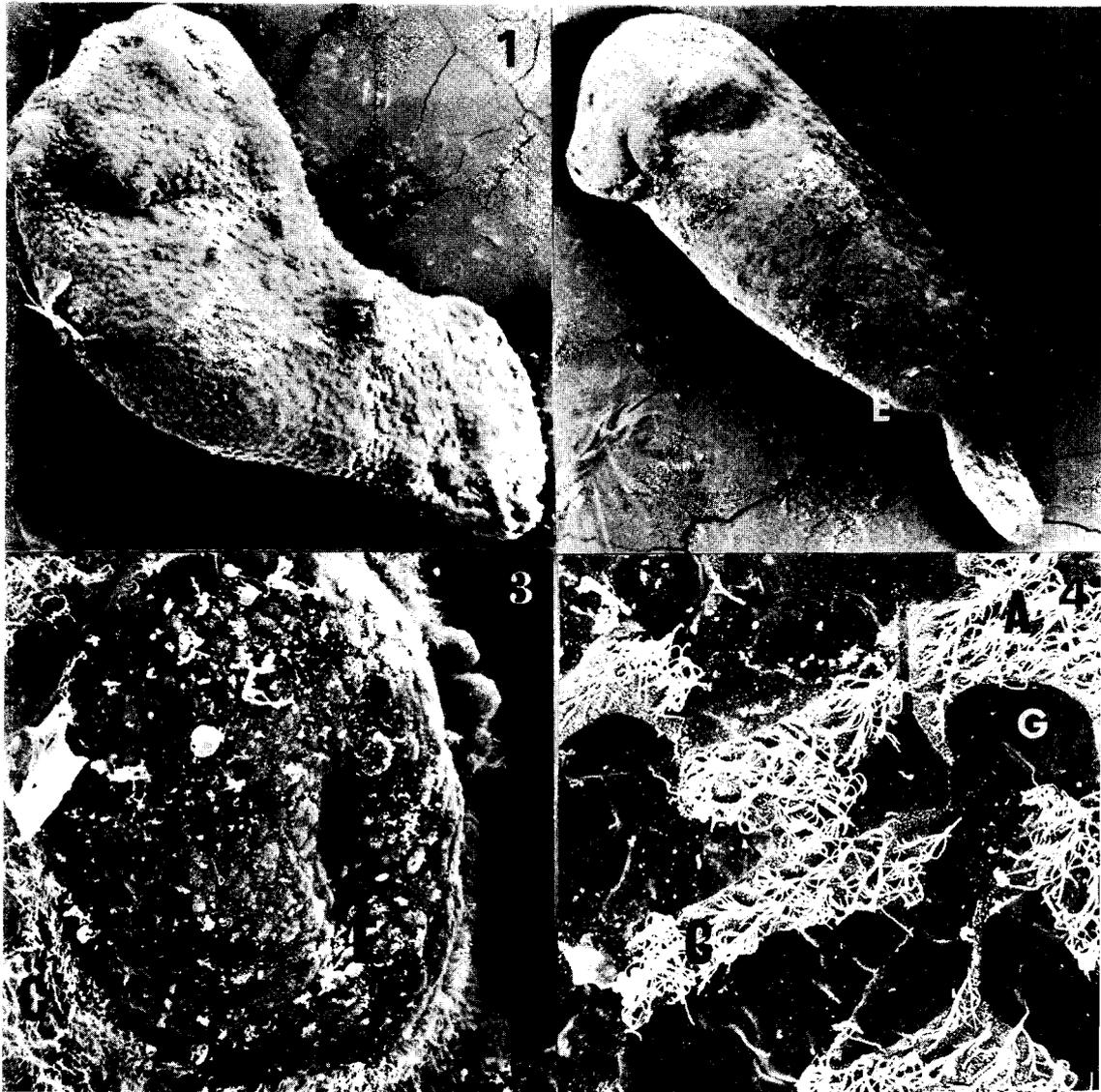
Las soluciones de 0,12 mg Cd<sup>++</sup>/L o menores fueron letales o tóxicas en forma dependiente de la concentración. La toxicidad se manifestó en: a) Retraso en el crecimiento que fue más notable hasta proximidades del estadio 20. A partir de dicho estadio, los embriones experimentales presentaron un fenómeno de recuperación que les permitió finalizar el período embrionario junto con los controles; b) Notoria disminución en la talla alcanzada; c) Malformaciones: microcefalia, desarrollo incompleto de branquias, hidropesía, torsión del eje del cuerpo, pliegues tanto en el ectodermo general como neural y angulación de la aleta. Algunas de las alteraciones mencionadas pueden apreciarse en la Fig. 1; d) El desarrollo de la aleta podía estar reducido en los casos más severos, básicamente

