



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
NÚCLEO DE SUCRE  
POSTGRADO EN BIOLOGÍA APLICADA  
MENCION ECOTOXICOLOGÍA

BIOMARCADORES MOLECULARES Y CELULARES EN LA LOMBRIZ DE  
TIERRA *Eisenia* spp. (Annelida: Oligochaeta) EXPUESTA A LOS PESTICIDAS  
ORGANOSFOSFORADOS CLORPIRIFOS Y MALATIÓN

(Modalidad: Investigación)

Lcda. Elena Cecilia Marcano Gómez

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OPTAR AL TÍTULO DE MAGISTER SCIENTIARUM EN BIOLOGÍA APLICADA,  
MENCION ECOTOXICOLOGÍA

Cumaná, Marzo de 2012



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
NÚCLEO DE SUCRE  
POSTGRADO EN BIOLOGÍA APLICADA  
MENCION ECOTOXICOLOGÍA

BIOMARCADORES MOLECULARES Y CELULARES EN LA LOMBRIZ DE  
TIERRA *Eisenia* spp. (Annelida: Oligochaeta) EXPUESTA A LOS PESTICIDAS  
ORGANOSFOSFORADOS CLORPIRIFOS Y MALATIÓN

(Modalidad: Investigación)

Lcda. Elena Cecilia Marcano Gómez

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OPTAR AL TÍTULO DE MAGISTER SCIENTIARUM EN BIOLOGÍA APLICADA,  
MENCION ECOTOXICOLOGÍA

Cumaná, Marzo de 2012

BIOMARCADORES MOLECULARES Y CELULARES EN LA LOMBRIZ DE  
TIERRA *Eisenia* spp. (Annelida: Oligochaeta) EXPUESTA A LOS PESTICIDAS  
ORGANOSFOSFORADOS CLORPIRIFOS Y MALATIÓN

APROBADO POR

---

Prof. Leida Marcano  
Tutora

---

Jurado

---

Jurado

## DEDICATORIA

- A Toñita, mi madre, porque la continuidad de mi formación como profesional en gran medida la debo a su estímulo y apoyo siempre.
- A Amanda Sofia, mi hija, por ser el regalo más grande que Dios ha dado a mi vida.
- A Ángel Salvador, Antonella Cecilia y Jhonny Alejandro, mis sobrinos, a quienes les quiero dejar como enseñanza que el esfuerzo, la dedicación y la perseverancia siempre nos llevan a alcanzar las metas trazadas.

## AGRADECIMIENTOS

- A Dios Todopoderoso, por darme siempre con su fe la fuerza que me impulsa a transitar los caminos intrincados y pedregosos que en la vida me ha tocado caminar.
- A mi asesora, la profesora Leida Marcano, por permitirme en esta etapa de mi formación estar a su lado nuevamente, brindándome conocimientos sin reservas. Mucho de lo poco que hoy se, se lo debo a usted.
- A mi compañero de laboratorio y del postgrado MSc. Aldo Polo, por el cultivo de las lombrices que se usaron durante los bioensayos de toxicidad y por estar siempre dispuesto a prestar su ayuda de forma desinteresada.
- A la profesora Sonia Nussetti por el apoyo técnico y las recomendaciones dadas durante la realización de los ensayos de genotoxicidad.
- A las profesoras Evelin Flores y Mariolga Berritzbeitia por permitirme el uso de los microscopios de fluorescencia de los laboratorios que coordinan y pertenecientes al Departamento de Bioanálisis y al Postgrado de Biología Aplicada, respectivamente.
- A mis compañeros de clases Juanny, Carol, Roseulis, Adriana, David, Neilis, Aldo, Mariana, Cecilia, María Ester, Jhanna y Carla, por hacer muchas veces con sus bromas antes y al final de las clases que la estadía en el postgrado fuese llevadera.
- A mis hermanas y compañeras Adriana y Carol, con sus palabras y apoyo incondicional me han hecho saber que en los buenos y los malos momentos puedo contar con ustedes.
- A todas a aquellas personas, familiares y amigos que de una u otra forma motivaron el inicio y la culminación de esta nueva etapa de mi formación académica.

*A todos ustedes mil gracias*

## ÍNDICE

|                       |     |
|-----------------------|-----|
| Lista de figuras..... | VI  |
| Resumen.....          | VII |
| Introducción.....     | 1   |
| Metodología.....      | 6   |
| Resultados.....       | 13  |
| Discusión.....        | 20  |
| Conclusiones.....     | 30  |
| Bibliografía.....     | 31  |
| Apéndices             |     |

## LISTA DE FIGURAS

|   |  | Pág. |
|---|--|------|
| 1 | Tiempo medio de retención de rojo neutro (TRRN <sub>50</sub> ) por lisosomas de celomocitos de <i>Eisenia</i> spp. controles y expuestas a 300 mg de clorpirifos/kg de sustrato y 400 mg de malation/kg de sustrato durante 7 y 21 días..... | 13   |
| 2 | Nº de cometas formados a partir de celomocitos de <i>Eisenia</i> spp. controles y expuestas a 300 mg de clorpirifos/kg de sustrato y 400 mg de malation/kg de sustrato durante 7 y 21 días .....   | 14   |
| 3 | Cometas tipo 0, 1 y 2 formados a partir de celomocitos de <i>Eisenia</i> spp. controles y expuestas a 300 mg de clorpirifos/kg de sustrato y 400 mg de malation/kg de sustrato durante 7 y 21 días .....                                     | 15   |
| 4 | Nº de cometas formados a partir de celomocitos de <i>Eisenia</i> spp. controles y expuestas a 300 mg de clorpirifos/kg de sustrato y 400 mg de malation/kg de sustrato durante 7 y 21 días.....  | 15   |
| 5 | Cometas tipo 3, 4 y 5 formados a partir de celomocitos de <i>Eisenia</i> spp. controles y expuestas a 300 mg de clorpirifos/kg de sustrato y 400 mg de malation/kg de sustrato durante 7 y 21 días.....                                      | 16   |
| 6 | Niveles de malondiandehido (MDA) en celomocitos de <i>Eisenia</i> spp. controles y expuestas a 300 mg de clorpirifos/kg de sustrato y 400 mg de malation/kg de sustrato durante 7 y 21 días.....   | 17   |
| 7 | Actividad específica de acetilcolinesterasa (AChE) en el tejido corporal de <i>Eisenia</i> spp. controles y expuestas a 300 mg de clorpirifos/kg de sustrato y 400 mg de malation/kg de sustrato durante 7 y 21 días.....                    | 18   |
| 8 | Niveles de glutatión reducido (GSH) en el tejido corporal de <i>Eisenia</i> spp. controles y expuestas a 300 mg de clorpirifos/kg de sustrato y 400 mg de malation/kg de sustrato durante 7 y 21 días.....                                   | 19   |

## RESUMEN

Con la finalidad de evaluar los efectos de concentraciones subletales de clorpirifos (300 mg/kg de sustrato) y malation (400 mg/kg de sustrato), se estimaron un grupo de biomarcadores en celomocitos y tejido corporal de *Eisenia* spp., utilizando un sistema de exposición en un sustrato orgánico mezclado con soluciones de los pesticidas por 7 y 21 días. En los celomocitos se cuantificaron el tiempo medio de retención del rojo neutro (TRRN<sub>50</sub>), fragmentación del ADN y concentraciones de malondialdehído (MDA), indicadores respectivos de desestabilización de membranas lisosomales, daño genotóxico y peroxidación de lípidos; mientras que, en tejido corporal se estimó la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) como biomarcador específico de exposición a los organofosforados y el contenido de glutatión reducido (GSH), indicativo del estado antioxidante celular. El tratamiento con ambos pesticidas a los 7 días causó efectos similares en los celomocitos de *Eisenia* spp.; un descenso aproximadamente del 11% en el TRRN<sub>50</sub> y aparición de cometas con predominio de los tipo 1 y 2, sugieren efectos perjudiciales a nivel de la estructura de las membranas lisosomales y en el ADN de estas células. Incrementos en las concentraciones de MDA, al menos en el grupo expuesto a clorpirifos, durante este período indican que la citotoxicidad posiblemente fue mediada por sobreproducción de agentes prooxidantes y estrés oxidativo. En contraste, en ese mismo período la actividad de AChE y niveles de GSH aumentaron en el tejido corporal de los grupos expuestos a ambos pesticidas, evidenciándose con este patrón de respuesta similar a la hormesis, que posiblemente a corto plazo el organismo puede hacer los ajustes bioquímicos necesarios para controlar la toxicidad en ese tejido. A los 21 días de exposición a ambos pesticidas, un mayor descenso en el TRRN<sub>50</sub> (50%), asociado con la formación en gran proporción de cometas tipo 2, 3 y 4 y aparición de cometas tipo 5, coincidente con concentraciones elevadas de MDA evidenciaron que el daño oxidativo fue mayor en esta fase y las lesiones a nivel de membranas y ADN fueron más severas. Consistente con la aseveración anterior, ambos pesticidas afectaron perjudicialmente también la enzima AChE en el tejido corporal del organismo, la cual exhibió un descenso aproximado al 50% en su actividad, indicando estos resultados la presencia de metabolitos bioactivos; producto de la biotransformación de los agroquímicos que interactuaron e interfirieron con la actividad de la enzima. Aún cuando GSH permaneció elevado en el grupo expuesto a clorpirifos por 21 días, al parecer el mecanismo de compensación bioquímico que controla la toxicidad a los 7 días de exposición deja de ser funcional a largo plazo. En general, los biomarcadores evaluados en celomocitos y tejido corporal de *Eisenia* spp. exhibieron cambios marcados en respuesta al tratamiento agudo y crónico con clorpirifos y malation, revelándose su alta sensibilidad en la detección de efectos perjudiciales a concentraciones subletales de ambos agroquímicos y su potencial para ser usados en los estudios de evaluación y detección temprana de riesgos de contaminación por pesticidas organofosforados en los ecosistemas terrestres..



## INTRODUCCIÓN

Los pesticidas desempeñan un papel crucial en la agroindustria, sin embargo, muchos de ellos no selectivos en su acción pueden constituir un riesgo para la salud de los ecosistemas, afectando organismos “no blancos” y beneficiosos para el suelo tales como las lombrices de tierra (Stojanović *et al.*, 2007). Éstas poseen características fisiológicas y ecológicas que los convierten en excelentes modelos para evaluar toxicidad de sustancias químicas en el medio terrestre (Booth y O’Halloran, 2001; Massicotte *et al.*, 2003; Olvera-Velona *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009). Principalmente, su hábito alimenticio y la presencia de un tegumento corporal altamente poroso y permeable, hace que las lombrices de tierra sean muy vulnerables a la acción perjudicial de la variedad de contaminantes químicos que continuamente son vertidos al suelo (Olchawa *et al.*, 2006).

Dentro de los pesticidas, el grupo de los organofosforados (OPs) es el más numeroso y versátil en uso en la época actual (Badii y Varela, 2008). Estos químicos son ésteres derivados del ácido fosfórico estructuralmente formados por un átomo de fósforo unido a cuatro de oxígeno (esterfosfatos) o en algunos casos, por tres de oxígeno y uno de azufre (tiofosfatos) (Olvera-Velona, 2011). Su introducción al mercado agrícola y pecuario surgió como una alternativa, una vez que se prohibió el empleo del DDT; un pesticida organoclorado, por su tendencia y la de sus metabolitos a bioacumularse en los ecosistemas y causar efectos perjudiciales en la biota (Galloway y Handy, 2003). El incremento en el uso de OPs inicialmente se consideró como de escasa amenaza para el ambiente dada su baja persistencia, no obstante, son diversas y variables las opiniones sobre el tema de la persistencia de estos químicos en el ambiente. En la actualidad se siguen utilizando mundialmente, a pesar de que se ha documentado sobre el amplio rango de problemas ecotoxicológicos generados por estos pesticidas, asociados con su alta toxicidad aguda y baja especificidad (Olvera-Velona *et al.*, 2008).

En los ecosistemas terrestres, la absorción y biotransformación de agroquímicos pueden inducir una variedad de respuestas en los organismos que, proporcionan una medida de la exposición, y algunas veces, también de su efecto tóxico. Tales respuestas

conocidas como biomarcadores medibles a distintos niveles de organización biológica, se utilizan frecuentemente en los estudios ecotoxicológicos ya que proveen información sobre el impacto de los químicos en la salud de los organismos y, tienen la ventaja de poner en evidencia síntomas tempranos de posibles alteraciones en la salud de los ecosistemas (Di Giulio *et al.*, 1995).

Aún cuando, el uso de biomarcadores en poblaciones y comunidades para determinar toxicidad de sustancias químicas tiene mayor relevancia desde el punto de vista ecológico, su sensibilidad, especificidad y precisión disminuye en comparación con marcadores que son evaluados en individuos a nivel molecular, celular y fisiológico. Es por ello que en la actualidad, estos últimos son los más ampliamente utilizados y, se han convertido en poderosas herramientas de uso predictivo que permiten el desarrollo de estrategias de protección y saneamiento antes de que el perjuicio, asociado a la contaminación química, se manifieste de manera irreversible en los ecosistema (Cajaraville *et al.*, 2000; De la Torre *et al.*, 2005).

En los estudios ecotoxicológicos se ha hecho frecuente el uso de una amplia gama de biomarcadores moleculares; entre ellos, el empleo de ciertos sistemas enzimáticos que proporcionan información específica sobre un químico en particular, tal es el caso de las enzimas ácido- $\delta$ -aminolevulínico deshidratasa que se utiliza para diagnosticar intoxicación por Pb y acetilcolinesterasa (AChE) para evaluar neurotoxicidad por pesticidas organofosforados y carbamatos (Schreck *et al.*, 2009). Otro grupo de enzimas de uso más general, incluye a las transaminasas como indicadores de estrés en fluidos y tejidos (Cajaraville *et al.*, 2000) y enzimas marcadoras que participan en las reacciones de la fase I y II del proceso de biotransformación intracelular de xenobióticos como lo son, citocromo P<sub>450</sub> reductasa y glutationa-S-transferasa respectivamente (Bucheli y Fent, 1995).

Sustentado en el hecho de que el potencial tóxico de muchos contaminantes se expresa durante su metabolismo al generar especies reactivas del oxígeno (EROs); las cuales son catalizadores de la mayoría de las reacciones que generan citotoxicidad (Ercal *et al.*, 2001), otros biomarcadores empleados para el diagnóstico del estado antioxidante celular y predisposición a patologías oxidativas incluyen, enzimas antioxidantes y otras

moléculas no enzimáticas que controlan las concentraciones intracelulares de estos agentes prooxidantes (Schreck *et al.*, 2008; Schreck *et al.*, 2009). Estimación del proceso de peroxidación de lípidos en membranas celulares así como, alteraciones en la morfología y número de los lisosomas se usan también como índices de estrés oxidativo (Saint-Denis *et al.*, 2001; Reinecke *et al.*, 2002). Por otro lado, daños genotóxicos y oxidación de proteínas inducidos por EROs pueden estimarse, utilizando el ensayo cometa (Singh *et al.* 1988) y la actividad de la enzima aconitasa (Gardner y Fridovich *et al.*, 1992), respectivamente.

Muchos son los investigadores que han empleado diferentes biomarcadores para evidenciar la acción perjudicial de pesticidas en lombrices de tierra. En este sentido, efectos de malation sobre parámetros del ciclo de vida en *Eisenia fetida* fueron evaluados por Bustos-Obregón e Iziga (2003), quienes observaron descensos en el crecimiento, alteración del tejido testicular, reducción de la viabilidad espermática y aumento en la producción de espermatozoides anormales. En la misma especie, el tratamiento con una mezcla de pesticidas provocó disminución en la biomasa y número de individuos (Stojanović *et al.*, 2007), y la acción de profenefos resultó en severas alteraciones histológicas y morfológicas que provocaron fragmentación del tegumento corporal (Chakra y Venkateswara, 2008).

