

**INMUNOTOXICIDAD DE MALATIÓN Y CLORPIRIFOS EN LA LOMBRIZ DE TIERRA *Eisenia* sp. (ANNELIDA: OLIGOCHAETA)****IMMUNOTOXICITY OF MALATHION AND CHLORPYRIFOS IN THE EARTHWORM *Eisenia* sp. (ANNELIDA: OLIGOCHAETA)**CARMEN CORTESÍA<sup>1</sup>, LEIDA MARCANO<sup>2</sup>, ELENA MARCANO<sup>2</sup>, EDGAR ZAPATA-VÍVENES<sup>2</sup><sup>1</sup>Universidad Politécnica Territorial del Oeste de Sucre, Departamento de Biología,<sup>2</sup>Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Escuela de Ciencias, Departamento de Biología,

Laboratorio de Bioquímica y Ecotoxicología, Cumaná, Venezuela

E-mail: ezapata@udo.edu.ve / edzapata2002@yahoo.com

**RESUMEN**

Se evaluaron los efectos de malatión y clorpirifos sobre respuestas inmunes de *Eisenia* sp. usando ensayos de toxicidad estándar. En recipientes plásticos con suelos naturales como sustrato, lombrices sexualmente maduras fueron expuestas a malatión (300 mg kg<sup>-1</sup> de suelo) y clorpirifos (400 mg kg<sup>-1</sup> de suelo) durante 7 y 21 días. Después de los períodos de exposición, se determinó la viabilidad celular, número total de celomocitos (NTC), porcentaje de células fagocíticas (PCF), actividad de lisozima y porcentaje de hemólisis. La exposición a malatión y clorpirifos causó descenso significativo en el NTC, actividad de lisozima y hemolítica, pero estas variables no fueron afectadas por el tiempo de exposición. El PCF disminuyó en lombrices expuestas a ambos pesticidas, siendo dependiente del tiempo de exposición. Los resultados sugieren una acción inmunotóxica de ambos agroquímicos sobre respuestas inmunes celulares y humorales de *Eisenia* sp., lo cual podría intensificar los efectos perjudiciales causados por estresores bióticos, tales como microorganismos patógenos asociados al suelo. Las respuestas inmunes mediadas por los celomocitos de *Eisenia* sp. evaluadas en este estudio fueron perjudicialmente afectadas por malatión y clorpirifos, evidenciándose la sensibilidad de éstas como potenciales biomarcadores útiles en la detección temprana de impacto ambiental por pesticidas organofosforados.

**PALABRAS CLAVE:** Celomocitos, *Eisenia*, inmunotoxicidad, pesticidas.**ABSTRACT**

The effects of malathion and chlorpyrifos on immune responses of *Eisenia* sp. were assessed using standard toxicity assays. In plastic containers with natural soils as substrate, mature sexually earthworms were exposed to malathion (300 mg kg<sup>-1</sup> of soil) and chlorpyrifos (300 mg kg<sup>-1</sup> of soil) during 7 and 21 days. After exposure periods, cellular viability, total number of coelomocytes (NTC), percentage of phagocytic cells (PCF), lysozyme activity and hemolytic percentage were determined. Malathion and chlorpyrifos exposures caused a significant decrease in NTC, lysozyme and hemolytic activities, but these variables were not affected by time of exposure. PCF declined in earthworms exposed to both pesticides; this decline was dependent of the time-exposure. The results suggest an immunotoxic action of both agrochemicals on humoral and cellular immune responses of *Eisenia* sp., which could intensify the detrimental effects caused by biotic stressors, such as pathogens microorganisms that live in the soil. The immune responses mediated by the coelomocytes of *Eisenia* sp. evaluated in this study were negatively affected by malathion and chlorpyrifos, demonstrating their sensitivity as potential biomarkers useful in early detection of environmental impact by organophosphate pesticides.

**KEY WORDS:** Coelomocytes, *Eisenia*, immunotoxicity, pesticide.**INTRODUCCIÓN**

Los pesticidas organofosforados (POF) constituyen el grupo de agroquímicos más utilizado a nivel mundial, a pesar de la amplia información que existe sobre el riesgo que éstos representan para el ambiente (Köhler y Triebkorn 2013). Su acción neurotóxica ha sido ampliamente documentada ya que interfieren con la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) y otras colinesterasas (Falugi y Aluigi 2012), no obstante, otros efectos inducidos por los POF incluyen genotoxicidad,

inmunotoxicidad, alteración del metabolismo, inhibición del crecimiento y la reproducción (Lantaville y Stone 2012).

