

Respuestas inmunológicas y cicatrización en el poliqueto *Eurythoe complanata*  
(Annelida: Amphinomidae) expuesto a cobre

Immunological responses and wound healing in the polychaete *Eurythoe complanata*  
(Annelida: Amphinomidae) exposed to copper

Edgar Zapata-Vívenes\*

Osmar A. Nusetti

Leida Marcano

María M. Esclapés

Luis Arredondo

Laboratorio de Bioquímica

Escuela de Ciencias

Universidad de Oriente

Cumaná-Edo. Sucre, Venezuela

\* E-mail: ezapata@sucre.udo.edu.ve

Recibido en marzo de 2004; aceptado en junio de 2004

## Resumen

Se dividieron grupos de poliquetos, controles y expuestos a  $0.4 \text{ mg Cu}^{+2} \text{ L}^{-1}$  ( $2.14 \text{ mg CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O L}^{-1}$ ; 30% 96 h-CL<sub>50</sub>) por siete días, en tres grupos: sensibilizados y no sensibilizados con *Micrococcus lysodeikticus* para evaluar la actividad de lisozima del fluido celómico, y otro sensibilizado con levaduras inactivadas por calor para evaluar la respuesta fagocítica de los celomocitos. La lisozima fue medida a 2 h y la fagocitosis a los 15 min después de la sensibilización inmunológica. Además, se evaluó el efecto de la exposición al cobre sobre la respuesta de cicatrización en los poliquetos. Para ello, los organismos expuestos al cobre y no expuestos fueron cortados en dos mitades y mantenidos en acuarios conteniendo agua de mar (sin cobre), determinándose el porcentaje de individuos cicatrizados diariamente. Las respuestas de fagocitosis y lisozima fueron inducidas por la sensibilización e inhibidas después de la exposición al metal. Por otra parte, 60–80% de los individuos controles cicatrizaron al cabo de cuatro días, mientras que los individuos tratados con cobre no evidenciaron cicatrización en el mismo periodo de tiempo. En conclusión, la inhibición de la inducción experimental de la lisozima y la fagocitosis, y de la cicatrización en el poliqueto *Eurythoe complanata* por la exposición aguda al cobre, sugiere el potencial de toxicidad del metal sobre los mecanismos fisiológicos que modulan la inmunidad innata y la reparación de heridas en anélidos, funciones biológicas comunes en animales cuya supresión puede resultar en una disminuida tolerancia a infecciones microbianas.

*Palabras clave:* cobre, cicatrización, fagocitosis, lisozima, *Eurythoe complanata*.

## Abstract

Polychaetes exposed to  $0.4 \text{ mg Cu}^{+2} \text{ L}^{-1}$  ( $2.14 \text{ mg CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O L}^{-1}$ ; 30% 96 h-LC<sub>50</sub>) for seven days and control individuals were divided into three groups: the first two were sensitized and non-sensitized with *Micrococcus lysodeikticus*, and the third was sensitized with heat-killed yeast. Lysozyme activity was tested in the first two groups and phagocytosis in the third one. Lysozyme was measured at 2 h and phagocytosis 15 min after immune sensitization. The effect of copper on wound healing was also examined in the polychaetes. For this, the polychaetes exposed and not exposed to copper were cut in two halves, and the body fragments were held in aquaria containing clean seawater, and the cicatrization was periodically observed. The lysozyme and phagocytosis responses were induced by the sensitization; however, these responses were inhibited after the metal exposure. On the other hand, 60–80% of the body fragments from the control group healed within four days, whereas the copper-treated individuals did not show cicatrization in the same period of time. In conclusion, the inhibition of the experimental activation of lysozyme and phagocytosis, and of wound healing in the polychaete *Eurythoe complanata* exposed to acute copper exposure, suggests the metal's potential toxicity on the physiological mechanisms that modulate the innate immunity in annelids, whose alteration could affect their tolerance to microbial infection.

*Key words:* copper, wound healing, phagocytosis, lysozyme, *Eurythoe complanata*.

## Introducción

En los últimos años ha surgido un creciente interés por el problema del deterioro de los sedimentos de las zonas costeras de las regiones tropicales, asociado a procesos de contaminación química. Se han dirigido numerosas investigaciones a la selección de organismos modelos y parámetros bioquímicos y fisiológicos apropiados para evaluar su condición biológica en áreas impactadas por contaminantes. En este sentido, los poliquetos (anélidos) han sido reconocidos como organismos sensores útiles para estudiar los distintos grados de contaminación del bentos (Reish, 1980, 1986, 1998; Méndez y Páez-Osuna, 1998).

El sistema inmunológico de los anélidos ofrece aspectos de interés para su aplicación en estudios de toxicología ambiental. Su capacidad inmunológica reside en el fluido celómico, y está conformada por un conjunto de elementos funcionales no específicos, humorales y mediados por las células, que presentan cierta analogía u homología con mecanismos de inmunidad de otros organismos (acuáticos y terrestres) de diferentes grupos taxonómicos (Cooper, 1976; Goven *et al.*, 1994; Millar y Ratcliffe, 1994; Dhainaut y Scaps, 2001). Otro aspecto de interés en los anélidos es el potencial de cicatrizar tejidos heridos y a su vez reponer partes completas del cuerpo que han sido eliminadas. Este fenómeno está relacionado con respuestas inmunes mediadas por las células, que a su vez son funciones relacionadas con la actividad macrofágica (Ville *et al.*, 1995; Cikutovic *et al.*, 1999).

El poliqueto *Eurythoe complanata* (gusano de fuego), debido a su abundancia en las zonas costeras de Venezuela y su amplia distribución geográfica (Liñero, 1978), ha sido seleccionado como organismo modelo en bioensayos de análisis de inmunotoxicidad, midiendo la actividad de la lisozima y fagocítica de los celomocitos *in vitro* como biomarcadores de las respuestas de defensa innata, a fin de diagnosticar riesgos de inmunodeficiencia en organismos del bentos ante una situación eventual de contaminación (Marcano *et al.*, 1996, 1997; Nusetti *et al.*, 1998, 1999). En estas pruebas se ha utilizado como contaminante de referencia al cobre, debido a su persistencia (al igual que la de otros metales pesados) en ambientes estuarinos y costeros y su gran tendencia a bioacumularse en la biota con importantes implicaciones inmunotoxicológicas.