Conociendo que el principal blanco molecular de acción de los pesticidas OPs es la enzima AChE, descensos en su actividad se utilizan como un biomarcador específico de toxicidad por estos químicos (Galloway y Handy, 2003). Al respecto, la exposición *in vivo* de *E. fetida* a diferentes concentraciones de carbarilfosfato produjo inhibición dosis-dependiente de AChE durante los primeros tres días de tratamiento (Gambi *et al.*, 2007). Neurotoxicidad evidenciada por inhibición de AChE se observó en *Aporrectodea caliginosa* expuesta a etil-paratión y a una mezcla de insecticidas (Olvera-Velona *et al.*, 2008; Schreck *et al.*, 2008) y en *Lumbricus terrestris* tratada con malation (Henson-Ramsey *et al.*, 2008). En contraste, Hackenberger *et al.* (2008) demostraron que el tratamiento de *E. fetida* con bajas concentraciones de temefos ( $0,12 \text{ ng/cm}^2$ ) produjo un incremento en la actividad de AChE, respuesta que fue revertida a concentraciones más elevadas ( $2,5 \text{ ng/cm}^2$ ).

Alternativamente, los OPs pueden interactuar irreversiblemente con otro grupo de esterasas; las carboxilesterasas (CEs) que catalizan la hidrólisis de sus grupos carboxilos y constituyen un mecanismo de resistencia a la toxicidad, tanto para el compuesto parental como para sus metabolitos activados (oxones), debido a que disminuyen la unión de éstos a la AChE (Henson-Ransey, 2007). Aunque escasamente investigadas en organismos “no blancos”, las CEs se usan también como biomarcadores de exposición a OPs y frecuentemente son más sensibles a la inhibición por estos agroquímicos que la AChE (Wheelock *et al.*, 2008). En *L. terrestris*, actividades de CEs han sido detectadas en tracto gastrointestinal, intestino anterior, buche, estómago, pared muscular y tejido reproductivo por Sanchez-Hernandez y Wheelock (2009) y González-Vejares *et al.* (2010). Tales autores, evidenciaron diferencias en las sensibilidades de CEs de diferentes tejidos a clorpirifos y clorpirifos-oxon, por lo que sugieren que para el uso de estas enzimas como biomarcadores de exposición a OPs, éstas se deben evaluar en tejidos específicos y acompañadas con análisis de AChE.

Literatura ha revelado el potencial tóxico de los pesticidas endosulfan y atrazina, los cuales a diferentes concentraciones provocaron daños en el ADN de los celomocitos de *E. fetida* y estrés oxidativo, este último evidenciado por descensos en las actividades de las enzimas superóxido dismutasa y guaiacol peroxidada (Liu *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2009). Similarmente, en la misma especie expuesta a suelos tratados con clorpirifos se observó un incremento significativo en el índice y porcentaje de daño en el ADN de celomocitos que evidenció el potencial genotóxico del agroquímico (Casabé *et al.*, 2007). Por otro lado, varios autores han demostrado que las membranas lisosomales de celomocitos de *A. caliginosa* y *E. fetida andrei* son blancos susceptibles a la acción del organofosforado clorpirifos, y han concluido que el ensayo del Tiempo de Retención de Rojo Neutro (TRRN) es un biomarcador sensible a este pesticida (Booth y O'Halloran., 2001; Reinecke y Reinecke, 2007; Casabé *et al.*, 2007).

A pesar de que el uso de biomarcadores aislados en distintas especies de lombrices han sido útiles para evaluar toxicidad por pesticidas, de mayor utilidad aún resulta el análisis integrado y simultáneo de diversos biomarcadores en una misma especie que permitan dilucidar con mayor precisión, los efectos globales de la

exposición a estos químicos (Schreck *et al.*, 2008). Por ello, se consideró de interés desarrollar la presente investigación, cuyo objetivo fue evaluar los efectos agudos y crónicos de clorpirifos y malation en *Eisenia* spp., utilizando los biomarcadores celulares: Tiempo medio de retención del rojo neutro (TRRN<sub>50</sub>), fragmentación del ADN y concentraciones de malondialdehído (MDA), indicadores respectivos de desestabilización de las membranas lisosomales, daño genotóxico y peroxidación de lípidos de membranas celulares y empleando adicionalmente en tejido corporal, la actividad de AChE; biomarcador específico de exposición a pesticidas organofosforados y contenido de glutatión reducido (GSH), índice del estado antioxidante del tejido.

## METODOLOGÍA

### **Obtención del material biológico**

Los ejemplares de *Eisenia* spp. se obtuvieron del lombricario del Instituto Nacional de Cooperación Estudiantil Socialista (INCES) con sede en Tunapui, estado Sucre y luego fueron trasladados al Bioterio del Departamento de Biología, donde permanecieron durante 2 semanas previas a los bioensayos de exposición a los pesticidas. Para esto último, se utilizaron recipientes plásticos provistos de un sustrato orgánico, preparado con estiércol de caballo y material vegetal mezclado en proporción 2:1 (m/m) y suplementado con cereal. La humedad del sustrato se mantuvo en 35%, el pH en  $7,2 \pm 0,5$  y la temperatura de la sala en  $25 \pm 2$  °C con un fotoperíodo de 12 h luz/12 h oscuridad. Se seleccionaron lombrices de peso promedio igual a  $0,5 \pm 0,2$  g con el clitelo bien desarrollado como señal de estar reproductivamente maduras para los bioensayos definitivos.

### **Bioensayos de toxicidad letal y subletal**

Se realizó un bioensayos de toxicidad agudo durante 7 días como primera fase de experimentación, a fin de determinar la concentración letal media ( $CL_{50}$ ) de los pesticidas organofosforados Lorsban 4E (clorpirifos) y Malation 57% (malation), que permitiera a su vez la selección de las dosis subletales de ambos agroquímicos que se emplearían en los bioensayos posteriores. Para ello, en recipientes plásticos de 340 cm<sup>3</sup> de capacidad se colocaron de 200 g del sustrato orgánico con las características anteriormente descritas, se añadieron 70 ml de las soluciones de los agroquímicos y se procedió a mezclar para facilitar su distribución homogénea. El rango de concentraciones de los pesticidas probadas en estos ensayos fueron 150; 1500; 3000; 5000 y 6000 mg de clorpirifos/kg de sustrato y 150; 300; 500; 3000 y 5000 mg de malation/kg de sustrato. Un total de 8 lombrices, divididas en dos réplicas de 4 organismos cada una fueron expuestas a cada una de las concentraciones de los pesticidas ensayados. Un grupo adicional de 8 lombrices colocadas en recipientes con

sustrato humedecido con agua sin los pesticidas sirvieron como grupo control. Durante los 7 días del bioensayo se realizaron registros diarios de la humedad y el pH del sustrato, la temperatura de la sala así como la sobrevivencia de los organismos controles y expuestos, considerándose como muertos aquellos que no presentaron ninguna respuesta sostenida a la estimulación mecánica. Los cálculos de las  $CL_{50}$  se realizaron mediante el empleo del programa computarizado desarrollado por Stephan (1977).

En una segunda fase, se realizaron bioensayos de exposición a concentraciones subletales de los pesticidas durante un periodo agudo (7 días) y uno crónico (21 días). Utilizando un sistema de exposición similar al descrito anteriormente, un total de 80 lombrices de tierra, divididas en 20 réplicas de 4 lombrices cada una, fueron expuestas a concentraciones de 300 mg de clorpirifos/kg de sustrato y 400 mg de malation/kg de sustrato, las cuales representan respectivamente el 9,20 y 7,30 %, de los valores de  $CL_{50}$ . (Clorpirifos:  $CL_{50}$ = 4347 mg/kg de sustrato; Malation:  $CL_{50}$ = 4106 mg/kg de sustrato). Un grupo de lombrices, cuyo sustrato fue humedecido con agua libre de pesticida sirvió como control. Durante esta fase de experimentación la humedad del sustrato se mantuvo en 35%, el pH en  $7,2 \pm 0,5$  y la temperatura de la sala en  $25 \pm 2$  °C con un fotoperíodo de 12 h luz/12 h oscuridad. Semanalmente, en cada tratamiento se hizo recambio del sustrato para mantener las concentraciones de los agroquímicos, la humedad y disponibilidad de nutrientes.

Transcurridos los 7 y 21 días de exposición, se tomaron 40 lombrices de cada tratamiento experimental (controles y expuestas a cada agroquímico). Estos anélidos fueron limpiados y cuidadosamente lavados, primero con agua destilada y luego con solución fisiológica, posteriormente se les extrajo a cada uno el fluido celómico contenido de celomocitos viables en donde se evaluaron los siguientes biomarcadores, indicadores efectos perjudiciales: Estabilidad lisosomal, daños al ADN y peroxidación de lípidos de membranas. Luego de la extracción del fluido celómico, a cada lombriz se le extrajo el tracto digestivo y en el tejido corporal se cuantificó la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) y el contenido de glutatión (GSH) como biomarcadores de exposición a pesticidas organofosforados y defensa antioxidante, respectivamente.

### **Obtención de los celomocitos**

Para la obtención de los celomocitos, se extrajo el fluido celómico de cada lombriz siguiendo un protocolo invasivo descrito por Eyambe *et al.*, 1991, realizando una punción directa con una jeringa hipodérmica en la región media ventral del organismo. Luego, el fluido colectado (~200  $\mu$ l) fue transferido a tubos eppendorf y diluido hasta 500  $\mu$ l con buffer fosfato de potasio frío 20 mM pH 7,4. Seguidamente se tomó una alícuota de 100  $\mu$ l y se mezcló con un volumen equivalente del colorante azul de tripano (0,2 %) para evaluar la viabilidad y el número total de celomocitos en una cámara de Neubauer por microscopía óptica. Para el análisis posterior de los biomarcadores celulares, indicadores efectos perjudiciales, la suspensión de celomocitos fue ajustada a una concentración final  $\geq$  a  $1 \times 10^6$  células/ml y la viabilidad celular osciló entre 95 y 87 % para lombrices controles y expuestas a pesticidas, respectivamente.

### **Estabilidad de membranas lisosomales**

La estabilidad o integridad de las membranas lisosomales es un biomarcador usado para evaluar citotoxicidad de contaminantes, frecuentemente a través del ensayo del Tiempo de Retención de Rojo Neutro (TRRN). Este método se fundamenta en el hecho de que los lisosomas de células provenientes de organismos saludables poseen valores elevados de TRRN<sub>50</sub> debido a que el colorante rojo neutro (3-amino-*m*-dimetilamina-2-metil-fenanzina hidrocloreuro) es retenido en su interior por largos períodos de tiempo, mientras que, las células de organismos sujetos a estrés químico tienen bajos valores de TRRN<sub>50</sub> porque el colorante difunde rápidamente desde el lisosoma al citoplasma (Weeks y Svendsen, 1996).

Para estimar el TRRN<sub>50</sub> en celomocitos de *Eisenia* spp. se siguió el protocolo descrito por Booth y O'Halloran (2001) para lombrices de tierra. Para ello, una suspensión de celomocitos ( $1 \times 10^6$  células/ml) viables fue mezclada en proporción 1:1 (v/v) con una solución del colorante rojo neutro (80  $\mu$ g/ml) en tubos eppendorf. Luego de un período de incubación en frío por 5 minutos, se colocaron 20  $\mu$ l de la mezcla en una cámara de Neubauer (profundidad 1/10mm, BOECO Alemania) para la observación



y cuantificación del número de células no teñidas y con su citoplasma teñido por el colorante, a una magnificación de 40X en un microscopio óptico (Motic Series B1), provisto de una cámara (Motic 1000 de 1.3 mega pixel). Se realizaron tantas observaciones y contajes de cada preparación celular hasta obtener un 50 % de células teñidas. Entre uno y otro período de observación la preparación se mantuvo en cámara húmeda por 5 minutos. Se observó un total de seis láminas por tratamiento cada una con su respectiva réplica. El tiempo transcurrido en minutos desde la incubación inicial de las células con el colorante hasta la obtención del 50% de células teñidas se consideró como el TRRN<sub>50</sub>, el mismo fue calculado con el programa computarizado desarrollado por Stephan (1977).

### **Daños en el ADN**

Los daños en el ADN de los celomocitos de *Eisenia* spp. se evaluaron por el ensayo cometa descrito por Singh *et al.* (1988) con ligeras modificaciones. Este ensayo permite detectar rupturas en sitios álcali lábiles del ADN nuclear, esto mediante la evaluación de la migración electroforética de los fragmentos de la molécula de ADN dañada hacia el campo anódico en geles de agarosa bajo condiciones alcalinas. Los fragmentos del ADN teñidos con sustancias fluorescentes dan una apariencia de cometa a la muestra celular sometida al campo electroforético (Cotelle y Ferar, 1999; Tice *et al.*, 2000).

Sobre un gel de agarosa al 0,5 % preparado sobre un portaobjeto se colocó una alícuota de 20 µl de la suspensión de celomocitos y se mezcló con 100 µl de una solución de agarosa 0,75 %, la mezcla se cubrió luego con un cubreobjeto y se dejó solidificar a 4 °C por 10 minutos. Seguidamente, para provocar la lisis celular, las láminas se sumergieron durante una hora en una solución contentiva de NaCl 2,5 M, EDTA-Na<sub>2</sub> 100 mM, triton X-100 al 1%, tris 10 mM pH 10,0 y dimetil sulfóxido al 10 %. A continuación las láminas fueron lavadas con agua bidestilada e incubadas por 20 minutos a 4 °C en una cámara de electroforesis contentiva de un buffer alcalino (NaOH 300 mM y EDTA-Na<sub>2</sub>, pH 12,6) para favorecer el desplegamiento del ADN. Se realizó posteriormente la corrida electroforética por 45 minutos en 25 V (300mA). Al término

de esta fase, las láminas se lavaron con una solución de tris 0,4 M pH 7,5 y finalmente, fueron teñidas con bromuro de etidio (20 µg/ml) y luego observadas en un microscopio de fluorescencia Zeiss West Axioskop Mc 100 equipado con filtro de excitación de 515 a 560 nm y un filtro de barrera de 590 nm. Controles positivos del ensayo se realizaron, utilizando celomocitos de lombrices no tratadas con pesticidas exponiéndolos durante 5 horas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,12 %) como agente inductor de daño al ADN.

El desplazamiento del ADN se determinó del polo negativo hacia el polo positivo y el parámetro que se utilizó para cuantificar la magnitud del daño en el ADN fue la longitud (µm) de la cola de los cometas medida en 20 células tomadas al azar por cada lámina. Se observó un total de seis láminas por tratamiento cada una con su respectiva réplica. Los cometas observados según la magnitud del daño se clasificaron en cinco clases: 0, 1, 2, 3, 4 y 5, donde 0 no representa ningún daño y 5, la máxima lesión al ADN.

### **Peroxidación de lípidos**

Se cuantificó la peroxidación de lípidos, estimando las concentraciones de malondialdehído (MDA); uno de los productos más comunes de la lipoperoxidación, haciendo uso del método LPO-586<sup>TM</sup> Bioxitech<sup>®</sup> de *Oxis Research*; un ensayo colorimétrico que se basa en la reacción a 45 °C del reactivo cromogénico, N-metil-2-fenilindol (R<sub>1</sub>) con MDA para formar un cromóforo estable que tiene una absorbancia máxima a 586 nm. Se procedió a preparar un lisado de celomocitos (~2x10<sup>6</sup> células/ml), para lo cual, inicialmente la preparación celular se centrifugó a 700xg por 10 minutos a 4 °C, el precipitado fue resuspendido en 250 µl de agua ultrapura y luego se sometió a un proceso de lisis por congelación y descongelación durante 12 horas en presencia del antioxidante butilato hidroxitolueno (BTH 0,5 M en acetonitrilo). Posterior a este período, el lisado celular se centrifugó a 3000xg por 10 minutos a 4 °C y en el sobrenadante se realizaron las determinaciones de MDA. La mezcla de reacción fue preparada con 200 µl de la muestra, 650 µl de R<sub>1</sub> diluido, luego de agitar fuertemente se adicionaron 150 µl de HCl al 37 %, se mezcló nuevamente y se incubó a 45 °C durante 60 minutos. Transcurrido este tiempo, la mezcla se centrifugó a 10000xg por 10

minutos a 4 °C y finalmente, en el sobrenadante se midió la absorbancia a 586 nm. Las determinaciones de las concentraciones de MDA se hicieron a partir de una curva de calibración con MDA estándar (1,1,3,3-tetrametoxipropano en Tris HCl). Los resultados son expresados en nmoles de MDA por ml de fluido celómico (nmol/ml de fluido).