Dentro de los organismos terrestres empleados para la evaluación de la toxicidad de sustancias químicas, particularmente pesticidas y metales pesados, las lombrices de tierra han sido adoptadas por la comunidad científica internacional como organismos centinelas apropiados, principalmente por vivir en contacto directo con el suelo y por su rol en la descomposición de la

materia orgánica y reciclaje de nutrientes aspectos que las hacen sensibles a la acción perjudicial de potenciales contaminantes (Ali y Naaz 2013). Estos anélidos poseen una cavidad celómica contentiva de un fluido en el que se hallan los celomocitos (células equivalentes a los leucocitos de vertebrados) los cuales median respuestas de defensa inmune, transporte de nutrientes, desintoxicación de xenobióticos así como la excreción de productos de desecho (Kauschke *et al.* 2007). Los celomocitos además, sintetizan y secretan dentro del fluido celómico moléculas que participan en los procesos de aglutinación, opsonización y lisis de agentes extraños (Homa *et al.* 2013).

El fluido celómico en lombrices de tierra es una vía de transporte de contaminantes desde el medio externo hacia los celomocitos y los diferentes tejidos, por tanto el sistema inmune de éstas se hace muy vulnerable a la acción perjudicial de los químicos que continuamente son vertidos al suelo (Cooper y Hirabayashi 2013). En este contexto, se han desarrollado protocolos metodológicos, basados en el uso de biomarcadores celulares que incluyen conteo total y diferencial de celomocitos, viabilidad celular, potencial fagocítico y su participación en procesos de cicatrización (Kauschke *et al.* 2007). Adicionalmente, un grupo de marcadores moleculares tales como factores proteicos con actividad aglutinante y lítica, han sido usados para estimar toxicidad a nivel humoral (Arslan-Aydoğdu y Çotuk 2008, Cooper y Hirabayashi 2013).

Existen algunas evidencias sobre el efecto inmunosupresor de los POF y carbamatos sobre el potencial fagocítico de celomocitos de *E. andrei* (Ville *et al.* 1997) y actividad inmune total de *E. veneta* (Bunn *et al.* 1996). Sin embargo, en *Lumbricus terrestris*, *E. fetida* y *E. hortensis* expuestas a aroclor y carbaril se registraron incrementos en las actividades de lisozima, proteasas y hemolisinas (Ville *et al.* 1995, Cooper y Roch 2003). En Venezuela, investigaciones sobre este aspecto son escasas, a pesar que es una práctica común el uso poco controlado de pesticidas. Particularmente clorpirifos es usado para erradicar insectos (arañuelas, áfidos, entre otros) y el malatión para el control de los mosquitos *Anopheles* y *Aedes aegypti* (Gómez y Cáceres 2010). Estos agroquímicos no son específicos en su acción (Molina-Morales *et al.* 2012) por lo que pueden causar toxicidad en organismos “no blanco” tales como las lombrices de tierra. En este sentido, este estudio evaluó los efectos a corto y mediano plazo de malatión y clorpirifos sobre respuestas inmunes celulares y humorales en la lombriz de tierra *Eisenia sp.*

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material biológico

Los ejemplares de *Eisenia sp.* fueron proporcionados por el lombricario del Instituto Nacional de Cooperación Estudiantil Socialista (INCES), ubicado en Tunapui, estado Sucre, Venezuela. Siguiendo las recomendaciones de Polo *et al.* (2012) se utilizó una mezcla (2:1) de estiércol equino y desechos vegetales como sustrato para el mantenimiento del cultivo de las lombrices utilizadas en los bioensayos.

### Bioensayos de exposición

La exposición de las lombrices a los pesticidas se llevó a cabo en contenedores plásticos de 350 cm<sup>3</sup> de capacidad provistos de 300 g del sustrato orgánico natural con base en estiércol equino y desechos vegetales, el cual fue mezclado homogéneamente con soluciones de los pesticidas. Con base en los ensayos de toxicidad previos realizados por Marcano *et al.* (2013), se usaron concentraciones subletales de clorpirifos y malatión correspondientes a 300 y 400 mg kg<sup>-1</sup> de sustrato, respectivamente. Sólo se le añadió agua desionizada (tratada con UV) al sustrato en el tratamiento control. Por cada tratamiento se emplearon 20 lombrices, distribuidas en 10 réplicas de 2 lombrices cada una. Durante el ensayo, la humedad del sustrato se mantuvo en 35%, el pH en 7,2 ± 0,5 y la temperatura de la sala en 25 ± 2°C, con un fotoperíodo de 12 h luz y 12 h oscuridad. Semanalmente, se hizo recambio total del sustrato de exposición para mantener las concentraciones de los agroquímicos, la humedad y disponibilidad de nutrientes. Transcurridos los 7 y 21 días de exposición se tomaron ejemplares según cada condición (controles y expuestos) para extraerles el fluido celómico y analizar los distintos parámetros inmunológicos.

