



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

**Evaluación de la toxicidad del cadmio y del plomo  
en la lombriz *Amyntas gracilis*.**

## TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR (A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**(BIOLOGÍA)**

P R E S E N T A

M. EN C. BIRMANIA HEREDIA RIVERA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. MARTÍN GERARDO RODRÍGUEZ.

Depto. de Fisiología y Farmacología.

Universidad Autónoma de Aguascalientes.

COMITÉ TUTOR: DRA. CHRISTINA DESIREE SIEBE GRABACH

Depto. de Edafología. Instituto de Geología.

UNAM.

DRA. ISABELLE BAROIS BOULLARD. Depto. de

Suelos. Instituto de Ecología. Jalapa, Ver.

DRA. MARÍA ESTELA MELÉNDEZ CAMARGO.

Depto. de Farmacia. Escuela Nacional de

Ciencias Biológicas. IPN.

MÉXICO, D. F.

MAYO, 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

OFICIO FCIE/DEP/165/13

ASUNTO: QUINTO TRANSITORIO

**DR. ISIDRO AVILA MARTÍNEZ**  
**DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR**  
**Presente**

**At n: Dr. Manuel Enrique Vázquez Valdés**

Por este conducto comunico a usted que en referencia al acuerdo emitido por el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, el **29 de septiembre del 2006**, aprobó que la integración del jurado se realizará a solicitud de (a) alumno(a) **BIRMANIA HEREDIA RIVERA** con número de cuenta **90811724** y número de expediente **102861** del(a) **Doctorado en Ciencias (Biología)**, obtenga el grado con cinco sinodales en apego a la nueva normatividad, acogiéndose al artículo **QUINTO TRANSITORIO**, apegándose a lo establecido en el artículo 31 del Reglamento General de Estudios de Posgrado vigente.

Comunico a usted lo anterior para los fines a que haya lugar y aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente  
"POR MI ARAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D. F., a 12 de abril de 2013  
**LA COORDINADORA DEL PROGRAMA**

*M. del Coro Arizmendi*

**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**

MCAA/ASR/mmm





POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/164/13

ASUNTO: Asignación de Jurado

**DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ**  
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
P R E S E N T E

At'n: DR. MANUEL ENRIQUE VÁZQUEZ VALDÉS

Comunico a usted que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas ha asignado al(a) **M. EN C. BIRMANIA HEREDIA RIVERA**, el jurado para presentar Examen de Grado de DOCTOR(A) EN CIENCIAS (BIOLOGÍA).

CARGO	GRADO	NOMBRE COMPLETO
PRESIDENTE	DR.	RAFAEL VILLALOBOS PIETRINI
VOCAL	DR.	MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ
SECRETARIO	DRA.	CHRISTINA DESIREE SIEBE GRABACH
SUPLENTE	DR.	LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
SUPLENTE	DRA.	ISABELLE BAROIS BOULLALD

El trabajo aprobado como tesis es:

**"EVALUACION DE LA TOXICIDAD DEL CADMIO Y DEL PLOMO EN LA LOMBRIZ DE TIERRA  
*Amyntas gracilis*"**

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 12 de abril de 2013  
COORDINADORA DEL PROGRAMA

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA

MCAA/ASR/mnm\*



## AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. Por haberme permitido llegar hasta esta etapa de mi formación personal y profesional.

Al Comité tutor: Dr. Martín Gerardo Rodríguez, Dra. Christina Desiree Siebe Grabach, Dra. Isabelle Barois Boullard y Dra. María Estela Meléndez Camargo por aconsejarme acertadamente en el desarrollo de este trabajo.

Al Comité evaluador: Dr. Rafael Villalobos Pietrini, Dr. Mariano Martínez Vázquez, Dra. Chistina Desiree Siebe Grabach, Dr. Luis Felipe Jiménez García y la Dra. Isabelle Barois Boullard Por su tiempo y apoyo brindado en esta parte final del trabajo.

**Agradezco infinitamente a la Dra. María Elena Calderón Segura por su gran amistad e invaluable apoyo.**

## ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS .....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
RESUMEN.....	xii
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. HIPÓTESIS .....	4
III. OBJETIVOS.....	4
IV. ANTECEDENTES.....	5
4.1 Biología de las lombrices. ....	5
4.2 Ecofisiología de las lombrices.....	8
4.3 Indicadores biológicos y pruebas de toxicidad.....	9
4.4 Cadmio y plomo como contaminantes. ....	11
4.5 Acumulación de metales pesados en la lombriz de tierra.....	13
4.6 Toxicidad de metales pesados en la lombriz de tierra. ....	15
4.7 Comportamiento de las lombrices .....	16
V. METODOLOGÍA.....	18
5.1 Cultivo de las lombrices de tierra <i>A. gracilis</i> y <i>E. fétida</i> .....	18
5.2 Pruebas de toxicidad por contacto del Cd y Pb en las lombrices <i>A. gracilis</i> y <i>E. fétida</i> .....	18
5.3 Pruebas de toxicidad del Cd y Pb por inmersión en las lombrices <i>A. gracilis</i> y <i>E. fétida</i> .....	20
5.4 Evaluación del daño histológico.....	22
5.5 Determinación de los metales pesados cadmio y plomo por EAA.....	23
5.6 Pruebas de toxicidad del Cd y Pb en la contracción muscular .....	24
5.6.1 Preparación de los tejidos buche-molleja y pared muscular de la lombriz .....	24
5.7 Evaluación de la prueba de escape al Cd y el Pb en suelo artificial por <i>A. gracilis</i> y <i>E. fétida</i> .....	25
5.8 Evaluación de la secreción mucosa cutánea inducida por el Cd y el Pb .....	29
5.8.1 Análisis cinemático de la secreción mucosa cutánea. ....	30
5.9 Métodos estadísticos.....	31
VI. RESULTADOS.....	32
6.1 Pruebas de toxicidad por contacto del Cd y Pb en las lombrices <i>A. gracilis</i> y <i>E. fétida</i> .....	32
6.1.1. Signos de toxicidad y CL <sub>50</sub> para el cadmio .....	32

6.1.2 Signos de toxicidad y CL <sub>50</sub> para el plomo .....	34
6.2 Pruebas de toxicidad del Cd y Pb por inmersión en las lombrices <i>A. gracilis</i> y <i>E. fétida</i> .....	37
6.2.1 Toxicidad del cadmio por inmersión. ....	37
6.2.2 Toxicidad del plomo por inmersión.....	37
6.3 Lesiones histopatológicas producidas por los metales Cd y Pb en las lombrices <i>E. fétida</i> .....	40
6.4. Bioacumulación del cadmio y del plomo en los tejidos de las lombrices por contacto.....	44
6.4.1. Bioacumulación de cadmio. ....	44
6.4.2. Bioacumulación del plomo.....	45
6.5. Bioacumulación del cadmio y del plomo en los tejidos de las lombrices por inmersión. ....	47
6.5.1. Curso temporal de la bioacumulación del cadmio. ....	47
6.5.2. Curso temporal de la bioacumulación del plomo por inmersión.....	48
6.6. Efectos del Cd y Pb sobre la contracción muscular de los tejidos de la lombriz de tierra <i>A. gracilis</i> . ....	49
6.6.1 Efecto del Cd y el Pb sobre la contracción muscular del tejido buche-molleja de <i>A. gracilis</i> .....	52
6.6.2 Efecto del Cd y el Pb sobre la contracción muscular del tejido de la pared corporal. ....	56
6.7 Comportamiento evasivo de las lombrices en suelos controles. ....	58
6.7.1 Comportamiento evasivo de las lombrices <i>A. gracilis</i> en suelos contaminados con Cd o Pb. ....	59
6.7.2 Comportamiento evasivo de la lombriz de tierra <i>E. fétida</i> en medios contaminados con cadmio o plomo. ....	61
6.8 Análisis e integración de las pruebas de toxicidad de Cd y del Pb en las lombrices <i>A. gracilis</i> y <i>E. fétida</i> .....	63
6.9 Estudio de la secreción mucosa cutánea por acción de los metales plomo y cadmio en <i>A. gracilis</i> y <i>E. fétida</i> . ....	65
VII. DISCUSION. ....	71
7.1 Signos de toxicidad.....	71
7.2 Estudios de histopatología.....	74
7.3 Efectos del Cd y el Pb sobre la contracción muscular de los tejidos. ....	77
7.4 Pruebas de escape o evasión de las lombrices <i>A. gracilis</i> y <i>E. fétida</i> .....	79
7.5 Secreción mucosa. ....	80
VIII. CONCLUSIONES.....	83

IX. BIBLIOGRAFIA.....	85
X. APÉNDICES .....	99

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Procedimiento seguido para la evaluación de la toxicidad del cadmio y el plomo por pruebas de contacto. ....	21
Figura 2. Procedimiento utilizado para determinar el curso temporal de Bioacumulación de los metales cadmio y plomo por pruebas de inmersión.....	22
Figura 3. Sistema de registro para determinar el efecto de los metales cadmio y plomo en la contracción muscular de las preparaciones buche-molleja y pared muscular .....	26
Figura 4. Cámara de dos espacios diseñada para el estudio de la prueba de escape con la lombriz de tierra <i>A. gracilis</i> en un suelo artificial con plomo y cadmio. ....	29
Figura 5. Cambios morfológicos encontrados en las lombrices expuestas al cadmio y el plomo por contacto. (a) secreción mucosa, (b) inflamación, (c) segmentación y edemas, (d) autotomía, (e) Constricción pronunciada, (f) enrollamiento, (g) sangrado y muerte. ....	34
Figura 6. Microfotografías de cortes longitudinales de lombrices expuestas al cadmio por la prueba de contacto. (a) lombriz control, (b) lombriz expuesta al cadmio con constricción en segmentos VII-XII, (c) lombriz con daño ventral y hemorragia interna. ....	40
Figura 7. Microfotografías del daño estructural causado por los metales cadmio y plomo en las lombrices <i>Eisneia fétida</i> y <i>A. gracilis</i> . (a) estructura normal lombriz control, (b) desprendimiento de la cutícula, (c) desprendimiento de la epidermis y (d) desorganización de la capa muscular.....	41
Figura 8. Microfotografías electrónicas de barrido. (a) lombrices control con prostomio sano, (b) pared muscular lisa sin daño. (c) Prostomio de una lombriz expuesta y (d) pared muscular. En ambos se aprecia la ruptura de la cutícula y constricción segmental. ....	42
Figura 9. Microfotografías electrónicas de barrido con análisis de dispersión de rayo x. (a) secreción mucosa de lombrices estimuladas con cadmio y espectrograma de barrido donde se puede observar el pico de emisión del cadmio y otros metales. (b) muestra de tejido cloragogeno y espectrograma con picos característicos del cadmio. ....	43

Figura 10. Cortes transversales de lombrices contaminadas con cadmio. (a) microfotografía de una sección distal mostrando el intestino, (b) Amplificación donde se indica la presencia del tejido cloragogeno. (c) Microfotografía electrónica de barrido del tejido chloragogeno y (d) Células de epitelio gloragogeno donde se localizo el cadmio. ....	44
Figura 11. Concentraciones de cadmio acumuladas en los tejidos de las lombrices <i>A. gracilis</i> y <i>E. fétida</i> después de su exposición por contacto. Cada punto representa la media $\pm$ la desviación estándar de tres determinaciones. ....	45
Figura 12. Concentraciones de plomo acumuladas en los tejidos de las lombrices <i>A. gracilis</i> y <i>E. fétida</i> después de su exposición por contacto. Cada punto representa la media $\pm$ la desviación estándar de tres determinaciones. ....	46
Figura 13. Curso temporal de captación del Cadmio en el tejido de la lombriz de tierra <i>A. gracilis</i> y <i>E. fétida</i> después de su exposición a diferentes tiempos por inmersión. Cada punto representa la media $\pm$ la desviación estándar de tres determinaciones. ....	48
Figura 14. Curso temporal de captación del Pb en el tejido de la lombriz de tierra <i>A. gracilis</i> y <i>E. fétida</i> después de su exposición a diferentes tiempos por inmersión. Cada punto representa la media $\pm$ desviación estándar de tres determinaciones. ....	50
Figura 15. Contracción muscular espontánea del tejido buche-molleja de <i>A. gracilis</i> , la parte superior es una ampliación de los primeros 3 minutos. ....	51
Figura 16. Efecto de la acetilcolina sobre la contracción muscular del tejido buche-molleja de <i>A. gracilis</i> , el trazo es representativo de al menos 5 registros. ....	52
Figura 17. Efecto del Cd sobre la contracción muscular del tejido buche-molleja. El trazo es representativo de 5 registros. ....	53
Figura 18. Efecto del Cd sobre la contracción muscular del tejido buche-molleja. El trazo es representativo de al menos 5 registros. ....	54
Figura 19. Efecto del Pb sobre la contracción muscular del tejido buche-molleja de la lombriz <i>A. gracilis</i> . Trazo representativo de al menos 5 registros. ....	55
Figura 20. Efecto del Pb sobre la contracción muscular del tejido buche-molleja de la lombriz de tierra <i>A. gracilis</i> . Trazo representativo de al menos 5 registros. ....	55
Figura 21. Trazo ilustrativo de la contracción muscular basal de la pared corporal de la lombriz <i>A. gracilis</i> . ....	56

Figura 22. Efecto del Cd sobre la contracción muscular de la pared corporal de la lombriz de tierra <i>A. gracilis</i> . Trazo representativo de al menos 5 registros. ....	57
Figura 23. Efecto del Cd sobre contracción muscular de la pared corporal de la lombriz de tierra <i>A. gracilis</i> . Trazo representativo de al menos 5 registros. ....	58
Figura 24. Efecto del Pb sobre la contracción muscular de la pared corporal de la lombriz de tierra <i>A. gracilis</i> . Trazo representativo de al menos 5 registros. ....	59
Figura 25. Prueba de evasión de la especie <i>E. fétida</i> en presencia de diferentes concentraciones de cadmio. ....	62
Figura 26. Fotografías que ilustran a las lombrices que se ubicaron en el suelo control (a); lombrices que no evitaron el suelo contaminado con cadmio (b). ....	62
Figura 27. Prueba de evasión de la especie <i>E. fétida</i> en presencia de diferentes concentraciones de plomo. ....	63
Figura 28. Fotografías de la secreción mucosa de las lombrices expuestas a los metales pesados Cadmio y plomo. ....	65
Figura 29. Montaje de una microfotografía de lombriz <i>E. fétida</i> . (a) campo claro y (b) misma toma con epifluorescencia. ....	66
Figura 30. Imágenes de microscopia de campo claro de vesículas secretadas por estímulo químico. (a) Campo claro, (b) fluorescencia y (c) imagen compuesta de a, b. ....	67
Figura 31. Imágenes de microscopia confocal de vesículas secretadas por la estimulación del cadmio. Las flechas blancas indican los gránulos encontrados con autofluorescencia. .	67
Figura 32. Estudio de la elasticidad de vesículas. (a-b) vesículas retenidas por presión negativa con una micropipeta. (c-f), aplicación de presión positiva con rompimiento de la vesícula, (g-h) retiro de la punta y (j-l) aplicación de presión positiva con efectos a otras vesículas. ....	68
Figura 33. Microfotografías electrónicas de barrido. (a) lombriz control, lombrices estimulas con cadmio (b), acercamiento de una región donde se observa la adhesividad del moco (c) y espacios intersegmentos con salida de vesículas. ....	69
Figura 34. Análisis cinemático de la secreción de moco. Sin secreción amarilla (a). Secreción mucosa por la parte lateral (b-d). Desplazamiento por contracción y secreción adyacente (e-h), desplazamiento del moco (i-j). Secreción lateral (m-n). ....	70

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Signos de toxicidad inducidos por el Cd en la lombriz de tierra <i>A. gracilis</i> durante 48 h de exposición. ....	34
Tabla 2. Signos de toxicidad inducidos por el Pb en la lombriz de tierra <i>A. gracilis</i> durante 48 horas de exposición. ....	36
Tabla 3. Curso temporal de exposición de <i>A. gracilis</i> y <i>E. fétida</i> a Cd por inmersión. ..	38
Tabla 4. Curso temporal de exposición de <i>A. gracilis</i> y <i>E. fétida</i> a Pb por inmersión. ....	39
Tabla 5. Distribución en % de las lombrices en un suelo artificial con y sin cadmio (65µg/g), después de un período de dos días. ....	60
Tabla 6. Distribución en % de las lombrices en un suelo artificial con y sin plomo (65µg/g), después de un período de dos días. ....	61
Tabla 7. Resultados finales de las concentraciones del Cd y del Pb en la lombriz <i>A. gracilis</i> .	64

## RESUMEN

Las lombrices de tierra son organismos con un sistema nervioso, digestivo y muscular bien desarrollado, lo que les permite estar bien adaptadas y realizar funciones importantes para el suelo como es el drenaje y el propio recambio del suelo. Al mismo tiempo ayudan a la fertilización del suelo debido a su capacidad de biotransformación de la materia orgánica. Sin embargo, en suelos contaminados con los metales cadmio y plomo, dichas funciones pueden ser interrumpidas y producir la muerte de las lombrices. Al respecto, se conoce que las lombrices constituyen el grupo principal de organismos de la mesofauna del suelo y que al estar en contacto con los metales pesados pueden morir o sobrevivir, dependiendo de sus mecanismos de defensa y procesos adaptativos. Los estudios realizados a la fecha se han dirigido a determinar las concentraciones en los tejidos, y evaluar la toxicidad de los metales en pruebas de crecimiento, reproducción y muerte. Sin embargo, no se había puesto atención en determinar las alteraciones morfo-fisiológicas y los cambios de comportamiento que se presentan durante la intoxicación con estos metales, así como los mecanismos que llevan a la muerte. En este trabajo se planteó como hipótesis de trabajo, que los metales plomo y cadmio inducen alteraciones morfológicas y daños en los tejidos principales de la lombriz de tierra, por una interacción de los metales con la barrera intestinal y de la pared corporal, provocando un daño que puede verse reflejado en el comportamiento de la lombriz en suelos contaminados con los metales plomo y cadmio. La metodología, incluyó pruebas de toxicidad por contacto e inmersión, para determinar la  $CL_{50}$  y los factores de bioacumulación de los metales plomo y cadmio en las especies *Amyntas gracilis* y *Eisenia fetida*, así como pruebas de evasión o escape para caracterizar su comportamiento en suelos contaminados y técnicas de microscopia para evaluar el daño estructural. Se encontraron valores de las  $CL_{50}$  para el cadmio 3.4, 16.6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  y el plomo 19.6 y 36.7  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  en las lombrices *A. gracilis* y *E. fetida*, respectivamente. Los factores de bioacumulación para el cadmio fueron de 14 y 17.8 y para el plomo de 4.8 y 2.6 en las lombrices *A. gracilis* y *E. Fetida*, respectivamente. La

toxicidad fue acompañada de signos progresivos, como fueron movimientos rápidos con deseos de escape, secreción mucosa, enrollamiento, parálisis, constricción segmentaria, edemas en la región preclitellar, sangrado y muerte. Los cambios morfológicos observados se distinguieron por desprendimiento de la cutícula, destrucción de la epidermis y daño en las capas musculares. La evaluación de la contracción muscular en presencia de los metales plomo y cadmio, arrojó un efecto inhibitorio en los tejidos de la pared muscular y la preparación buche molleja. Ambas lombrices evitaron suelos contaminados con el plomo y el cadmio a concentraciones encontradas en suelos contaminados. Estudios de microscopia electrónica revelaron a la secreción mucosa y el tejido cloragógeno como sitios principales de acumulación de los metales pesados. El estudio de la secreción mucosa reveló que la secreción mucosa está constituida por vesículas fluorescentes, que se liberan en respuesta a la estimulación de los metales, su formación involucra movimientos de los metámeros, agregación y deformación con una propiedad adhesiva en la pared corporal.

Estos resultados nos permiten concluir lo siguiente: Los metales cadmio y plomo inducen sus efectos tóxicos irrumpiendo los tejidos corporales de la lombriz provocando un daño estructural en las capas externas y musculares, con la alteración de las funciones nerviosas y musculares de la lombriz como son la detección de estímulos, la locomoción y la ingesta de alimento. La lombriz *A. gracilis* fue más sensible a la presencia de cadmio comparada con el plomo. Probablemente por mecanismos que involucran la secreción mucosa y una forma de bioacumulación diferente.

Las lombrices son capaces de detectar suelos contaminados por mecanismos sensoriales, las cuales al detectar un contaminante producen una respuesta de evasión, con la secreción del moco como mecanismo de defensa. Si los organismos no logran alejarse del sitio contaminado se activan mecanismos de adaptación para sobrevivir, o de lo contrario mueren por parálisis e inanición.

## ABSTRACT.

Earthworms are organisms with a well developed nervous, digestive and muscular system; those allow them to perform important functions such as soil drainage and soil replacement, while helping to fertilize the soil due to its ability to biotransform organic matter. On the other hand, in soil contaminated with the metals cadmium and lead, these functions can be disrupted and cause the death of the worms. In this regard, it is known that earthworms are the main group of soil mesofaunal organisms; if they come into contact with heavy metals they may die or survive, depending on their defense mechanisms and adaptive processes. Studies to date have focused on identifying tissue concentrations, and evaluating the toxicity with endpoints as growth, reproduction and death. In contrast, they did not pay attention to determine the morpho-physiological changes and behavioral changes that occur during intoxication with these metals leading to death as well as the mechanisms. In this thesis, it was hypothesized that the cadmium and lead induce morphological changes and damage to important tissues of earthworms, by an interaction of these metals with the body wall and the intestinal barrier, causing damage, which may be reflected in the behavior of earthworms inhabiting soils contaminated with cadmium and lead.

The methodology included contact toxicity and immersion tests to determine the  $LC_{50}$  and bioaccumulation factors of the cadmium and lead in *Amyntas. gracilis* and *Eisenia fetida* species. Avoidance tests to characterize their behavior in contaminated soils and microscopy techniques to assess structural damage. We found the  $LC_{50}$  values for cadmium 3.4, 16.6 and lead  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  19.6 and 36.7  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  in *A. gracilis* and *E. fetida*, respectively. Bioaccumulation factors for cadmium were 14 and 17.8 and for lead of 4.8 and 2.6 in *A. gracilis* and *E. fetida*, respectively. Toxicity was accompanied by progressive signs like rapid movements and escape behavior, mucous secretion, coiling, paralysis, segmental constriction, edema in the preclitellar region, bleeding and death. The morphological changes observed were marked by detachment of the cuticle, epidermal destruction and damage in the muscle layers. The evaluation of muscular contraction in the presence of cadmium and lead metals showed an inhibitory effect on the muscular wall and crop-gizzard tissues. Earthworms avoided soils contaminated with cadmium and lead concentrations, similar to those found in contaminated soils.

Electron microscopy studies revealed to mucous secretion and the cloragogen tissue as major sites for accumulation of the heavy metals. The kinematic study revealed that the mucus secretion was formed by fluorescent vesicles, which is released in response to stimulation with the metals; their formation involves movements of the segments, aggregation and deformation; this material has an adhesive property, and it's joined to the body wall.

These results allow us to conclude the following: The cadmium and lead metals induced toxic effects by bursting body tissues of the worm, causing structural damage in muscle and the outer layers of the worm, with the alteration of nerve and muscle functions such as the stimuli detection, locomotion and food intake. The worm *A. gracilis* was more sensitive than *E. fetida* to the presence of cadmium. *E. fetida* tolerates the metals by mechanisms involving mucus secretion and bioaccumulation shaped differently.

The worms are able to detect contaminated soils by sensory mechanisms; they can detect a contaminant and induce an avoidance response, with secretion of mucus as a defense mechanism. If the organism fails to get away from the contaminated site, or to activate adaptation mechanisms to survive, it can die by paralysis and starvation.

## I. INTRODUCCIÓN

Las lombrices de tierra pertenecen al filum de los anélidos y a la clase de los oligoquetos, hay como 3000 especies identificadas y se cree que existan unas 6000 especies. Muchas de ellas son esencialmente cosmopolitas, están presentes en muchos suelos, con la excepción de medios extremos (glaciares, desiertos, suelos ácidos o salados, Holmstrup y Loeschke, 2003), son básicamente saprófagas, desempeñan una labor valiosa de labranza del suelo con sus amplias redes de túneles que construyen constantemente, representan del 60 % al 80 % de la masa animal del suelo y forman parte del alimento de numerosos animales (Darwin, 1881; Eyambe et al., 1991). Sin embargo, las lombrices se dividen en 3 categorías ecológicas según su hábitat y su alimentación (Bouche 1972; Lavelle, 1983): Las epigeas, que viven en la capa superficial del suelo, se alimentan de 100% de materia orgánica en descomposición, raramente forman madrigueras; las endógeas son geófagas no pigmentadas y forman madrigueras horizontales y las anécicas que viven en madrigueras verticales, son dorsalmente pigmentadas, se alimentan de materia orgánica y suelo.

Son organismos lo suficientemente complejos, con sistemas y procesos ampliamente conservados filogenéticamente, validados para determinar la toxicidad de los contaminantes presentes en el suelo (Bouché, 1972; Neuhauser, 1984), como sustancias químicas (Neuhauser, 1986a), tales como los insecticidas (Pereira et al., 2010) y metales pesados (Neuhauser, 1986b; Mhatre y Pankhurst, 1997).

Las lombrices de tierra son vulnerables a los metales pesados por su respiración cutánea, forma de vida y sus hábitos alimenticios. La exposición se lleva a cabo mediante dos vías principalmente; por la pared corporal, que se encuentra continuamente en íntimo contacto con el suelo, y por el tracto digestivo al alimentarse, así dañando funciones vitales

como su locomoción y la alimentación (Muangphra, y Gooneratne, 2011).

La toxicidad de los metales pesados (específicamente cadmio y plomo) en las lombrices de tierra se puede valorar mediante signos de toxicidad, determinación de la concentración letal ( $CL_{50}$ ) y a través de pruebas de su comportamiento. Al respecto, el comportamiento de escape puede ser un parámetro de evaluación ideal al reflejar la sensibilidad de las lombrices sin la necesidad de llegar a dañarlas como sucede con las pruebas para la determinación de la  $CL_{50}$ . En una situación real, la presencia de metales en un determinado sitio implicaría la ausencia de lombrices; lo cual repercutiría en los ciclos de la degradación de la materia orgánica, en las capas superficiales del suelo, en la estructura del suelo y en una disminución o pérdida de sus depredadores.

Por lo mencionado anteriormente y por las características biológicas como su intestino con movimiento propio y una pared corporal, la cual posee un mecanismo de contracción muscular que facilita la locomoción y el escape, las lombrices *A. gracilis* y *E. fétida* se escogieron como especies modelo para este estudio, en especial para determinar los efectos de la toxicidad del cadmio y el plomo. *A. gracilis* es una lombriz con movimiento rápido, habitante de suelos perturbados (Barois, 1992) y en cuya especie no se han realizado estudios de toxicidad. *E. fétida* es considerada como una especie estándar de comparación, debido a que se conoce su biología, su forma de cultivo y reproducción. Así mismo, es la especie más estudiada y avalada internacionalmente en la literatura (Velki y Hackenberger, 2012; IBACON, OCDE 2004).

Por otro lado, el cadmio y el plomo son metales pesados cuya toxicidad en las lombrices ha sido determinada en pruebas de contacto y suelo artificial. Su efecto ha sido evaluado sobre parámetros de crecimiento, reproducción y muerte. Sin embargo, no se había puesto atención en conocer las alteraciones morfo-fisiológicas y los cambios de comportamiento de escape que se manifiestan en presencia de estos metales. En este trabajo se planteó la necesidad de estudiar la toxicidad de dichos metales en una especie poco estudiada como es *A. gracilis*. Al respecto, exponer a las lombrices de tierra *A. gracilis* y

*E. fétida* a pruebas de contacto e inmersión evita el uso de una matriz compleja como es un suelo artificial y permite evaluar la sensibilidad a los tóxicos a través de la determinación de la  $CL_{50}$  y evaluar: a) los signos de toxicidad y los cambios morfológicos que se presentan en dichos organismos, b) determinar la evolución de los efectos en el curso temporal de la intoxicación, c) la relación entre la exposición, las concentraciones acumuladas en los tejidos y sus efectos en la contracción muscular d) la respuesta de escape y la secreción mucosa que son parámetros de estimación de toxicidad.

## II. HIPÓTESIS

1. El cadmio y el plomo son metales pesados que se acumulan e inducen toxicidad en las lombrices de tierra *A. gracilis* y *E. fétida*; interfieren con la contracción muscular del tejido intestinal y de la pared corporal hasta causar una inhibición de dicha función.
2. Las lombrices *A. gracilis* y *E. fétida* son capaces de detectar y evitar sitios contaminados con los metales pesados cadmio y plomo.

## III. OBJETIVOS

### Objetivo general

Evaluar los efectos del Cd y del Pb en la lombriz de tierra *A. gracilis* y estudiar algunos de los mecanismos de su toxicidad. Determinar el posible daño sobre la contracción muscular de los tejidos, la pared corporal e intestinal de la lombriz de tierra *A. gracilis*. Así mismo, investigar el comportamiento de *A. gracilis* y *E. fétida* ante la presencia de cadmio y plomo.

### Objetivos específicos

1. Determinar la toxicidad del cadmio y el plomo (CL<sub>50</sub>) en las lombrices de tierra *A. gracilis* y *E. fétida* por pruebas de contacto en papel filtro.
2. Determinar el curso temporal de la captación de los metales cadmio y plomo en las lombrices *A. gracilis* y *E. fétida* por pruebas de inmersión.
3. Determinar el efecto de cadmio y de plomo sobre la contracción de los tejidos musculares del intestino y de la pared corporal de la lombriz *A. gracilis*.
5. Valorar el comportamiento de escape de las lombrices *A. gracilis* y *E. fétida* como una prueba sensible para detectar la presencia de cadmio y plomo en suelos contaminados.
6. Estudiar el mecanismo de la secreción de moco inducida por los metales cadmio y plomo en *E. fétida*.

## **IV. ANTECEDENTES.**

### ***4.1 Biología de las lombrices.***

Las lombrices de tierra son animales invertebrados del filum de los anélidos, el término se refiere a la división de su cuerpo en segmentos cilíndricos o metámeros. Los metámeros se observan como anillos en la parte externa y están separados por particiones o septos internos (Rosenbluth, 1978). Cada segmento contiene cuatro pares de cerdas o sedas que se retraen mediante músculos especiales y son usadas para fijar una parte de su cuerpo mientras otra se mueve hacia adelante (Mizutani et al., 2002). En cada segmento (excepto en los tres primeros y el último) se encuentran los metanefridios; cada uno ocupa dos segmentos, en uno se abren en el interior mediante un embudo ciliado y en el siguiente segmento se conectan al exterior a través de un poro. El intestino, los metanefridios y otros órganos internos están suspendidos en el celoma, lleno de fluido, que también actúa como esqueleto hidrostático (Newell, 1959; Laverack, 1963).

Las lombrices presentan un aparato digestivo tubular con actividad propia; la boca está situada en la extremidad anterior y con ella ingieren continuamente el alimento que les rodea, el cual es impulsado hacia su interior por una faringe muscular. A ésta le sigue un delgado esófago, una bolsa membranosa llamada buche, en la que se acumula el alimento, y la molleja, de paredes musculares, cuyas contracciones desmenuzan las partículas alimenticias. De la molleja pasan los alimentos, ya triturados, al intestino para su absorción, y los desechos finales son eliminados por el ano situado en la extremidad posterior (Beltrán et al., 1963).

Presentan un sistema nervioso bien desarrollado que les permite detectar los cambios ambientales y situaciones desfavorables que se generan frecuentemente en su entorno; está estructurado por una masa cerebral, un collar esofágico y una cadena nerviosa

infraintestinal (Gardner, 1976; Barnes, 1977). También están provistos de células sensoriales (receptoras) táctiles, gustativas, fotorreceptoras y otras vinculadas con la detección de la humedad (Molnar et al., 2006). Estos organismos carecen de un aparato respiratorio especializado, pero efectúan los cambios gaseosos necesarios para su vida a través de la piel. En cambio, poseen un sistema circulatorio cerrado formado por un vaso sanguíneo dorsal prominente y al menos dos ventrales, que recorren de forma longitudinal el cuerpo y están conectados entre sí a intervalos regulares por medio de una serie de vasos transversales. Contienen cinco pares de corazones contráctiles que se conectan con el vaso dorsal y el ventral, que impulsan la sangre hacia las diferentes partes del cuerpo (Berman, 1992).

El movimiento en los seres vivos es un signo vital, en las lombrices ha sido considerado desde varios puntos de vista, pudiéndose resumir brevemente en: la locomoción hacia adelante, la cual se produce por una onda de contracción del músculo circular, cuya consecuencia es la elongación de los segmentos, dicha onda viaja desde el extremo anterior al posterior. Cuando esta onda retrógrada ha pasado por la mitad del cuerpo, se presenta una onda contráctil en el músculo longitudinal, que conduce a un aplanamiento y ensanchamiento en el cuerpo de la lombriz, la cual se continua hasta el extremo posterior. Los segmentos longitudinales encogidos forman un punto de apoyo sobre el substrato, y a medida que se repite el fenómeno en cada segmento, la lombriz se estira y se encoge una y otra vez, alcanzando un desplazamiento de 2 a 3 cm por etapa (Gray y Lissmann, 1939). Si la onda locomotriz retrógrada desaparece al alcanzar el extremo posterior del cuerpo, los segmentos restantes son empujados pasivamente. La locomoción hacia atrás, usualmente sigue después de un estímulo peligroso recibido en el extremo anterior, hay un aplanamiento dorso-ventral del extremo posterior y el paso de la onda locomotriz es similar a aquella del movimiento hacia adelante pero, con una dirección posterior-anterior (Yapp, 1956; Seymour, 1969; Drewes et al., 1988; Barnes, 1977).

La musculatura de la pared corporal de la lombriz de tierra actúa sobre el esqueleto

hidrostático constituido por el fluido celómico, el cual genera las ondas para la locomoción. Este fenómeno es básicamente peristáltico, sin embargo; también puede involucrar ondulaciones laterales o movimiento pulsátil (Drewes et al., 1988).

La musculatura es arreglada en dos cubiertas concéntricas; una cubierta externa delgada constituida de fibras con sus axones largos dispuestos en forma tangencial al eje longitudinal de la lombriz, formando el músculo circular; y una cubierta interna de fibras longitudinales. Ambas capas son equivalentemente del mismo grosor para los anélidos. Las fibras musculares se unen al tejido conectivo del septo y contienen numerosos desmosomas, además presentan un retículo sarcoplásmico bien definido y uniones neuromusculares con paquetes de fibras nerviosas que viajan a través del tejido conectivo del septo (Gardner, 1976). Las fibras del músculo longitudinal pueden alcanzar algunos milímetros y extenderse hasta en dos segmentos del gusano.

La contracción muscular se inicia con el estímulo de las terminales nerviosas que desembocan en la placa neuromuscular. Dicho evento puede iniciarse mediante dos mecanismos de estimulación: eléctrico y químico; el primero, se lleva a cabo por la conductancia de iones potasio, sodio, cloro y calcio, mientras que el segundo se inicia por la liberación de sustancias químicas conocidas como neurotransmisores (acetilcolina) y consecuentes cambios en la conductancia de iones sodio, potasio y calcio (Milk y Knapp, 1970; Sánchez 1997).

Las lombrices han desarrollado mecanismos de defensa contra patógenos ambientales, sean éstos ingeridos por los alimentos o bien introducidos por heridas. El sistema inmune está compuesto de una barrera limitante localizada en la epidermis conocida como cutícula impregnada de una secreción mucosa, y de un mecanismo de respuesta inmune mediado por respuestas celulares y humorales, que reducen la propagación de organismos invasores. El mecanismo celular incluye actividades fagocíticas y de reconocimiento de célula a célula, mientras que la respuesta humoral se basa en actividades enzimáticas lisosomales, aglutinantes y de hemolisis con la liberación de diversas sustancias como la lumbricina, péptidos antimicrobianos y algunas sustancias tóxicas (Wang et. al., 2011).

La secreción mucosa a través de su piel es un mecanismo importante para el mantenimiento de la humedad y el intercambio gaseoso, así mismo, actúa como una barrera protectora para evitar la erosión de la cutícula. Pocos estudios se han realizado para conocer el fenómeno de la secreción mucosa; se conoce que estímulos físicos, químicos o eléctricos promueven la secreción copiosa de moco, sin embargo, bajo condiciones de estrés las lombrices responden con una secreción mucosa abundante (Wampler y Jamieson, 1980).

#### ***4.2 Ecofisiología de las lombrices.***

Las lombrices de tierra representan uno de los componentes más importantes de la fauna del suelo; su abundancia y distribución dependen directamente de las condiciones del medio ambiente y el estado ecológico del sistema (Lee, 1985; Edwards y Bolhen, 1996; Lavelle y Spain, 2001).

El hábitat apropiado para las lombrices de tierra es aquel que cubre sus requerimientos mínimos en cantidad y calidad de alimento, humedad, pH y temperatura adecuada, oxígeno suficiente para poder respirar, protección contra la radiación ultra violeta y ausencia de sustancias tóxicas que puedan modificar su balance osmótico (Camacho López et al., 2003).

Dependiendo de sus diferencias de hábitat y hábitos alimenticios, se han clasificado en tres categorías ecológicas: Epígeas, se alimentan exclusivamente de materia orgánica en la superficie de los suelos; endógeas o geófagas, viven en capas más internas, excavan galerías horizontales, son puramente comedoras de suelo con bajos contenidos de materia orgánica, y las anécicas, que son un grupo intermedio, cuyas galerías son verticales, colectan materia orgánica de la superficie del suelo y la trasladan hacia su madriguera donde se lleva a cabo una pre-digestión por la microbiota local, creándose un proceso de “rumen externo”, para después comerla junto con el suelo y la microbiota promovida (Bouche, 1972; Lavelle 1983, Barois, e Irisson, 1997; Tripathi et al., 2007).

