

Toxicidad del cadmio en celomocitos de lombriz de tierra *Eisenia sp.*: Ensayo *in vitro*

Leida Marcano^{1*}, Analía León¹, Dwight Arrieche² y Edgar Zapata-Vívenes¹

Universidad de Oriente. Escuela de Ciencias. Núcleo de Sucre. Departamento de Biología.
Laboratorio de Bioquímica. Cumaná, Venezuela. Tel: 0058-293-4411881. Email: leimar0501@
gmail.com

Resumen

Se evaluó el efecto *in vitro* sobre la viabilidad, morfología y lipoperoxidación de los celomocitos de la lombriz de tierra *Eisenia sp* por exposición aguda al cadmio (Cd) a 100 y 500 µg/mL. Ambos tratamientos con Cd tuvieron efectos dosis-dependientes sobre la viabilidad celular, provocando descensos del 6 y 15 % en la viabilidad de los celomocitos con respecto al control (99,58 %). En contraste, la concentración de malondialdehído (MDA) incrementó en los celomocitos expuestos en relación a las concentraciones del metal. La pérdida de la integridad estructural de las membranas, el hinchamiento celular, la vacuolización abundante en el citoplasma, pérdida del contenido intracelular y lisis de los celomocitos fueron observadas en ambos tratamientos con Cd. En conclusión, los tratamientos con Cd afectaron perjudicialmente la viabilidad y morfología de los celomocitos de *Eisenia sp.*; estos efectos asociados con incrementos en los niveles de MDA sugieren que la lipoperoxidación de membranas y posiblemente, otras patologías oxidativas fueron determinantes de la citotoxicidad de este metal. El ensayo de exposición *in vitro* usando celomocitos de *Eisenia sp.* y los biomarcadores evaluados, aporta una herramienta adicional de rápida respuesta, costo-efectiva y reproducible de mucha utilidad para dilucidar los posibles mecanismos de acción tóxica del Cd a nivel celular y molecular.

Palabras clave: *Eisenia*, biomarcador, celomocitos, malondialdehído, viabilidad.

Cadmium toxicity in coelomocytes of earthworm *eisenia* sp.: In vitro assay.

Abstract

In vitro effect on the viability, morphology and lipoperoxidation of *Eisenia* sp. coelomocytes was evaluated by acute exposure to cadmium (Cd) at 100 and 500 µg/mL. Both treatments with Cd had dose-dependent effects on cellular viability, causing decreases of 6 and 15% in viability of coelomocyte with respect to control group (99.58%). In contrast, concentration of malondialdehyde (MDA) was increased in coelomocytes exposed to metal concentrations. Membranes integrity loss, swelling, abundant vacuolization in cytoplasm, intracellular loss of content and coelomocytes lysis were observed in both treatments with Cd. In conclusion, the viability and morphology of Cd-treatment *Eisenia* sp. coelomocytes were harmfully affected; these effects associated with increases in MDA levels suggest that membrane lipoperoxidation and possibly, other oxidative pathologies were determinant of cytotoxicity of this metal. *In vitro* exposure test using coelomocytes from *Eisenia* sp. and evaluated biomarkers represents an additional fast tool of response, cost-effective and reproducible, very useful to elucidate possible mechanisms of toxic action of the Cd at cellular and molecular level.

Key words: *Eisenia*, biomarker, coelomocytes, malondialdehyde, viability.

Introducción

La contaminación de los suelos por cadmio (Cd) ha incrementado drásticamente, convirtiéndose en un severo problema ambiental (Yue et al. 2016). Naturalmente es un metal muy escaso, sin embargo, sus elevadas concentraciones en el ambiente provienen, de las descargas de desechos industriales como la minería, metalúrgica, y la agricultura; entre otras actividades antrópicas (Lemtiri et al. 2016). El Cd posee propiedades químicas que le confieren cierta resistencia a la biodegradación, lo que favorece su persistencia en el suelo por largos periodos de tiempo, aumentando así la probabilidad de ser bioacumulado en distintos niveles tróficos y potenciar su acción perjudicial sobre los organismos (Suruchi y Pankaj 2011; Kowald et al. 2016).

Además de su acción directa, interactuando con distintas macromoléculas (proteínas estructurales, enzimas, lípidos y ácidos nucleicos), la acción tóxica del Cd se ha asociado con la inducción de estrés oxidativo, causado por una sobreproducción de especies reactivas del oxígeno (EROs) cuando se altera la capacidad de defensa antioxidante celular (Nair et al. 2013, Hernández et al. 2016). Niveles fisiológicos apropiados de EROs son mantenidos por sistemas enzimáticos tales como, la superóxidodismutasa (SOD) y la catalasa, encargadas de regular los niveles del anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), respectivamente,

y moléculas no enzimáticas; entre ellas el tripéptido glutatión reducido (GSH), el cual actúa como agente quelante de EROs y coenzima de algunas enzimas antioxidantes (Wang *et al.* 2012).