a las estructuras de su eje (Fig. 2). Efectos menores se manifestaron como deficiencias en el desarrollo de las porciones ventral y caudal o solamente ventral; e) En algunos casos se encontró dificultad en la culminación del proceso de invaginación del endodermo. En etapas posteriores se observó con microscopía electrónica de barrido un área pericloacal con células epiteliales libres de cilias, delimitada en forma abrupta por células ciliadas normales del ectodermo (Figs. 2 y 3); f) Los estudios con microscopía electrónica de barrido muestran en el ectodermo predominio de células ciliadas o distribución de éstas formando cordones o acúmulos celulares (Fig. 4), o ambos fenómenos. También se observó que la superficie apical de las células glandulares era abovedada. Además, en las zonas que presentan pliegues, se observaron células esferoidales desprendiéndose del epitelio. En los embriones controles (que estaban en estadio de circulación branquial, E.20), el ectodermo presentó células ciliadas rodeadas por células glandulares. Este último tipo celular tiene una superficie apical aplanada.

TABLA 1: ESTADIO MAXIMO ALCANZADO Y PORCENTAJE DE MALFORMACIONES OBSERVADOS EN EMBRIONES DE *BUFO ARENARUM* SOMETIDOS A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE Cd A PARTIR DEL ESTADIO DE 2 BLASTOMEROS.

mgCd <sup>++</sup> /L	ESTADIO						MALFORMACIONES* %								
	2 Blastó- meras	Gástrula inicial	Gástrula media	Canal neural	Tubo neural	Latido cardíaco	1	2	3	4	5	6	7	8	
4.00	[Barra horizontal]						-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.00	[Barra horizontal]						-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.00	[Barra horizontal]						30	-	-	-	-	-	-	-	-
0.50	[Barra horizontal]						50	30	40	100	20	-	-	-	-
0.25	[Barra horizontal]						-	-	-	-	35	35	100	100	-

\* 1: Placa - canal neural con pliegues longitudinales.  
 2: Tapón vitelino persistente.  
 3: Cierre incompleto de tubo neural.  
 4: Mamelones ectodérmicos.  
 5: Hidropesía.  
 6: Desviación del eje de la aleta.  
 7: Escaso desarrollo de la aleta.  
 8: Escaso desarrollo de las branquias.



*Fig. 1:* Imagen al microscopio electrónico de barrido de un embrión tratado con 0,25 mg Cd<sup>++</sup>/L. Su aspecto general corresponde a un embrión en estadio de latido cardíaco, E.19 (control en circulación en la aleta, E.22). Presenta un pequeño y no armónico desarrollo de la cabeza y de la cola. 50 X.

*Fig. 2:* Imagen al microscopio electrónico de barrido de un embrión tratado con 0,25 mg Cd<sup>++</sup>/L. El aspecto general corresponde al de un embrión en latido cardíaco, E.19 (control en circulación en las aletas E.22). Nótese la marcada reducción de la aleta y la presencia de una corona de células de tipo endodérmico (E) en la región de la cloaca. 50 X.

*Fig. 3:* Imagen al microscopio electrónico de barrido de la región pericloacal ampliada del embrión de la Fig. 2. La cloaca aparece rodeada por células de tipo endodérmico (E) las que están abruptamente limitadas por células ciliadas (C) pertenecientes al ectodermo. 450 X.

*Fig. 4:* Imagen al microscopio electrónico de barrido de la zona lateral de un embrión tratado con 0,25 mg Cd<sup>++</sup>/L. Se observan grupos de células ciliadas formando acúmulos (A) o cordones (C) entre las células glandulares (G). 1.000 X.

