



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

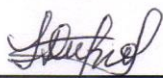
EFFECTOS DEL COBRE, EL GLIFOSATO Y SU INTERACCIÓN SOBRE  
BIOMARCADORES MOLECULARES EN LA LOMBRIZ DE TIERRA *Eisenia  
andrei* (Annelida: Oligochaeta)  
(Modalidad: Tesis de Grado)

LOREANNY DEL CARMEN SALAZAR CARIACO

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

EFFECTOS DEL COBRE, EL GLIFOSATO Y SU INTERACCIÓN SOBRE  
BIOMARCADORES MOLECULARES EN LA LOMBRIZ DE TIERRA *Eisenia  
andrei* (Annelida: Oligochaeta)

APROBADO POR:



---

Profa. Leida Marcano  
Asesora



---

Prof. Carmen Martins  
Jurado



---

Prof. Yanet Antón  
Jurado

## ÍNDICE

DEDICATORIA .....	I
AGRADECIMIENTOS .....	II
LISTA DE FIGURAS .....	III
RESUMEN .....	IV
INTRODUCCIÓN .....	1
METODOLOGÍA .....	6
Obtención y acondicionamiento de las lombrices .....	6
Bioensayo de toxicidad subletal .....	7
Biomarcadores fisiológicos .....	8
Lactato deshidrogenasa (LDH: EC 1. 1. 1. 27) .....	8
Proteínas totales (PT) .....	8
Biomarcadores del sistema antioxidante .....	9
Catalasa (CAT: EC 1. 11. 1.6) .....	9
Tioles totales (-SH) .....	10
Biomarcador de estrés oxidativo .....	11
Peroxidación de lípidos .....	11
Análisis estadísticos .....	11
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	13
Biomarcadores fisiológicos .....	13
Lactato deshidrogenasa (LDH) .....	13
Proteínas totales (PT) .....	14
Biomarcadores del sistema antioxidante .....	15
Catalasa (CAT) .....	15
Tioles totales (-SH) .....	17
Biomarcador de estrés oxidativo .....	18
Peroxidación de lípidos (MDA) .....	18
Biomarcadores fisiológicos: LDH y PT .....	20
Biomarcadores de defensas antioxidante: CAT y -SH .....	24
Biomarcador de daño oxidativo: MDA .....	27
CONCLUSIONES .....	30

RECOMENDACIONES.....	31
BIBLIOGRAFÍA .....	32
APÉNDICES .....	41
HOJAS DE METADATOS .....	51

## DEDICATORIA

Dedico este trabajo de investigación a **Dios** principalmente, por las bendiciones y la oportunidad de llegar a este momento tan importante de mi profesión.

A mis padres **Lorena Cariaco** y **Pedro Salazar**, por ser el pilar fundamental en mi vida, quienes me formaron con buenos valores y me ayudaron a salir adelante.

A mis hermanos **Katerine Salazar** y **Pedro Salazar**, por todo su apoyo. En especial a ella, por aconsejarme y ser ejemplo de superación y valentía.

A mi abuelita **Beda Cariaco**, por ser como una madre y siempre estar dispuesta a escucharme y ayudarme en cualquier momento.

A mis tíos **Fernando** y **Mayra Cariaco**, por su apoyo incondicional y sus buenos deseos.

A mis amigos **Laura y Rosa Arcila**, **Anthony Cotua** y **Marines González**, por sus constantes motivaciones, consejos y apoyo para que esta meta sea cumplida.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a **Dios todo poderoso** por la fortaleza y valor concedido para culminar esta etapa de mi vida.

A mis padres **Lorena Cariaco** y **Pedro Salazar**, por ser ejemplo vivo de persistencia y perseverancia que me ha permitido ver materializada esta meta.

A mi hermana **Katerine Salazar** por estar siempre presente, por sus consejos, apoyo y tolerancia me han permitido salir adelante en momentos difíciles.

A las profesoras **Elena Marcano** y **Patricia Velázquez**, por la guía académica, la motivación y la gran ayuda en el desarrollo de esta investigación.

A mi tutora, la profesora **Leida Marcano**, por aceptar dirigir esta tesis, compartir sus conocimientos académicos y brindarme su disposición para el desarrollo del presente trabajo.

Al profesor **José Imery**, por su apoyo para que se llevara a cabo el desarrollo experimental de mi trabajo de grado, sus consejos y pasión a la hora de impartir conocimientos.

A mi casa de estudio, la **UNIVERSIDAD DE ORIENTE** por darme la oportunidad de formarme y superarme no solo en el ámbito académico, sino también, en el ámbito personal.

A mi amiga **Laura Arcila**, por su apoyo incondicional, consejos, motivación en momentos difíciles, por hacerme ver las cosas de manera diferentes y por ayudarme a ser mejor persona.

Agradezco profundamente a mi amiga **Rosa Arcila**, por su amistad, apoyo, conocimientos académicos, dedicación, consejos, motivación y por ser clave en la culminación de mi trabajo de grado.

Y finalmente gracias a todas aquellas personas que de alguna u otra manera, formaron parte de este sueño. **MIL GRACIAS A TODOS...**

