



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

RESPUESTAS INMUNOLÓGICAS Y PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS EN LA
LOMBRIZ DE TIERRA *Eisenia* spp. (ANNELIDA: OLIGOCHAETA)
EXPUESTA A CADMIO

(Modalidad: Investigación)

ZOILA GABRIELA JIMÉNEZ LÓPEZ

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADA EN BIOLOGÍA

Cumaná, 2009

**RESPUESTAS INMUNOLÓGICAS Y PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS EN LA
LOMBRIZ DE TIERRA *Eisenia* spp. (ANNELIDA: OLIGOCHAETA)
EXPUESTA A CADMIO**

APROBADO POR:

Prof. Leida Marcano
Asesora

JURADO

JURADO

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTO	V
LISTA DE FIGURAS	VI
RESUMEN.....	VII
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	6
1. Obtención del material biológico	6
2. Bioensayos de toxicidad.....	6
3. Parámetros citológicos e inmunológicos.....	7
3.1 Viabilidad y recuento de celomocitos totales.....	7
3.2 Fagocitosis	8
4.3 Lisozima	8
4. Peroxidación de Lípidos.....	9
5. Análisis estadísticos	9
RESULTADOS.....	10
1. Parámetros citológicos	10
2. Fagocitosis	11
3. Actividad lisozima	12
4. Peroxidación de Lípidos.....	13
DISCUSIÓN	15
CONCLUSIONES	23
BIBLIOGRAFÍA	24
APÉNDICES.....	33
Hoja de Metadatos	40

DEDICATORIA

A mi madre, por su insistencia y aliento durante el desarrollo de mi carrera.

A mi hermana Ysia y a mi sobrino Fabián, por su apoyo en momentos difíciles.

A mi novio Adolfo, por creer en mí y ayudarme a conseguir las muestras para mis ensayos.

A la profesora Leida Marcano, por su infinita paciencia y comprensión para que yo pudiera culminar con mi Tesis.

A mí misma.

AGRADECIMIENTO

A Dios, por permitirme culminar esta etapa de mi vida y superar todos los obstáculos presentados.

A la Profesora Leida Marcano, por su asesoría, paciencia y ayuda incondicional para conmigo, durante el desarrollo de mi Trabajo de Grado.

Al Profesor Osmar Nusetti, coordinador del laboratorio donde se llevaron a cabo parte de los análisis de este estudio.

Al Profesor Edgar Zapata, por su ayuda proporcionada en todo momento y a mi compañera, Lcda. Elena Marcano, por brindarme su ayuda incondicional.

A todos los Profesores del Departamento de Biología, quienes participaron en el desarrollo de mi carrera.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Número total de células en el fluido celómico de *Eisenia* spp. controles (0) y expuestos a 2,6 y 10,4 mg Cd/kg de sustrato durante 7 y 21 días. Las barras expresan las medias y la tendencia de la desviación estándar (n=8). 10
- Figura 2.** Viabilidad celular (%) de los celomocitos del fluido celómico de *Eisenia* spp. controles (0) y expuestas a 2,6 y 10,4 mg de Cd/kg de sustrato durante 7 y 21 días. Las barras expresan las medias y la tendencia de la desviación estándar (n=8). 11
- Figura 3.** Actividad fagocítica (%) de los celomocitos del fluido celómico de *Eisenia* spp. controles (0) y expuestas a 2,6 y 10,4 mg de Cd/kg de sustrato durante 7 y 21 días. Las barras expresan las medias y la tendencia de la desviación estándar (n=8). 12
- Figura 4.** Actividad lisozima en el fluido celómico de *Eisenia* spp. controles (0) y expuestas a 2,6 y 10,4 mg de Cd/kg de sustrato durante 7 y 21 días . Las barras expresan las medias y la tendencia de la desviación estándar (n=8). 13
- Figura 5.** Concentración de MDA en el tejido corporal de *Eisenia* spp. controles (0) y expuestas a 2,6 y 10,4 mg de Cd/kg de sustrato durante 7 y 21 días. Las barras expresan las medias y la tendencia de la desviación estándar (n = 8). 14

RESUMEN

Se evaluaron los efectos agudos (7 días) y crónicos (21 días) de 2,6 y 10,4 mg Cd/kg de sustrato sobre la fagocitosis de celomocitos y actividad de lisozima del fluido celómico, así como las concentraciones de malondialdehído (MDA) en el tejido corporal de *Eisenia* spp. Los bioensayos de exposición al metal fueron conducidos en el laboratorio, colocándose cada lombriz por separado en recipientes plásticos contentivos de un sustrato orgánico preparado con estiércol de vaca y compost vegetal, mezclado con la solución del metal. Las respuestas inmunológicas fueron evaluadas en el fluido celómico y el contenido de MDA en el tejido corporal de la lombriz. Los inmunoensayos revelaron la existencia de celomocitos con una viabilidad de $72,13 \pm 12,84\%$ en organismos no expuestos que se mantuvo sin variaciones significativas durante el tratamiento con Cd. Durante la exposición aguda a las dos concentraciones del metal se observó una reducción significativa en el número total de celomocitos y porcentaje de células fagocíticas de aproximadamente 37 y 61%, respectivamente. Asociado a esto se observó un incremento en los niveles de MDA desde $2,18 \pm 0,28$ nmoles MDA/g.t.h en lombrices controles hasta $4,50 \pm 0,81$ nmoles MDA/g.t.h en las expuestas a la concentración más alta. La exposición por 21 días al Cd inhibió en un 71% la fagocitosis de los celomocitos de *Eisenia* spp., mientras que el número total de celomocitos solo mostró un descenso del 12%, aproximadamente con respecto al grupo control. En contraste, en este periodo la actividad de lisozima exhibió un aumento aproximado al 66 % a ambas concentraciones del metal, el cual coincidió con un reestablecimiento de los niveles de MDA hasta valores similares a los del control. El tratamiento con Cd de *Eisenia* spp. durante la fase aguda, probablemente genere una condición de estrés oxidativo; evidenciado por los altos niveles de MDA registrados durante este periodo que afecta principalmente el componente celular del sistema inmune, provocando un descenso en el número total de celomocitos y su potencial fagocítico y, en menor grado al componente humoral, inhibiendo la actividad de lisozima. Luego, durante la exposición mas prolongada al metal (21 días), el organismo posiblemente realiza los ajustes bioquímicos necesarios que le permiten controlar los daños oxidativos, tal como lo indica los bajos niveles de MDA en esta fase, favoreciendo una recuperación parcial de su sistema de defensa inmunológico; específicamente del componente humoral (aumento de lisozima). Esta última respuesta puede representar un mecanismo bioquímico de compensación importante para la especie que, le provee protección inmune frente a la invasión bacteriana cuando las funciones celular-mediadas (como fagocitosis) se encuentran inhibidas. Se concluye que las respuestas inmunes evaluadas en *Eisenia* spp. fueron alteradas por la exposición al Cd, constituyéndose en biomarcadores inmunológicos sensibles de uso potencial en estudios sobre la calidad de los suelos en organismos de relevancia ecológica.

INTRODUCCIÓN

Las lombrices de tierra son un grupo de anélidos terrestres que presentan una serie de características que las convierten en modelos biológicos apropiados para evaluar toxicidad por productos químicos en el ambiente. Entre ellas, su amplia distribución geográfica, posición clave en la cadena trófica, abundancia en varios tipos de suelo, hábitat y hábitos alimenticios, así como su elevada tasa de reproducción y facilidad de cultivo en condiciones experimentales (Eyambe *et al.*, 1991; Saint-Denis *et al.*, 1999; Booth y O'Halloran, 2001; Dhainaut y Scaps, 2001; Sauvé *et al.*, 2002; Hamman *et al.*, 2003; Homa *et al.*, 2005; Sauvé y Fournier, 2005; Olchawa *et al.*, 2006).

Muchos estudios han revelado el potencial del sistema inmune de estos anélidos para ser usados en estudios de evaluación de riesgo biológico por contaminantes químicos, dado que ciertos aspectos de este sistema son similares al de vertebrados superiores (Rodríguez-Grau *et al.*, 1989; Ville *et al.*, 1995; Nusetti *et al.*, 1999; Cooper y Roch, 2003; Kurek y Plytycz, 2003; Komiyama *et al.*, 2004). Los anélidos poseen un sistema de defensa inmunológico que reside en el celoma y está constituido por un componente celular y un componente humoral (Cooper, 2002; Cooper y Roch, 2003).

La inmunidad celular es llevada a cabo fundamentalmente a diferentes poblaciones de células contenidas en la cavidad celómica. Estas células son conocidas como celomocitos las cuales participan en diferentes respuestas tales como: fagocitosis activa contra bacterias, encapsulación; una defensa específica contra parásitos, reacciones de citotoxicidad y respuestas de cicatrización de heridas. Las respuestas humorales incluyen un grupo de diversas proteínas, entre ellas, aglutininas que permiten la agregación y neutralización de material extraño, hemolisinas con actividad hemolítica y bactericida, lisozima y otras proteínas con

actividad antibacterial (Lange *et al.*, 1999; Dhainaut y Scaps, 2001; Olchawa *et al.*, 2006).

Las respuestas de defensa inmunológicas en anélidos pueden ser alteradas por la acción de contaminantes orgánicos e inorgánicos, disminuyendo así la inmunocompetencia del organismo y aumentando su susceptibilidad a la invasión por patógenos. Aún cuando los principales cambios en el sistema inmune inducido por contaminantes son rápidamente expresados en una significativa morbilidad y en algunos casos, mortalidad de los organismos afectados, éstos a menudo, son precedidos por alteraciones estructurales y funcionales en algunos componentes de este sistema, cuando las concentraciones de los contaminantes son subletales (Sauvé y Fournier, 2005). Este último aspecto, en la actualidad ha despertado gran interés y se ha convertido en objeto de estudio en el área de inmunotoxicología.