## DISCUSION

La capacidad teratogénica de algunos metales pesados como el mercurio, el cobre y el arsénico sobre los embriones y larvas de anfibios ha sido informada por diferentes autores. Cabe mencionar que existen coincidencias entre algunos de los efectos descritos para aquellos metales y los que observamos nosotros con el Cd. Así, Ghaté y Mulherkar (1980) describieron entre otros efectos producidos por el cloruro mercúrico (200-250  $\mu\text{g Cl}_2\text{Hg/L}$ ) en embriones de *Microhyla ornata*, tratados a partir de la gastrulación, curvatura del eje del cuerpo y retardo en el desarrollo; con concentraciones menores (100-150  $\mu\text{g Cl}_2\text{Hg/L}$ ) observaron perturbaciones en el comportamiento incluidos pérdida del equilibrio y nado anormal. El retraso en el desarrollo también fue indicado por Landé y Guttman (1973) como un efecto tóxico del cobre (0,16 mg Cu/L) sobre las larvas de *Rana pipiens*, si bien esta dosis pareció no afectar el desarrollo temprano de este anfibio. Las aberraciones en el comportamiento y la desviación del eje del cuerpo con distintos grados de angulación de la cola, presencia de tumefacciones en el ectodermo general e hidropesía fueron también dadas a conocer por Vega y Pisanó (1980) en embriones de *Bufo arenarum* expuestos al arsénico (25-50 mg As/L).

En mamíferos y peces, los efectos de diversos metales pesados sobre el desarrollo y crecimiento son similares a los informados en anfibios. En ratas intoxicadas con plomo a partir del nacimiento se observó retraso en el crecimiento con respecto a sus controles (Mykkanen *et al.*, 1982). En una amplia variedad de embriones y larvas de peces expuestos a soluciones con Cd se encontraron alteraciones similares a las descritas para anfibios en desarrollo expuestos a otros metales pesados, tales como aletas de bordes irregulares, flexiones en la columna vertebral, talla subnormal, retraso en el desarrollo, movimientos de nado y comportamiento general atípicos (Rombough y Garside, 1982, Spehar, 1976).

Cabe mencionar que los efectos teratogénicos descritos no son exclusivos siquiera

para el conjunto de metales pesados, ya que diversas condiciones fisico-químicas adversas para el desarrollo embrionario, *vg.* litio, agua pesada, dinitrofenol, shock térmico, restricción en el entorno, inhibidores de síntesis proteica (Bustuoabad *et al.*, 1977; Herkovits *et al.*, 1975; Rosenthal y Alderice, 1976; Herkovits y Fernández, 1979; Brachet, 1974), pueden desencadenar algunas respuestas comunes. Estos efectos inespecíficos informados para distintos "stressantes" también en peces (Rosenthal y Alderice, 1976) dificultan una interpretación causal que explique el tipo de interferencia que se produce en cada caso. Posiblemente eso se deba a los efectos múltiples de las sustancias tóxicas sobre los sistemas biológicos. Así, en el caso particular del Cd, este catión tiene una fuerte afinidad por los grupos SH- de las proteínas y por las bases de los ácidos nucleicos. Asimismo se produciría una alteración en las actividades enzimáticas debido a la competencia del Cd<sup>++</sup> con otros cationes divalentes como Zn<sup>++</sup> y Ca<sup>++</sup> que suelen ser cofactores de enzimas (Jacobson y Turner, 1980). El Cd también produce una disminución en la disponibilidad de moléculas energéticas por interferencia con el proceso de fosforilación oxidativa (Vallee y Ulmer, 1972).

Entre los efectos observados a nivel celular por el tratamiento con Cd, la disociación celular podría deberse al desplazamiento del Ca por competencia del Cd con la consiguiente dificultad en mantener las uniones celulares. Puede descartarse un efecto osmótico provocado por el agregado de  $\text{Cl}_2\text{Cd}$  a la solución utilizada como control, ya que hemos comprobado en nuestro laboratorio que los embriones de *Bufo arenarum* son capaces de completar su desarrollo en soluciones cuya osmolaridad varía más de diez veces con respecto a la utilizada en nuestros grupos control (12,42 mOsm) sin mostrar signos externos similares a los observados en los tratamientos con Cd. Las cantidades de  $\text{Cl}_2\text{Cd}$  agregadas a las soluciones experimentales modifican la osmolaridad entre 12,42 y 12,52 mOsm, cambios éstos que entendemos no pueden dar cuenta *per se* de los efectos observados. El abovedamiento de la superficie apical de las células glandulares podría deberse a

alteraciones en el citoesqueleto, ya que con tratamiento con agua pesada, que afecta dicha estructura, las células epiteliales adquieren también una forma abovedada (Herkovits *et al.*, 1975). La ausencia de células ciliadas en la región pericloacal de algunos embriones probablemente podría deberse a la incompleta invaginación de las células endodérmicas durante la gastrulación, expresando durante el desarrollo embrionario subsiguiente una potencialidad de diferenciación apical similar a la que corresponde a las células que revisten el intestino primitivo. El límite netamente marcado entre estas células y las ectodérmicas ciliadas parece indicar que esta potencialidad funcional queda ya definida durante la gastrulación. La persistencia de agrupamientos celulares ciliados en forma de cordones o acúmulos durante etapas avanzadas del desarrollo embrionario (circulación branquial, E.19 en los embriones experimentales) podría deberse a una perturbación en la formación de células glandulares que normalmente se intercalan entre la población de células ciliadas, de tal manera que en el estadio mencionado, las células ciliadas no contactan entre sí (Herkovits y Pisanó, 1980).