### Respuestas celulares

Previo lavado de las lombrices con solución salina 0,85% m/v, se extrajo el fluido celómico por un método invasivo estandarizado para *Eisenia sp.* por Marcano *et al.* (2013). Para ello, se realizó punción en la cavidad celómica a nivel de la región media ventral con una jeringa hipodérmica contentiva de 50 µL de solución balanceada de Hanks pH 7,4 preparada con NaCl 10 g L<sup>-1</sup>, KCl 0,5 g L<sup>-1</sup>, glucosa 1,25 g L<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,075 g L<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,475 mg L<sup>-1</sup>. El fluido extraído de cada lombriz (100-200 µL) se dispuso en tubos Eppendorf de 1,5 mL mantenidos en frío sobre recipientes con hielo,

se agregó luego la cantidad necesaria de solución Hanks para ajustar el volumen a 1,0 mL.

El número total de celomocitos (NTC), la viabilidad celular y la actividad fagocítica de los celomocitos se estimaron siguiendo el procedimiento de Rodríguez-Grau *et al.* (1989) adaptado por Nusetti *et al.* (1998), utilizando una cámara de Neubauer y posterior observación en un microscopio óptico (Olympus B-MAX-40), a una magnificación de 40X. Se mezclaron 100  $\mu\text{L}$  del fluido con 100  $\mu\text{L}$  del colorante azul de tripano 0,4% frío (Sigma Chemical Co, preparado en solución Hanks), después de resuspender se dispensaron 10  $\mu\text{L}$  en la cámara y se hicieron contajes por triplicado de 100 células entre teñidas y no teñidas para obtener el porcentaje promedio de viabilidad. El NTC se obtuvo promediando el total de células viables contadas en los cuatro cuadrantes externos del hemocitómetro multiplicado por el factor de dilución.

Para estimar la actividad fagocítica de los celomocitos se utilizó como antígeno levadura comercial inactivada por calor (100°C). Se preparó una mezcla en tubos Eppendorf de volúmenes equivalentes (100  $\mu\text{L}$ ) del fluido celómico y el antígeno (0,1 mg mL<sup>-1</sup> en solución Hanks), luego de un periodo de incubación por 24 horas se tomaron muestras para hacer la tinción con azul de tripano y observación microscópica. Se contaron 100 células con y sin levaduras visibles en el citoplasma para estimar el porcentaje de celomocitos con actividad fagocítica.

### Respuestas humorales

Se siguió la metodología estandarizada por Goven *et al.* (1994), modificada por Marcano *et al.* (1997) para estimar la actividad de lisozima. Para ello, el fluido celómico puro extraído de cada lombriz se dispuso en tubos Eppendorf contentivos de 200  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato 100 mol L<sup>-1</sup>, pH 6,2 frío, se mezcló y se ajustó el volumen de esta preparación a 500  $\mu\text{L}$  con el mismo buffer fosfato. De esta preparación se tomaron luego 40  $\mu\text{L}$  y se cargaron por réplica en geles de agarosa 1% provistos de la bacteria *Micrococcus lysodeikticus* 0,06%, empleada como sustrato para la enzima. Transcurridas 48 horas de incubación a temperatura ambiente, se midieron los diámetros de los halos correspondientes a la lisis de la pared celular de *M. lysodeikticus* y se compararon con los halos producidos por la lisozima estándar de clara de huevo de gallina (HEL, Sigma Chemical, Co). La actividad enzimática se expresó en unidades equivalente de la lisozima estándar, calculada a través de la ecuación:  $\mu\text{g HEL mL}^{-1} = \text{antilog}_{10} [a+b (\text{diámetro en mm})]$ .