### **Actividad de acetilcolinesterasa (AChE; EC. 3.1.1.7)**

La actividad de AChE se evaluó en el tejido corporal de *Eisenia* spp. empleando organismos con una masa de 0,5 g aproximadamente. Para la preparación del extracto enzimático el tejido corporal libre del tracto gastrointestinal de cada lombriz fue previamente lavado con solución fisiológica fría, homogeneizado al 10 % (m/v) en una solución tampón de fosfato de potasio 20 mM pH 7,5 a 4 °C y centrifugado posteriormente a 5000xg por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante fue utilizado para cuantificar la actividad de AChE. La actividad máxima de la enzima se estimó mediante la reacción de Ellman *et al.* (1961), en la cual el 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) reacciona con el producto de la actividad enzimática, formando un producto coloreado que absorbe luz a 412 nm. La mezcla de reacción (1 ml) consistió de: 860 µl de buffer fosfato de potasio 20 mM pH 7,5, 50 µl del extracto, 40 µl de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) 15 mM y 50 µl de yoduro de acetilcolina 15 mM como sustrato para iniciar la reacción. Luego de incubar la mezcla por 5 minutos en la oscuridad se midió la absorbancia a 412 nm. Las actividades se expresaron en unidades enzimáticas por gramo de tejido húmedo (U/g.t.h), siendo una Unidad (U) los µmoles de yoduro de acetilcolina hidrolizados por AChE en un minuto.

### **Niveles de glutatión reducido (GSH)**

Los niveles de GSH en el tejido corporal de *Eisenia* spp. se cuantificaron, utilizando el ensayo GSH-400 de Bioxytech® Test Kits (Oxis Research®), un método colorimétrico basado en una reacción química que tiene lugar en dos pasos. El primero conduce a la formación de productos de sustitución (tioéteres) entre un reactivo de marca patentada R<sub>1</sub> (4-cloro-1-metil-7-triflurometil-quinolinium metil sulfato) y todos

los mercaptanos (RSH) presentes en la muestra. El segundo paso, es una reacción de  $\beta$ -eliminación, mediada por R<sub>2</sub> (NaOH 30%), el cual específicamente transforma los productos de sustitución (tioéteres) obtenidos con GSH en una tiona cromófora que tiene su máxima absorción a una longitud de onda de 400 nm.

Se preparó un homogeneizado del tejido (1:9, m/v) en ácido tricloroacético (10 %), se centrifugó a 3000xg por 10 min a 4 °C y en el sobrenadante se cuantificó la concentración de GSH. El volumen final de la mezcla de reacción fue de 1 ml y consistió de 800  $\mu$ l de buffer S<sub>3</sub> (buffer fosfato de potasio contentivo de ácido de dietilenotriamina pentaacético), 50  $\mu$ l del reactivo R<sub>1</sub>, 50  $\mu$ l del R<sub>2</sub> y 100  $\mu$ l del extracto del tejido. Después de un período de incubación por 10 minutos en la oscuridad se leyó la absorbancia a 400 nm. Los cálculos de los niveles de GSH se realizaron empleando una curva patrón de concentraciones conocidas de GSH estándar (Sigma-Aldrich St Louis, Mo USA). Se expresaron los resultados como milimoles de GSH por gramo de tejido húmedo (mmoles de GSH/g.t.h).

### **Análisis estadísticos**

Diferencias en los siguientes biomarcadores: TRRN<sub>50</sub>, Concentración de MDA, actividad de AChE y contenido de GSH en lombrices controles y expuestas a los agroquímicos por 7 y 21 días se examinaron mediante el análisis de varianza (ANOVA). Las diferencias significativas encontradas en cada caso se midieron aplicando la “prueba a posteriori” de Duncan. Adicionalmente, mediante la prueba de Kruskal-Wallis se estimaron diferencias en los niveles de genotoxicidad (nº de cometas) en celomocitos de lombrices sujetas a los distintos tratamientos experimentales. Previo a la realización de los análisis estadísticos se comprobó para cada caso el cumplimiento de los supuestos del análisis de varianza (homogeneidad de varianzas y normalidad en la distribución de los datos). Los análisis estadísticos se realizaron mediante el empleo del paquete estadístico Statgraphic versión 5.1

## RESULTADOS

### Estabilidad de membranas lisosomales

La figura 1 muestra los resultados de TRRN<sub>50</sub> en celomocitos de lombrices tratadas con clorpirifos y malation por un período agudo y crónico. Ambos pesticidas produjeron un descenso significativo en este parámetro dependiente del tratamiento experimental (Anova<sub>Tratamiento</sub>, Fs=63,01; P<0,001) y del tiempo de exposición (Anova<sub>Tiempo</sub>, Fs=103,62; P<0,001), ejerciendo ambos factores un efecto conjunto significativo sobre la integridad de la estructura de las membranas de los lisosomas (Anova<sub>Interacción</sub>, Fs=27,19; p<0,001). Durante la fase aguda el valor del TRRN<sub>50</sub> disminuyó desde 77,88 ± 2,79 minutos en lisosomas de celomocitos controles hasta 74,32 ± 5,29 y 67,57 ± 5,55 minutos en los expuestos a clorpirifos y malation, respectivamente. El descenso en el TRRN<sub>50</sub> por el tratamiento con los agroquímicos fue más drástico en el período de exposición crónico, aproximadamente de un 50 % con respecto a su respectivo control (78,14 ± 5,99 min).

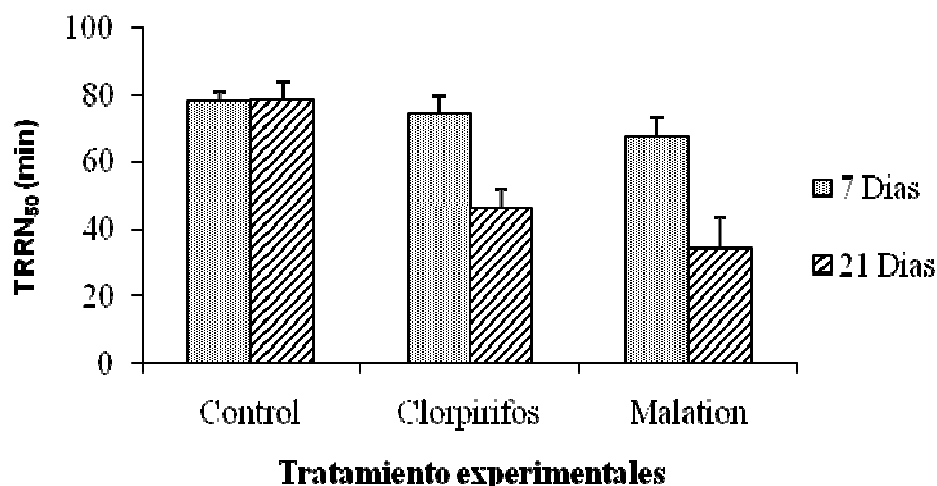


Figura. 1. Tiempo medio de retención de rojo neutro (TRRN<sub>50</sub>) por lisosomas de celomocitos de *Eisenia* spp. controles y expuestas a 300 mg de clorpirifos/kg de sustrato durante 7 y 21 días. Los valores se expresan en minutos. Las barras expresan las medias y la tendencia de la desviación estándar. N=6.

### Daños al ADN

El tratamiento experimental con ambos pesticidas tuvo un efecto significativo en el número de cometas (K-W: 19,22;  $P < 0,001$ ) estimados en celomocitos de *Eisenia* spp. No obstante, el tiempo de exposición no afectó esta variable (K-W: 0,54;  $P > 0,05$ ). Adicionalmente, se encontraron diferencias significativas en el número de cometas obtenido según diferentes tipos de cometas (K-W: 48,79;  $P < 0,001$ )

Los resultados del número de cometas en celomocitos de lombrices controles y sujetas al tratamiento agudo con malation y clorpirifos se muestran en la figura 2. En general, se observó un patrón similar en el número y tipo de cometas en los organismos tratados con ambos pesticidas, predominando los cometas tipo 1 ( $4,08 \pm 1,24$ ) y 2, ( $5,17 \pm 0,88$ ) seguido por los cometas tipo 3. En contraste, en el control se observaron mayoritariamente cometas tipo 0. Cometas tipo 2 y 3 con longitudes de colas de  $2,53 \pm 0,39$  y  $7,54 \pm 0,29$   $\mu\text{m}$ , respectivamente se muestran en la figura 3.

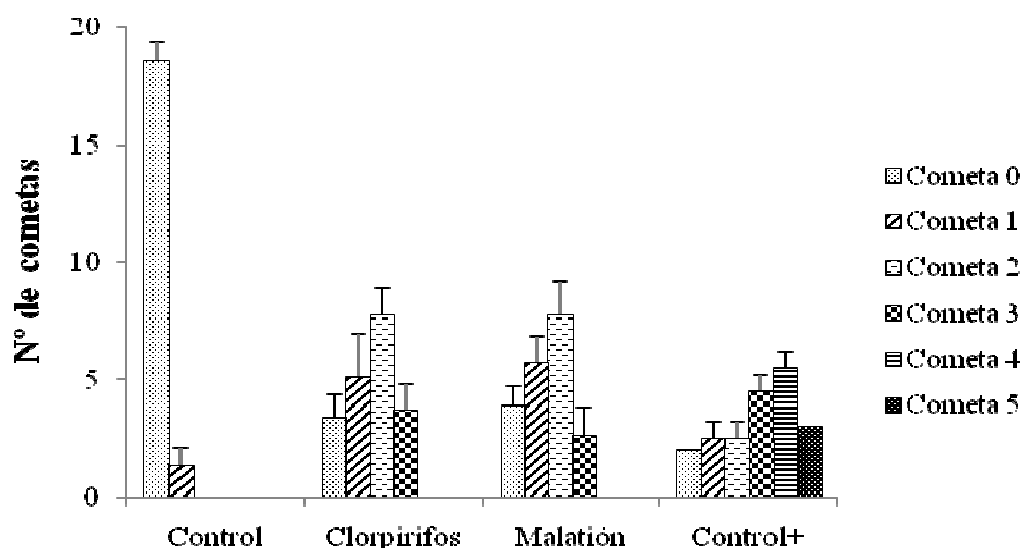


Figura 2. N° de cometas formados a partir de celomocitos del fluido celómico de *Eisenia* spp. controles y expuestas a 300 mg de clorpirifos/kg de sustrato y 400 mg de malation/kg de sustrato durante 7 días. Los valores se expresan en N° de cometas. Las barras expresan las medias y la tendencia de la desviación estándar. N=6.

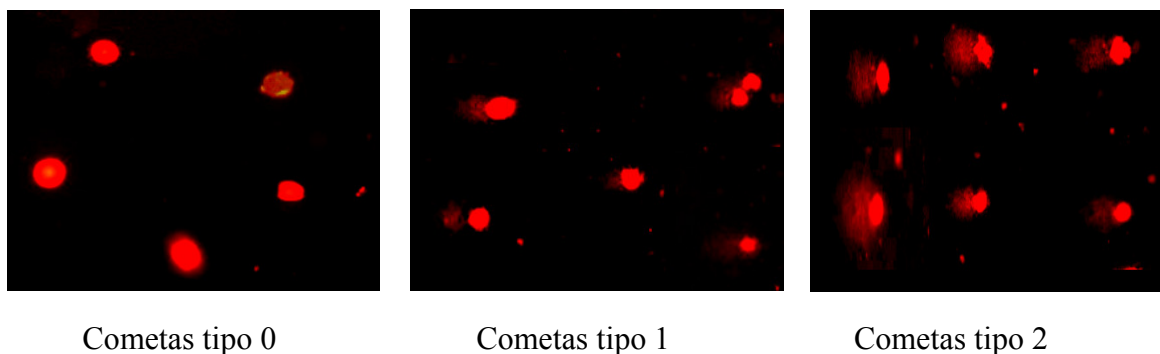


Figura 3. Cometas tipo 0, 1 y 2 formados a partir de celomocitos de *Eisenia* spp. controles y expuestas a 300 mg de clorpirifos/kg de sustrato y 400 mg de malation/kg de sustrato durante 7 días.

En la exposición crónica, se observaron adicionalmente cometas tipo 4 y 5 en los celomocitos de organismos tratados con ambos pesticidas, predominando específicamente los cometas tipo 3 ( $4,75 \pm 0,96$ ) y 4 ( $5,25 \pm 1,19$ ) debido a la exposición a clorpirifos, y en el grupo expuesto malation, los cometas tipo 2 ( $5,63 \pm 0,63$ ) y 3 ( $5 \pm 0,71$ ) (Figura 4). Los cometas tipo 4 y 5 con colas, cuyas longitudes promedios oscilaron respectivamente entre  $17,94 \pm 0,43$  y  $21,70 \pm 0,54$   $\mu\text{m}$  se muestran en la figura 5.

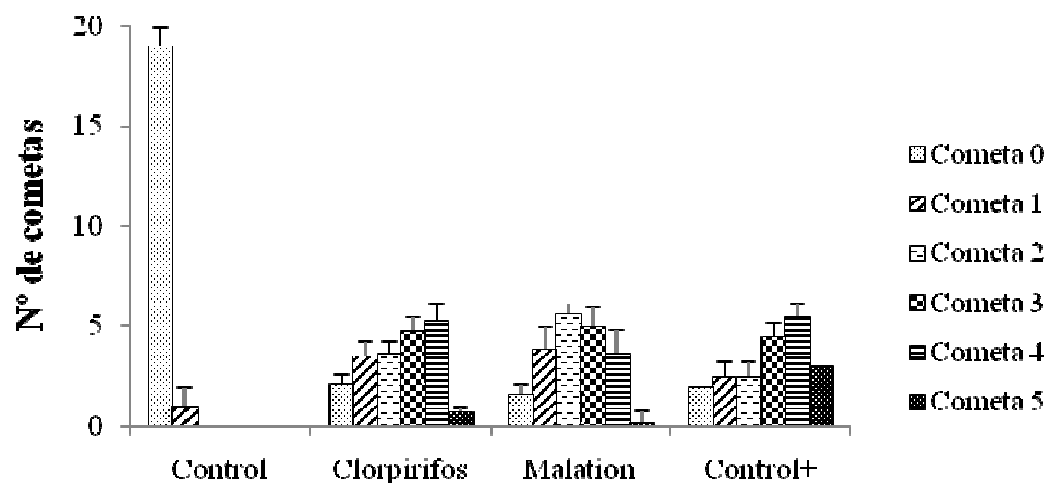
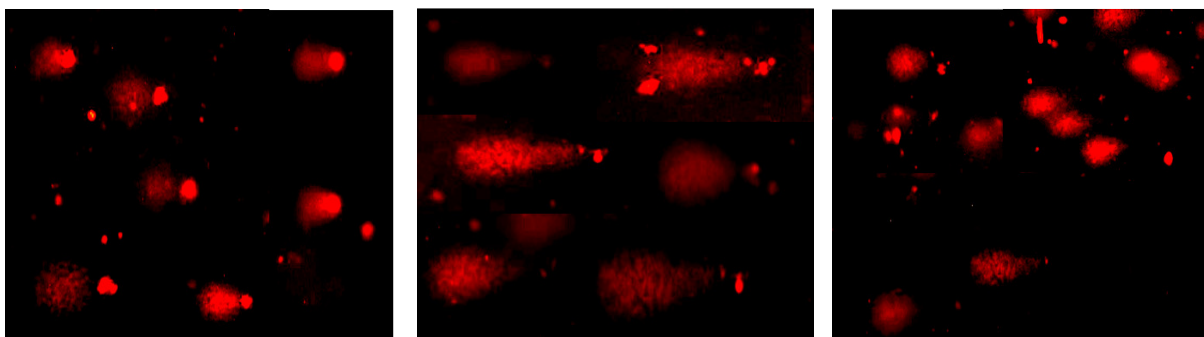


Figura 4. Nº de cometas formados a partir de celomocitos del fluido celómico de *Eisenia* spp. controles y expuestas a 300 mg de clorpirifos/kg de sustrato y 400 g de malation/kg de sustrato durante 21 días. Los valores se expresan en Nº de cometas. Las barras expresan las medias y la tendencia de la desviación estándar. N=6



Cometas tipo 3

Cometas tipo 4

Cometas tipo 5

Figura 5. Cometas tipo 3, 4 y 5 formados a partir de celomocitos de *Eisenia* spp. controles y expuestas a 300 mg de clorpirifos/kg de sustrato y 400 mg de malation/kg de sustrato durante 21 días.