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Ubicación de la estación experimental de Biotecnologías Agrícolas (recuadro blanco) de donde proceden los ejemplares de *E. andrei*..... 6
- Figura 2. Actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) (U/g.m.h), en el tegumento de la región anterior (A) y posterior (B) de *E. andrei* controles y expuestas por 7 y 28 días a cobre (Cu1= 1,5 g de cobre/kg de sustrato; Cu2= 3 g de cobre/kg de sustrato), glifosato (GFS1= 0,9 g de glifosato/kg de sustrato; GFS2= 1,8 g de glifosato/kg de sustrato) y las mezclas de ambos (Mez1= Cu2+GFS1; Mez2= Cu1+GFS2)..... 14
- Figura 3. Concentración de proteínas totales (mg/g.m.h.), en el tegumento de la región anterior (A) y posterior (B) de *E. andrei* controles y expuestas por 7 y 28 días a cobre (Cu1= 1,5 g de cobre/kg de sustrato; Cu2= 3 g de cobre/kg de sustrato), glifosato (GFS1= 0,9 g de glifosato/kg de sustrato; GFS2= 1,8 g de glifosato/kg de sustrato) y las mezclas de ambos (Mez1= Cu2+GFS1; Mez2= Cu1+GFS2).. 15
- Figura 4. Actividad enzimática de la Catalasa (U/g.m.h.), en el tegumento de la región anterior (A) y posterior (B) de *E. andrei* controles y expuestas por 7 y 28 días a cobre (Cu1= 1,5 g de cobre/kg de sustrato; Cu2= 3 g de cobre/kg de sustrato), glifosato (GFS1= 0,9 g de glifosato/kg de sustrato; GFS2= 1,8 g de glifosato/kg de sustrato) y las mezclas de ambos (Mez1= Cu2+GFS1; Mez2= Cu1+GFS2).. 17
- Figura 5. Contenido de grupos tioles totales (mmol/L), en el tegumento de la región anterior (A) y posterior (B) de *E. andrei* controles y expuestas por 7 y 28 días a cobre (Cu1= 1,5 g de cobre/kg de sustrato; Cu2= 3 g de cobre/kg de sustrato), glifosato (GFS1= 0,9 g de glifosato/kg de sustrato; GFS2= 1,8 g de glifosato/kg de sustrato) y las mezclas de ambos (Mez1= Cu2+GFS1; Mez2= Cu1+GFS2).. 18
- Figura 6. Niveles de malondialdehído (MDA) (nmoles de MDA/g.m.h.), en el tegumento de la región anterior (A) y posterior (B) de *E. andrei* controles y expuestas por 7 y 28 días a cobre (Cu1= 1,5 g de cobre/kg de sustrato; Cu2= 3 g de cobre/kg de sustrato), glifosato (GFS1= 0,9 g de glifosato/kg de sustrato; GFS2= 1,8 g de glifosato/kg de sustrato) y las mezclas de ambos (Mez1= Cu2+GFS1; Mez2= Cu1+GFS2)..... 19

## RESUMEN

En este estudio se evaluaron los efectos agudos (7 días) y crónicos (28 días) del cobre, glifosato y sus mezclas sobre biomarcadores moleculares en la región anterior y posterior de *Eisenia andrei*. Se utilizaron lombrices de tierra cliteladas y se distribuyeron en seis grupos, cada uno conformado por ocho réplicas, contenidos en 200 g de sustrato mezclado con los tratamientos experimentales (dos concentraciones de cobre, dos de glifosato a diferentes concentraciones y dos soluciones de mezcla alternando dosis baja y alta de ambos compuestos), y con agua destilada para el tratamiento control. Para cada tratamiento, se contaminaron aleatoriamente 10 lombrices adultas de peso similar en cada recipiente plástico. El experimento duró 28 días y cada dos semanas se cambió el medio de cultivo para reemplazar los contaminantes y los micronutrientes. Por cada tratamiento experimental, transcurridos los 7 y 28 días de exposición se tomaron al azar cinco lombrices para la determinación de los parámetros fisiológicos (lactato deshidrogenasa; LDH y proteínas totales; PT), las defensas antioxidantes (catalasa y tioles totales) y daño oxidativo (concentración de malondialdehído; MDA). Los resultados muestran que la actividad de LDH aumentó significativamente en los organismos sujetos a los distintos tratamientos en cada región; en esta variable se encontraron diferencias entre las dos regiones corporales y entre los tiempos de exposición para cada región. Las PT sólo de la región posterior fueron afectadas por los tratamientos; el tiempo de exposición afectó esta variable en las dos regiones y entre cada región también variaron las PT. La actividad de la enzima CAT fue afectada por todos los tratamientos químicos en ambas regiones, tales efectos fueron diferentes entre las regiones y el tiempo de exposición sólo afectó la actividad de CAT en la región posterior. Se observaron incrementos significativos de MDA en ambas regiones corporales de *E. andrei*, principalmente a los 28 días. Los diferentes tratamientos ejercieron un efecto significativo sobre los niveles de MDA en las dos regiones. Tales efectos fueron diferentes entre los tiempos de exposición tanto para región anterior como para la región posterior, sin embargo, no existieron diferencias significativas entre regiones para esta variable. En general, los incrementos en los biomarcadores fisiológicos (LDH y PT) y de defensas antioxidantes (CAT) principalmente en la región posterior de *E. andrei* durante el periodo de exposición crónico (28 días) no fueron suficientes para evitar el desarrollo de estrés oxidativo, tal como lo evidencia el incremento de MDA en ambas regiones para ese periodo. Las diferencias encontradas entre los BMs en ambas regiones corporales sugiere una distribución estratégica de las moléculas que conforman las defensas antioxidantes para regular los inductores de daños oxidativos, preservando las estructuras reproductivas en la región anterior y activando preferiblemente en la región posterior los mecanismos necesarios para bioacumular, destoxificar y facilitar la eliminación de los xenobióticos.

Palabras clave: *E. andrei*, cobre, glifosato, defensas antioxidantes, estrés oxidativo.



## INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas terrestres representan un recurso esencial del ambiente, que puede verse afectado por el desarrollo de la industrialización y la continua descarga de sustancias químicas, sintéticas y naturales que ésta genera (Rendón-von y Dzul-Caamal, 2017). Actualmente, la actividad agrícola, para el cuidado de sus cultivos, demanda un

mayor uso de pesticidas y fertilizantes que pueden estar asociados a impactos en la calidad de alimentos y del suelo (Koch y Sures, 2018). Estos agroquímicos cuando se encuentran en concentraciones elevadas o interactúan con otros elementos disponibles en el sustrato, como metales pesados por ejemplo, pueden alterar las propiedades físico-químicas y biológicas del suelo, llegando a afectar desde las actividades microbianas que en él se desarrollan, hasta las plantas y animales que viven dentro o sobre él (Essien y John, 2010; Pohanka, 2019).