Las lombrices de tierra desempeñan una función ecológica relevante ya que participan en el reciclaje de nutrientes y fertilidad del suelo, de tal manera que, cualquier perturbación inducida por contaminación química puede alterar el equilibrio funcional del medio terrestre (Calisi *et al.* 2011). Se emplean como sensores del estado de salud del suelo, ya que su contacto directo con el sustrato facilita el ingreso, vía oral o a través de la piel, de agentes químicos permitiendo el transporte y posterior acumulación en su pared corporal y en el celoma (Ali y Naaz 2013, Min-carelli *et al.* 2016). La cavidad celómica de estos anélidos contiene células, análogas a los leucocitos de los vertebrados, conocidas como celomocitos, con funciones de defensa inmune, osmoregulación, transporte de nutrientes, excreción de desechos metabólicos y desintoxicación de contaminantes (Cooper y Hirabayashi 2013, Homa *et al.* 2015).

El Cd es eficientemente acumulado en tejidos especializados de las lombrices, formando complejos con moléculas ricas en grupos tioles (Stürzempaun *et al.* 2004, Kowald *et al.* 2016), sin embargo, su toxicidad se ha asociado al desbalance del estado redox celular y estrés oxidativo (Nair *et al.* 2013, Hernández *et al.* 2016). Se ha demostrado que el potencial tóxico del Cd en lombrices de tierra abarca alteraciones del crecimiento y la reproducción (Polo *et al.* 2011, Domínguez-Crespo *et al.* 2012), respuestas antioxidantes y estrés oxidativo (Hernández *et al.* 2016), en la actividad inmune-celular y humoral de los celomocitos (Homa *et al.* 2007, Plytycz *et al.* 2007, Homa *et al.* 2016), alteraciones morfológicas (Fuller-Espie *et al.* 2011), balance electrolítico (Lourenço *et al.* 2011), daño al ADN (Wang *et al.* 2012, Sáez *et al.* 2015). Dado que las membranas biológicas en lombrices son ricas en ácidos grasos polinsaturados; un blanco importante para el ataque de EROs que inducen reacciones de lipoperoxidación (Albro *et al.* 1993), este último proceso, se usa ampliamente como índice de daño oxidativo a nivel celular, mediado por la exposición a metales pesados (Saint-Denis *et al.* 2001).

Son varios los protocolos experimentales que han sido validados para evaluar efectos de sustancias químicas en lombrices de tierra. Inicialmente predominaron los bioensayos de exposición dérmica del organismo en papel de filtro impregnado con la solución del tóxico (Fitzpatrick *et al.* 1996) y luego, fueron sustituidos por los ensayos que usan suelos artificiales o naturales como sustrato de exposición, por ser éstos más realísticos y ecológicamente más relevantes (Homa *et al.* 2013). El desarrollo de metodologías de exposición *in vitro* de celomocitos de lombrices de tierra cada día despierta más interés en los investigadores, como una técnica alternativa a los ensayos de toxicidad que emplean organismos, para evaluar toxicidad de sustancias químicas, debido al uso reducido y contaminación de animales experimentales, rapidez, bajo costo y alta reproducibilidad (Asensio *et al.* 2007; Irizar *et al.* 2014). Resultados de este tipo estudios aportan información relevante en la búsqueda del entendimiento de los mecanismos de acción perjudicial de con-

taminantes químicos a nivel molecular y celular. Por tal motivo, en este estudio se evaluaron los efectos *in vitro* de concentraciones subletales de Cd sobre la morfología y viabilidad de los celomocitos de la lombriz de tierra *Eisenia* sp. y su relación con el daño lipoperoxidativo en sus membranas.

Materiales y Métodos.

Obtención y mantenimiento de los organismos.

Los ejemplares de *Eisenia* sp. fueron proporcionados por el lumbricario del Instituto Nacional de Cooperación Estudiantil Socialista (INCES), ubicado en Tunapuy, estado Sucre, Venezuela. Para su mantenimiento y cultivo en el laboratorio se utilizó un sustrato orgánico a base de estiércol de caballo siguiendo lo recomendado por Polo et al. (2012). Se seleccionaron organismos adultos (clitelados) de una biomasa promedio de 0,1 g para la obtención de los celomocitos.