La susceptibilidad de las defensas inmunológicas al cobre en *E. complanata* y otras especies de invertebrados marinos ha sido demostrada después de fases de contaminación agudas y crónicas, basado fundamentalmente en mediciones de las respuestas inmunológicas *in vitro* (Chen *et al.*, 1984; Anderson *et al.*, 1994; Marcano *et al.*, 1997; Nusetti *et al.*, 1998; Nicholson, 2003). Los resultados sugieren efectos inmunosupresores en el organismo, pero no revelan una relación directa con la capacidad del organismo de responder adaptativamente a un material no propio. En general, investigaciones en este aspecto toxicológico son limitadas en invertebrados marinos.

Este estudio examinó la inmunocompetencia del poliqueto *E. complanata* después de un tratamiento de contaminación

## Introduction

In recent years, there has been increased interest in the problem of deterioration of the silts from coastal areas of tropical regions, associated with processes of chemical contamination. Numerous investigations have dealt with the selection of model organisms and appropriate biochemical and physiological parameters to evaluate the biological condition in areas impacted by pollutants, and polychaetes (annelids) have been recognized as useful sensor organisms to study the different degrees of contamination of the benthos (Reish, 1980, 1986, 1998; Méndez and Páez-Osuna, 1998).

The immune system of the annelids offers features of interest for its application in studies of environmental toxicology. Their immunological capacity resides in the coelomic fluid, formed by a group of functional elements, non-specific innate humoral and cellular immune systems, that present certain analogy or homology with some immunity mechanisms of other organisms (aquatic and terrestrial) of different taxonomic groups (Cooper, 1976; Goven *et al.*, 1994; Millar and Ratcliffe, 1994; Dhainaut and Scaps, 2001). Another interesting features of the annelids is the potential of healing wounds and completely restoring parts of the body that have been eliminated. These phenomena are associated with non-specific innate immune defenses which, in turn are related with macrophagia activity (Ville *et al.*, 1995; Cikutovic *et al.*, 1999).

The polychaete *Eurythoe complanata* (fire worm), because of its abundance in the coastal areas of Venezuela and wide geographical distribution (Liñero, 1978), was selected as model organism in bioassays of immunotoxicity tests, measuring the activity of the lysozyme and phagocytosis of the coelomocytes *in vitro* as biomarkers of innate defense response, to assess risks to benthic organisms from an eventual situation of local contamination (Marcano *et al.*, 1996, 1997; Nusetti *et al.*, 1998, 1999). Copper was used as reference pollutant in these tests due to its persistence (like that of other heavy metals) in the marine environment and tendency to bioaccumulate in the biota with important immunotoxic implications.

The susceptibility of the immune defenses to copper in *E. complanata* and other species of marine invertebrates has been demonstrated after acute and chronic exposure contamination, based mainly on *in vitro* measures of immune responses (Chen *et al.*, 1984; Anderson *et al.*, 1994; Marcano *et al.*, 1997; Nusetti *et al.*, 1998; Nicholson, 2003). The results suggest immunomodulatory effects of the metal, but they do not reveal a direct relationship between these effects and the organism's ability to adaptatively respond to an exogenous material. In general, investigations on this toxicological aspect are limited in marine invertebrates.

This study aims to examine the immunocompetency of the polychaete *E. complanata* after an acute exposure to copper sulfate by measuring the activity of the lysozyme and phagocytosis in the coelomic fluid after a process of microbial

aguda con sulfato de cobre. Se midieron las funciones inmunológicas innatas en base a las actividades de la lisozima y fagocitosis en el fluido celómico, tras un proceso de inmunosensibilización microbiana. También, se evaluó el efecto del cobre sobre la capacidad de cicatrización del organismo a fin de establecer la relación entre las respuestas inmunológicas y los procesos de reparación de tejidos.

## Materiales y métodos

### Organismos

Los ejemplares de *E. complanata* fueron recolectados en la línea costera sur del Golfo de Cariaco, 20 km al este de Cumaná, Venezuela. Los poliquetos fueron mantenidos durante dos semanas en condiciones de laboratorio, en acuarios de 5 L de capacidad, conteniendo agua de mar filtrada (36‰, pH 7.8,  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ), aireación constante y sustrato arenoso proveniente del sitio de captura, el cual le sirvió de refugio y alimento.

### Bioensayos de toxicidad

Se escogieron poliquetos con pesos comprendidos entre 1.2 y 1.4 g para realizar los bioensayos. Los organismos fueron expuestos a una concentración nominal de  $0.4 \text{ mg Cu}^{+2} \text{ L}^{-1}$  de cobre ( $2.14 \text{ mg CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O L}^{-1}$ ) por un periodo de siete días, con sus respectivos controles. Esta concentración representa el 30% de la concentración letal media a 96 h,  $\text{LC}_{50}$ :  $1.30 \text{ mg L}^{-1} \text{ CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , límite de confianza de 0.4 a  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$ , estimada por Marcano *et al.* (1996). Se realizaron recambios de agua, sedimentos y contaminantes cada tres días para eliminar productos de desecho. El pH del agua de mar se mantuvo entre 7.6 y 7.8.

La concentración de  $\text{Cu}^{+2}$  usada en los bioensayos de toxicidad es equivalente a  $0.39 \mu\text{g g}^{-1}$  de agua de mar, la cual es inferior a la cantidad señalada ( $10 \mu\text{g g}^{-1}$ ) para sedimentos superficiales no contaminados de las regiones costeras del Golfo de Cariaco (Martínez, 2002).

### Bioacumulación de cobre

Después del periodo de exposición se determinó el contenido de cobre en la masa corporal libre de vísceras de *E. complanata* mediante espectrometría de llama, usando un espectrómetro Varian AA-20, con límite mínimo de detección de  $0.03 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Marcano *et al.*, 1996).

### Recolección del fluido celómico

Los poliquetos controles y expuestos a cobre, inoculados con 25 mL de una solución de *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma Chemical Co., San Luis, Miss., EUA;  $8 \text{ mg mL}^{-1}$ ) y no inoculados fueron utilizados para recolectar fluido celómico. A las 2 h después de la inyección bacteriana, el fluido celómico fue recolectado usando el método descrito previamente por

inmuno-sensibilización. Also, the effect of copper on wound healing response was recorded in order to establish a possible relationship between the immunological responses and the processes of cicatrization.

## Materials and methods

### Organisms

Specimens of *E. complanata* were collected from a southern shore of the Gulf of Cariaco, 20 km east of Cumaná, Venezuela. The worms were maintained indoors for two weeks before the experimental treatments in 5-L aerated aquaria at  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , containing filtered seawater (36‰, pH 7.8,  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ), sand and gravel from the collection site to provide food and refuge.