Los suelos están formados por una gran variedad de elementos ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ ), esenciales en los procesos biológicos, convirtiéndose frecuentemente en contaminantes por la actividad del hombre. Particularmente el cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ), es un metal esencial para el crecimiento y desarrollo de plantas, animales y otros organismos que puede tornarse perjudicial cuando se encuentra en elevadas concentraciones (Pohanka, 2019). Su toxicidad se asocia a su alta permanencia en el ambiente, su rápida acumulación por organismos vivos y las asociaciones complejas que pueden formar con la materia orgánica, arcillas o con aniones  $\text{CO}_3^{2-}$  y  $\text{S}^{2-}$  (Plant *et al.*, 2001; Taiz *et al.*, 2017). Este metal ingresa al suelo principalmente por el uso de fungicidas a base de  $\text{Cu}^{2+}$  y el estiércol proveniente de explotaciones ganaderas, empleados como promotores de crecimiento en cultivos (Gao *et al.*, 2016; Santana *et al.*, 2019).

El herbicida glifosato (N-[fosfonometil] glicina), un ácido orgánico débil soluble en agua, compuesto de una fracción de glicina y un radical aminofosfato (Van Bruggen *et al.*, 2018), es uno de los agroquímicos ampliamente usado para el control de malezas, debido a su acción enzimática específica y exclusiva sobre éstas, inhibiendo la ruta de síntesis de ciertos aminoácidos y proteínas, impidiendo así su crecimiento (Kwiatkowska

*et al.*, 2014; Mesnage *et al.*, 2021). Debido a ello, este herbicida se ha clasificado como un producto de baja toxicidad para animales (US EPA, 1993; Kniss, 2017).

Gimsing *et al.* (2004) clasifican al glifosato como un producto de rápida biodegradación e indica que su bioacumulación y toxicidad dependerá de su biodisponibilidad en el medio, la cual puede disminuir cuando el herbicida interactúa con iones metálicos y forman complejos químicos estables, descendiendo así la absorción y riesgo de toxicidad en los organismos (Defarge *et al.*, 2018). A pesar de la importancia de los estudios sobre la toxicidad exhibida por la de mezclas de contaminantes. Son pocos los autores que señalan que puede ocurrir interacción entre estos químicos, modificando así su potencial de toxicidad (Zhou *et al.*, 2013). En este sentido, Wang *et al.* (2009) señalan que la toxicidad de los metales pesados se ve disminuido por la interacción con el glifosato y sus grupos funcionales, disminuyendo el potencial tóxico de ambos cuando se aplican conjuntamente en los suelos. Sierra *et al.* (2008) indicaron que la formación de un complejo orgánico entre el glifosato y cobre, disminuye la solubilidad y por ende, el potencial de absorción por los organismos.

La acumulación en organismos de sustancias potencialmente contaminantes; entre ellas pesticidas y metales pesados, eleva los niveles de especies reactivas del oxígeno (EROs), causa estrés oxidativo y eventualmente induce toxicidad y carcinogenicidad (Baba y Bhatnagar, 2018; Wallace y Djordjevic, 2020). Sin embargo, los sistemas vivos desarrollan sistemas de destoxificación y antioxidantes que le permiten mantener las concentraciones fisiológicas de los oxiradicales y tolerar ciertos niveles de los contaminantes presentes en el suelo (Salvio *et al.*, 2016; Yashin *et al.*, 2017; Zapata-Vívenes y Aparicio, 2019). El anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), una de las EROs generadas por la acumulación y biotransformación de contaminantes, es metabolizado por la enzima superóxido dismutasa (SOD); reacción ésta que resulta en la producción de  $H_2O_2$  que, aunque no es un radical libre puede generar una de los oxiradicales más tóxicos; el radical hidroxilo ( $\bullet OH$ ). Las enzimas glutatona peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT) son las encargadas de transformar el  $H_2O_2$  en productos inocuos para la célula (Deherly *et al.*, 2010).

Moléculas de baja masa molecular que actúan como defensas antioxidantes no

enzimáticas contra el estrés oxidativo (EO) incluyen a la tiorredoxina, al ácido lipoico, ascorbato, carotenoides, flavonoides, vitamina E y el tripéptido glutatión en su forma reducida (GSH) (Wang y Cui, 2016; Chowdhury y Saikia, 2020). Este último, es uno de los tioles más abundantes de las células que constituye una de las primeras líneas de defensa contra la citotoxicidad producida por contaminantes orgánicos e inorgánicos debido, a su participación en diversos procesos de detoxificación mediante la eliminación de EROs, actuando como sustrato de las enzimas glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión-transferasa (GST), ejerciendo así, un efecto protector contra la lipoperoxidación de membrana celulares y de organelos (Stephensen *et al.*, 2002; Zapata-Vívenes y Aparicio, 2019). Su importancia en procesos de detoxificación de metales pesados también ha sido documentada y viene dada por la gran afinidad que estos muestran por los grupos sulfhidrilos (-SH) de los residuos de cisteína del tripéptido, con los que forman complejos estables GSH-metal, facilitando así su detoxificación y excreción (Barbosa *et al.*, 2010; Baba y Bhatnagar, 2018).

Ante el creciente deterioro del ambiente, se ha impulsado el desarrollo de programas de monitoreo orientados hacia la protección de los recursos bióticos y los ecosistemas en general (Filser *et al.*, 2008; Rendón-von y Dzul-Caamal, 2017). Dentro de este contexto, son muchos los estudios ecotoxicológicos que actualmente, combinan análisis cuantitativos de los contaminantes en el ambiente con la evaluación de efectos en los organismos, mediante el uso de biomarcadores (BMs); éstos incluyen cualquier respuesta frente a la exposición a un químico (o mezcla de ellos), medible a distintos niveles de organización biológica que da una medida de la exposición y, en ciertos casos, de los efectos que producen dichas sustancias (Depledge *et al.*, 1995; Castillo, 2004; Barbosa *et al.*, 2010; Niva *et al.*, 2016). El empleo de BMs surge como un nuevo enfoque complementario al empleado tradicionalmente en los programas de monitoreo ambiental, entre otras razones porque en el análisis tradicional se excluyen aspectos fundamentales como: los efectos que generan estas sustancias sobre el componente biótico, efectos interactivos (sinergismo y antagonismo) entre los químicos y su biodisponibilidad (Schettino *et al.*, 2012).