Las lombrices son importantes en muchos aspectos; la cantidad de suelo y materia orgánica en descomposición que estos organismos pueden procesar sobrepasa las 37

toneladas de tierra seca por hectárea cultivada por año en regiones templadas. Dicha cantidad de suelo equivale al espesor arable de una hectárea, la cual tardaría un período de 60 a 70 años en ser removida (Bouché, 1972). En zonas tropicales puede ser de 400 a 1000 toneladas (Lavelle, 1983). Durante el paso a través de los gusanos, no sólo la materia orgánica sirve de alimento a la lombriz de tierra; sus minerales constituyentes quedan sujetos a las enzimas digestivas y a la acción trituradora del sistema digestivo para convertirlos en formas más asimilables para las plantas (Bouché, 1972). Los moldes depositados por las lombrices (excrementos) comparados con el propio suelo, son más ricos en materia orgánica, en nitrógeno total y en nitratos, en fósforo asimilable, en magnesio y calcio intercambiables, produciendo así un fertilizante más amigable para las plantas (Buckman y Brady, 1966). Las lombrices también son importantes por la formación de agujeros que dejan durante su actividad de labranza, los cuales sirven para aumentar la aireación y el drenaje del suelo. Su actividad es fundamental en la mezcla y en la granulación del suelo por el arrastre de materiales de las capas inferiores a la superficie del mismo y viceversa (Beltrán et al., 1963). Al mismo tiempo, debido a que las lombrices de tierra consumen todo lo que encuentran a su paso, se convierten en organismos vulnerables a diferentes tipos de contaminantes ambientales (Velki y Hackenberger, 2012).

### ***4.3 Indicadores biológicos y pruebas de toxicidad.***

Los bioindicadores son organismos o comunidades de ellos que pueden responder a la contaminación ambiental mediante alteraciones en su fisiología o a través de su capacidad para acumular contaminantes, ofreciendo información sobre los riesgos para otros organismos y el hombre. Las especies bioindicadoras deben ser, en general, abundantes, muy sensibles al medio de vida, fáciles y rápidas de identificar, bien estudiadas en su ecología y ciclo biológico (Mhatre y Pankhurst, 1997). Las algas, bacterias, protozoos, invertebrados y peces son los más utilizados como indicadores de la

contaminación del agua. Para el suelo, además de otros organismos, los macroinvertebrados; especialmente aquellos que se alimentan de materia orgánica en descomposición (Reinecke y Reinecke, 1998; Römbke, 2006), los gasterópodos, los piojos de madera, los isópodos (*Porcellio scaber*), los collembola (*Folsomia candida*), y las lombrices de tierra son grandes acumuladores de metales pesados (Köhler et al., 1996; Sandifer y Hopkin, 1997).

Las lombrices de tierra son perfectos indicadores de la contaminación del suelo, como lo fundamentan varios estudios (Lee et al., 1985; Fugere et al., 1996; Mariño et al., 1996), y en la mayoría de ellos han contemplado especies como: *Lumbricus terrestris*, *Lumbricus rubellus*, *Allolobophora chlorotica*, *Aporrectodea caliginosa*, *E. andrei* y *E. fétida* siendo esta última la más frecuentemente utilizada (Scott-Fordsmand y Weeks, 2000, OCDE, 1984).

El uso de lombrices para evaluación ecotoxicológica ha experimentado un desarrollo considerable en los últimos años (Römbke, 2006). Pruebas de toxicidad aguda han sido bien establecidas y estandarizadas (OCDE, 1984, 2004). Sin embargo, estas pruebas por sí mismas no dan información suficiente para predecir el efecto de un contaminante en situaciones de campo. Se conocen diferentes especies y ha habido diferencias entre los investigadores para utilizar una especie ideal en pruebas de toxicidad (Bouché 1992; Heimbach 1985; Callahan, 1985), No obstante, que hay un consenso para seguir usando a la lombriz *E. fétida* como un organismo para determinar toxicidad aguda en pruebas de suelo, debido a su sensibilidad, facilidad de cultivo, importancia económica y relevancia ecológica. Sin embargo, para estudios de toxicidad crónica, así como estudios de bioacumulación a largo plazo, se ha establecido que debe haber una representación de cada tipo ecológico ya que *E. fétida* vive en el suelo.

Estudios de toxicidad aguda son conducidos para averiguar los efectos biológicos adversos, en general durante un período determinado de exposición después de la administración de una simple dosis en un amplio intervalo de concentración del químico. Los efectos son frecuentemente severos y en algunos casos llegan a causar la muerte. Este

tipo de pruebas son diseñadas para determinar la potencia de los tóxicos en términos de la dosis letal media ( $DL_{50}$ ), definida como aquella dosis que produce el 50% de muertes en una población estudiada bajo condiciones definidas de la prueba. Cuando la administración es indirecta la potencia se señala como la concentración letal 50, ( $CL_{50}$ ) la cual es más específica para estudios con lombrices (Reinecke y Reinecke, 1998).

Pruebas de toxicidad subletal como son el crecimiento y la reproducción carecen de parámetros comparativos para determinar las diferencias en efectos subletales, ya que en dichas pruebas hay factores determinantes como son la especie y sus hábitos alimenticios. Esto claramente demuestra una necesidad para distinguir entre las propuestas de las pruebas de toxicidad y su factibilidad para extrapolar los resultados entre las especies.

Las pruebas de toxicidad en las lombrices son realizadas bajo protocolos bien establecidos (EPS, 2004), principalmente basados sobre la guía 207, 222 de la OECD, las cuales son útiles para la determinación de la  $DL_{50}$  en pruebas de contacto y de suelo artificial. La prueba de contacto establece el uso de papel filtro impregnado con el tóxico como medio de exposición, mientras que la prueba de suelo artificial presupone el uso de suelo compuesto de materia orgánica, arcilla, caolín más el agente de prueba. Ambas pruebas son realizadas a tiempos cortos (48 h y 14 días respectivamente) y están lejos de la realidad, ya que los suelos son estructuras complejas en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas, y los organismos están expuestos a tiempos largos e incluso años. No obstante, son útiles en cuanto a la obtención de información primaria de tóxicos. Por otro lado, el desarrollo de estas pruebas por períodos mayores, permiten diseñar y detectar efectos subletales como cambios del comportamiento, crecimiento retardado, baja tasa de fertilidad y efectos teratogénicos entre otros. Desde un punto de vista de la ecotoxicología, datos que impliquen el debilitamiento de las funciones vitales de las lombrices tienen una mayor relevancia ecológica que aquellos obtenidos de pruebas de toxicidad aguda (Reinecke y Reinecke, 1998).

#### **4.4 Cadmio y plomo como contaminantes.**

Un contaminante es una sustancia, simple o compleja, que produce efectos ecotoxicológicos, concretamente una toxicidad generada en organismos que viven en

ecosistemas como es el caso de las lombrices de tierra (Bouché, 1996).

La presencia de metales pesados en suelos, debería ser únicamente función de la composición original de los procesos edafogénicos que dan lugar al suelo, pero la actividad humana incrementa su contenido en cantidades considerables siendo ésta, sin duda, la causa más frecuente de las concentraciones tóxicas del medio ambiente (Brown et al., 1999; Galán y Romero, 2008).

El cadmio es un metal pesado que ha adquirido gran importancia toxicológica; está ligado a la actividad antrópica. A partir de la mitad del siglo pasado, la producción y el uso del cadmio a nivel industrial ha aumentado rápidamente, y su eliminación se ha convertido en un serio problema para el ambiente. Los usos más habituales de este metal son en la industria de la galvanoplastia, la fabricación de baterías y la estabilización de algunos plásticos, aunque el cadmio se ha utilizado también en la elaboración de algunos plaguicidas y fertilizantes (Willuhn et al., 1996). La contaminación por cadmio también es producto de la explotación de minas, la industria metalúrgica y la incineración de material orgánico fósil. Estas actividades lo remueven de sus depósitos naturales insolubles, distribuyéndolo en los diferentes compartimentos ambientales, como aire, agua y tierra (Davies, 1990). Las aplicaciones y la producción del Cd siguen en aumento debido a que menos del 5 % es reciclado (Allowey, 1990; Berman, 1980).

El plomo, de color gris azulado que se encuentra ampliamente distribuido en la corteza terrestre en forma natural, las partículas del plomo se liberan al aire a partir de las distintas fuentes y se depositan en el agua y el suelo principalmente (Foulkes, 1990; Labrot et al., 1999). En suelos no contaminados, el promedio general se encuentra entre los 10 a 30 mg/kg, en suelos con niveles relativamente bajos se estiman desde los 30 a 100 mg/kg. Las actividades mineras en asociación con las industriales generan una contribución substancial a la contaminación por este metal (Davies, 1990). El Pb metálico es relativamente opaco a la radiación ionizante por lo cual, se ha utilizado en las labores de la radioisotopía y rayos-X, en la soldadura y placas de baterías. Otros compuestos inorgánicos de plomo son

esenciales en la elaboración de pinturas, como los cromados amarillos utilizados ampliamente en todas las señales de las carreteras (Singh y Thomas, 1980). Otro ejemplo, es el glaseado de contenedores de bebidas y comidas ácidas, como los jugos de tomate, de frutas, de cola, de sidra y, de escabeche. También debe tomarse en cuenta que en el pasado se usó extensivamente en la química orgánica de los compuestos del Pb (IV), especialmente en los componentes tetra-alquilos (tetra etil y tetra-metil) de la gasolina (Boeckx, 1986; Goyer, 1997).

La dinámica ambiental de los metales conlleva a que los organismos de forma individual o poblacional sean expuestos continuamente a los metales, originando como consecuencia su bioacumulación. Ésta tiene impactos variados que ocurren a distintas escalas, desde un organismo, hasta un ecosistema.

#### **4.5 Acumulación de metales pesados en la lombriz de tierra.**

En los ecosistemas terrestres el suelo representa el último sitio de depósito para los metales pesados y al ser casi inmóviles, tienden a acumularse primeramente en las capas superficiales junto con la materia orgánica, facilitando su disponibilidad para las lombrices de tierra. Los primeros estudios realizados en tejidos de las lombrices provenientes de zonas contaminadas indicaron que exceden la concentración de metales pesados con respecto a la del suelo (Ma, 1984). Específicamente muestras colectadas próximas a carreteras, proporcionaron una concentración de cadmio corporal de 11.1 mg/kg, mientras que en el suelo fue de 1.59 mg/kg (Gish y Christensen, 1973). Una relación similar se encontró en *Lumbricus rubellus* y *Dendrobaena rubida* colectadas de suelos mineros, cuya concentración corporal de cadmio fue de 823 y 1 320 µg/g peso seco respectivamente; y la del suelo resultó ser de 467 µg/g peso seco (Morgan y Morris, 1982). En pruebas de laboratorio, la supervivencia de lombrices ha sido estudiada en *E. fétida* mediante su exposición prolongada por más de diez generaciones a concentraciones

subletales de cadmio, indicando que la continua exposición conduce a la lombriz a desarrollar resistencia; es decir, no afecta su reproducción ni su crecimiento y termina adaptándose al metal (Reinecke et al., 1999). Los reportes en la literatura señalan que esto se debe básicamente a que la lombriz contiene varios sitios donde puede acumular los metales pesados, como por ejemplo: en las células de la mucosa intestinal (Yongcan et al., 1998), en células epiteliales de la pared corporal, en la cavidad celómica y en el tejido cloragógeno (Ireland, 1988). Los análisis ultraestructurales han mostrado que el cadmio predominantemente es atrapado por un complejo bio-orgánico con ligandos-tiol dentro de vesículas intracelulares del tejido cloragógeno. La co-localización del cadmio y sulfuros dentro de un organelo intracelular sugiere el involucramiento de un tipo de proteínas con abundantes sulfuros, denominadas metalotioneínas (Stürzenbaum et al., 1998; 2001). Las metalotioneínas son proteínas catiónicas ricas en residuos de cisteína que están asociadas con la tolerancia de varios organismos a los metales pesados, involucradas no solamente en la homeóstasis de metales esenciales como el Cu y Zn sino también con la detoxificación de metales no esenciales tales como Ag, Hg, Cd y Pb en una gran variedad de organismos (Liang et al., 2009). El tejido cloragógeno se localiza en torno al intestino y revistiendo el vaso sanguíneo dorsal, consiste de células alargadas en forma de bastón con un gran número de gránulos esféricos, nombrados cloragosomas (Morgan y Morris, 1982; Morgan y Morgan, 1989). La función del tejido cloragógeno, además, es vital en el metabolismo intermediario parecido al del hígado de vertebrados (Barnes, 1977; Fischer y Molnár, 1992), teniendo como funciones las de almacenar grasas, metabolismo del nitrógeno, reserva de glucógeno, síntesis del pigmento respiratorio sanguíneo, estabilización de la composición iónica de los fluidos de la lombriz y excreción (Richards y Ireland, 1978; Prento, 1979).

#### **4.6 Toxicidad de metales pesados en la lombriz de tierra.**

La toxicidad de los metales pesados se presenta como una amplia variedad de cambios fisiológicos, bioquímicos y de comportamiento (Neuhauser et al., 1984; Spurgeon y Hopkins, 1994; Spurgeon y Hopkin, 1999; Maboeta et al., 1999). Datos de toxicidad del cadmio en la lombriz de tierra *E. fétida* se observan en concentraciones de 376 mg/Kg de peso seco (Fitzpatrick et al., 1996) hasta 1843 mg/Kg de peso seco (Neuhauser et al., 1985; Lock and Janssen, 2001) en pruebas de toxicidad aguda de suelo artificial. Así mismo, los factores de acumulación para el cadmio oscilan entre 6 y 64 (Tischer, 2009).

La toxicidad del plomo es dependiente del tiempo y la concentración del plomo inicial, así como de la sal de plomo utilizada y pH del suelo. En estudios de toxicidad de plomo en pruebas de suelo artificial se han encontrado  $CL_{50}$  alrededor de 5824 mg/Kg de suelo (Davies et al., 2003; Langdon et al., 2005). La bioacumulación del plomo es muy variable, por ejemplo, Bradham et al., (2006) reportaron que a una concentración de plomo en suelo de 2000 mg/Kg encontraron concentraciones internas de plomo de 28.7 a 782 mg/Kg, explicando estas variaciones en relación a los cambios de pH y la composición del suelo. En otros experimentos Davies et al. (2003) colocaron lombrices en suelo artificial con plomo inmediatamente y después de un período de equilibrio del suelo, las lombrices que se colocaron inmediatamente sobrevivieron por 23 h, mientras que las que se colocaron después del período de equilibrio sobrevivieron por 67 h. La bioacumulación del plomo en las lombrices ha sido reportada menor que la del cadmio (Ma 2002; Ni et al., 2009; Tischer 2009).

Algunas evidencias indican que el mecanismo de toxicidad de los metales pesados se encuentra asociado a una interacción con ciertas enzimas, específicamente aquellas con una alta proporción de residuos de cisteína como las aldehído deshidrogenasas, Glutación S transferasas (Willuhn et al., 1996; Grelle y Descamps, 1998). O bien, a través de la

formación de radicales libres de oxígeno, con la inhibición de las enzimas captadoras de radicales como la superóxido dismutasa y la catalasa (Rojas et al., 1999). Otra explicación es que el cadmio se une directamente a los ácidos nucleicos causando rompimientos de las hebras del ADN y cambios conformacionales de esta molécula (Bagchi et al., 2000). En el caso del plomo aunque no se ha demostrado un efecto directo sobre el ADN de lombrices, puede causar defectos en la división celular (Muangphra, y Gooneratne, 2011). El Pb también tiene actividad preferencial en las mitocondrias, donde además de alterar la mayoría de las reacciones mitocondriales, modifica la permeabilidad de la membrana mitocondrial y el transporte de iones calcio (Foulkes, 1990). Ambos metales alteran la captación, distribución y concentración celular de iones de Ca intracelular (Beyersmann y Hechtenberg, 1997).

#### ***4.7 Comportamiento de las lombrices***

El comportamiento se puede definir como cualquier cosa que hace un organismo para ajustar o interactuar con su medio ambiente, siendo hereditario o aprendido (Tomlin, 1992). Estudiando el comportamiento de la lombriz de tierra sobre su acondicionamiento a estímulos de vibraciones y luz, Ratner y Miller (1959) demostraron su capacidad de responder con una respuesta de retiro rápido. La respuesta de retiro rápido es el resultado de un reflejo originado en la fibra nerviosa gigante que inerva la musculatura de la lombriz de tierra (Roberts, 1962), sugiriendo que el sistema nervioso es el encargado de coordinar dicha respuesta (Peeke y Herz., 1967). Se piensa que la respuesta de escape rápido de la lombriz de tierra es un comportamiento de reflejo biológicamente importante que sirve como parámetro en la evaluación de ensayos en ecotoxicología (Drewes et al., 1988).

El comportamiento de escape ha sido comúnmente usado para estudiar los efectos de químicos en animales y subsecuentemente se ha integrado en la toxicología de la lombriz de tierra (Yeardly et al., 1996). La evasión puede ser una adaptación fenotípica que permite

a los animales sobrevivir a cambios ambientales; proporciona una perspectiva única en toxicología debido a que representa la unión entre la fisiología y la ecología de un organismo y su medio ambiente (Little y Brewer, 2001).

Las reacciones de escape son secuencias de acciones cuantificables que operan a través del sistema nervioso (Drewes y Lingamneni, 1992). Así mismo, son manifestaciones acumuladas de procesos genéticos, bioquímicos y fisiológicos esenciales para la vida, incluyendo la alimentación, reproducción y escape de los depredadores. También permiten a los organismos ajustarse a estímulos internos y externos, de la misma manera enfrentarse a retos de sobrevivencia en un ambiente cambiante. Son respuestas selectivas que están constantemente adaptándose a través de la interacción directa con aspectos físicos y químicos del medio ambiente. Consecuentemente, la selección evolutiva conserva patrones de comportamientos estables en conjunto con adaptaciones morfológicas y fisiológicas. Esta estabilidad optimiza oportunidades para sucesos reproductivos y de sobrevivencia facilitando al organismo explotar recursos eficientemente y definir habitats adecuados (Little y Brewer, 2001; Kane et al., 2005; Artuso et al., 2011).

Se ha sostenido que las respuestas de escape son útiles en toxicología, porque son pruebas finales bien definidas y prácticas en su medición, permiten un buen entendimiento con respecto a factores ambientales que causan variación en la respuesta, son sensitivas a una variación de contaminantes y adaptables a diferentes especies, y finalmente, son ecológicamente relevantes (Rand, 1985).

Para satisfacer los requerimientos necesarios, en la selección de una prueba final de comportamiento en cualquier estudio toxicológico, debe tomarse en cuenta el mecanismo de acción, la ruta de captación y las propiedades físicas y químicas del tóxico de interés (Kane et al., 2005; Pereira et al., 2010).

## V. METODOLOGÍA

### **5.1 Cultivo de las lombrices de tierra *A. gracilis* y *E. fétida*.**

Se trabajó con la lombriz de tierra *A. gracilis*, identificada por el Dr. Carlos Frago, investigador titular del Departamento de Biología de Suelos del Instituto de Ecología, A.C. de Xalapa Veracruz. El ejemplar de *A. gracilis* se colectó en un jardín local de la Ciudad de Morelia, Michoacán. Se procuró coleccionar lombrices adultas, con clitelo definido. Su mantenimiento se llevó a cabo en un medio compuesto de materia orgánica de origen vegetal en descomposición y tierra. Se mantuvieron a temperatura ambiente con una humedad relativa de entre 50 % y 70 %. La lombriz de tierra *A. gracilis* es una especie epíendógea (Frago et. al., 1999), se distribuye ampliamente en áreas templadas, calurosas y tropicales, son dorsalmente pigmentadas y se mueven rápidamente (Barois, 1992).

Originalmente, este trabajo se planteó con esta especie de lombriz por su disponibilidad en el lugar indicado anteriormente (Morelia, Michoacán). Sin embargo, durante el desarrollo del presente proyecto se tuvieron problemas en el crecimiento y reproducción de esta especie, básicamente porque no se pudo mantener en cautiverio, se mueve muy rápido y escapa de los cultivos con relativa facilidad. Por ello fue preciso trabajar con la especie de *E. fétida*, que es manipulable, se reproduce rápidamente en laboratorio y al mismo tiempo sirvió como especie comparativa.

Para el cultivo de esta última se usó un suelo compuesto de turba canadiense colocada en un bioreactor de doble fondo, y las lombrices se alimentaron con desechos de casa que consistieron principalmente en desperdicios de frutas: plátano, mango, papaya, melón y sandía.

### **5.2 Pruebas de toxicidad por contacto del Cd y Pb en las lombrices *A. gracilis* y *E. fétida***

Los ensayos de toxicidad se realizaron por medio de las pruebas de contacto y de

inmersión. Estas pruebas son las recomendadas por la OECD (Organización para la Cooperación Económica y Desarrollo) y la UE (Unión Europea), para la evaluación de tóxicos ambientales a través de parámetros como la  $CL_{50}$ , y signos de toxicidad (Neuhauser et al., 1986; Reinecke, 1992; Fitzpatrick et al., 1996).

La prueba por contacto se llevó a cabo de acuerdo a la norma de la OECD que establece el uso de papel filtro (Whatman No. 1), impregnado con el agente tóxico en tubos de ensaye de diámetro igual a 3 cm x 7 cm. Sin embargo, en este trabajo, se sustituyeron los tubos por cajas de Petri con una superficie de  $56.7 \text{ cm}^2$ . En ellas se colocó papel filtro, cubriendo completamente la superficie interna de cada una (figura 1). El papel se impregnó completamente con 1 mL de la solución del metal a evaluar (cloruro de cadmio o cloruro de plomo). Posteriormente, se adicionó una lombriz adulta (con clitelo definido) a cada caja, utilizándose un total de 10 repeticiones por cada concentración y la evaluación fue por triplicado.

Las concentraciones finales de los metales cadmio y plomo se obtuvieron de estudios preliminares con cada una de las especies. Para la especie *A. gracilis* se usaron concentraciones de cadmio de 0, 1.1, 2.1, 3.2, 4.2, 6.3, 8.5, 10.6, 12.7, 16.9  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , y para Pb de 0, 3.3, 6.6, 13.2, 19.8, 26.4, 39.7, 52.9, 66.1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Mientras que para la lombriz de tierra *E. fétida* el cadmio se usó a concentraciones de 5, 10, 20, 30 y 60  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , y para el plomo de 3.3, 6.6, 13.2, 19.8, 26.4, 39.7, 52.9, 66.1, 79.2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Las cajas con las lombrices se incubaron en condiciones de oscuridad y los signos de toxicidad desarrollados durante la exposición fueron determinados a las 2, 12, 24 y 48 horas.

Después de cada tiempo de exposición y observación, cada lombriz fue retirada del tóxico, se colocaron individualmente en cajas de Petri, se dejaron secar a temperatura ambiente y se almacenaron para determinar las concentraciones de cada metal. En la prueba por contacto propuesta por la UE, se establece el uso de tubos de ensaye pero, en los ensayos piloto realizados en este trabajo se observaron inconvenientes como la fuga de lombrices, dificultad para la aireación, pérdida de humedad y difícil observación de los

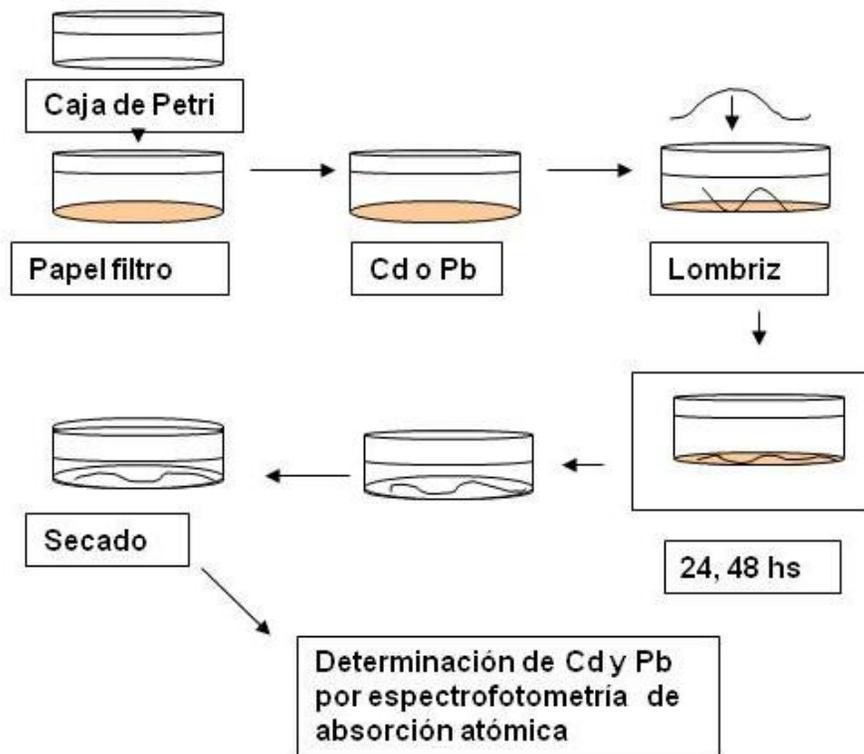
signos de toxicidad. Las cajas de Petri facilitaron la manipulación y el seguimiento de los experimentos, debido a que éstas son especiales para cultivos de células; permiten la entrada de aire, no existe pérdida de humedad y con las cajas se pudo controlar el escape de las mismas. En estas pruebas se recomienda reportar las concentraciones en unidades de  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  y realizar ensayos con concentraciones a partir de los 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0  $\mu\text{g}$  hasta alcanzar el 100% de muerte. Las concentraciones utilizadas en estos ensayos fueron determinadas después de varios preliminares con concentraciones de cadmio desde 0.0005 a 34.5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , y de plomo desde 1.7 a 211.6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

La  $CL_{50}$  de los metales se determinó mediante el método estadístico del análisis probit-logaritmo (Daniel, 1982; Gad y Weil, 1989). La  $CL_{50}$  se refiere a la concentración que conduce al 50 % de muerte en los organismos expuestos durante 48 horas.

Después de establecer la  $CL_{50}$ , se determinó la concentración de los metales en los tejidos de las lombrices expuestas por espectrofotometría de absorción atómica, cuya metodología se describe posteriormente en la sección 6.5.

### **5.3 Pruebas de toxicidad del Cd y Pb por inmersión en las lombrices *A. gracilis* y *E. fétida***

Estas pruebas también han sido avaladas por la OECD, y permiten determinar el curso temporal de captación de los metales en los tejidos de las lombrices. Las lombrices *A. gracilis* y *E. fétida* se seleccionaron con clitelo definido, y se sumergieron en una solución con una concentración de cloruro de cadmio de 195  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Esta concentración se definió al multiplicar la  $CL_{50}$  por el área de exposición de la caja de Petri,  $(3.44 \mu\text{g}/\text{cm}^2) * 56.7 \text{ cm}^2 = 195 \mu\text{g}/\text{mL}$  y para la concentración del cloruro de plomo se consideró el mismo criterio (1106  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Los tiempos de exposición con el cadmio y el plomo fueron de 0, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120 minutos y en cada tiempo se incluyeron tres réplicas y cada réplica contaba con 10 lombrices; en total para este ensayo se utilizaron  $3 \times 10 \times 9 = 270$  lombrices de cada especie y para cada metal pesado.



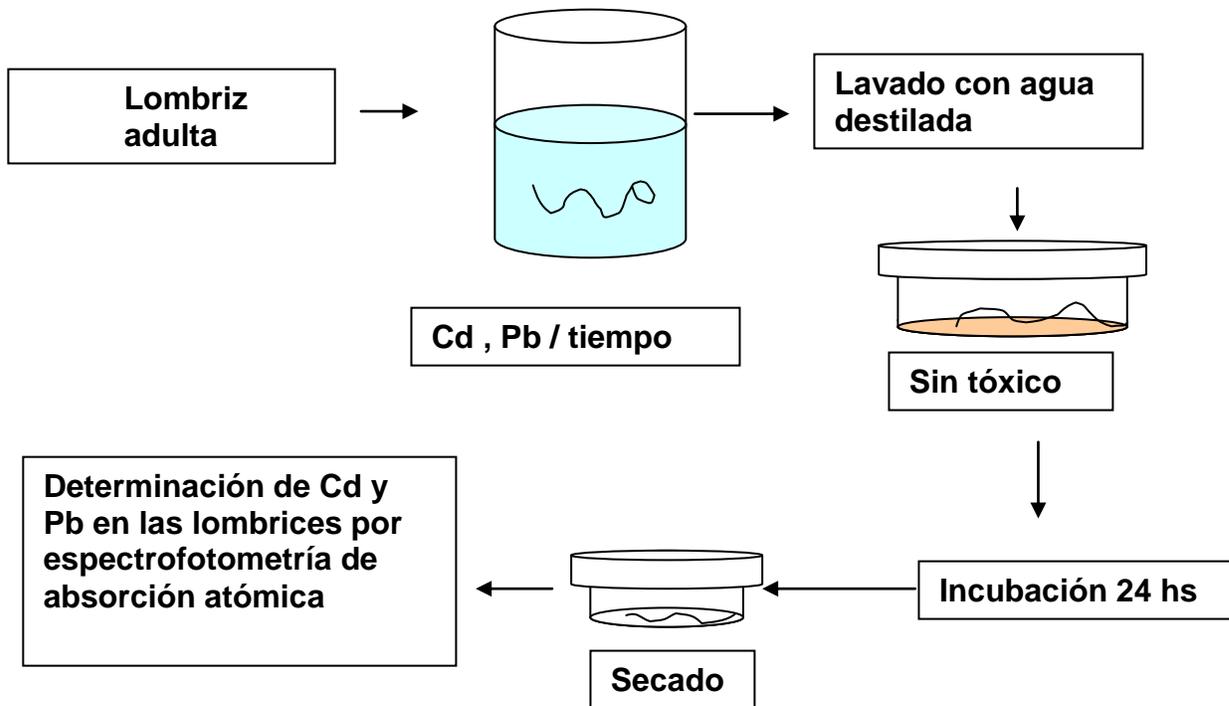
**Figura 1.** Procedimiento seguido para la evaluación de la toxicidad del cadmio y el plomo por pruebas de contacto.

Al final de cada tiempo de exposición se fueron retirando de una en una (figura 2), se lavaron con agua destilada y se colocaron en cajas de Petri previamente preparadas con papel filtro humedecido con agua destilada y sin metal. Enseguida, se incubaron en la oscuridad a una temperatura promedio de 22 °C, realizándose observaciones a los mismos tiempos de exposición al tóxico y valorando su movimiento como signo de sobrevivencia. Después cada lombriz se dejó secar a temperatura ambiente y se conservaron para determinar la concentración de cada metal acumulado en cada tiempo de exposición. Cada triplicado se agrupó y se determinó la concentración del Cd y del Pb.

Condiciones de incubación.

En ambas pruebas las lombrices expuestas se colocaron en cajas de Petri con papel filtro humedecido y en una incubadora a una temperatura y humedad constante. La temperatura mínima fue  $22.6 \pm 0.5$  °C, la máxima fue de  $24.3 \pm 1.5$  °C y la condición promedio normal

de  $22.0 \pm 0$ . En el caso de la humedad ambiental, la mínima fue de  $52.33 \pm 12 \%$ , la máxima fue de  $76.2 \pm 13 \%$  y la lectura promedio normal fue de  $64.1 \pm 10.7 \%$ .



**Figura 2.** Procedimiento utilizado para determinar el curso temporal de bioacumulación de los metales cadmio y plomo por pruebas de inmersión

#### **5.4 Evaluación del daño histológico.**

Muestras representativas de la especie *E. fétida* de lombrices sanas y expuestas a cadmio y plomo fueron preparadas para realizar estudios de histopatología. Cortes longitudinales y transversales fueron realizados con el objetivo de estudiar el daño en la epidermis y el tubo intestinal, respectivamente.

Lombrices individuales fueron fijadas en paraformaldehído al 2.5% en solución amortiguadora de fosfato por 24 horas. Después fueron retiradas y deshidratadas en soluciones de alcohol etílico al 60, 70, 80, 90, y 100%. Una vez deshidratadas fueron embebidas en parafina sólida y cortes longitudinales o transversales de  $7 \mu\text{m}$  fueron realizados con la ayuda de un microtomo. Los cortes se sometieron a tinción con Eosina-

Hematoxilina.

Las observaciones se hicieron en un microscopio óptico equipado con una cámara de color digital (Axioscop 40FL, Carl Zeiss, CoolSNAP-cf Photometrics GmbH, Munich, Alemania), y analizadas con el software ImagePro Plus 5.0 (Media Cybernetics, Inc., Bethesda, MD. USA). El montaje y preparación de las figuras finales se realizaron utilizando software Corel-Photopaint ver 9.0 (California USA).

Los estudios de microscopía electrónica se hicieron con muestras de lombrices expuestas a Cd y Pb, las cuales fueron fijadas en 2.5 de glutaraldehído en 0.1 M de solución de fosfatos a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente, las muestras fueron lavadas con solución amortiguadora de fosfatos y deshidratadas en series de acetona al 50 80, 90 y 100%, sometidas a secado por punto crítico, entonces se montaron y se cubrieron con una capa de oro puro. Las observaciones se hicieron en un microscopio de barrido electrónico modelo JSM 25S (JEOL, Ltd, Tokio, Japón), equipado con dispersión de rayos X.

### ***5.5 Determinación de los metales pesados cadmio y plomo por EAA.***

Las lombrices secas de ambas pruebas expuestas al Cd se molieron en un mortero, se pesó medio gramo del molido y se colocó en un vaso de precipitado con cubierta de reloj, se agregaron 2 mL de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) al 2 %. El vaso se colocó en una placa caliente hasta su completa oxidación. El contenido oxidado se disolvió nuevamente con  $\text{HNO}_3$ , se filtró a través de papel filtro Whatman No.42 y se aforó a 10 mL con  $\text{HNO}_3$  al 2 %. Esta solución se llevó al espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin-Elmer modelo AAnalyst 100) para leer la concentración de Cd a una longitud de onda de 228.8 nm, con una abertura de 0.7 nm y con una flama de aire-acetileno. Las concentraciones de las muestras problema se determinaron mediante una curva patrón de  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$  diluido en 1 litro de  $\text{HNO}_3$  al 1 % (solución estándar de cadmio Sigma 207012 Sigma Aldrich) preparada con concentraciones de 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . El procedimiento para determinar el contenido de plomo en los tejidos de las lombrices fue el mismo, excepto que las lecturas se llevaron a cabo con una longitud de onda de 217 nm y su determinación

fue mediante una curva patrón de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  diluido en 1 litro de  $\text{HNO}_3$  al 1% (v/v) (Fleming y Richards, 1981; Abernathy, 1999).

## **5.6 Pruebas de toxicidad del Cd y Pb en la contracción muscular**

Los ensayos de contracción muscular se realizaron en la especie *A. gracilis* y se utilizaron tejidos representativos de la lombriz: a) el tejido intestinal sección buche-molleja, y b) el tejido somático de la pared corporal de la lombriz de tierra *A. gracilis*, en presencia y ausencia de cadmio y plomo.

### **5.6.1 Preparación de los tejidos buche-molleja y pared muscular de la lombriz**

Tejido buche-molleja: se seleccionaron lombrices de tierra adulta, se colocaron en hielo para su anestesia, luego se montaron en una placa de parafina en presencia de una solución fisiológica compuesta de 102 mM de NaCl, 1.6 mM de KCl, 1.8 mM de  $\text{CaCl}_2$ , y 5 mM de HEPES a un pH de 7.2 (solución Worm) y a temperatura ambiente (Ukena et al., 1995). Con la ayuda de un estereoscopio se sujetó del prostomio y de la parte terminal posterior, (pigidio) con alfileres, se le realizó una disección longitudinal por la parte dorsal, la cual inició cerca del clitelo hasta la cavidad bucal; cada parte disecada se sujetó con alfileres (Berman, 1992). Posteriormente, la sección buche-molleja se desprendió de la lombriz, se sujetó de las partes terminales con hilo de seda y se suspendió en una cámara previamente preparada con 1.5 mL de la solución Worm (Ukena et al., 1995).

Para la detección de los cambios de la contracción muscular se tomaron en cuenta los siguientes parámetros: a) la tensión basal, b) cambios en la frecuencia y, c) la tensión pico. La tensión basal indica la fuerza de contracción inicial del músculo; los cambios en la frecuencia, se refieren a los ciclos de contracción y relajación; y la tensión pico, es la fuerza de contracción máxima alcanzada. Inicialmente se registraron las contracciones rítmicas espontáneas, y luego se adicionó acetilcolina para establecer la funcionalidad del tejido.

Luego a cada preparación se le agregó el Cd o el Pb según correspondiera. En estos ensayos se eligieron las concentraciones de 0.65 y 65  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Cd y de 36 y 368  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Pb.