### Toxicity bioassays

Polychaetes weighing between 1.2 and 1.4 g were selected to perform the bioassays. The organisms were exposed to a nominal concentration of  $0.4 \text{ mg Cu}^{+2} \text{ L}^{-1}$  ( $2.14 \text{ mg CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O L}^{-1}$ ) during a seven-day period. A group of seaworms not exposed to copper was used as control. This copper concentration represents 30% of the calculated 96-h median lethal concentration ( $\text{LC}_{50}$ :  $1.30 \text{ mg Cu}^{+2} \text{ L}^{-1}$ ; 95% confidence limits:  $0.4\text{--}2.0 \text{ mg L}^{-1}$ ) for this species, as estimated by Marcano *et al.* (1996). Every three days, water and sediment were changed to replenish the metal and to avoid the accumulation of excretory products. The pH of the seawater was maintained in the range of 7.6 to 7.8.

The  $\text{Cu}^{+2}$  concentration used in the toxicity bioassay is equivalent to  $0.39 \mu\text{g g}^{-1}$  seawater mass, which is lower than that reported for unpolluted superficial sediments ( $10 \mu\text{g g}^{-1}$ ) from southern and northern coastal regions of the Gulf of Cariaco (Martínez, 2002).

### Copper bioaccumulation

After the exposure period, copper content in the worm carcasses was determined by flame atomic absorption spectrometry (FAAS), using a Varian AA-20 Plus spectrophotometer with a detection limit of  $0.03 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Marcano *et al.*, 1996).

### Coelomic fluid collection

The control and copper-exposed polychaetes, not inoculated and inoculated with 25 mL of a bacterial solution of *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA;  $8 \text{ mg mL}^{-1}$ ) were used for the collection of the coelomic fluid. At 2 h after bacterial injection, the coelomic fluid was collected as described by Arredondo (1993). The worms were bathed during 5 min in a 10-cm diameter Petri dish with 40 mL of a solution consisting of  $2.5 \text{ mg mL}^{-1}$  chloral hydrate (Merck) and  $1.0 \text{ mg mL}^{-1}$  guaiacol glyceryl ether

Arredondo (1993). Los gusanos fueron colocados durante 5 min en una cápsula de Petri de 10 cm de diámetro conteniendo 40 mL de una solución constituida por 2.5 mg mL<sup>-1</sup> de hidrato de cloral (Merck) y 0.1 mg mL<sup>-1</sup> de éter glicerol guaiacolato (Sigma Chemical Co.) en agua de mar filtrada (Millipore: 0.45 µm, salinidad 36‰, pH 7.5–7.8), para estimular la expulsión del fluido celómico, el cual fue recolectado directamente del poro del pigidio con la ayuda de una pipeta Pasteur. Luego, el fluido fue transferido a un tubo de centrifugación de polietileno de 5 mL, seguida por centrifugación a 200 g y 4°C por 10 min. El sobrenadante fue usado como fuente de lisozima.

#### Actividad de lisozima

La actividad de la lisozima fue determinada por el método de McHenery *et al.* (1979). Se colocaron alícuotas de 40 µL de fluido celómico en pozos de 5 mm de diámetro en lisoplasca de agarosa 1.0% en buffer fosfato (pH 6.2), conteniendo *M. lysodeikticus* (0.6 mg cel secadas con frío mL<sup>-1</sup>) como sustrato en placas de Petri. Las placas fueron incubadas a 24°C por 48 h, periodo en el cual se hicieron claramente visibles los halos correspondientes a la lisis bacterial. La actividad de la lisozima fue determinada mediante una curva de calibración preparada con lisozima estándar de clara de huevo de gallina (5 mg mL<sup>-1</sup> en buffer fosfato 100 mM, pH 6.2; HEL, Sigma Chemical Co.). Los resultados se expresaron como HEL-equivalentes (µg mL<sup>-1</sup>), calculados por el siguiente modelo de regresión:

$$\text{HEL-equivalente } (\mu\text{g mL}^{-1}) = \text{antilog}_{10} \{a + b (\text{diámetro, mm})\}$$

#### Fagocitosis

Los poliquetos controles y los expuestos al metal fueron inoculados con 25 µL de una suspensión de levaduras inactivadas por calentamiento (1 mg mL<sup>-1</sup> agua de mar filtrada). Transcurridos 15 min de la sensibilización, el fluido celómico fue recolectado y centrifugado a baja velocidad, y el precipitado celular fue resuspendido en 400 µL de agua de mar EDTA, pH 7.8 a 4°C. Para cuantificar la actividad fagocítica se mezclaron 100 µL de la suspensión celular con 100 µL de una solución de cristal violeta y se contaron 100 células en el hemocitómetro a una magnificación 400× en un microscopio Nikon. Las células que mostraron por lo menos una inclusión citoplásmica de levadura claramente visible al microscopio fueron contadas como fagocíticas. El conteo total y la viabilidad celular de los celomocitos fueron determinados como se indica en Nusetti *et al.* (1998), antes de la prueba de fagocitosis.

#### Cicatrización

Se escindieron transversalmente en dos mitades diez poliquetos controles y diez poliquetos expuestos al cobre. Los

(Sigma Chemical Co.) in filtered seawater (Millipore: 0.45 µm, salinity 36‰, pH 7.5–7.8), to stimulate the expulsion of the coelomic fluid, which was collected directly from the pigidial pore with a Pasteur pipette and transferred to a 5-mL polyethylene test tube, followed by centrifugation at 200 g and 4°C for 10 min. The supernatant was used as lysozyme source.

#### Lysozyme activity

The lysozyme activity was determined by the method of McHenery *et al.* (1979). Aliquots of 40 µL of the coelomic fluid were dispensed into 5-mm diameter wells in 1.0% agarose in 5-cm diameter Petri dishes, containing 100 mM phosphate buffer (pH 6.2) and *M. lysodeikticus* (0.6 mg freeze-dried cell mL<sup>-1</sup>) as substrate. After incubation for 48 h at 24°C, the diameter of zones of bacterial lysis was measured and the lysozyme concentration was determined referred to a calibration curve off hen egg-white lysozyme (5 mg mL<sup>-1</sup> in 100 mM phosphate buffer pH 6.2; HEL, Sigma Chemical Co.). The results are presented as HEL-equivalent (µg mL<sup>-1</sup>) activity, calculated by the following regression model:

$$\text{HEL-equivalent } (\mu\text{g mL}^{-1}) = \text{antilog}_{10} \{a + b (\text{diameter, mm})\}$$

#### Phagocytosis

Control and metal-exposed worms were inoculated with 25 µL of a heat-killed yeast cell solution (1.0 mg mL<sup>-1</sup> Millipore-filtered seawater). At 15 min after inoculation, the coelomic fluid was collected, centrifuged at low speed, and the cell pellet was resuspended in 400 µL seawater, pH 7.8 at 4°C, containing 0.01 mM EDTA. To quantify the phagocytic activity, an aliquot of 100 µL of the cell suspension was mixed with 100 µL of 0.4% crystal violet solution, and 100 cells were counted in a hemocytometer chamber at a magnification of 400× in a Nikon microscope. Cells showing at least one yeast cell clearly visible in the cytoplasm were recorded as phagocytic. Total counts and cell viability of coelomocytes were determined, prior to the phagocytosis test, as indicated by Nusetti *et al.* (1998).