### **Peroxidación de lípidos**

La exposición a malation y clorpirifos tuvo un efecto significativo en los niveles de MDA cuantificados en celomocitos de *Eisenia* spp. (Anova<sub>Tratamiento</sub>,  $F_s=33,63$ ;  $P<0,001$ ) que varió durante los períodos de exposición agudo y crónico (Anova<sub>Tiempo</sub>,  $F_s=25,83$ ;  $P<0,001$ ). A los 7 días, solo el tratamiento con el pesticida organofosforado clorpirifos produjo un incremento significativo en las concentraciones de MDA en celomocitos de lombrices de tierra en comparación con sus respectivos controles (Controles:  $1,08 \pm 0,42$  y Clorpirifos:  $2,76 \pm 0,45$  nmoles de MDA/ml de fluido celómico), mientras que a los 21 días, los valores de MDA aumentaron con la exposición a los dos pesticidas, registrándose durante esta fase valores de  $1,22 \pm 0,50$  nmoles de MDA/g.t.h para organismos controles y  $3,03 \pm 0,72$  y  $3,10 \pm 0,57$  nmoles de MDA/g.t.h para lombrices de tierra expuestas a clorpirifos y malation, respectivamente (Figura 6).



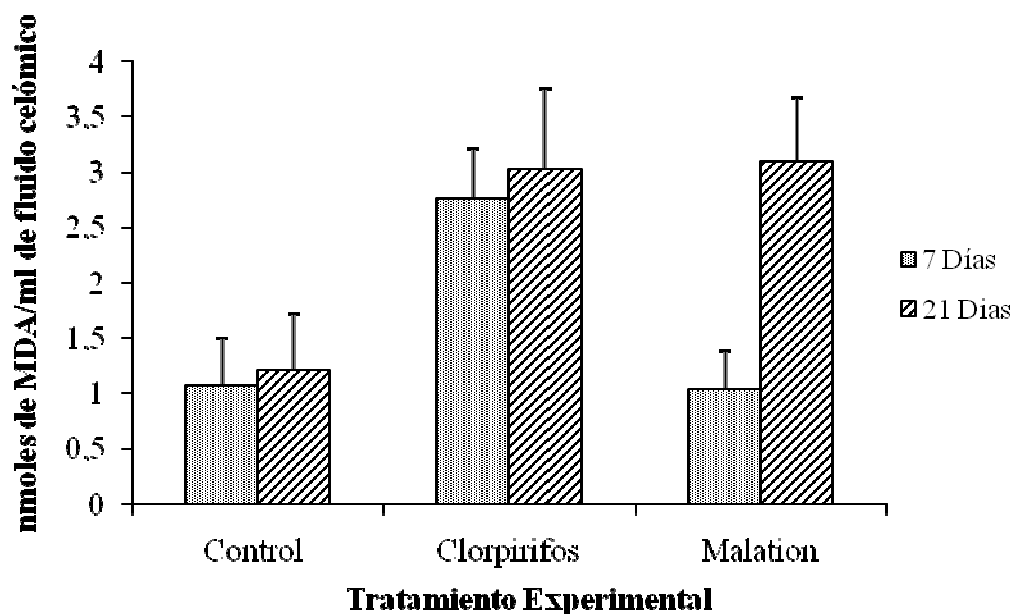


Figura 6. Niveles de malondialdehído (MDA) en celomocitos de *Eisenia* spp. controles y expuestas a 300 mg de clorpirifos/kg de sustrato y 400 mg de malation/kg de sustrato durante 7 y 21 días. Los valores se expresan en nmoles de MDA por mililitro de fluido celómico (nmoles de MDA/ml de fluido celómico). Las barras expresan las medias y la tendencia de la desviación estándar. N=8.

#### Actividad de Acetilcolinesterasa (AChE; EC. 3.1.1.7)

Los resultados de las actividades de AChE en el tejido corporal de *Eisenia* spp. controles y expuestas a los pesticidas clorpirifos y malation durante 7 y 21 días se muestran en la figura 7. Los dos agroquímicos afectaron similarmente la actividad de esta enzima en los períodos agudo y crónico, encontrándose que tanto los químicos como el tiempo de exposición ejercen un efecto conjunto sobre este parámetro (Anova<sub>Interacción</sub>,  $F_s = 15,02$ ;  $p < 0,001$ ). La actividad promedio de AChE en organismos no expuestos fue de 279,41 U/g.t.h, observándose un aumento significativo durante la exposición aguda a los dos agrotóxicos (Anova<sub>Tiempo</sub>,  $F_s = 55,83$ ;  $p < 0,001$ ). En contraste, en el período crónico la actividad de la enzima exhibió un descenso del 50% aproximadamente por los tratamientos experimentales, descendiendo desde 284,01

U/g.t.h en lombrices controles hasta 170,04 U/g.t.h y 132,35 U/g.t.h en las expuestas a clorpirifos y malation, respectivamente.

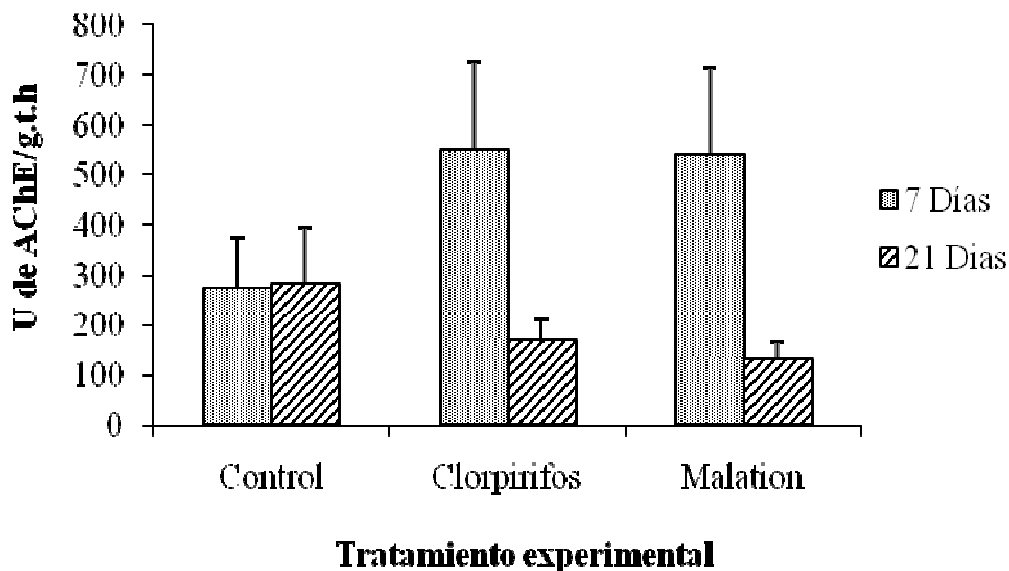


Figura 7. Actividad específica de acetilcolinesterasa (AChE) en el tejido corporal de *Eisenia* spp. controles y expuestas a 300 mg de clorpirifos/kg de sustrato y 400 mg de malation/kg de sustrato durante 7 y 21 días. Los valores se expresan en  $\mu$ moles de acetilcolina transformados en producto en un minuto (U) por gramo de tejido húmedo (U/g.t.h). Las barras expresan las medias y la tendencia de la desviación estándar. N=8

### Niveles de glutatión reducido (GSH)

La figura 8 muestra los niveles de GSH en el tejido corporal de *Eisenia* spp. durante la exposición aguda y crónica a los pesticidas clorpirifos y malation. El tratamiento experimental de las lombrices de tierra con los dos organofosforados afectó significativamente los niveles del tripéptido GSH durante los 7 y 21 días de exposición (Anova<sub>Tratamiento</sub>,  $F_s=60,15$ ;  $P<0,001$  y Anova<sub>Tiempo</sub>,  $F_s=50,52$ ;  $P<0,001$ ). Observándose durante la exposición por 7 días, un incremento significativo desde  $14,63 \pm 0,98$  mmoles de GSH/g.t.h en organismos no tratados hasta  $18,11 \pm 1,40$  y  $23,67 \pm 1,15$  mmoles de GSH/g.t.h en los organismos sujetos al tratamiento con clorpirifos y malation, respectivamente. En el período de exposición por 21 días, el contenido de GSH sólo fue afectado por el tratamiento con clorpirifos que produjo un incremento desde  $14,63 \pm 0,98$  mmoles de GSH/g.t.h hasta  $18,88 \pm 1,53$  mmoles de GSH/g.t.h.

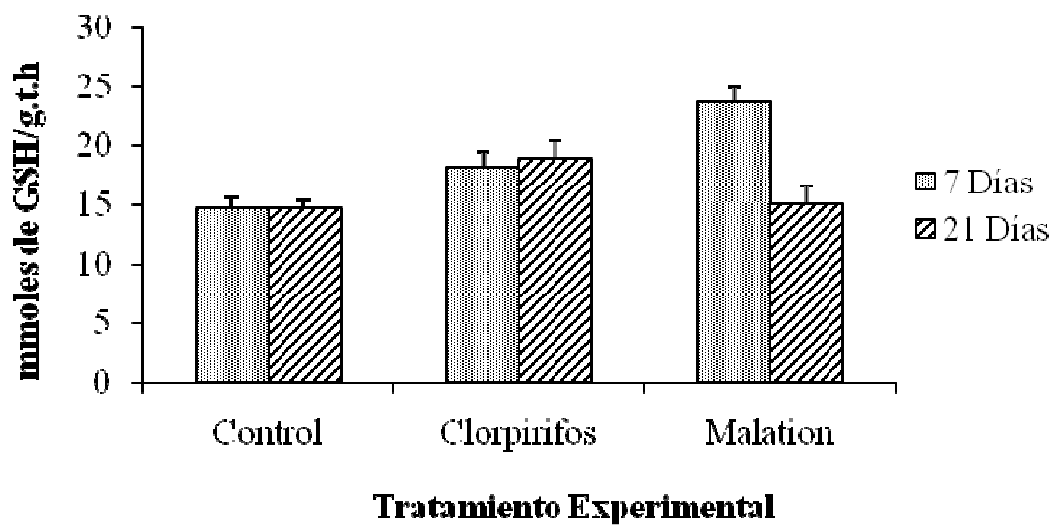


Figura 8. Niveles de glutatión reducido (GSH) en el tejido corporal de *Eisenia* spp. controles y expuestas a 300 mg de clorpirifos/kg de sustrato y 400 mg de malation/kg de sustrato durante 7 y 21 días. Los valores se expresan en milimoles de GSH por gramo de tejido húmedo (mM de GSH/g.t.h). Las barras expresan las medias y la tendencia de la desviación estándar. N=8.

## DISCUSIÓN

Los resultados de esta investigación constituyen un aporte adicional al conjunto de antecedentes que apoyan el uso de múltiples biomarcadores en individuos para dilucidar la acción tóxica de xenobióticos. Los biomarcadores evaluados en celomocitos y tejido corporal de *Eisenia* spp. exhibieron cambios marcados en respuesta al tratamiento agudo y crónico con clorpirifos y malation, revelándose su alta sensibilidad en la detección de efectos perjudiciales a concentraciones subletales de ambos agroquímicos y su potencial para ser usados en los estudios de evaluación y detección temprana de riesgos de contaminación por pesticidas organofosforados en los ecosistemas terrestres.

Los cambios detectados en los biomarcadores evaluados en *Eisenia* spp. proporcionaron una medida indirecta de que los químicos son absorbidos por el organismo y, su biotransformación posterior y/o bioactivación intracelular, bioacumulación en diferentes compartimientos celulares así como una baja tasa de excreción, posiblemente fueron factores determinantes en el desarrollo de la toxicidad evidenciada en las lombrices sujetas al tratamiento con los pesticidas durante los dos periodos de exposición. En este sentido, se conoce el potencial de las lombrices de tierra para absorber pesticidas organofosforados del medio vía oral o dérmica (Chakra y Venkateswara, 2008), a pesar de la elevada sensibilidad de estos químicos a la degradación físico-química y biótica en el suelo que los hace poco persistentes en el medio (Yu *et al.*, 2006)

Los celomocitos de *Eisenia* spp. fueron perjudicialmente afectados por la exposición a clorpirifos y malation, siendo estos efectos más severos a los 21 días de exposición. Las membranas y el ADN de estas células fueron parte de los blancos moleculares con los que interactuaron los pesticidas y/o sus productos de biotransformación que propiciaron la citotoxicidad. Los descensos observados en el TRRN<sub>50</sub> (Fig.1); indicativo de pérdida de la estabilidad de membranas lisosomales, coincidente con aumentos en el número y tipos de cometas (Figs. 2 y 4); índice de daño genotóxico, sustentan la aseveración anterior. En concordancia, incrementos en los niveles de MDA en los celomocitos de las lombrices expuestas a los dos agroquímicos;

principalmente en el periodo crónico (Fig. 6) sugieren que el mecanismo de acción perjudicial de los químicos en estas células, posiblemente está mediado por daño oxidativo, asociado a su vez, con alteración del potencial antioxidante celular y sobreproducción de oxiradicales durante el proceso de biotransformación de ambos pesticidas.

En el contexto anterior, se conoce que los pesticidas OPs para exhibir su acción perjudicial requieren de una activación metabólica, proceso que en ciertos casos, implica una reacción de desulfuración oxidativa que transforma al grupo funcional P=S del compuesto parental en su correspondiente oxon (P=O); un metabolito bioactivo con alta afinidad por los centros activos de AChE y otras enzimas serin-hidrolasas que constituyen sus principales blancos moleculares (Galloway y Handy, 2003). En la bioactivación de OPs participan enzimas monoxigenasas dependientes de NADPH y de citocromo P<sub>450</sub>; una vía catabólica generadora de agentes prooxidantes que, bajo condiciones de perturbación de los mecanismos bioquímicos que facilitan su posterior eliminación, conlleva a su interacción inespecífica con macromoléculas biológicas (proteínas estructurales, enzimas, lípidos y ADN), generando daños oxidativos (Bucheli y Fent, 1995; Lee y Carter, 2006).

Muchos aspectos sobre el metabolismo de clorpirifos y malation se conocen, principalmente en mamíferos, peces y algunos insectos (Bucheli y Fent, 1995; Karanth y Pope, 2000). En el caso específico de clorpirifos, la acción de monoxigenasas citocromo P<sub>450</sub> reductasa en tejidos blancos genera clorpirifos-oxon (Mattson *et al.*, 1996; Russell y Chambers, 1996), el cual es posteriormente hidrolizado generando como principales metabolitos: 3,5,6 tricloro-2-piridinol (TCP) y 3,5,6 tricloro-2-metoxipiridina (TMP). En el destino metabólico de estos últimos, en peces y mamíferos, participan las enzimas glucoronosil transferasa y glutatióna-S-transferasa (GST), respectivamente (Barron *et al.*, 1993). El metabolismo de malation también está bien caracterizado en mamíferos y, se sabe que participan familias de citocromo P<sub>450</sub> en la primera fase de su biotransformación para generar el correspondiente oxon (maloxon), el cual es posteriormente metabolizado vía GST (Rabideau, 2001), siendo los productos de excreción, derivados fosfóricos y ácidos carboxílicos (Buratti y Testai, 2005).