En el contexto anterior, desde hace algunos años se han propuesto los inmunoensayos con lombrices de tierra para evaluar riesgos a la salud ambiental y pública debida a la disposición inadecuada de productos químicos en el medio terrestre. Parámetros como el conteo total y diferencial de celomocitos, viabilidad celular, potencial fagocítico y participación en el proceso de cicatrización se han considerado buenos biomarcadores celulares (Cikutovick *et al.*, 1999; Dhainaut y Scaps, 2001; Olchawa *et al.*, 2006; Homa *et al.*, 2007). Niveles de proteínas antibacteriales secretadas por los celomocitos tales como las lisozimas, aglutininas, hemolisinas, fetidinas, eiseniaporos, factor citolítico celómico constituyen un grupo de marcadores moleculares comúnmente usados para evaluar toxicidad en el sistema de defensa humoral (Lange *et al.*, 1999; Kauschke *et al.*, 2007; Arlan-Aydoğdu y Çotuk, 2008).

Inmunotoxicidad por contaminantes orgánicos ha sido evidenciada en las lombrices *Lumbricus terrestris*, *Eisenia fetida* y *Eisenia hortensis*, expuesta a bifenilos policlorinados (PCBs), el tratamiento con estas sustancias orgánicas produjo

efectos inhibitorios en la actividad fagocítica de los celomocitos (Rodríguez-Grau *et al.*, 1989; Goven *et al.*, 1993; Ville *et al.*, 1995). Similares resultados fueron observados en *E. fetida* durante la exposición a los pesticidas aroclor 1254 y carbamifosfato (Cooper y Roch, 2003). Ville *et al.* (1997) demostró que la exposición por 48 horas a carbamifosfato y al ácido 2,4-diclorofenoxiacético inhibió el potencial fagocítico de los celomocitos de *E. andrei*. En contraste, a las respuestas inmunes celulares, respuestas humorales como lisozima, actividad de proteasas y hemólisis fueron estimuladas por PCB_s, aroclor y carbamil en *L. terrestris*, *E. fetida* y *E. hortensis* (Ville *et al.*, 1995; Cooper y Roch, 2003).

Los efectos perjudiciales de metales pesados sobre la estructura y función de las células inmunes (celomocitos) de las lombrices han sido reportados previamente por ciertos investigadores (Goven *et al.*, 1994; Fugere *et al.*, 1996; Nusetti *et al.*, 1999; Sauvé *et al.*, 2002; Sauvé y Fournier, 2005; Olchawa *et al.*, 2006; Homa *et al.*, 2007). Estos estudios han contribuido a un mejor entendimiento de la evolución del sistema inmune en invertebrados y han proporcionado biomarcadores celulares útiles de aplicación en el diagnóstico ambiental. En muchos casos, la inmunosupresión inducida por metales se ha correlacionado con un desbalance de los mecanismos humorales o celulares que disminuyen la inmunocompetencia del organismo (Fournier *et al.*, 2000; Kauschke *et al.*, 2007). Metales pesados como Cu, Hg, Zn, Pb, Ag, y Cd han propiciado descensos en la viabilidad y actividad fagocítica de celomocitos, así como incrementos en la actividad de lisozima en *L. terrestris*, *Aporrectodea turgida* y *Amyntas hawayanus* (Goven *et al.*, 1994; Fugere *et al.*, 1996; Nusetti *et al.*, 1999).

Los metales pesados esenciales y no esenciales son eficientemente incorporados por las lombrices a través de la superficie corporal altamente permeable o a través del tracto digestivo con el alimento, siendo bioacumulados luego, en los distintos compartimientos tisulares, principalmente en el tejido cloragogeno; un

repliegue del tracto intestinal con una función análoga al tejido hepático de vertebrados. A nivel intracelular, los iones metálicos pueden formar complejos estables con moléculas contentivas de grupos tioles (Stürzenbaum *et al.*, 2001).

En los sistemas biológicos, la selectividad y discriminación entre metales pesados esenciales y no esenciales se hace difícil, principalmente cuando las propiedades físicas de éstos y afinidades por ligandos moleculares son semejantes. En este sentido, la toxicidad de los metales pesados en el interior celular se manifiesta cuando éstos interactúan directamente con distintas biomoléculas, afectando su estructura y función biológica, o a través de la producción de especies reactivas del oxígeno (EROs) y atenuación de los mecanismos de defensas antioxidantes celulares (Ercal *et al.*, 2001).

Patologías oxidativas son observadas cuando se sobrepasan las concentraciones fisiológicamente apropiadas de EROs, los cuales actúan como catalizadores de reacciones oxidativas de macromoléculas celulares. Uno de los blancos más importantes del ataque de EROs son los lípidos que conforman las membranas biológicas, los cuales son oxidados a radicales lipídicos e hidroperóxidos, formando MDA. La lipoperoxidación (LPO) ha sido reportada como el mayor contribuyente en la pérdida de la funcionabilidad celular bajo situaciones de estrés oxidativo, modificando la permeabilidad de sistemas membranales de organelos (mitocondrias o microsomas), produciendo así disrupción de la energía celular (Bindoli, 1988; Ercal *et al.*, 2001; Torres *et al.*, 2002; Mendoza-Cozati y Moreno-Sánchez, 2006; Alvarez-Legorreta *et al.*, 2008). Las membranas en lombrices son ricas en ácidos grasos poliinsaturados (Albro *et al.*, 1993; Saint-Denis *et al.*, 2001), los cuales sufren reacciones de peroxidación en presencia de metales pesados, tales como Pb y cadmio (Saint-Denis *et al.*, 2001; Hernandez, 2006; Marcano, 2006).

El cadmio es un metal pesado no esencial altamente tóxico, potencial carcinógeno humano que puede bioacumularse en todos los niveles tróficos. A nivel

mundial, la concentración promedio de este metal en suelo es de 0,62 mg/kg, pero la geología y la variedad de actividades antropogénicas pueden incrementar significativamente su concentración. Las consecuencias ecotoxicológicas de la contaminación por cadmio son exacerbadas por su alto potencial de biodisponibilidad, así como su tendencia a bioacumularse con larga vida media en la biota (Stürzenbaum, 2004).

Las lombrices de tierra exhiben una excepcional tolerancia al Cd, encontrándose en suelos con concentraciones de Cd que exceden los valores publicados de CL₅₀ a 14 días. La ruta que facilita la absorción, acumulación, transporte y excreción de Cd en estos anélidos, se ha asociado con la participación de varias cohortes de celomocitos e isoformas específicas de metalotioneinas (Stürzenbaum *et al.*, 2004; Olchawa *et al.*, 2006).

Tomando en consideración que el Cd representa un riesgo potencial de contaminación para los ecosistemas terrestres, aún a muy bajas concentraciones (Lukkari, 2004) y que manifestaciones de alteraciones perjudiciales son exhibidas por los organismos expuestos a metales pesados, cuando se excede la capacidad de defensa antioxidante por agentes prooxidantes. El sistema inmune, por ejemplo, puede ser altamente vulnerable a la acción perjudicial de estas especies químicas. En este estudio se evaluaron los efectos agudos y crónicos del Cd sobre algunas respuestas inmunológicas y la peroxidación de lípidos en la lombriz de tierra *Eisenia* spp.; un género mundialmente reconocido como bioindicador apropiado para estudios de ecotoxicología terrestre (Saint-Denis *et al.*, 2001; Domínguez *et al.*, 2005; Perez-Lozada *et al.*, 2005), de gran abundancia en nuestro país y que además constituye una posición clave en el proceso de biomagnificación de este contaminante a través de la escala trófica

METODOLOGÍA

1. Obtención del material biológico

Los ejemplares de *Eisenia* spp. fueron obtenidos de un lombricario del vivero Inverca, ubicado en El Tigre, estado Anzoátegui. Posteriormente, fueron trasladados en cavas de anime con suficiente sustrato orgánico proveniente del sitio de captura al Bioterio del Departamento de Biología de la Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente, donde fueron mantenidas por dos semanas previo a la realización de los bioensayos, en recipientes plásticos de mayor capacidad (50 l), provistas de un sustrato orgánico húmedo (mezcla 2:1 de estiércol de vaca y compost vegetal, pH 7,8 \pm 2) y tapados con una malla de nylon. La temperatura de la sala se mantuvo en 25 \pm 2 °C. Luego de este período, se seleccionaron organismos de un peso homogéneo (0,2 \pm 0,1 g) para el desarrollo de los bioensayos.

2. Bioensayos de toxicidad

Las lombrices fueron expuestas durante 7 y 21 días a concentraciones subletales de 2,6 y 10,4 mg de Cd/kg de sustrato, las cuales representan el 2 y 7%, respectivamente, de la concentración letal media (CL_{50} = 147,6 mg de Cd/kg de sustrato), estimada previamente por Marcano (2006) para la especie en estudio. Para el sistema de exposición al metal, se utilizaron recipientes plásticos de 340 cm² de capacidad, en los que se colocaron 100 g del sustrato orgánico anteriormente descrito y se mezcló luego con 35 ml de la solución del metal (CdCl₂ Merck). Se colocaron 16 lombrices en total por cada concentración; una en cada recipiente. En el caso del grupo control, el sustrato fue mezclado con 35 ml de agua destilada. Transcurridos los primeros 7 días del bioensayo, se tomaron muestras de 8 lombrices controles y 8 de cada uno los grupos tratados con Cd para los análisis respectivos. Para garantizarles las condiciones óptimas de humedad, alimento y concentración del

contaminante en el sistema, se hizo recambios del sustrato con y sin el metal a los 7 y 15 días para las lombrices restantes de los distintos tratamientos que permanecerían en el bioensayo por 21 días.