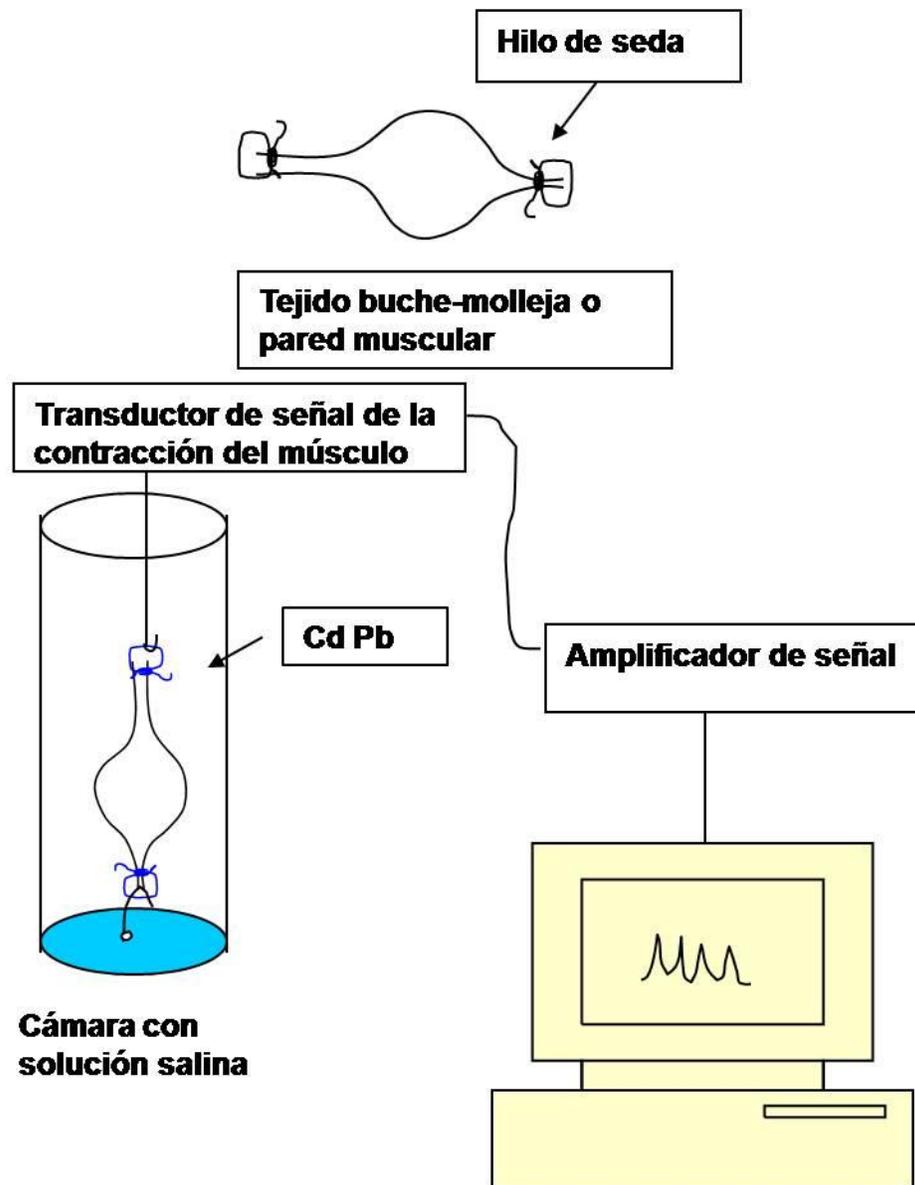
Tejido pared corporal: se seleccionaron lombrices adultas, se colocaron en hielo para su anestesia, se montaron en un panel de parafina y se sujetó el prostomio de la lombriz con un alfiler. Con la ayuda de un estereoscopio a nivel del clitelo y por la parte dorsal de la lombriz se realizó un corte, que se siguió hasta el prostomio. Posteriormente con extremo cuidado para no dañar el cordón nervioso ventral y para dejar libre esta porción de pared corporal, se procedió a eliminar lo que corresponde al intestino. Para obtener esta porción de pared corporal se contaron de 5 a 10 segmentos partiendo después del segundo segmento del prostomio, se realizó un corte transversal, la porción obtenida se sujetó de ambos extremos con hilo de seda y se colocó en una cámara con solución fisiológica cuya composición fue de: 140 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl, 1.8 mM de  $\text{CaCl}_2$ , 1.0 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0.1 mM de Hepes (ácido N-2-Hidroxietilpiperacina-N'-2-etanosulfónico) a un pH de 7.3 y a temperatura ambiente (Hassoni et al., 1985).

La fuerza de contracción y el perfil de las espigas fueron los parámetros analizados a las concentraciones previamente mencionadas (0.65 y 65  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Cd y de 36 y 368  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Pb. Aquí se consideró utilizar concentraciones mayores a las encontradas en pruebas de contacto, debido a que en pruebas de suelo de sitios mineros y pruebas de suelo artificial adicionado con los metales Cd y Pb, se han reportado concentraciones en suelo muy altas.

### ***5.7 Evaluación de la prueba de escape al Cd y el Pb en suelo artificial por A. gracilis y E. fétida.***

Modelo de probabilidad y conducta de escape.

Fundamento: En general todos los anélidos están provistos de un sistema sensorial, así,



**Figura 3.** Sistema de registro para determinar el efecto de los metales cadmio y plomo en la contracción muscular de las preparaciones buche-molleja y pared muscular

podemos citar la presencia de fotorreceptores, estructuras sensoriales a través del tegumento y la cutícula o cubierta externa con función de quimiotaxis y táctil (Barnes, 1977). Estudios clásicos de comportamiento en estos invertebrados han demostrado las respuestas condicionadas a la luz (Ratner y Miller, 1959). Algunos reportes indican que bajo condiciones poco favorables para su hábitat, la lombriz presenta una conducta de

escape o de evasión (Peeke y Herz, 1967; Berman, 1992).

Para determinar la distribución de las lombrices, los primeros ensayos se realizaron con la lombriz de tierra *A. gracilis*. Se realizaron en una cámara con suelo artificial cuya composición fue a base de 20 % de caolín, 10 % materia vegetal en descomposición, 69 % de arena fina y 1 % de carbonato de calcio pulverizado para ajustar el pH (Edwards y Bohlen, 1996), sin Cd ni Pb. Esto se repitió 10 veces con 10 lombrices adultas.

Después, para desarrollar las pruebas de escape o de evasión, se diseñó un modelo de probabilidad con dos compartimientos (figura 4); uno de ellos contenía el suelo artificial (control). El otro compartimiento tenía el suelo antes descrito más Cd o Pb dependiendo del metal a examinar. De las pruebas por contacto con Cd se obtuvo una  $CL_{50}$  de  $3.4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  para las pruebas de inmersión. Se usó dicho valor multiplicado por el área de superficie de la caja de Petri, cuyo valor corresponde a  $195 \mu\text{g}/\text{mL}$ . Para las pruebas de plomo el valor fue de  $19.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  equivale a  $1106 \mu\text{g}/\text{mL}$ . Como en estas pruebas sólo se pretendía conocer el escape o la evasión de las lombrices de un medio contaminado con respecto a otro no contaminado con los metales, se utilizó una concentración 3 veces más pequeña que la mencionada anteriormente de Cd y de Pb ( $65$  y  $368 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , respectivamente), ya que en el suelo artificial los metales son inmovilizados por la materia orgánica (Wang 2010). En el compartimiento contaminado se colocaron 10 lombrices y se determinó cuántas de ellas permanecían en este medio o cuántas emigraban al suelo control (sin metal). Este procedimiento fue repetido 10 veces, al final los resultados se reportaron en porcentajes y se analizaron por la prueba de chi-cuadrada.

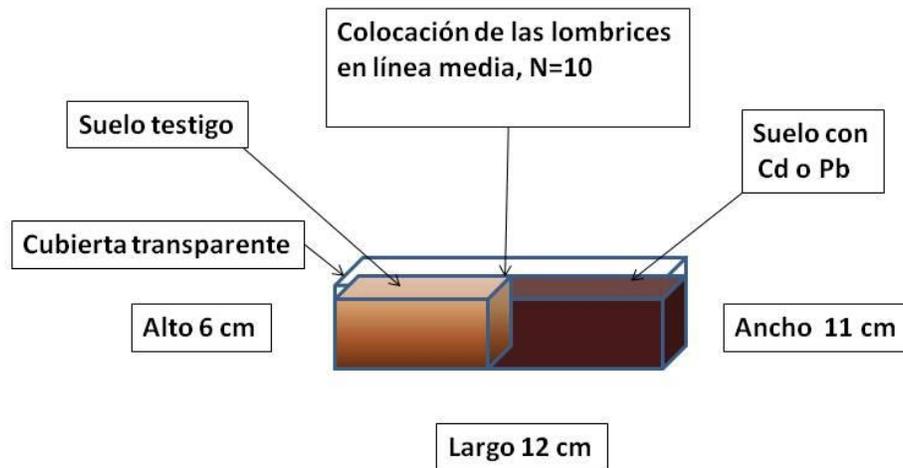
Es importante señalar que durante el desarrollo de este trabajo aparecieron numerosos reportes publicados de la prueba de escape con el sinónimo de prueba de evasión, en los cuales se confirmó nuestra hipótesis, acerca de la sensibilidad de las lombrices para detectar contaminantes presentes en el suelo. Dicha prueba adquirió una relevancia como una prueba de campo para evaluar sitios contaminados dentro de las otras pruebas de toxicidad en el suelo, debido a su significado ecotoxicológico. Actualmente, es una de las pocas pruebas

con un valor en el ensayo de riesgo aprobada por organizaciones internacionales como la ISO, ASTM, OECD. En este trabajo se adoptó la norma ISO 2008 para estudiar el comportamiento de escape o de evasión en la especie *E. fétida*.

En la prueba se utilizó suelo artificial como se describió anteriormente, y se estudio la evasión al Cd a concentraciones de 8, 16, 48, 150  $\mu\text{g/g}$  de suelo, mientras que para el Pb se usaron concentraciones de 100, 226, 400 y 800  $\mu\text{g/g}$  de suelo.

La prueba se hizo en contenedores de plástico de 500 mL con dimensiones de 12 x 11 x 8 cm, los cuales fueron llenados por mitad con suelo artificial sin contaminar a una altura de 6 cm, mientras que la otra mitad se llenó con suelo contaminado con las concentraciones descritas anteriormente.

Al inicio de la prueba 10 lombrices fueron colocadas al centro del recipiente en la línea divisoria de los suelos, tapadas con plástico perforado colocadas en una cámara a 20 °C con humedad constante  $50 \pm 10\%$ . Las lombrices no fueron alimentadas durante la prueba, después de 48 h cada parte de suelo control y suelo contaminado fueron separados manualmente, las lombrices se contaron a cada lado de la cámara y se calculó la distribución porcentual a cada lado.



**Figura 4.** Cámara de dos espacios diseñada para el estudio de la prueba de escape con la lombriz de tierra *A. gracilis* en un suelo artificial con plomo y cadmio.

### **5.8 Evaluación de la secreción mucosa cutánea inducida por el Cd y el Pb**

Para estimar la secreción mucosa, las lombrices fueron colocadas en una caja de Petri cubierta con un papel filtro humedecido con agua destilada e incubadas por un período de 24 horas para permitir el vaciado del tubo intestinal. Las lombrices fueron lavadas con una solución fisiológica compuesta de 125 mM de NaCl, 2.5 mM de KCl y 2.0 mM de Tris buffer, pH = 7.4 (Ukena et al., 1995).

La secreción mucosa cutánea fue inducida por un estímulo con CdCl<sub>2</sub> (66 µg/mL) o un estímulo eléctrico de baja corriente (17±4 mA) por 2 milisegundos. Para cuantificar la secreción mucosa las lombrices individuales fueron colocadas y pesadas en cajas de Petri previamente taradas; después de ser estimuladas, se retiraron y las cajas de Petri se

volvieron a pesar. La diferencia de peso fue considerada como la cantidad de moco secretado.

Para analizar la fluorescencia de la secreción mucosa, se utilizó el microscopio Axioscope con la configuración de epifluorescencia con un par de filtros para fluoresceína (longitud de excitación 490 nm / 515 nm longitud de emisión). El estudio de microscopía confocal de las vesículas se hizo con una unidad confocal de barrido FV300 acoplada a un microscopio Olympus (Olympus Optical Co.Ltd., Japón).

Para la excreción de moco, la lombriz de tierra primero fue depurada de su tubo digestivo colocándola en una caja de Petri con solución Worm por 12 h, enseguida se estimuló con  $\text{CdCl}_2$  o un pulso eléctrico de baja corriente ( $17 \pm 4$  mA) por 2 milisegundos. La caja de Petri fue colocada en la platina del microscopio y para observar la muestra se utilizó un objetivo de inmersión (UPLFL 40x). La excitación se hizo mediante un laser de Argón operando con un par de filtros para Fluorescein-Isotiocianato. Barridos repetitivos fueron realizados en el plano z y subsecuentemente sometidos al análisis con el software Flowview (Olympus Optical Co. Ltd., Japón).

### **5.8.1 Análisis cinemático de la secreción mucosa cutánea.**

Para estudiar el mecanismo de la secreción mucosa en tiempo real, se hicieron cámaras de observación con portaobjetos y parafilm de 1 mm de ancho x 1mm de alto por 5 cm de longitud. La profundidad de las cámaras fue lo suficiente estrecha para mantener al organismo dentro de ella: al tener dos paredes de parafilm y un fondo de vidrio, hizo posible mantener a la lombriz en un espacio pequeño humedecido con agua. Esto minimizó la locomoción y permitió una observación de la secreción después del estímulo. La secreción fue filmada a una velocidad de 30 fotos/segundo con el apoyo de una cámara de color de CCD (Panasonic GP-KR222) acoplada a un microscopio de inspección con zoom 2.5-10x (Edmund Scientific, Inc. USA). Videoclips de 5 min de duración fueron grabados y digitalizados con software Pinnacle Studio ver 7. El campo de observación fue iluminado con una fibra óptica circular. La secreción fue estudiada en 60 individuos, en la sección de

resultados se presentan secuencias del evento en dos videoclips.

### **5.9 Métodos estadísticos.**

Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  la desviación estándar de réplicas.

Para la determinación de la concentración letal 50, los resultados fueron analizados por medio de una transformación probit-logaritmo (Gad y Weil, 1989), utilizando el programa de software Prisma Graph-pad ver 3.0.

Las concentraciones de los metales Cd y Pb evaluadas por espectroscopia de absorción atómica se relacionaron con las concentraciones colocadas en el papel filtro con un análisis de regresión lineal simple, y un análisis de varianza de una vía. Mientras que las determinaciones de los metales Cd y Pb en las pruebas de inmersión, se analizaron a través del análisis de varianza de una y dos vías, y la comparación de medias fue realizada con una prueba de Dunnett (Gad y Weil, 1989).

Los resultados de las pruebas de escape de *A. gracilis*, se analizaron con la prueba de chi-cuadrada con una tabla de contingencia de 2x2 (Gad y Weil, 1989, Sousa et al., 2010). Las pruebas de evasión de *E. fétida*, se reportan como % de evasión calculados con la ecuación  $\% \text{ evasión} = ((C-T)/N) * 100$  y se graficaron en diagramas de cajas y bigotes, debido a que éstas permiten una visualización más adecuada de la variabilidad de los resultados.

Los resultados de las pruebas sobre la contracción muscular son representados como un trazo característico, sin embargo, los experimentos fueron repetidos al menos 5 veces, las diferencias entre los valores control y los valores experimentales fueron analizadas a través de pruebas de medias de t-Student pareada (Gad y Weil, 1989).

Las pruebas estadísticas se calcularon con el paquete de software Prisma Graphpad considerando como nivel significativo un valor de  $p < 0.05$ .

## VI. RESULTADOS

### 6.1 Pruebas de toxicidad por contacto del Cd y Pb en las lombrices *A. gracilis* y *E. fétida*

#### 6.1.1. Signos de toxicidad y $CL_{50}$ para el cadmio

Las lombrices al ser expuestas al Cd mostraron signos de intoxicación observables a simple vista en todas las concentraciones probadas. Reaccionaron inmediatamente con un movimiento rápido, con deseo de escape y expulsión de moco. La expulsión de moco fue observada como un fluido pigmentado de color amarillo (figura 5a). También se observaron anomalías fisio-morfológicas tales como movimiento lento con temblor de la parte anterior, enrollamiento, magullamiento de la epidermis, segmentación pronunciada, hemorragia por la cavidad bucal, inflamación desde el prostomio hasta el clitelo y un anillo necrótico pre-clitelar (figura 5b-e). Se observó retracción del prostomio e inflamación en los segmentos del 7 al 12 de la región anterior, y en la parte posterior ocurrió segmentación pronunciada (figura 5b-c, figura 6b, c). La segmentación pronunciada o constricción fue seguida de autotomía en la región posterior después de las 24 horas de exposición de las lombrices en las concentraciones más altas (figura 5d). Algunas lombrices mostraron una o más zonas de inflamación intensa en la región post-clitelar, cerca del segmento número 30 (figura 5c-d). La inflamación fue asociada con una coloración rojiza y fusión de segmentos de la región anterior del cuerpo, algunas veces se rompía con sangrado, conduciendo a la muerte.

En la tabla 1 se describe detalladamente el curso temporal de los signos de toxicidad producidos por el cadmio. Los controles mostraron una apariencia normal durante todos los tiempos registrados. Al exponer las lombrices a las diferentes concentraciones, todas mostraron de inmediato un movimiento rápido con deseo de escape y expulsión de moco. Las que se sometieron a la concentración de  $1.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  empezaron a tener dificultad en su movimiento con cierto temblor de la parte anterior y prostomio dilatado, enrollamiento, magullamiento de la epidermis, y a presentar una segmentación pronunciada de la parte posterior a partir de las 12 horas. Estos signos fueron completamente visibles a las 24 horas

y así se mantuvieron hasta las 48 horas sin llegar a la muerte. Los signos descritos anteriormente los manifestaron todas las lombrices en las diferentes concentraciones hasta las 12 horas. Las lombrices expuestas en la concentración  $2.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , presentaron la descripción mencionada, sólo que a las 48 horas una de ellas pereció quedando un total de 9 al final de este tiempo. Las concentraciones de  $3.2$  y  $4.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de Cd, alteraron a las lombrices en la forma descrita anteriormente hasta las 12 horas, pero a las 24 horas de exposición, murieron 2 en cada concentración con hemorragia en la cavidad bucal. A las 48 horas, 2 más de la concentración  $3.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  y 6 de las que permanecían en la concentración  $4.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , murieron, quedando al final 6 en la concentración de  $3.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , y 2 en la concentración de  $4.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Las lombrices expuestas a la concentración de  $6.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , expresaron los signos de intoxicación ya mencionados, pero a las 24 horas, 2 de las sobrevivientes empezaron a sufrir inflamación desde el prostomio hasta el clitelo con la aparición de un anillo necrótico intenso a la altura de éste, llegando a perder el movimiento por completo (signo de muerte), a las 48 horas. Las lombrices que permanecieron en las concentraciones de  $8.5$ ,  $10.6$ ,  $12.7$  y  $16.9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , también sufrieron todos los daños mencionados, sin llegar a superar las 24 horas. Con estos resultados se dedujo que la  $CL_{50}$  fue de  $3.4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $2.9 - 3.9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ).

En *E. fétida* la toxicidad del cadmio se expresó de la misma forma que en *A. gracilis*. Sin embargo, las concentraciones a las cuales aparecieron dichos signos fueron más altas a aquellas aplicadas en *A. gracilis*; por ejemplo, alteraciones morfológicas como hinchamiento de la región pre-clitelar y sangrado fueron observadas después de 12 horas en las lombrices expuestas a concentraciones  $> 10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  y la  $CL_{50}$  para el cadmio fue  $16.6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  ( $14.6 - 19.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ).



**Figura 5.** Cambios morfológicos encontrados en las lombrices expuestas al cadmio y el plomo por contacto. Los números en negro son las concentraciones del metal (a) Secreción mucosa, (b) inflamación, (c) segmentación y edemas, (d) autotomía, (e) Constricción pronunciada, (f) enrollamiento, (g) sangrado y muerte.

### 6.1.2 Signos de toxicidad y $CL_{50}$ para el plomo

Las lombrices de la especie *A. gracilis* al exponerse al plomo, fueron experimentando signos de toxicidad parecidos a los producidos por el cadmio y se describen conforme fueron apareciendo al incrementarse las concentraciones durante 48 horas de exposición. Al principio mostraron movimiento rápido con deseo de escape y expulsión de moco, después movimiento lento con temblor de la parte anterior, epidermis magullada, segmentación pronunciada e inflamación desde el prostomio hasta el clitelo.

En la tabla 2 se describen dichos signos producidos en el grupo de lombrices expuestas en cada concentración de plomo. Los controles se mostraron libres de alteraciones durante todos los tiempos observados. Al introducir las lombrices en las diferentes concentraciones

**Tabla 1.** Signos de toxicidad inducidos por el Cd en la lombriz de tierra *A. gracilis* durante 48 h de exposición.

Concentraciones de Cd ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Tiempos de observación				
	2 h	12 h	24 h	48 h	Muerte total
0	A	A	A	A	0
1.1	M	ML	ML	ML	0
2.1	M	ML	ML	1 ML	1
3.2	M	ML	2 H	2 H	4
4.2	M	ML	2 H	6 H	8
6.3	M	ML	8 PI	2 PI	10
8.5	M	ML	10 PI		10
10.6	M	ML	10 PI		10
12.7	M	ML	10 PI		10
16.9	M	ML	10 PAI		10

Pruebas de toxicidad por contacto en papel filtro con 10 lombrices en cada concentración.

A = Apariencia normal

M = Movimiento rápido con deseo de escape y expulsión de fluido celómico.

ML= Movimiento lento con temblor de la parte anterior y prostomio dilatado, epidermis magullada, segmentación pronunciada.

H = Hemorragia por la cavidad bucal, autotomía de la región posterior.

PI = Parte anterior inflamada, anillo necrótico a la altura del clitelo.

expresaron movimiento rápido con deseo de escape y expulsión de moco manteniéndose en ese estado durante las primeras 2 horas. Las que se sometieron a una concentración de 3.3  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  mostraron movimiento lento con temblor de la parte anterior y prostomio dilatado, epidermis magullada y, segmentación pronunciada a partir de las 24 horas. Las concentraciones de 6.6 y 13.2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  presentaron estos efectos hasta las 24 horas, y a las 48 horas, 1 lombriz de cada tratamiento de concentración había muerto. Estos primeros signos de toxicidad también se presentaron a las 12 horas en las lombrices que se expusieron a las concentraciones de 19.8 y 26.4  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , la muerte de 4 de ellas en cada concentración se observó a las 24 horas, con inflamación desde el clitelo hasta el prostomio; las sobrevivientes también presentaban estas características, al llegar a las 48 horas, 2 en la concentración de 19.8  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  y 5 de la 26.4  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  habían muerto, quedando

un total de 4 y 1 respectivamente, al final de este tiempo. Las lombrices que permanecieron en las concentraciones de 39.7 y 52.9  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  manifestaron todos los signos antes descritos hasta las 12 horas, a las 24 horas, 7 murieron en la concentración de 39.7  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  y, 8 en la de 52.9  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , no sobreviviendo ninguna a las 48 horas. Finalmente, la concentración de 66.1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  eliminó a todas las lombrices a las 24 horas, con la previa manifestación de los signos de toxicidad ya señalados. De estos resultados se desprende que la  $CL_{50}$  para el plomo fue de 19.5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (18.5 - 20.5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ).

Las lombrices de la especie *E. fétida* expuestas al plomo mostraron los mismos signos de toxicidad a los descritos en la especie *A. gracilis* pero, también en este caso dicha especie fue menos sensible a la toxicidad del plomo, debido a que la  $CL_{50}$  resultó ser igual a 39.6  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (36.2 - 43.0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ).

**Tabla 2.** Signos de toxicidad inducidos por el Pb en la lombriz de tierra *A. gracilis* durante 48 horas de exposición.

Concentraciones de Pb ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	Tiempos de observación				
	2 h	12 h	24 h	48 h	Muerte total
0	A	A	A	A	0
3.3	M	M	M	ML	0
6.6	M	M	ML	1ML	1
13.2	M	M	ML	1ML	1
19.8	M	ML	4 PI	2 PI	6
26.4	M	ML	4 PI	5 PI	9
39.7	M	ML	7 PI	3 PI	10
52.9	M	ML	8 PI	2 PI	10
66.1	M	ML	10 PI		10

Pruebas de toxicidad por contacto en papel filtro con 10 lombrices en cada concentración.

A = Apariencia normal

M = movimiento rápido con deseo de escape y excreción de celoma.

ML = Movimiento lento con temblor de la parte anterior y prostomio dilatado, epidermis magullada, segmentación pronunciada.

PI = Parte anterior inflamada, anillo necrótico a la altura del clitelo.

## **6.2 Pruebas de toxicidad del Cd y Pb por inmersión en las lombrices *A. gracilis* y *E. fétida***

La exposición de las lombrices a los metales por inmersión permitió conocer el curso temporal de captación de los mismos bajo una observación continua y sin interrupción, durante períodos cortos. Cabe resaltar nuevamente en esta sección de experimentos que las lombrices al ser introducidas en la solución con el cadmio o plomo, expulsaron moco de inmediato en todos los tiempos examinados.

### **6.2.1 Toxicidad del cadmio por inmersión.**

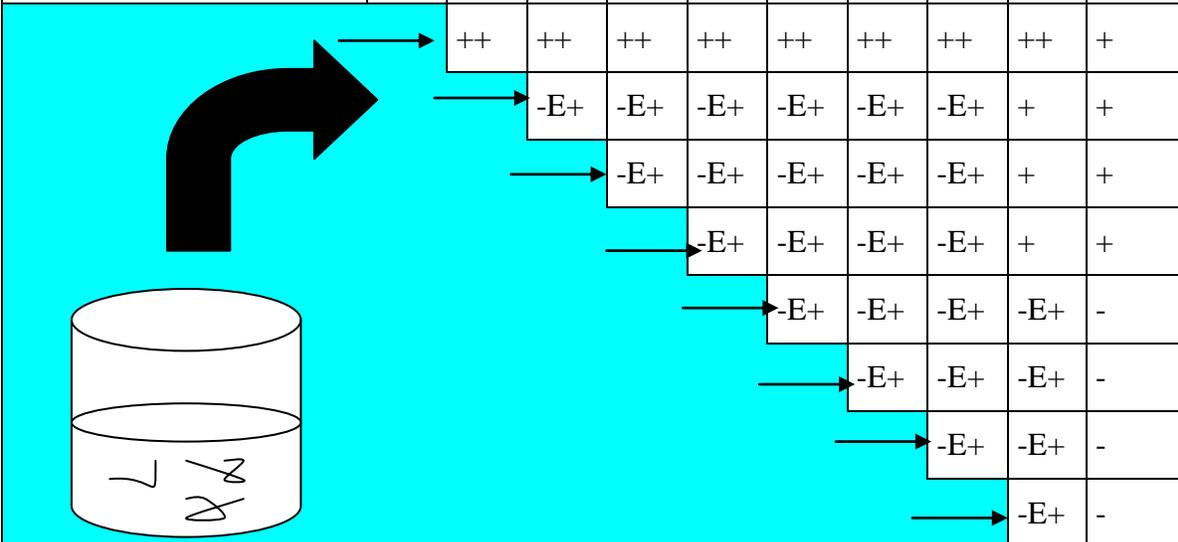
Al introducir las lombrices en la solución con cadmio o plomo, expulsaron moco y se movieron rápidamente. Después de los 10 minutos se observaron plegadas. Al prolongar el tiempo de exposición por más de 30 minutos, fueron mostrando un aspecto extendido y flácido. En la tabla 3 se muestran los resultados de los tiempos de exposición de las lombrices (área sombreada) y los tiempos de observación después de que fueron expuestas (área clara). Las lombrices controles permanecieron en condiciones normales durante todo el tiempo de los ensayos. Las lombrices que se expusieron 5 minutos, mantuvieron el movimiento, pero sin deseo de escape, su apariencia general fue normal durante todos los tiempos observados. Sin embargo, en los períodos de 10, 15 y 20 minutos, presentaron ausencia de movimiento, pero respondían a un estímulo mecánico mediante punción suave. Estas lombrices lograron recuperar su movimiento a los 120 minutos después de su permanencia en el medio sin el metal. Lo anterior no sucedió con las expuestas durante los tiempos de 30, 60, 90 y 120 minutos. A estos tiempos con el tóxico perdieron su movimiento por completo y al final murieron.

### **6.2.2 Toxicidad del plomo por inmersión.**

La tabla 4 muestra los tiempos de exposición de las lombrices en cloruro de plomo (área sombreada) y los tiempos de observación después de su exposición (área clara). Las lombrices que fueron expuestas durante 5, 10 y 15 minutos, se movían hasta cierto punto normalmente, pero sin deseo de escape, al término de la observación su movimiento era dificultoso y no-coordinado. Las que permanecieron en la solución tóxica durante 20, 30,

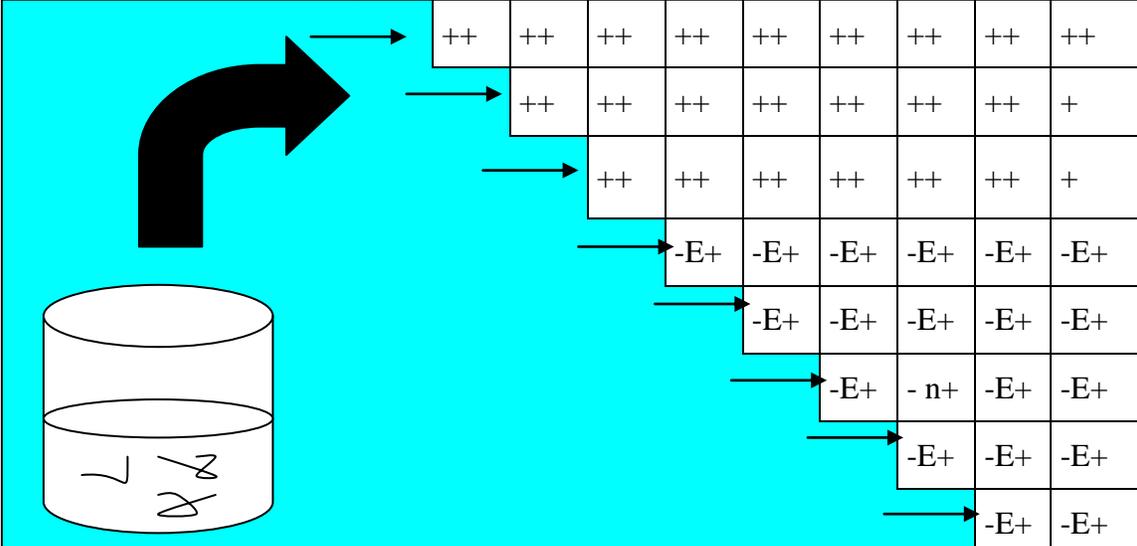
60, 90 y 120 minutos, no presentaban movimiento, aunque sí respondían al estímulo mecánico, permaneciendo en ese estado hasta el término del experimento, no se observó muerte.

**Tabla 3.** Curso temporal de exposición de *A. gracilis* y *E. fétida* a Cd por inmersión.

Tiempo de exposición de las lombrices en la solución de CdCl <sub>2</sub> (195 µg/mL).	Tiempos de observación (min)									
	0	5	10	15	20	30	60	90	120	24 h
Testigo	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+
	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	+	+
	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	+	+
	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	+	+
	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-
	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-
	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-
	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-

+++	Movimiento rápido con deseo de escape
++	Movimiento sin deseo de escape
+	Movimiento con dificultad
-E+	Sin movimiento responden a estímulo mecánico (punción suave).
-	Muerte

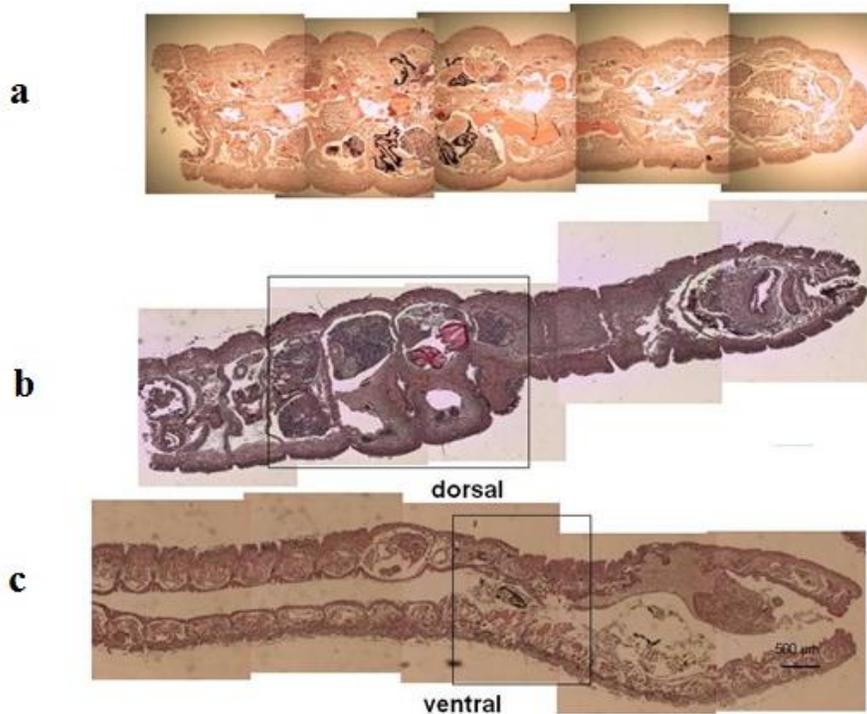
**Tabla 4.** Curso temporal de exposición de *A. gracilis* y *E. fétida* a Pb por inmersión.

Tiempo de exposición de las lombrices en la solución de PbCl <sub>2</sub> (1106 µg/mL).	Tiempos de observación (min)									
	0	5	10	15	20	30	60	90	120	24 h
Testigo	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+
	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+
	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+
	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+
	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+
	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+
	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+	-E+

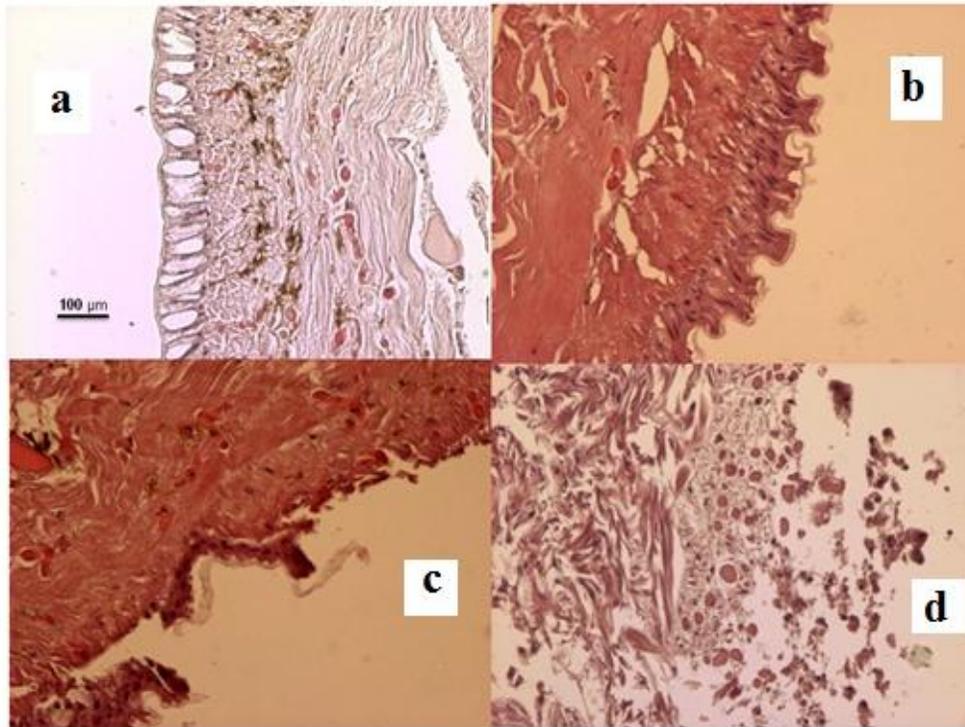
+++	Movimiento rápido con deseo de escape
++	Movimiento sin deseo de escape
+	Movimiento con dificultad
-E+	Sin movimiento responden a estímulo mecánico (punción suave)
-	Muerte

### 6.3 Lesiones histopatológicas producidas por los metales Cd y Pb en las lombrices *E. fétida*

El estudio por histopatología de secciones del cuerpo de las lombrices control, ilustraron una arquitectura del cuerpo normal con músculos longitudinales y circulares intactos (figura 6 a). Las lombrices expuestas a concentraciones más altas que  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de cadmio por contacto revelaron cambios estructurales en la región ventral (figura 6 b, c). El cadmio afectó de manera importante la pared ventral del cuerpo de las lombrices. Algunas lombrices con inflamación en la región pre-clitelar presentaron ruptura del canal alimentario con grandes lesiones en los vasos y sangrado interno (figura 6 b, c). La membrana cuticular y la capa del ectodermo, fueron severamente dañadas y desprendidas de la capa muscular. Espacios o desprendimientos se observaron en la capa del músculo circular interno (figura 7 b, c), y la superficie externa del tejido afectado se empezó a disociar (figura 7 d).



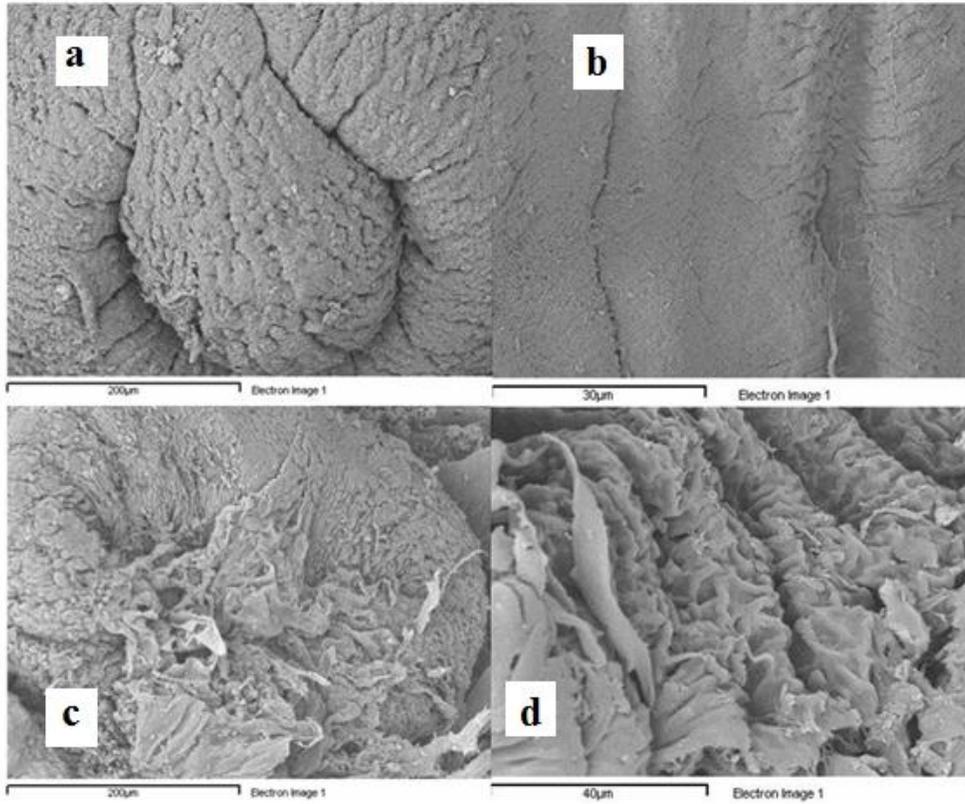
**Figura 6.** Microfotografías de cortes longitudinales de lombrices *E. fétida* expuestas al cadmio por la prueba de contacto. (a) Lombriz control, (b) lombriz expuesta al cadmio con constricción en segmentos VII-XII, (c) lombriz con daño ventral y hemorragia interna.