A pesar de que los estudios sobre BMs a nivel de poblaciones y comunidades son

de mayor relevancia desde el punto ecotoxicológico, la mayoría de este tipo de estudios se llevan a cabo en individuos y, los marcadores moleculares o bioquímicos son los más utilizados, por su carácter predictivo y su utilidad como señales de alerta temprana en la evaluación de riesgos de impacto ambiental en los ecosistemas causado por la contaminación química (Pernía *et al.*, 2008; Fontanetti *et al.*, 2011; Fernández, 2016). Cambios en marcadores inmunológicos, receptores proteicos, moléculas y enzimas con función antioxidante, concentración de moléculas y de enzimas claves del metabolismo son, entre otros, algunos de los BMs cuantificados en modelos biológicos apropiados y representativos de un medio en particular (Calisi *et al.*, 2011; Uwizeyimana *et al.*, 2017). De gran importancia resulta la cuantificación de los niveles de la concentraciones de malondialdehído (MDA) como biomarcador específico de efecto, asociado con daños oxidativos a nivel de los lípidos de membranas celulares (Sheng *et al.*, 2021).

Las lombrices de tierra se consideran buenos biomonitores del estado de salud del suelo; entre otras razones por su hábitat y hábitos alimenticios que las mantiene en contacto directo con el sustrato, del cual pueden captar los distintos contaminantes que continuamente son vertidos en él. Adicionalmente, constituyen un grupo muy abundante dentro de los macroinvertebrados terrestres y ocupan una posición clave en la cadena trófica que propicia el proceso de biomagnificación de contaminantes en el ambiente (Marcano *et al.*, 2013; Hernández *et al.*, 2016; Marcano *et al.*, 2017; Das *et al.*, 2018; Mincarelli *et al.*, 2019; Owagboriayea *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2022).

Son muchos los estudios en lombrices de tierra que han empleado distintos BMs para evaluar la acción individual de contaminantes orgánicos e inorgánicos. En este sentido, se halló que la exposición de *E. andrei* al cobre resultó en una inactivación de la enzima LDH (Andersson *et al.*, 2000) y en incrementos de enzimas antioxidantes asociadas con aumentos en la peroxidación de lípidos de membranas (Ferreira, 2015). En la misma especie, Mincarelli *et al.* (2019) evidenciaron que el cobre estimuló la síntesis de metalotioninas y produjo daños al ADN. En *Eisenia* sp, el cadmio afectó el crecimiento y la reproducción (Polo *et al.*, 2011), mientras que el herbicida glifosato provocó incrementos en GPx y GSH, asociados con aumentos en los niveles MDA (Marcano *et al.*, 2017) y los pesticidas malation y clorpirifos produjeron

inmunotoxicidad (Cortés *et al.*, 2015) y genotoxicidad en celomocitos (Marcano *et al.*, 2013). Todos los estudios anteriores han sido de mucha utilidad para inferir sobre los mecanismos de acción por separado de cada contaminante, sin embargo, bajo condiciones naturales, los organismos se encuentran expuestos a mezclas de dos o más contaminantes y la toxicidad en este escenario puede variar significativamente (Zhou *et al.*, 2013; Holzinger *et al.*, 2022), razón por la cual se hace necesario ampliar las pocas investigaciones en este sentido en lombrices de tierra. En el presente estudio se planteó como objetivo: evaluar los efectos del cobre, el herbicida glifosato y la interacción de ambos sobre distintos BMs en la región anterior y posterior de *E. andrei*; especie que presenta diferentes respuestas fisiológicas a lo largo de su cuerpo que le permiten modular los ajustes bioquímicos necesarios para facilitar la tolerancia y protección contra la toxicidad de sustancias químicas (Zhou *et al.*, 2013; Hernández *et al.*, 2016).

## METODOLOGÍA

### Obtención y acondicionamiento de las lombrices

Las lombrices de tierra de la especie *E. andrei* se obtuvieron de la Estación Experimental de Biotecnologías Agrícolas, adscrita al Laboratorio de Genética, Departamento de Biología, Universidad de Oriente, ubicada en un bosque seco tropical de la ciudad de Cumaná, estado Sucre, a 10°26'32" N y 64°09'14" O, 12 m s.n.m. y temperatura diaria ambiental entre 24,3-32,7°C. Los animales se mantuvieron en su sustrato original (compost), compuesto de materiales orgánicos: 65% v/v de bagazo de caña de azúcar seco y triturado, 15% v/v de gallinaza seca y pulverizada, 15% v/v de hojas frescas de *Moringa oleífera* y 5% v/v de suspensión de microorganismos eficientes. Las lombrices se mantuvieron durante dos semanas en la oficina N° 401 ubicada en el cuarto piso del edificio de Ciencias, de la Universidad de Oriente, en cestas plásticas con capacidad de 40 kg, bajo condiciones controladas: pH del sustrato  $7,4 \pm 0,2$ , temperatura en  $30 \pm 2$  °C y la humedad relativa en  $35 \pm$ . Posterior a este período, se seleccionaron organismos de masa promedio igual  $0,5 \pm 0,2$  g con el clitelo bien desarrollado como señal de madurez reproductiva para los bioensayos de exposición.



Figura 1. Ubicación de la estación experimental de Biotecnologías Agrícolas (recuadro blanco) de donde proceden los ejemplares de *E. andrei*. Imagen satelital captada a través del programa Google Earth Pro.