3. Parámetros citológicos e inmunológicos

3.1 Viabilidad y recuento de celomocitos totales

La expulsión del fluido celómico de *Eisenia* spp. fue provocada por irritación mecánica del organismo, realizando ligeras punciones sobre el tejido corporal con una jeringa hipodérmica. Para ello, cada lombriz fue previamente lavada con solución salina 0,85%, masajead a nivel de la región posterior para limpiar el tubo intestinal, y luego se colocó en una cápsula de petri para inducir la irritación. El fluido fue colectado y transferido a tubos de polietileno (ependorf de 1,5 ml), donde se mezcló con 1 ml de una solución fría de NaCl 10 g/l, KCl 0,5 g/l, glucosa 1,25 g/l, KH₂PO₄ 75 mg/l, Na₂HPO₄ 475 mg/l (Kurek *et al.*, 2003), se centrifugó a 2000 rpm, durante 10 minutos a 4°C, y el precipitado celular fue resuspendido en 500 µl de la solución antes mencionada. El porcentaje de células viables y el número total de células se determinó, usando microscopía de luz y tinción con el colorante vital azul de tripano (Sigma Chemical, Co). Se mezclaron 100 µl de la suspensión de celomocitos con un volumen equivalente del colorante (0,4%) y se contaron 100 células teñidas y no teñidas en un hemocitómetro para obtener el porcentaje de viabilidad. El número total de células se obtuvo promediando el total de células viables contadas en los cuatro cuadrantes externos del hemocitómetro, multiplicado por el factor de dilución. Aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ de celomocitos/ml} = X/2 \times 10^4$$

3.2 Fagocitosis

La actividad fagocítica de los celomocitos se cuantificó, utilizando levadura comercial (0,1 mg/ml) inactivada por calor como antígeno. Se mezclaron 100 µl de la suspensión de celomocitos (1×10^6 células/ml) con 100 µl del antígeno, después de mezclar brevemente e incubar por 24 h a 4°C, se tomaron 100 µl y se mezclaron con 100 µl del colorante vital. En un hemocitómetro se hizo el conteo de 100 células viables, considerándose como fagocitos aquellas células que contenían al menos una levadura en su interior.

4.3 Lisozima

La actividad de lisozima en el fluido celómico se determinó utilizando el protocolo previamente estandarizado para el poliqueto *Eurythoe complanata* por Marcano *et al.* (1997), incluyendo algunas modificaciones para la especie en estudio. El fluido celómico fue diluido en buffer fosfato de potasio 100 mmol/l, pH 6,2. Una alícuota de 40 µl del fluido se sembró en pozos de 5 mm de diámetro en lisoplacas de agarosa 1% en buffer fosfato 100 mmol/l, conteniendo *Micrococcus lysodeikticus* 0,6% como sustrato. Las lisoplacas se incubaron a temperatura ambiente por 48 horas, período en el cual se midieron los diámetros de los halos correspondientes a la lisis e inhibición del crecimiento de *M. lysodeikticus* y se compararon con los producidos por la lisozima estándar de clara de huevo (HEL, Sigma Chemical, Co).

La concentración de lisozima se expresó como µ g/ml equivalentes de lisozima estándar, aplicando la siguiente ecuación de regresión, según lo propuesto por Goven *et al.* (1994):

$$\text{HEL}_{\mu\text{g/ml}} = \text{antilog}_{10} [a + b (\text{diámetro del halo, mm})]$$

4. Peroxidación de Lípidos

La peroxidación de lípidos en el tejido corporal de *Eisenia* spp. se cuantificó por el método LPO-586™ (BIOXYTECH® LPO-586™; OxisResearch™); un ensayo colorimétrico el cual se basa en la reacción del reactivo cromogénico, N-metil-2-fenilindol (R1) con MDA, uno de los productos más comunes de la lipoperoxidación, a 45 °C para formar un cromóforo estable que absorbe luz máxima a 586 nm. Para ello, se preparó un homogeneizado con el tejido muscular de cada lombriz (0,2 g aproximadamente) libre de vísceras en 1,8 ml de buffer fosfato 20 mmol/l, pH 7,4; justo antes de homogeneizar se agregaron 10 µl de butilato hidroxitolueno (BTH, 0,5 mol/l, diluido en acetonitrilo) por cada ml de homogeneizado. Luego de centrifugar a 3000 rpm a 4 °C por 10 minutos, se tomó una alícuota de 100 µl del sobrenadante y se mezcló con R1 en un medio ácido, después de un período de incubación a 45 °C por 60 minutos, se midió la absorbancia a 586 nm. Las determinaciones de MDA se realizaron, utilizando una curva de calibración con MDA estándar. Los resultados se expresaron en nmol de MDA por gramo de tejido húmedo (nmol MDA/g.t.h).

5. Análisis estadísticos

Las diferencias entre los parámetros citológicos e inmunológicos, así como del contenido de MDA en lombrices controles y experimentales se analizaron aplicando un análisis de varianza doble, utilizando el paquete estadístico Statgraphic, versión 5,1. Las diferencias significativas encontradas en las variables, se midieron aplicando la prueba a posteriori de Duncan. (Sokal y Rohlf, 1981).

RESULTADOS

1. Parámetros citológicos

En la figura 1 se muestran los resultados del número total de celomocitos en el fluido celómico de *Eisenia* spp. durante la exposición aguda y crónica a 2,6 y 10,4 mg de Cd/kg de sustrato. El protocolo de liberación del fluido celómico ensayado para esta especie produjo celomocitos suficientes que permitieron el desarrollo posterior de los inmunoensayos. El tratamiento con Cd provocó un descenso en el número total de celomocitos dependiente de las concentraciones ($F_s = 3,84$; $p < 0,05$) y del tiempo de exposición ($F_s = 4,05$; $p < 0,05$). El grupo control mostró un número total de células promedio de $1,10 \pm 0,50 \times 10^6$ cel/ml, el cual descendió hasta un valor promedio de $0,69 \pm 0,26 \times 10^6$ cel/ml y $0,96 \pm 0,24 \times 10^6$ cel/ml en los expuestos a 2,6 y 10,4 mg Cd/kg sustrato, respectivamente durante los dos periodos de exposición.

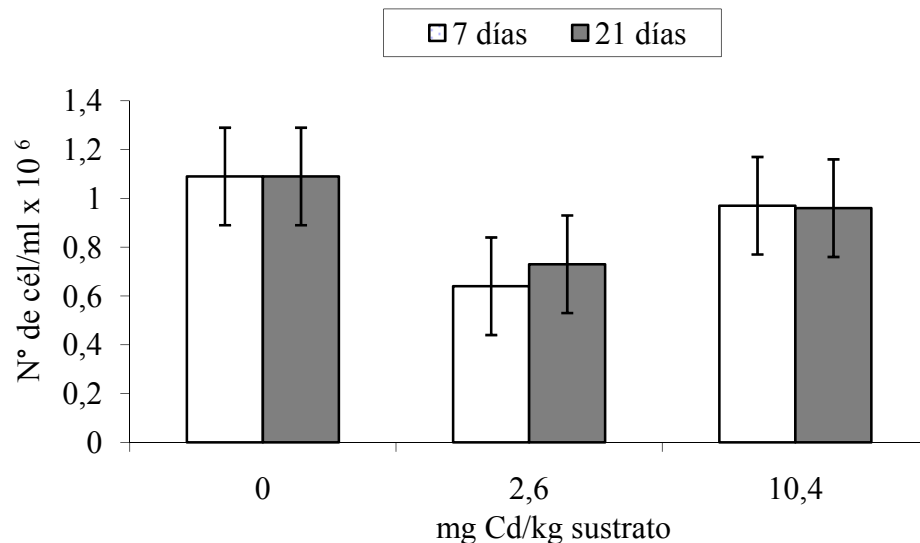


Figura 1. Número total de células en el fluido celómico de *Eisenia* spp. controles (0) y expuestos a 2,6 y 10,4 mg Cd/kg de sustrato durante 7 y 21 días. Las barras expresan las medias y la tendencia de la desviación estándar (n=8).

El porcentaje de viabilidad de los celomocitos de *Eisenia* spp. en organismos no expuestos y expuestos por 7 y 21 días a las dos concentraciones de Cd se muestra en la figura 2. La viabilidad promedio de los celomocitos en el grupo de lombrices controles fue de $72,13 \pm 12,84\%$, observándose un ligero descenso hasta un valor promedio de $71,82 \pm 10,4 \%$ y $68,5 \pm 6,1\%$, durante la exposición aguda y crónica, respectivamente. Sin embargo, estos últimos valores no fueron significativamente diferentes de los observados en el grupo control.

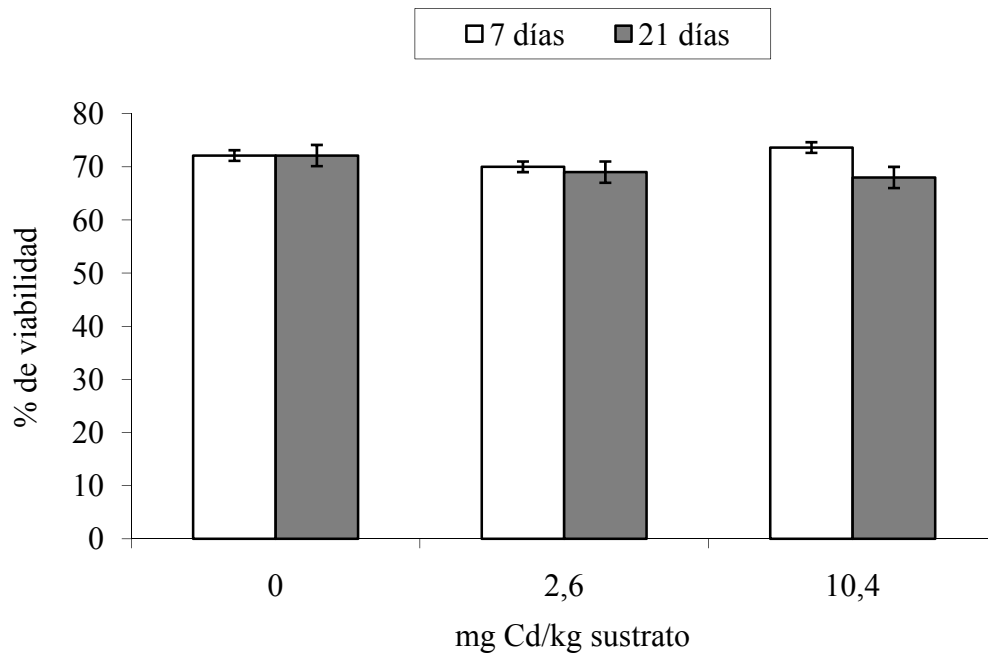


Figura 2. Viabilidad celular (%) de los celomocitos del fluido celómico de *Eisenia* spp. controles (0) y expuestas a 2,6 y 10,4 mg de Cd/kg de sustrato durante 7 y 21 días. Las barras expresan las medias y la tendencia de la desviación estándar (n=8).