Con respecto a la formación de la aleta, el eje de la misma es la parte menos susceptible al Cd, mientras que podría existir un gradiente de susceptibilidad creciente en las porciones dorsal, caudal y ventral de la aleta.

Los desórdenes etológicos observados representan fenómenos habituales por intoxicación con metales pesados (Rombough y Garside, 1982; Spehar, 1976; Ghate y Mulherkar, 1980; Vega y Pisanó, 1980).

Desde el punto de vista ecológico, sería importante también conocer la máxima cantidad de Cd que pueda estar presente en los tejidos embrionarios sin interferir con el desarrollo ya que estos organismos participarían eventualmente en fenómenos de bioamplificación.

#### AGRADECIMIENTOS

Las observaciones con el microscopio electrónico de barrido se realizaron en el Servicio de Microscopía Electrónica del CONICET con la muy eficiente colaboración de Jorge Hoffman.

La realización de este trabajo contó con el apoyo de subsidios otorgados por la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires.

Se agradece al Laboratorio Elea la donación de las hormonas utilizadas en este estudio.

#### REFERENCIAS

- BANDO, R. (1976) Heavy metals concentrations (chromium, copper, manganese and lead) in tadpoles and adults of *Rana sculentata* (L.) *Memorie Ist. Ital Idrobiol.* 33: 325-344.
- BRACHET, J. (1974) *Introduction to Molecular Embryology*. Springer Verlag, New York, p. 125.
- BUSTUOABAD, O.; HERKOVITS, J. y PISANO, A. (1977) Different sensitivity to lithium ion during the segmentation of *Bufo arenarum* eggs. *Acta Embryol. Exp.* 3: 271-282.
- CHENG, L.; FRANCO, P.J. y SCHULTZ-BALDES, M. (1979) Heavy metals in the sea-skater *Halobates robustus* from the Galápagos Islands: Concentrations in nature and uptake experiments, with special reference to cadmium. *Mar. Biol.* 54: 201-206.
- COOKE, A.S. (1977) Effects of field applications of the herbicides Diquat and Dichlobenil on amphibians. *Environm. Pollut.* 12: 43-50.
- COOKE, A.S. (1981) Tadpoles as indicators of harmful levels of pollution in the field. *Environm. Pollut.* 25: 123-133.
- DANIELSON, K.G.; OHI, S. y HUANG, P.C. (1982) Immunochemical detection of metallothionein in specific epithelial cells of rat organs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 2301-2304.
- DEL CONTE, E. y SIRLIN, J.L. (1951) Los primeros estadios embrionarios en *Bufo arenarum*. *Acta Zool. Lilloana* 12: 495-499.
- DETHLEFSEN, V.; WESTERNHAGEN, H. VON y ROSENTHAL, H. (1976) Cadmium uptake by marine fish larvae. *Helgol. Wiss. Meeresunters.* 27: 396-407.
- DMOWSKY, K. y KAROLEWSKY, M.A. (1979) Cumulation of zinc, cadmium, and lead in invertebrates and in some vertebrates according to the degree of an area contamination. *Ekol. Pol.* 27: 333-349.
- DONGMANN, G. y NURNBERG, H.W. (1982) Observation with *Thalassiosira rotula* (Meunier) on the toxicity and accumulation of cadmium and nickel. *Ecotoxicol. Environm. Safety* 6: 535-544.
- FASSETT, D.W. (1975) Cadmium: Biological effects and occurrence in the environment *Ann. Rev. Pharmacol.* 15: 425-435.
- FOX, M.R.S. (1982) Biochemical basis of cadmium toxicity in human subjects. *Clinical, Biochemical and Nutritional Aspects of Trace Elements*. (Ed. Prasad. A.S.) Alan R. Liss, New York, pp. 537-547.
- GHATE, H.V. y MULHERKAR, L. (1980) Effect of mercuric chloride on embryonic development of the frog *Microhyla ornata*. *Indian. J. Exper. Biol.* 18: 1094-1096.
- HERKOVITS, J.; PISANO, A. y FERNANDEZ, A. (1975) Alteraciones en el desarrollo embrionario y en el proceso de recuperación morfológico por efectos del agua pesada. *Rev. Biol. Med. Nucl.* 7: 161-162.
- HERKOVITS, J. y FERNANDEZ, A. (1979) Tolerancia a noxas durante el desarrollo embrionario. *Medicina (Bs. As.)* 39: 400-408.
- HERKOVITS, J. y PISANO, A. (1980) Estudio con microscopía electrónica de barrido de la evolución de las células ciliadas ectodérmicas en embriones de *Bufo arenarum*. *An. Soc. Cient. Arg.* 206: 23-28.