Obtención de celomocitos

Siguiendo el protocolo estandarizado por Cortesía et al. (2015), se extrajo el fluido celómico de cada lombriz, previamente lavada con solución salina (0,85%), mediante una punción en la región media ventral de la cavidad celómica usando una jeringa hipodérmica contentiva de 50 μ L de la solución buffer para *Lumbricus* (SBL) compuesta de: NaCl 10 g/L; glucosa 1,25 g/L; KCl 0,5 g/L; 75 mg/Ly 475 mg/L, pH 7,4. Se mezcló el fluido extraído de dos lombrices (100-200 μ L) en tubos Eppendorf (1,5 mL) y se ajustó a 500 μ L con SBL, luego de centrifugar a 100g a 4°C, el precipitado de celomocitos se resuspendió en 500 μ L del mismo buffer y se mantuvo a 4°C hasta el momento de cuantificar la viabilidad y número total de células, previo al desarrollo de los ensayos de exposición al metal.

Viabilidad y recuento celular

El porcentaje de viabilidad y número total de celomocitos (NTC) se estimaron según el protocolo descrito por Cortesía et al. (2015) empleando la tinción con el colorante azul de tripano 0,4 % (Sigma Chemical Co). Se preparó una mezcla con 100 μ L de la suspensión de celomocitos y 100 μ L del colorante preparado al 0,4 % en SBL; 10 μ L de esta mezcla se dispensaron en un hemocitómetro para hacer el conteo, en un microscopio óptico (Olympus B-MAX-40) a una magnificación de 40X, de 100 células (teñidas y no teñidas) para obtener el porcentaje promedio de células viables. El NTC se obtuvo promediando el total de células viables contadas en los cuatro cuadrantes externos del hemocitómetro, multiplicado por el factor de dilución. El conteo de cada muestra se hizo por triplicado.

Bioensayos de exposición al cadmio

Para la exposición *in vitro* de los celomocitos de *Eisenia* sp. al metal, se utilizó un bioensayo descrito por Fuller-Espie et al. (2011) para la especie *Eisenia hortensis*. Previamente se determinó la Concentración Letal Media (CL_{50} = 1100 μ g Cd/mL) de

Cd para celomocitos de *Eisenia* sp. y, a partir de ésta, se seleccionaron 100 y 500 µg Cd/mL (equivalentes al 9 y 46 % del CL_{50}) como dosis de prueba para este estudio, porque garantizaron una viabilidad celular superior al 80% y no afectaron el NTC en ensayos preliminares. El bioensayo definitivo consistió de 3 tratamientos (control: 0, 100 y 500 µg Cd/mL); cada uno con 6 réplicas, las cuales fueron preparadas en tubos Eppendorf, contentivos de 900 µL de la suspensión de celomocitos (densidad celular: $\geq 1 \times 10^6$ células/mL) y 100 µL de la solución del metal (100 y 500 µg Cd/mL). La mezcla del tratamiento control se preparó con 1 mL de la suspensión de celomocitos en buffer SBL. Luego de 48 h de incubación a 4 °C, se tomaron muestras (por triplicado) de las mezclas de cada uno de los tratamientos para cuantificar la viabilidad celular según el protocolo de Cortesía *et al.* (2015), así como, para estimar la lipoperoxidación y aspectos morfológicos de los celomocitos.

Ensayo de lipoperoxidación

Se utilizó el método LPO-586™ (BYOXYTECH® LPO-586™; Oxis Research™) basado en la reacción del N-metil-2-fenilindol (R1) con el malondialdehído (MDA); uno de los productos más comunes de la lipoperoxidación. Siguiendo las instrucciones de Marcano *et al.* (2013) se lisaron los celomocitos, agregando agua (500 µL) desionizada (tratada con sistema purificador Barnstead NANO pure Infinity UV/UF) en presencia de butilatohidroxitolueno (BTH: 500 mmol/L en acetoneitrilo) y sometidos luego a un proceso de congelación y descongelación por 4 h. El lisado celular se centrifugó a 9000g por 10 min a 4°C, 200 µL del sobrenadante se mezclaron con 650 µL de R1 y 150 µL de HCl al 37%, luego de incubar a 45°C por 1 hora se leyeron las absorbancias a 586 nm en un espectrofotómetro UV/visible marca JENWAY 6705. Se utilizó una curva de calibración (0,5-4,0 µmoles/mL) preparada con una solución de MDA estándar (1,1, 3,3-tetrametoxipropano en Tris-HCl,) para calcular las concentraciones de MDA en las muestras.