## **Bioensayo de toxicidad subletal**

Como fase inicial de esta investigación, se realizó la exposición de las lombrices de tierra por 28 días a concentraciones subletales del cobre, al herbicida glifosato y de ambos compuestos incorporados juntos, a fin de evaluar posteriormente los efectos sobre biomarcadores moleculares en la lombriz de tierra *E. andrei*. Para ello, en recipientes plásticos de 340 cm<sup>3</sup> de capacidad, se colocaron 200 g del sustrato orgánico con las características anteriormente descritas, se añadieron 60 mL de las soluciones del metal, del agroquímico y de las combinaciones de ambos y se procedió a revolver para facilitar su distribución homogénea en el sustrato. Se probaron dos concentraciones de cobre, dos de glifosato preparadas a partir del herbicida Glifomax y dos soluciones compuestas por la unión de las dosis del metal y del herbicida. Estas concentraciones subletales que garantizaron el 100% de supervivencia de las lombrices durante la exposición, se seleccionaron a partir de concentraciones letales media (CL<sub>50</sub>) del metal y el herbicida, determinados a partir de bioensayos de toxicidad letales realizados con anterioridad (CL<sub>50</sub>: 8,71 g de cobre/kg de sustrato y 5,21 g de sustrato de glifosato/kg de sustrato). Un total de 560 lombrices de tierra se distribuyeron en seis grupos; cada uno conformado por ocho réplicas de 10 lombrices cada una. Dos grupos de anélidos se expusieron a 1,5 y 3,0 g de cobre/kg de sustrato, referidos como Cu1 y Cu2, dos grupos se trataron con 0,9 y 1,8 g de glifosato/kg de sustrato, designados como GFS1 y GFS2, respectivamente y, finalmente, dos grupos de anélidos se sometieron a las mezclas de 3 g de cobre/kg de sustrato con 0,9 g de glifosato/kg de sustrato y 1,5 g de cobre/kg de sustrato con 1,8 g de glifosato/kg de sustrato, estas últimas consideradas como Mez1 y Mez2. Un grupo adicional de 80 lombrices colocadas en recipientes con sustrato humedecido con agua fueron utilizadas como control.

Durante todo el bioensayo, se realizaron registros diarios de la humedad y el pH del sustrato, de la temperatura de la sala así como de la sobrevivencia de los organismos controles y expuestos, considerándose como muertos aquellos que no presentaron ninguna respuesta sostenida a la estimulación mecánica. Con la finalidad de garantizar el suministro apropiado de nutrientes y mantener constantes las concentraciones del metal y del herbicida en el sustrato, cada dos semanas se realizaron recambios del sustrato de

los grupos tratados y controles. Transcurridos los 7 y 28 días se tomaron al azar de cada envase plástico cinco lombrices que fueron empleados en la determinación de los biomarcadores.

### **Biomarcadores fisiológicos**

Para la cuantificación de los biomarcadores moleculares, las lombrices de tierra de cada tratamiento experimental se lavaron por separado en solución fisiológica 0,85% a 4°C. Se colocaron posteriormente en planchas de hielo para adormecerlas, se les extrajo el tracto digestivo por presión sobre el tegumento de la región ventral haciendo uso de pinzas de disección, se lavaron nuevamente en solución fisiológica y se dividieron en regiones anterior y posterior picando con tijeras en tamaños iguales.

#### Lactato deshidrogenasa (LDH: EC 1. 1. 1. 27)

La actividad de la lactato deshidrogenasa se evaluó siguiendo el protocolo de Nusetti *et al.* (2015) por espectrofotometría, midiendo la velocidad de la reacción de oxidación de la coenzima NADH a 340 nm, a una concentración saturante del sustrato durante un minuto (coeficiente de extinción:  $6,22 \times 10^3$  mol/L/cm). Para ello, de cada una de las lombrices de tierra sujetas a los diferentes tratamientos experimentales, se tomó por separado el tejido de la región anterior y posterior y se homogeneizó en buffer fosfato de potasio 50 mmol/L pH 7,0 a 4°C. Seguidamente, los extractos se transfirieron a tubos eppendorf y se centrifugaron a 3 500 g por 10 minutos. Los sobrenadantes obtenidos se emplearon para la cuantificación de la actividad de la enzima en una mezcla de reacción (1 mL) contentiva de 830 µL de buffer fosfato de potasio 50 mmol/L pH 7,0, 20 µL de NADH, 50 µL del extracto enzimático y 100 µL del sustrato piruvato. La actividad se expresó en unidades por gramo de masa húmeda (U/g.m.h), siendo una U de LDH los µmoles de NADH oxidados a NAD<sup>+</sup> en un minuto.

#### Proteínas totales (PT)

La cuantificación de proteínas se realizó mediante métodos colorimétricos,



siguiendo el protocolo de Lowry *et al.* (1951). El tegumento de la región anterior y posterior de las *E. andrei* se homogenizó en una proporción 1:9 m/v en una solución de buffer fosfato de potasio 50 mmol/L pH 7,5 a 4°C. Posteriormente, el homogenizado se centrifugó a 3 000 x g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante se utilizó como fuente de proteínas. La concentración de proteínas totales se estimó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 540 nm en una mezcla de reacción de un volumen final de 1 mL, constituida por 50 µL del sobrenadante de las muestras, 50 µL de agua, 800 µL del reactivo R<sub>1</sub> (reactivo de Biuret) y 100 µL del reactivo R<sub>2</sub> (reactivo de Folin-Ciocalteu). Para la cuantificación de PT se utilizó una curva de calibración preparada con albúmina de suero bovino como estándar (ASB: 10 mg/mL Sigma 9048-46-8). Los resultados se expresaron en mg de proteínas por gramo de masa húmeda (mg de proteínas/ g.m.h).