2. Fagocitosis

La figura 3 muestra los resultados del porcentaje de celomocitos con actividad fagocítica en lombrices controles y expuestas a las dos concentraciones de Cd durante los 7 y 21 días. La exposición al Cd produjo un descenso significativo en el

porcentaje de fagocitosis, dependiente de las concentraciones ($F_s = 208,27$, $p < 0,001$) y del tiempo de exposición ($F_s = 4,77$, $p < 0,05$). Los celomocitos de las lombrices controles mostraron un $79,88 \pm 11,21\%$ de actividad fagocítica que descendió durante los primeros 7 días de exposición a las dos concentraciones de Cd hasta $31,51 \pm 5,46\%$, pronunciándose el descenso hasta $23,61 \pm 7,8\%$, a los 21 días de tratamiento con el metal.

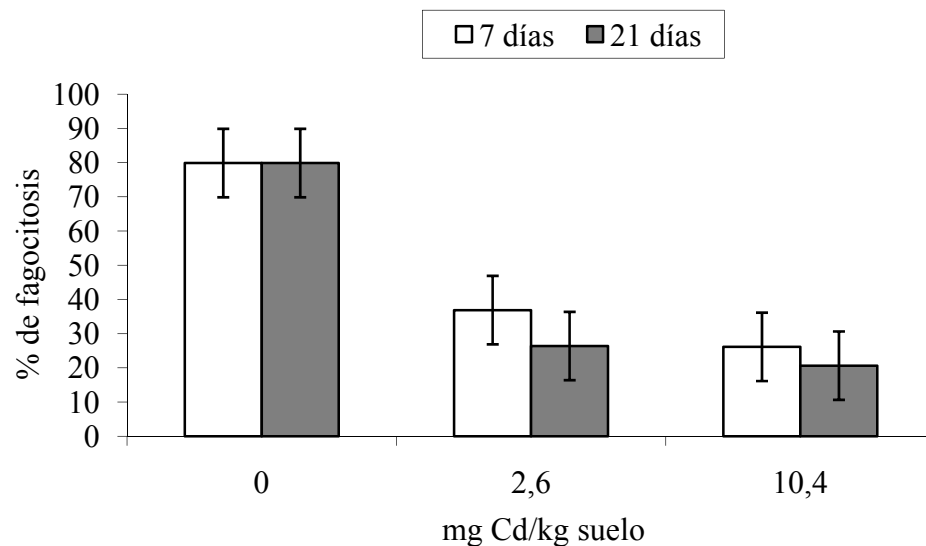


Figura 3. Actividad fagocítica (%) de los celomocitos del fluido celómico de *Eisenia* spp. controles (0) y expuestas a 2,6 y 10,4 mg de Cd/kg de sustrato durante 7 y 21 días. Las barras expresan las medias y la tendencia de la desviación estándar (n=8).

3. Actividad lisozima

En la figura 4 se muestran los resultados de la actividad de lisozima en el fluido celómico de *Eisenia* spp. durante la exposición aguda y crónica a 2,6 y 0,4 mg Cd/kg de sustrato. En el fluido celómico de lombrices no expuestas al metal, se registró un valor de lisozima de $0,81 \pm 0,3 \mu\text{g/ml}$ que, aunque mostró un descenso de aproximadamente el 30% durante el tratamiento agudo con las dos

concentraciones de Cd, el análisis estadístico no reveló diferencias significativas entre el grupo control y los expuestos ($F_s = 0,09$; $p > 0,05$). En contraste, en el periodo de exposición crónico, la actividad de esta enzima mostró un incremento altamente significativo ($F_s = 16,38$; $p < 0,001$) con respecto al grupo control ($0,81 \pm 0,3 \mu\text{g/ml}$) hasta un valor promedio de $1,12 \pm 0,7 \mu\text{g/ml}$ a ambas concentraciones del metal.

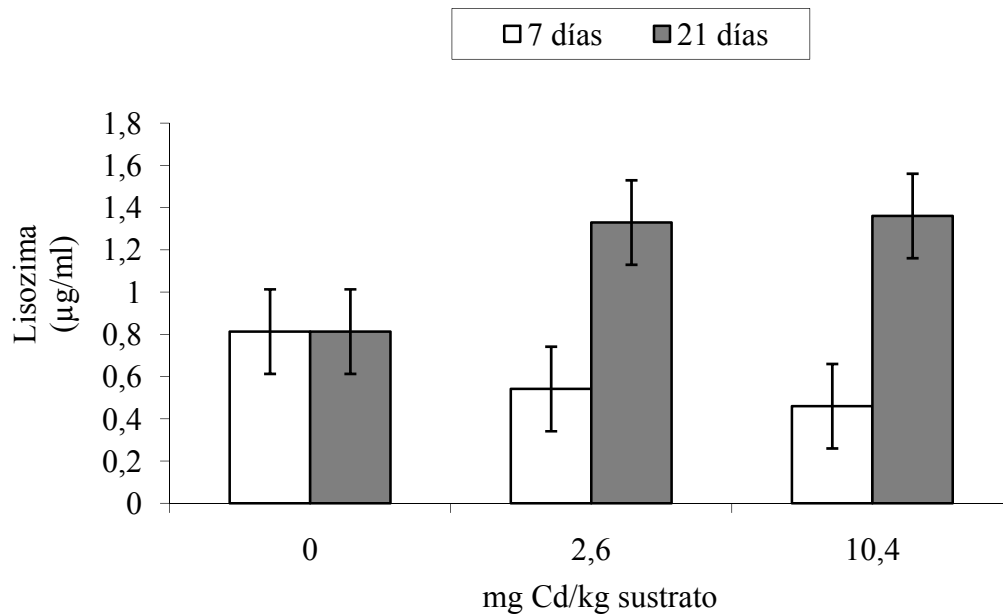


Figura 4. Actividad lisozima en el fluido celómico de *Eisenia* spp. controles (0) y expuestas a 2,6 y 10,4 mg de Cd/kg de sustrato durante 7 y 21 días. Las barras expresan las medias y la tendencia de la desviación estándar (n=8).

4. Peroxidación de Lípidos

Los niveles de MDA en el tejido corporal de *Eisenia* spp. controles y expuestas a 2,6 y 10,4 mg de Cd/kg de sustrato en los dos periodos, se muestran en la figura 5. Los organismos tratados con la dosis más alta de Cd a los 7 días de exposición mostraron diferencias significativa en los niveles de MDA en

comparación con sus respectivos controles ($F_s = 15,28$; $p < 0,001$), oscilando los valores entre $2,18 \pm 0,28$ y $4,50 \pm 0,81$ nmoles de MDA/g.t.h. para organismos controles y expuestos, respectivamente. Sin embargo, en el ensayo crónico no se observaron diferencias significativas en los niveles del MDA entre los grupos controles y los expuestos a las dos concentraciones de Cd.

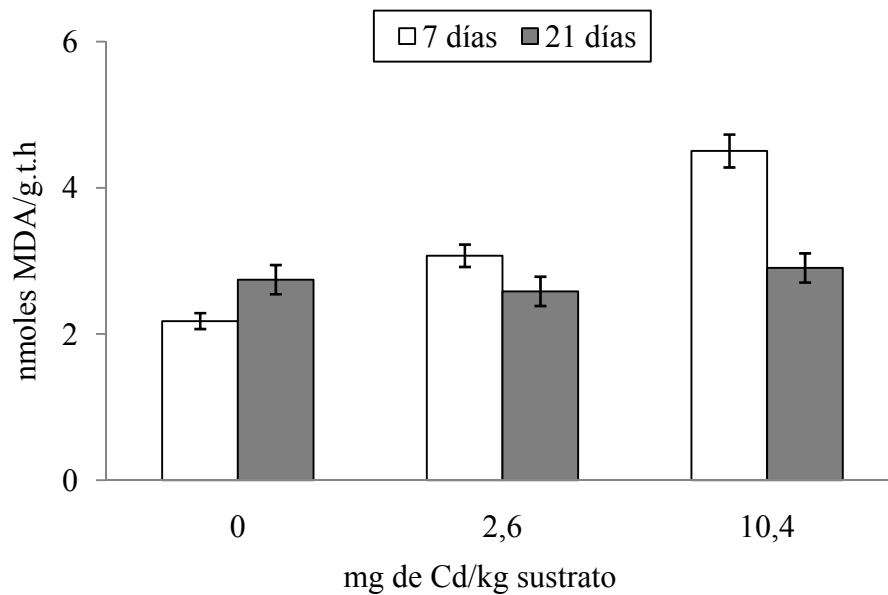


Figura 5. Concentración de MDA en el tejido corporal de *Eisenia* spp. controles (0) y expuestas a 2,6 y 10,4 mg de Cd/kg de sustrato durante 7 y 21 días. Las barras expresan las medias y la tendencia de la desviación estándar ($n = 8$).

DISCUSIÓN

En este estudio se utilizó un protocolo metodológico no invasivo para la obtención de células inmunoactivas (celomocitos) del fluido celómico de *Eisenia* spp. que proporcionó en lombrices controles suficientes células ($1,1 \pm 0,5 \times 10^6$ cel/ml) con un valor aproximado de viabilidad promedio de 72%; parámetros citológicos apropiados que permitieron el desarrollo posterior de los inmunoensayos para evaluar los efectos del Cd.

Existen suficientes evidencias de que las funciones del sistema inmune en lombrices de tierra son vulnerables a la modulación por contaminantes ambientales (Rodríguez-Grau *et al.*, 1989; Goven *et al.*, 1994; Dhainaut y Scaps, 2001; Sauvé y Fournier, 2005; Homa *et al.*, 2007). Los resultados de esta investigación demostraron que el tratamiento agudo y crónico de *Eisenia* spp. con Cd produjo distintos efectos sobre los parámetros citológicos y respuestas inmunológicas evaluadas, indicando diferencias en las sensibilidades de estos marcadores inmunológicos, desarrolladas posiblemente para controlar la acción tóxica del metal que es eficientemente bioacumulado por esta especie. Al respecto, en un estudio previo Marcano (2006) demostró que la especie en estudio incrementó, en un factor de 5, las concentraciones de Cd en el tejido corporal cuando fue expuesta a 2,6 y 10,4 mg Cd/kg de sustrato.