Morfología y estructura de los celomocitos

La estructura de los celomocitos se analizó por microscopía de alta resolución a 100X. Posterior a la fijación de la suspensión celular por 90 minutos en glutaraldehído al 2%, se realizaron 3 lavados sucesivos con SBL seguidos de centrifugaciones a 100g durante 3 min, se hizo luego, una post fijación del precipitado celular en OsO_4 al 1% (90 min) y lavado con agua destilada. Las células fijadas fueron incluidas en agar al 4% y, a partir de los bloques formados se realizaron los cortes que fueron sujetos a un proceso de deshidratación en alcoholes (Alcohol ETOH 70% a 100%), inclusión y polimerización de resina durante 18 h a 70°C. Se procedió seguidamente, a realizar el tallado y cortes gruesos de los bloques de resina para su tinción con azul de tolouidina y posterior observación se examinaron en un fotomicroscopio Axioskop FL-40 marca Zeiss, con cámara digital incorporada, con la ayuda de un software analizador de imágenes Axio Vision LE Cannon Modul, Carl Zeiss, Germany.

Análisis estadístico

Se aplicó una prueba no paramétrica Kruskal-Wallis para determinar las diferencias significativas al 95% de confiabilidad ($p < 0,05$) entre la viabilidad celular y las concentraciones de MDA entre los distintos tratamientos. Los análisis estadísticos se realizaron mediante el empleo del paquete estadístico Statgraphic versión 5.1.

Resultados

El tratamiento de los celomocitos con Cd produjo un descenso significativo y dependiente de la concentración sobre la viabilidad celular ($KW=15,25$; $p < 0,001$). En contraste, las concentraciones de MDA en celomocitos tratados con el metal incrementaron significativamente ($KW=9,89$; $p < 0,01$); efecto también dependiente de la concentración de Cd (Tabla 1).

Tabla 1. Viabilidad y concentración de malondialdehido (MDA) en celomocitos de *Eisenia sp.* Controles (C) y expuestos a cadmio (100 y 500 $\mu\text{g/mL}$). Los resultados se expresan como $X \pm \text{DE}$ ($n = 6$)

| Cd ($\mu\text{g/mL}$) | Viabilidad (%) | MDA ($\mu\text{g/mL}$) |
|-------------------------|-----------------|--------------------------|
| C | $99,6 \pm 0,24$ | $5,0 \pm 3,6$ |
| 100 | $93,6 \pm 8,64$ | $8,9 \pm 3,8$ |
| 500 | $84,3 \pm 29,5$ | $12,0 \pm 0,6$ |

Muestras de celomocitos controles de *Eisenia sp.* teñidos con azul de tripano y sin tratamiento para microscopía de alta resolución revelaron la existencia de tres tipos principales de celomocitos que mostraron diferencias en cuanto al tamaño, coloración, morfología y contenido de gránulos en el citoplasma (Fig. 1). El primero de éstos, amebocitos granulares, de forma irregular con proyecciones de la membrana plasmática (pseudopodios), núcleo excéntrico bien definido y citoplasma granuloso (Fig. 1A), el segundo tipo, los amebocitos hialinos, de forma esférica, núcleos periféricos o centrales y citoplasma con escasos gránulos (Fig. 1B).

El último tipo celular, los eleocitos o cloragocitos, se caracterizó por ser de mayor tamaño y coloración más oscura en comparación con los tipos anteriormente descritos, con abundantes vesículas y gránulos intracitoplásmicos (Fig. 1C). La figura 2 muestra aspectos morfológicos de los celomocitos observados por microscopía de alta resolución (100X). Membrana celular intacta, pseudopodios y gránulos citoplasmáticos fueron observados en celomocitos controles (Fig. 1A). Los tratamientos con Cd provocaron evaginación e hinchamiento celular (Fig. 2B), desestabilización y ruptura de la membrana plasmática (Fig. 2C), la vacuolización, la liberación del contenido intracitoplásmico y lisis celular (Figs. D, E y F).

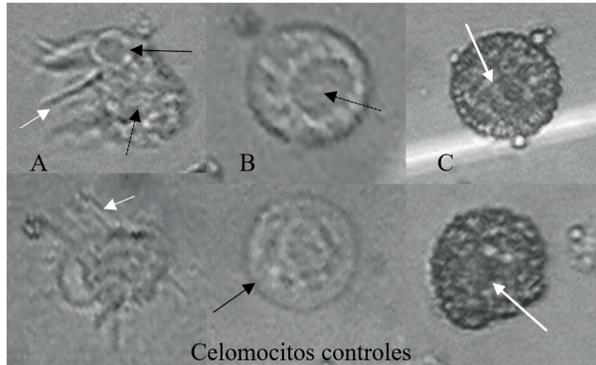


Figura 1. Tipos de celomocitos controles vistos por microscopía óptica (40X) en muestras coloreadas con azul de tripano. A: Celomocitos de forma irregular, núcleo excéntrico bien definido (flecha negra continua), citoplasma granulado (flecha negra discontinua) y proyecciones de la membrana plasmática o pseudopodios (flecha blanca continua). B: Celomocitos de forma circular con núcleos centrales o periféricos (flechas negras discontinuas) y membrana plasmática intacta (flecha negra continua). C: Celomocitos circulares con abundantes gránulos citoplasmáticos (flecha blanca continua) y coloración más oscura en comparación con los dos tipos anteriores.