Existen evidencias de que las enzimas citocromo P<sub>450</sub> y carboxilesterasas compiten por los OPs como sustrato; las primeras por degradación oxidativa los convierten en los oxones correspondientes; metabolitos activados más tóxico que el compuesto parental y, las carboxilesterasas catalizan la hidrólisis de los grupos carboxilos tanto de los compuestos parentales como de los oxones, generando productos no tóxicos para su excreción (Sánchez-Hernandez, 2010). Siendo las carboxilesterasas un sitio de unión para OPs alternativo a las enzimas colinesterasas, éstas constituyen un mecanismo de resistencia a la toxicidad de estos pesticidas. En invertebrados, los pesticidas organofosforados, incluyendo malation y clorpirifos, exhiben un mayor potencial de toxicidad debido a la relativa carencia en estos organismos de CEs en comparación con los mamíferos (Ciesielski y Loomis. 1994).

El metabolismo de organofosforados y rutas involucradas en el desarrollo de su toxicidad en lombrices ha sido poco estudiado, se ha revelado no obstante, la presencia de familias de enzimas citocromo P<sub>450</sub> en *L. terrestris* y *E. foetida* (Stenersen y Oien, 1981), por lo que se presume que ambas especies pueden transformar OPs a sus oxones y así exhibir su toxicidad. También existen reportes de la presencia de la enzima GST en ambas especies, si embargo, la función de esta enzima en el metabolismo de estos pesticidas no está bien dilucidada. Stenersen (1979) demostró que el metabolismo de paration en lombrices ocurre vía formación de paroxon y ácido dietil fosfato, siendo ésta una posible ruta para metabolizar malation en *Eisenia* spp. y otras especies de lombrices. Por otro lado, en *L. terrestris* se ha detectado la presencia de múltiple isoformas de CEs con alta sensibilidad tejido-específica a OPs como clorpirifos-oxon (Sánchez-Hernandez y Wheelock, 2009). Siendo estas enzimas a nivel intestinal una barrera contra la absorción de pesticidas OPs, la inhibición de sus actividades podría propiciar la toxicidad de estos pesticidas en lombrices (González-Vejares *et al.*, 2010). Esta propuesta podría ser válida también para *Eisenia* spp. y explicaría en parte, los efectos tóxicos observados por clorpirifos y malation.

En esta investigación, los daños en la integridad estructural de los lisosomas debidos a los tratamientos con clorpirifos y malation fueron similares para ambos químicos, observándose descensos promedios aproximados en el TRRN<sub>50</sub> de 11 y 50 %

a los 7 y 21 días de exposición, respectivamente, evidenciándose una relación entre la respuesta celular y el tiempo de exposición a los agroquímicos. Es posible que la naturaleza lipofílica de clorpirifos y malation así como, la alta reactividad química de los metabolitos generados por su biotransformación intracelular hayan sido determinantes en la selección de las membranas lisosomales como blanco de acción ideal de estos pesticidas. Frecuentemente, son reacciones de oxidación de los lípidos y proteínas de las membranas las que generan alteraciones de la integridad estructural del organelo y pérdida de sus funciones (Booth y O' Halloran, 2001; Reinicke y Reinecke, 2007). Niveles de MDA incrementados por clorpirifos en la fase aguda y, por ambos pesticidas en el periodo crónico sustentan la idea de que patologías oxidativas pudieron estimular los efectos perjudiciales en los lisosomas de *Eisenia* spp.

En el contexto anterior, Sevanian y Hochstein. (1985) señalaron que ciertos productos de la lipoperoxidación pueden difundir desde las membranas celulares hacia otros compartimientos subcelulares e inducir pérdida de la rigidez, permeabilidad selectiva y finalmente de la integridad estructural y funcional en membranas de organelos que conlleva al deterioro de la viabilidad celular. Coincidente con los resultados de esta investigación, daños en membranas lisosomales de celomocitos fueron inducidos en *E. andrei* por la exposición a suelos contaminados con benzo-a-pireno y clorpirifos (Eason *et al.*, 1999; Piola *et al.*, 2009), en *A. caliginosa* luego de su exposición a clorpirifos y diazinon (Booth y O' Halloran, 2001) y en *E. fetida* expuesta *in vivo* a diferentes concentraciones de carbaril fosfato (Gambi *et al.*, 2007).

Similar a los efectos observados sobre la estructura de los lisosomas, a los 21 días la acción genotóxica de clorpirifos y malation fue mayor en celomocitos de *Eisenia* spp. En general, durante la fase aguda, para ambos tratamientos predominaron los cometas tipo 1 y 2, seguido por los cometas tipo 3 (Fig. 2), mientras que, en el periodo crónico además de estos tres tipos de cometas, se evidenciaron los tipo 4 y 5 (Fig. 4), indicativos de lesiones severas que incluyen fragmentación en la doble cadena de ADN. Dado que en este periodo, los niveles de MDA en los celomocitos incrementaron significativamente (Fig. 6), se presume que los efectos perjudiciales en el ADN de estas células podrían estar asociados con la condición de estrés oxidativo establecida en esta

fase. Variaciones intraespecíficas inherentes al potencial de los celomocitos en cada organismo podría explicar las diferencias observadas en las respuestas a la exposición aguda y crónica a cada pesticida. Al respecto, Di Marzio *et al.* (2005) señalan que los celomocitos en cada organismo pueden exhibir diferencias estructurales en la cromatina, en la capacidad barredora de oxiradicales por mecanismos antioxidantes y por ende, en la susceptibilidad al daño oxidativo.

Otras investigaciones han señalado que la integridad del ADN es vulnerable al daño oxidativo (Cooke *et al.*, 2003; Di Marzio *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009). En este contexto, se conoce que agentes prooxidantes junto con los productos de la peroxidación de lípidos (MDA y otros radicales), generados durante la exposición a xenobióticos atacan al ADN en sitios específicos, causando modificaciones estructurales severas en la molécula (Liu *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2009). La variedad de las lesiones pueden incluir: rupturas e intercambios de segmentos inter e intracadenas, separación de la doble hélice, rupturas en cadenas simples o en la doble hélice, modificaciones de las pentosas y oxidación de las bases nitrogenadas (Walsh *et al.*, 1995; Shugart, 2000; Lee y Carter, 2006). Específicamente, alteraciones a nivel de la estructura de las pentosas y bases nitrogenadas se han asociado con una sobreproducción del radical hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ) (Teebor *et al.*, 2000).

La acción genotóxica de pesticidas ha sido revelada desde estudios previos, Bustos-Obregon e Iziga (2003), demostraron que el pesticida paration es capaz de inducir genotoxicidad en células germinales de *Eisenia foetida*. Recientemente, Liu *et al.*, (2009) demostraron que el tratamiento de *E. foetida* con clorpirifos provocó ruptura en las cadenas del ADN de los celomocitos, siendo el efecto genotóxico dependiente de las dosis de exposición. Similarmente, en la misma especie se observó una fragmentación del ADN dependiente de las dosis de atrazina (2,5, 5 y 10 mg/kg de suelo) cuando fue expuesta por 7, 14, 21 y 28 días (Song *et al.*, 2009). Los autores concluyeron que el mecanismo de acción genotóxico fue mediado por estrés oxidativo, asociado con inhibición de las defensas antioxidantes celulares (actividades de la superóxido dismutasa y catalasa). Piola *et al.*, (2009) en un sistema de exposición en suelos naturales asperjados con clorpirifos observaron daños estructurales en el ADN de



celomocitos de *E. andrei* a los días 1 y 14 después del tratamiento con el pesticida. Tales autores señalaron que el efecto genotóxico inducido por clorpirifos podría conducir al desarrollo de mutaciones, rupturas en las hélices, modificaciones de las bases y finalmente, a desordenes en la salud del organismo, alterando así el equilibrio del ecosistema que, en ciertos casos, podría representar un elevado riesgo de extinción de especies sensibles.

Diversos estudios han demostrado que las membranas celulares en lombrices de tierra son ricas en fosfolípidos con predominio de ácidos grasos polinsaturados, por lo que son muy susceptibles a sufrir reacciones de peroxidación lipídica en presencia de especies reactivas del oxígeno (Albro *et al.*, 1993; Saint-Denis *et al.*, 2001). Los resultados del presente estudio demostraron que, malation a los 21 días y clorpirifos a los 7 y 21 días de exposición causaron lipoperoxidación en las membranas de los celomocitos de *Eisenia* spp. tal como lo sugiere los incrementos de las concentraciones de MDA detectadas (Fig. 6). Reacciones de lipoperoxidación en membranas son uno de los principales factores que contribuyen con la pérdida de la funcionalidad celular bajo situaciones de estrés oxidativo (Bindoli, 1988; Botsoglou, 1994), llegando a inducir, en ciertos casos, la lisis celular a través de la generación de alteraciones estructurales y funcionales irreversibles en sistemas de membranas celulares y de organelos (Clavel *et al.*, 2002).

En general, los resultados de los biomarcadores evaluados en los celomocitos de *Eisenia* spp. reflejaron un claro patrón de respuesta a los tratamientos con clorpirifos y malation. Ambos pesticidas provocaron efectos similares sobre la estructura de las membranas y el ADN de estas células que se magnificaron en el periodo de exposición crónico. Tomando en consideración que los celomocitos en lombrices de tierra participan en los mecanismos de defensa inmunológicos, así como en los procesos de nutrición, destoxificación y excreción de productos de desecho entre los distintos tejidos (Cooper, 2002; Kurek *et al.*, 2007), la sensibilidad de estas células en *Eisenia* spp. a la acción tóxica de los pesticidas probados podría interferir con tales funciones y repercutir en el estado de salud y sobrevivencia de este organismo. En este contexto, es evidente la

relevancia ecotoxicológica y utilidad de los biomarcadores celulares evaluados en este estudio para detectar toxicidad por exposición a OPs en lombrices de tierra.

Por otro lado, a diferencia de lo que ocurrió con los biomarcadores evaluados en los celomocitos de *Eisenia* spp., el patrón de respuesta frente al tratamiento agudo y crónico con clorpirifos y malation varió para los biomarcadores evaluados en el tejido corporal del organismo. Así a los 7 días, el biomarcador de exposición a OPs (AChE) incrementó debido al tratamiento con los dos pesticidas, disminuyendo luego en el periodo de exposición más prolongado (Fig. 7). Es probable que en *Eisenia* spp. la absorción de los pesticidas vía dérmica sea una ruta de menor importancia que permitió un limitado ingreso de los químicos y, a corto plazo, las concentraciones intracelulares disponibles fueron muy bajas para provocar efectos perjudiciales en el tejido muscular y por el contrario, activaron mecanismos de ajustes bioquímicos que resultaron en una estimulación de la actividad de AChE. Dado que a los 21 días, el efecto fue revertido y la actividad enzimática fue inhibida en un 50 % aproximadamente, el mecanismo de compensación bioquímica sugerido al parecer es funcional sólo por cortos periodos de exposición a los agroquímicos.

El fenómeno de respuesta a diferentes dosis de un químico, caracterizado por estimulación a dosis bajas e inhibición a dosis altas fue inicialmente reconocido como efecto hormético por Southam y Erlich (1943). Este fenómeno ha sido observado en un amplio rango de organismos (bacterias, hongos, plantas y animales), y algunos autores han señalado que éste representa una respuesta adaptativa evolucionaria a la alteración de la homeostasis inducida por factores ambientales (Cedergreen *et al.*, 2007; Cedergreen, 2008). Un reporte reciente sobre hormesis, coincidiendo con los resultados de este estudio, fue hecho por Velki *et al.* (2010) en *E. foetida* expuesta a malation y tenefos; específicamente, la exposición por 2 horas a concentraciones de malation de 0,2 y 0,6 ng/cm<sup>2</sup> produjo un incremento en la actividad de colinesterasa y a 8,0 ng/cm<sup>2</sup> fue significativamente inhibida. En la misma especie, Hackenberger *et al.* (2008) observó un comportamiento similar en la actividad de AChE en respuesta al tratamiento con tenefos. El número de individuos de *L. variegatus* incrementó luego de la exposición a sedimentos contaminados con el fluoranteno (59 µg/g), pero a una dosis mayor (108

µg/g) se observó un descenso en la variable y no difirió del grupo control (Landrum *et al.*, 2002).

La hormesis también ha sido frecuentemente observada en lombrices expuestas a metales pesados. En este contexto, Zhang *et al.* (2009), evidenciaron estimulación de la actividad de enzimas antioxidantes a bajas concentraciones de Cd y un decrecimiento posterior, luego de una exposición prolongada a dosis más elevadas. En *L. rubellus*, Cd también produjo el mismo fenómeno sobre el crecimiento, siendo éste estimulado a dosis de 0,11 µmoles/g e inhibido a concentraciones superiores a 1,5 µmoles/g (Spurgeon *et al.*, 2004). El tratamiento a corto plazo de *E. andrei* con metilmercurio resultó en un incremento de las defensas inmunes mediadas por celomocitos, respuesta que se invirtió al prolongarse la exposición (Sauvé y Fournier, 2005).

A pesar de que la estimulación a corto plazo de AChE en *Eisenia* spp. puede ser una estrategia de compensación bioquímica efectiva para controlar y evitar la toxicidad de malation y clorpirifos, este comportamiento se convierte en una desventaja al momento de considerar la actividad de esta enzima como un biomarcador predictivo de estrés agudo por la exposición a tales agroquímicos y destaca por otro lado, la pertinencia del enfoque sobre el uso de múltiples biomarcadores en este y otros estudios al evaluar toxicidad por exposición a OPs (Chapman, 2002).

En contraste, la actividad de AChE de *Eisenia* spp. fue inhibida por ambos pesticidas a los 21 días de exposición, sugiriendo estos resultados la presencia en el tejido corporal de los sistemas enzimáticos y rutas metabólicas que generan los metabolitos bioactivos, clorpirifos oxon y malaixon, cuya acción directa es ejercida sobre grupos funcionales catalíticamente activos de esta enzima (Sultatos *et al.*, 1985; Gallo y Lowryk, 1991; Boucheli y Fent, 1995, Chanda *et al.*, 1997; Bouchard *et al.*, 2003; Buratti y Testai, 2005). Alternativamente, inhibición de AChE podría ser el resultado de la alteración o inhibición de enzimas esterasas que al interactuar irreversiblemente con OPs y sus oxones representan una barrera de defensa bioquímica contra la acción específica de éstos sobre AChE (González-Vejares *et al.*, 2010). En este sentido, se ha destacado la función de CEs y A-esterasas (AEs) en el metabolismo de xenobióticos, incluyendo organofosforados (Tang y Chamber, 1999). CEs actúan como

“barredores moleculares” por enlazamiento estequiométrico a oxones, con lo que se reduce el número de moléculas disponibles para AChE; mientras AEs tales como la malation oxonasa y clorpirifos oxonasa participan en la inactivación catalítica de derivados oxones de OPs (Jokanovic *et al.*, 1996; Li *et al.* , 2000; Chamber y Oppenheimer, 2004).