El número total y la actividad fagocítica de los celomocitos de *Eisenia* spp. disminuyeron durante el tratamiento agudo y crónico con Cd (Figs. 1 y 3), lo cual es una evidencia del efecto perjudicial del metal sobre el componente celular del sistema inmune que puede provocar una susceptibilidad incrementada en el organismo a la invasión por patógenos y una perturbación negativa en su condición fisiológica. Como ha sido demostrado, los celomocitos en lombrices de tierra participan en el reconocimiento y eliminación de agentes extraños, en la coagulación y cicatrización, así como en los procesos de nutrición, destoxificación y excreción de

productos de desecho entre los distintos tejidos (Cooper, 2002; Kurek y Plytycz, 2003). La sensibilidad de los celomocitos a la acción tóxica de contaminantes interfiere con dichos procesos y repercute en el estado de salud de estos organismos.

Es probable que el Cd genere alteraciones estructurales irreversibles en la membrana plasmática de los celomocitos de *Eisenia* spp. y de organelos subcelulares que propician alteraciones en sus funciones y, en último término, la lisis celular. Esta propuesta justificaría el descenso observado en el recuento total y actividad fagocítica de estas células. En este sentido, es conocido que tanto el Cd como otros metales pesados exhiben su acción tóxica bien sea vía producción de radicales libres, o por su interacción directa, induciendo alteraciones en la estructura molecular de la bicapa lipídica y en las proteínas de la membrana plasmática (Romero *et al.*, 2009).

Estudios recientes han evidenciado una correlación entre el descenso en las poblaciones de celomocitos de *E. fetida* y *A. chlorotica* expuestas a metales pesados (Cd, Cu y Pb) y la activación de rutas que conducen a la apoptosis, mediada a su vez, por la inducción en la expresión de la proteasa caspasa-3 en los celomocitos (Homa *et al.*, 2007). Muerte celular por apoptosis también ha sido previamente evidenciada en celomocitos de *E. fetida* expuestos *in vitro* a Ni, después de alterada la homeostasis de estas células por desequilibrios en los niveles intracelulares de iones electrolitos (Reinecke y Reinecke, 2004).

Coincidente con los resultados de este estudio, Homa *et al.* (2003) encontró en *E. fetida* y *A. chlorotica* expuestas a metales pesados, un descenso en la abundancia de celomocitos, relacionada la inmunosupresión con un descenso en la biomasa corporal y sobrevivencia del organismo. Homa *et al.* (2005) demostró que la exposición de *Dendrobaena veneta* por tres días a Cu y Cd produjo un descenso significatativo específicamente en los eleocitos; una subpoblación de celomocitos

inmunoactivos en lombrices, mientras que los amebocitos no fueron afectados por ambos metales. El autor señala que los amebocitos, encargados de la captura y transporte de Cd entre los distintos compartimientos tisulares en esta especie, se protegen de la toxicidad de este metal porque poseen el potencial bioquímico para activar la expresión de metalotioninas específicas, mientras que la química estructural de los eleocitos es afectada severamente por Cd y otros metales pesados porque carecen de este mecanismo de protección.

En otros estudios, se ha asociado la toxicidad del Cd con su elevada actividad mutagénica (Filipic y Hei, 2004), interfiriendo el metal con los mecanismos de reparación del ADN, mas que provocando daño directo a la estructura de la molécula (Waisbert *et al.*, 2003). Recientemente, Li *et al.* (2008), usando ensayo cometa, demostró que el Cd causó daños al ADN de celomocitos de *E. fetida*, evidencia de que este metal tiene un alto potencial genotóxico en lombrices.

La fagocitosis de agentes extraños por celomocitos es un mecanismo de defensa celular esencial en lombrices de tierra (Cooper, 2002), la inhibición de este proceso como consecuencia de la acción tóxica de contaminantes químicos puede deteriorar la inmunocompetencia de estos organismos. Las dos concentraciones de Cd usadas en este estudio afectaron perjudicialmente, durante los dos periodos de exposición (Fig. 3), la actividad fagocítica de los celomocitos de *Eisenia* spp., corroborando este resultado, junto con el descenso observado en el número total de estas células, que el componente celular del sistema inmune es el principal blanco sobre el cual el metal ejerce su acción perjudicial.

En el contexto anterior, es conocido que el proceso fagocítico depende, en gran parte, de la integridad estructural de la membrana plasmática de los celomocitos (Homa *et al.*, 2007), de tal manera que cualquier perturbación en esta estructura celular puede afectar dicho proceso. El descenso en la fagocitosis de los celomocitos

de *Eisenia* spp. por el tratamiento con Cd, probablemente se explique porque éste provoca alteraciones en la conformación de la estructura celular al interactuar con proteínas de membrana, interfiriendo así con su función, o porque afecta los mecanismos bioquímicos involucrados en la producción y secreción de factores humorales previos a la fagocitosis (Chen *et al.*, 1991).

Coincidente con los resultados de esta investigación, trabajos previos en lombrices han revelado que Cd, Hg y Zn provocaron descensos en la actividad fagocítica de los celomocitos de *L. terrestris* (Fugere *et al.*, 1996) y el Cu disminuyó la fagocitosis en *A. hawayanus* (Nusetti *et al.*, 1999). Sauvé *et al.* (2002) demostró el potencial inmunotóxico de Pb, Hg, Cu, Zn, Ag y Cd sobre el potencial fagocítico de celomocitos en *Aporrectodea turgida*, *E. fetida* y *L. terrestris*. Similarmente, se ha demostrado que contaminantes químicos de naturaleza orgánica también ejercen un efecto inmunosupresor de respuestas inmunes mediadas por células (Rodríguez-Grau *et al.*, 1989; Ville *et al.*, 1997; Dhainaut y Scaps, 2001).

En contraste al efecto del Cd sobre la fagocitosis en *Eisenia* spp., la actividad fagocítica de los celomocitos de *E. andrei* fue estimulada con el tratamiento experimental con Hg orgánico (Sauvé y Fournier, 2005), lo cual parece ser una respuesta (efecto hormético) frecuente al estrés por contaminantes a muy bajas dosis. Sin embargo, la estimulación de funciones inmunes después de la exposición a bajas concentraciones de los químicos, a menudo cambia hacia la supresión cuando las concentraciones son altas y los periodos de exposición prolongados (Cedergreen, 2008). Efecto hormético sobre el crecimiento, inducido por Cd (0,11 µmoles/g) fue previamente observado en *Lumbricus rubellus*, el cual produjo manifestaciones tóxicas graduales a concentraciones superiores a 1,5 µmoles/g (Spurgeon *et al.*, 2004).

Durante el tratamiento agudo de *Eisenia* spp. con Cd, a pesar de que el análisis estadístico no reveló efectos significativos, en las lombrices expuestas se observó un descenso del 38% en la actividad de lisozima (Fig. 4), lo cual refleja una alteración en la homeostasis de la inmunidad humoral innata del organismo que podría tener efectos letales para la especie. La presencia en el fluido celómico de niveles basales de lisozima, inducibles después de la sensibilización bacterial en las lombrices *E. fetida andrei*, *A. hawayanus*, *L. terrestris*, *A. calliginosa*, *Dendrodilus rubellus* y *E. fetida* (Lasalle *et al.*, 1988; Hirigoyenberry *et al.*, 1990; Kauschke *et al.*, 2007), y en el poliqueto *E. complanata* (Marcano *et al.*, 1997), evidencia que en anélidos esta enzima, al igual que otros factores proteicos (aglutininas, lisinas y proteasas), representan una de las primeras líneas de protección humoral frente a la invasión de bacterias del ambiente y control de su propia flora simbiótica natural.

La inmunosupresión de lisozima por Cd en *Eisenia* spp. durante la exposición aguda podría estar relacionado con el descenso en el recuento total de celomocitos; compartimiento donde se lleva a cabo la síntesis de esta proteína, o puede ser el resultado de la interacción directa del metal con grupos funcionales de la enzima, luego de su liberación a la cavidad celómica (Goven *et al.*, 1994). Los iones metálicos, incluyendo Cu^{2+} y Cd^{2+} tienen una alta afinidad por proteínas citosólicas y estructurales, conduciendo a reacciones que catalizan la ruptura de puentes de hidrógenos, enlaces peptídicos y disulfuros que, en el caso de enzimas, atenúan su actividad o las inactivan totalmente (Jolles y Jolles, 1984).

En concordancia con los resultados de este trabajo, en *L. terrestris* y *A. hawayanus* se observó un descenso en la actividad de lisozima después de ser expuestas a Cu por 5 y 2 días, respectivamente (Goven *et al.*, 1994; Nusetti *et al.*, 1999). La bioacumulación de Cd y otros metales en *D. veneta*, *E. fetida* y *A. chlorotica* alteró la composición homeostática de celomocitos inmunocompetentes,

afectando la síntesis y secreción de factores humorales antibacteriolíticos (Homa *et al.*, 2007; Kauschke *et al.*, 2007).

Coincidente con la inhibición de las respuestas inmunes observadas durante la exposición aguda de *Eisenia* spp. al Cd, se registraron incrementos en los niveles de MDA en el tejido corporal (Fig. 5), resultado que es indicativo de la formación de productos de la descomposición de ácidos grasos (lipoperoxidación); un mecanismo de daño celular ampliamente utilizado como indicador de estrés oxidativo en células y tejidos (Botsoglou, 1994). Esta condición de patología oxidativa desarrollada durante la fase de exposición aguda al metal, probablemente sea la causa de la perturbación observada en el sistema de defensa inmunológico, relacionado a su vez, con una atenuación del potencial de defensa antioxidante del organismo.

En el contexto anterior, es conocido que en la mayoría de las células aeróbicas el tripeptido glutatión y enzimas dependientes de éste como cofactor constituyen la primera línea de defensa frente a la citotoxicidad mediada por EROs, protegiendo a las células contra el estrés oxidativo (Storey, 1998). Debido a su alta afinidad de unión por grupos funcionales de biomoléculas y capacidad de reacción con grupos tioles (-SH), numerosos estudios han señalado que los metales pesados actúan directa o indirectamente como catalizadores de reacciones oxidativas de macromoléculas biológicas, asociándose su toxicidad a daños oxidativos tisulares, relacionados con un descenso del potencial antioxidante celular (Canesi *et al.*, 1997; Geracitano *et al.*, 2002).