La actividad hemolítica del fluido se cuantificó siguiendo el método descrito por Arslan-Aydođdu y Çotuk (2008). El fluido puro extraído de cada lombriz se ajustó a un volumen de 500  $\mu\text{L}$  y luego se prepararon 5 diluciones seriadas, agregando solución balanceada de Hanks. De cada dilución se tomaron 100  $\mu\text{L}$  y se mezcló con un volumen igual de una solución de eritrocitos de ratón (preparados al 20% en buffer fosfato salino). Posterior a un periodo de incubación por 2 h a 25 °C, se agregó 1 mL de solución Hanks y se centrifugó a 750 *g* por 5 minutos a 4°C. En los sobrenadantes se hicieron las lecturas de absorbancia a 541 nm correspondientes a la hemólisis. Se preparó, un control negativo del ensayo con fluido celómico sin la suspensión de eritrocitos y un control positivo con la suspensión de eritrocitos y agua destilada en volúmenes iguales. La lectura de absorbancia del control positivo se tomó como equivalente al 100% de lisis y, a partir de este valor se calculó el porcentaje de lisis de las muestras experimentales aplicando la fórmula: % Hemólisis = [(Absorbancia de la muestra/Absorbancia de hemólisis total) x 100].

### Análisis estadístico

Luego de comprobarse el cumplimiento de los supuestos de homogeneidad de las varianzas y distribución normal de los datos, se aplicó análisis de varianza doble (ANOVA) para estimar las diferencias entre las distintas variables estudiadas en lombrices controles y expuestas a los agroquímicos a los 7 y 21 días, utilizando el paquete estadístico *Statgraphic* versión 5.1. Las diferencias significativas encontradas en las variables analizadas según el factor tratamiento y tiempo de exposición se analizaron mediante la prueba a posteriori de Duncan.

## RESULTADOS

### Respuestas celulares

El análisis estadístico reveló diferencias significativas en el porcentaje de celomocitos viables en relación a los tiempos de exposición ( $F_s = 28,83$ ;  $p < 0,001$ ). Sin embargo, el tratamiento con los pesticidas no tuvo efecto sobre esta variable, encontrándose un porcentaje de viabilidad promedio (en ambos periodos de exposición) de  $89,81 \pm 1,49\%$  en lombrices controles y de  $89,25 \pm 0,91\%$  y  $89,50 \pm 1,38\%$  en las expuestas a malatión y clorpirifos, respectivamente (Tabla 1). En contraste, el NTC fue afectado significativamente por el tratamiento con los pesticidas ( $F_s = 20,50$ ,  $p < 0,001$ ), registrándose en organismos controles un valor promedio de  $1,13 \pm 0,24 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>, mientras que en los grupos tratados con

los pesticidas por 21 días este valor descendió hasta  $0,92 \times 10^6 \pm 0,17 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup> y  $0,59 \times 10^6 \pm 0,05 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup> en los expuestos a clorpirifos y malatión, respectivamente (Tabla 1), sin embargo, NTC no presentó variaciones en los dos períodos de exposición ( $F_s = 1,18, p > 0,2837$ ).

El porcentaje de células fagocíticas fue afectado significativamente por los tratamientos con los pesticidas ( $F_s = 32,50, p < 0,001$ ) en los ambos períodos de exposición ( $F_s = 28,49, p < 0,001$ ). El porcentaje promedio de fagocitos descendió en los dos períodos de exposición, siendo  $17,75 \pm 1,98\%$  y  $21,75\%$  los registros más bajos observados durante los 21 días en los tratamientos con malatión y clorpirifos, respectivamente, en contraste a las lombrices controles (Tabla 1).

Tabla 1. Porcentaje de viabilidad, número total de celomocitos ( $\times 10^5$  cel mL<sup>-1</sup>) y porcentaje de células fagocíticas, en *Eisenia* sp. controles y expuestas durante 7 y 21 días a 300 mg de clorpirifos kg<sup>-1</sup> de suelo y 400 mg de malatión kg<sup>-1</sup> de suelo. Los resultados se expresan como  $X \pm DE$  (n = 8).