Como ya se ha mencionado, la acción neurotóxica de los pesticidas OPs se debe al potencial que éstos tienen de inhibir irreversiblemente la actividad de AChE (Chanda *et al.*, 1997), generando una sobreacumulación de acetilcolina en las terminaciones nerviosas durante la sinapsis colinérgica, que su vez desencadena una sobreestimulación de receptores postsinápticos colinérgicos y finalmente, signos de neurotoxicidad (Gallo y Lowry, 1991; Aldridge, 1996; Karanth y Pope, 2000). Algunos estudios previos, cuyos resultados coinciden con los de la presente investigación incluyen el de Gambi *et al.* (2007), en el que se demostró que la exposición *in vivo* de *E. fetida* a diferentes concentraciones de carbarilfosfato produjo inhibición dosis-dependiente de AChE durante los primeros tres días de tratamiento. La exposición a malation resultó también en un decrecimiento significativo en la actividad de AChE en *L. terrestris* (Henson-Ramsey *et al.*, 2008) y en *A. caliginosa* expuesta a etil-paratión y a una mezcla de insecticidas (Olvera-Velona *et al.*, 2008; Schreck *et al.*, 2008)

Similar a lo observado en la actividad de AChE en el tejido muscular de *Eisenia* spp. en la fase de exposición aguda a los dos pesticidas, las concentraciones de GSH exhibieron aumentos significativos, manteniéndose este comportamiento a los 21 días sólo para el grupo tratado con clorpirifos (Fig. 8). Este patrón de respuesta permite inferir que las defensas antioxidantes mediadas por GSH en ese tejido no fueron perjudicialmente afectadas, por el contrario, incrementos en los niveles del tripéptido indican su posible participación en el control de la toxicidad mediada por radicales libres durante la biotransformación intracelular de los químicos. Al respecto, se conoce de la alta afinidad de GSH por radicales libres y su participación directa como molécula barredora de agentes prooxidantes, así como cosustrato de las enzimas atioxidantes glutaciona peroxidasa y glutaciona-S-transferasa, representando una de las primeras

líneas de defensa celular contra patologías oxidativas (Di Giulio *et al.*, 1995; Saint-Denis *et al.*, 2001).

En un estudio realizado por Stenersen. (1979) en seis especies de lombrices de la familia Lumbricidae, incluyendo *E. fetida*, el autor evidencio actividad de GST en tejido muscular y sugirió que las reacciones de conjugación con GSH de metabolitos resultantes de biotransformación de xenobióticos, catalizadas por GST pueden representar un importante mecanismos de destoxificación y control de la toxicidad en lombrices. Adicionalmente, otros estudios en lombrices han revelado que la exposición a contaminantes orgánicos; entre ellos pesticidas, inducen alteraciones en las defensas antioxidantes mediadas por el GSH, desencadenando estrés oxidativo. En la especie *Pheretima postuma*, la enzima GST aumentó después de una semana de exposición a los pesticidas, aldrin, endosulfan y lindano (Hans *et al.*, 1993), mientras que en *A. caliginosa*, esta enzima fue inhibida después del tratamiento con clorpirifos y diazinon (Booth y O'Halloran, 2001). En *E. fetida andrei*, Saint-Denis *et al.* (1999) encontraron que, la exposición a benzo(a)pireno generó una descenso en los niveles de GSH asociado con aumentos en la peroxidación de lípidos.

En general, en esta investigación se demostró la importancia de usar biomarcadores adicionales a la actividad de AChE para evaluar toxicidad por exposición a los pesticidas OPs, ya que en *Eisenia* spp. durante la exposición aguda, la enzima no fue susceptible a la inhibición por clorpirifos y malation y, por el contrario mostró un incremento. En contraste, la estabilidad lisosomal, integridad estructural del ADN y lipoperoxidación evaluados en celomocitos fueron biomarcadores altamente sensibles a ambos agroquímicos y pusieron en evidencias efectos perjudiciales a corto y largo plazo, demostrando así que su empleo junto con la actividad de AChE debe ser recomendado para estudiar efectos tóxicos por exposición a OPs.

## CONCLUSIONES

Durante la exposición aguda y crónica de *Eisenia* spp. a clorpirifos y malation, todos los biomarcadores exhibieron cambios significativos que reflejaron la acción tóxica de ambos pesticidas a las concentraciones subletales utilizadas.

Los biomarcadores en los celomocitos fueron similarmente sensibles a los tratamientos con los dos pesticidas y evidenciaron daños oxidativos, desestabilización de membranas lisosomales y genotoxicidad en estas células, siendo estos efectos más severos en el periodo de exposición crónico.

A corto plazo (7 días), a nivel del tejido corporal de *Eisenia* spp no se revelaron efectos perjudiciales por el tratamiento con los dos agroquímicos, ya que AChE y GSH incrementaron, sugiriendo el rol antioxidante del tripéptido y su participación en el control de la toxicidad en ese tejido.

El uso de múltiples biomarcadores en la especie estudiada y la interpretación integrada de los resultados permitieron detectar alteraciones a corto y largo plazo que facilitaron la comprensión de los efectos provocados por la exposición a los agroquímicos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Albro, P.; Corbett, J. y Schroeder, J. 1993. Endogeneous lipids of the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Biochem. Cell. Biol.*, 71:220-221.
- Aldridge, W. 1996. Organophosphorus compounds and carbates. *Toxicology.*, 26: 86-90.
- Badii, M. y Varela, S. 2008. Insecticidas organofosforados: Efectos sobre la salud y el ambiente. *Toxicol. Insect.*, 28: 5-17.
- Barron, M.; Plakas, S.; Wilga, P. y Ball, T. 1993. Absorption, tissue distribution and metabolism of chlorpyrifos in channel catfish following waterborne exposure. *Environ. Toxicol. Chem.* 12:1469-1476
- Bindoli, A. 1988. Lipid peroxidation in mitochondria. *Free Rad. Biol. Med.*, 5: 247-261.
- Booth, L. y O'Halloran, K. 2001. A comparison of biomarker responses in the earthworm *Aporrectoea caliginosa*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20 : 2494-2502.
- Botsoglou, N. A. 1994. Rapid, sensitive, and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food and feedstuff samples. *J. Agric. Food Chem.*, 42:1931-1937.
- Bouchar, M.; Gosselin, N.; Brunet, R.; Onit, S.; Dumoulin, M. y Carrier, G. 2003. A toxicokinetic model of malathion and its metabolites as a tool to assess human exposure and risk through measurements of urinary biomarkers. *Toxicol. Science.*, 73: 182-194.
- Bucheli, T. y Fent, K. 1995. Induction of cytochrome P-450 as a biomarker for environmental contamination. *Crit. Rev. Env. Sci. Techno.*, 25: 201-268.
- Bustos-Obregón, E. y Iziga, R. 2003. Pesticide soil contamination mainly affects earthworm male reproductive parameters. *Asian. J. Andol.*, 4: 195-199.
- Buratti, F. y Testai, E. 2005. Malathion detoxification by human hepatic carboxylesterase and its inhibition by isomalathion and other pesticides. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 19 (6): 406-414.
- Cajaraville, M.; Bebianno, M.; Blasco, J.; Porte, C.; Sarasquete, C. y Viarengo, A. 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci. Total. Environ.*, 247 : 295-311.

- Casabé, N.; Piola, L.; Fuchs, J.; Oneto, M.; Pamparato, L.; Basack, S.; Giménez, R.; Massaro, R.; Papa, J. y Kesten, E. 2007. Ecotoxicological assessment of the effects of glyphosate and chlorpyrifos in an Argentine soya field. *J. Soils. Sedim.*, 7: 232-239.
- Cedergreen, N. 2008. Is the growth stimulation by low doses of glyphosate sustained over time?. *Environ. Pollut.*, 156 (3): 1099-1104.
- Cedergreen, N.; Streibig, J.; Kudsk, P.; Mathiassen, S. y Duke, S. 2007. The occurrence of hormesis in plants and algae. *Dose-Response.*, 5: 150-162
- Chakra, N. y Venkateswara, J. 2008. Biological response of earthworm, *Eisenia foetida* (Savigny) to an organophosphorous pesticide profenofos. *Ecotoxcol. Environ. Saf.*, 71: 574-582.
- Chamber, J. y Oppenheimer, S. 2004. Organophosphates, serine esterase inhibition and modeling of organophosphate toxicity. *Toxicol. Esciences.*, 77: 185-187.
- Chanda, S.; Mortensen, S.; Moser, V. y Padilla, S. 1997. Tissue-specific effects of chlorpyrifos on carboxylesterase and cholinesterase activity in adult rats: An in Vitro and in vivo comparison. *Fundam. Applied. Toxicol.*, 38: 148-157.
- Chapman, P. 2002. Ecological risk assessment (ERA) and hormesis. *Scien. Total. Environ.*, 288(1-2): 131-140.
- Ciesielki, S. y Loomis, P. 1994. Pesticides exposures, cholinesterase depression and symptoms among North Carolina migrant farmworkers. *American. J. Public. Health.* 84(3): 446-451.
- Clavel, I.; Vian, D. y Arce, L. 2002. El papel de los radicales libres en la homeostasia celular. *J. Med.*, 24: 12-18.
- Cooke, M.; Evans, M.; Dizdaroglu, M. y Lunec, J. 2003. Oxidative DNA damage: Mechanisms, mutation, and disease. *FASEB. J.*, 17: 1195-1214.
- Cooper, E. 2002. Introduction to the earthworm immune system. In: A new model for analysing antimicrobial peptides with biomedical applications. Cooper, E.; Beschin, A. y Bilej, M. (eds). IOS Press, Amsterdam, pp 3-26.
- Cotelle, S. y Ferar, J. 1999. Comet assay in genetic ecotoxicology: A review. *Environ. Mol. Mutagen.*, 34: 246-255.



- De la Torre, F.; Ferrari, L. y Salibian, A. 2005. Biomarkers of a native fish species (*Cnesterodon decemmaculatus*) application to the water toxicity assessment of a peri-urban polluted river of Argentina. *Chemosphere.*, 59(4):577-583.
- Di Giulio, R.; Benson, W.; Sander, B. y Vanveld, P. 1995. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation and toxicity. En: *Fundamentals of aquatic toxicology*. Rand, G (Ed). Second edition. Taylor & Francis Publisher. Washington DC. Págs. 523-561.
- Di Marzio, W.; Sáenz, M.; Lemièrre, S. y Vasseur, P. 2005. Improved single-cell gel electrophoresis assay for detecting DNA damage in *Eisenia foetida*. *Environ. Mol. Mutagen.*, 46: 246-252.
- Eason, C.; Svendsen, C.; O'Halloran, K. y Weeks, J. 1999. An assessment of the lysosomal neutral red retention test and immune function assay in earthworm (*Eisenia andrei*) following exposure to chlorpyrifos, benzo-a-pyrene (BaP) and contaminated soil. *Pedobiol.*, 43:641-645.
- Ellman, L.; Courtney, K.; Andreas Jr. y Featherstone, R. 1961. A new rapid colorimetric determination of cholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7: 88-95.
- Ercal, N.; Gurer-Orhan, H. y Aykin-Burns, N. 2001. Toxic metals and oxidative stress: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr. Top. Med. Chem.*, 1 (6): 529-539.
- Eyambe, G.; Goven, L.; Fitzpatrick, Ll.; Venables, B. y Cooper, E. 1991. A non invasive technique for sequential collection of earthworm (*Lumbricus terrestris*) leukocytes during subchronic immunotoxicity studies. *Lab. Anim.*, 25: 61-67.
- Gallo, M. y Lawryk, N. 1991. Organic phosphorus pesticides. *Pest. Toxicol.*, 2: 917-937.
- Galloway, T. y Handy, R., 2003. Immunotoxicity of organophosphorus pesticides. *Ecotoxicol.*, 12: 345-363.
- Gambi, N.; Pasteris, A. y Fabbri, E. 2007. Acetylcholinesterase activity in the earthworm *Eisenia Andrei* at different conditions of carbaryl exposure. *Com. Biochem. Physiol.*, 145C: 678-685.
- Gardner, P. y Fridovich, I. 1992. Inactivation-reativation of aconitase in *E coli*: A sensitive measure of superoxide radical. *J. Biol. Chem.* 267: 8757-8763.
- González-Vejares, S., Sabat, P. y Sanchez-Hernández, J. 2010. Tissue-specific inhibition and recovery of esterase activities in *Lumbricus terrestris* experimentally exposed to chlorpyrifos. *Com. Biochem. Physiol.*, 151C: 351-359.

- Hackenberger, B. Jarie- Perkusie, D. Y Stepie, S. 2008. Effects of temephos on cholinesterase activity in the earthworm *Eisenia fetida* (Oligochaeta Lumbricidae). *Ecotoxicol. and Environ. Saf.*, 71: 583-589.
- Hans, R.; Khan, M.; Farooq, M. y Beg, M. 1993. Glutathione-S-transferase activity in an earthworm (*Pheretima posthuma*) exposed to three insecticides. *Soil Biol. Biochem.*, 25 (4): 509-511.
- Henson-Ramsey, H. 2007. Assessment of malathion environmental kinetics using earthworm and salamander models. Tesis de grado presentado como requisito para optar al título de doctorado en fisiología. Facultad de la Universidad del Estado de Carolina del Norte. Carolina del Norte. Estados Unidos. 161 pág.
- Henson-Ramsey, H.; Shea, D.; Levine, J.; Kennedy-Stoskopf, S.; Taylor, S. y Stoskopf, M. 2008. Assessment of the effect of varying soil organis matter content on the bioavailability of malathion to the common nightcrawler, *Lumbricus terrestris* L. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 80: 220-224.
- Jokanovic, M.; Kosanovic, M. y Maksimovic, M. 1996. Interation of organophosphorus compounds with carboxylesterases in the rat. *Arch. Toxicol.*, 70: 444-450.
- Karant, S. y Pope, C. 2000. Carboxylesterase and A-esterase activities during maturation and aging: Relationship to the toxicity of chlorpyrifos and parathion in rats. *Toxicol, Science.*, 58: 282-289.
- Kurek, A.; Homa, J.; Kauschke, E. y Plytycz, B. 2007. Characteristics of coelomocytes of the stubby earthworm, *Allolobophora chlorotica* (Sav.). *European J. of Soil Biol.*, 43: 121-126.
- Landrum, P.; Gedeon, M.; Burton, G.; Greenberg, M. y Rowland, D. 2002. Biological responses of *Lumbricus variegatus* exposed to fluoranthene-spiked sediment. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42, 292-302.
- Lee, B. y Carter, L. 2006. Genotoxicity of pesticidas: Induction of single and double DNA strand breaks and DNA-protein cross-lins. *J. Mutat.*, 18: 63-73.
- Li, W.; Costa, L.; Richter, R.; Hagen, T.; Shih, D.; Twar, A.; Lusi, A. y Furlog, C. 2000. Catalytic efficiency determines the in vivo efficacy of malathion oxonase y chlorpirifos oxonase. *Pharmacogenetics.*, 7: 23-37.
- Liu, W.; Zhu, L.; Wang, J.; Wang, J.; Xie, H. y Song, Y. 2009. Assessment of the genotoxicity of endosulfan in earthworm and white clover plants using the comet assay. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 56: 742-746.

- Massicotte, R.; Robidoux, R.; Sauve, S.; Flipo, D.; Fournier, M. y Trottier, B. 2003. Immune response of earthworms (*Lumbricus terrestris*, *Eisenia andrei* and *Aporrectodea tuberculata*) following in situ soil exposure to atmospheric deposition from a cement factory. *J. Environ. Monit.* 5: 774–779.
- Mattsson, J.; Wilmer, J.; Shankar, M.; Berdasco, N.; Crissman, J.; Maurissen, J. y Bond, D. 1996. Single-dose and 13-week repeated-dose neurotoxicity screening studies of chlorpyrifos insecticide. *Food. Chem. Toxicol.* 34: 393-405.
- Olchawa, E.; Bzowska, M.; Stürzenbaum, S.; Morgan, A. y Plytycz, B. 2006. Heavy metals affect the coelomocyte-bacteria balance in earthworms: Environmental interactions between abiotic and biotic stressors. *Environ. Pollut.*, 142: 373-381.
- Olvera-Velona, A. 2011. Contaminación en suelo por plaguicidas: ¿Dónde están las lombrices?. *Hypatia.*, 07: 34-35.
- Olvera-Velona, A.; Capowiez, Y.; Mascle, O.; Ortiz-Hernandez, L. y Benoit, P. 2008. Assessment of the toxicity of ethyl-parathion to earthworms (*Aporrectodea caliginosa*) using behavioural, physiological and biochemical markers. *Appl. Soil Ecol.*, 40: 476- 483
- Piola, L.; Fuchs, J.; Oneto, M.; Basack, S.; Giménez, R.; Massaro, R.; Papa, J.; Kesten, E. y Casabé, N. 2009. Biomarkers for the assessment of chlorpyrifos effects on earthworms and on soil functional parameters. *Pesq. agropec. bras.*, 44 (8): 17-27.
- Rabideau, C. 2001. Pesticide mixture induce immunotoxicity: Potentiation of apoptosis and oxidative stress. Tesis de grado presentado como requisito parcial para optar al título de magister en ciencias. Departamento de Ciencias Biomédicas y Patobiológicas del Instituto Politécnico de Virginia. Virginia-Maryland. Estados Unidos. 170 pág.
- Reinecke, S.; Helling B. y Reinecke, A. 2002. Lysosomal responses of earthworm (*Eisenia foetida*) coelomocytes to the fungicide copper oxochloride and relation to life-cycle parameters. *Environ. Toxic. Chem.*, 21: 1026-1031.
- Reinecke, S. y Reinecke, A. 2007. Biomarker response and biomass change of earthworms exposed to chlorpyrifos in microcosms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 66: 92-101.
- Russell, L. y Chambers, J. 1996. Kinetic analysis of the *in vitro* inhibition, aging and reactivation of brain acetylcholinesterase from rat and channel catfish by paraoxon and chlorpyrifos-oxon. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 139: 365-373.