La idea de que en *Eisenia* spp. la inmunosupresión por Cd, coincidente con elevados niveles de MDA en la fase aguda podría ser consecuencia de una deficiencia en el estatus antioxidante del organismo, está sustentada en observaciones previas en esta especie hechas por Marcano (2006), quien demostró que las mismas concentraciones de Cd usadas en este estudio produjeron aumentos en MDA,

asociados sólo con un aumento en la actividad de la enzima glutatona peroxidasa (GPx), mientras que la glutatona-S-transferasa (GST) y niveles de glutatión reducido (GSH) no variaron. Estos datos permitieron inferir que el daño oxidativo inducido por Cd, posiblemente sea debido a una sobreproducción de H₂O₂ y el aumento de GPx no fue suficiente para controlar el efecto perjudicial, demandando la participación de otras defensas antioxidantes.

En contraste a lo sucedido en el periodo agudo, la exposición crónica al Cd produjo un incremento en la actividad de lisozima de *Eisenia* spp. (Fig. 4), lo cual probablemente esté relacionado con la presencia de un mecanismo de compensación molecular que se estimula durante la exposición prolongada al metal que, le proporciona al organismo protección y resistencia a la invasión bacteriana cuando la fagocitosis se encuentra inhibida. Este patrón de respuesta inmunológico, observado en diferentes anélidos expuestos a contaminantes orgánicos e inorgánicos (Marcano *et al.*, 1997; Ville *et al.*, 1997) podría ser de gran importancia en la modulación de las respuestas de defensa del organismo, facilitando así su supervivencia en condiciones adversas promovidas por agentes químicos estresantes.

La exposición crónica de *L. terrestris* a aroclor 1254 produjo inhibición de respuestas celulares, sin embargo no se inhibió la actividad antibacteriana humoral del fluido celómico (Roch y Cooper, 1991). Ville *et al.* (1995) demostraron que la exposición a bifenilos policlorados (PCBs) produjo aumentos en la actividad de proteínas antibacteriales en el fluido celómico de *E. fetida andrei* y un descenso en la fagocitosis. La exposición a Cu inhibió el potencial fagocítico de celomocitos de *A. hawayanus* cuando lisozima se encontraba aumentada (Nuseti *et al.*, 1999). Un patrón de respuesta similar también se observó en el pez *Oncorhynchus mykiss*, después de ser expuesto por 5 semanas a distintas concentraciones de Hg, Cd y Zn; la actividad lisozima mostró un incremento significativo, mientras que la fagocitosis y otras respuestas celulares fueron inhibidas (Sánchez-Dordón *et al.*, 1996).

En general, los resultados de esta investigación permiten inferir que durante la exposición aguda de *Eisenia* spp. al Cd se desarrolla una condición de patología oxidativa, reflejado por el aumento en MDA que se asocia con inmundeficiencia en el organismo; principalmente del componente celular-mediado y, en menor grado, del componente humoral. Durante la exposición más prolongada (21 días) al metal, al parecer el organismo realiza los ajustes bioquímicos pertinente que le permitieron controlar el estrés oxidativo, favoreciendo así la recuperación parcial de la inmunocompetencia, tal como lo evidencia el incremento en el marcador humoral (lisozima) evaluado.

CONCLUSIONES

Los efectos del Cd sobre los marcadores citológicos, inmunológicos y bioquímicos evaluados en *Eisenia* spp. dependieron más del tiempo de exposición que de las concentraciones del metal.

Durante la exposición por 7 días al metal se desarrolla una condición de daño oxidativo en el tejido corporal de *Eisenia* spp., que se asoció con inmunosupresión en la abundancia total de celomocitos y su actividad fagocítica.

El tratamiento de *Eisenia* spp. con Cd por 21 días provocó un restablecimiento de las concentraciones basales de MDA que coincidió con un incremento en la actividad de lisozima del fluido celómico, cuando la fagocitosis permanece inhibida.

Las diferentes respuestas evaluadas en este estudio fueron sensibles al metal, reflejando su utilidad en el diagnóstico temprano de posibles riesgos de contaminación terrestre por metales pesados.

BIBLIOGRAFÍA

- Albro, P.; Corbett, J. y Schroeder, J. 1993. Endogeneous lipids of the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Biochem. Cell. Biol.*, 71 : 220-221.
- Alvarez-Legorreta, T.; Mendoza-Cozati, D.; Moreno-Sanchez, R. y Gold-Bouchot, G. 2008. Thiol peptides induction in the seagrass *Thalassia testudinum* (Banks ex Köning) in response to cadmium exposure. *Aquatic. Toxicol.* 86 (1) : 12-19.
- Arlan-Aydoğdu, E. y Çotuk, A. 2008. Antibacterial and hemolytic activity of the coelomic fluid of *Dendrobaena veneta* (Oligochaeta, Lumbricidae) living in different localities. *J. Biol.* 67 (1) : 23-32.
- Bindoli, A. 1988. Lipid peroxidation in mitochondria. *Free. Rad. Biol. Med.*, 5 : 247-261.
- Booth, L. y O'Halloran, K. 2001. A comparison of biomarker responses in the earthworm *Aporrectodea caliginosa*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20 : 2494-2502.
- Botsoglou, N. A. 1994. Rapid, sensitive, and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food and feed stuff samples. *J. Agric. Food. Chem.*, 42 : 1931-1937.
- Canesi, L. y Viarengo, A. 1997. Age related differences in glutathione metabolism in mussel tissues. *Comp. Biochem. Physiol.*, 116 : 217-221.
- Cedergreen, N. 2008. Is the growth stimulation by low doses of glyphosate sustained overtime?. *Environ. Pollut.*, 156 : 1099-1104.

- Cikutovic, M.; Fitzpatrick, L.; Goven, A.; Venables, B.; Giggelman, M. y Cooper, E. 1999. Wound healing in earthworms *Lumbricus terrestris*: a cellular-based biomarker for assessing sublethal chemicals toxicity. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 62 : 508-514.
- Cooper, E. 2002. Introduction to the earthworm immune system. En: *A new model for analysing antimicrobial peptides with biomedical applications*. Cooper, E.; Beschin, A. y Bilej, M. (eds). IOS Press, Amsterdam, pp 3-26.
- Cooper, E. y Roch, P. 2003. Earthworm immunity: A model of immune competence. *Pedobiología*, 47 : 676-688.
- Chen, S.; Fitzpatrick, L.; Goven, A. Venables, B. y Cooper, E. 1991. Nitroblue tetrazolium dye reduction by earthworm (*Lumbricus terrestris*) coelomocytes; An enzyme assay for nonspecific immunotoxicity of xenobiotics. *Environ. Toxicol. Chem.*, 10 : 1037-1043.
- Dhainaut, A y Scaps, S. 2001. Immune defense and biological responses induced by toxics in annelida. *Can. J. Zool*, 79 (2) : 233-253.
- Domínguez, J.; Velando, A. y Ferreiro, A. 2005. Are *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) and *Eisenia andrei* Bouché, 1972 (Oligochaeta: Lumbricidae) different biological species?. *Pedobiología*, 49 : 81-87.
- Ercal, N.; Gurer-Orhan, H. y Aykin-Burns, N. 2001. Toxic metals and oxidative stress: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curro. Top. Med. Chem.*, 1 (6) : 529-539.

- Eyambe, G.; Goven, A.; Fitzpatrick, L.; Venables, B. y Cooper, E. 1991. A non invasive technique for sequential collection of earthworm (*Lumbricus terrestris*) leukocytes during subchronic immunotoxicity studies. *Lab. Anim.*, 25 : 61-67.
- Fournier, M.; Cyr, D.; Blakley, B.; Boermans, H. y Brousseau, P. 2000. Phagocytosis as a biomarker of immunotoxicity in wildlife species to environmental xenobiotics. *Anim. Zool.*, 40 : 412-420.
- Fugere, N.; Brousseau, P.; Krzystyniak, K. Coderre, D y Fournier, M. 1996. Heavy metal-specific inhibition of phagocytosis and different in vitro sensitivity of heterogeneous coelomocytes from *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta). *Toxicology*, 109 (2-3) : 157-166.
- Filipic, M. y Hei, T. 2004. Mutagenicity of cadmium in mammalian cells; implications of oxidative DNA damage. *Mutat. Res.*, 546 : 81-91.
- Geracitano, L.; Monserrat, J. y Bianchini, A. 2002. Physiological and antioxidante enzyme responses to acute and chronic exposure of *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae) to cooper. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 277 : 145-156.
- Goven, A.; Chen, S.; Fitzpatrick, L. y Venables, B. 1994. Lysozyme activity in earthworm (*Lumbricus terrestris*) coelomic fluid and coelomocytes: Enzyme assay for immunotoxicity of xenobiotics. *Environ. Toxicol. Physiol.*, 13 : 607-613.
- Goven, A.; Eyambe, G.; Fitzpatrick, L.; Venables, B. y Cooper, E. 1993. Cellular biomarker for measuring toxicity of xenobiotics: effects of polychlorinated

- biphenyls on earthworm *Lumbricus terrestris* coelomocytes. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12 : 863-870.
- Hirigoyemberry, F.; Lasalle, F. y Lassagues, M. 1990. Antibacterial transcription and regulation of lysozyme and proteins evidenced after bacterial infestation. *Comp. Biochem. Physiol.*, 95 (B) : 25-28.
- Hamman, A; Momo, F.; Duhour, A; Falco, L.; Sagario, M. y Cuadrado, M. 2003. Effects of UV radiation on *Eisenia fetida* populations. *Pedobiología*, 47 : 842-845.
- Homa, J; Olchawa, E.; Stürzenbaum, S.; Morgan, J. y Plytycz, B. 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.; Stürzenbaum, S.; Morgan, A. y Plytycz, B. 2007. Disrupted homeostasis in coelomocytes of *Eisenia fetida* and *Allobophora chlorotica* exposed dermally to heavy metals. *Europ. J. Soil Biol.*, 43 : 5273-5280.
- Homa, J.; Niklinska, M. y Plytycz, B. 2003. Effects of heavy metals on coelomocytes of the earthworm *Allobophora Chlorotica*. *Pedobiología*, 47 : 640-645.
- Hernandez, J. 2006. Metalotioneínas y peroxidación lipídica en la lombriz de tierra *Eisenia foetida* (Savigny, 1826). Trabajo de Pregrado. Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.
- Jolles, P. y Jolles, P. 1984. What's new in lysozyme research?. *J. Mol. Cell. Biochem.*, 63 : 165-189.