#### Wound healing

Groups of 10 control and copper-exposed worms were cut transversely in two halves. Both the anterior and posterior body fragments were placed in aerated aquaria that only contained seawater and sediment. Observations were made daily to determine the wound-healing time and the percentage of healed individuals. Those organisms that were able to remove the clot without showing any apparent tissue lesion were recorded as completely sealed.

#### Statistics

The differences in lysozyme activities between the experimental and control groups were analyzed by one-way ANOVA.

fragmentos escindidos (anterior y posterior) fueron colocados en acuarios que contenían sólo agua de mar, sedimento y aireación. Se realizaron observaciones diarias para determinar el porcentaje de individuos cicatrizados y el tiempo de cicatrización total de la herida. Se consideraron totalmente sellados aquellos organismos que lograron desprender los restos de tejidos muertos y el coágulo.

### Análisis estadísticos

Las diferencias de las actividades de la lisozima entre los controles y los grupos experimentales fueron evaluadas por el análisis de varianza sencillo. Se usó la prueba de diferencias significativas mínimas (LSD) para establecer diferencias significativas entre pares de grupos (Snedecor y Cochran, 1971). Se utilizó el análisis *t* de Student para determinar los efectos de la exposición al cobre sobre la actividad fagocítica en el fluido celómico, y una prueba de Kruskal-Wallis para determinar las diferencias entre los efectos de los tratamientos estudiados sobre el proceso de sellado total de las heridas.

### Resultados

Los niveles de cobre acumulados durante el periodo de ensayo en tejido corporal de *E. complanata* fueron de 5.60 y 42.0  $\mu\text{g g}^{-1}$  de tejido seco en poliquetos controles y expuestos al cobre, respectivamente. La bioconcentración del metal en los organismos experimentales indica su biodisponibilidad en el curso del bioensayo de toxicidad. Los niveles de cobre en los poliquetos se encuentran en el rango de las concentraciones de cobre (0.63–67.01  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) reportado por Martínez (2002) para la capa superficial de los sedimentos en la región costera sur del Golfo de Cariaco.

Los gusanos no sensibilizados con *M. lysodeikticus*, contaminados con el cobre, no mostraron cambios significativos en la actividad de la lisozima en comparación con el grupo control no sensibilizado (tabla 1). La lisozima fue estimulada por la sensibilización microbiana; sin embargo, esta respuesta fue inhibida significativamente por la exposición al cobre ( $F_s = 20.68$ ,  $P < 0.001$ , prueba LDS) (tabla 1).

La viabilidad celular (90–95%) y el número total de celomocitos ( $7-9 \times 10^5$  cél  $\text{mL}^{-1}$ ) no fueron afectados por el tratamiento experimental con cobre. La fagocitosis fue estimulada por la inyección de levaduras en los organismos no expuestos, siendo esta respuesta inhibida significativamente por la exposición al cobre ( $11.0 \pm 0.6$  vs.  $4.8 \pm 0.6$ ;  $F_s = 24.70$ ,  $P < 0.001$ ). El número de fagocitos en el fluido celómico de los poliquetos en presencia y ausencia de cobre alcanzó su máximo valor a los 15 min después de la inoculación con levadura.

El proceso de cicatrización fue afectado por el tratamiento con cobre (fig. 1); la capacidad de sellar completamente las heridas disminuyó significativamente en los organismos expuestos con respecto a los organismos controles (Kruskal-Wallis,  $P < 0.003$ ). Entre 60% y 80% de los individuos

Significant differences between pairs of groups were assessed by the least significant differences (LSD) test (Snedecor and Cochran, 1971). The effect of copper exposure on the phagocytosis among the different groups was determined by Student's *t*-test. Differences in the wound-healing among the treatments were statistically evaluated by a Kruskal-Wallis test.

### Results

The non-exposed and copper-exposed polychaetes accumulated 5.6 and 42.0  $\mu\text{g Cu g}^{-1}$  carcass dry mass, respectively. This indicates metal bioavailability during the toxicity bioassay. The copper levels in tissue are in the range of concentrations (0.63–67  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) reported by Martínez (2002) for superficial sediments of the southern coastal region of the Gulf of Cariaco.

In the absence of bacterial treatment, the lysozyme activity showed no significant differences between the non-exposed and copper-exposed groups (table 1). Lysozyme was stimulated by the microbial inoculation in the former group, a bacteriolytic response that was not observed in the latter ( $F_s = 20.68$ ,  $P < 0.001$ , LDS test) (table 1).

The cell viability (90–95%) and total number of coelomocytes ( $7-9 \times 10^5$  cells  $\text{mL}^{-1}$ ) were not affected by the experimental copper treatment. The phagocytic activity of coelomocytes following the yeast injection was significantly higher in the non-exposed polychaetes than in the copper-exposed specimens ( $11.0 \pm 0.6$  vs.  $4.8 \pm 0.6$ ;  $F_s = 24.70$ ,  $P < 0.001$ ). These mean values represent the maximal numbers of phagocytes, which was recorded 15 min after the yeast inoculation.

The cicatrization process appeared to be affected in the copper-exposed polychaetes (fig. 1); their capacity to heal wounds was lower in comparison with the chemically non-contaminated controls (Kruskal-Wallis,  $P < 0.003$ ). Accordingly, 60–80% of the control specimens healed in a period of four days, while the copper-contaminated ones did not repair the damaged tissue within this same period of time. Moreover, following the copper exposure, cicatrization of the posterior body fragments was delayed as compared with the anterior body halves.

### Discussion

The constitutive levels of lysozyme in the polychaete *E. complanata* probably reflect the existence of a humoral defense mechanism that protects the organism from bacteria living in its environment and controls its natural symbiotic flora. The induction of lysozyme activity after inoculation with *M. lysodeikticus* may be related to the activation of a first-line immune surveillance over bacterial challenge. Basal concentrations and induction of this enzyme have been observed in the hemolymph and coelomic fluid of other invertebrates (Perin

controles cicatrizaron sus heridas al cabo de cuatro días, mientras que los individuos tratados con cobre no evidenciaron reparación del tejido en este mismo periodo de tiempo. Por otra parte, los fragmentos de la región posterior de los organismos expuestos al cobre presentaron un mayor retardo en la habilidad de recuperarse en comparación con los de la región anterior.