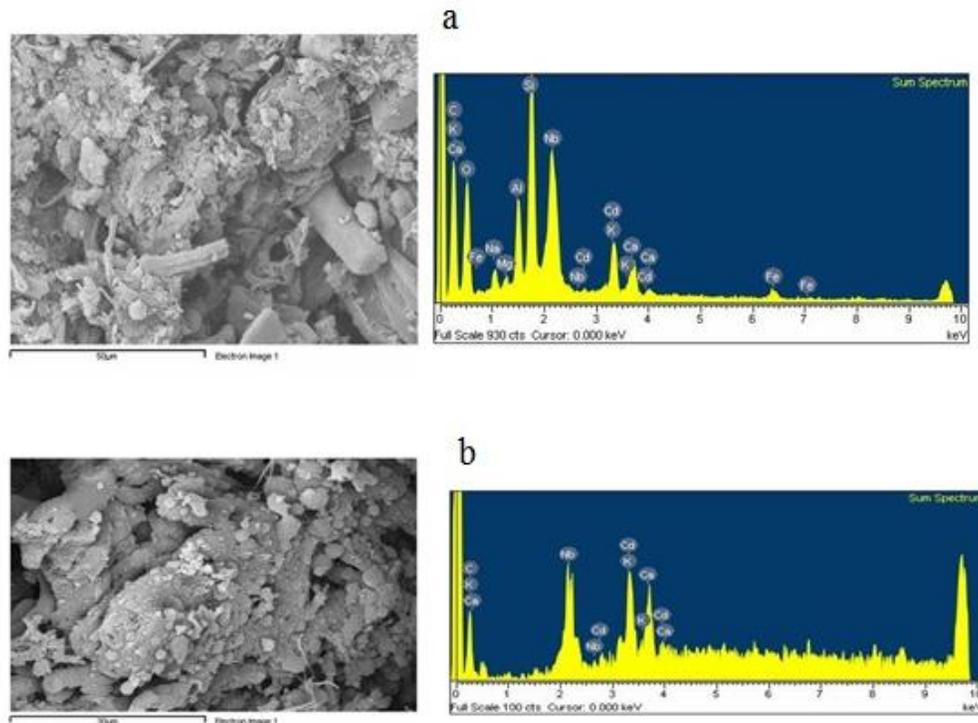
**Figura 7.** Microfotografías del daño estructural causado por los metales cadmio y plomo en las lombrices *E. fetida* y *A. gracilis*. (a) Estructura normal lombriz control, (b) desprendimiento de la cutícula, (c) desprendimiento de la epidermis y (d) desorganización de la capa muscular.

Los efectos causados por el cadmio fueron analizados por microscopía electrónica de barrido (SEM). Las lombrices control mostraron una integridad normal de la región del prostomio y superficie corporal (figura 8 a, b). Por el contrario, en las lombrices expuestas al cadmio ocurrió un desprendimiento y pérdida de cutícula en el prostomio (figura 8 c), además, de un encogimiento de los segmentos, plegamiento de la epidermis y desprendimiento de la capa muscular (figura 8 d). La localización del cadmio dentro del cuerpo se exploró por microanálisis de rayos-X (EDX) en muestras preparadas por SEM. El cadmio no se detectó en la superficie externa de las lombrices, pero sí se encontró en la secreción de moco cutáneo, desechos celulares y en el tejido cloragógeno (figura 9 a, b). El estudio a través de microscopía de luz y microscopía de barrido en secciones transversales mostraron al tejido intestinal con el epitelio cloragógeno (figura 10 a, b). Este epitelio está formado por una sola capa de células columnares que en presencia de cadmio se observan desprendidas de su membrana basal (figura 10 c, d), y como ya se mencionó anteriormente,

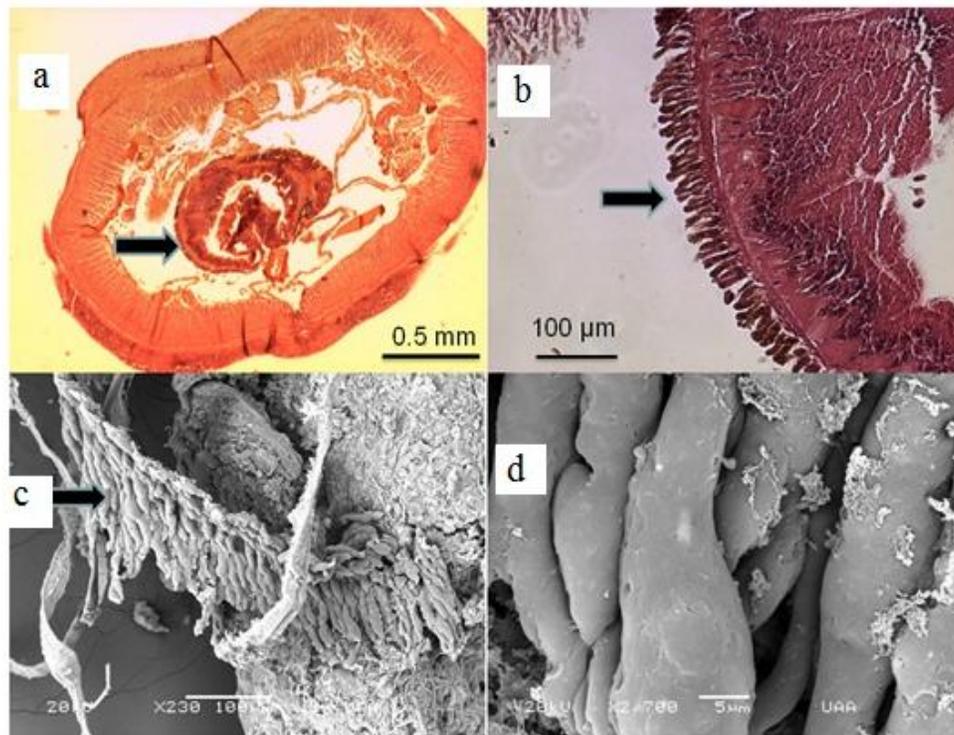
el análisis por microscopía de rayos-X, indicó la presencia de cadmio en esta preparación (figura 5 b).



**Figura 8.** Microfotografías electrónicas de barrido. (a) prostomio de lombrices control, (b) pared muscular control (c) Prostomio de una lombriz expuesta y (d) pared muscular. En ambos se aprecia la ruptura de la cutícula y constricción segmental.



**Figura 9.** Microfotografías electrónicas de barrido con análisis de dispersión de rayo x. (a) secreción mucosa de lombrices estimuladas con cadmio y espectrograma de barrido donde se puede observar el pico de emisión del cadmio y otros metales. (b) muestra de tejido cloragógeno y espectrograma con picos característicos del cadmio.



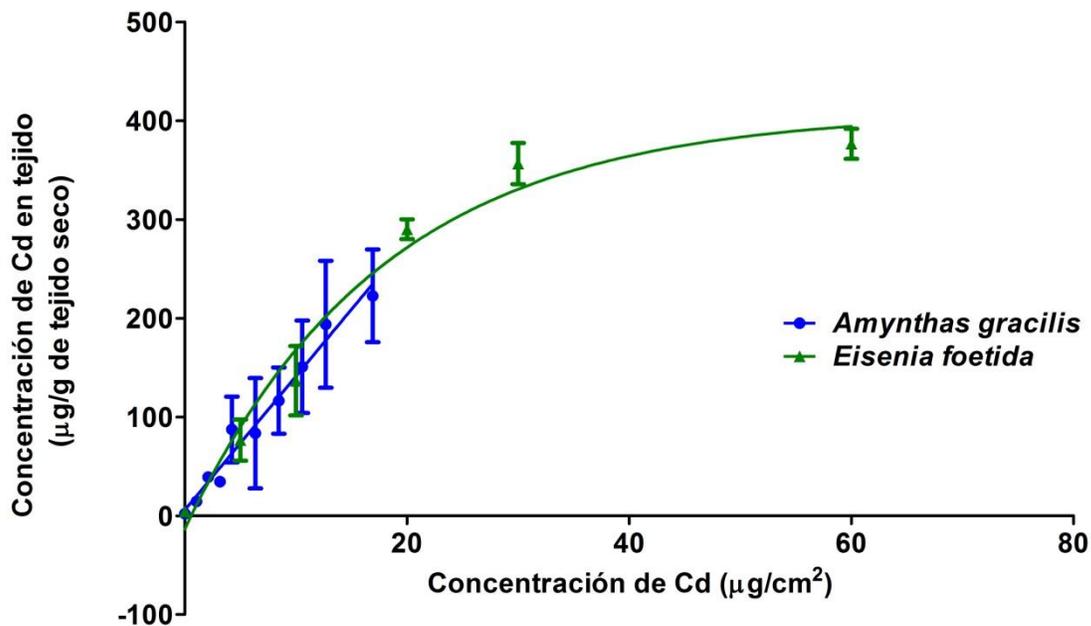
**Figura 10.** Cortes transversales de lombrices contaminadas con cadmio. (a) Microfotografía de una sección distal mostrando el intestino, (b) ampliación donde se indica la presencia del tejido cloragógeno. (c) Microfotografía electrónica de barrido del tejido cloragógeno y (d) Células de epitelio cloragógeno donde se localizó el cadmio.

#### **6.4. Bioacumulación del cadmio y del plomo en los tejidos de las lombrices por contacto.**

##### **6.4.1. Bioacumulación de cadmio.**

En la figura 11 se muestran las concentraciones de Cd acumuladas en los tejidos de las lombrices *A. gracilis* y *E. fétida* a través de su exposición por contacto al final del tiempo de exposición. Se encontró que ambas lombrices acumularon el metal de una manera dependiente de la concentración externa. Para el caso de la lombriz *A. gracilis*, la concentración de cadmio acumulada con respecto a la concentración en el papel filtro, fue analizada por una regresión lineal de dichas variables e indicó una correlación directa entre las concentraciones corporales del Cd y las concentraciones de exposición ( $r = 0.88$ ). Por lo tanto, se puede decir que a medida que se incrementó la concentración del metal en el papel

filtro, aumentó su acumulación en las lombrices. Es importante mencionar que en las lombrices control se encontró una concentración de  $2.17 \pm 0.76 \mu\text{g}$  de Cd /g de tejido seco y en las lombrices expuestas, las concentraciones variaron desde  $14.84 \pm 2.03$  a  $233.99 \pm 42.59 \mu\text{g}$  de Cd /g de tejido seco. El factor de bioacumulación (FBA) definido como el cociente de la concentración alcanzada en el tejido con respecto a la concentración del papel filtro se calculó a través del valor de la pendiente y fue  $\text{FBA} = 14$ . En las lombrices control de la especie *E. fétida* (figura 11) se encontró una concentración basal de  $4.2 \pm 1$ , mientras que en las lombrices expuestas, las concentraciones variaron desde  $76.66 \pm 20.81$  a  $376.76 \pm 15.27 \mu\text{g}$  de Cd /g de tejido seco. Para el análisis de estos datos se utilizó un modelo de un crecimiento exponencial con saturación, el  $\text{FBA} = 17.8$ .

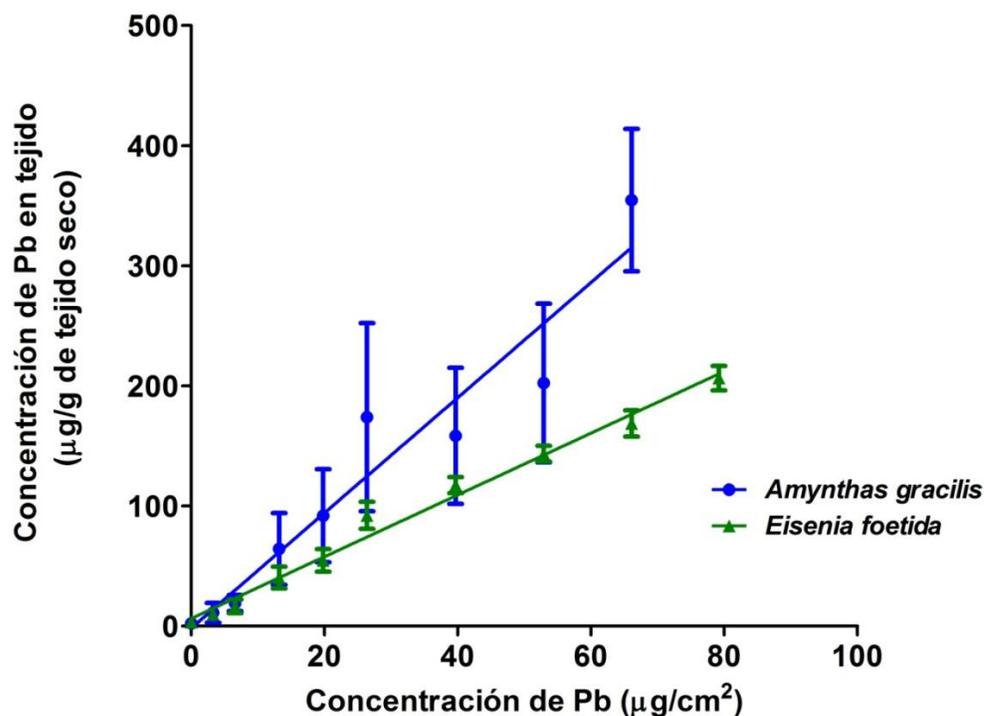


**Figura 11.** Concentraciones de cadmio acumuladas en los tejidos de las lombrices *A. gracilis* y *E. fétida* después de su exposición por contacto. Cada punto representa la media  $\pm$  la desviación estándar de tres determinaciones.

#### 6.4.2. Bioacumulación del plomo.

La figura 12, muestra las concentraciones de Pb acumuladas por las lombrices *A. gracilis* y *E. fétida* mediante su exposición por contacto. Para el caso de la lombriz *A. gracilis*, la

concentración de plomo acumulada en la lombriz con respecto a la concentración en el papel filtro, fue analizada por una regresión lineal de dichas variables, el análisis de regresión lineal entre las dos variables indicó una correlación directamente proporcional entre las concentraciones de los tejidos y las de exposición ( $r = 0.9$ ). La concentración encontrada en los testigos fue de  $2.23 \pm 0.60 \mu\text{g}$  de Pb /g de tejido seco y en las expuestas se detectaron valores desde  $11.16 \pm 8.21$  a  $354.62 \pm 59.31 \mu\text{g}$  de Pb /g de tejido seco, con un  $\text{FB} = 4.8$ . Para la lombriz *E. fétida*, se encontró una concentración basal  $3.5 \pm 1.8$ , mientras que en las lombrices expuestas, las concentraciones variaron desde  $10.00 \pm 4.61$  a  $206.48 \pm 10.15 \mu\text{g}$  de Pb /g de tejido seco. El factor de bioacumulación fue menor que para *A. gracilis*  $\text{FB} = 2.6$

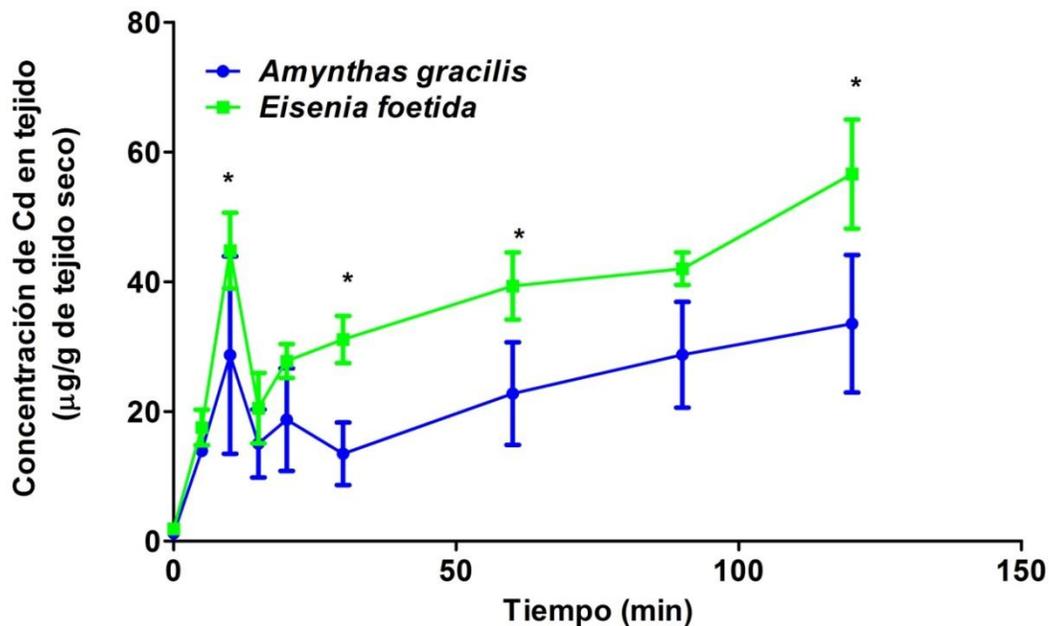


**Figura 12.** Concentraciones de plomo acumuladas en los tejidos de las lombrices *A. gracilis* y *E. fétida* después de su exposición por contacto. Cada punto representa la media  $\pm$  la desviación estándar de tres determinaciones.

## **6.5. Bioacumulación del cadmio y del plomo en los tejidos de las lombrices por inmersión.**

### **6.5.1. Curso temporal de la bioacumulación del cadmio.**

El curso temporal de captación del Cd por las lombrices durante su exposición por inmersión al Cd, se muestra en la figura 13. En la ordenada se exponen las concentraciones corporales del Cd y en la abscisa, se grafica el tiempo de exposición (0 a 120 minutos). Cada concentración representa una media de tres determinaciones. La concentración encontrada en los controles fueron de  $1.24 \pm 0.59 \mu\text{g Cd /g de tejido seco}$ , cuyos valores son similares a los de los controles expuestas por contacto. Se observó que en los primeros 10 minutos de exposición, la concentración de Cd en los tejidos se incrementó hasta alcanzar un pico máximo de  $28.06 \pm 14.72 \mu\text{g Cd /g de tejido seco}$  ( $p < 0.001$ ), después las concentraciones tendieron a disminuir hasta los 30 minutos de exposición ( $13.64 \pm 4.97 \mu\text{g Cd /g de tejido seco}$ ). Al pasar este tiempo, las concentraciones corporales nuevamente indicaron un ascenso continuo hasta llegar a los 120 minutos ( $33.17 \pm 10.36 \mu\text{g Cd /g de tejido seco}$ ). El análisis de varianza ( $F = 4.4$ ;  $p = 0.002$ ) mostró que hubo diferencias estadísticamente significativas entre medias. La comparación de acuerdo a la prueba de Dunett entre las medias de los controles y tratados, fue diferente con respecto a los valores de todos los tiempos. La comparación de pares de medias experimentales fue hecha con un análisis de comparación múltiple (Rosner, 1982), sobresaliendo la diferencia de las medias de 60, 90, y 120 min ( $p < 0.05$ ) con respecto a las medias de los tiempos de 5, 15, 20, 30 min, y la no diferencia entre los tiempos de 60, 90 y 120 contra el valor pico a los 10 min ( $p > 0.1$ ). Un análisis de varianza de dos vías, mostró diferencias en la bioacumulación entre las especies *A. gracilis* y *E. fétida* a los tiempos de 10, 30, 60 y 120 min.



**Figura 13.** Curso temporal de captación del cadmio en el tejido de la lombriz de tierra *A. gracilis* y *E. fétida* después de su exposición a diferentes tiempos por inmersión. Cada punto representa la media  $\pm$  la desviación estándar de tres determinaciones.

### 6.5.2. Curso temporal de la bioacumulación del plomo por inmersión.

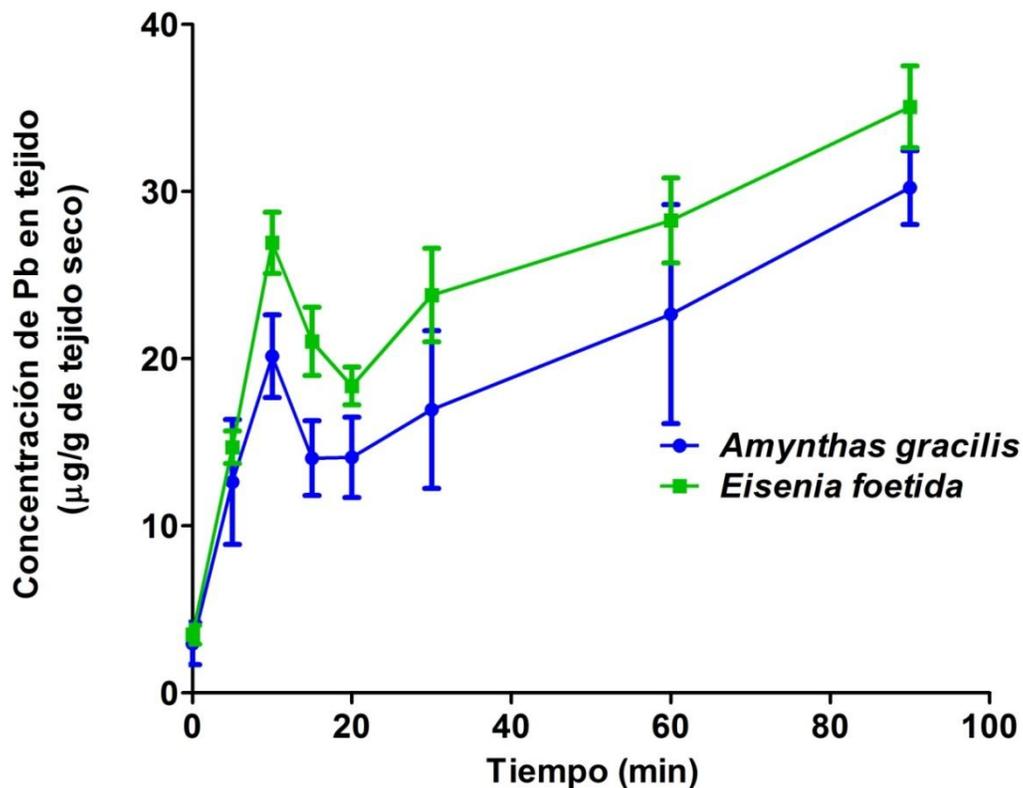
En la figura 14 se observa el curso temporal de captación por las lombrices durante su exposición por inmersión al Pb. Al igual que con el Cd, se hizo una valoración de 0 a 120 minutos; cada concentración representa una media de tres determinaciones. Con este metal la concentración en los tejidos control fue de  $2.98 \pm 1.55 \mu\text{g Pb/g}$  de tejido seco, la concentración de plomo en los tratados, se incrementó ligeramente a los 10 minutos de exposición ( $20.13 \pm 2.48 \mu\text{g Pb/g}$  de tejido seco,  $p < 0.05$ ), después la concentración fue en descenso hasta los 20 minutos, tiempo en el que nuevamente empezó a incrementar en forma constante hasta los 120 minutos, cuyo valor se registró en  $54.27 \pm 6.12 \mu\text{g Pb/g}$  de tejido seco ( $F = 38.8$  ;  $p \ll 0.001$ ).

Para ambos metales se puede observar en las figuras mencionadas que existe un patrón de concentración en los tejidos semejante; primero se observó un aumento a los 10 minutos, luego un descenso hasta los 20 y 30 minutos, después el patrón de concentración es ascendente sin interrupción hasta los 120 minutos de exposición. Con la prueba de Dunnett

se encontró que todos los valores experimentales fueron estadísticamente diferentes con respecto al control ( $p < 0.05$ ). El análisis estadístico con una prueba de comparación múltiple reveló que el valor del pico de 10 min fue diferente a los valores de 0, 5, 60, 90 y 120 min, y que los valores de 60, 90 y 120 min fueron diferentes con respecto a los valores de los tiempos cortos (5, 15, 20 y 30 min). El análisis de varianza de dos vías, mostró que no hubo diferencias en la bioacumulación entre las especies *A. gracilis* y *E. fétida*.

#### **6.6. Efectos del Cd y Pb sobre la contracción muscular de los tejidos de la lombriz de tierra *A. gracilis*.**

Otra tarea de este trabajo fue demostrar la toxicidad del Cd y Pb a nivel de la contracción muscular en los tejidos buche molleja y pared muscular. Para demostrarlo desarrollamos la metodología descrita en material y métodos. Como no existían datos en la literatura al respecto, primeramente se determinó el comportamiento de la contracción muscular de los tejidos; intestinal (sección buche-molleja) y pared corporal.



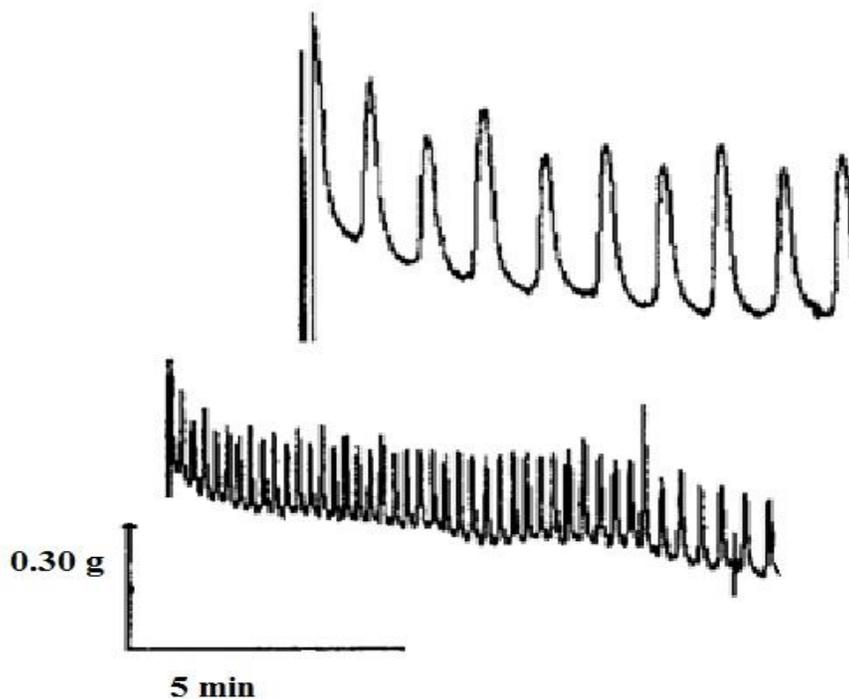
**Figura 14.** Curso temporal de captación del Pb en el tejido de la lombriz de tierra *A. gracilis* y *E. fétida* después de su exposición a diferentes tiempos por inmersión. Cada punto representa la media  $\pm$  desviación estándar de tres determinaciones.

La contracción muscular espontánea del tejido buche-molleja de lombrices control se midió como la fuerza de contracción en gramos en la ordenada y como el tiempo registrado en la abscisa. Dicho tejido se contrajo y se relajó rítmicamente con una frecuencia de 4 ciclos por minuto y con una fuerza de contracción de 0.2 a 0.5 gf (figura 15). Una ampliación de los primeros tres minutos se ilustra en la parte superior de la figura 15, donde se observaron claramente las fases de contracción y relajación del tejido.

Efecto de la acetilcolina sobre la contracción muscular del tejido buche-molleja.

Para determinar la funcionalidad de este tejido (tejido liso) generalmente se utilizan algunas sustancias o iones cuya función es la de promover la contracción muscular (Mahmod y Huddart, 1993). Iones como el  $K^+$  y el  $Ca^{2+}$ , o bien un neurotransmisor como la

acetilcolina, son los indicados. En la figura 16 se muestra el efecto de la acetilcolina a 32  $\mu\text{g/mL}$ , sobre la contracción muscular espontánea de este tejido. Como puede observarse, las contracciones espontáneas típicas de este tejido se registraron normalmente con una fuerza de contracción de  $0.57 \pm 0.04$  gf,  $n = 6$ , pero al adicionar la acetilcolina la fuerza de contracción aumentó significativamente alcanzando aproximadamente el doble ( $1.04 \pm 0.1$  gf,  $n = 6$ ,  $p < 0.001$ ) para posteriormente descender paulatinamente sin llegar a la tensión basal inicial. Durante su descenso, el tejido siguió presentando contracciones espontáneas, pero con una fuerza mínima ( $0.06 \pm 0.01$  g,  $n = 6$ ,  $p < 0.001$ ) y con ciclos mucho más rápidos que los efectuados antes de agregar la acetilcolina.



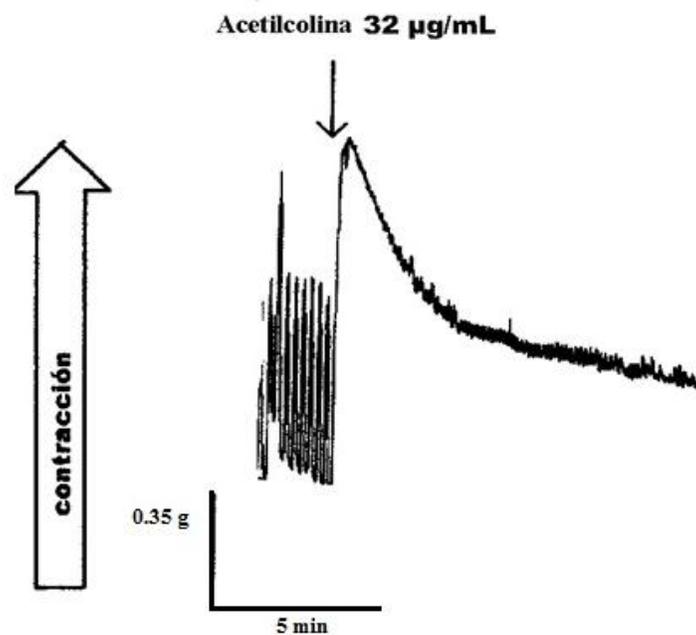
**Figura 15.** Contracción muscular espontánea del tejido buche-molleja de *A. Gracilis*; la parte superior es una ampliación de los primeros 3 minutos.

La espiga amplia generada es el resultado típico del efecto de la acetilcolina sobre la contracción muscular de este tipo de tejido. De esto se desprende que el tejido buche-

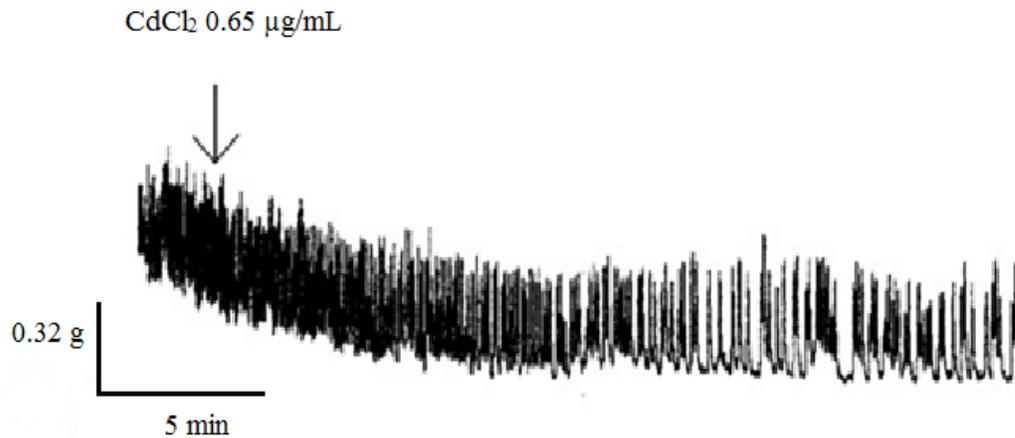
molleja es completamente funcional para determinar el efecto del Cd y Pb en la contracción muscular.

### 6.6.1 Efecto del Cd y el Pb sobre la contracción muscular del tejido buche-molleja de *A. gracilis*

Al relacionar el valor de la  $CL_{50}$  con la concentración de cadmio alcanzada en los tejidos de las lombrices expuestas por contacto, encontramos un valor de aproximadamente  $65 \mu\text{g} / \text{g}$  de tejido seco. Inicialmente se evaluó una dosis menor de  $0.65 \mu\text{g}/\text{mL}$  Cd en la preparación del tejido buche-molleja. La figura 17 muestra la actividad del tejido antes de adicionar el Cd, indicando ciclos de contracción y relajación rápidos.



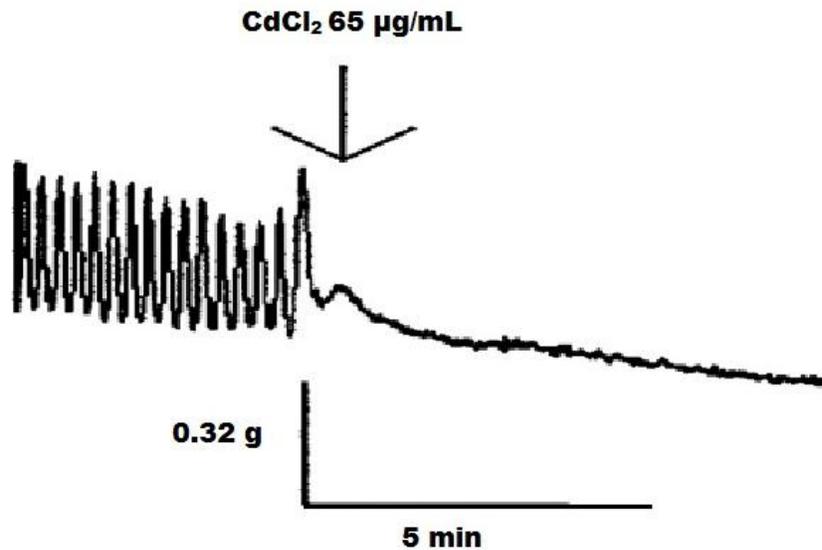
**Figura 16.** Efecto de la acetilcolina sobre la contracción muscular del tejido buche-molleja de *A. gracilis*; el trazo es representativo de 5 registros.



**Figura 17.** Efecto del Cd sobre la contracción muscular del tejido buche-molleja. El trazo es representativo de 6 registros.

Cada una de las espigas se encimó una con otra con una fuerza de contracción  $0.47 \pm 0.06$  g,  $n = 6$ ; al agregar el Cd prácticamente no pasó nada 3 minutos después ( $0.49 \pm 0.04$  g,  $n = 6$ ). Su efecto se puede apreciar aproximadamente a los 6 minutos de exposición; las espigas se empezaron a espaciar, pero sin llegar a afectar el tamaño de ellas ( $0.48 \pm 0.07$  g,  $n = 6$ ). Si se comparan las frecuencias de los ciclos finales de contracción con las del inicio, se puede decir que a esta concentración el Cd ejerce cierto efecto inhibitorio en la contracción de este tejido.

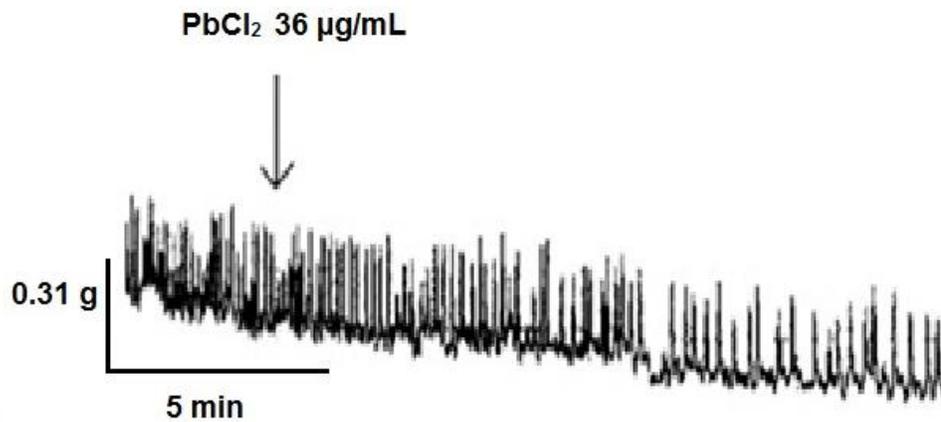
En la figura 18 se muestra el efecto del Cd a una concentración de  $65 \mu\text{g/mL}$  en el mismo tejido. Inicialmente se observó una actividad espontánea normal con ciclos de contracción y relajación de 4 por minuto, con una fuerza de contracción de  $0.36 \pm 0.05$  g,  $n = 6$ . Cuando se adicionó el Cd, hubo una inhibición total a los 26 segundos, y se refleja por la ausencia de espigas en el trazo ( $0.04 \pm 0.005$  g,  $n = 6$ ). Esto significa que a concentraciones por arriba de  $65 \mu\text{g/mL}$ , tienen un efecto completamente inhibitorio de la actividad muscular de este tejido.