### **Biomarcadores del sistema antioxidante**

#### Catalasa (CAT: EC 1. 11. 1.6)

La estimación de la actividad enzimática de la catalasa en el tejido de la región anterior y posterior de lombriz de tierra *E. andrei* se realizó usando el protocolo de Claiborne (1984), con algunos ajustes en la concentración del sustrato y el volumen del extracto enzimático. Para la preparación del extracto enzimático, se realizaron homogeneizados de la masa tisular (1:9 m/v) en una solución tampón de Tris-HCl 20 mmol/L, pH 7,6 a 4°C, contentiva de EDTA-Na<sub>2</sub> 1 mmol/L, sucrosa 0,5 mol/L y KCl 0,15 mol/L, utilizando un homogeneizador manual Polter-Elvehjem. Justo antes de homogeneizar, se agregaron 10 µL de ácido fenil-metil-sulfónico (PMSF) 10 mmol/L (preparado en alcohol isopropílico). El homogeneizado se centrifugó inicialmente en una centrífuga refrigerada Hermle Z-360 K a 1 100 x g por 10 minutos a 4°C y posteriormente a 2 200 x g por 20 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante se utilizó para determinar la actividad de la enzima, para lo cual se empleó un espectrofotómetro de UV-VIS Helios g modelo 1.0, bajo condiciones de temperatura controlada a 25 ± 1°C, siguiendo el descenso a 240 nm en la concentración del sustrato H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (coeficiente

de extinción: 40 mmol/L/cm) en una mezcla de reacción (1 140  $\mu$ L) contentiva de 980  $\mu$ L de buffer fosfato de potasio 50 mmol/L pH 7,2, 30  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 mmol/L y 30  $\mu$ L de la muestra. Los resultados se expresaron en unidades enzimáticas por gramo de masa húmeda (U/g.m.h), siendo una unidad (U) de CAT equivalente a los  $\mu$ moles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> transformados en sus productos en un minuto.

#### Tioles totales (-SH)

La concentración de tioles totales se determinó siguiendo el protocolo de Ellman *et al.* (1961), en el cual el reactivo 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) reacciona con los grupos sulfidrilos (-SH) libres y asociados a proteínas formando un producto coloreado, el anión 2-nitro-5-benzoato, que absorbe luz a 412 nm. Para ello se tomó, tanto de la región anterior como de la posterior de cada lombriz de tierra, 0,1 g de tejido y se homogenizó en una proporción 1:9 m/v con 900  $\mu$ L de buffer Tris EDTA pH 8.9 a 4°C. Seguidamente se centrifugaron las muestras a 3 500 x g durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se utilizó como fuente de grupos -SH. Su cuantificación se llevó a cabo preparando una mezcla de reacción en la celda de experimentación contentiva inicialmente de 38  $\mu$ L de la muestra, 144  $\mu$ L de buffer Tris EDTA, 770  $\mu$ L de metanol. Se inició la reacción añadiendo a la mezcla 48  $\mu$ L de DTNB (preparado disolviendo 29,7 g en 25 mL de metanol). Las preparaciones se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos, se centrifugaron a 3 000 x g por 5 minutos y finalmente se realizaron las lecturas de absorbancias en un espectrofotómetro UV/VIS a una longitud de onda de 412 nm. Se preparó una celda “blanco” con todos los reactivos excepto la muestra. Las concentraciones de tioles totales se calcularon mediante el empleo de una curva de calibración preparada con glutatión reducido (GSH) a una concentración 3 mmol/L como estándar. Las concentraciones de tioles totales se expresaron en  $\mu$ moles de -SH por gramos de masa húmeda ( $\mu$ moles de -SH/g.m.h).

## **Biomarcador de estrés oxidativo**

### **Peroxidación de lípidos**

La peroxidación de lípidos se estimó por el método de análisis de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS), el cual se fundamenta en la cuantificación colorimétrica de uno de los principales productos de la peroxidación de lípidos, el malondialdehído (MDA), siguiendo el protocolo estandarizado por Livingstone (2001). Para ello, 0,1 g de tejido de las regiones anterior y posterior de *E. andrei* se homogenizaron, cada una, en 2 mL de buffer fosfato de potasio 100 mmol/L pH 7,5, se centrifugaron a 3 500 x g por 15 minutos a 4°C. Separado el precipitado del sobrenadante, se tomó de éste último una alícuota de 250 µL y se completó a un volumen de 1 mL la mezcla de reacción con 250 µL de Stop Mix (ácido tricloroacético 12,5 % y ácido clorhídrico 1 mol/L) y 500 µL de ácido tiobarbitúrico (1%). La mezcla se colocó a baño de María a 100°C con agitación constante durante 40 minutos. Se dejó enfriar la preparación a temperatura ambiente, luego se centrifugó a 3 000 x g por 10 minutos a 4°C y se procedió a realizar la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro UV/VIS a 532 nm. La celda “blanco” estuvo constituida por todos los reactivos a excepción del extracto. Las concentraciones de TBARS se calcularon usando un coeficiente de extinción de  $1,56 \times 10^{-5}$  mmol/L/cm. Los resultados se expresaron en nmol de MDA por gramo de masa húmeda (nmol de MDA/ g.m.h).

### **Análisis estadísticos**

Una vez comprobado el cumplimiento de los supuestos de normalidad de datos y homogeneidad de varianzas, se determinaron, mediante ANOVA y T-Student si existían diferencias significativas en las respuestas bioquímicas que se evaluaron en la lombriz de tierra *E. andrei* expuesta a dos concentraciones subletales de cobre, glifosato y a las combinaciones de cobre con glifosato durante diferentes períodos de exposición. De encontrarse diferencias significativas estas serán estimadas mediante la prueba de contraste de rangos múltiples de Duncan al 95%. Aquellos datos que no cumplieron con los supuestos fueron analizados a través de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y

Mann-Whitney (Sokal y Rohlf, 1969). Los análisis se realizaron utilizando el paquete estadístico Statgraphic versión 5.1 en ambiente Windows y los resultados se expresaron con medias y desviación estándar en tablas y gráficos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Biomarcadores fisiológicos