### Discusión

Los niveles basales de la lisozima en *E. complanata* probablemente reflejan la existencia natural de un mecanismo de defensa humoral que protege al organismo de bacterias que viven en su ambiente, y controla también su flora simbiótica normal. La inducción de la actividad de la lisozima por la inoculación con *M. lysodeiکتicus* posiblemente está asociada con la activación de un mecanismo de vigilancia de primera línea en los procesos de reconocimiento de la carga infecciosa bacteriana y la potenciación de la capacidad bacteriolítica del fluido celómico. Se han observado concentraciones basales e inducción de esta enzima en la hemolinfa y fluido celómico de otros invertebrados (Perin y Jolles, 1972; McHenery *et al.*, 1979; Hirigoyemberry *et al.*, 1990; Hawking *et al.*, 1993). El mecanismo de inducción de la lisozima en *E. complanata* inmunológicamente sensibilizado, podría estar vinculado con un aumento de la liberación de la proteína hacia el fluido celómico, lo que conlleva a un aumento de la inmunocompetencia innata de los individuos infectados. Posiblemente, esta respuesta funcional tiene relación, al menos parcialmente, con ajustes bioquímicos sobre la tasa de recambio de las proteínas (síntesis vs. degradación). En concordancia con esta posibilidad, Hirigoyemberry *et al.* (1990) observaron que los inhibidores de la síntesis de proteínas, actinomicina D y cicloheximida, afectaron la inducción de proteínas bacteriolíticas, incluyendo lisozima, en la lombriz de tierra *Eisenia foetida* inyectada con *Aeromonas hydrophila*. Aparentemente, la modulación de los mecanismos de biosíntesis de proteínas a nivel transcripcional desempeña una función clave en el control de la actividad bacteriolítica humoral en anélidos (Dhainaut y Scaps, 2001).

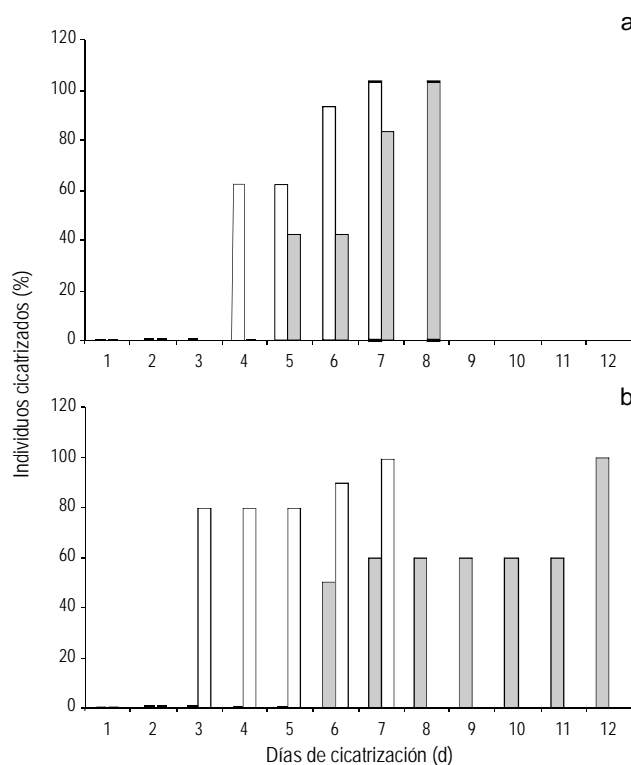
La contaminación con el cobre produjo un efecto inhibitorio sobre la actividad de la lisozima en los organismos inoculados con *M. lysodeiکتicus*; presumiblemente, el nivel de bioacumulación ( $42 \mu\text{g gps}^{-1}$ ) modificó los procesos de inducción de la enzima, limitando la capacidad de respuesta de defensa interna contra el agente bacterial invasor. Alternativamente, la bioacumulación de cobre en *E. complanata* pudo propiciar cambios moleculares y celulares (por ejemplo, estrés oxidativo; Nusetti *et al.*, 2001) que podrían exacerbarse durante la fase de infección con consecuencias perjudiciales sobre la función de la lisozima. Tales alteraciones biológicas son factibles en organismos en el medio ambiente natural, en condiciones de infección microbiana y elevadas concentraciones de cobre en su hábitat, según reportó Martínez (2002) para el Golfo de Cariaco.

**Tabla 1.** Actividad de la lisozima celómica ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) en poliquetos expuestos a cobre, sensibilizados y no sensibilizados con inóculo bacterial (los datos muestran  $X \pm \text{SD}$ ; NS  $P > 0.05$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ , N = 6). Comparaciones estadísticas entre expuestos y no expuestos al cobre.

**Table 1.** Coelomic lysozyme activity ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) in copper-exposed and control polychaetes inoculated and non-inoculated with bacterial inoculum (mean value and standard deviation; NS  $P > 0.05$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ , N = 6). Statistical comparison between copper-exposed and non-exposed polychaetes.

Organismos	No sensibilizados	Sensibilizados
Controles	$0.49 \pm 0.2$	$2.60 \pm 0.3$
Expuestos al cobre	$0.58 \pm 0.28^{\text{NS}}$	$0.43 \pm 0.3^{***}$

and Jolles, 1972; McHenery *et al.*, 1979; Hirigoyemberry *et al.*, 1990; Hawking *et al.*, 1993). The induced activity of lysozyme could be the result of an increased release of protein into the coelomic fluid, enhancing the innate immune competence of the infected organisms. This functional adjustment may possibly involve, at least partially, biochemical changes in the host protein-turnover (synthesis vs degradation). In agreement with this assertion, Hirigoyemberry *et al.* (1990)



**Figura 1.** Porcentaje de fragmentos cicatrizados de las regiones anterior (a) y posterior (b) de los poliquetos expuestos (barras vacías) y no expuestos a cobre (barras rellenas) en relación con el tiempo para la recuperación total.

**Figure 1.** Percentage of cicatrized anterior (a) and posterior (b) body fragments from non-exposed (empty bars) and copper-exposed (filled bars) polychaetes through the time for total recuperation.