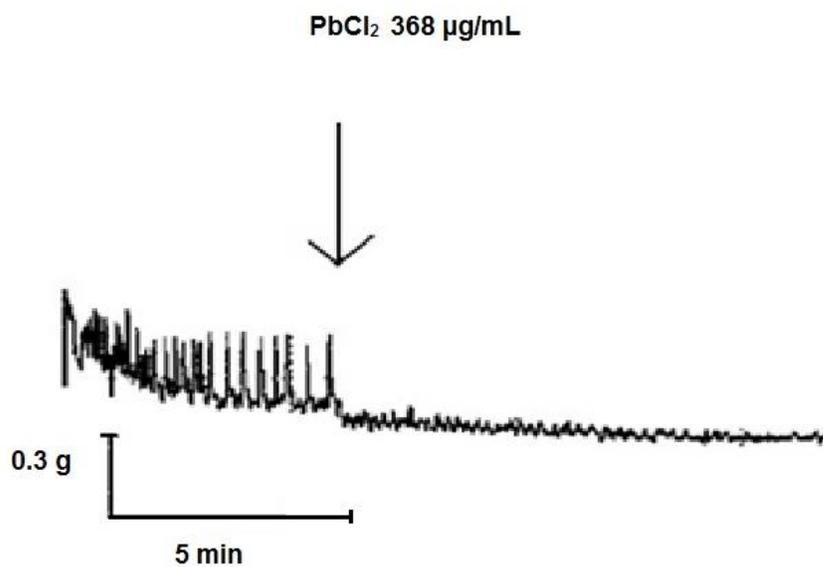
**Figura 18.** Efecto del Cd sobre la contracción muscular del tejido buche-molleja *A. gracilis*. El trazo es representativo de 6 registros.

En estos ensayos también se tomó en consideración la  $CL_{50}$  del Pb y los niveles encontrados en los tejidos. La figura 19 muestra un trazo de la actividad basal espontánea de la contracción muscular cuya fuerza se estimó en un valor de  $0.31 \pm 0.04$  g,  $n = 6$ , con ciclos rítmicos de contracción y relajación de 6 por minuto. Se muestra que a una concentración de  $36 \mu\text{g/mL}$  de cloruro de plomo, los ciclos de contracción y relajación se empezaron a separar paulatinamente a los 11 minutos aproximadamente, sin llegar a bajar la fuerza de contracción ( $0.28 \pm 0.05$  g,  $n = 6$ ). Este comportamiento también se observó con el Cd a la concentración de  $0.6 \mu\text{g/mL}$ .

En la figura 20 se observa el efecto del Pb a una concentración de  $368 \mu\text{g/mL}$ . El trazo inicial muestra a la actividad basal con una fuerza de contracción de  $0.31 \pm 0.02$  g,  $n = 6$ , y una frecuencia en los ciclos de contracción y relajación de 6 por minuto. Al adicionar el Pb este comportamiento desapareció notablemente ( $0.08 \pm 0.01$  g,  $n = 6$ ,  $p < 0.005$ ), los parámetros descritos anteriormente se redujeron al máximo y al final de la exposición desaparecieron. Lo anterior indica que esta concentración posee un efecto inhibitorio total de la contracción muscular de este tejido.



**Figura 19.** Efecto del Pb sobre la contracción muscular del tejido buche-molleja de la lombriz *A. gracilis*. Trazo representativo de 6 registros.

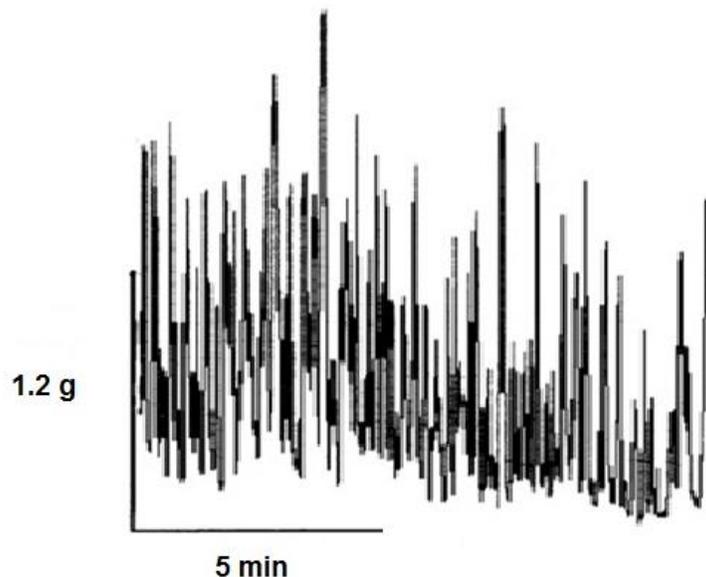


**Figura 20.** Efecto del Pb sobre la contracción muscular del tejido buche-molleja de la lombriz de tierra *A. gracilis*. Trazo representativo de 6 registros.

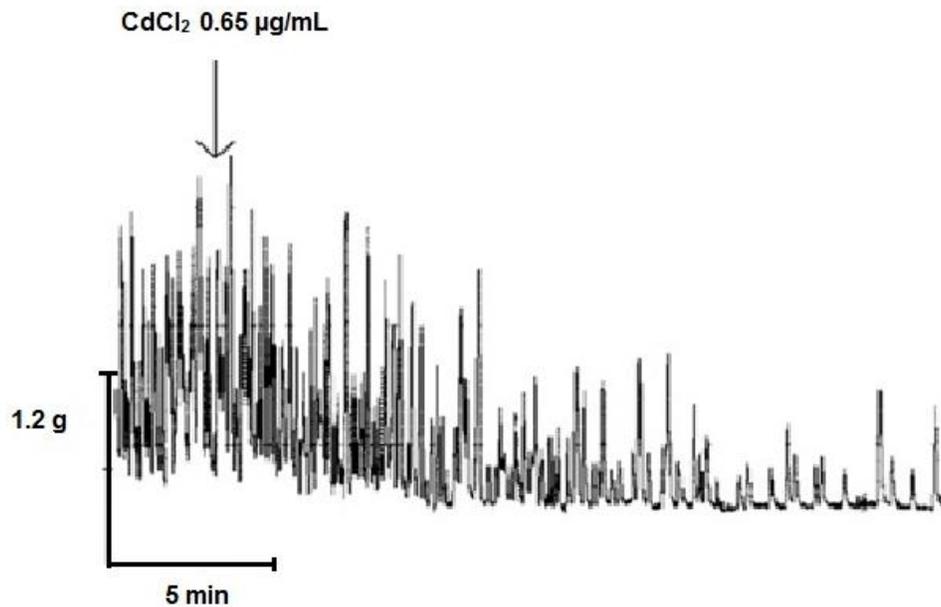
### 6.6.2 Efecto del Cd y el Pb sobre la contracción muscular del tejido de la pared corporal.

La contracción de la pared corporal basal se ilustra en la figura 21, en donde se puede apreciar principalmente una fuerza de contracción de mayor magnitud que la registrada para el tejido buche-molleja. La actividad de la contracción ilustrada en la figura es característica de este tejido (Bieger y Hornykiewicz, 1972).

El efecto del Cd en la pared corporal se muestra en la figura 22. La actividad basal de este tejido y el efecto del Cd a una concentración de  $0.6 \mu\text{g/mL}$  se evaluó como en la molleja. Al principio se observó la actividad basal de la contracción normal, con una fuerza de contracción de  $1.38 \pm 0.15 \text{ g}$ ,  $n = 6$ ; al adicionar el Cd, esta fuerza se fue perdiendo con el tiempo. Los ciclos de contracción y relajación también fueron disminuyendo de tal forma que a los 8 minutos, el tamaño de las espigas eran de  $0.632 \pm 0.166 \text{ g}$ ,  $n = 6$ ,  $p < 0.05$ . Esto significa que a una concentración como la antes referida el Cd afecta profundamente esta actividad, aunque no inmediatamente, pero si con el tiempo.



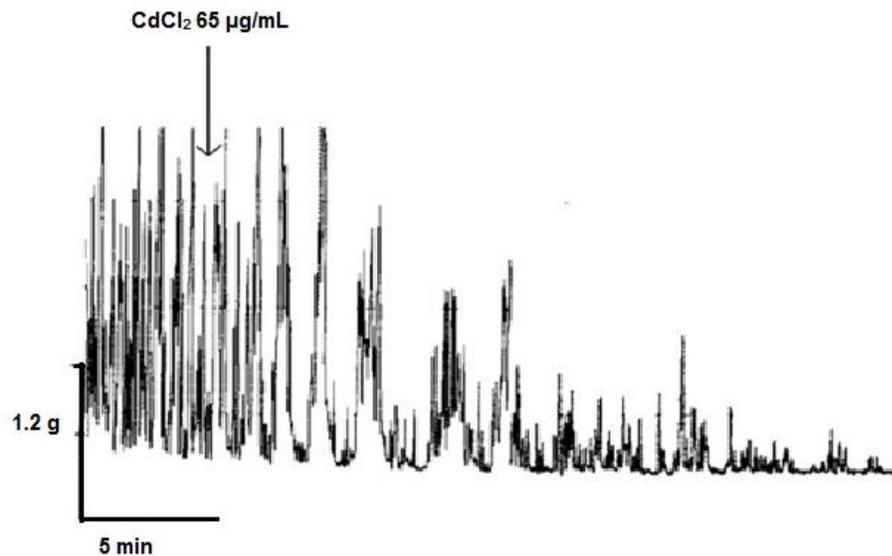
**Figura 21.** Trazo ilustrativo de la contracción muscular basal de la pared corporal de la lombriz *A. gracilis*. Trazo representativo de 6 experimentos.



**Figura 22.** Efecto del Cd sobre la contracción muscular de la pared corporal de la lombriz de tierra *A. gracilis*. Trazo representativo de 6 registros.

Posteriormente este tejido se trató con una concentración de  $65 \mu\text{g/mL}$ , y su efecto se muestra en la figura 23, primeramente se ilustra la fuerza de contracción basal cuyo valor fue  $2.0 \pm 0.38 \text{ g}$ ,  $n=6$  y al agregar el Cd los ciclos de contracción y relajación tendieron a disminuir hasta finalmente desaparecer. Finalmente, al pasar 5.5 minutos, la fuerza de contracción disminuyó a  $1.26 \pm 0.59 \text{ g}$ ,  $p < 0.05$ , posteriormente las espigas se fueron separando cada vez más hasta llegar a su pérdida total. De esto puede decirse que concentraciones por arriba de  $65 \mu\text{g/mL}$  de Cd resultan altamente inhibitorias para la contracción muscular de la pared corporal de la lombriz. La comparación entre los dos tejidos, permite establecer un efecto inhibitorio aún a concentraciones de  $0.6 \mu\text{g/mL}$ .

El efecto del plomo en este tejido, se analizó con las mismas concentraciones utilizadas en la preparación buche-molleja. Con la concentración de Pb  $36 \mu\text{g/mL}$  no se observaron efectos de inhibición, en cambio la concentración de  $368 \mu\text{g/mL}$ , si presentó un efecto inhibitorio en este tejido (figura 24); los ciclos de contracción y relajación muscular se fueron separando después de los 5 minutos y si se compara la fuerza de contracción inicial ( $2.01 \pm 0.16 \text{ g}$ ,  $n = 6$ ) con la final ( $0.66 \pm 0.15 \text{ g}$ ,  $n = 6$ ,  $p < 0.05$ ), se observa una disminución considerable.



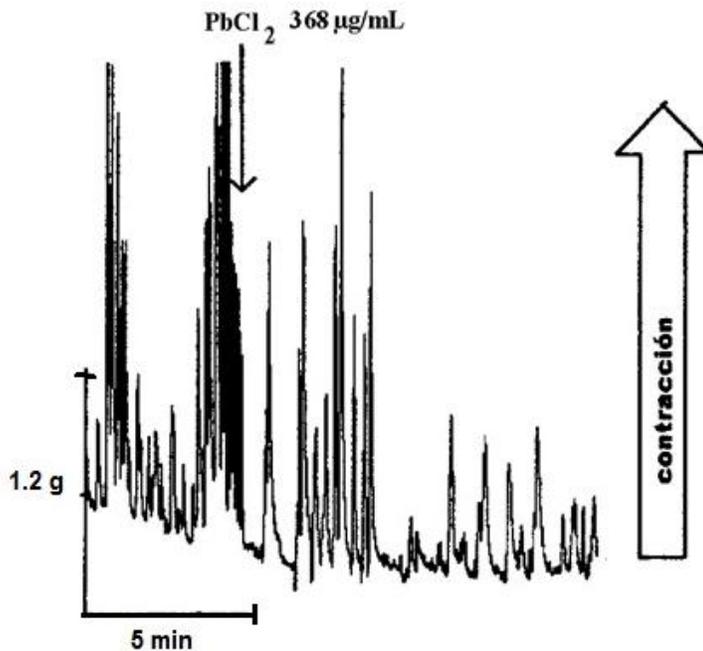
**Figura 23.** Efecto del Cd sobre contracción muscular de la pared corporal de la lombriz de tierra *A. gracilis*. Trazo representativo de 6 registros.

Al comparar el efecto del plomo entre los dos tejidos, se concluye que este metal presenta un efecto más inhibitorio en el tejido buche-molleja (sistema digestivo), que en la pared corporal (incluye cubierta externa, segmentos, etc.).

### **6.7 Comportamiento evasivo de las lombrices en suelos controles.**

Las observaciones hechas de la toxicidad del cadmio y plomo en las pruebas de contacto y las de inmersión, así como la literatura, nos llevó a sugerir que la conducta de escape o de evasión de las lombrices a sustancias tóxicas, podría ser una forma más cercana de ensayar la toxicidad y comparar los resultados con el medio natural de las lombrices. Por lo tanto, se plantearon experimentos de comportamiento de escape en medios conteniendo suelo artificial control y suelo contaminado con los metales Cd y Pb.

Para conocer el patrón de distribución de las lombrices en una cámara, se realizaron las series experimentales con 10 lombrices en una cámara con suelo artificial sin división y sin los metales (como se describió en la metodología).



**Figura 24.** Efecto del Pb sobre la contracción muscular de la pared corporal de la lombriz de tierra *A. gracilis*. Trazo representativo de 5 registros.

Después de dos días el suelo se revisó con cuidado y se procedió a retirar parte de éste desde la línea media hacia los extremos, primero una mitad y después la otra, se encontró una distribución al azar de las lombrices, permanecieron en el fondo del suelo. Los porcentajes obtenidos de cada parte fueron de 52 y 48 % por cada mitad o parte. Las lombrices se encontraron mayoritariamente en las paredes de la cámara en relación a la parte central.

### **6.7.1 Comportamiento evasivo de las lombrices *A. gracilis* en suelos contaminados con Cd o Pb.**

En este caso si se utilizó una cámara con una barra divisoria como se describió en los métodos. Cuando las lombrices se colocaron en el compartimiento con suelo contaminado de Cd, inmediatamente detectaron la presencia del metal, tendieron a escapar y varias de ellas cruzaron la línea divisoria hacia el compartimiento testigo. A los 5 minutos se observó una migración del 80 % hacia el control. Al final del período de dos días, cuando se retiró el suelo artificial para contar las lombrices en cada lado de la cámara, el porcentaje aumentó a un 93 %, la prueba de Chi-cuadrada proporcionó una diferencia significativa con

un valor de  $p < 0.001$  (tabla 5), sin embargo, el resto permanecía en el suelo contaminado sin signos de intoxicación. La contraparte consistió en colocar a las lombrices en el compartimiento control. Se observó que un 89 % de ellas cavaron preferentemente en el suelo control, algunas cruzaban a la parte contaminada con Cd, pero luego retornaban al suelo control. Sin embargo, al final de los dos días se encontró solo un 11 % de ellas en el suelo contaminado. Estas lombrices presentaban un aspecto normal, sin signos de intoxicación aparentes.

El procedimiento con el Pb fue el mismo que con el Cd, las lombrices se colocaron en el suelo contaminado con Pb, a los 5 minutos se observó un 80 % de su migración al compartimiento control. Dos días después, el promedio de permanencia en este suelo fue el mencionado anteriormente, la prueba de chi-cuadrada resultó altamente significativa  $p < 0.001$  (tabla 6). El resto que permaneció en el suelo contaminado se encontró hasta el fondo sin daños visibles a simple vista. La tabla 6 también muestra los porcentajes de las lombrices que fueron encontradas en el suelo control; el 83 % ellas cavaron y permanecieron en este suelo, un 17 % migró al suelo contaminado y ahí permanecieron hasta los dos días, con aspecto normal.

<b>Tabla 5.</b> Distribución en % de las lombrices en un suelo artificial con y sin cadmio ( $65\mu\text{g/g}$ ), después de un período de dos días.			
		Lombrices colocadas en lado "B"	Lombrices colocadas lado "A"
Lado A	Control (52%)	Control (93%)	Control (89%)
Lado B	Control (48%)	Cd (7%)	Cd ( $65\mu\text{g/g}$ ) (11%)
<ul style="list-style-type: none"> <li>Las flechas indican migración de las lombrices</li> </ul>			

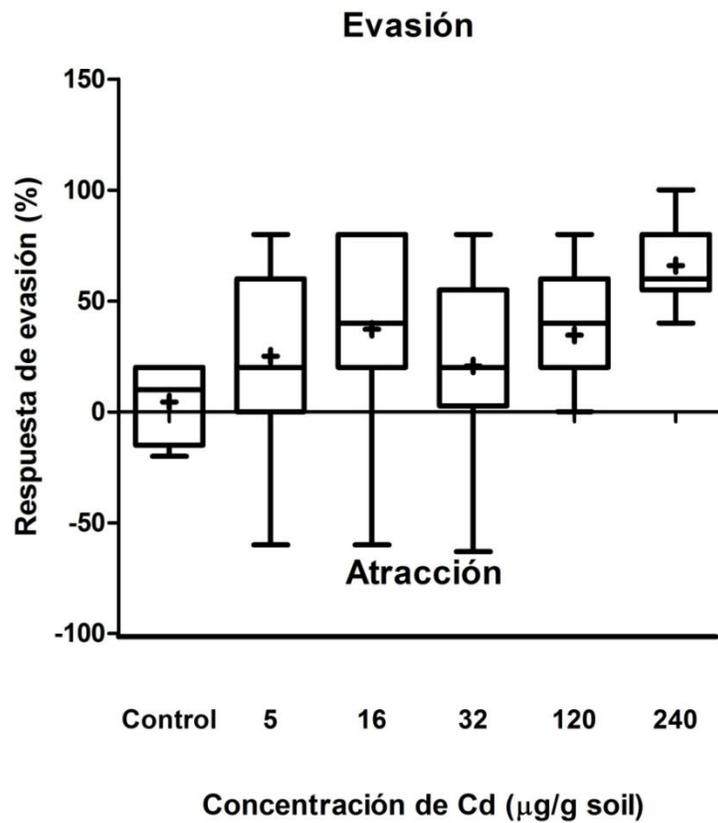
<b>Tabla 6.</b> Distribución en % de las lombrices en un suelo artificial con y sin plomo ( $65\mu\text{g/g}$ ), después de un período de dos días.			
		Lombrices colocadas en lado "B"	Lombrices colocadas lado "A"
Lado A	Control (52%)	Control (80%)	Control (83%)
Lado B	Control (48%)	Pb (20%)	Pb (17%)
<ul style="list-style-type: none"> <li>Las flechas indican migración de las lombrices</li> </ul>			

### **6.7.2 Comportamiento evasivo de la lombriz de tierra *E. fétida* en medios contaminados con cadmio o plomo.**

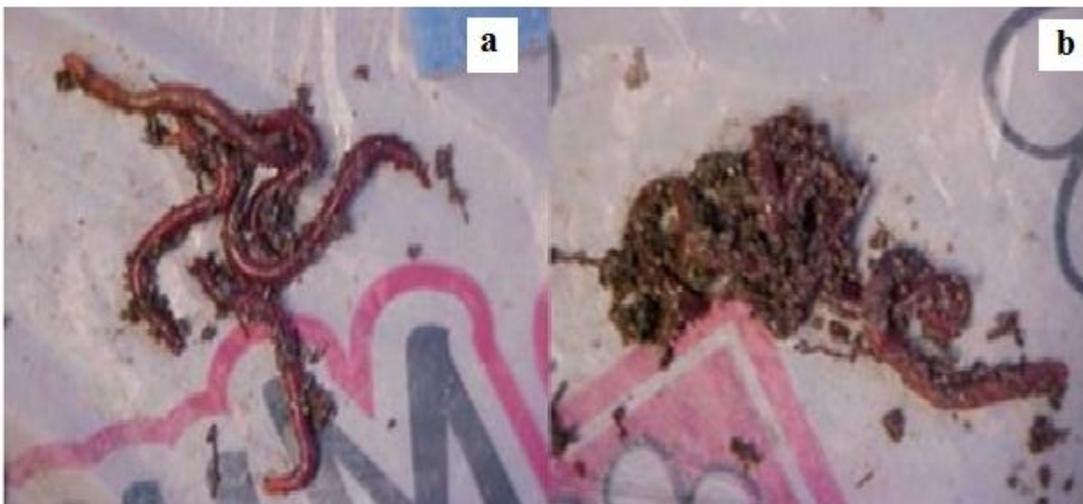
Las pruebas de comportamiento evasivo fueron llevadas a cabo para examinar interacciones con el cadmio y el plomo presentes en el suelo. La mortalidad en estas pruebas fue de 1.6 %. En las pruebas de control dual, las lombrices fueron distribuidas al azar entre los dos lados de la cámara prueba con un rango de 40-60%. En esta prueba hubo una diferencia importante, ya que la barra divisoria se quita y las lombrices se colocan al centro de la caja de prueba. La figura 25 muestra los valores evasivos calculados de la distribución de las lombrices expuestas al cadmio, indicando un comportamiento evasivo del suelo con cadmio y una preferencia por el suelo control, aunque algunas lombrices escogieron permanecer en el suelo contaminado. La magnitud de la respuesta evasiva fue similar en todas las concentraciones probadas ( $p > 0.05$ , ns), excepto en la dosis de 240 donde resultó ser significativa ( $p < 0.05$ ). Las lombrices que escogieron permanecer en el suelo contaminado exhibieron signos de toxicidad claros y aparentes como partículas del suelo adheridas a la lombriz y una locomoción lenta (figura 26 a, b).

Las lombrices control en la prueba de evasión con el plomo, presentaron una distribución del 50-50%. La figura 27 muestra los valores evasivos calculados de la distribución de lombrices expuestas al plomo; en este caso, se observó un comportamiento de evasión

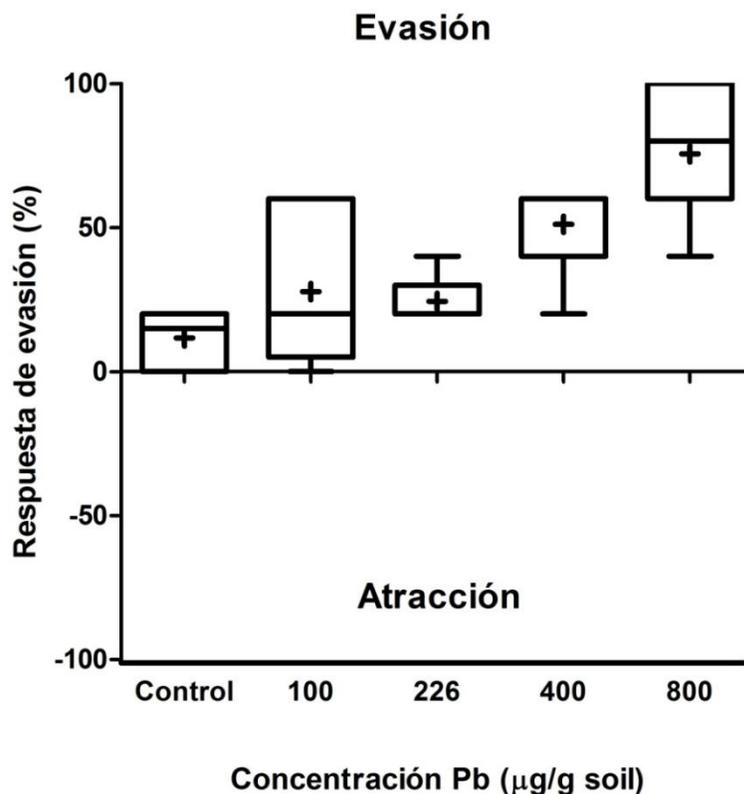
dependiente de la concentración del plomo en el suelo. Las lombrices expuestas a las concentraciones de 400 y 800  $\mu\text{g/g}$  de suelo fueron significativas respecto al control.



**Figura 25.** Prueba de evasión de la especie *E. fetida* en presencia de diferentes concentraciones de cadmio.



**Figura 26.** Fotografías que ilustran a las lombrices que se ubicaron en el suelo control (a); lombrices que no evitaron el suelo contaminado con cadmio (b).



**Figura 27.** Prueba de evasión de la especie *E. fétida* en presencia de diferentes concentraciones de plomo.

### **6.8 Análisis e integración de las pruebas de toxicidad de Cd y del Pb en las lombrices *A. gracilis* y *E. fétida***

La tabla 7 resume los resultados obtenidos a través de las diferentes pruebas realizadas con las lombrices de tierra *A. gracilis*. La  $CL_{50}$  para el cadmio en las pruebas de contacto fue de  $3.44 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , a esta concentración las lombrices capturaron  $52.7 \mu\text{g}/\text{g}$  de tejido seco. Con las pruebas de inmersión, a las dos horas las lombrices acumularon  $33.2 \pm 10.4 \mu\text{g}/\text{g}$  de tejido seco. Las concentraciones encontradas en los tejidos se encuentran cercanas a la concentración de  $65 \mu\text{g}/\text{mL}$  de cadmio, que fue la que generó un efecto completamente inhibitorio en la contracción del tejido buche-molleja. Una concentración cien veces menor ( $0.65 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) a la de  $65 \mu\text{g}/\text{mL}$ , también provocó inhibición sobre la contracción en el tejido mencionado. Las lombrices respondieron con una respuesta inmediata de escape a la presencia de  $65 \mu\text{g}/\text{g}$  de suelo.

En cuanto al plomo se encontró una concentración letal 50 de  $19.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  por contacto, a esta concentración la concentración corporal de Pb fue de  $94.2 \mu\text{g}/\text{g}$  de tejido seco. Aunque las lombrices se sumergieron en una concentración alta de Pb solamente acumularon  $54.3 \pm 6.1 \mu\text{g}/\text{g}$  de tejido seco. Concentraciones más pequeñas que  $36 \mu\text{g}/\text{mL}$  en los tejidos buche-molleja no afectaron la contracción muscular. Mientras que las concentraciones de  $36$  y  $368 \mu\text{g}/\text{mL}$  sí mostraron efecto inhibitorio en dicha función. En el tejido de la pared corporal la concentración inhibitoria fue de  $368 \mu\text{g}/\text{mL}$ .

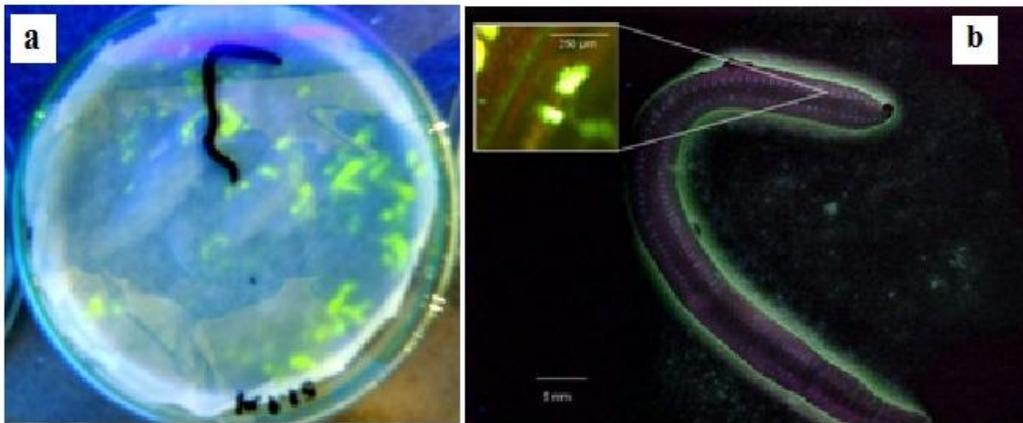
En los cálculos de las concentraciones para determinar la  $CL_{50}$ , por las pruebas de contacto se asumió, que el papel filtro no absorbe el metal, ya que la concentración letal 50 se reporta en  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , calculamos la cantidad en 1 mL de agua y entonces se pudo estimar la concentración en  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Al multiplicar la concentración por el área ( $56.7 \text{ cm}^2$ ), se obtuvieron valores de  $195 \mu\text{g}/\text{mL}$  para cadmio y de  $1106 \mu\text{g}/\text{mL}$  para plomo.

**Tabla 7.** Resultados finales de las concentraciones del Cd y del Pb en la lombriz *A. gracilis*.

Concentraciones y unidades	Cadmio	Plomo
Contacto $CL_{50}$ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	3.44	19.5
Acumulación por contacto $\mu\text{g}/\text{g}$ de tejido	52.7	94.2
Concentración Inmersión $\mu\text{g}/\text{mL}$	195	1106
Acumulación Inmersión $\mu\text{g}/\text{g}$ de tejido	$33.2 \pm 10.4$	$54.27 \pm 6.12$
Factor de bioacumulación	14.1	4.8
Concentraciones inhibitorias en tejido buche-molleja $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.6 65	36 368
Concentraciones inhibitorias en tejido pared corporal $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.65 65	368
Concentraciones para la prueba de escape $\mu\text{g}/\text{g}$ de suelo artificial	65	368

### 6.9 Estudio de la secreción mucosa cutánea por acción de los metales plomo y cadmio en *A. gracilis* y *E. fétida*.

Antes de la estimulación, todas las lombrices tuvieron una secreción mínima de moco, pero después del estímulo eléctrico, cadmio o plomo secretaron un fluido como mucoso viscoso, nuboso y amarillento. El efecto fue observado visualmente y también registrado por videomicroscopía (figura 35). La expulsión de moco por las lombrices, fue una respuesta inmediata que manifestaron al ser expuestas al cadmio ó plomo, en todas las pruebas de toxicidad realizadas. Por esta razón, este fenómeno se estudió con cuidado para determinar el mecanismo mediante el cual ocurre. En la figura 28a, se pueden observar a simple vista las manchas fluorescentes de la secreción mucosa de la lombriz de tierra *E. fétida* ante la exposición del plomo bajo una iluminación de luz ultravioleta. La figura 28 b, muestra a la lombriz de tierra *A. gracilis* rodeada por un halo fluorescente de moco al enfrentarla al plomo, en el recuadro se pueden observar dos manchas fluorescentes más intensas que corresponden a un par de quetas.

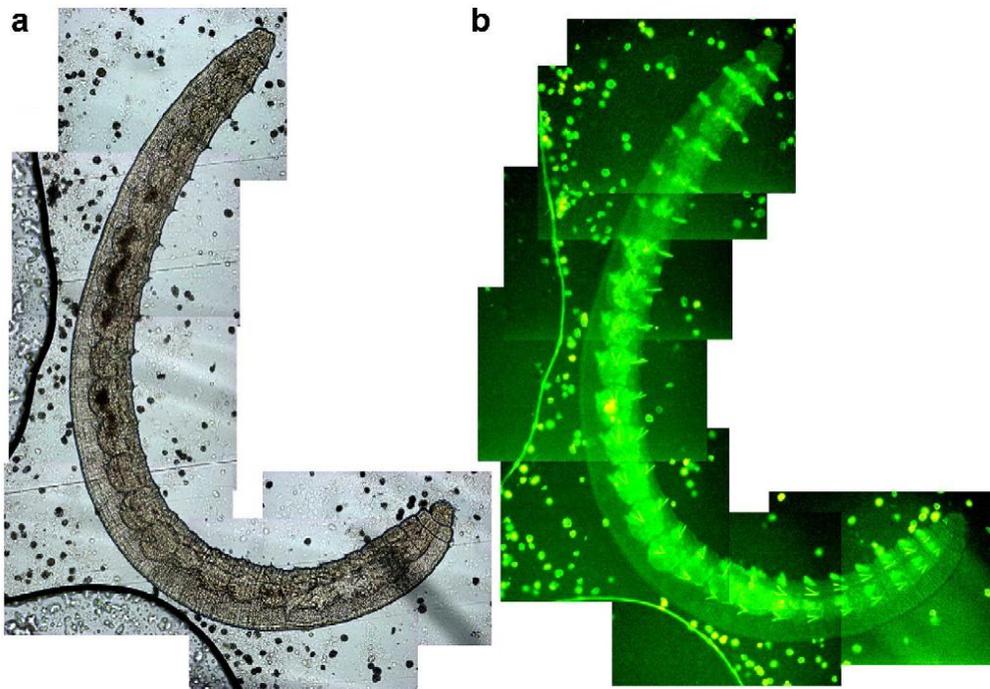


**Figura 28.** Fotografías de la secreción mucosa de las lombrices *E. fétida* (a) y *A. gracilis* (b) expuestas a los metales pesados cadmio y plomo.

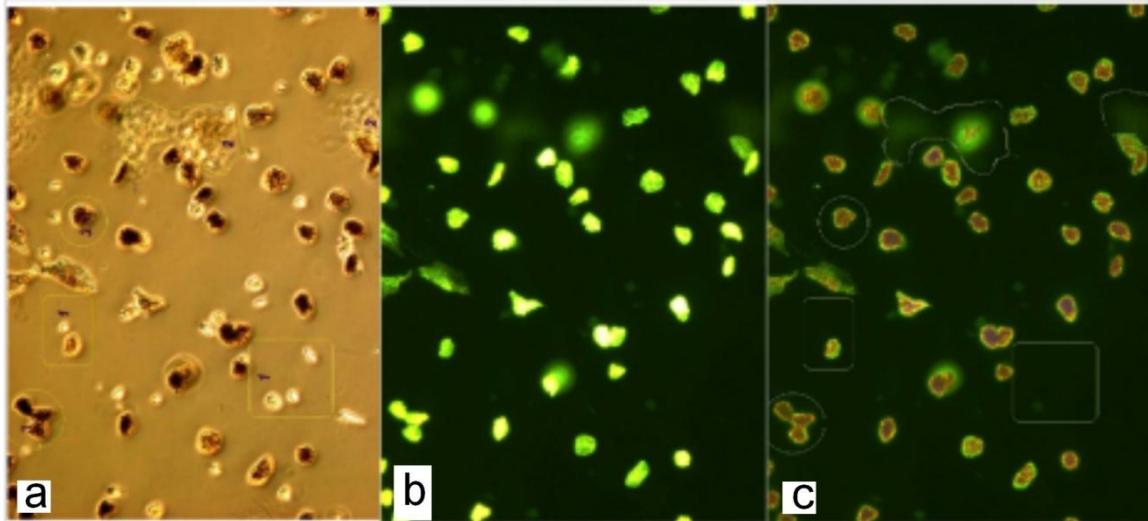
La figura 29 describe a una lombriz de tierra juvenil o recién nacida de *E. fétida* previamente estimulada con corriente eléctrica o cadmio en medio líquido. En la figura 29 a la secreción de moco es claramente visible como pequeñas vesículas. La pared corporal y el tubo digestivo están separados por el fluido celómico. La figura 29 b, muestra

la misma lombriz de tierra bajo microscopía de fluorescencia; la lombriz exhibió autofluorescencia en todas las partes del cuerpo, pero con más intensidad en el tubo digestivo, las quetas y las secreciones mucosas. Cuando la secreción mucosa fue examinada con microscopía de fluorescencia y filtros de fluoresceína, un color verde fluorescente fue observado (figura 30 b, c). Como se ve en la figura 30 a, algunas vesículas parecieron tener partículas refractivas, mientras que algunas otras vesículas estaban rotas. La fluorescencia fue difusa o ausente en algunas vesículas. Otras vesículas estaban alargadas y perdían su forma con el tiempo. Pequeños gránulos refractivos, estaban adheridos a las vesículas, mostrando aún una autofluorescencia de color verde más intensa que los gránulos típicos (figura 30 c).

La secreción mucosa en medio líquido, también fue examinada por microscopía confocal y el moco secretado estaba compuesto de pequeñas vesículas acomodadas en forma de racimo (figura 31 a). Las vesículas intactas tenían una forma ovalada con diámetros del eje mayor de  $35.7 \pm 3.9 \mu\text{m}$  y  $29.5 \pm 2.9 \mu\text{m}$  del eje menor ( $n=50$ ). Otras vesículas perdieron su

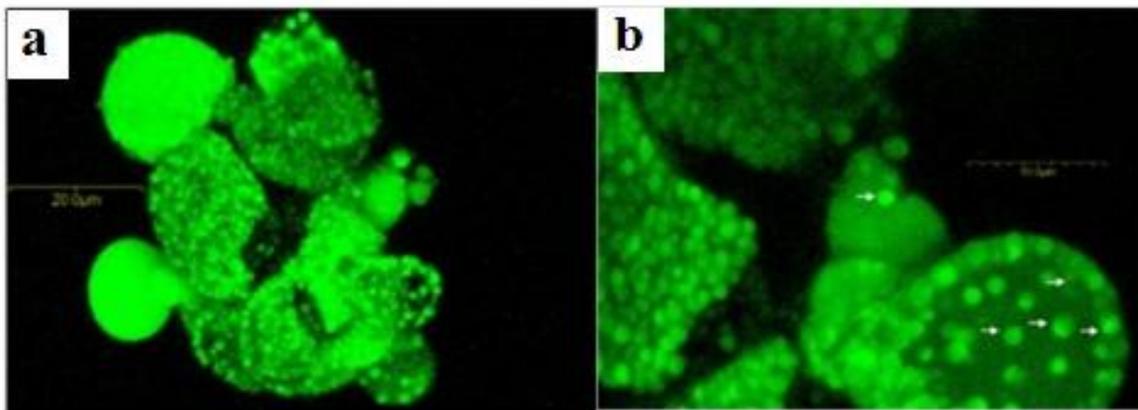


**Figura 29.** Montaje de una microfotografía de lombriz *E. fetida* (a) campo claro y (b) la misma toma con epifluorescencia.



**Figura 30.** Imágenes de microscopía de campo claro de vesículas secretadas por estímulo químico. (a) Campo claro, (b) fluorescencia y (c) imagen compuesta de a, b.

forma después del estrés mecánico (movimiento de la lombriz). El análisis confocal en el plano Z, reveló partículas esféricas (diámetro  $1.44 \pm 0.06 \mu\text{m}$ ,  $n=100$ ) con fuerte fluorescencia; estas partículas estaban asociadas con la membrana basal aunque ocasionalmente estaban libres (Figura 31, b).