- Saint-Denis, M.; Narbonne, J.; Arnaud, C. y Ribera, D. 2001. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil: effects of carbaryl. *Soil Biol. Biochem.*, 32: 1123-1130.
- Saint-Denis, M.; Narbonne, J.; Arnaud, C.; Thybaud, E. y Ribera, D. 1999. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil: effects of benzo (a) pyrene. *Soil Biol. Biochem.*, 31: 1837-1846.
- Sánchez-Hernández, J. 2010. Environmental applications of earthworm esterases in the agroecosystem. *J. Pestic. Sci.*, 35 (3): 290-301.
- Sánchez-Hernández, J. y Wheelock, C. 2009. Tissue distribution, isozyme abundance and sensitivity to chlorpyrifos-oxon of carboxylesterases in the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Environ. Pollut.* 157: 264-272.
- Sauvé, S. y Fournier, M. 2005. Age-specific immunocompetence of the earthworm *Eisenia andrei*: exposure to methylmercury chloride. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 60 (1): 67-72.
- Schreck, E.; Geret, F.; Gontier, L. y Treilhou, M. 2009. ChE, GST and CAT: Evaluation of the efficiency of a combined buffer for protein extraction. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72: 1609-1613.
- Schreck, E.; Geret, F.; Gontier, L. y Treilhou, M. 2008. Neurotoxic effect and metabolic responses induced by a mixture of six pesticides on the earthworm *Aporrectodea caliginosa nocturna*. *Chemosphere*. 71: 1832-1839.
- Sevanian, A. y Hochstein, P. 1985. Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Annu. Rev. Nutr.*, 5: 365-390.
- Shugart, L. 2000. DNA damage as a biomarker of exposure. *Ecotoxicology.*, 9: 329-340.
- Singh, N; McCoy, M.; Tice, R. y Schneider, E. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individuals cells. *Exp. Cell Res.* 175: 184-191.
- Song, Y.; Zhu, L.; Wang, J.; Wang J.H.; Liu, W. y Xie, H. 2009. DNA damage and effects on antioxidative enzymes in the earthworm (*Eisenia fetida*) induced by atrazine. *Soil Biol. Biochem.*, 41: 905-909.
- Southam, C. y Erlich, J. 1943. Effects of extract of western red-cedar heartwood of certain wood-decaying fungi in culture. *Phytopathology*, 33: 517-524.
- Spurgeon, D.; Svendsen, C.; Kille, P. Morgan, A. y Weeks, J. 2004. Response of earthworms (*Lumbricus rubellus*) to copper and cadmium as determined by

- measurement of juvenile traits in a specifically designed test system. *Ecotox. Environ. Saf.*, 57:54-64.
- Stenersen, J. 1979. Glutathione -S- transferases in earthworm (Lumbricidae). *Biochem. J.*, 181: 47-50.
- Stenersen, J. y Oien, N. 1981. Glutathione-S-transferases in earthworm (Lumbricidae). Substrate specificity, tissue and species distribution and molecular weight. *Comp. Biochem. Physiol.*, 69C: 243-252.
- Stephan, E. 1977. Methods for calculating LC<sub>50</sub>. En: *Aquatic toxicology and hazard evaluation, ASTM SPT 634*. Mayer, F. y Hamilink, J (eds). American Society for Testing Material, Philadelphia. Págs. 65-84.
- Stojotovic, M.; Karaman, S. y Milutinovic, T. 2007. Herbicide and pesticide effects on the earthworm species *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) (Oligochaeta, Lumbricidae). *Arch. Biol. Sci.* 59(2): 25-26.
- Sultatos, L.; Minor, G. y Murphy, S. 1985. Metabolic activation of organophosphorus pesticides. *Jour. Pharmacol. Exp. Ther.*, 232: 624-628.
- Tang, J. y Chamber, J. 1999. Detoxication of paraoxon by rat liver homogenate and serum carboxylesterases and A-esterases. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 13: 261-268.
- Teebor, G.; Boorstein, R. y Cadet, J. 2000. The reparability of oxidative free radical mediated damaged to DNA: A review. *Int. J. Radiat. Biol.*, 54: 131-150.
- Tice, R.; Agurell, E.; Anderson, D.; Burlinson, B.; Hatmann, A.; Kobayashi, H.; Miyamae, Y.; Rojas, E.; Ryu, J-C. y Sasaki, Y. 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.*, 25: 206-221.
- Velki, M., Stepić, S.; Jarić, D. y Hackenberger, B. 2010. Effect of organophosphates malathion and temephos on cholinesterase activity in the earthworm *Eisenia fetida* (Annelida: Oligochaeta). Project workshop. Croacia.
- Vermeulen, L.; Reinecke, A. y Reinecke, S. 2001. Evaluation of the fungicide manganese-zinc ethylene bis (dithiocarbamate) (manozeb) for sublethal and acute toxicity to *Eisenia foetida* (Oligochaeta). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 48: 183-189.
- Walsh, P.; El Adlouni, C.; Mukhopadhyay, M.; Viel, G.; Nadeau, D. y Poirier, G. 1995. 32P- Postlabeling determination of DNA adducts in the earthworm *Lumbricus terrestris* exposed to PAH-contaminated soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 54: 654-661.

- Weeks, J. y Svendsen, C. 1996. Neutral red retention by lysosomes from earthworm (*Lumbricus rubellus*) coelomocytes: a simple biomarker of exposure to soil copper. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15: 1801-180.
- Yu, Y.; Wu, X.; Li, S.; Fang, H.; Zhan, H. y Yu, J. 2006. An exploration of the relationship between adsorption and bioavailability of pesticides in soil to earthworm. *Environ. Pollut.*, 141: 428-433.
- Zhang, Y.; Shen, G.; Yu, Y. y Zhu, H. 2009. The hormetic effect of cadmium on the activity of antioxidant enzymes in the earthworm *Eisenia fetida*. *Environ. Pollut.*, 157 (11): 3064-3068.

## APÉNDICE

Apéndice 1. Valores promedios y desviaciones estándar ( $x \pm DE$ ) del tiempo medio de retención del rojo neutro (min) por lisosomas de celomocitos (min) *Eisenia* spp. controles y expuestas a 300 mg de clorpirifos/kg de sustrato y 400 mg de malation/kg de sustrato durante 7 y 21 días.

|                | Control          | Clorpirifos      | Malation         |
|----------------|------------------|------------------|------------------|
| <b>7 Días</b>  | $79,41 \pm 3,05$ | $74,33 \pm 5,30$ | $67,63 \pm 5,44$ |
| <b>14 Días</b> | $78,24 \pm 5,93$ | $46,52 \pm 5,25$ | $34,17 \pm 8,94$ |

Apéndice 2. Análisis de varianza del tiempo medio de retención del rojo neutro por lisosomas de celomocitos (min) de *Eisenia* spp. controles y expuestas a 300 mg de clorpirifos/kg de sustrato y 400 mg de malation/kg de sustrato durante 7 y 21 días. Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

| Fuente de Variación        | Sc      | Gl | Mc      | Fs     | P      |
|----------------------------|---------|----|---------|--------|--------|
| <b>Efectos principales</b> |         |    |         |        |        |
| Tiempo                     | 3776,72 | 1  | 3776,72 | 103,62 | 0,0000 |
| Tratamiento                | 4593,73 | 2  | 2296,86 | 63,01  | 0,0000 |
| <b>Interacciones</b>       |         |    |         |        |        |
| Tiempo-Tratamiento         | 1982,03 | 2  | 991,017 | 27,19  | 0,0000 |
| Residuos                   | 1093,49 | 30 | 36,4495 |        |        |
| <b>Total (corregido)</b>   | 11446,0 | 35 |         |        |        |

Apéndice 3. Contraste múltiple de rango para el tiempo medio de retención del rojo neutro por lisosomas de celomocitos (min) de *Eisenia* spp. controles y expuestas a 300 mg de clorpirifos/kg de sustrato y 400 mg de malation/kg de sustrato durante períodos agudo y crónico. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

| Método<br>(Tratamiento) | PR | X       | DE     | GH |
|-------------------------|----|---------|--------|----|
| <b>Control</b>          | 12 | 78,0092 | 4,457  |    |
| <b>Clorpirifos</b>      | 12 | 60,2775 | 15,562 |    |
| <b>Malation</b>         | 12 | 50,7475 | 18,997 |    |

Apéndice 4. Contraste múltiple de rango para el tiempo medio de retención del rojo neutro por lisosomas de celomocitos (min) de *Eisenia* spp. expuesta a pesticidas organofosforados durante 7 y 21 días. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

| Método (Tiempo) | PR | X       | DE     | GH |
|-----------------|----|---------|--------|----|
| 7 días          | 18 | 73,2539 | 6,242  |    |
| 21 días         | 18 | 52,7689 | 20,302 |    |

Apéndice 5. Valores promedios y desviaciones estándar ( $x \pm DE$ ) del N° de cometas formados a partir de celomocitos de *Eisenia* spp. controles y expuestas a 300 mg de clorpirifos/kg de sustrato y 400 mg de malation/kg de sustrato durante 7 y 21 días y tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. N° de células contadas = 20.

| Tipo de cometa       | 0         | 1         | 2         | 3         | 4        | 5         |
|----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|
| <i>7 Días</i>        |           |           |           |           |          |           |
| Control              | 18,6±0,8  | 1,4 ± 0,8 | 0 ± 0     | 0 ± 0     | 0 ± 0    | 0 ± 0     |
| Clorpirifos          | 3,4±0,85  | 5,1±1,11  | 7,8±1,44  | 3,8 ±1,19 | 0 ± 0    | 0 ± 0     |
| Malation             | 3,9±1,03  | 5,8±1,85  | 7,8±1,19  | 2,6 ±1,11 | 0 ± 0    | 0 ± 0     |
| <i>21 Días</i>       |           |           |           |           |          |           |
| Control              | 19,0±0,98 | 1± 0,96   | 0 ± 0     | 0±0       | 0±0      | 0±0       |
| Clorpirifos          | 1,6±0,48  | 3,9±1,08  | 5,6± 0,48 | 5±0,96    | 3,6±1,19 | 0,13±0,65 |
| Malation             | 2,1±0,48  | 3,5±0,75  | 3,6± 0,63 | 4,8±0,71  | 5,3±0,95 | 0,75±0,25 |
| Control <sup>+</sup> | 2,0±0     | 2,5±0,7   | 2,5± 0,7  | 4,5±0,7   | 5,5±0,7  | 3,0±0,7   |



Apéndice 6. Valores promedios y desviaciones estándar ( $x \pm DE$ ) de la longitud de la cola ( $\mu$ ) de cometas formados a partir de celomocitos de *Eisenia* spp. controles y expuestas a 300 mg de clorpirifos/kg de sustrato y 400 mg de malation/kg de sustrato durante 7 y 21 días. N° de células contadas = 20.

| <b>Tipo de cometa</b>      | <b>0</b> | <b>1</b>  | <b>2</b> | <b>3</b>  | <b>4</b> | <b>5</b> |
|----------------------------|----------|-----------|----------|-----------|----------|----------|
| <i>7 Días</i>              |          |           |          |           |          |          |
| <b>Control</b>             | 0±0      | 1,5±0,5   | 0±0      | 0±0       | 0±0      | 0±0      |
| <b>Clorpirifos</b>         | 0±0      | 3,0±0,3   | 7,7±0,3  | 12,0 ±0,4 | 0±0      | 0±0      |
| <b>Malation</b>            | 0±0      | 3,1±0,3   | 7,3±0,3  | 11,8 ±0,7 | 0±0      | 0±0      |
| <i>21 Días</i>             |          |           |          |           |          |          |
| <b>Control</b>             | 0±0      | 1,45±0,47 | 0±0      | 0±0       | 0±0      | 0±0      |
| <b>Clorpirifos</b>         | 0±0      | 3,2±0,4   | 7,6±0,4  | 13,4±0,3  | 18,0±0,2 | 21,6±0,5 |
| <b>Malation</b>            | 0±0      | 2,4±0,7   | 7,8±0,2  | 13,4±0,3  | 18,0±0,6 | 21,6±0,5 |
| <b>Control<sup>+</sup></b> | 0±0      | 2,4±1,6   | 6,3±0,6  | 14,1±4,8  | 18,0±0,3 | 21±0,5   |

Apéndice 7. Prueba de Kruskal-Wallis para el N° de cometas formados a partir de celomocitos de *Eisenia* spp. controles y expuestas a 300 mg de clorpirifos/kg de sustrato y 400 mg de malation/kg de sustrato durante 7 y 21 días. N° de células contadas = 20.

|                       | <b>Prueba estadística</b> | <b>P</b>                 |
|-----------------------|---------------------------|--------------------------|
| <b>Tipo de cometa</b> | 48,7909                   | 2,44868x10 <sup>-9</sup> |
| <b>Tiempo</b>         | 0,54346                   | 0,4610                   |
| <b>Tratamiento</b>    | 19,2241                   | 0,0000669187             |

Apéndice 8. Prueba de Kruskal-Wallis para la longitud de la cola ( $\mu\text{m}$ ) de cometas formados a partir de celomocitos de *Eisenia* spp. controles y expuestas a 300 mg de clorpirifos/kg de sustrato y 400 mg de malation/kg de sustrato durante 7 y 21 días. N° de células contadas = 20.

|                       | <b>Prueba estadística</b> | <b>P</b>                 |
|-----------------------|---------------------------|--------------------------|
| <b>Tipo de cometa</b> | 38,5361                   | $2,94425 \times 10^{-7}$ |
| <b>Tiempo</b>         | 7,68998                   | 0,0056                   |
| <b>Tratamiento</b>    | 35,5512                   | $1,90619 \times 10^{-8}$ |

Apéndice 9. Valores promedios y desviaciones estándar ( $x \pm \text{DE}$ ) de los niveles de MDA (nmoles de MDA/ml de fluido celómico) en celomocitos *Eisenia* spp. controles y expuestas a 300 mg de clorpirifos/kg de sustrato y 400 mg de malation/kg de sustrato durante 7 y 21 días.

|                | <b>Control</b>  | <b>Clorpirifos</b> | <b>Malation</b> |
|----------------|-----------------|--------------------|-----------------|
| <b>7 Días</b>  | $1,08 \pm 0,42$ | $2,76 \pm 0,45$    | $1,04 \pm 0,34$ |
| <b>14 Días</b> | $1,22 \pm 0,50$ | $3,03 \pm 0,72$    | $3,10 \pm 0,57$ |

Apéndice 10. Análisis de varianza de los niveles de MDA (nmoles de MDA/ml de fluido celómico) en celomocitos de *Eisenia* spp. controles y expuestas a 300 mg de clorpirifos/kg de sustrato y 400 mg de malation/kg de sustrato durante 7 y 21 días. Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

| <b>Fuente de Variación</b> | <b>Sc</b>      | <b>Gl</b> | <b>Mc</b> | <b>Fs</b> | <b>P</b> |
|----------------------------|----------------|-----------|-----------|-----------|----------|
| <b>Efectos principales</b> |                |           |           |           |          |
| Tiempo                     | 6,10591        | 1         | 6,10591   | 22,98     | 0,0000   |
| Tratamiento                | 18,3167        | 2         | 9,15837   | 34,46     | 0,0000   |
| <b>Interacciones</b>       |                |           |           |           |          |
| Tiempo-Tratamiento         | 16,96198       | 2         | 3,48099   | 13,10     | 0,0001   |
| Residuos                   | 7,97196        | 42        | 0,265732  |           |          |
| <b>Total (corregido)</b>   | <b>39,3566</b> | <b>47</b> |           |           |          |