Variable	Días	Control	Malatión	Clorpirifos
Viabilidad	7	88,75 ± 1,75	88,63 ± 1,18	88,13 ± 1,64
	21	90,88 ± 1,24	89,88 ± 0,64	90,00 ± 1,13
NTC	7	9,44 ± 0,33	9,11 ± 0,35	9,18 ± 0,55
	21	11,3 ± 2,38	5,99 ± 0,49	9,24 ± 1,68
% Fagocitos	7	36,50 ± 5,63	24,75 ± 5,95	29,38 ± 2,56
	21	30,75 ± 4,62	17,75 ± 1,98	21,75 ± 4,20

### Respuestas humorales

Los resultados muestran un descenso significativo en la actividad de la lisozima ( $F_s = 39,36; p < 0,001$ ) en los organismos expuestos a malatión ( $4,43 \pm 3,37$  µg mL<sup>-1</sup>) y clorpirifos ( $8,63 \pm 4,15$  µg mL<sup>-1</sup>) con relación al grupo control ( $39,75 \pm 20,56$  µg mL<sup>-1</sup>). No obstante, el tiempo de exposición no tuvo un efecto significativo sobre esta variable (Tabla 2).

Se evidenció descenso significativo en el porcentaje de hemólisis dependiente de los tratamientos con los pesticidas ( $F_s = 8,01; p < 0,001$ ) y de los tiempos de exposición ( $F_s = 21,88; p < 0,001$ ). Los organismos controles exhibieron un porcentaje de hemólisis promedio de  $70,56 \pm 8,83\%$ , mientras que en los expuestos a

malatión y clorpirifos se encontraron valores promedios, respectivos de  $57,06 \pm 4,51\%$  y  $50,75 \pm 11,25\%$  (Tabla 2).

Tabla 2. Actividad de lisozima y hemolítica del fluido celómico de *Eisenia* sp. controles y expuestas durante 7 y 21 días a 300 mg de clorpirifos kg<sup>-1</sup> de suelo y 400 mg de malatión kg<sup>-1</sup> de suelo. Los resultados se expresan como  $X \pm DE$  (n = 8).

Actividad	Días	Control	Malatión	Clorpirifos
Lisozimas	7	39,75 ± 20,56	4,00 ± 4,50	4,63 ± 3,02
	21	39,75 ± 20,56	4,87 ± 2,20	12,63 ± 5,29
% Hemólisis	7	70,88 ± 12,32	58,13 ± 4,58	51,62 ± 15,45
	21	70,00 ± 5,34	56,00 ± 10,32	49,88 ± 8,03

### DISCUSIÓN

Los descensos significativos en las respuestas inmunológicas celulares y humorales de *Eisenia* sp. expuesta a malatión y clorpirifos ponen en evidencia la acción inmunotóxica de tales agroquímicos, debilitando su primera línea de defensa de inmunidad innata basada en celomocitos y sustancias bacteriolíticas (Homa *et al.* 2013), lo que podría aumentar la susceptibilidad del organismo a la invasión por microorganismos patógenos, poniendo en riesgo su sobrevivencia.

Se conocen muchos estudios que han asociado la toxicidad de pesticidas POF con la inhibición de enzimas colinesterasas (Falugi y Aluigi 2012), no obstante, los mecanismos por los cuales estos químicos inducen inmunotoxicidad no están claramente establecidos (Banerjee *et al.* 2008). Sin embargo, Pruett (1992) propuso un mecanismo de acción tóxica de POF sobre el sistema inmune de oligoquetos similar al descrito para vertebrados; un efecto indirecto que promueve alteraciones en la función y regulación de células inmunes como consecuencia de la inhibición de AChE. Adicionalmente, Galloway y Handy (2003) sugieren que los efectos pueden ser directos, vía inhibición de enzimas hidrolasas o esterasas en componentes del sistema inmune, mediado por daño oxidativo. Recientemente, Köhler y Triebkorn (2013) señalaron que la inmunotoxicidad ejercida por POF se asocia a la inhibición de enzimas serin-hidrolasas y esterasas, daño oxidativo y modulación de rutas de transducción de señales.

La toxicidad ejercida por malatión y clorpirifos sobre respuestas inmunes mediadas por células y humorales de *Eisenia* sp. posiblemente se encuentre asociada a una sobreproducción de agentes prooxidantes y de estrés

oxidativo. Propuesta sustentada, en los resultados de Marcano *et al.* (2013) quienes observaron incremento significativo de las concentraciones de malondialdehído (MDA) durante la exposición a estos mismos pesticidas durante períodos similares de exposición. MDA es uno de los productos de reacciones de lipoperoxidación, asociados además con daños en membranas lisosomales y estructura del ADN de celomocitos de *Eisenia* sp.