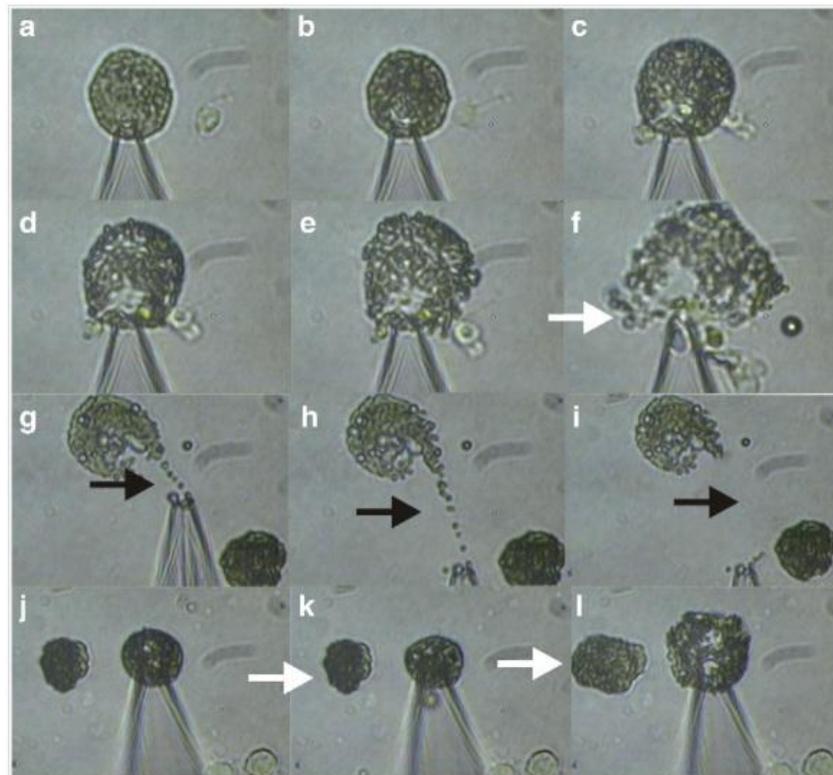


**Figura 31.** Imágenes de microscopía confocal de vesículas libres secretadas por la estimulación del cadmio. Las flechas blancas indican los gránulos encontrados con autofluorescencia.

Las vesículas eran completamente elásticas, y su volumen se incrementó cuando se presionó suavemente con la punta de una micropipeta (figura 32 a, b y c). La presión excesiva causó que las vesículas se rompieran y liberaran gránulos (figura 32 d, e y f).

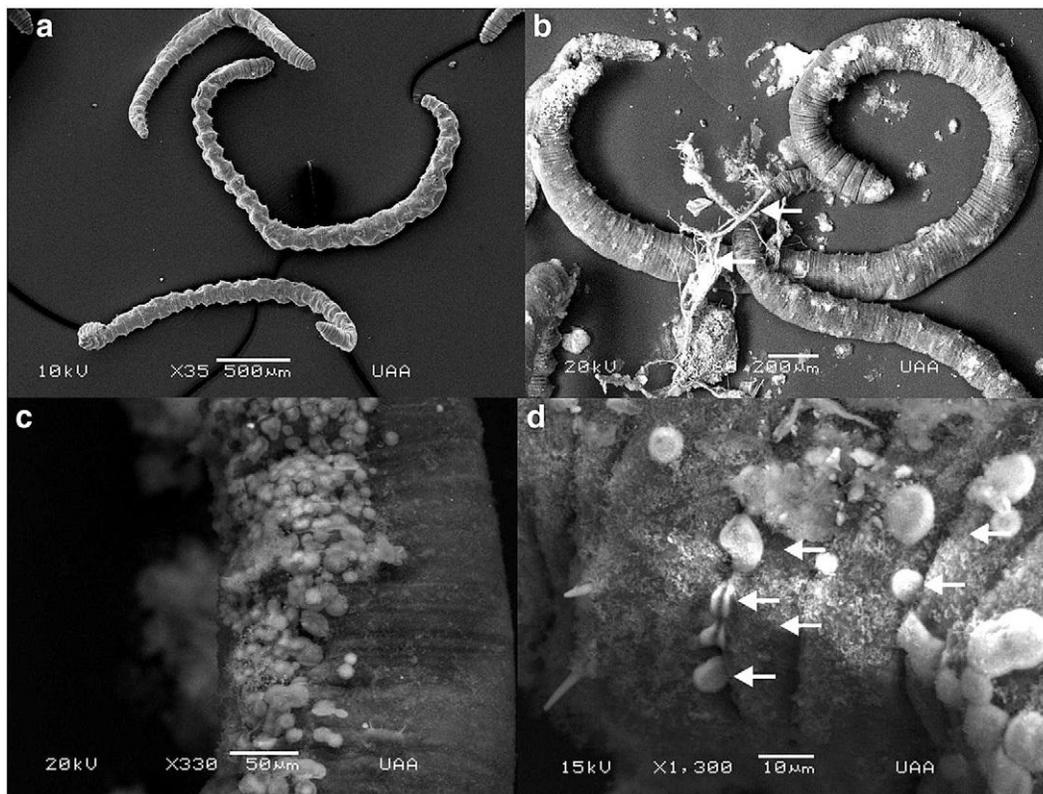
Pequeños paquetes de gránulos refractivos fueron vistos, mientras que en otros casos, los gránulos eran disparados en movimiento Browniano. La respuesta elástica de las vesículas a la presión generó la retención de un fragmento de vesícula (figura 32, g), elongación y una liberación de gránulos (figura 32, h) y pérdida de esta estructura bajo un alto estrés (figura 32, i). El estrés también deformó las vesículas adyacentes (figura 32 j, k y l).

La microscopía electrónica de barrido de lombrices antes del estímulo mostró una secreción mínima de moco (figura 33a). El análisis microscópico reveló que el espacio entre los segmentos, como el sitio preciso de secreción (figura 33 d). El umbral para la secreción del estrés eléctrico fue de  $17.3 \pm 2.5 \text{ mA}$  ( $n=30$ ). El examen de microscopía mostró que con el estrés, parte de la expulsión mucosa se transformó en hebras (figura 34 b). Además el moco era muy adhesivo y permaneció unido a la cutícula aún después de su tratamiento y fijación para microscopía de barrido (figura 33 c).

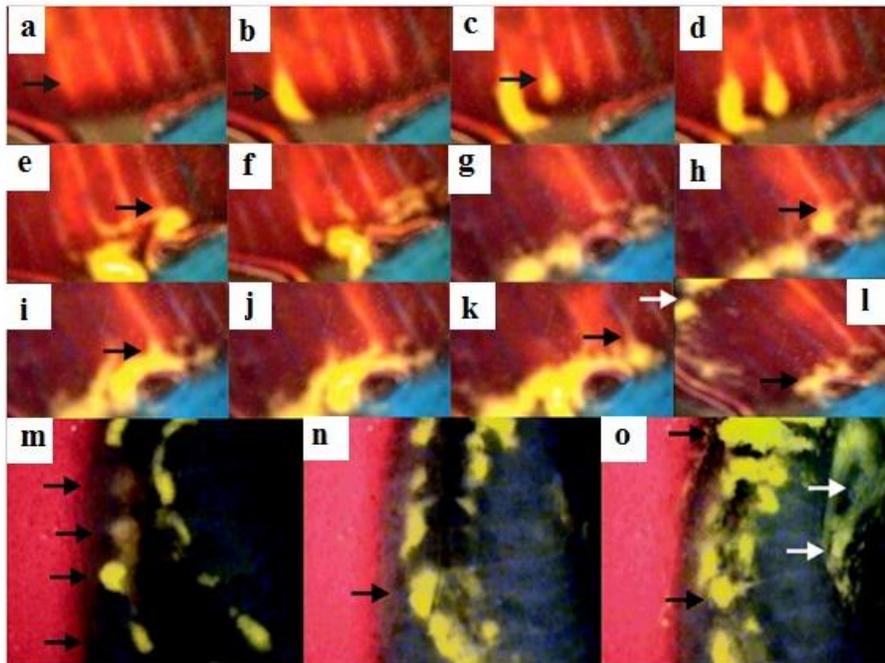


**Figura 32.** Estudio de la elasticidad de vesículas. (a-b) vesículas retenidas por presión negativa con una micropipeta. (c-f), aplicación de presión positiva con rompimiento de la vesícula, (g-h) retiro de la punta y (j-l) aplicación de presión positiva con efectos a otras vesículas.

Imágenes de video compuestas (figura 35), fueron reconstruidas para ilustrar la secuencia general de los eventos que ocurren durante la secreción de moco. Generalmente, la lombriz exhibió un pigmento amarillento en el fluido celómico. Con la estimulación eléctrica, la lombriz se movió hacia atrás, y todos los segmentos se encogieron (figura 35 a). Subsecuentemente la lombriz se movió hacia adelante y el moco fue secretado en el primer segmento, como un fluido amarillento (figura 35 a). El moco entonces apareció por el lado lateral, y cuando la lombriz continuaba moviéndose, la secreción apareció en los siguientes segmentos (figura 35 c, d, e, f, g y h). Concomitantemente, la secreción mucosa se incrementó en el primer segmento. A medida que los segmentos posteriores se contraían, la secreción mucosa se incrementó en los segmentos proximales (figura 35 i, j, k). Así, las imágenes de este video indicaron que las lombrices secretaron moco a lo largo de la pared del cuerpo y por los lados laterales (figura 35 l, m, n y o, flechas blancas) y más abundantemente del lado proximal cerca del prostomio.



**Figura 33.** Microfotografías electrónicas de barrido. (a) lombriz control, lombrices estimulas con cadmio (b), acercamiento de una región donde se observa la adhesividad del moco (c) y espacios intersegmentos con salida de vesículas.



**Figura 34.** Análisis cinemático de la secreción de moco. Sin secreción amarilla (a). Secreción mucosa por la parte lateral (b-d). Desplazamiento por contracción y secreción adyacente (e-h), desplazamiento del moco (i-j). Secreción lateral (m-n).

## VII. DISCUSION.

### **7.1 Signos de toxicidad**

El cadmio es un metal pesado no biodegradable y no esencial, que ha sido incluido en la “lista negra” de tóxicos químicos (Taylor, 1983). Numerosos estudios han sido realizados a evaluar la toxicidad del cadmio sobre las lombrices en suelos de origen minero y suelo artificial, evaluando reproducción y crecimiento (Van Gestel et al., 1991; Spurgeon et al., 2004), sin embargo, pocos estudios se han dirigido a evaluar los daños morfofisiológicos de la toxicidad del cadmio. Existe una amplia variedad de métodos de exposición que se han utilizado para examinar los efectos de los contaminantes ambientales sobre las lombrices. Las pruebas de suelo artificial y las de papel filtro por contacto son las recomendadas para estudios de toxicidad en laboratorio, porque las condiciones de estas pruebas son aceptadas internacionalmente, permitiendo la estandarización de los estudios y comparaciones a nivel internacional.

En este trabajo se evaluó la toxicidad del cadmio y el plomo usando pruebas de papel filtro, debido a que éstas ofrecen un método rápido, sencillo y de bajo costo para exponer a las lombrices a los metales. Este método es confiable, porque permite que la sustancia de prueba esté en solución y haga contacto directo con la epidermis de la lombriz, permitiendo la observación de los efectos de los metales sobre las lombrices (Honeycutt et al., 1995). De acuerdo a lo anterior la exposición por contacto de las lombrices al cadmio o al plomo, permitió una apreciación clara sobre el desarrollo de los signos de intoxicación ocasionados por el cadmio y el plomo. Las lombrices al enfrentarse al cadmio o al plomo manifestaron signos de toxicidad expresados por cambios en su comportamiento, descritos como movimiento rápido con deseo de escape, movimiento lento con temblor de la parte anterior y excreción de moco. Estos signos se pudieron apreciar al comparar el comportamiento normal y sin cambios aparentes de los controles (Tabla 1 y 2). El movimiento rápido con deseo de escape de *A. gracilis* registrado durante las primeras horas

de exposición, se observó aún en las concentraciones más bajas de cadmio y plomo ( $1.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  y  $3.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , respectivamente), lo cual indica que la lombriz puede detectar y escapar rápidamente de un sustrato con cantidades tan pequeñas como las mencionadas. Dicho comportamiento puede asociarse con una respuesta de sobrevivencia y podría considerarse como un parámetro subletal indicativo de la presencia de cadmio y plomo (Quillin, 1999; West y Ankley, 1998). Al transcurrir el tiempo de exposición empezaron a perder dicho movimiento y a experimentar temblor de la parte anterior en todas las concentraciones de cadmio; lo mismo ocurrió en las lombrices expuestas al plomo (concentraciones  $3.3$ ,  $6.6$  y  $13.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), indicando que estos metales, sí ejercen un efecto inhibitorio sobre el sistema locomotor de estos organismos. Otro de los efectos generados por cadmio y plomo fue la expulsión de moco. En un estudio realizado en el oligoqueto *Tubifex tubifex*, se observó el mismo efecto después de su exposición al cadmio, relacionando dicho fenómeno con una posible respuesta de adaptación o de protección (Bouché et al., 2000). También fue claro que si las lombrices permanecen más de 12 h de exposición continua en  $1.1$  y  $2.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de cadmio, o en  $6.6$  y  $13.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de plomo, llegan a padecer cambios estructurales serios a nivel de tejidos, como una epidermis magullada y segmentación pronunciada de la parte posterior. La segmentación pronunciada fue uno de los efectos observados en un estudio realizado con la especie *Lumbriculus variegatus* por la exposición al mercurio, cromo, cobre, cadmio y plomo (Bailey y Liu, 1980) y también en la especie *Tubifex tubifex* después de la exposición al cadmio. Dicho efecto fue considerado como un efecto subletal de toxicidad en oligoquetos de fácil apreciación (Bouché et al., 2000). En las tablas 1 y 2 se observó que si las concentraciones de ambos metales aumentan, las consecuencias llegan a ser letales llegando a sufrir inflamación y necrosis de la parte anterior, sobre todo en la región donde se ubica la cavidad bucal, el esófago, el buche y la molleja. Estos signos aparecieron en la concentración de  $3.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de cadmio, y con el plomo en la de  $19.8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  a las 24 h, valores que se encuentran justo cerca de las  $CL_{50}$ . Otro signo de toxicidad importante encontrado fue el sangrado observado en la región pre-clitelar

inducido por el cadmio. En dicha región anatómica se encuentra localizado el corazón de la lombriz. Se conoce que el cadmio causa heridas en vasos sanguíneos pequeños en vertebrados y contracturas del músculo liso vascular llevando a hemorragias (Evans y Weingarten, 1990). El daño inducido por el cadmio en esta región también ha sido reportado por Siekierska (2002, 2003), quien reportó que el cadmio inducía heridas en los ganglios supra y sub faríngeo de la lombriz *Dendrobaena venata*.

Estos estudios revelaron también que el cadmio indujo efectos deletéreos sobre funciones fisiológicas de las lombrices como los cambios repentinos en el comportamiento de la locomoción, lo que podría explicarse como un fenómeno de tipo sensorial. El cadmio primero es detectado por los quimiorreceptores localizados principalmente en el prostomio (Knap y Mill, 1971), el cual entonces inicia el reflejo de escape rápido (Drewes y Vining, 1984). Esto es acompañado por movimientos en forma de látigo y expulsión de moco, moviéndose rápidamente alrededor de la caja de Petri con la parte anterior levantada, aparentemente como intentando escapar del contacto con el tóxico. Finalmente, las lombrices adoptan un acomodo de forma helicoidal o la de un nudo. Estas respuestas no son específicas del cadmio, ya que también se observaron con el plomo. Asimismo, se han reportado con otros metales (Labrot et al., 1999; Venkateswara et al., 2003; Rao et al., 2003) e insecticidas (Sternesen, 1979). El cadmio indujo autotomía (pérdida espontánea de la cola) en las *A. gracilis* y *E. fétida* cuando se expusieron a altas concentraciones. Dicho fenómeno también fue observado con la exposición a otros metales como el mercurio, cobre y cromo (Venkateswara et al., 2003) en oligoquetos de agua dulce (Bouche et al., 2000), así mismo, por otros contaminantes (Reddy y Venkateswara, 2008). Generalmente, la autotomía es considerada como un mecanismo de defensa contra depredadores. Ésta es una respuesta rápida e inmediata en algunos animales, e incluso, por lombrices cuando son sometidas a algunos estímulos de estrés, tales como el contacto y la aprehensión (Tsai y Tsai 2000). Sin embargo, en estos experimentos apareció después de períodos largos de exposición. Estas observaciones convergen con la hipótesis de un mecanismo de

destoxificación, planteada por Vidal y Horne (2003), que sostienen una acumulación del metal por parte de los segmentos de la región caudal y su desprendimiento como vía de eliminación.

## **7.2 Estudios de histopatología**

Los cambios histopatológicos observados en la pared muscular nos permiten afirmar que el cadmio hace contacto directo con la pared ventral de la lombriz y atraviesa las principales barreras de protección alcanzando la epidermis (Vijver, 2005), no sin antes causar daño en la cutícula. Dicha estructura es la primera barrera que establece contacto con el medio ambiente y es muy susceptible al daño por abrasión. Se conoce que la cutícula está compuesta principalmente de colágeno y tiene un constante recambio (Golstein y Adams, 1968). A la fecha no existen estudios que relacionen el desprendimiento de la cutícula con la presencia de contaminantes, por lo que puede ser planteada como un biomarcador de exposición a los contaminantes. El cadmio también penetró hasta el celoma y a su paso provocó daño severo a la pared muscular. Venkateswara et al. (2003) han reportado estudios similares de daño con el cadmio y otros metales como el plomo. Los estudios de microscopía electrónica de barrido demostraron que el cadmio se localizó en el tejido cloragógeno, hecho que es consistente con las observaciones realizadas por otros investigadores, que afirman que dicho tejido es el sitio principal de acumulación del cadmio (Ireland y Richards, 1977; Richards e Ireland, 1978; Morgan y Morgan, 1989; Yongcan et al., 1998). Sin embargo, no pudimos detectar cadmio en la capa muscular, probablemente debido a la baja capacidad para detectar metales sobre la superficie de la muestra. En este mismo sentido, varios estudios han sido incapaces de detectar el cadmio u otros metales pesados sobre la capa muscular (Vijver 2005; Laurencó 2011; Sharma y Satyanarayan 2011).

Por otra parte, la mayoría de los signos de toxicidad observados por el cadmio y el plomo en las lombrices fueron similares, sin embargo, hubo diferencias importantes: así por

ejemplo, las concentraciones del cadmio fueron menores que las del plomo, el cadmio resultó ser más tóxico, debido a que generó hemorragia por la cavidad bucal de las lombrices a partir de la concentración de  $3.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  hasta  $16.9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , lo cual no ocurrió en ninguna de las concentraciones de plomo. La concentración letal 50 de cadmio en *A. gracilis* fue  $3.4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  menor que la del plomo  $19.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Estudios que nos permitan comparar las  $\text{CL}_{50}$  de estos metales en esta especie no han sido publicados, y en cuanto al valor encontrado para el cadmio solo se encontró una  $\text{CL}_{50}$  similar en la especie *Lumbricus terrestris* (Fitzpatrick et al., 1996). En la especie *E. fétida* la  $\text{CL}_{50}$  para el cadmio fue de  $16.6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Dicho valor es acorde con aquellos valores publicados por otros autores (Van Gestel et al., 1988; Fitzpatrick et al., 1996). Sin embargo, Neuhauser (1986) reportó un valor mayor que el encontrado en *E. fétida*. Los estudios entre los valores de  $\text{CL}_{50}$  derivados de pruebas de toxicidad en papel filtro con valores derivados de pruebas de toxicidad en suelo artificial, han permitido determinar que la exposición de las lombrices en papel filtro no es un buen indicador de toxicidad aguda igual a la que ocurre en las pruebas de toxicidad en suelo, ya que la exposición en papel filtro es considerada más tóxica que la exposición en el suelo (Neuhauser et al., 1986; Callahan 1985; Honeycutt et al., 1995). Sin embargo, las pruebas de suelo artificial también pueden sobreestimar las  $\text{CL}_{50}$ , ya que los componentes del suelo como arcillas y materia orgánica pueden inmovilizar el metal en estudio. Por otra parte, la  $\text{CL}_{50}$  del plomo determinada por la prueba de contacto en la especie *A. gracilis*, fue más pequeña que la reportada por Labrot et al., ( $\text{CL}_{50} = 47.02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , 1999), y muy parecida a la encontrada en la especie *E. fétida*. Hacer una comparación directa de la toxicidad de ambos metales en diferentes especies resulta difícil, debido a las diferencias en los métodos de exposición o condiciones experimentales. Las diferencias en la  $\text{CL}_{50}$  del cadmio y el plomo encontradas en este trabajo y las reportadas en la literatura podrían ser atribuidas a las características químicas de cada metal (Foulkes, 1990), o al tipo de especie de lombriz utilizada (Fitzpatrick et al., 1996). En este trabajo, la  $\text{CL}_{50}$  en *A. gracilis* refleja hasta cierto punto una alta sensibilidad al cadmio y

al plomo en comparación con *E. fétida*. Debido a que el valor de la  $CL_{50}$  es un parámetro no preciso, evaluamos la bioacumulación como una relación de la concentración externa y las concentraciones encontradas en sus tejidos. El factor de bioconcentración proporciona información más directa sobre los posibles daños y/o efectos que producen estos metales a nivel de tejidos. Cuando se determinaron las concentraciones de cada metal en sus tejidos, se encontró que tanto para el cadmio como para el plomo en ambas especies, hubo una relación proporcional entre la cantidad adicionada al papel filtro y los niveles encontrados en los tejidos. Este patrón ha sido reportado por otros autores ( Kiewiet y Ma, 1991; Yeates et al., 1994; Grelle y Descamps, 1998). El factor de bioacumulación para el cadmio fue mayor en *E. fétida* que en *A. gracilis*. Esto implicaría que *E. fétida* tiene una capacidad mayor para atrapar dicho metal y evitar su toxicidad. Varios estudios concuerdan con estos resultados y han demostrado que dicha especie puede sobrevivir bajo condiciones de suelos contaminados y en cultivos de laboratorio con metales pesados por años (Reinecke et al., 1999). Para explicar el fenómeno de resistencia al cadmio; se ha propuesto por un lado, que las lombrices tienen la capacidad de inducir la síntesis de proteínas encargadas de atrapar al cadmio como las metalotioneínas (Ramseier et al., 1990; Willuhn et al., 1996; Stürzenbaum, 1998; Gruber et al., 2000), mientras que para el plomo hubo una ligera tendencia mayor para la especie *A. gracilis*. Para dicho metal se propone un mecanismo de detoxificación, el cual involucra sistemas de eliminación especializados como los cloragosomas. Las evidencias indican, que los cloragosomas retienen y secuestran especialmente metales como el plomo, el cual lo convierten en forma insoluble y así no interfiere con las reacciones bioquímicas esenciales del citoplasma de las células (Ireland y Richards, 1977; Morgan y Morris, 1982; Morgan y Morgan, 1989).

Al interpolar las  $CL_{50}$ , con las concentraciones alcanzadas en los tejidos dieron valores de 52.7  $\mu\text{g/g}$  para Cd y 94.2  $\mu\text{g/g}$  para plomo. Estos valores son elevados, lo que explicaría la inflamación y la necrosis desarrollada por las lombrices a estas concentraciones antes de la muerte.

La toxicidad causada por el cadmio y el plomo observada en las lombrices mediante las pruebas por inmersión fue dependiente del tiempo de exposición, expresando una vez más mayor toxicidad el cadmio ( $33.2 \pm 10.4 \mu\text{g}$  de Cadmio / g de tejido seco) vs. ( $54.2 \pm 6.1 \mu\text{g}$  de plomo/g de tejido seco) valor alcanzado a las 2 horas. En cuanto a las concentraciones de plomo y cadmio encontradas en los experimentos de acumulación por inmersión, se observó un pico para el cadmio y el plomo a los 10 minutos, dicho pico se relacionó directamente con los signos de toxicidad encontrados, como fue la secreción de moco y el encogimiento de la lombriz, lo cual podría significar que las lombrices al estar en inmersión y presencia de los tóxicos, activan mecanismos que llevan a eliminar el cadmio o el plomo; sin embargo, al estar en exposición por más de 30 minutos, pierden esa capacidad y entonces la acumulación empieza a tener un incremento.

Los estudios en la literatura sobre toxicidad de contaminantes a través de las pruebas por inmersión son escasos a pesar de que se ha reportado que existe una buena correlación entre la toxicidad expresada por lombrices a varios químicos mediante estas pruebas y la toxicidad por medio de suelo artificial (Reinecke, 1992), sugiriendo que ambas pruebas son complementarias.

### **7.3 Efectos del Cd y el Pb sobre la contracción muscular de los tejidos.**

Al encontrar concentraciones elevadas de cadmio y plomo en los tejidos en nuestras determinaciones, se trabajó en la hipótesis sobre su posible interferencia a nivel de la contracción muscular de tejidos u órganos que por su función resultan ser los más frecuentemente expuestos. En este sentido el intestino es uno de los afectados, escogiendo específicamente la sección buche-molleja por su rápido movimiento peristáltico. El trabajo de laboratorio con esta estructura aislada de *A. gracilis*, reveló movimiento peristáltico igual que el reportado en otras especies como *Lumbricus terrestris* y *E. fétida*, caracterizado por espigas de contracción-relajación con valores de 0.05-0.5 g (Oumi et al., 1995; Ukena et al., 1995). La acetilcolina indujo un incremento en la fuerza de contracción de la preparación buche-molleja. Dicho efecto se ha encontrado también en tejidos intestinales de otros anélidos como la sanguijuela y en los vertebrados (Walker, Holden-Dye y Franks,

1993; Mahmud y Huddart, 1993). El cadmio y el plomo inhibieron la contracción espontánea del tejido buche-molleja y de la pared muscular. La inhibición fue aún a concentraciones menores que las encontradas en suelos normales. Triggles et al. (1975) y Walsh y Harnett (1986) reportaron una inhibición de la contracción del músculo liso de cobayo con el cadmio y el plomo respectivamente, la cual fue más eficaz cuando se despolarizó la membrana. Estos resultados sugieren que tanto el cadmio como el plomo podrían interferir a través de la entrada de otros iones (Nasu y Shibata 1993; Nasu et al., 1993). El mecanismo para explicar la inhibición de estos metales ha sido propuesto a ser mediado por su capacidad para inhibir la entrada del calcio necesaria para la contracción muscular (Nasu y Koshiba, 1985), y a su capacidad para interferir con la acetilcolina en la inducción de la contracción muscular (Schmidt y Ibrahim, 1995). Estos resultados nos permiten señalar la importancia de tal inhibición, ya que una inhibición en la contracción muscular conlleva a una disminución y/o pérdida del movimiento en dos tejidos importantes como son el intestino (molleja) y la pared muscular. En lo que se refiere al primero, tal disminución de la contracción disminuye la capacidad de la lombriz de tierra a ingerir y obtener el aporte energético necesario para la digestión de los alimentos. Así mismo, al no haber los nutrientes necesarios para la síntesis de nuevos componentes celulares, la consecuencia podría ser una disminución en la biomasa, el crecimiento, y la reproducción de la lombriz expuesta a dichos tóxicos (Edwards y Bohlen, 1992; Neuhauser et al., 1984). Mientras que la inhibición de la contracción de la pared muscular, sugiere que las lombrices expuestas al cadmio o plomo, podrían disminuir su velocidad de desplazamiento e incluso paralizar el movimiento, esto tendría un efecto severo en su función de remoción del suelo y en la capacidad de hacer sus madrigueras, evitando su desplazamiento a sitios no contaminados.

En conclusión podemos afirmar que la toxicidad de cadmio en las lombrices involucra un daño severo a la pared corporal con rompimiento de comunicación sensorial debida a la ruptura de la cutícula con lesiones internas que llevan a la muerte. El cadmio interfiere con la función vascular y muscular de la lombriz debilitando sus capacidades físicas para alimentarse y realizar una respuesta evasiva adecuada.

#### **7.4 Pruebas de escape o evasión de las lombrices *A. gracilis* y *E. fétida*.**

La observación de que las lombrices escaparon cuando se realizaron las pruebas de toxicidad en tubos de vidrio, nos llevó a cambiar los tubos por cajas de Petri. Este cambio permitió observar la conducta de escape en las pruebas de contacto, así mismo; se pudo suponer que la prueba de escape tiene un papel potencial en el ensayo de la toxicidad de contaminantes como los metales pesados. El intento de emigrar de la cámara donde se encuentra el cadmio o el plomo, es un reflejo de la interacción del metal con estructuras anatómicas como la pared muscular y las fibras nerviosas, las cuales promueven la contracción y el movimiento de la lombriz para facilitar el escape, si la lombriz no escapa del medio, entonces permite la acumulación del metal pesado y su inactivación en estructuras u organelos celulares. Yeardeley et al. (1996) reportaron pruebas similares con sales inorgánicas como el KCl y el NH<sub>4</sub>Cl con porcentajes de evasión del 90%. Este comportamiento es importante desde el punto de vista de la ecotoxicología, porque podría explicar los resultados encontrados en suelos contaminados donde las lombrices han presentado bajas tasas de biomasa por unidad área. La prueba de escape planteada en este proyecto pronto se vio reflejada en un número creciente de reportes en la literatura (Hund-Rinke, 2002, 2005; Schaefer, 2003), donde se recomienda para estudiar el tiempo ideal para evaluar la evasión, los métodos estadísticos más adecuados para el análisis de los resultados (Nadal-da-Luz et al., 2004, Nadal-da-Luz et al., 2008). De tal forma que en el año 2008, se publicó una norma estandarizada por la organización de estándares internacionales, y ha sido utilizada como uno de los pocos procedimientos de importancia ecotoxicológica. En este trabajo se planteó esta prueba basándonos en las respuestas observadas durante la exposición de las lombrices al Cd y al Pb, y en los cambios de comportamiento, los cuales han sido muy usados para estudiar los efectos de los tóxicos y drogas en los animales. Al respecto, estos cambios en el comportamiento son adaptaciones fenotípicas que facilitan la sobrevivencia de los organismos a los cambios de su medio ambiente, permitiéndoles desarrollar respuestas como la respuesta de escape, resistencia al estrés, crecimiento y longevidad en un entorno desfavorable. En la especie *A. gracilis*, se observó una respuesta de escape a concentraciones bajas de cadmio y plomo, dicho evento puede estar asociado a su capacidad para detectar y huir del peligro, se conoce como una de las especies más escurridizas, la cual escapa fácilmente cuando se le tiene en cautiverio. En cuanto a *E.*

*fétida*, nuestros resultados son consistentes con otros publicados e incluso se ha encontrado que estas lombrices no evitaron suelos obtenidos de minas abandonadas (Langdon et al., 2005). El fenómeno de no evasión ha sido explicado como un proceso de adaptación, el cual ha sido atribuido a un desarrollo de resistencia y tolerancia a los metales pesados (Reinecke y Reinecke 1999). Esto podría explicar porque algunas lombrices se quedaron en el suelo contaminado. Por otro lado, se puede tomar ventaja de aquellas lombrices que permanecieron en los compartimientos contaminados, ya que de esta manera se pueden seleccionar lombrices adaptadas, para estudiar los mecanismos de resistencia y utilizarlas en los desastres ecológicos como indicadores (Bouché et al., 2000). Una observación importante en las lombrices que permanecieron en los suelos contaminados fue la secreción excesiva de moco, tal fenómeno podría ser considerado como un mecanismo de defensa no específico contra los tóxicos, excretado con la finalidad de reducir el contacto con el tóxico. El moco forma una barrera entre la superficie corporal y el tóxico que minimiza el efecto irritante (Dube y Hosetti, 2010). Sin embargo, las partículas del suelo que son adheridas a la superficie corporal podrían incrementar la fricción e impedir el movimiento libre de la lombriz. Los datos histopatológicos de este trabajo señalaron que hubo un daño estructural, por lo que aquellas lombrices que se quedaron en el suelo contaminado perdieron sus capacidades sensoriales, disminuyendo su locomoción y la capacidad de respuesta, quizás en algunos casos no pudieron regresar al suelo control.

### **7.5 Secreción mucosa.**

El mecanismo de la secreción mucosa es de suma importancia para entender las propiedades de su formación y expulsión en respuesta a los metales estudiados. Estos organismos excretaron un moco amarillo y fluorescente; dicha fluorescencia fue encontrada en estructuras dentro del organismo, en general algunos investigadores han descrito a la pared corporal con colores usualmente rojos, cafés e incluso púrpura, ocasionalmente, de un color verde olivo (Stephenson, 1930; Needham 1996; Jiang et al., 1989). La pigmentación de las lombrices ha sido asociada con algunos compuestos como las flavinas, carotenoides, flavonas y cumarinas (Roots y Johnston, 1966), eritrocurina (Cardillo et al., 1989) y Riboflavina (Blytycz et al., 2009). Sin embargo, la autofluorescencia no había sido

explicada. Wampler y Jamieson (1980) reportaron cerca de 12 especies de lombrices con bioluminiscencia, la cual tenía un espectro amplio de emisión en el rango de los 500-570 nm y estuvo asociada a los cloragocitos. Posteriormente Jiang et al., (1989) separaron e identificaron un compuesto fluorescente. Nuestros resultados de microscopía confocal revelaron que la fluorescencia estuvo unida a pequeños gránulos fluorescentes en las vesículas intactas. Este resultado apoya el mecanismo propuesto, en el cual los pigmentos fluorescentes se encuentran asociados a proteínas y lípidos (Roots y Johnston, 1966). Albani et al., (2003) estudiaron el fluido celómico de dos especies de lombrices y concluyeron que hay diferencias entre las especies. La secreción mucosa es amarilla a simple vista y emite luz fluorescente bajo condiciones de luz adecuadas, por lo tanto, el color del moco puede estar asociado a los procesos metabólicos (Albani, 2003). Richards y Ireland (1977) identificaron células amarillas en la epidermis y describió una interacción de estas células amarillas con las células secretoras de moco (Richards, 1975). Otros investigadores también han encontrado una relación estrecha entre el tejido intestinal, el fluido celómico y el pigmento amarillo en las lombrices (Needham, 1966; Roots y Johnston, 1966; Erno y Molnar, 1992; Valembois et al., 1992).

En nuestros experimentos de cinemática, las lombrices no tuvieron movimiento libremente, por lo que fueron confinadas a un espacio estrecho. Esto favoreció el estrés mecánico y la adhesión del moco a su superficie. Por el contrario, cuando la lombriz secretó en el medio, la secreción de vesículas permaneció en suspensión. El estímulo eléctrico o químico provocó un impulso rápido como aquel descrito por Roberts (1962) y, con una contracción muscular de los segmentos, la liberación, deformación, adhesión y conversión del moco a las fibras observadas por inspección visual (Drawes y Vining, 1984). De tal manera, que el moco forma una barrera exterior a la exposición de los metales ((Jiang et al., 1990; Bouché 2000). Como un mecanismo de defensa el moco puede proteger la epidermis y facilitar la locomoción momentánea; sin embargo, las partículas del suelo podrían ser un obstáculo y evitar la locomoción como ocurrió en las pruebas de evasión (Denny, 1989).

En conclusión, las lombrices presentan una autofluorescencia interna, la cual acompaña al moco secretado. El moco se origina dentro de los tejidos de la lombriz, y se acompaña de la expulsión de vesículas intactas, con pequeños gránulos que por fuerzas de estrés mecánico se transforman en cadenas de moco adhesivo. Este mecanismo es de importancia

para la lombriz cuando se encuentra ante situaciones desfavorables como es la exposición a los contaminantes como los metales pesados en solución.

## VIII. CONCLUSIONES

1.- El cadmio y plomo producen sus efectos tóxicos en las lombrices por ingresar a través de la epidermis, no sin antes producir daño en las capas más externas como son la cutícula, la epidermis y las capas musculares. Alteran las estructuras anatómicas y los procesos funcionales que deben de realizar las lombrices, como son la detección de los estímulos externos, la contracción muscular y la locomoción.

2.- La  $CL_{50}$  del cadmio fue menor en *A. gracilis* que en *E. fétida*, provocó más muertes tanto por exposición por contacto, como por pruebas de inmersión y acumuló menor cantidad de cadmio en sus tejidos. Por lo tanto, concluimos que la lombriz *A. gracilis* fue más sensible al cadmio que *E. fétida*.

3.- Los resultados de toxicidad del plomo por contacto, muestran que no hubo diferencia en la bioacumulación del plomo para las dos especies y en los estudios de inmersión ambas especies bioacumularon el metal de manera muy semejante, sin llegar a morir a ningún tiempo de exposición. Por lo tanto concluimos que el plomo aunque resultó ser tóxico para ambas especies, su toxicidad fue menor que la del cadmio, y ambas especies pueden tolerar mayores concentraciones.

4.- Los metales cadmio y plomo producen efectos inhibitorios en las propiedades contráctiles del tubo intestinal, lo cual puede repercutir en una reducida alimentación y bajo peso de la lombriz, afectando así su desarrollo y crecimiento.

5.- Los metales cadmio y plomo produjeron una inhibición de la contracción de la pared corporal a concentraciones más bajas que aquellas encontradas en suelos contaminados, por lo tanto, estos resultados demuestran que sí hay efectos deletéreos en la función contráctil, lo que conlleva a deficiencias en la locomoción.

6.- Los estudios de evasión al cadmio y plomo demostraron que las lombrices *A. gracilis* evaden el suelo contaminado aun con la barrera colocada en la parte media de la caja. Esto nos lleva a pensar que poseen un sistema sensorial muy sensible, que detecta el contaminante y que poseen un circuito neuronal que les permiten detectar y evadir más eficientemente. Las pruebas de evasión con *E. fétida* confirman lo encontrado en las pruebas de toxicidad, debido a que sí detectaron el contaminante y algunas toleraron estar en suelo contaminado, sin embargo a medida que se incrementa la concentración del tóxico en el suelo, lo detectan y lo evaden. Tomando estos resultados en su conjunto podemos decir que la lombriz *A. gracilis* podría ser un mejor bioindicador de contaminación ambiental que la misma lombriz *E. fétida*.