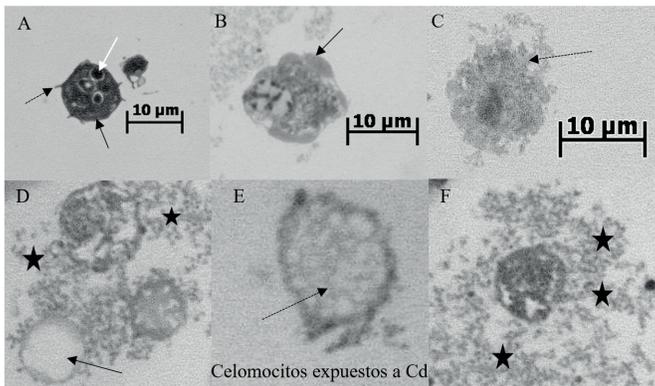


Figura 2. Composición fotográfica que muestra aspectos morfológicos de los celomocitos de *Eisenia* sp. Controles y expuestos a Cd, observados en muestras teñidas con azul de Toluidina a 100X. A: Celomocito control con membrana plasmática intacta (flecha negra continua), pseudopodia (flecha negra discontinua) y gránulos citoplasmáticos (flecha blanca continua). B y C: Celomocitos expuestos a 100 µg de Cd/mL exhibieron hinchamiento (B, flecha negra continua), pérdida de la integridad estructural de la membrana plasmática (C, flecha negra discontinua), celomocito sin contenido intra-citoplásmico (D, flecha negra continua), rodeado de restos celulares (D, estrella). E y F: Celomocitos expuestos a 500 µg de Cd/mL mostraron abundante vacuolización y pérdida del contenido intracitoplásmico, restos celulares (F, Estrella).

Discusión

Coincidente con la clasificación de los celomocitos referida inicialmente por Cooper y Roch (2003) para *L. terrestris*, *Dendrodilus rubidis* (Cholewa et al. 2006), *E. fetida* (Kozioł et al. 2006), *Allolobophora chlorotica* (Kurek et al. 2007), *Dendrobaena veneta* (Homa et al. 2008) y *E. andrei* (Homa et al. 2015), en *Eisenia* sp. se observaron tres tipos principales de celomocitos con características muy similares a las referidas para: amebocitos granulares (Fig. 1A), amebocitos hialinos (Fig. 1B) y eleocitos o cloragocitos (Fig. 1C). Cada tipo celular desempeña funciones específicas; los amebocitos reconocen material extraño, median la coagulación, encapsulación, fagocitosis y cicatrización de heridas; los eleocitos participan en la defensa inmune humoral, acumulan glucógeno, lípidos, riboflavina y se asocian con el transporte, la acumulación y la excreción de metales pesados (Homa et al. 2016).

Descensos en la viabilidad, coincidente con alteraciones en la integridad estructural de los celomocitos e incrementos en las concentraciones de MDA durante la exposición de los celomocitos de *Eisenia* sp. al Cd evidencian el potencial citotóxico del metal, asociado posiblemente con una sobreproducción de agentes pro-oxidantes, inductores de reacciones de lipoperoxidación u otras reacciones oxidativas que propiciaron la citotoxicidad. Radicales del oxígeno catalizan peroxidación de ácidos grasos polinsaturados de membranas, generando peróxidos orgánicos y otros productos altamente reactivos e inductores de la propagación de reacciones autocatalíticas y daño celular (Spurgeon et al. 2004), siendo las membranas de los celomocitos de lombrices ricas en esta clase de lípidos, la susceptibilidad a sufrir lipoperoxidación es elevada (Saint-Denis et al. 2001).

La membrana plasmática de los celomocitos de *Eisenia* sp. fue uno de los blancos más sensibles a la toxicidad del Cd, evidenciándose pérdida de la integridad estructural e hinchamiento de las células a las dos concentraciones empleadas. Tales alteraciones posiblemente estén asociadas con desequilibrios en los mecanismos de control de la homeostasis iónica intracelular y otros desajustes fisiológicos inducidos por patologías oxidativas durante la exposición al metal. Al respecto, se conoce que el hinchamiento puede resultar de perturbaciones en el catabolismo de proteínas y/o aminoácidos y del transporte de iones a través de membranas, lo que a su vez es una indicación de alteraciones metabólicas y daño celular (Lang et al. 1998).