Alternativamente, la acción inmunotóxica pudo ser el resultado de la interacción directa de metabolitos bioactivos (oxones) con esterases de la membrana plasmática de los celomocitos que cooperan con el sistema inmune en el reconocimiento y destrucción de antígenos extraños (Rabideau 2001). En este sentido, se conoce que durante la primera fase del proceso de biotransformación de estos agroquímicos se generan metabolitos bioactivos (maloxon y clorpirifo-oxon) con una alta afinidad por colinesterasa y, la acción de enzimas monoxigenasas dependientes de NAD(P)H pueden generar especies reactivas del oxígeno (ERO) que desencadenan daños oxidativos (Rabideau 2001). Diversos estudios han revelado que la exposición a xenobióticos, incluyendo pesticidas, generan patologías oxidativas, entre ellas: daños al ADN y membranas celulares, alteraciones de la estructura y lisis mitocondrial, reacciones de oxidación de proteínas y peroxidación de lípidos que pueden desencadenar en lisis celular; este último proceso puede tener severas implicaciones sobre procesos de regulación de células inmunes (Descotes y Vial 1994, Descotes 2000).

Se infiere que el descenso en el NTC de *Eisenia* sp, como ha sido demostrado para otras especies de lombrices, posiblemente se asocie con daños estructurales a nivel de la membrana plasmática de los celomocitos, mediados por estrés oxidativo que desencadenan lisis, siendo esta la principal causa de las perturbaciones de las funciones celulares y humorales dependientes de estas células (Homa *et al.* 2007). Liu *et al.* (2009) revelaron patologías oxidativas asociadas a daños genotóxicos en celomocitos de *E. fetida* expuesta a los pesticidas endosulfan y atrazina. Otros autores, reportaron que la acción perjudicial de clorpirifos es ejercida por radicales libres a nivel de membranas lisosomales en celomocitos de *Aporrectodea caliginosa* y *E. fetida andrei* (Casabé *et al.* 2007, Piola *et al.* 2009).

El porcentaje de células fagocíticas en *Eisenia* sp. disminuyó significativamente en las lombrices tratadas con los agroquímicos, tales resultados ponen en evidencia la acción perjudicial de los agroquímicos, tanto a nivel

de receptores de superficie de los celomocitos como a nivel de la producción de factores opsonizantes que median la agregación e internalización del antígeno (Homa *et al.* 2013). Una combinación en la reducción de la producción de aglutininas (opsoninas) y receptores de antígenos en celomocitos podría suprimir la actividad fagocítica en lombrices, tal como se ha observado en leucocitos de mamíferos (Goven *et al.* 1994).

Similar a los resultados de este estudio, Bunn *et al.* (1996) evidenciaron descenso en la actividad inmune total de *E. veneta* inducida por POF y carbamatos. Disminución en la actividad fagocítica de los celomocitos de *E. foetida* y *E. andrei* durante la exposición a carbamilsulfato y al ácido 2,4-diclorofenoxiacético fue observada por Ville *et al.* (1997) y Cooper y Roch (2003). En un ensayo *in vitro*, Fuller-Espie *et al.* (2011) demostraron un efecto inhibitorio del dimetil-benzoantraceno sobre la actividad fagocítica de celomocitos de *E. hortensis*, asociado con incremento en la producción de ERO en las células. En un estudio reciente, la exposición durante cinco semanas del gasterópodo *Lymnaea stagnalis* a malatión produjo un descenso en el número de hemocitos que afectó la inmunocompetencia y reproducción del organismo (Lantaville y Stone 2012).

Los celomocitos en lombrices de tierra, además de su rol fagocítico, sintetizan y secretan dentro del fluido celómico moléculas proteicas que participan en los procesos de aglutinación, opsonización y lisis de agentes extraños (Homa *et al.* 2015). La acción inmunotóxica del malatión y del clorpirifos sobre la población y función de los celomocitos posiblemente esté asociado con el perjuicio observado en este estudio sobre el componente humoral del sistema inmune de *Eisenia* sp. Es probable que la interferencia directa de metabolitos bioactivos (oxones) y/o radicales libres con los factores proteicos evaluados (lisozimas y hemolisinas), así como con la ruta de su biosíntesis podrían explicar el descenso observado en ambos parámetros. Algunos estudios han evidenciado que agentes tóxicos tales como aroclor y metales pesados pueden suprimir la inmunidad humoral en lombrices de tierra (Sauvé y Fournier 2005, Homa *et al.* 2015).