7.- En este trabajo se estudió el mecanismo de la secreción de moco inducida por los metales cadmio y plomo; los estudios de microscopía y cinemática de la secreción nos permiten concluir lo siguiente: la secreción de moco, es un proceso que ocurre en respuesta a la presencia de los metales plomo y cadmio, el cual se lleva a cabo por la expulsión de fluido celómico, con características fluorescentes, cuyo origen está en las células mucosas de la epidermis y células desprendidas de la cavidad intestinal, las cuales son liberadas durante el estímulo como vesículas intactas, que al ser sometidas a fuerzas de estrés mecánico se rompen y se transforman en cadenas de moco adhesivo. Esta liberación de moco es de suma importancia para la lombriz expuesta a los metales, debido a que desempeña un papel protector en su superficie externa y la protege contra los efectos tóxicos de los metales pesados.

## IX. BIBLIOGRAFIA

- Abernathy, T.V., Lee, K.B., Parker, R. J., and Reed, E. (1999). The measurement of cadmium in biological materials, using graphite furnace atomic absorption spectrometry with Zeeman background correction. *Oncol. Rep.* **6**:155-159.
- Albani, J.R., Demuyneck, S., Grumiaux, F., Lepretre, A., (2003). Fluorescence fingerprints of *E. foetida* and *E. andrei*. *Photochem Photobiol.* **78**: 599–602.
- Alohan, F.I., and Huddart, H. (1979). Spontaneous activity of annelid visceral muscle and related calcium movements. The effect of KCl depolarization, caffeine, acetylcholine and adrenaline. *Comp. Biochem. Physiol.* **63C**:161-171
- Allowey, B. J. (1990). Cadmium, Lead. En: Heavy metals in soils, Ed. por Blackie and Sons LTD Halsted Press John Wiley and Sons, Inc. New York. Pp 100-124 y 177-196.
- Artuso N., TF., Kennedy, J. Connery, J. Grant, and O. Schmidt. (2011) Assessment of biosolids in earthworm choice test with different species and soils. *Global NEST J.* 13:255-265
- Bagchi, D., Joshi, S. S., Bagchi, M., Balmoori, J., Benner, E. J., Kuszynski, C. A., and Stohs, S.J. (2000). Cadmium and chromium-induced oxidative stress, DNA damage, and apoptotic cells. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **14**: 33-41.
- Bailey, H.C., and Liu, D.H. (1980). *Lubriculus variegatus*, a benthic oligochaete, as a bioassay organism. En: Aquatic toxicology. Editado por J.C. Eaton, P.R. Parrish, y A.C. Hendricks. ASTM STP 707, ASTM. Philadelphia. pp 205-215.
- Barnes, D. R. (1977). Anélidos. En: Zoología de los invertebrados. Ed. Interamericana. pp 226-306.
- Barois, I. (1992). Mucus production and microbial activity in the gut of two species of *A. (Megascolecidae)* from cold and warm tropical climates. *Soil. Biol. Biochem.* **24**:1507-1510.
- Barois, I. y Irisson, S. (1997). Mutualismo entre lombrices de tierra y la microflora del suelo. *Anuario Inst. de Ecología.* 116-117.
- Beltrán, E., Rioja, E., Alcaraz, J., Ruiz, M., Miranda, F., Larios, I. (1983). Biología. Ed. Porrua. pp 110-115.
- Berman, E. (1980). Cadmium, lead. En: Toxic metals and their analysis. Editado por: Heyden & Sons. Ltd. London. Pp 65 –135.
- Berman, W. (1992). How to dissect. First fireside edition. Simon & Schuster Inc. USA. pp 9-24.

Beyersmann, D., and Hechtenberg, S. (1997). Cadmium, gene regulation and cellular signaling in mammalian cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **144**: 247-261.

Blytycz B., L. Molinda., U., M. Cygal, E. Kiekbas, A Greboz, M. Ducghnowski, J. Andre, A.J. Morgan (2009). Riboflavin content of coelomocytes in earthworm (*Dendrodrilus rubidus*) field populations as a molecular biomarker of soil metal pollution. *Enviroment. Poll.* **157**: 3042-3050

Boeckx, R.L.(1986). Lead Poisoning in Children. *Analytical Chemistry.* **58**: 274-286.

Bouché, M. (1972). Lombriciens de France. Ecologie et systématique. Annales de Zoologie et Ecologie Animale, Numéro hors-série. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris.

Bouché, M.B. (1992). Earthworm species and ecotoxicological studies. In Ecotoxicology of Earthworms, P.W. Greig-Smith et. Al. (eds), pp 20-35. Intercept Ltd., Hants U.K.

Bouché, M., Habets, F., Biagiante-Risbourg, S., and Vernet, G. (2000). Toxic effects and bioaccumulation of cadmium in the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **46**: 246-251.

Bradham, K.D., E.A. Dayton, N.T. Basta, J. Schroder, M. Payton, and R.P. Lanno (2006). Effect of soil properties on lead bioavailability and toxicity to earthworms. *Environ. Toxicol. Chem.* **25**:769-775

Brown, Jr. G. E., Foster, A. L. and Ostergren, J. D.(1999). Mineral surfaces and bioavailability of heavy metals: A molecular-scale perspective. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**:3388-3395.

Buckman, H. O., and Brady, N. C. (1966). Lombrices de tierra. En: Naturaleza y propiedades de los suelos. Editorial Montaner y Simón, S.A. Barcelona. pp 113-118.

Callahan, C.A., Russel, L.K., Peterson, S.A. (1985). A comparison of three earthworm bioassay procedures for the assessment of environmental samples containing hazardous wastes. *Biol. Fert. Soils.* **1**: 195-200.

Cardillo, F., de Paula, E., Oliveira, G.R., Marangoni, S., Oliveira, B., Meirelles, N.C., (1997). Erythrocrurin of *Glossoscolex paulistus* (Oligochaeta, Glossoscolecidae) modulation of oxygen affinity by specific antibodies. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **41**, 497–509.

Darwin C., (1881). Darwin on earthworms: The formation of vegetable mould through the action of worms with observations on their habits. Editado por: Book Worm Publishing Company. London. 1976. Accessible:  
[http://darwin-online.org.uk/converted/pdf/1881\\_Worms\\_F1357.pdf](http://darwin-online.org.uk/converted/pdf/1881_Worms_F1357.pdf)

Daniel, W.W. (1882). Bioestadística. Bases para el análisis de las ciencias para la salud. Ed.

Limusa. México.

Dallinger, R., Berger, B., Gruber, Ch., Hunziker, P., and Stürzenbaum, S. (2000). Metallothioneins in terrestrial invertebrates: structural aspects, biological significance and implications for their use as biomarkers. *Cell. Mol. Biol.* **46**: 331-346.

Darnell J., Lodish H., and Baltimore D. (1990). Actin, myosin, and intermediate filaments: cell movements and cell shape. En: *Molecular Cell Biology*. Ed. Scientific American Books. Chapter 22. 859-899.

Davies, B. E. (1990). Lead. En: *Heavy metals in soils*. Editado por: B. J. Alloway. Blakie and Sons. Ltd., John Wilby and Sons. Inc. New York. USA. pp.176-197.

Davies N.A., M.E. Hodson, and S. Black (2003). The influence of time on lead toxicity and bioaccumulation determined by the OECD earthworm toxicity test. *Environ. Pollut.* **121**:55-61

Denny, M.W. (1989). Invertebrate mucous secretions: functional alternatives to vertebrate paradigms. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 1989, 337–366.

Drewes, C.D., and Vining, E. P., (1984). *In vivo* neurotoxic effects of dieldrin on giant nerve fibers and escape reflex function in the earthworm, *E. foetida*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **22**: 93-104.

Drewes, C.D., Vining, E.P., and Callahan, C.A. (1988). Electrophysiological Detection of Sublethal Neurotoxic Effects in Intact Earthworms. En: *Earthworms in Waste and Environmental Management*. Ed C.A. Edwards and E.F. Neuhauser. The Hague: SPB Academic Publishing. pp. 355-366.

Drewes, C.D., and Lingamneni. (1992). Use of earthworms in eco- neurotoxicity: effects of carbofuran in *Lumbricus terrestris*. In: *Ecotoxicology of earthworms*, PW, Greig-Smith et. Al. (eds.), p63-72, Intercept Ltd., Hants, U.K.

Dube, P.N., Hosetti, B.B.( 2010). Behaviour surveillance and oxygen consumption in the freshwater fish *Labeo rohita* (Hamilton) exposed to sodium cyanide. *Biotechnol. Anim. Husb.* **26** : 91-193

Edwards, C.A., and Bohlen, P.J. (1992). The Effects of Toxic Chemicals on Earthworms: *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **125**: 23-99.

Edwards, C. A. & P. J. Bohlen. (19969). *Biology and ecology of earthworms*, 3rd Ed. Chapman & Hall, London.

EPS. (2004). Biological test method: Test for toxicity of contaminated soil to earthworms (*E. foetida*, *Esieia Andrei*, and *Lumbricus terrestris*) Method Development of Application Section. Environment Canada 2004 EPS 1/RM/43.

- Evans, D.H., and Weingarten, K., (1990). The effect of cadmium and other metals on vascular smooth muscle of the dogfish Shark, *Squalus acanthias*. *Toxicology* **61**: 275-281.
- Fischer, E., and Molnár, L. (1992). Environmental aspects of the chloragogenous tissue of earthworms. *Soil. Biol. Biochem.* **24**: 1723-1727
- Fitzpatrick, L. C., Muratti-Ortíz, J. F., Venables, B. J. and Goven, A. J. (1996). Comparative toxicity in earthworms *E. fétida* and *Lumbricus terrestris* exposed to cadmium nitrate using artificial soil and filter paper protocols. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **57**:63-68
- Fleming, T. P. and Richards, K. S. (1981). A technique to quantify surface adsorption of heavy metals by soft-bodied invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.*, **69C**:391-394
- Foulkes, E. C. (1990). Cadmium, lead. En: Biological effects of heavy metals. CRC. Press. Inc. Vol. II: 29-34, 44-48.
- Fragoso, C., Kanyonyo, J., Moreno, A., Senapi, B., Blanchart, E., Rodríguez C. (1999). A survey of tropical earthworms: taxonomy biogeography and environmental plasticity. En: Lavelle P. Brussaard L. Hendrix P. (ed) Earthworm Management in tropical Agroecosystems. CAB International. Oxford 1-26
- Fugere, N., Brousseau, P., Krystyniak, K., Coderre, D., Fourtinier, M. (1996). Heavy metal-specific inhibition of phagocytosis and different in vitro sensitivity of heterogeneous coelomocytes from *Lumbricus terrestris* (Ologochaeta). *Toxicology* **109**: 157-166.
- Gad, S. C., and Weil, C. S. (1989). Statistics for toxicologists. En: Principles and methods of toxicology. Second edition. Ed por: A. W. Hayes. Raven Press. New York, USA. pp 435-483.
- Galán H.E., y A. Romero B. (2008): Contaminación de Suelos por Metales Pesados *Macla* **10**: p. 48-60.
- Gardner, C.R. (1976). The neuronal control of locomotion in the earthworms. *Biol. Rev.* **51**:25-52.
- Gish, Ch. D., and Christensen, R. E. (1973). Cadmium, nickel, lead and zinc in earthworms from roadside soil. *Environmental Science & Technology*. **7**:1060-1062.
- Goyer, R. A. (1997). Toxic and essential metal interactions. *Ann Rev. Nutr.* **17**:37-50.
- Golstein, A., Adams, E. (1968). Occurrence of glycyhydroxypyrolyl sequences in earthworm cuticle collagen. *J. Biol. Chem.* **243**: 3550-3552.
- Gray, J., and Lissmann (1938). Studies in animal locomotion VII. Locomotory reflexes in the earthworm. *The J. Exp. Biol.* **15**:506-517.

Grelle C., and Descamps, M. (1998) Heavy metal accumulation by *E. foetida* and its effects on glutathione-S-transferase activity. *Pedobiologia* **42**:289-297.

Gruber C., Sturzenbaum, S., Gehrig, P., Sack, R., Hunziker, P., Berger, B., y Dallinger, R. (año). Isolation and characterization of a self-sufficient one-domain protein (Cd)-metallothionein from *E. foetida*. *Eur. J. Biochem.* **267**: 573-582.

Hassoni, A. A., Kerkut, G. A., and Walker R. J. (1985). The action of cholinomimetic and cholinolytic agents, hemicholinium-3 and  $\alpha$  and  $\beta$ -bungarotoxin on the body wall muscle of the earthworm, *Lumbricus terrestris*. *Comp. Biochem. Physiol.* **82C**: 179-192.

Heimbach, F. (1985). Comparison of laboratory methods, using *E. foetida* and *Lumbricus terrestris*, for the assessment of the hazard of chemicals to earthworms. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **92**: 182-193.

Holmstrup, M., and V. Loeschcke. (2003). Genetic variation in dissection tolerance of *Dendrobaena octaedra* cocoons originating from different climatic regions. *Soil. Biol. Biochem.* **35**:119-124

Honeycutt, M. E., Roberts, B. L. and Roane, D. S. (1995). Cadmium disposition in earthworm *E. fétida*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **30**: 143-150.

Hund-Rinke, K. and H. Wiechering (2000). Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests, *J. Soils Sediments* **1**: 15-20.

Hund-Rinke, K., Lindemann, M., Simon, M. (2005). Experiences with novel approaches in earthworm testing alternatives. *J. Soil. Sediments.* **5**: 233-239.

IBACON. Ecotoxicology tests. [www.ibacon.de](http://www.ibacon.de) 25 Oct 2012

Ireland, M. P., and Richards, K. S. (1977). The occurrence and localisation of heavy metals and glycogen in the earthworms *Lumbricus rubellus* and *Dendrobaena rubida* from a heavy metal site. *Histochemistry.* **51**: 153-166.

Ireland, M.P. (1988). Heavy metal uptake and tissue distribution in earthworms. En. Earthworm ecology. Ed por: Satchell, J.E. Chapman & Hall, London. pp 247-265.

ISO (International Standard Organization) (1998), Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*E. fétida*), Part 2: Determination of effects on reproduction, No.11268-2. ISO, Geneve.

ISO (International Standard Organization)(2008). Soil Quality—Avoidance Test for Determining the Quality of Soils and Effects of Chemicals on Behaviour—Part 1: Test with Earthworms (*E. fétida* and *E. andrei*); ISO Guideline N° 17512-1; International Organization for standardization (ISO): Geneva, Switzerland, 2008; p. 32.

Jamieson, B.G.M. (1981). The Ultrastructure of the Oligochaeta. Academic Press, London.

- Jiang, X.C., Wang, D., Halpern, M. (1989). Isolation and characterization of alarm pheromone from electric shock-induced earthworm secretion. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **32**: 213–221.
- Jiang, X.C., Inouchi, J., Wang, D., Halpern, M. (1990). Purification and characterization of a chemoattractant from electric shock-induced earthworms secretion: Its receptor binding, and signal transduction through the vomeronasal system of garter snakes. *J. Biol. Chem.* **265**: 8736–8744.
- Kane, A.S., Salierno, J.D., and Brewer, S.K. (2005). Fish models in behavioral toxicology: Automated techniques, updates and perspectives. Pages 559-590 In: Ostrander, GK, editor. *Methods in Aquatic Toxicology (Chapter 32)*, Volume 2. Lewis Publishers, Boca Raton, FL
- Kerper, L.E., and Hinkle, P.M. (1997). Cellular uptake of lead is activated by depletion on intracellular calcium stores. *J. Biol. Chem.* **38**: 8346-8352.
- Kiewiet, A.T., and Ma, W-C. (1991). Effect of pH and calcium on leadn and cadmium uptake by earthworms in water. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **21**: 32-37.
- Kille, P., Hemmings, A., and Lunney, E. A. (1994). Memories of metallothionein. *Biochim. Biophys. Act.* **1205**: 151-161.
- Knapp, M.F., Mill, P.J. (1971). The fine structure of ciliades sensory cells in the epidermis of the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Tissue and Cell.* **3**: 623-636.
- Köhler, H-R., Hüttenrauch, K., Berkus, M., Gräff, S., and Alberti, G. (1996). Cellular hepatopancreatic reactions in *Porcellio scaber* (Isopoda) as biomarkers for the evaluation of heavy metals toxicity in soils. *Appl. Soil. Ecol.* **3**:1-15.
- Labrot, F., Narbonne, J. F., Ville, P., Saint Dennis, M., and Ribera, D. (1999). Acute toxicity, toxicokinetics, and tissue target of lead and uranium in the clam *Corbicula fluminea* and the worm *E. fétida*: Comparison with the fish *Brachydanio rerio*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **36**:167-178.
- Langdon C., M.E. Hodson., R.E. Arold, S Black.(2005). Survival, Pb-uptake and behaviour of three species of earthworm in Pb treated soils determined using an OECD-style toxicity test and a soil avoidance test. *Enviromental Poll.* **138**:368-375
- Lavelle P. (1983). The soil fauna of tropical savannas. II: The earthworms. En: bourliere F (ed). *Tropical savannas*. E.S.P.C., Amsterdam. Holanda. P 485-504
- Laverack, M.S. (1963). *The physiology of earthworms*. McMillan, New York. USA.
- Lee, K.E. (1985). *Earthworms, their ecology and relationships with soils and land use*. Academic Press, Sydney.

- Liang, SH., Y-P. Jeng, Y-W Chiu, J-H Chen, B-S Shieh, C-Y Chen, C-C Chen. (2009). Cloning, expression and characterization of cadmium-induced metallothionein-2 from earthworms *Metaphire posthuma* and *Polypheretima elongate*. *Comp. Biochem. Physiol, C.* **149**:349-357.
- Little, E.E., Brewer, S.K. (2001). Neurobehavioral toxicity in fish. Schlenk, D. and Benson, W.H. (Ed.), Target organ toxicity in marine and freshwater teleost new perspectives: Toxicology and the environment, Taylor and Francis, London and New York. 2, 139-174.
- Lock K and CR Janssen. (2001). Cadmium toxicity for terrestrial invertebrates: taking soil parameters affecting bioavailability into account. *Ecotoxicology*. **10**:315-322.
- Lourenco, J., Silva, A., Carvalho, F., Oliveira, J., Malta, M., Mendo, S., Goncalves, F., Pereira, R., (2011). Histopathological changes in the earthworm *Esienia andrei* associated with the exposure to metals and radionuclides. *Chemosphere* **85**: 1630-1634.
- Ma, W.C. (1984). sublethal toxic effects of copper on growth, reproduction and litter breakdown activity in the earthworm *lumbricus rubellus*, with observations on the influence of temperature and soil pH. *Environ. Poll.* **33**: 207-219.
- Ma, Y., N.M. Dickinson, M.H. Wong. (2002) Toxicity of Pb/Zn mine tailings to the earthworm *Pheretima* and the effects of burrowing on metal availability. *Biol. Fertil. Soils.* **36**: 79-86.
- Maboeta, M. S., Reinecke, A. J., and Reinecke. S. A. (1999). Effects of low levels of lead on growth and reproduction of the Asian earthworm *Perionyx excavatus* (Ologachete). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **44**: 236-240.
- Mahmod, S. M., and Huddart, H. (1993). Purinergic modulation of spontaneous activity and of responses to high potassium and acetylcholine in rat ileal smooth muscle. *Comp. Biochem. Physiol.* **106C**:79-85.
- Mariño, F. Ligeró and Díaz Cosín, D. J. (1996). Metales pesados en lombrices de tierra y suelos de los alrededores de la central térmica de As Pontes (La Coruña, NO España). *Bol. R. Soc. Esp. Hist. Nat. (Sec. Biol.)*, **92** (1-4), 65-73.
- Meplan, C., Mann, K., and Hainaut, P. (1999). Cadmium induces conformational modifications of wild-type p53 and suppresses p53 response to DNA damage in cultured cells. *J. Biol. Chem.* **274**: 31663-31670.
- Mhatre, G.N., and Pankhurst, C. E.(1997). Bioindicators to detect contamination of soil with special reference to heavy metals. En: Biological indicators of soil health. (Ed) C.E Pankhurst, B.M. Doube y V.V.S.R. Gupta. CAB Int. pp 349-369.
- Mill, P.J., and Knapp, M.F.(1970). Neuromuscular junctions in the body wall muscles of the earthworm, *Lumbricus terrestris* Linn. *J Cell Sci.* **7**: 263-271.

Mizutani K., H. Ogawa., J. Saito., and K. Oka. Fictive locomotion induced by octopamine in the earthworm. *The J.Exp. Biol.* **202**:265-271

Molnar, L., G. Kiszler and E. Pollak (2006). Identification and pattern of primary sensory cells in the body wall epithelium of the tubificid worm. *Limnodrilus hoffmeisteri*. *Hydrobiologia.* **564**:45-50

Momo, F. R. & L. B. Falco. 2003. Meso fauna del suelo. Biología y ecología. Pp. 51-58. In: A. Albanesi, A. Anriquez, S. Luna, C. Kunst and R. Ledesma (Eds.). Microbiología agrícola. Un aporte de la investigación argentina. Editorial de la Universidad Nacional de Santiago del Estero, Santiago del Estero. Chile.

Morgan, A. J., and Morris, B. (1982). The accumulation and intracellular compartmentation of cadmium, lead, zinc and calcium in two earthworm species (*Dendrobaena rubida* and *Lumbricus rubellus*) living in highly contaminated soil. *Histochemistry.* **75**: 269-285.

Morgan, J. E., and Morgan, A. J. (1989). The effect of lead incorporation on the elemental composition of earthworm (Annelida, Oligochaeta) chloragosome granules. *Histochemistry.* **92**: 237-241.

Morgan, J. E., and Morgan, A. J. (1992). Heavy metal concentrations in the tissue, ingesta and faeces of ecophysiologicaly different earthworm species. *Soil Biol. Biochem.* **24**: 1691-1697.

Muangphra, P., and R. Gooneratne. (2011). Comparative genotoxicity od cadmium and lead in Earthworm coelomocytes. *Applied and Environ. Soil. Sc.* Article ID 218929, 7 pages

Nadal-da-Luz, T., R. Ribeiro, and J.P. Sousa. (2004). Avoidance tests with collembola and earthworms as early screening tools for site-specific assessment of polluted soils. *Environ. Toxicol. Chem.* **23**: 2188-2193

Nadal-da-Luz, T., Römbke, J., Sousa, J.P. (2008). Avoidance tests in site specific risk assessment: influence of soil properties on the avoidance response of collembola and earthworms. *Environ. Toxicol. Chem.* **27**: 1112–1117.

Nasu, T., and Koshiha, H. (1985). The effects of K-despolarization medium, chelating agents thiol groups on cadmium uptake and efflux in the guinea-pig *taenia coli*. *J. Pharm. Pharmacol.* **37**: 536-541.

Nasu, T., Suzuki, J., and Shibata. H. (1993). Tension inhibitory effect of lead ions and lead uptake in ileal longitudinal muscle of the guinea-pig. *Comp. Biochem. Physiol.* **104C**: 91-95.

Needham, A.E. (1966). The chloragogen-pigment of earthworms. *Life Sci.* **5**: 33–39.

- Nei, L., J. Kruusma, M. Ivask, A. Kuu. (2009). Novel approaches to bioindication of heavy metals in soils contaminated by oil shale wastes. *Oil Shale*. **26**:424-431
- Neuhauser, E. F., Malecki, M. R., and Loher, R. C. (1984). Growth and reproduction on the earthworm *E. fétida*, after exposure to sublethal concentrations of metals. *Pedobiologia* **27**:89-97.
- Neuhauser, E. F., Durkin, P. R., Malecki, M. R., and Anatra, M. (1986a). Comparative toxicity of ten organic chemicals to four earthworm species. *Comp. Biochem. Physiol.* **83**: 197-200.
- Neuhauser, E.F., Loehr, R.C., Malecki, M.R., (1986b). Contact and artificial soil tests using earthworms to evaluate the impact of wastes in soils. Pp 192-203. In: Hazardous and industrial solid waste testing: Fourth symposium. ASTM STP 886. Petros JK Jr, Lacy WJ, Conway RA (eds) American Society for testing and materials. Philadelphia.
- Newell, G.E. (1950). The role of the coelomic fluid in the movements of earthworms. *The J. Exp. Biol.* **27**:110-122.
- OECD, (1984). OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 207, Earthworm Acute Toxicity. OECD, Paris, France.
- OECD, (2004). Guideline for Testing of Chemicals, No. 222, Earthworm Reproduction Test (*E. fétida*/*E. andrei*). OECD, Paris, France.
- Oumi, T., Ukena, K., Matsushima, O., Ikeda, T., Fujita, T., Minakata, H., and Nomoto. K. (1995). The GGNG peptides: novel myoactive peptides isolated from the gut the whole body of the earthworms. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **216**: 1072-1078.
- Peeke, H. V. S. and Herz, M. J. (1967). Forward conditioning, backward conditioning, and pseudoconditioning sensitization in the earthworm (*Lumbricus terrestris*). *J. Comp. Physiol. Psychology.* **64**: 534-536.
- Pereira, J.L., Antunes, S.C., Ferreira, A.C., Alves, F.G., Pereira, R. (2010). Avoidance behavioral of earthworms under exposure to pesticides: Is it always chemosensorial? *J. Environ. Sc. and Health* **45**, 229–232.
- Prento, P., (1979) Metals and phosphate in the chloragosomes of *Lumbricus terrestris* and their possible physiological significance. *Cell. Tiss. Res.* **196**: 123-134.
- Quillin, K.J. (1999). Kinematic scaling of locomotion by hydrostatic animals: ontogeny of peristaltic crawling by the earthworm *Lumbricus terrestris*. *J. Exp. Biol.* **202**: 661-674.
- Ramseier, S., Deshusses, J., and Haerdi, W. (1990). Cadmium speciation studies in the intestine of *Lumbricus terrestris* by electrophoresis of metal proteins complexes. *Molecular Cellular Biochemistry* **97**: 137-144.

Ratner, S. C. and Miller, K. R. (1959). Classical conditioning in earthworm *Lumbricus terrestris*. *J. Comp. Physiol. Psychol.* **52**: 102-105

Rand, G.M. (1985). Behavior. In *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications*. Rand, G.M., S. R. Petrocelli (eds.), pp 221-256. Hemisphere Publishing, New York

Reddy, N.C., Venkateswara, R.J. (2008). Biological response of earthworm, *E. foetida* (Savigny) to an organophosphorous pesticide, profenofos. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **71**: 574-582.

Reinecke, A.J. (1992). A review of Ecotoxicological Test Methods Using Earthworms: Ecotoxicology of Earthworms. En: *Ecotoxicology of earthworms*. Editado por: Grieg-Smith P.W., Becker, H., Edwards, P.J., Heimbach, F. Intercept Ltd. pp 7-20.

Reinecke A J., and Reinecke S. A. (1998). The use of earthworms in ecotoxicological evaluations and risk assessment: new approaches. . In: *Earthworms Ecology* (C. A. Edwards Ed.) pp 273-293 CRC Press. The Netherlands.

Reinecke, S. A., Prisoloo, W., and Reinecke, A. J. (1999). Resistance of *E. fétida* (Ologochaeta) to cadmium after long-term exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **42**:75-80.

Richards, K.S. (1975). The ultrastructure of the metachromatic mucous cells of some British lumbricids (Annelida). *J. Zool. Lond.* **177**: 233–246.

Richards, K.S., Ireland, M.P. (1978). Glycogen-lead relationship in the earthworm *Dendrobaena rubida* from a heavy metal site. *Histochemistry* **56**: 55-64.

Roberts, M.V.B. (1962). The giant fibre reflex of the earthworm. *Lumbricus terrestris*: I rapid response. *J. Exp. Biol.* **39**: 219-227.

Rojas, E., Herrera, L. A., Poirier, L. A., and Ostrosky-Wegman, P. (1999). Are metals dietary carcinogens?. *Mutat. Res.* **443**:157-181.

Römbke, J. (2006). Tools and techniques for the assessment of ecotoxicological impacts of contaminants in the terrestrial environment. *Human Ecol Risk Assessment.* **12**:84-106.

Roots, B.I., Johnston, P.V.(1966). The lipids and pigments of the chloragosomes of the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Comp. Biochem. Physiol.* **17**: 285–286.

Rosenbluth, J. (1978). Particle arrays in three earthworm postjunctional membranes. *The J. Cell Biol.* **76**:76-86.

Rostner B. (2010). *Fundamentals biostatistics*. Cengage learning. Inc USA

- Sánchez, G. A. (1997). La fibra muscular esquelética. En: Memorias del curso internacional: Actualización en Fisiología. XL Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. A.C. pp 117-130.
- Sandifer, R. D., and Hopkin, S. P. (1997). Effect of temperature on the relative toxicities of Cd, Cu, Pb, and Zn to *Folsomia candida* (Collembola). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **37**:125-130.
- Schaefer, M. (2003). Behavioral endpoints in earthworms ecotoxicology: Evaluation of different test systems in soil toxicity assessment. *J. Soil. Sediments.* **3**:79-84
- Schmidt, G.H., and Ibrahim, M.M. (1994). Heavy metal content ( $Hg^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ) in various body parts: its impact on cholinesterase activity and binding glycoproteins in the grasshopper *Aiolopus thalassinus* adults. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **29**: 148-164.
- Scott-Fordsman, J. J., and Weeks, J. M. (2000). Biomarkers in earthworms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **165**:117-159.
- Seymour, M.K. (1969). Locomotion and coelomic pressure in *Lumbricus terrestris*. *J. Exp. Biol.* **51**: 47-58.
- Sharma, V.J., Satyanarayan, S.(2011). Effect of selected heavy metals on the histopathology of different tissues of earthworms *Eudrillus eugeniae*. *Environ. Monit. Assess.* **180**: 257-267.
- Siekierska, E. (2003). Cadmium effect on the structure of supra and subpharyngeal ganglia and the neurosecretory processes in earthworm *Dendrobaena veneta* (Rosa). *Environ. Pollut.* **126**: 21-28.
- Siekierska, E., Urbanska-Jasik, D. (2002). Cadmium affect on the ovarian structure in earthworm *Dendrobaena veneta*(Rosa). *Environ. Pollut.* **120**: 289-297.
- Singhal, P., and Thomas, J.A. (1980). Animal models the study of behavioral effects of lead. En: Lead toxicity. Ed by Padhey Singhal and John A. Thomas. Urban & Schwarzenberg. USA.
- Spurgeon, D.J., Hopkin, S.P., Jones, D.T. (1994). Effects of cadmium, copper, lead and zinc on growth, reproduction and survival of the earthworm *E. foetida* (Savigny): Assessing the environmental impact of point-source metal contamination in terrestrial ecosystems. *Environ. Poll.* **84**: 123-130.
- Spurgeon, D.J., Hopkin. S.P. (1999). Comparisons of metal accumulation and excretion kinetics in earthworms (*E. foetida*) exposed to contaminated field and laboratory soils. *App. Soil. Ecol.* **11**, 227-243.

- Spurgeon, D.J., Svendsen, C., Kille, P., Morgan, A.J., Weeks, J.M. (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.
- Stenersen, J. (1992). Uptake and metabolism of xenobiotics by earthworms. En: *Ecotoxicology of earthworms*. Editado por: Grieg-Smith P.W., Becker, H., Edwards, P.J., Heimbach, F. Intercept Ltd. pp 129-138.
- Stephenson, J. (1930). *The Oligochaeta*. Oxford at the Clarendon Press. Reedited by Verlag Von J. Cramer 1972.
- Souza, A., Pereira, R., Antunes, S.C., Cachada, A., Pereira, E., Duarte, A.C., Gonçalves, F. (2008). Validation of avoidance assays for the screening assessment of soils under different anthropogenic disturbances. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **71**: 661-670.
- Sousa, APA and M.M. Andrea (2011). Earthworm (*E. andrei*) Avoidance of Soils Treated with Cypermethrin. *Sensors*. **11**:11056-11063
- Stürzenbaum, S. R., Kille P., and Morgan A. J. (1998). The identification, cloning and characterization of earthworm metallothionein. *FEBS Lett.* **431**: 437-42.
- Stürzenbaum, S. R., C. Winters, M. Galay., AJ. Morgan, and P. Kille. (2001). Metal ion trafficking in earthworms. Identifiacion of a cadmium-specific metallothionein. *The J. Biol. Chem.* **276**: 34013-34018.
- Taylor, D. (1983). The significance of the accumulation of cadmium by aquatic organisms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **7**: 33-42.
- Tischer S. (2009). Earthworms (Lumbricidae) as bioindicators: the relationship between in-soil and in tissue heavy metals content. *Polish J. Ecol.* **57**: 513-523.
- Tomlin, A.D. (1992). Behaviour as a Source of Earthworm Susceptibility to Ecotoxicants: *Ecotoxicology of Earthworms*. En: *Ecotoxicology of earthworms*. Editado por: Grieg-Smith P.W., Becker, H., Edwards, P.J., Heimbach, F. Intercept Ltd. pp 116-125.
- Triggle, C. R., Grant, W. F., and Triggle, D.J. (1975). Intestinal smooth muscle contraction and the effects of cadmium and A23187. *J. Exp. Pharmacol. Ther.* **194**: 182-189.
- Tripathi G., N. Kachhwaha, I Dabi and J. Singh. (2007). Earthworms as bioengineers. Chapter 70. In *Frontiers in Ecology Research*. (SD. Antonello Ed). Nova Science Publishers Inc. pp187-270
- Tsai, C-F., Tsai, S-H. (2001). Statistical distention between normal and amputated specimens in a field-collecting samples of the earthworms, *A. lautus* (*Ude*). *Zological Studies* **40**, 21-28.

Ukena, K., Oumi, T., Matsushima, O., Ikeda, T., Fujita, T., Minakata, H., and Nomoto, K. (1995). Effects of annetocin, an oxytocin-related peptide isolated from the earthworm *E. foetida*, and some putative neurotransmitters on gut motility of the earthworm. *J. Experimental Zool.* **272**: 184-193.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). (1996). *Ecological effects test guidelines. OPPTS 850.6200. Earthworm subchronic toxicity test.* USEPA 712-C-96-167. [http://www.epa.gov/opptsfrs/publications/OPPTS\\_Harmonized/850\\_Ecological\\_Effects\\_Test\\_Guidelines/Drafts/zx850-6200.pdf](http://www.epa.gov/opptsfrs/publications/OPPTS_Harmonized/850_Ecological_Effects_Test_Guidelines/Drafts/zx850-6200.pdf).

Valembois, P., Lassegues, M., Roch, P. (1992). Formation of brown bodies in the coelomic cavity of the earthworms *E. fétida andrei* and attendant changes in shape and adhesive capacity of constitutive cells. *Dev. Comp. Immunol.* **16**: 95–101.

Van Gestel, C. A. M., Van Dis, W. A., Van Breemen, E. M., and Sparenburg, P. M. (1988). Comparison of two methods for determining the viability of cocoons produced in earthworm toxicity experiments. *Pedobiologia* **32**: 367-371.

Van Gestel, C.A.M., Dis, W.A., Breemen, E.M.D-V., Sparenburg, P.M., Baerselman R., (1991). Influence of cadmium, copper, and pentachlorophenol on growth and sexual development of *E. Andrei* (Ologochaeta; Annelida). *Biol. Fertil. Soil.* **12**: 117-121.

Van Gestel, C.A.M., Dirven-van, E.M., and Baerselman, R. (1992). Influence of environmental conditions of the grow and reproduction of the earthworm *E. andrei* in an artificial soil substrate. *Pedobiologia* **36**:109-120.

Velki, M., and Hachenberger. (2012). Species-specific differences in biomarker responses in two ecologically different earthworms exposed to the insecticide dimethoate. *Comp. Biochem Physiol C.* **156**:104-144.

Venkateswara, J.R., Kaviha, P., and Padmanabha, A.R. (2003). Comparative toxicity of tetra ethyl lead and lead oxide to earthworms, *E. foetida* (Savigny). *Environ. Res.* **92**: 271-276.

Vidal, D.E., Horne, A.J. (2003). Mercury toxicity in the aquatic oligochaete *Sparganophilus pearsei*. II: autotomy as a novel form of protection. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **45**: 462-467.

Vijver, M.G., Vink, J.P.M., Miermans, C.J.H., Van Gestel, C.A.M. (2003). Oral sealing using glue: a new method to distinguish between intestinal and dermal uptake of metals in earthworms. *Soil. Biol. Biochem.* **35**: 125-132.

Vijver, M.G., Wolterbeek, H.T., Vink, J.P.M., Van Gestel, C.A.M. (2005). Surface adsorption of metals onto the earthworm *Lumbricus rubellus* and the isopod *Porcellio scaber* is negligible compared to adsorption in the body. *Sci. Tech. Environ.* **340**: 271-280.