Adicionalmente, se ha comprobado que los productos de la lipoperoxidación entre ellos MDA tienen acción detergente sobre las membranas celulares, pueden insertarse dentro de la bicapa lipídica o intercambiarse con fosfolípidos, causando cambios en su permeabilidad, integridad estructural y alteraciones electrofisiológicas. Dado que las membranas de los celomocitos en lombrices son ricas en ácidos grasos polinsaturados son sensibles a la lipoperoxidación, que es un biomarcador de daño oxidativo (Saint-Denis et al. 2001).

Sustentando los resultados del presente estudio, existen evidencias de que los metales pesados interfieren con el mecanismo de transporte a nivel de membranas que incrementan el contenido de osmolitos intracelulares, seguido por un influjo osmótico de agua, generando hinchamiento celular (Sánchez-Hernández *et al.* 2006). Alteraciones específicas en transportadores de membrana fueron estimuladas durante la exposición de celomocitos de *E. hortensis* a Cu (Calisi *et al.* 2011).

De manera similar, Fuller-Espie *et al.* (2011) reportaron descensos en la viabilidad y potencial fagocítico de los celomocitos de *E. hortensis* expuestos *in vitro* a Cd, asociado con un incremento en la producción de oxiradicales. Recientemente, Irizar *et al.* (2015) investigó la toxicidad de Cd, Cu, Pb y Ni, empleando un ensayo *in vitro* y sus resultados revelaron sensibilidad diferencial de las distintas clases de celomocitos a la acción tóxica de estos metales, siendo los eleocitos más sensibles al Cd. En ensayos de exposición *in vivo* e *in vitro* se evidenció la citotoxicidad de Cd y Cu, generando reducción significativa de la viabilidad y conteo total de celomocitos de *E. andrei* y *Perionyx excavatus* (Kwak *et al.* 2014).

Cuando se contrasta con ensayos *in vivo* se demuestra que la viabilidad de los celomocitos de *E. fetida* expuesta a Cd también desciende significativamente. Homa *et al.* (2005) coincidieron con incrementos de la viabilidad hasta 58 veces más que el control, asociado al contenido de Cd en el tejido corporal. Adicionalmente, según Homa *et al.* (2015) demostraron que la exposición dérmica de *E. andrei* a Cd no afectó la viabilidad y número total de celomocitos, pero si incrementó la transcripción de genes de metalotioneínas; proteínas con alta afinidad por Cd que también protegen contra la acción de oxiradicales. Tales resultados reflejan diferencias interespecíficas en las sensibilidades de las respuestas empleadas como biomarcadores de efectos de toxicidad por metales pesados.

Conclusiones

Los celomocitos de *Eisenia* sp. fueron perjudicialmente afectados por la exposición a 100 y 500 µg/mL de Cd; los efectos citotóxicos fueron dependientes de la concentración del metal e incluyeron: descensos en la viabilidad celular, alteraciones morfológicas e inclusive, lisis celular, asociada con lipoperoxidación de la membrana celular. El ensayo de exposición *in vitro* de los celomocitos de *Eisenia* sp. y la sensibilidad de los biomarcadores utilizados en este estudio, aportan una herramienta adicional de rápida respuesta, costo-efectiva y reproducible, de mucha utilidad para dilucidar los posibles mecanismos de acción tóxica del Cd a nivel celular y molecular.

Agradecimiento

Al Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente por el financiamiento del Proyecto Cl. 02-030100-1857-13.