- Komiyama, K.; Okave, M.; Miki, Y.; Ohkubo, M.; Moro, I. y Cooper, E. 2004. Non-specific cellular function of *Eisenia fetida* regulated by polycyclic aromatic hydrocarbons., *47* (5-6) : 717-723.
- Kauschke, E.; Mohring, W. y Cooper, E. 2007. Coelomic fluid proteins as basic components of innate immunity in earthworms. *Eur. J. Soil. Biol.*, *43* : S110-S115.
- Kurek, A. y Plytycz, B. 2003. Annual changes in coelomocytes of four earthworm species. *Pedobiología*, *47* : 689-701.
- Lange, S.; Kauschke, E.; Mohring, W. y Cooper, E. 1999. Biochemical characteristics of Eiseniapore, a pore forming protein in the coelomic fluid of earthworm. *Europ. J. Biochem.*, *262* : 547-556.
- Lassalle, F.; Lasegues, M. y Roch, P. 1988. Protein analyses of earthworm coelomic fluid-IV. Evidence, activity induction and purification of *Eisenia fetida andrei* lysozyme (Annelidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, *91* (B) : 187-192.
- Li, M.; Liu, Z.; Xu, Y.; Li, D. y Kong, Z. Comparative effects of Cd and Pb on biochemical responses and DNA damage in the earthworm *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta): 10.1016/j.Chemosphere.2008.10.048.
- Lukkari, T. 2004. Earthworm responses to metal contamination: Tools for soil quality assessment En: *Jyväskylä studies in biological and environmental science* 146. J. Särkkä (ed). Jyväskylä University Printing House, Finland, pp. 1-64.

- Marcano, L.; Nusetti, O.; Rodríguez-Grau, J.; Briceño, J. y Vilas, J. 1997. Coelomic fluid lysozyme activity induction in the polichaete *Eurythoe complanata* as a biomarker of heavy metal toxicity. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 59 : 22-28.
- Marcano, E. 2006. Efectos del cadmio sobre los niveles de glutatión reducido (GSH) y actividades de enzimas antioxidantes en relación con la peroxidación de lípidos en la lombriz de tierra *Eisenia fetida* (Annelida: Oligochaeta). Trabajo de Pregrado. Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.
- Mendoza-Cozati, D. y Moreno-Sanchez, G. 2006. Control of glutathione and phytochelatin synthesis under cadmium stress. Pathway modelling for plants. *J. Theor. Biol.*, 238 : 919-936
- Nusetti, O.; Parejo, E.; Esclapés, M.; Rodríguez-Grau, J. y Marcano, L. 1999. Acute-sublethal copper effects on phagocytosis and lysozyme activity in the earthworm *Amyntas hawayanus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 63 : 350-356.
- Olchawa, E.; Bzowka, M.; Stürzenbaum, S.; Morgan, A. y Plytycz, B. 2006. Heavy metals affect the coelomocyte-bacteria balance in earthworm: Environmental interactions between abiotic and biotic stressors. *Environ. Pollut.*, 142 : 373-381.
- Perez-Losada, M.; Eiroa, J.; Mato, S. y Domínguez, J. 2005. Phylogenetic species delimitation of the earthworms *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) and *Eisenia*

- andrei* Bouche, 1972 (Oligochaeta, Lumbricidae) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Pedobiología*, 49 : 317-324.
- Reinecke, S. y Reinecke, A. 2004. The comet assay as biomaker of heavy metal genotoxicity in earthworms. *Environ. Contam. Toxicol.*, 46 : 208-215.
- Roch, P. y Cooper, E. 1991. cellular but not humoral antibacterial activity of earthworms is inhibited by aroclor 1254. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 22 : 283-290.
- Rodríguez-Grau, J.; Venables, B.; Fitzpatrick, L.; Goven, A. y Cooper, E. 1989. Suppression of secretory rosette formation by PCBs in *Lumbricus terrestris*: An earthworm assay for humoral immunotoxicity of xenobiotics. *Environ. Toxicol. Chem.*, 8 : 1201-1207.
- Romero, D.; Hernández-García, A.; Tagliati, C.A.; Martínez-López, E. y García-Fernández, A.J. 2009. Cadmium and lead-induced apoptosis in mallard erythrocytes (*Anas platyrhynchos*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 72 : 3-44.
- Saint-Denis, M.; Narbonne, J.; Arnaud, C.; Thybaud, E. y Ribera, D. 2001. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil: effects of carbaryl. *Soil. Biol. Biochem.*, 32 : 1123-1130.
- Saint-Denis, M.; Narbonne, J.; Arnaud, C.; Thybaud, E. y Ribera, D. 1999. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil: effects of benzo(a)pyrene. *Soil. Biol. Biochem.*, 31 : 1837-1846.

- Sauvé, S. y Fournier, M. 2005. Age-specific immunocompetence of the earthworm *Eisenia andrei*: exposure to methylmercury chloride. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 60 (1) : 67-72.
- Sauvé, S.; Hendawi, P. y Fournier, M. 2002. Phagocytic responses of terrestrial and aquatic invertebrates following *in vitro* exposure to trace elements. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 57 : 21-29.
- Sanchez-Dordón, J.; Voccia, I.; Hontela, A.; Anderson, P. y Fournier, M. 1996. In vitro exposure of rainbow trout to Cadmium (Cd), Zinc (Zn) and Mercury (Hg) chlorides. Society of Environ Toxicol and Chem (SETAC). 17th Annual Meeting Washington, D. C., pp.8.
- Spurgeon, D.; Svendsen, C.; Kille, P. Morgan, A. y Weeks, J. 2004. Response of earthworms (*Lumbricus rubellus*) to copper and cadmium as determined by measurement of juvenile traits in a specifically designed test system. *Ecotox. Environ. Saf.*, 57 : 54-64.
- Stürzenbaum, S.; Georgiev, O.; Morgan, J. y Kille, P. 2004. Cadmium detoxification in earthworms: from genes to cells. *Environ. Sc. Technol.*, 38 : 6283-6289.
- Stürzenbaum, S.; Winters, C.; Galay, M.; Morgan, A. y Kille, P. 2001. Metal ion trafficking in earthworms. *J. Biol. Chem.*, 276 : 34013-34018.
- Torres, M.; Testa, C.; Gaspari, C.; Masutti, M.; Curi-Pedrosa, R.; Alves, E.; Di Mascio, P. y Wilhelm, D. 2002. Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. *Mar. Pollut. Bull.*, 44 : 923-932.

Ville, P.; Roch, P.; Cooper, E.; Masson, P. y Narbonne, J. 1995. PCBs increase molecular-related activities (lysozyme, antibacterial, hemolysis, proteases) but inhibit macrophage-related functions (phagocytosis, wound healing) in earthworm. *J. Invertebr. Pathol.*, 65 : 217-224.

Ville, P.; Roch, P. y Cooper, E. 1997. Immuno-modulator effects of carbaryl and 2, 4 diclorophenoxyiacetic acid in the earthworm *Eisenia fetida andrei*. *Environ. Comp. Toxicol.*, 32 : 291-297.

Waisberg, M.; Joseph, P.; Hale, B. y Beyersmann, D. 2003. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology*, 192 : 95-111.

APÉNDICES

Apéndice 1. Análisis de varianza del número total de células en el fluido celómico de *Eisenia* spp. controles (0) y expuestas a 2,6 y 10,4 mg de Cd/kg de sustrato durante 7 y 21 días. Sc: sumas cuadráticas, GL: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

Fuente de variación	Sc	Gl	Mc	Fs	P
Efectos principales					
Dosis	787032,0	2	393516,0	3,84	0,0295
Tiempo	415338,0	1	415338,0	4,05	0,0437
Interacción					
A - B	225957,0	2	112979,0	1,10	0,3419
Residuo	4,30935	42	102603,0		
<hr/>					
Total (corregido)	573767	47			

Apéndice 2. Análisis de varianza del % viabilidad celular en el fluido celómico de *Eisenia* spp. controles (0) y expuestas a 2,6 y 10,4 mg de Cd/kg de sustrato durante 7 y 21 días. Sc: sumas cuadráticas, GL: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

Fuente de variación	Sc	Gl	Mc	Fs	P
Efectos principales					
Dosis	55,125	2	27,5625	0,26	0,7694
Tiempo	55,5208	1	58,5208	0,56	0,4584

Interacciones					
A- B	72,0417	2	36,02085	0,34	0,7103
Residuos	4387,63	42	104,467		
Total (corregido)	4573,31	47			

Apéndice 3. Análisis de varianza del % de fagocitosis de celomocitos del fluido celómico de *Eisenia* spp. controles (0) y expuestas a 2,6 y 10,4 mg de Cd/kg de sustrato durante 7 y 21 días. Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

Fuente de variación	Sc	Gl	Mc	Fs	P
Efectos principales					
Dosis	29804,7	2	14902,3	208,27	0,0000
Tiempo	341,333	1	341,333	4,77	0,0346
Interacciones					
A-B	220,667	2	110,333	1,54	0,2258
Residuo	3005,25	42	71,5536		
Total (corregido)	33371,9	47			

Apéndice 4. Análisis de varianza de la actividad lisozima ($\mu\text{g/ml}$ de HEL) en el fluido celómico de *Eisenia* spp. controles (0) y expuestas a 2,6 y 10,4 mg de Cd/kg de sustrato durante 7 y 21 días. Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

Fuente de variación	Sc	Gl	Mc	Fs	P
Efectos principales					
Dosis	0,0381402	2	0,0190701	0,09	0,9141
Tiempo	3,46967	1	3,46967	16,38	0,0002
Interacciones					
A - B	1,72157	2	0,860784		
Residuos	8,0588	38	0,211865		
<hr/>					
Total (corregido)	13,4102	43			