#### Lactato deshidrogenasa (LDH)

La Figura 2 muestra la actividad de la enzima LDH en ambas regiones del tegumento corporal de *E. andrei* sujeta a los distintos tratamientos a los 7 y 28 días de exposición. Los resultados de la región anterior se muestran en la Figura 2A; a los 7 días de exposición se observaron variaciones en la actividad de la enzima en respuesta a los diferentes tratamientos; descensos con respecto al grupo control (Control=  $2,65 \pm 0,65$  U/g.m.h) se registraron en Cu1 y GFS2 donde se obtuvo el valor más bajo (Cu1=  $2,87 \pm 0,315$  U/g.m.h; GFS2=  $2,65 \pm 0,63$  U/g.m.h) y aumentos en Cu2 y en los grupos tratados con las mezclas que presentaron los valores más altos (Cu2=  $3,62 \pm 0,79$  U/g.m.h; Mez1=  $4,16 \pm 0,73$  U/g.m.h; Mez2=  $5,49 \pm 0,79$  U/g.m.h). A los 28 días, en la misma región se evidenció un aumento de la actividad de LDH en la mayoría de los tratamientos comparado con el grupo no expuesto (Control=  $2,65 \pm 0,65$  U/g.m.h), mostrando los valores más altos en los tratamientos de cobre (Cu1=  $7,12 \pm 0,27$  U/g.m.h; Cu2=  $11,75 \pm 3,84$  U/g.m.h), seguido de GFS2 (GFS2=  $5,53 \pm 1,07$  U/g.m.h). El comportamiento de esta misma variable en la región posterior se muestra en la Figura 2B. Se puede observar en esta región que todos los tratamientos provocaron incrementos en la LDH en ambos periodos de exposición, siendo los organismos tratados con las mezclas los que exhibieron los mayores valores a los 7 días (MEZ1=  $7,33 \pm 1,98$  U/g.m.h; MEZ2=  $6,91 \pm 1,49$  U/g.m.h), en comparación con su grupo control (Control=  $2,48 \pm 0,44$  U/g.m.h) y a los 28 días, los tratamientos individuales con cobre (Cu1=  $6,32 \pm 0,64$  U/g.m.h; Cu2=  $11,43 \pm 2,90$  U/g.m.h).

Los análisis estadísticos revelaron diferencias significativas en las actividades de LDH en *E. andrei* sujetas a los distintos tratamientos, tanto en la región anterior (KW= 21,1963;  $p < 0,05$ ; Apéndice 1) como en la posterior (KW= 35,5481;  $p < 0,05$ ; Apéndice 2) así como, entre ambas regiones (Mann-Whitney= 646,5;  $p < 0,05$ ; Apéndice 3) y entre los tiempos de exposición para la región anterior (Mann-Whitney= 423,0;  $p < 0,05$ ; Apéndice 4) y posterior (Mann-Whitney= 346,0;  $p < 0,05$ , Apéndice 5).

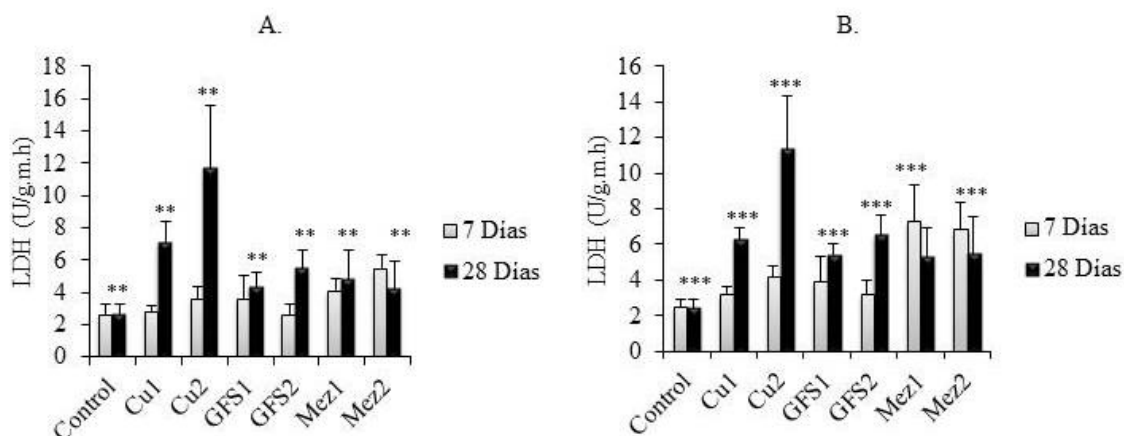


Figura 2. Actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) (U/g.m.h), en el tegumento de la región anterior (A) y posterior (B) de *Eisenia andrei* controles y expuestas por 7 y 28 días a cobre (Cu1= 1,5 g de cobre/kg de sustrato; Cu2= 3 g de cobre/kg de sustrato), glifosato (GFS1= 0,9 g de glifosato/kg de sustrato; GFS2= 1,8 g de glifosato/kg de sustrato) y las mezclas de ambos (Mez1= Cu2+GFS1; Mez2= Cu1+GFS2). Las barras expresan las medias y tendencia de la desviación estándar. (\*\*\*) Indican diferencias  $p < 0,001$ .

#### Proteínas totales (PT)

La concentración de PT se muestra en la Figura 3. En la región anterior, a los 7 días de exposición se observaron variaciones en las PT de todos los grupos experimentales; los valores más bajos se encontraron en los tratamientos individuales con cobre (Cu1=  $66,46 \pm 22,15$  mg/g.m.h; Cu2=  $49,34 \pm 16,87$  mg/g.m.h) y los más altos en los tratados con glifosato (GFS1=  $56,65 \pm 13,42$  mg/g.m.h; GFS2=  $115,91 \pm 21,34$  mg/g.m.h) en relación con el grupo control (Control=  $89,28 \pm 16,20$  mg/g.m.h). En contraste, a los 28 días de exposición todos los tratamientos produjeron incrementos en las PT, siendo el valor máximo Cu2=  $137,48 \pm 37,73$  mg/g.m.h y Mez2=  $133,63 \pm 50,07$  mg/g.m.h (Figura 3A). En la región posterior, las PT también variaron según los tratamientos a los 7 días, registrándose descensos en los grupos tratados con cobre (Cu1=  $51,80 \pm 16,20$  mg/g.m.h; Cu2=  $58,12 \pm 18,83$  mg/g.m.h) y aumentos en los expuestos a las mezclas (Mez1=  $103,84 \pm 16,81$  mg/g.m.h; Mez2=  $86,96 \pm 18,04$  mg/g.m.h) y al glifosato (GFS1=  $112,51 \pm 22,05$  mg/g.m.h; GFS2=  $150,05 \pm 34,75$  mg/g.m.h). A los 28 días, todos los grupos exhibieron aumentos de la PT con respecto al control (Control=  $86,48 \pm 34,21$  mg/g.m.h), siendo el grupo tratado con la más baja dosis