Referencias bibliográficas

- ASENCIO, V., P. KILLE, A. MORGAN, M. SOTO Y I. MARIGÓMEZ. 2007. Metallothionein expression and neutral red uptake as biomarkers of metal exposure and effect in *Eisenia fetida* and *Lumbricus terrestris* exposed to Cd. Eur. J. Soil Biol. 43: 233-238.
- CALISI, A., M. LIONETTO Y T. SCETTINO. 2011. Biomarker responses in the earthworm *Lumbricus terrestris* exposed to chemical pollutants. Sci. Total Environ. 409: 4456-4464.
- CHOLEWA, J., G. FEENEY, M. O'REILLY, S. STÜRZENBAUM, J. MORGAN Y B. PŁYTYCZ. 2006. Auto-fluorescence in leucocytes of some earthworm species. Fol. Histo. Cytobiol.4: 65-71.
- Cooper, E. y P. Roch. 2003. Earthworm immunity: a model of immune competence. Pedobiol. 7: 676-688.
- COOPER, E. Y K. HIRABAYASHI. 2013. Origen of innate immune responses: Revelation of food and medicinal applications. J. Trad. Complement. Med. 3:204-212.
- CORTESÍA, A., L. MARCANO, E. MARCANO Y E. ZAPATA-VÍVENES. 2015. Inmunotoxicidad de malation y clorpirifos en la lombriz de tierra *Eisenia* sp (Annelida: Oligochaeta). Saber. 27(4):350-336.
- DOMÍNGUEZ-CRESPO, M., Z. SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, A. TORRES-HUERTA, M. NEGRETE-RODRÍGUEZ, E. CONDE-BARAJAS Y A. FLORES-VELA. 2012. Effects of the metals Cu, Ni, Cd and Zn on the growth and reproduction of epigenic earthworm (*E. fetida*) during the vermin stabilization of municipal sewage sludge. Water Air Soil Pollut. 223: 915-931.
- FULLER-ESPIE, S., F. BEAROFF Y M. MINULILLO. 2011. Exposure of coelomocytes from earthworm *Eisenia hortensis* to Cu, Cd and dimethylbenz[a]anthracene: an *in vitro* study examining reactive oxygen species production and immune response inhibition. Pedobiol. 54S: S31-S36.
- HERNÁNDEZ, J., E. ZAPATA-VÍVENES, L. MARCANO, E. MARCANO Y O. NUSETTI. 2016. Respuestas bioquímicas en la lombriz de tierra *Eisenia andrei* expuesta a cadmio. Saber. 28: 536-545.
- HOMA, J., E. OLCHAWA, S. STÜRZENBAUM, J. MORGAN Y B. PLYTYCZ. 2005. Early-phase immunodetection of metallothionein and heat shock proteins in extruded earthworm coelomocytes after dermal exposure to metals ions. Environ. Pollut. 13: 275-280.
- HOMA, J., M. BZOWSKA, M. KLIMEK Y B. PLYTYCZ. 2008. Flow cytometric quantification of proliferating coelomocytes non-invasively retrieved from the earthworm, *Dendrobaena veneta*. Develop. Comp. Immunol. 82: 570-573.
- HOMA, J., A. ZORSKA, D. WESOLOWSKI Y M. CHADZINSKA. 2013. Dermal exposure to immunostimulants induces changes in activity and proliferation of coelomocytes of *Eisenia andrei*. J. Comp. Physiol. 183: 313-322.

- HOMA, J., A. RORAT, J. KRUK, C. COCQUERELLE, B. PLYTYCS Y F. VANDENBULCKE. 2015. Dermal exposure of *Eisenia andrei* earthworm: Effects of heavy metals on metallothionein and phytochelatin synthase genes expressions in coelomocytes. *Environ. Toxicol. Chem.* 34: 1397-1404.
- HOMA, J., S. STÜRZENBAUM Y E. KOLACZKOWSKA. 2016. Metallothionein and heat shock protein 72 protect *Allolobophora chlorotica* from cadmium but not nickel or copper exposure: body malformation and coelomocytes functioning. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 186: 417-430.
- IRIZAR, A., D. DUARTE, L. GUILHERMINO, I. MARIGÓMEZ Y M. SOTO. 2014. Optimization RNU assay in primary cultures of *Eisenia fetida* for metal toxicity assessment. *Ecotoxicol.* 23: 1326-1335.
- IRIZAR, A., C. RIVAS, N. GARCÍA-VELASCO, F. GOÑI DE CERIO, J. ETXEBARRIA, I. MARIGÓMEZ Y M. SOTO. 2015. Establishment of toxicity thresholds in subpopulations of coelomocytes (amoebocytes vs eleocytes) of *Eisenia fetida* exposed *in vitro* to a variety of metals: implications for biomarker measurements. *Ecotoxicol.* 24: 1004-1013.
- KOWALD, G., S. STÜRZENBAUM Y C. BLINDAUER. 2016. Earthworm *Lumbricus rubellus* MT-2: metal binding and protein folding of a true cadmium-MT. *Int. J. Mol. Sci.* 17: 1-16.
- KOZIOL, B., M. MARKOWICZ, J. KRUK Y B. PLYTYCZ. 2006. Riboflavin as a source of autofluorescence in *Eisenia fetida* coelomocytes. *Photochem. Photobiol.* 82: 570-573.
- KUREK, A., J. HOMA, E. KAUSCHKE Y B. PLYTYCZ. 2007. Characteristic of coelomocytes of the stubby earthworm, *Allolobophora chlorotica* (Sav.). *Eur. J. Soil Biol.* 43: 121-126.
- KWAK, J., K. SHIN Y A.YOUN-JOO. 2014. A new method for measuring *in vivo* and *in vitro* cytotoxicity in earthworm coelomocytes by flow cytometry. *Environ. Res.* 134: 118-126.
- LANG, F., G. BUSCH Y H. VOLKL. 1998. The diversity of volume regulatory mechanisms. *Cell. Physiol. Biochem.* 8: 1-45.
- LEMTIRE, A., A. LIÉNARD, T. ALABI, Y. BROSTAU, D. CLUZEAU, F. FRANCIS Y G. COLINET. 2016. Earthworms *Eisenia fetida* affect the up take of heavy metals by plants *Vicia faba* and *Zea mays* in metal-contaminated soils. *Appl. Soil Ecol.* 104: 67-78.
- LOURENÇO, J., A. SILVA, F. CARVALHO, J. OLIVEIRA, S. MALTA, M. MENDO, F. GONCALVES Y R. PEREIRA. 2011. Histopathological changes in the earthworm *Eisenia andrei* associated with the exposure to metals and radionuclides. *Chemosphere.* 85: 1630-1634.
- MARCANO, E., L. MARCANO, A. CORTESÍA Y S. NUSETTI. 2013. Efectos citotóxicos de clorpirifos y malatión en la lombriz de tierra *Eisenia* sp. (Annelida: Oligochaeta). *Rev. Argent. Ecotoxicol. Contam. Ambient.* 41: 289-301.
- MINCARELLI, L., C. VISCHETTI, J. CRAFT Y L. TIRANO. 2016. DNA-damage in different *Eisenia Andrei* coelomocytes sub-populations after *in vitro* exposure to hydrogen peroxide. *Springer Plus.* 5: 302-307.