- Wang, X., L. Chang, Z. Sun, and H. Ma. (2010). Characterization of genes expressed in response to cadmium exposure in the earthworm *E. foetida*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **73**:1214-1220
- Wang, C. ZJ sun, D. Zheng, and X. Liu.(2011). Function of mucilaginous secretions in the antimicrobial immunity system of *Esienia fétida*. *Pedobiologia* **54S**: S57-S62
- Walker, R. J., Holden-Dye, L., and Franks, C. J. ( 1993). Physiological and pharmacological studies on annelid and nematode body wall muscle. *Comp. Biochem. Physiol.* **106C** : 49-58.
- Walsh, C. T., and Harnett, K. M. (1986). Inhibitory effect of lead acetate on contractility of longitudinal smooth muscle from rt illeum. *Toxicol. Appl. Pharm.* **83**: 62-68.
- Wampler, J.E., Jamieson, B.G.M. (1980). Earthworms bioluminescence. *Comp. Biochem. Physiol.* **B 66**, 43–50.
- West, C. W., and Ankley, G. T. (1998). A laboratory assay to assess avoidance of contaminated sediments by the freshwater Oligochaete *Lumbriculus variegatus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **35** : 20-24.
- Willuhm, J., Otto, A., Schmitt-Wrede, H-P., and Wunderlich. (1996). Earthworm gene as indicator of bioefficacious cadmium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **220**: 581-585.
- Yapp, W.B. (1956). Locomotion of worms. *Nature, Lond.* **177**: 614-615.
- Yeates, G. W., Speir, V. A., Hunt, T.W., and Harmans, M.C.C. (1994). Reduction in soil biological activity following pasture contamination by copper, chromium, arsenic timber preservative. *Biol. Fert. of soils* **18**:200-208.
- Yearly, R.B. Lasorchak, J.M. and Gast, L.C.(1996). The Potential of Earthworm Avoidance Test for Evaluation of Hazardous Waste Sites.*Environ. Tox. Chem.* **15**, 1532-1537.
- Yongcan, G., Zhenzhong, W., Youmel, Z., y Xiaoyang, Mo. (1998). Bioconcentration effects of heavy metal pollution in soil on the mucosa epithelia cell ultrastructure injuring of the earthworm's gastrointestinal tract. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **60**: 280-284.

## X. APÉNDICES

Copia del artículo aceptado para titulación.

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Comparative Biochemistry and Physiology, Part A 151 (2008) 407–414

[www.elsevier.com/locate/cbpa](http://www.elsevier.com/locate/cbpa)Autofluorescence as a tool to study mucus secretion in *Eisenia foetida*<sup>☆</sup>R.B. Heredia<sup>a</sup>, S. Duñas<sup>d</sup>, L. Castillo<sup>a</sup>, J.J. Ventura<sup>b</sup>, M. Silva Briano<sup>c</sup>,  
F. Posadas del Rio<sup>a</sup>, M.G. Rodríguez<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Depto de Fisiología y Farmacología, Centro de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Mexico<sup>b</sup> Depto de Morfología, Centro de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Mexico<sup>c</sup> Depto de Biología, Centro de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Mexico<sup>d</sup> Depto de Fisiología, CICEX, Universidad de Guadalajara, Mexico

Received 20 April 2006; received in revised form 26 January 2007; accepted 27 January 2007

Available online 12 March 2007

## Abstract

Autofluorescence in living cells is due to the presence of endogenous substances that emit fluorescence upon excitation by incidental light. A type of fluorescence, bioluminescence, has been suggested to be linked to mucus secretion in earthworms; however, the origin and the physiological function of this fluorescence are not clear. The aims of this work were to describe autofluorescence in the earthworm *Eisenia foetida* by SEM, CLSM, and fluorescence microscopy and to examine the possible mechanism of mucus secretion by video microscopy. Earthworms were stimulated either chemically or electrically to induce the secretion of yellow mucus, which was subsequently studied by video microscopy. Mucus was released from the body wall and near the mouth. This phenomenon was associated with autofluorescence and involved at least four distinct stages: release of vesicles, formation of granules, muscular contraction, and organization of strands. The fluorescent molecules were stored in vesicles bound to the membranes. These vesicles were intact when shed from the body. The vesicles were stable but also changed to a granular material or formed strands. Video analyses demonstrated that secretion was dependent on the type of stimulus.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Autofluorescence; Coelomic fluid; Earthworms; Mechanism; Mucus secretion; Videomicroscopy

## 1. Introduction

Fluorescence is the light emitted when a fluorescent molecule has been excited by the appropriate light. Native fluorescence is common in bacteria, algae, aquatic invertebrates, and some insects and moths (Abels and Ludescher, 2003). Fluorescence depends on the presence of endogenous fluorescent compounds

such as nicotinamide adenine dinucleotide, flavins, and fluorophoric amino acids tryptophan, tyrosine, and phenylalanine (Albani, 2004). Other proteins such as green fluorescent protein and yellow fluorescent protein can also cause fluorescence (Daubner et al., 1987; Ya and Szalay, 2002).

The ability of earthworms to emit light has long interested researchers (Jamieson, 1983; Cardillo et al., 1997). Although much is known about the biochemistry of this earthworm luminescence, the cell biology of the phenomenon is less well understood. In *Diplocardus alvega*, bioluminescent light is emitted by a luciferin reaction; however, the anatomical origin of the bioluminescence has not been clarified (Otsuka et al., 1976). Early image-intensified microscopy studies suggested that fluorescence occurs in slime exudates, but the cellular or subcellular sources have not been elucidated (Radie and Wampler, 1978; Wampler and Jamieson, 1986).

The mucus secreted on the surfaces and mucus membranes of earthworms plays a crucial role in locomotion, feeding, osmoregulation, defense, reproduction, and protection of

<sup>☆</sup> This paper is part of the 5th special issue of CBP dedicated to The Hon. of Latin American Comparative Biochemistry and Physiology organized by Marcelo Herrera-Lima (Brazil) and co-edited by Carlos Navas (Brazil), Rene Bickhorn (Brazil), Carolina A. Pires (Brazil), Tereza Zenteno-Savin (Mexico) and the editors of CBP. This issue is dedicated to the memory of Kurt Schramm-Nielsen (1915–2007), a great mind in comparative physiology, with books translated into 16 languages, including Spanish and Portuguese, and César Lima (1934–2006), journalist, science lover and Herrera-Lima's dad.

\* Corresponding author. Lab 6, Edif. 202 Centro de Ciencias Biológicas, Avenida Universidad #940 col Bioparc, Aguascalientes, Agt. c.p. 20100, Mexico. Tel.: +52 449 9108424; fax: +52 449 9108401.

E-mail address: [romag18@hotmail.com](mailto:romag18@hotmail.com) (M.G. Rodríguez).

epithelial and other surfaces (Dayrup-Olsen et al., 1983; Denny, 1989). Appropriate to these diverse functions, mucus is composed of many components, including water, electrolytes, mucus glycoproteins, and mucopolysaccharides, as well as other large molecules such as lectins and hemocyanin (Jamieson, 1981). Secretion of yellow mucus is copious and varies considerably depending on the conditions and immediate physiological use (Dayrup-Olsen et al., 1983; Dayrup-Olsen and Luchtel, 1998).

Although bioluminescence and mucus secretion in earthworms have been linked in experimental studies, differences between the two are evident (Wampler and Jamieson, 1986; Radie and Wampler, 1978). The cellular origin and physiological function are not clear. Thus, the aim of this work was to examine autofluorescence in the earthworm *Eisenia foetida* and to uncover a possible mechanism of mucus secretion. This model of secretion offers an exceptionally favorable system for the study of mucus secretion due to the copious levels of mucus and the precise control of this secretion. Furthermore, the mucus is released onto the exposed body surface rather than within body cavities or under the protection of shells as for other organisms.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

*E. foetida* were purchased from a local dealer. Worms were maintained in a plastic case containing a mixture of humid soil, banana peel, and finely milled oat husk at a constant temperature of  $20 \pm 2$  °C. This medium favored their growth and allowed the emergence of many cocoons. Experiments were performed at room temperature with sexually mature earthworms that weighed more than 300 mg.

### 2.2. Electric stimulation

Worms were transferred to Petri dishes containing filter paper moistened with distilled water and were maintained for 24 h to depurate the intestine. Immediately prior to the electrical stimulation, earthworms were placed individually in Petri dishes containing 2 mL of saline solution (125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2.0 mM Tris buffer, pH 7.4). Field stimulation was applied to the worm using platinum electrodes connected to a Grass S-2 stimulator (Grass Instruments Co., USA). A single electrical current was applied at the lowest frequency for 2 ms. The current intensity was increased from zero until a secretion was observed. The amount of current delivered during a single stimulation was 2–30 mA as monitored with a constant current unit.

Secretion phenomena were recorded by video microscopy using a CCD color camera (Panasonic GP-KR 222) coupled to a 2.5×–10× zoom inspection microscope (Edmund Scientific, Inc., USA). The incident illumination was facilitated via a fiber optic ring light.

### 2.3. Quantification of mucus secretion

Individual worms were weighed in previously tared Petri dishes, and the electrical stimuli were applied ( $17 \pm 4$  mA). Following mucus secretion, the worms were removed from the dishes, and the Petri dishes were again weighed to determine the quantity of the mucus secretion.

### 2.4. Microscopy techniques

At the end of the stimulus, worms were fixed for further examination by scanning electron microscopy. The worms were

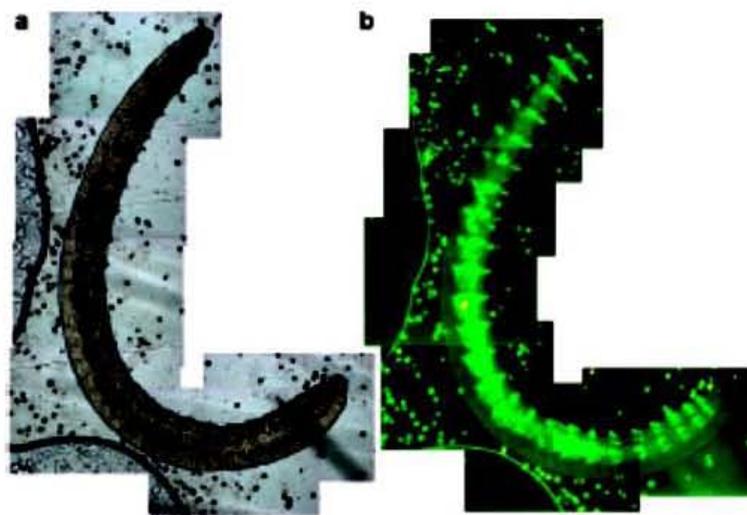


Fig. 1. Earthworm fluorescence using bright field and fluorescence microscopy. (a) The anatomical structures shown are the digestive tube, body, and anus. (b) The entire body shows green fluorescence especially the digestive tube, coelomic cavity, and secretion vesicles.

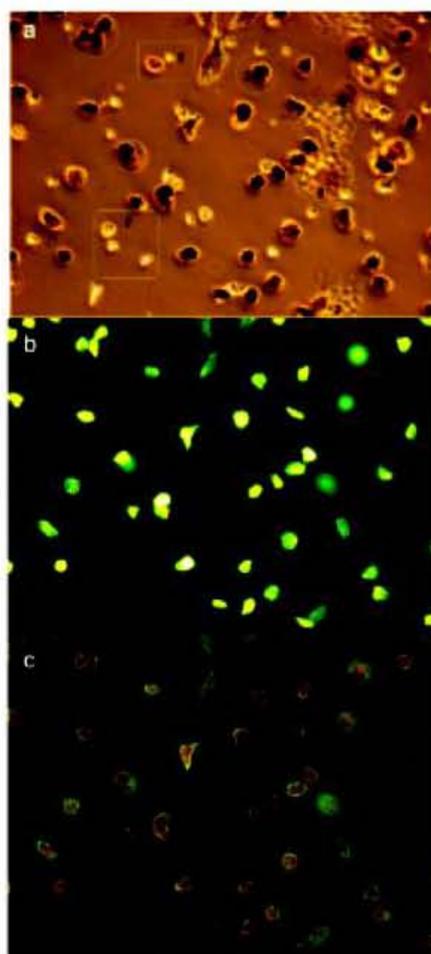


Fig. 2. Secreted mucus vesicles. (a) Bright-field microscopy of vesicles shows that the vesicles have small enclosed refractive granules. (b) The same field is shown using a fluorescence microscope. Fluorescent intact vesicles and vesicles disrupted by mechanical shearing (irregular areas, 2) are shown. (c) Overlay pictures of (a) and (b). The granules are more refractive. The granules look the same as in bright field microscopy but show green fluorescence. When the vesicles are disrupted, the fluorescence is lost (irregular areas, 1).

fixed in 2.5% glutaraldehyde and 0.1 M sodium cacodylate in phosphate buffer overnight at 4 °C, rinsed several times with phosphate buffer, and dehydrated in an acetone series (50, 80, 90 and 100%). The worms were then subjected to critical point drying, coated with metal, and examined in a Jeol model JSM 25S scanning electron microscope.

Light microscopy studies were carried out using a low light video microscope. Transmitted light pictures were obtained using a Zeiss tungsten illuminator selected by colored glass filters and a Zeiss substage condenser system adjusted for bright field illu-

mination. Fluorescence microscopy was performed with a Zeiss epi-illuminator microscope (Axiovert 40/40FL, Zeiss, Germany) and set fluorescein filters. These filters were selected from one work previously reported in earthworms (Wampler, 1982).

The confocal microscopy system used to study the vesicles consisted of a FV300 laser scanning confocal unit interfaced with an Olympus upright microscope (Olympus Optical Co. Ltd., Japan). The earthworm was placed on a dish and stimulated with electrical current in order to induce mucus secretion. The observations of the worm on the stage were made with a water immersion lens (UPLFL 40 $\times$ ) that was submerged in the saline solution contained in the dish. An Argon laser operating with a set FITC filter was used to excite and detect the emission fluorescence. Repetitive scans were acquired and subsequently subjected to analysis. To collect serial z-sections, the software was run in Z-plane. Each optical section was obtained with FluoView software and an image average was calculated at the end.

### 2.5. Elastic properties of the vesicles

To observe the elasticity of the vesicles, one worm was placed in a Petri dish and stimulated with electrical current. The secretion was allowed to settle and attach to the chamber floor for 10–15 min. After this time period, the remaining suspension was removed, and the dish was filled with worm saline solution.

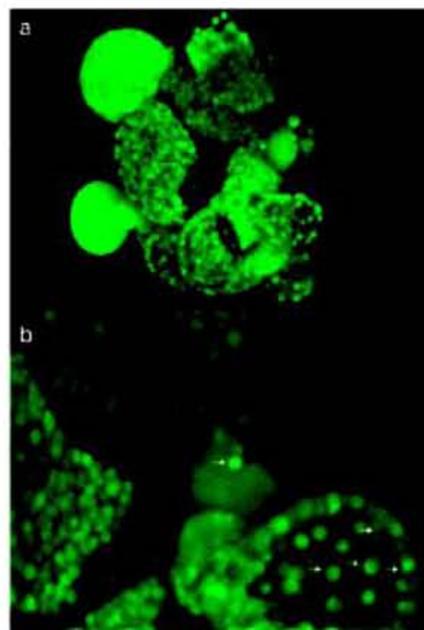


Fig. 3. Confocal microscopy of vesicles secreted by the earthworm *Eisenia foetida*. (a) Mucus vesicles containing granules. (b) Magnification of the vesicles with small fluorescent granules (white arrows).

The chamber was mounted on a stage of the inverted microscope (Zeiss) equipped with a video system. A vesicle was impaled with a micropipette and gentle pressure was applied. The software J-image (NIH, USA) was used for analysis.

### 2.6. Kinetics of mucus secretion

Viewing chambers made from glass slides and paraffin (1 mm W × 1 mm D × 5 cm L). The chambers were shallow with a narrow trough with dimensions slightly wider and longer than a single worm so that the worm fit snugly into the chamber. The chamber had hydrophobic walls and a hydrophilic floor. The hydrophobic wall ensured that a small volume of water used to bathe the worm, remained within the trough as an elongated column bound by its surface tension. Thus, the worm remained entrapped by the water surface tension. The worms also maintained contact with the solid walls and the electrodes under their body, thus minimizing crawling activity and optimizing mucus secretion viewing. Excess saline solution was removed from the chamber, and a cover slip was placed on the viewing chamber. Secretions were recorded by video microscopy using a CCD color camera (Panasonic GP-KR222) coupled to a 2.5×–10× zoom inspection microscope (Edmund Scientific, Inc. USA). Video clips of longer than 5 min in length were digitized with Pinnacle Studio version 7

software. To view the observation field, incidental illumination was facilitated with a fiber optic ring light. The worm mucus secretions were filmed at 30 frames/s. At least two minutes were digitized before the electrical stimulation. The fields were digitized every 33 ms. More than 50 individual animals were studied. For purpose of illustrate two sequences that yielded the greatest muscle contractions and mucus secretion were reported.

### 2.7. Statistics

Data obtained from experiments in this study reported as quantitative values are given as mean ± S.D. For each description of phenomena the same results were obtained in several preparations.

## 3. Results

### 3.1. Autofluorescence

Fig. 1a depicts a small *E. foetida* earthworm that was previously stimulated with an electrical current. The mucus secretion, which appeared as small vesicles, is clearly visible. The digestive tube and the body wall appeared to be separated by the coelomic fluid. Fig. 1b shows the same earthworm under fluorescence microscopy. The earthworm exhibited out of fluorescence

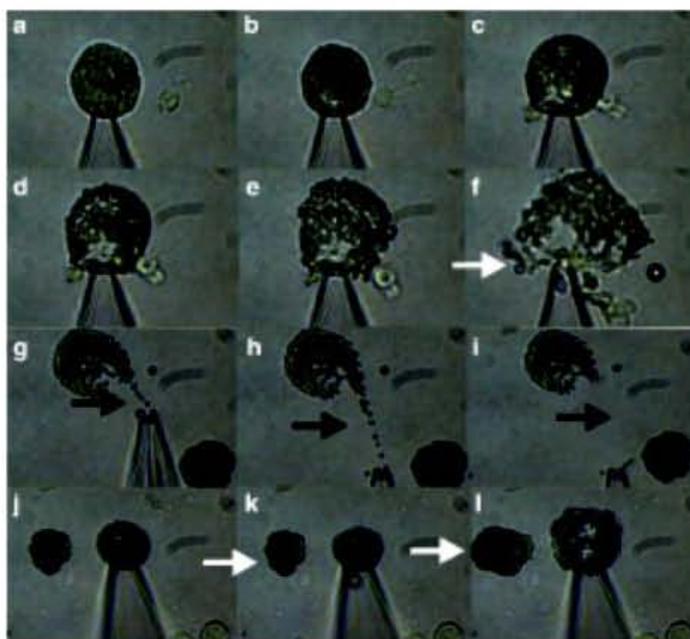


Fig. 4. Effects of shear stress on the mucus vesicles. A single vesicle was touched with a micropipette (a). When gentle positive pressure was applied, the volume of the vesicle changed (b–d). Application of successive pressure resulted in breaking the vesicle and subsequent release of its granules (e). The micropipette retained a highly elastic fragment (g). Elongation resulted in a linear arrangement of the granules (h), and this arrangement was lost upon the application of shear stress (i). The mechanical stress also deformed the adjacent vesicles (j–l).

in all parts of the body with principal fluorescence in the digestive tube, the setae, and the mucus secretions. When the mucus secretion was examined using fluorescence microscopy with fluorescein filters, green fluorescence was observed (Fig. 2b, c). As seen in Fig. 2a, some vesicles appeared to be refractive particles while some vesicles were broken and amorphous. The fluorescence was diffuse or absent in some vesicles. Other vesicles were elongated and lost their form over time. Small refractive granules, which adhered to vesicles, showed even greater green fluorescence than the typical granules (Fig. 2c).

In addition, the secretions in the liquid media were examined by confocal microscopy. The secreted mucus was composed of small vesicles arranged as clusters (Fig. 3a). The intact vesicles had an oval shape with diameter of major axis  $35.7 \pm 3.9 \mu\text{m}$  and  $29.5 \pm 2.9 \mu\text{m}$  minor axis ( $n=50$ ). Other vesicles lost their shape upon exposure to mechanical stress. Confocal analysis in the Z-plane revealed spherical particles (diameter  $1.44 \pm 0.06 \mu\text{m}$ ,  $n=100$ ) with strong fluorescence. These particles were associated with the basal membrane although occasionally these particles were free (Fig. 3b).

### 3.2. Elastic properties of the vesicles

The vesicles were quite elastic, and the volume was increased with gentle pressure by a micropipette tip (Fig. 4a, b, and c). Excessive pressure caused the vesicles to break and release granules (Fig. 4d, e, and f). Small pockets of refractive granules

were seen while, in other cases, the granules were dispersed in Brownian motion. The elastic response of the vesicle to pressure resulted in retention of a vesicle fragment (Fig. 4g), elongation and a linear release of granules (Fig. 4h), and loss of this structure under higher stress (Fig. 4i). The stress also deformed adjacent vesicles (Fig. 4j, k, and l).

### 3.3. Electrical and chemical stimulation

Before stimulation, all worms had minimal mucus secretion (Fig. 5a), but following electrical or chemical stimuli, they secreted viscous, cloudy, yellow mucus-like fluid (Fig. 5b and 6). This effect was observed visually and also recorded by video microscopy. Scanning electron microscopy revealed that the space between the segments was the precise site of secretion (Fig. 5d). The threshold for secretion was  $17.3 \pm 2.5 \text{ mA}$  ( $n=30$ ). The addition of NaCl or KCl to external medium induced mucus secretion only at high concentrations of  $653 \pm 35 \text{ mM}$  and  $385 \pm 21 \text{ mM}$ , respectively. When added to the worm medium, neurotransmitters such as acetylcholine ( $100 \mu\text{g/ml}$ ), adrenalin ( $50 \mu\text{g/ml}$ ), L-glutamate ( $100 \mu\text{g/ml}$ ), and serotonin ( $150 \mu\text{g/ml}$ ) also provoked mucus secretion in a dose-independent manner. As the quantity of mucus secretion was determined by the difference in body mass before and after secretion, the secretion of individual worms was  $0.067 \pm 0.017 \text{ g}$  ( $n=30$ ), which corresponds to 12.2% of body mass. Examination by microscopy showed that the mucus was transformed into

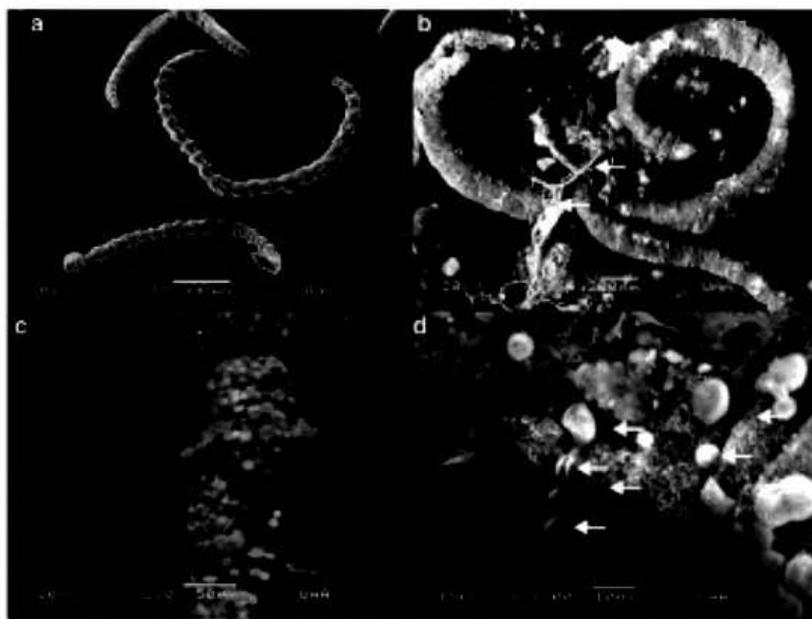


Fig. 5. Scanning electron micrographs of *Eisenia fetida*: (a) control condition and (b) following electrical stimulation at 15 mA. Mucus strands formed and adhered to the body wall. SEM of earthworm segments: (c) secreted vesicles adhered to body wall and (d) magnification showing the arrangement of vesicles from the intersegment space.

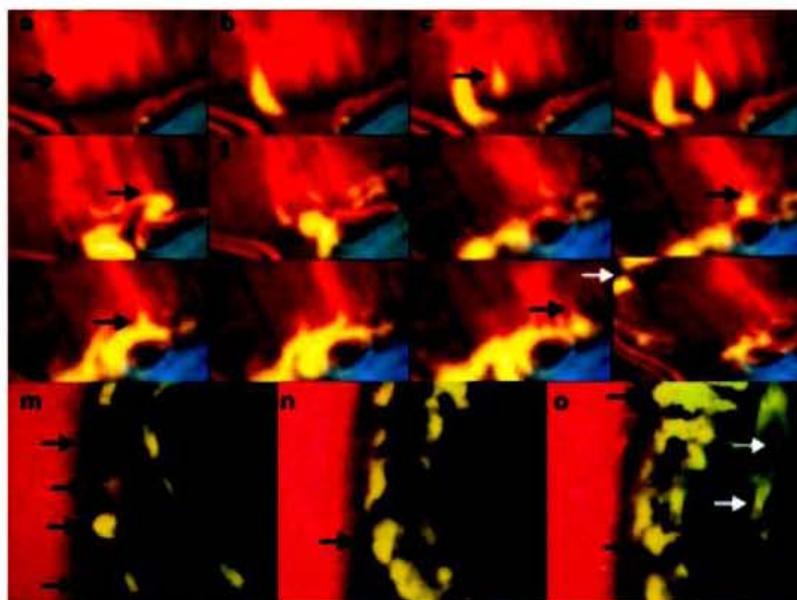


Fig. 6. Kinetics of mucus secretion in the segments in earthworms. The earthworm was stimulated with an electric current. A video sequence of the resultant mucus secretion was analyzed. (a) Earthworm before stimuli (0 ms). (b–h) Sequential time frames obtained each 33 ms. (m, n, o) Frames from a different earthworm under the same conditions. The frames (m) and (n) show lateral side views of the earthworm before (m) and after (n) stimulation. Arrows indicate the points of secretion.

strands by shearing stress (Fig. 5b). In addition, the mucus was very adhesive and remained bound to the cuticles even after being processed for scanning microscopy (Fig. 5c).

The electrical stimulation of worms in saline solution resulted in secretion of large quantities of fluid containing ovoid vesicles of varying sizes ( $35.7 \pm 3.9 \mu\text{m}$  major axis,  $29.5 \pm 2.9 \mu\text{m}$ ). These vesicles were sedimented by centrifugation (5 min at  $750 \times g$ ). The vesicles were unstable and sometimes swelled and ruptured. The vesicles were converted to a densely sticky or granular mass upon treatment with Triton X-100 or lipid solvents (ethanol, acetone, and ether mixed 1:5 with vesicle suspensions). Intact vesicles exposed to water or glutaraldehyde (2% in cacodylate buffer) suffered swelling and loss of the ovoid shape. These vesicles were observed via transmission microscopy to become an amorphous mass containing small granules. The supernatant fluid that had been separated from the secreted mucus after centrifugation was a faint yellow color with none of the other obvious physical properties of mucus.

### 3.4. Kinetics of mucus secretion

Composite video images (Fig. 6) have been constructed to illustrate the general sequence of events that occur during mucus secretion. Generally, the worm exhibited yellow pigment in the coelomic fluid. Upon electrical stimulation, the worm moved backwards, and all of the segments contracted.

Subsequently, the worm resumed forward movement, and the mucus was secreted at the first segment (Fig. 6b) as a yellow fluid. The mucus then appeared at the lateral side, and when the worm continued moving, the secretion appeared in the next segments (Fig. 6c, d, e, f, g and h). Concomitantly, the mucus secretion increased in the first segment. As the posterior segments contracted, the mucus secretion was increased in the proximal segments (Fig. 6i, j, k). Thus, these video images indicated that the earthworms secreted mucus along the body wall by the lateral sides (Fig. 6l, m, n, and o white arrows) and most abundantly from the proximal side near the prostomium.

### 4. Discussion

The present study reports several findings that, although relatively simple in nature, are of profound importance for understanding the integrative properties of the mucus secretion. The experiments were conducted on the earthworm *E. foetida* as these organisms secrete yellow mucus under basal conditions (Stephenson, 1980; Needham, 1966; Jiang et al., 1989) and exhibit autofluorescence in the entire body especially in the body wall, setae, and digestive tube (Fig. 1). In general, the pigment of the body wall of earthworms is usually red, brown, or purple and occasionally olive or green. The setae and intestinal tube have been described as a faint yellow color (Stephenson, 1980). Wampler and Jamieson (1980), on the other hand, described bioluminescence in twelve species of

earthworms. A broad spectrum of emissions was detected with a maxima ranging from 500 nm to 570 nm. This bioluminescence was associated with chloamogocytes. Recently, Albani et al. (2003) reported autofluorescence in the coelomic fluid in *E. foetida* and suggested that the fluorescent compound 4-methylumbelliferyl  $\beta$ -D-glucuronide may be responsible for the fluorescence. The pigmentation of earthworms has been conferred to compounds such as flavins (Needham, 1966), carotenoids, flavones, coumarins (Roots and Johnston, 1966), and erythrocrucorin (Cardillo et al., 1997). These compounds are conjugated to lipids and proteins and show fluorescence upon excitation with ultraviolet light. A study to isolate the fluorescent compound has not yet been conducted, and only a partial characterization of the one fluorescent compound has been published (Jiang et al., 1989). The confocal microscopy studies revealed that the fluorescence was localized to small fluorescent granules in contact with the vesicles. This result is consistent with a previously described specific packing mechanism in which fluorescent pigment joins to other macromolecules such as proteins or lipids (Roots and Johnston, 1966). Following centrifugation, the secreted mucus supernatant was free of visible particles suggesting that the fluorescent pigment is polar. Needham (1966) and Jiang et al. (1989) have also isolated water-soluble yellow pigment from earthworms.

Our results demonstrate that the yellow secretion of earthworms was autofluorescent when illuminated with the appropriate light. The color of the mucus is related to the metabolic process (Stephenson, 1980; Albani, 2003). Richards (1977) identified yellow cells in the epidermis. Furthermore, he described the possible interaction of these yellow cells with mucus cells (Richards, 1975). Other researchers have found a close relationship between the intestinal tissue (chloamogogenous tissue), the coelomic fluid, and the yellow pigment in earthworms (Needham, 1966; Roots and Johnston, 1966; Emo and Molnár, 1992; Valenbois et al., 1992).

The phenomenon of this secretion in earthworms is quite common in invertebrates and occurs in slugs, sea stars, anemone, and squid. In fact, most of the 90% of animals without backbones are bursting with mucus secretions which serve a far broader spectrum of functions than in vertebrates. Examples include navigation, defense, desiccation resistance, structural support, feeding, and locomotion (Denny, 1989). In earthworms, mucus originates from the tissues in response to noxious stimuli. The mucus secretion is accompanied by extrusion of intact vesicles that contain mucopolysaccharides and glycoproteins (Jiang et al., 1990). The 1- $\mu$ m granules are adherent and can be transformed to strands. Shearing stress participates in the characteristic organization of the mucus strands. Such forces may be developed by contact with surfaces.

Chemical or electrical stimulation provoked the expulsion of mucus from the coelomic fluid (Jiang et al., 1990). Following stimulation, the earthworms responded with a fast impulse similar to the escape response described by Roberts (1962). The earthworm secreted mucus from the prostomium to elude the stimulus (IV segment, Fig. 6). This response has been described many times previously (Wampler et al., 1980; Jiang et al., 1990). The mucus was then secreted from the adjacent seg-

ments. In our system, the earthworm was unable to move freely, and this confinement caused the mucus to remain crowded together. The adhesive properties of this mucus facilitated the adhesion to the cuticle. On the contrary, worms freely swimming in saline solution secreted mucus and resulted in isolated vesicles. The muscular contraction of subsequent segments provoked the secretion of mucus from the lateral sides along the body. Therefore, this process involved the release of intact vesicles, deformation, adhesion, and conversion to strands. Similar production of vesicles and their disruption were observed in slugs of the genera *Ariolimax* and *Limax* and in the snail *Helix aspersa* (Dayrup-Olsen et al., 1983; Prince et al., 1998). The mucus was secreted promptly upon exposure to high levels of heavy metals and resulted in mucus strand formation (Bouché et al., 2000). The expulsion of mucus near the prostomium could signal a defense mechanism similar to the expulsion of ink in octopus and squid (Thompson and Kier, 2001). As a defense mechanism, the mucus adhesive properties may serve to delay the predator and facilitate the earthworm locomotion (Denny, 1989).

In conclusion, the earthworm *E. foetida* exhibited autofluorescence in the intestine, setae, and coelomic fluid. The secreted mucus also yielded autofluorescence. This mucus was extruded from the earthworms in intact vesicles containing small granules. Exposure to shear stress converted the vesicles to strands. This mechanism may be used as a secretion model to offer an exceptionally favorable system for the study of mucus secretions due to the copious levels of mucus, the precise control of these secretions, and their release onto the exposed body surface and not within body cavities.

#### Acknowledgments

The authors are indebted to T.L.C. Rosa Isabel Sandoval Lozano (Laboratorio de Morfología, Universidad Autónoma de Aguascalientes) and, Lic. Biología Araceli Adbache Ortiz (Laboratorio de Microscopía de Alta Resolución, Depto de Biología) for their technical support. Christian Jesús Rubio Gómez, and Hector García Rangel are undergraduates that helped with the video analysis. Bimania Heredia Rivera is a postgraduate student at Autonomous University of México.

#### References

- Abida, J.P., Ladoacher, R.D., 2003. Native fluorescence from juvenile stages of common food storage insects. *J. Agric. Food Chem.* 51, 544–549.
- Albani, J.R., 2004. Structure and dynamics of macromolecular absorption and fluorescence studies. Elsevier Science Publishers Amsterdam, Netherlands.
- Albani, J.R., Demeryck, S., Graciano, F., Laporte, A., 2003. Fluorescence fingerprints of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Photochem. Photobiol.* 78, 599–602.
- Bouché, M.L., Hubert, F., Bagnard-Babenzon, S., Vernet, G., 2000. Toxic effects and bioaccumulation of cadmium in the aquatic oligochaete *Tubificoides tubificus*. *Environ. Toxicol. Saf.* 46, 246–251.
- Cardillo, F., de Paik, E., Oliveira, G.R., Marangoni, S., Oliveira, B., Martins, N.C., 1997. Erythrocrucorin of *Glossoscolex paulista* (Oligochaeta, Glossoscolecidae) modulation of oxygen affinity by specific antibodies. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 41, 497–509.

- Dunbar, S.C., Auring, A.M., Lamm, G.H., Baldwin, T.G., 1987. Yellow light emission of *Rhizoflavet* strain Y-1: purification and characterization of the energy-accepting yellow fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 8912–8916.
- Dayup-Chan, I., Luchini, D.L., 1998. Secretion of mucous granules and other membrane-bound structures: a look beyond exocytosis. *Int. Rev. Cyt.* 183, 95–141.
- Dayup-Chan, I., Luchini, D.L., Martin, A.W., 1983. Components of mucus of terrestrial slugs (Gastropoda). *Am. J. Physiol.* 245, R448–R452.
- Denny, M.W., 1989. Invertebrate mucous secretions: functional alternatives to vertebrate paradigms. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 1989, 337–366.
- Erno, F., Molnár, L., 1992. Environmental aspects of the chironomous tissue of earthworms. *Soil Biol. Biochem.* 24, 1723–1727.
- Jarman, B.G.M., 1981. *The Ultrastructure of the Oligochaeta*. Academic Press, London.
- Jiang, X.C., Wang, D., Halpern, M., 1989. Isolation and characterization of alarm pheromone from electric shock-induced earthworm secretion. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 32, 213–221.
- Jiang, X.C., Inouchi, J., Wang, D., Halpern, M., 1990. Purification and characterization of a chemoretractant from electric shock-induced earthworm secretion, its receptor binding, and signal transduction through the vomeronasal system of garter snakes. *J. Biol. Chem.* 265, 8736–8744.
- Nandham, A.E., 1966. The chironogen-pigment of earthworms. *Life Sci.* 5, 33–39.
- Ostika, H., Ruda, N.G., Wampler, J.E., 1976. Structural identification and synthesis of luciferin from the bioluminescent earthworm, *Diplocardia longa*. *Biochemistry* 15, 1001–1004.
- Prince, J., Nolan, T.G., Cotho, I., 1998. Defensive ink pigment processing and secretion in *Physa californica*: concentration and storage of phenylthiothioin in the ink gland. *J. Exp. Biol.* 201, 1595–1613.
- Richards, K.S., 1975. The ultrastructure of the metachromatic mucous cells of some British landplanarians (Annelida). *J. Zool. Lond.* 177, 233–246.
- Richards, K.S., 1977. The histochemistry of the mucous cells of the epidermis of some landplanarian enchytraeids (Annelida: Oligochaeta). *Cell. Mol. Biol. Int. Cytol. Enzymol.* 22, 219–225.
- Roberts, M.B.V., 1962. The gaseous reflex of the earthworm *Lumbricus terrestris* L. *J. Exp. Biol.* 39, 219–227.
- Rosa, B.L., Johnson, P.V., 1966. The lipids and pigments of the chironomous of the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Comp. Biochem. Physiol.* 17, 285–286.
- Ruda, N.G., Wampler, J.E., 1978. Earthworm bioluminescence: characterization of the luminiferous cell from *Diplocardia longa*. *Comp. Biochem. Physiol.* A 59, 1–8.
- Stephenson, J., 1930. *The Oligochaeta*. Oxford at the Clarendon Press. Reprinted by Verlag Van J. Cramer 1972.
- Thompson, J.T., King, W.M., 2001. Ontogenic changes in muscle kinematics escape-jet locomotion in the oval squid *Sepioteuthis lessonae* Lesson, 1830. *Biol. Bull.* 201, 154–166.
- Valambona, P., Laugustin, M., Koch, P., 1992. Formation of brown bodies in the coelomic cavity of the earthworms *Eisenia fetida* and related changes in shape and adhesive capacity of contractile cells. *Dev. Comp. Immunol.* 16, 95–101.
- Wampler, J.E., 1982. The bioluminescence system of microstrilix phosphorated its similarities to those of other earthworms (Oligochaeta). *Comp. Biochem. Physiol.* A 71, 599–604.
- Wampler, J.E., Jarman, B.G.M., 1980. Earthworm bioluminescence. *Comp. Biochem. Physiol.* B 66, 43–50.
- Wampler, J.E., Jarman, B.G.M., 1986. Cell bound bioluminescence from *Photodrilus borealis* and its similarities to other earthworm bioluminescence. *Comp. Biochem. Physiol.* A 84, 81–82.
- Yu, Y., Szalay, A.A., 2002. A *RuvB* luciferase-Apuro-GFP (ruo-gfp) fusion gene construct permits real-time detection of promoter activation by nongenetically administered inducements in vivo. *Mol. Genet. Genomics* 268, 169–179.