La exposición al cobre en poliquetos no sensibilizados no afectó la actividad de la lisozima; un hallazgo similar fue reportado por Marcano *et al.* (1997) en *E. complanata*. En contraste, Goven *et al.* (1994) describieron efectos inhibitorios sobre la lisozima en la lombriz de tierra *Lumbricus terrestris* asociados con un incremento de bioacumulación del cobre en condiciones experimentales agudas (cinco días a sulfato de cobre), mostrando una relación dosis-respuesta, y sugirieron que la toxicidad del metal estuvo probablemente relacionada con alteraciones en la estructura funcional de la proteína. Esta suposición concuerda con la inhibición, *in vitro*, de la lisozima de aves por cobre (Feeney *et al.*, 1956). Es interesante destacar que en otras investigaciones realizadas en anélidos se han observado diferentes respuestas de la lisozima a la contaminación aguda con cobre, por ejemplo, activación en *Amyntas hawayanus* (Nusetti *et al.*, 1999) e inhibición en *Eisenia foetida* (Nusetti *et al.*, 1996).

Altos conteos y viabilidad de celomocitos indicaron que estas células fueron suficientes para probar su capacidad fagocítica en todos los organismos experimentales. La exposición aguda al cobre inhibió la respuesta fagocítica en los poliquetos. Este efecto inmunomodulatorio podría estar asociado con cambios en la composición relativa de los fagocitos, o estar relacionado con modificaciones bioquímicas sobre la capacidad de eliminar materiales extraños a través de mecanismos inmunes mediados por células. La fagocitosis es activada normalmente por estímulos antigénicos tales como microbios y otros agentes opsonizados, y esta respuesta es sensible a la exposición de metales pesados en anélidos (Chen *et al.*, 1991; Fugeré *et al.*, 1996; Nusetti *et al.*, 1999; Sauvé *et al.*, 2002). Nusetti *et al.* (1998) demostraron que la exposición aguda y crónica de *E. complanata* al cobre altera la capacidad de los celomocitos de formar rosetas secretorias y eritrocíticas contra eritrocitos de ratón, indicando deficiencias en los mecanismos de reconocimiento antigénico y en la producción de factores aglutinantes (lectinas y aglutininas), lo que resulta en una disminución de la inmunocompetencia humoral y celular. Se han realizado observaciones similares en la lombriz de tierra *L. terrestris* contaminada con bifenilos policlorados, o Aroclors (Rodríguez-Grau *et al.*, 1989; Goven *et al.*, 1994).

La concentración nominal de cobre utilizada produjo efectos inhibitorios sobre el proceso normal de cicatrización de los fragmentos de *E. complanata*. Probablemente, la disminuida capacidad de los poliquetos de sellar completamente las heridas resultó de una acción tóxica del cobre bioacumulado sobre los mecanismos fisiológicos que determinan la capacidad de cicatrización, en especial sobre los mecanismos de inmunidad innata. El proceso de cicatrización en anélidos involucra eventos consecutivos tales como: la formación de un coágulo que evita la pérdida de líquido celómico, la inflamación de la región dañada y, a su vez, la activación del sistema inmunocelular y humoral. La inhibición de la actividad de la lisozima y de los fagocitos en el fluido celómico puede afectar la inmunocompetencia del organismo, y por consiguiente, su capacidad de cicatrización. En anélidos, específicamente

showed that inhibitors of protein synthesis, actinomycine D and cycloheximide, affected the induction of bacteriolytic proteins, including lysozyme, in the earthworm *Eisenia foetida* injected with *Aeromonas hydrophila*. Apparently, the modulation of protein biosynthesis at transcriptional levels plays a key function in the control of the humoral bacteriolytic activity in annelids (Dhainaut and Scaps, 2001).

The acute copper exposure promoted the inhibition of lysozyme activity in *M. lysodeiکتicus*-treated polychaetes; presumably, the metal bioaccumulation ( $42 \mu\text{g g}^{-1}$  dry mass) altered the induction process of the enzyme limiting the animal's struggle capacity against the bacterial infection. Alternatively, the excessive body copper-load could propitiate exacerbated molecular and/or cellular changes (i.e., oxidative damage, Nusetti *et al.*, 2001) during the infective phase, leading to negative effects on the lysozyme function. Such biological alterations are feasible in bacterial-stressed polychaetes inhabiting copper-contaminated environments, as was previously indicated by Martínez (2002) for polluted areas of the Gulf of Cariaco.

The exposure to copper did not affect lysozyme activity in the non-sensitized polychaetes; a similar finding was previously reported by Marcano *et al.* (1997). Conversely, Goven *et al.* (1994) described inhibition of lysozyme in the earthworm *Lumbricus terrestris*, associated with increasing bioaccumulation of copper sulphate after short-term (five days) exposures to  $\text{CuSO}_4$ , suggesting that the metal affected the structural function of the protein. This proposal agrees with the *in vitro* inhibition of avian lysozyme by copper (Feeney *et al.*, 1956). Interestingly, other studies on annelids have observed different responses of lysozyme activity to acute copper contamination; for example, activation in *Amyntas hawayanus* (Nusetti *et al.*, 1999) and inhibition in *E. foetida* (Nusetti *et al.*, 1996).

The high total counts and bioviability of coelomocytes indicated that these cells were fairly suitable for testing their phagocytic capacity in all experimental organisms. The phagocytic response of the coelomocytes to the inoculation of heat-killed yeast was suppressed in the copper-exposed polychaetes. This immunomodulatory effect could be associated with either the changes in the relative composition of the coelomic phagocytic cell population or the biochemical alterations that impaired the cell capacity to utilize foreign material through cell-mediated immune mechanisms. Phagocytosis is normally activated by antigenic factors such as microbial invasions and other opsonized agents, and this response is sensitive to heavy metal exposure in annelids (Chen *et al.*, 1991; Fugeré *et al.*, 1996; Nusetti *et al.*, 1999; Sauvé *et al.*, 2002). Nusetti *et al.* (1998) demonstrated that acute and chronic exposure of *E. complanata* to copper altered the ability of coelomocytes to form secretory and erythrocyte rosettes against white mouse red cell, implying failure in the cell-surface antigenic recognition and in the production of humoral agglutinant factors (lectines and agglutinins), resulting in a decreased humoral and

oligoquetos, se ha encontrado que diversos xenobióticos, en especial los metales pesados, actúan como factores que alteran el proceso de cicatrización, afectando directamente parte del sistema inmunológico (Cooper y Roch, 1992; Ville *et al.*, 1995; Cikutovic *et al.*, 1999). Por otra parte, es factible que la exposición al cobre haya generado una condición de estrés oxidativo (Nusetti *et al.*, 2001; Geracitano *et al.*, 2002), causando cambios bioquímicos y celulares que podrían alterar la capacidad de cicatrización del poliqueto. El procesamiento metabólico del cobre, al igual que el de otros metales pesados y xenobióticos orgánicos, puede causar un incremento de las especies reactivas de oxígeno y otras moléculas reactivas, que al exceder las defensas antioxidantes resultan en una posible disfunción inmunológica promoviendo alteraciones en los mecanismos de reparación de tejidos lesionados.