## CONCLUSIÓN

En este estudio se demostró la acción perjudicial de malatión y clorpirifos sobre los celomocitos de *Eisenia* sp. y moléculas inmunoprotectoras secretadas por estas células, siendo el efecto inmunotóxico crónico similar para ambos agroquímicos. La susceptibilidad del sistema

inmunológico de *Eisenia* sp. a estos compuestos puede incrementar la invasión de microorganismos patógenos que puede resultar en perjuicio de su condición fisiológica y supervivencia en su medio natural. Se concluye que las respuestas inmunes evaluadas en el fluido celómico de la lombriz de tierra *Eisenia* sp. fueron sensibles a las dosis subletales de los pesticidas probados, lo cual revela su utilidad como herramientas apropiadas en la evaluación temprana de riesgos ecológicos por agroquímicos en anélidos terrestres.

### AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente por el financiamiento de esta investigación a través del Proyecto CI.02-030100-1857-13

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI A, NAAZ I. 2013. Earthworm biomarkers: The new tools of environmental impact assessment. *Biosci. Biotech. Res. Comm.* 6(2):163-169.
- ARSLAN-AYDOĞDU E, ÇOTUK A. 2008. Antibacterial and hemolytic activity of the coelomic fluid of *Dendrobaena veneta* (Oligochaeta, Lumbricidae) living in different localities. *IUFS J. Biol.* 67(1):23-32.
- BANERJEE B, CHAKRABORTI A, SUKE S, AHMED R, TRIPATHI A. 2008. Xenobiotic- induced immune alterations: Implications in health and disease. *Indian J. Biochem. Biophys.* 45(1):7-15.
- BUNN K, THOMPSON M, TARRANT M. 1996. Effects of Agrochemicals on the immune systems of earthworms. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 57:632-639.
- CASABÉ N, PIOLA L, FUCHS J, ONETO M, PAMPARATO L, BASACK S, GIMÉNEZ R, MASSARO R, PAPA J, KESTEN E. 2007. Ecotoxicological assessment of the effects of glyphosate and chlorpyrifos in an Argentine soya field. *J. Soils. Sedim.* 7(1):232-239.
- COOPER E, ROCH P. 2003. Earthworm immunity: a model of immune competence. *Pedobiol.* 47(5-6):676-688.
- COOPER E, HIRABAYASHI K. 2013. Origen of innate immune responses: Revelation of food and medicinal applications. *J. Tradit. Complement. Med.* 3(4):204-212.
- DESCOTES J. 2000. Integrating immunotoxicity with effects on other biological systems in preclinical safety evaluation: A perspective. *Toxicology.* 142 (3): 157-160.
- DESCOTES J, VIAL T. 1994. Immunotoxic effects of xenobiotics in humans: A review of current evidence. *In Vitro.* 8(5):963-966.
- FALUGI C, ALUIGI M. 2012. Early appearance and posible function of non-neuromuscular cholinesterase activities. *Front. Mol. Neurosci.* 5(54):1-12.
- FULLER-ESPIE S, BEAROFF F, MINUTILLO M. 2011. Exposure of coelomocytes from the earthworm *Eisenia hortensis* to Cu, Cd and dimethylbenze[a]anthracene: An *in vitro* study examining reactive oxygen species production and immune responses inhibition. *Pedobiol.* 54S:S31-S36.
- GALLOWAY T, HANDY R. 2003. Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. *Ecotoxicol.* 12(1-4):345-363.
- GÓMEZ M, CÁCERES J. 2010. Toxicidad por insecticidas organofosforados en fumigadores de Campaña contra el Dengue, estado Aragua, Venezuela, año 2008. *Bol. Mal. Salud Amb.* 50(1):119-125.
- GOVEN A, FITZPATRICK L, VENABLES B. 1994. Chemical toxicity and host defense in earthworms. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 712(1):280-299.
- HOMA J, STÜRZENBAUM S, MORGAN A, PLYTYCZ B. 2007. Disrupted homeostasis in coelomocytes of *Eisenia fetida* and *Allolobophora chlorotica* exposed dermally to heavy metals. *Eur. J. Soil Biol.* 43(1):273-280.
- HOMA J, ZORSKA A, WESOŁOWSKI D, CHADZINSKA M. 2013. Dermal exposure to immunostimulants induces changes in activity and proliferation of coelomocytes of *Eisenia andrei*. *J. Comp. Physiol.* 183(3):313-322.
- HOMA J, RARAT A, KRUK J, COCQUERELLE C, PLYTYCZ B, VANDENBULCKE F. 2015. Dermal exposure of *Eisenia andrei* earthworms: Effects of heavy metals on metallothionein and phytochelatin