- NAIR, A., O. DEGHESELLE, K. SMEETS, E. VAN KERKHOVE Y A. CUYPER. 2013. Cadmium-induced pathologies: where is the oxidative balance lost (o not)?. *Int. J. Mol. Sci.* 14: 6116-6143.
- PLYTYCZ, B., M. KLIMEK, J. HOMA, G. TYLKO Y E. KOLACZKOWSKA. 2007. Flow cytometric measurement of neutral red accumulation in earthworm coelomocytes: Novel assay for studies on heavy metal exposure. *Eur. J. Soil Biol.* 43: S116-S120.
- POLO, A.M., L. MARCANO, M. GRANADILLO, E. MARCANO, A. CORTESÍA Y J. HERNÁNDEZ. 2011. Crecimiento y reproducción en la lombriz roja californiana (*Eisenia andrei*) en sustratos contaminados con cadmio. *Bol. C. Invest. Biol.* 45: 123-134.
- POLO, A., L. MARCANO Y R. MARTÍNEZ. 2012. Evaluación de la calidad del humus producido por *Eisenia andrei* a partir de tres sustratos orgánicos. *Bol. C. Invest. Biol.* 46: 263-282.
- SAEZ, G., M. AYE, M. DE MEO, A. AIMÉ, I. BESTEL, P. BARTHÉLÉMY Y C. DI GIORGIO. 2015. Genotoxic and oxidative responses in coelomocytes of *Eisenia fetida* and *Hediste diversicolor* exposed to lipid-coated CdSe/ZnS quantum dots and CdCl₂. *Environ. Toxicol.* 30:918-926.
- SAINT-DENIS, M., J. NARBONNE, C. ARNAUD Y D. RIBERA. 2001. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida Andrei* exposed to contaminated artificial soil: effects of lead acetate. *Soil Biol. Biochem.* 32: 395-404.
- SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, J. C. 2006. Earthworm biomarkers in ecological risk assessment. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 188: 85-126.
- SPURGEON, D., C. SVENDSEN, P. KILLE, A. MORGAN Y J. WEEKS. 2004. Responses of earthworms (*Lumbricus rubellus*) to copper and cadmium as determined by measurement of juvenile traits in a specifically designed test system. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57: 54-64.
- STÜRZENBAUM, S., O. GEORGIEV, J. MORGAN Y P. KILLE. 2004. Cadmium detoxification in earthworms: from genes to cells. *Environ. Sd. Technol.* 38: 6283-6289.
- SURUCHI, H. Y H. PANKAJ. 2011. Assessment of heavy metals contaminations in different vegetables grown in an around urban areas. *Res. J. Environ. Toxicol.* 3: 162-179.
- YUE, R., C. LU, J. QI, X. HAN, S. YAN, S. GUO, L. LIU, X. FU, N. CHEN, H. YIN, H. CHI Y S. Tie 2016. Transcriptome analysis of cadmium-treated roots in maize (*Zea mays* L.). *Front Plant Sci.* 7, 1298: 1-8.
- WANG, J., L. ZHU, Y. MENG, J. WANG, H. XIE Y Q. ZHANG. 2012. The combined stress effects of atrazine and cadmium on the earthworm *Eisenia fetida*. *Environ. Toxicol. Chem.* 31: 2035-2040.



**UNIVERSIDAD
DEL ZULIA**

**BOLETÍN DEL CENTRO DE
INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS**

Vol.52 N° 2_____

*Esta revista fue editada en formato digital y publicada
en agosto de 2018, por el **Fondo Editorial Serbiluz,**
Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela*

www.luz.edu.ve
www.serbi.luz.edu.ve
produccioncientifica.luz.edu.ve