Apéndice 5. Análisis de varianza de la concentración de MDA (nmoles/g.t.h) en el tejido corporal de *Eisenia* spp controles (0) y expuestas a 2,6 y 10,4 mg de Cd/kg de sustrato durante 7 y 21 días. Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

Fuente de variación	Sc	Gl	Mc	Fs	P
Efectos principales					
Dosis	13,073	2	6,536	10,02	0,0000
Tiempo	3,080	1	3,080	21,24	0,0000
Interacción					
A-B	9,397	2	4,698	15,28	0,0000
Residuos	12,914	42	0,307		
<hr/>					
Total (corregido)	38,462	47			

Apéndice 6. Contraste múltiple de rangos del número total de células en el fluido celómico de *Eisenia* spp. controles (0) y expuestas a 2,6 y 10,4 mg de Cd/kg de sustrato durante 7 y 21 días. R: recuento, X: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Concentración	R	X	DE	GH
Control	16	1095,0	80,0795	
2,6	16	807,188	80,0795	
10,4	16	843,126	80,0795	

Apéndice 7. Contraste múltiple de rangos del % viabilidad celular en el fluido celómico de *Eisenia* spp. controles (0) y expuestas a 2,6 y 10,4 mg de Cd/kg de sustrato durante 7 y 21 días según concentraciones. R: recuento, X: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Concentraciones	R	X	DE	GH
Control	16	69,5	2,5523	
2,6	16	72,125	2,5523	
10,4	16	70,8125	2,5523	

Apéndice 8. Contraste múltiple de rangos del % de fagocitosis de los celomocitos del fluido celómico de *Eisenia* spp controles (0) y expuestas a 2,6 y 10,4 mg de Cd/kg de sustrato durante 7 y 21 días según concentraciones. R: recuento, X: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Concentraciones	R	X	DE	GH
Control	16	23,375	2,11473	
2,6	16	79,875	2,11473	
10,4	16	31,625	2,11473	

Apéndice 9. Contraste múltiple de rangos de la actividad lisozima ($\mu\text{g/ml}$ de HEL) en el fluido celómico de *Eisenia* spp. controles (0) y expuestas a 2,6 y 10,4 mg de Cd/kg de sustrato durante 7 y 21 días según concentraciones. R: recuento, X: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Concentración	R	X	DE	GH
Control	14	0,863482	0,120317	
2,6	15	0,9328	0,119111	
10,4	15	0,910054	0,119111	

Apéndice 10. Contraste múltiple de rangos para la concentración de MDA (nmoles /g.t.h) en el tejido corporal de *Eisenia* spp. controles (0) y expuestas a 2,6 y 10,4 mg de Cd/kg de sustrato durante 7 y 21. R: recuento, X: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Concentración	R	X	DE	GH
Control	16	2,460	0,527	
2,6	16	2,827	0,405	
10,4	16	3,704	1,119	

Apéndice 11. Contraste múltiple de rangos del número total de células en el fluido celómico de *Eisenia* spp. controles (0) y expuestas a 2,6 y 10,4 mg de Cd/kg de sustrato durante 7 y 21 días. R: recuento, X: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Nivel	R	X	DE	GH
7	24	822,083	65,3846	
21	24	1008,13	65,3846	

Apéndice 12. Contraste múltiple de rangos del % viabilidad celular en el fluido celómico de *Eisenia* spp. controles (0) y expuestas a 2,6 y 10,4 mg de Cd/kg de sustrato durante 7 y 21 días según días de exposición. R: recuento, X: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Nivel	R	X	DE	GH
7	24	69,7083	2,08634	
21	24	71,9167	2,08634	

Apéndice 13. Contraste múltiple de rangos del % de fagocitosis de los celomocitos del fluido celómico de *Eisenia* spp controles (0) y expuestas a 2,6 y 10,4 mg de Cd/kg de sustrato durante 7 y 21 días según días de exposición. R: recuento, X: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Nivel	R	X	DE	GH
7	24	42,2917	1,72667	
21	24	47,625	1,72667	

Apéndice 14. Contraste múltiple de rangos para la actividad lisozima (flg/ml de HEL) en el fluido celómico de *Eisenia* spp controles (0) y expuestas a 2,6 y 10,4 mg de Cd/kg de sustrato durante 7 y 21 días según días de exposición. R: recuento, X: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Nivel	R	X	DE	GH
7	23	0,621569	0,096167	
21	21	1,8331	0,100443	

Apéndice 15. Contraste múltiple de rangos para la concentración de malondialdehído (nmoles de MDA/g.t.h) en el tejido corporal de *Eisenia* spp a dosis subletales de Cd durante 7 y 21 días. R: recuento, X: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Nivel	R	X	DE	GH
7	24	3,250	1,103	
21	24	2,744	0,567	

Apéndice 16. Contraste múltiple de rangos para la concentración de malondialdehído (nmoles de MDA/g.t.h) en el tejido corporal de *Eisenia* spp controles (0) y expuestas a 2,6 y 10,4 mg de Cd/kg de sustrato durante 7 y 21 días. R: recuento, X: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

Método (dosis)	R	X	DE	GH
Control-7 días	8	2,176	0,279	
2,6 -21 días	8	2,583	0,315	
Control-21 días	8	2,743	0,577	
10,4 -21 días	8	2,904	0,752	
2,6 -7 días	8	3,071	0,342	
10,4 -21 días	8	4,501	0,808	

Hoja de Metadatos

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/5

Título	Respuestas inmunológicas y peroxidación de lípidos en la lombriz de tierra <i>Eisenia</i> spp. (ANNELIDA: OLIGOCHAETA) expuesta a cadmio.
---------------	--

Autor

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Jiménez López Zoila Gabriela	CVLAC	14.816.570
	e-mail	zoilajp79@hotmail.com

Palabras o frases claves:

Lombriz de tierra, <i>Eisenia</i> spp, Inmunotoxicidad, cadmio, peroxidación de Lípidos.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/5

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Biología

Resumen (abstract):

Se evaluaron los efectos agudos (7 días) y crónicos (21 días) de 2,6 y 10,4 mg Cd/kg de sustrato sobre la fagocitosis de celomocitos y actividad de lisozima del fluido celómico, así como las concentraciones de malondialdehído (MDA) en el tejido corporal de *Eisenia* spp. Los bioensayos de exposición al metal fueron conducidos en el laboratorio, colocándose cada lombriz por separado en recipientes plásticos contentivos de un sustrato orgánico preparado con estiércol de vaca y compost vegetal, mezclado con la solución del metal. Las respuestas inmunológicas fueron evaluadas en el fluido celómico y el contenido de MDA en el tejido corporal de la lombriz. Los inmunoensayos revelaron la existencia de celomocitos con una viabilidad de $72,13 \pm 12,84\%$ en organismos no expuestos que se mantuvo sin variaciones significativas durante el tratamiento con Cd. Durante la exposición aguda a las dos concentraciones del metal se observó una reducción significativa en el número total de celomocitos y porcentaje de células fagocíticas de aproximadamente 37 y 61%, respectivamente. Asociado a esto se observó un incremento en los niveles de MDA desde $2,18 \pm 0,28$ nmoles MDA/g.t.h en lombrices controles hasta $4,50 \pm 0,81$ nmoles MDA/g.t.h en las expuestas a la concentración más alta. La exposición por 21 días al Cd inhibió en un 71% la fagocitosis de los celomocitos de *Eisenia* spp., mientras que el número total de celomocitos solo mostró un descenso del 12%, aproximadamente con respecto al grupo control. En contraste, en este periodo la actividad de lisozima exhibió un aumento aproximado al 66 % a ambas concentraciones del metal, el cual coincidió con un reestablecimiento de los niveles de MDA hasta valores similares a los del control. El tratamiento con Cd de *Eisenia* spp. durante la fase aguda, probablemente genere una condición de estrés oxidativo; evidenciado por los altos niveles de MDA registrados durante este periodo que afecta principalmente el componente celular del sistema inmune, provocando un descenso en el número total de celomocitos y su potencial fagocítico y, en menor grado al componente humoral, inhibiendo la actividad de lisozima. Luego, durante la exposición mas prolongada al metal (21 días), el organismo posiblemente realiza los ajustes bioquímicos necesarios que le permiten controlar los daños oxidativos, tal como lo indica los bajos niveles de MDA en esta fase, favoreciendo una recuperación parcial de su sistema de defensa inmunológico; específicamente del componente humoral (aumento de lisozima). Esta última respuesta puede representar un mecanismo bioquímico de compensación importante para la especie que, le provee protección inmune frente a la invasión bacteriana cuando las funciones celular-mediadas (como fagocitosis) se encuentran inhibidas. Se concluye que las respuestas inmunes evaluadas en *Eisenia* spp. fueron alteradas por la exposición al Cd, constituyéndose en biomarcadores inmunológicos sensibles de uso potencial en estudios sobre la calidad de los suelos en organismos de relevancia ecológica.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/5

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Marcano, Leida	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	8.219.437
	e-mail	Leimar0501@gmail.com
Lemus, Mairín	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	6.429.405
	e-mail	Mlemus88@gmail.com
Salazar, Raquel	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	5.855.836
	e-mail	Raquelugove@yahoo.com

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2009	10	16

Lenguaje: SPA

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/5

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis-JimenezZ.doc	Application/Word

Alcance:

Espacial: Internacional (Opcional)

Temporal: Intemporal (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo: Licenciatura en Biología

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciatura

Área de Estudio:
Biología

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

Universidad de Oriente


Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/5

Derechos:

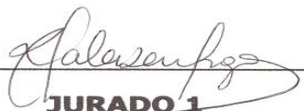
Yo, Zoila Jiménez como autor de la presente tesis autorizo a la Universidad de Oriente para que publique en su totalidad mi tesis con fines educativos, perteneciéndome los derechos comerciales que esta puedan derivar.



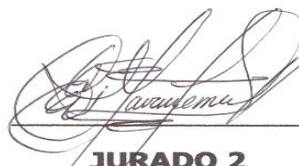
AUTOR
Zoila Jiménez



ASESOR
Profa. Leida Marcano



JURADO 1
Profa. Raquel Salazar



JURADO 2
Profa. Mairin Lemus

POR LA SUB-COMISIÓN DE TESIS