El retardado proceso de cicatrización observado en los fragmentos posteriores de los poliquetos contaminados con cobre, posiblemente es resultado de la distinta acción tóxica del metal sobre las diferentes regiones anatómicas del organismo. Es conocido que ciertos anélidos poseen la capacidad de bioacumular altas concentraciones de metales pesados (cobre, plomo) mayormente en la región posterior-caudal (Lucan-Bouche *et al.*, 1999), haciendo esta región más vulnerable que la región anterior a la acción tóxica del metal sobre el proceso de sanado de las heridas. Este aspecto de toxicidad de metales pesados sobre los mecanismos biológicos de cicatrización en anélidos no ha sido aclarado.

En conclusión, la inducción de la actividad de la lisozima y la fagocitosis por la inoculación microbiana en *E. complanata*, posiblemente está asociada con la activación de un mecanismo de protección de primera línea entre los procesos de inmunidad innata (humoral y celular). Los efectos tóxicos del cobre sobre la lisozima y fagocitosis presumiblemente afectaron la capacidad de los poliquetos para reparar heridas, alteraciones biológicas que pudieron estar relacionados con el desarrollo de un estrés oxidativo inducido por el metal. La supresión de estas respuestas funcionales pueden causar manifestaciones patológicas en organismos silvestres. Por lo tanto, la estimulación microbiana de las defensas inmunológicas y la capacidad de sellar heridas en *E. complanata* pueden ser adecuadas para su uso en monitoreos de bentos contaminados por químicos.

## Agradecimientos

Se agradece al Consejo de Investigación del Núcleo de Sucre, de la Universidad de Oriente, el apoyo institucional y económico a este estudio, y al Instituto Oceanográfico de Venezuela-Universidad de Oriente la infraestructura facilitada para la realización de este estudio.

## Referencias

Anderson, R., Mora, L. and Thomson, S. (1994) Modulation of oyster (*Crassostrea virginica*) hemocyte functions by copper, as

cellular immunocompetence. Similar observations have been described for in earthworms *L. terrestris* contaminated with polychloride biphenyls, or Arochlors (Rodríguez-Grau *et al.*, 1989; Goven *et al.*, 1994).

Wound healing of the body fragments from the copper-exposed polychaetes was inhibited. The reduced capacity to completely repair wounds was probably related to a toxic effect of copper on the physiological processes that modulate cicatrization, especially the innate immunity mechanisms. The cicatrization involved consecutive events, including clot formation to avoid the loss of body fluid, inflammation at the wounded site, and the concomitant activation of cellular and humoral immune responses. Thus, the inhibition of the lysozyme and phagocytic activity in the coelomic fluid may affect the immune competence of the organisms, and hence their ability to heal injured tissue. In annelids, mainly oligochaetes, it has been shown that diverse xenobiotics, especially heavy metals, act as immunological stressors affecting the cicatrization process (Cooper and Roch, 1992; Ville *et al.*, 1995; Cikutovic *et al.*, 1999). On the other hand, acute copper-exposure could induce an oxidative stress in polychaetes *E. complanata*, causing molecular or cellular damage (Nusetti *et al.*, 2001; Geracitano *et al.*, 2002) that may interfere with the normal cicatrization response. The metabolic processing of copper, like those of other heavy metals and organic xenobiotics, may lead to an increased production of oxygen-free radicals or other reactive molecules, which upon overwhelming the antioxidant defense may result in immune dysfunction promoting impaired ability to heal tissue lesions.

A different cicatrization pattern was observed between the anterior and posterior body fragments of the copper-exposed polychaetes, possibly as a result of distinct toxic action of the metal on the anatomical regions. Certain annelids are able to bioconcentrate high levels of heavy metals mainly in the posterior caudal regions (Lucan-Bouche *et al.* 1999), and thus these regions may be more vulnerable to chemical stressors than the anterior cephalic regions. This biological feature may account, at least partly, for the delayed cicatrization displayed by the posterior body fragments, in comparison with the anterior counterparts of the copper-exposed seaworms. The toxicity of heavy metals on the biological mechanisms of tissue cicatrization is still not clear.

In conclusion, the stimulation of the coelomic activity of the lysozyme and phagocytosis in the microbial-inoculated polychaetes may be related to changes in the primary surveillance processes of the host's innate non-specific immunity. The toxic effects of copper on lysozyme and phagocytosis presumably affected the capacity of the polychaetes to heal wounds, biological alterations that could be related to a metal-induced oxidative stress. Suppression of these functional responses portends pathological manifestation in the wildlife; thus, the microbial stimulation of the innate-immune defenses and the wound-healing ability of the polychaete *E. complanata* appear