- synthase gene expressions in coelomocytes. *Environ. Toxicol. Chem.* 34(6):1397-1404.
- KAUSCHKE E, MOHRIG W, COOPER E. 2007. Coelomic fluid proteins as basic components of innate immunity in earthworms. *Eur. J. Soil Biol.* 43(1):1164-5563.
- KÖHLER H, TRIEBSKORN R. 2013. Wildlife ecotoxicology of pesticides: Can we track effects to the population levels and beyond? *Science.* 341(759):1-8.
- LANTAVILLE J, STONE J. 2013. Pesticide and predation exposure effects on pond snail immune system function and reproductive output. *J. Shell. Res.* 32(3):745-750.
- LIU W, ZHU L, WANG J, WANG J, XIE H, SONG Y. 2009. Assessment of the genotoxicity of endosulfan in earthworm and white clover plants using the comet assay. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 56(4):742-746.
- MARCANO E, MARCANO L, CORTESÍA A, NUSETTI S. 2013. Efectos citotóxicos de clorpirifos y malatión en la lombriz de tierra *Eisenia* sp. (Annelida:Oligochaeta). *Rev. Argent. Ecotoxicol. Contamina. Ambient.* 4(1):289-301.
- MARCANO L, NUSETTI O, RODRÍGUEZ-GRAU J, BRICEÑO J, VILAS J. 1997. Coelomic fluid lysozyme activity induction in the polychaete *Eurythoe complanata* as a biomarker of heavy metal toxicity. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 59(1):22-28.
- MOLINA-MORALES Y, FLORES M, Balsa A, BENÍTEZ P, MIRANDA L. 2012. Niveles de plaguicidas en aguas superficiales de una región agrícola del estado Mérida, Venezuela, entre 2008 y 2010. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 28(4):156-166.
- NUSETTI O, SALAZAR-LUGO R, RODRÍGUEZ-GRAU J, VILAS J. 1998. Immune and biochemical responses on the polychaete *Eurythoe complanata* exposed to sublethal concentration of copper. *Comp. Biochem. Physiol.* 119C:177-183.
- PIOLA L, FUCHS J, ONETO M, BASACK S, GIMÉNEZ R, MASSARO R, PAPA J, KESTEN E, CASABÉ N. 2009. Biomarkers for the assessment of chlorpyrifos effects on earthworms and on soil functional parameters. *Pesq. Agropec. Bras.* 44(8):17-27.
- POLO A, MARCANO L, MARTÍNEZ R. 2012. Evaluación de la calidad del humus producido por *Eisenia andrei* a partir de tres sustratos orgánicos. *Bol. Centro Invest. Biol.* 46(3):263-282.
- PRUETT S. 1992. Immunotoxicity of organophosphate compounds, in organophosphates: chemistry, fate and effects. CHAMBERS J, LEVI P. (Eds). Academic Press, New York, USA, pp. 367-385.
- RABIDEAU C. 2001. Pesticide mixtures induce immunotoxicity: Potentiation of apoptosis and oxidative stress. Virginia-Maryland: Virginia Polytechnic Institute and State University. [Dissertation for the Degree of Masters of Science in Veterinary Medical Sciences Environmental Toxicology], pp. 185
- RODRÍGUEZ-GRAU J, VENABLES B, FITZPATRICK L, GOVEN A, COOPER E. 1989. Suppression of secretory rosette formation by PCBs in *Lumbricus terrestris*: An earthworm assay for humoral immunotoxicity of xenobiotics. *Environ. Toxicol. Chem.* 8(12):1201-1207.
- SAUVÉ S, FOURNIER M. 2005. Age-specific immunocompetence of the earthworm *Eisenia andrei*: exposure to methylmercury chloride. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60(1):67-72.
- VILLE P, ROCH P, COOPER E, MASSON P, NARBONNE J. 1995. PCBs increase molecular-related activities (lysozyme, antibacterial, hemolysis, proteases) but inhibit macrophage-related functions (phagocytosis, wound healing) in earthworms. *J. Invert. Pathol.* 65(3):217-224.
- VILLE P, ROCH P, COOPER E, NARBONNE J. 1997. Immune-modulator effects of carbaryl and 2,4 D in the earthworm *Eisenia fetida andrei*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 32(2):291-297.