Apéndice 11. Contraste múltiple de rango para los niveles de MDA (nmoles de MDA/ml de fluido celómico) en celomocitos de *Eisenia* spp. controles y expuestas a 300 mg de clorpirifos/kg de sustrato y 400 mg de malation/kg de sustrato durante periodos agudo y crónico. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

| Método (Tratamiento) | PR | X      | DE     | GH |
|----------------------|----|--------|--------|----|
| <b>Control</b>       | 16 | 1,15   | 0,4473 |    |
| <b>Clorpirifos</b>   | 16 | 2,8964 | 0,5896 |    |
| <b>Malation</b>      | 16 | 2,0703 | 1,1683 |    |

Apéndice 12. Contraste múltiple de rango para los niveles de MDA (nmoles de MDA/ml de fluido celómico) en celomocitos de *Eisenia* spp. expuesta a pesticidas organofosforados durante 7 y 21 días. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

| Método (Tiempo) | PR | X      | DE     | GH |
|-----------------|----|--------|--------|----|
| <b>7 días</b>   | 24 | 1,6270 | 0,9106 |    |
| <b>21 días</b>  | 24 | 2,4507 | 1,0615 |    |

Apéndice 13. Valores promedios y desviaciones estándar ( $x \pm DE$ ) de la actividad específica de acetilcolinesterasa (U de AChE/g.t.h) en el tejido corporal de *Eisenia* spp. controles y expuestas a 300 mg de clorpirifos/kg de sustrato y 400 mg de malation/kg de sustrato durante 7 y 21 días.

|                | Control          | Clorpirifos      | Malation         |
|----------------|------------------|------------------|------------------|
| <b>7 Dias</b>  | 274,816± 98,174  | 548,713 ±176,073 | 539,522 ±174,664 |
| <b>14 Dias</b> | 284,007 ±111,301 | 170,037±41,676   | 132,353 ±34,038  |

Apéndice 14. Análisis de varianza de la actividad específica de acetilcolinesterasa (U de AChE/g.t.h) en el tejido corporal de *Eisenia* spp. controles y expuestas a 300 mg de clorpirifos/kg de sustrato y 400 mg de malation/kg de sustrato durante 7 y 21 días. Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

| <b>Fuente de Variación</b> | <b>Sc</b>                         | <b>Gl</b> | <b>Mc</b> | <b>Fs</b> | <b>P</b> |
|----------------------------|-----------------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|
| <b>Efectos principales</b> |                                   |           |           |           |          |
| Tiempo                     | 804256,0                          | 1         | 804256,0  | 55,83     | 0,0000   |
| Tratamiento                | 54072,5                           | 2         | 27036,3   | 1,88      | 0,1657   |
| <b>Interacciones</b>       |                                   |           |           |           |          |
| Tiempo-Tratamiento         | 432812,0                          | 2         | 216406,0  | 15,02     | 0,0000   |
| Residuos                   | 605016,0                          | 42        | 14405,1   |           |          |
| <b>Total (corregido)</b>   | <b>1,89616x 10<sup>6</sup> 47</b> |           |           |           |          |

Apéndice 15. Contraste múltiple de rango para la actividad específica de acetilcolinesterasa (U de AChE/g.t.h) en el tejido corporal de *Eisenia* spp. controles y expuestas a 300 mg de clorpirifos/kg de sustrato y 400 mg de malation/kg de sustrato durante períodos agudo y crónico. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

| <b>Método<br/>(Tratamiento)</b> | <b>PR</b> | <b>X</b> | <b>DE</b> | <b>GH</b> |
|---------------------------------|-----------|----------|-----------|-----------|
| <b>Control</b>                  | 16        | 279,412  | 101,495   |           |
| <b>Clorpirifos</b>              | 16        | 359,375  | 247,460   |           |
| <b>Malation</b>                 | 16        | 335,937  | 168,490   |           |

Apéndice 16. Contraste múltiple de rango para la actividad específica de acetilcolinesterasa (U de AChE/g.t.h) en el tejido corporal de *Eisenia* spp. expuesta a pesticidas organofosforados durante 7 y 21 días. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

| <b>Método<br/>(Tiempo)</b> | <b>PR</b> | <b>X</b> | <b>DE</b> | <b>GH</b> |
|----------------------------|-----------|----------|-----------|-----------|
| <b>7 días</b>              | 24        | 454,35   | 196,177   |           |
| <b>21 días</b>             | 24        | 195,466  | 94,808    |           |

Apéndice 17. Valores promedios y desviaciones estándar ( $x \pm DE$ ) de los niveles de glutatión reducido (mmoles de GSH/g.t.h) en el tejido corporal de *Eisenia* spp. controles y expuestas a 300 mg de clorpirifos/kg de sustrato y 400 mg de malation/kg de sustrato durante 7 y 21 días.

|                | <b>Control</b> | <b>Clorpirifos</b> | <b>Malation</b> |
|----------------|----------------|--------------------|-----------------|
| <b>7 Días</b>  | 14,627± 0,980  | 18,105±1,403       | 23,667±1,153    |
| <b>14 Días</b> | 14,633±0,771   | 18,877±1,530       | 14,954±1,667    |

Apéndice 18. Análisis de varianza de los niveles de glutatión reducido (mmoles de GSH/g.t.h) en el tejido corporal de *Eisenia* spp. controles y expuestas a 300 mg de clorpirifos/kg de sustrato y 400 mg de malation/kg de sustrato durante 7 y 21 días. Sc: sumas cuadráticas, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

| <b>Fuente de Variación</b> | <b>Sc</b>      | <b>Gl</b> | <b>Mc</b> | <b>Fs</b> | <b>P</b> |
|----------------------------|----------------|-----------|-----------|-----------|----------|
| <b>Efectos principales</b> |                |           |           |           |          |
| Tiempo                     | 83,9618        | 1         | 83,9618   | 50,52     | 0,0000   |
| Tratamiento                | 199,919        | 2         | 99,9596   | 60,15     | 0,0000   |
| <b>Interacciones</b>       |                |           |           |           |          |
| Tiempo-Tratamiento         | 222,136        | 2         | 111,068   | 66,83     | 0,0000   |
| Residuos                   | 69,802         | 42        | 1,66195   |           |          |
| <b>Total (corregido)</b>   | <b>575,819</b> | <b>47</b> |           |           |          |

Apéndice 19. Contraste múltiple de rango para los niveles de glutatión reducido (mmoles de GSH/g.t.h) en el tejido corporal de *Eisenia* spp. controles y expuestas a 300 mg de clorpirifos/kg de sustrato y 400 mg de malation/kg de sustrato y durante períodos agudo y crónico. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

| <b>Método<br/>(Tratamiento)</b> | <b>PR</b> | <b>X</b> | <b>DE</b> | <b>GH</b> |
|---------------------------------|-----------|----------|-----------|-----------|
| <b>Control</b>                  | 16        | 14,63    | 0,852     |           |
| <b>Clorpirifos</b>              | 16        | 18,4909  | 1,473     |           |
| <b>Malation</b>                 | 16        | 19,3105  | 4,708     |           |

Apéndice 20. Contraste múltiple de rango para los niveles de glutatión reducido (mmoles de GSH/g.t.h) en el tejido corporal de *Eisenia* spp. expuesta a pesticidas organofosforados durante 7 y 21 días. PR: porcentaje de recuento, x: media, DE: desviación estándar y GH: grupos homogéneos.

| <b>Método<br/>(Tiempo)</b> | <b>PR</b> | <b>X</b> | <b>DE</b> | <b>GH</b> |
|----------------------------|-----------|----------|-----------|-----------|
| <b>7 días</b>              | 24        | 18,7997  | 3,97      |           |
| <b>21 días</b>             | 24        | 16,1546  | 2,371     |           |

## **HOJA DE METADATOS**

# Hoja de Metadatos

## (1/6)

|                  |  |
|------------------|--|
| <b>Título</b>    | BIOMARCADORES MOLECULARES Y CELULARES EN LA LOMBRIZ DE TIERRA<br><i>Eisenia</i> spp. (Annelida: Oligochaeta) EXPUESTA A LOS PESTICIDAS<br>ORGANOSFOSFORADOS CLORPIRIFOS Y MALATIÓN |
| <b>Subtítulo</b> |  |

### Autor(es)

| Apellidos y Nombres | Código CVLAC / e-mail |                             |
|---------------------|-----------------------|-----------------------------|
| Marcano, Gómez      | <b>CVLAC</b>          | <b>14.670.813</b>           |
|                     | <b>e-mail</b>         | elenamarcano_24@hotmail.com |
|                     | <b>e-mail</b>         |                             |
|                     | <b>CVLAC</b>          |                             |
|                     | <b>e-mail</b>         |                             |
|                     | <b>e-mail</b>         |                             |
|                     | <b>CVLAC</b>          |                             |
|                     | <b>e-mail</b>         |                             |
|                     | <b>e-mail</b>         |                             |
|                     | <b>CVLAC</b>          |                             |
|                     | <b>e-mail</b>         |                             |
|                     | <b>e-mail</b>         |                             |

### Palabras o frases claves:

|  |
|--|
| Lombriz de tierra, <i>Eisenia</i> spp, pesticidas, malation, clorpirifos, biomarcadores. |
|  |
|  |
|  |



# Hoja de Metadatos

## (2/6)

### Líneas y sublíneas de investigación:

| Área     | Subárea                                   |
|----------|---|
| Ciencias | Biología aplicada, Mención Ecotoxicología |

### Resumen (abstract):

Con la finalidad de evaluar los efectos de concentraciones subletales de clorpirifos (300 mg/kg de sustrato) y malation (400 mg/kg de sustrato), se estimaron un grupo de biomarcadores en celomocitos y tejido corporal de *Eisenia* spp., utilizando un sistema de exposición en un sustrato orgánico mezclado con soluciones de los pesticidas por 7 y 21 días. En los celomocitos se cuantificaron el tiempo medio de retención del rojo neutro (TRRN<sub>50</sub>), fragmentación del ADN y concentraciones de malondialdehído (MDA), indicadores respectivos de desestabilización de membranas lisosomales, daño genotóxico y peroxidación de lípidos; mientras que, en tejido corporal se estimó la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) como biomarcador específico de exposición a los organofosforados y el contenido de glutatión reducido (GSH), indicativo del estado antioxidante celular. El tratamiento con ambos pesticidas a los 7 días causó efectos similares en los celomocitos de *Eisenia* spp.; un descenso aproximadamente del 11% en el TRRN<sub>50</sub> y aparición de cometas con predominio de los tipo 1 y 2, sugieren efectos perjudiciales a nivel de la estructura de las membranas lisosomales y en el ADN de estas células. Incrementos en las concentraciones de MDA, al menos en el grupo expuesto a clorpirifos, durante este período indican que la citotoxicidad posiblemente fue mediada por sobreproducción de agentes prooxidantes y estrés oxidativo. En contraste, en ese mismo período la actividad de AChE y niveles de GSH aumentaron en el tejido corporal de los grupos expuestos a ambos pesticidas, evidenciándose con este patrón de respuesta similar a la hormesis, que posiblemente a corto plazo el organismo puede hacer los ajustes bioquímicos necesarios para controlar la toxicidad en ese tejido. A los 21 días de exposición a ambos pesticidas, un mayor descenso en el TRRN<sub>50</sub> (50%), asociado con la formación en gran proporción de cometas tipo 2, 3 y 4 y aparición de cometas tipo 5, coincidente con concentraciones elevadas de MDA evidenciaron que el daño oxidativo fue mayor en esta fase y las lesiones a nivel de membranas y ADN fueron más severas. Consistente con la aseveración anterior, ambos pesticidas afectaron perjudicialmente también la enzima AChE en el tejido corporal del organismo, la cual exhibió un descenso aproximado al 50% en su actividad, indicando estos resultados la presencia de metabolitos bioactivos; producto de la biotransformación de los agroquímicos que interactuaron e interfirieron con la actividad de la enzima. Aún cuando GSH permaneció elevado en el grupo expuesto a clorpirifos por 21 días, al parecer el mecanismo de compensación bioquímico que controla la toxicidad a los 7 días de exposición deja de ser funcional a largo plazo. En general, los biomarcadores evaluados en celomocitos y tejido corporal de *Eisenia* spp. exhibieron cambios marcados en respuesta al tratamiento agudo y crónico con clorpirifos y malation, revelándose su alta sensibilidad en la detección de efectos perjudiciales a concentraciones subletales de ambos agroquímicos y su potencial para ser usados en los estudios de evaluación y detección temprana de riesgos de contaminación por pesticidas organofosforados en los ecosistemas terrestres.

# Hoja de Metadatos

## (3/6)

**Contribuidores:**

| Apellidos y Nombres | ROL / Código CVLAC / e-mail |  |
|---------------------|-----------------------------|--|
| Marcano, Leida      | <b>ROL</b>                  | CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/> |
|                     | <b>CVLAC</b>                | 8.219.437  |
|                     | <b>e-mail</b>               | Leimar0501@gmail.com   |
|                     | <b>e-mail</b>               |  |
| Alfonsi, Carmen     | <b>ROL</b>                  | CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/> |
|                     | <b>CVLAC</b>                | 5880562  |
|                     | <b>e-mail</b>               | calfonsir@hotmail.com  |
|                     | <b>e-mail</b>               |  |
| Fariñas, Milagros   | <b>ROL</b>                  | CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/> |
|                     | <b>CVLAC</b>                | 8.440.052  |
|                     | <b>e-mail</b>               | Milyfari2006@gmail.com   |
|                     | <b>e-mail</b>               |  |
|                     | <b>ROL</b>                  | CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>            |
|                     | <b>CVLAC</b>                |  |
|                     | <b>e-mail</b>               |  |
|                     | <b>e-mail</b>               |  |

**Fecha de discusión y aprobación:**

| Año  | Mes | Día |
|------|-----|-----|
| 2012 | 03  | 16  |

**Lenguaje:** SPA

# Hoja de Metadatos

## (4/6)

**Archivo(s):**

| Nombre de archivo                    | Tipo MIME       |
|--------------------------------------|-----------------|
| (2012-03)-Elena_Marcano-[00.006].pdf | application/pdf |
|                                      |                 |
|                                      |                 |
|                                      |                 |
|                                      |                 |
|                                      |                 |

**Alcance:**

**Espacial:** Internacional

**Temporal:** Intemporal

**Título o Grado asociado con el trabajo:**

MAGISTER SCIENTIARUM EN BIOLOGÍA APLICADA, MENCIÓN ECOTOXICOLOGÍA

**Nivel Asociado con el Trabajo:** MAGISTER SCIENTIARUM

**Área de Estudio:** Biología Aplicada

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

UNIVERSIDAD DE ORIENTE

# Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
CONSEJO UNIVERSITARIO  
RECTORADO

CUN°0975

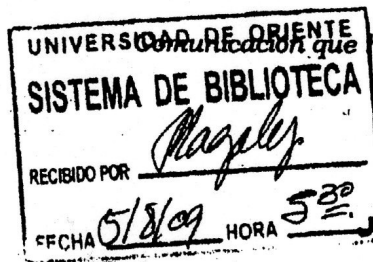
Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano  
**Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ**  
Vicerrector Académico  
Universidad de Oriente  
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.



Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

**JUAN A. BOLANOS CUNPEL**  
Secretario



C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

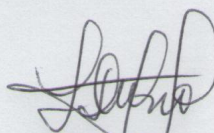
JABC/YGC/manuja

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso- 6/6

**Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009) :** “los Trabajos de Grado son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y sólo podrán ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Consejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario para su autorización”.



**Autor**



**Asesor**