- HUTTON, M. (1982) The role of wild life species in the assessment of biological impact from chronic exposure to persistent chemicals. *Ecotoxicol. Environm. Safety* 6: 471-478.
- JACOBSON, K.B. y TURNER, J.E. (1980) The interaction of cadmium and certain other metal ions with proteins and nucleic acids. *Toxicology* 16: 1-37.
- JENNETTE, K.W. (1981) The role of metals in carcinogenesis: biochemistry and metabolism. *Environm. Health Persp.* 40: 233-252.
- LANDE, S.P. y GUTTMAN, S.I. (1973) The effects of copper sulfate on the growth and mortality rate of *Rana pipiens* tadpoles. *Herpetologica* 29: 22-27.
- LUCAS, J.M. (1980) Cadmium. *Mineral Facts and Problems* (U.S. Dept. Interior, Bureau of Mines Staff, Bulletin 671), pp. 131-142.
- MACHEMER, L. y LORKE, D. (1981) Embryotoxic effect of cadmium on rats upon oral administration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 58: 438-443.
- MANSON, J.M. y O'FLAHERTY, E.J. (1978) Effects of cadmium on salamander survival and limb regeneration. *Env. Res.* 16: 62-69.
- MARTOJA, T.; TRUCHET, M. y BOUQUEGNEAU, J.M. (1982) Une néphropathie provoquée par le cadmium chez l'anguille adaptée a l'eau de mer (Téléostéen). *C.R. Acad. Sc. Paris*, 295: 369-374.
- MYKKANEN, H.M.; LANCASTER, M.C. y DICKERSON, J.W.T. (1982) Concentrations of lead in the soft tissues of male rats during a long-term dietary exposure. *Env. Res.* 28: 147-153.
- NOEL-LAMBOT, F. (1976) Distribution of cadmium, zinc and copper in the mussel *Mytilus edulis*. Existence of cadmium binding proteins similar to metallothioneins. *Experientia* 32: 324-326.
- OUELLETTE, A.J.; AVILES, L.; BURNWEIT, C.A.; FREDERIC, D. y MALT, R.A. (1982) Metallothionein mRNA induction in mouse small bowel by oral cadmium and zinc. *Am. J. Physiol.* 243: G396-G403.
- PEREZ-COLL, C.; HERKOVITS, J. y SALIBIAN, A. (1983) Acción del cadmio sobre el desarrollo embrionario de *Bufo arenarum*. *Medicina* (Bs. As.) 43: 816-817.
- PISANO, A. (1956) Método para mantener la hipófisis de anfibio fisiológicamente "in vitro". *Arch. Bioquim. Quim. Farm.* Tucumán, 7: 387-392.
- REHWOLDT, R. y KARIMIAN-TEHERANI, D. (1976) Uptake and effect of cadmium on zebrafish. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 15: 442-446.
- ROMBOUGH, P.J. y GARSIDE, E.T. (1982) Cadmium toxicity and accumulation in eggs and alevins of Atlantic salmon *Salmo salar*. *Can J. Zool.* 60: 2006-2014.
- ROSENTHAL, H. y ALDERDICE, D.F. (1976) Sublethal effects of environmental stressors, natural and pollutional on marine fish eggs and larvae. *J. Fish. Res. Board Can.* 33: 2047-2065.
- SMITH, M.J.; PIHL, R.O. y GARBER, B. (1982) Post-natal cadmium exposure and longterm behavioral changes in the rat. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 4: 283-287.
- SPEHAR, R.L. (1976) Cadmium and zinc toxicity to flagfish *Jordanella floridae*. *J. Fish. Res. Board Can.* 33: 1939-1945.
- VALLEE, B.L. y ULMER, D.D. (1972) Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. *Ann. Rev. Biochem.* 41: 91-128.
- VEGA, D.E. y PISANO, A. (1980) Teratogénesis experimental por arsénico durante el desarrollo de un anfibio. *Rev. Mus. Hist. Nat.* San Rafael (Mendoza) 8: 29-34.