- measured by luminol-enhanced chemiluminescence. *Comp. Biochem. Physiol.*, 108C: 215–220.
- Arredondo, L. (1993). Desarrollo de un método para colección de celomocitos en el poliqueto *Eurythoe complanata* (Annelida: Amphinomidae). Trabajo de Grado, Maestría en Biología Aplicada: Contaminación Ambiental, Universidad de Oriente, Venezuela.
- Chen, T.C. and Sullivan, J.P. (1984). Effects of heavy metals on phagocytosis by molluscan hemocytes. *Mar. Environ. Res.*, 14: 305–315.
- Chen, S.C., Fitzpatrick, L.C., Goven, A., Venables, B. and Cooper E. (1991). Nitroblue tetrazolium dye reduction by earthworm (*Lumbricus terrestris*) coelomocytes: An enzyme assay for nonspecific immunotoxicity of xenobiotics. *Environ. Toxicol. Chem.*, 10: 1037–1043.
- Cikutovic, M.A., Fitzpatrick, L.C., Goven, A.J., Venables, B.J., Gigglesman, M.A. and Cooper E.L. (1999). Wound healing in earthworms *Lumbricus terrestris*: A cellular-based biomarker for assessing sublethal chemical toxicity. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 62: 508–514.
- Cooper, E.L. (1976) Phagocytosis. In: E.L. Cooper (ed.), *Comparative Immunology*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, pp.40–60.
- Cooper, E.L. and Roch, P. (1992). The capacities of earthworm to heal wound and to destroy allografts are modified by polychlorinated biphenyls (PCB). *J. Invert. Pathol.*, 232: 67–72.
- Dhainaut, A. and Scaps, P. (2001). Immune defense and biological responses induced by toxics in Annelida. *Can. J. Zool.*, 79: 233–253.
- Feeney, R.E., Macdonnell, L.R. and Ducay, D. (1956). Irreversible inactivation of lysozyme by copper. *Arch. Biochem. Biophys.*, 61: 72–83.
- Fugère, N., Brousseau, P., Krzystyniak, K., Coderre, D. and Fournier, M. (1996). Heavy metal-specific inhibition of phagocytosis and different *in vitro* sensitivity of heterogeneous coelomocytes from *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta). *Toxicology*, 109: 157–166.
- Geracitano, L., Monserrat, J.M. and Bianchini, A. (2002). Physiological and antioxidant enzyme responses to acute and chronic exposure of *Laonereis acuta* (Polichaeta, Nereididae) to copper. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 277: 145–156.
- Goven, A.J., Fitzpatrick, L. and Venables, B. (1994). Chemical toxicity and host defense in earthworms. *Ann. NY Acad. Sci.*, 712: 280–299.
- Hawking, L.E., Brook, J. and Hutchison, S. (1993). The effects of tidal exposure an aspects of metabolic and immunological activity in the hard clam *Mercenaria mercenaria* (Linnaeus). *Comp. Biochem. Physiol.*, 104A: 225–228.
- Hirigoyemberry, F., Lasalle, F. and Lassagues, M. (1990). Antibacterial transcription and regulation of lysozyme and proteins evidenced after bacterial infestation. *Comp. Biochem. Physiol.*, 95B: 25–28.
- Líñero, I. (1978). Algunos aspectos biológicos y ecológicos de los poliquetos errantes. *Lagena*, 41–42: 45–53.
- Lucan-Bouche, M.L., Biagianti-Risbourg, S., Arsac, F. and Vernet, G. (1999). An original decontamination process developed by the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex* exposed to copper and lead. *Aquat. Toxicol.*, 45: 9–17.
- Marcano, L., Nusetti, O., Rodríguez-Grau, J. and Vilas, J. (1996). Uptake and depuration of copper and zinc in relation to metal-binding protein in the polychaete *Eurythoe complanata*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 114C: 179–184.
- Marcano, L., Nusetti, O., Rodríguez-Grau, J., Briceño, J. and 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: 22–28.
- to be suitable for use in assessing risks of exposure of marine benthos to chemical contamination.

## Acknowledgements

We thank the Sucre Research Council of Universidad de Oriente for institutional and financial support, and the Venezuelan Oceanographic Institute of Universidad de Oriente for the use of the facilities for this research.

English translation by the authors.

Martínez, G. (2002). Algunos metales pesados en sedimentos superficiales del Golfo de Cariaco, Edo. Sucre, Venezuela. *Bol. Inst. Oceanogr. Univ. Oriente.*, 41: 83–93.

McHenry, J.G., Birbeck, T.H. and Allen, L. (1979). The occurrence of lysozyme in marine bivalves. *Comp. Biochem. Physiol.*, 63B: 25–28.

Méndez, N. and Páez-Osuna, F. (1998). Trace metals in two populations of the fireworm *Eurythoe complanata* from Mazatlan bay: Effects of body size on concentrations. *Environ. Pollut.*, 102(2–3): 279–285.

Millar and Ratcliffe, N.A. (1994). *Immunology: A comparative approach*. John Wiley, New York, pp. 50–52.

Nicholson, S. (2003). Lysosomal membrane stability, phagocytosis and tolerancia to emersion in the *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae) following exposure to acute, sublethal copper. *Chemosphere*, 52(7): 1147–1151.

Nusetti, O., Marcano, L. y Cordova, L. (1996). Desarrollo de protocolos estandarizados de evaluación de toxicidad subletal a nivel inmunológico, empleando la lombriz de tierra *Eisenia foetida* (Annelida: Lumbricidal). Boletín Técnico de la Gerencia General de Investigaciones Ecológicas y Ambientales. INTEVEP, S.A.

Nusetti, O.A., Salazar-Lugo, R., Rodríguez-Grau, J. and Vilas, J. (1998). Immune and biochemical responses of the polychaete *Eurythoe complanata* exposed to sublethal concentration of copper. *Comp. Biochem. Physiol.*, 119C(2): 177–183.

Nusetti, O.A., Parejo, E., Esclapés, M.M., Rodríguez-Grau, J. and Marcano, L. (1999). Acute-sublethal copper effects on phagocytosis and lysozyme activity in the earthworm *Amyntas hawayanus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 63: 350–356.

Nusetti, O., Esclapés, M., Salazar, G., Nusetti, S. and Pulido, S. (2001). Biomarkers of oxidative stress in the polychaete *Eurythoe complanata* (Amphinomidae) under short term copper exposure. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 66: 576–581.

Perin, J. and Jolles, P. (1972). The lysozyme from *Nephtys hombergi* (Annelid). *Biochim. Biophys. Acta*, 263: 683–689.

Reish, D.J. (1980). Use of polychaetous annelids as test organisms for marine bioassays experiments. In: A.L. Buikema and J.C. Cairns (eds.), *Aquatic Invertebrate Bioassays*. ASTM 715, Philadelphia, pp. 140–145.

Reish, D.J. (1986). Benthic invertebrates as indicators of marine pollution: 35 years of study. *IEEE Oceans'86 Conference Proc.* Washington, DC, September 23–25, pp. 885–888.

Reish, D.J. (1998). The use of larvae and small species of polychaetes in marine toxicological testing. In: P. Well, K. Lee and C. Blaise (eds.), *Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques and Practice*. 1st ed. CRC Press, pp. 383–392.

Rodríguez-Grau, J., Venables, B., Fitzpatrick, L., Goven, A. and Cooper, E. (1989). Suppression of secretory rosette formation PCBs in

- Lumbricus terrestris*, and earthworm immune assays for humoral immunotoxicity of xenobiotics. *Environ. Toxicol. Chem.*, 8: 1201–1207.
- Sánchez-Alvardo, A. (2000). Regeneration in the metazoans: Why does it happen? *Bioassays*, 22: 578–590.
- Sauvé, S., Hendawi, M., Brousseau, P. and Fournier, M. (2002). Phagocytic response of terrestrial and aquatic invertebrates following *in vitro* exposure to trace elements. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 5(1): 21–29.
- Snedecor, W.G. and Cochran, E.G. (1971). *Statistical Methods*. Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa, pp. 258–298.
- Ville, P., Roch, P., Nasson, P. and Narbonne, J. (1995). PBCs increase molecular-related activities (lysozyme, antibacterial hemolysis, proteases) but inhibit macrophage-related function (phagocytosis, wound healing) in earthworm *J. Invert. Pathol.*, 65: 217–224.