de glifosato (GFS1= 139,24±22,00 mg/g.m.h) el que mostró mayor contenido de PT, seguido de la dosis más alta de cobre (Cu2= 138,05±22,99 mg/g.m.h) (Figura 3B).

Según el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas en las PT de la región anterior de *E. andrei* sujeta a los distintos tratamientos (KW= 8,81;  $p>0,05$ ; Apéndice 6), sin embargo, en la región posterior si hubo diferencias en esta variable según los diferentes tratamientos (KW= 24,5;  $p<0,05$ ; Apéndice 7), al igual que para el factor tiempo en la región anterior (Mann-Whitney= 467,5;  $p<0,05$ ; Apéndice 9) y posterior (Mann-Whitney= 358,0;  $p<0,05$ ; Apéndice 10), así como entre ambas regiones (Mann-Whitney= 722,5;  $p<0,05$ ; Apéndice 8).

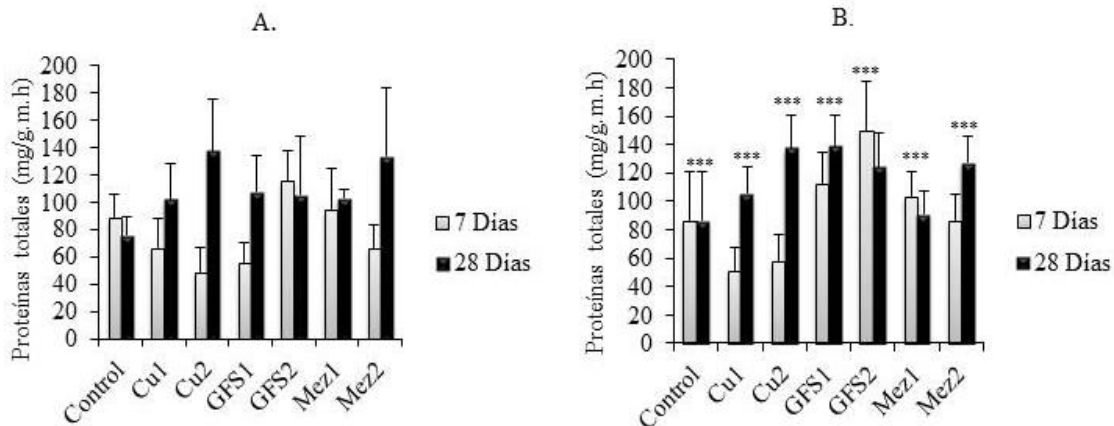


Figura 3. Concentración de proteínas totales (mg/g.m.h.), en el tegumento de la región anterior (A) y posterior (B) de *Eisenia andrei* controles y expuestas por 7 y 28 días a cobre (Cu1= 1,5 g de cobre/kg de sustrato; Cu2= 3 g de cobre/kg de sustrato), glifosato (GFS1= 0,9 g de glifosato/kg de sustrato; GFS2= 1,8 g de glifosato/kg de sustrato) y las mezclas de ambos (Mez1= Cu2+GFS1; Mez2= Cu1+GFS2). Las barras expresan las medias y tendencia de la desviación estándar. (\*\*\*) Indican diferencias  $p<0,001$ .

## Biomarcadores del sistema antioxidante

### Catalasa (CAT)

En la Figura 4, se muestra la actividad enzimática de la CAT en *E. andrei* sujeta a los distintos tratamientos a los dos periodos de exposición. En la región anterior, a los 7 días de exposición se observaron descensos de CAT en la mayoría de los tratamientos comparado con el grupo no expuesto (Control= 504,11±246,02 U/g.m.h), registrándose

el valor más bajo en el tratamiento Cu1 (Cu1= 260,20±100,97 U/g.m.h), mientras que, a los 28 días se observaron variaciones con respecto al grupo control que exhibió un valor de 533,72±232,68 U/g.m.h; la actividad de la CAT disminuyó hasta valores mínimos en los grupo tratados con ambas mezclas (Mez1= 314,97±83,88 U/g.m.h; Mez2= 339,64±122,59 U/g.m.h) y aumentó hasta sus valores máximos en los tratamientos individuales con glifosato (GFS= 858,46±205,61 U/g.m.h; GFS2= 773,24±166,19 U/g.m.h) (Figura 4A). En la región posterior (Figura 4B), a los 7 días de exposición, en comparación con el grupo no expuesto (Control= 594,49±246,31 U/g.m.h), la mayoría de los tratamientos provocaron descensos en CAT (Cu1= 367,43±91,50 U/g.m.h; GFS1= 430,26±82,69 U/g.m.h; Mez1= 582,38±275,30 U/g.m.h y Mez2= 405,06±118,02 U/g.m.h) sin embargo, las dosis más altas de cobre (Cu2= 605,96±230,43 U/g.m.h) y glifosato (GFS2= 771,74±210,92 U/g.m.h) estimularon la actividad de la enzima. A los 28 días también se observó una disminución de la actividad en todos los tratamientos, excepto para los tratamientos individuales con glifosato en donde aumentó (GFS1= 1086,41±275,68 U/g.m.h; GFS2= 1146,20±238,59 U/g.m.h) con respecto al control (Control= 667,69±227,60 U/g.m.h).

Todos los tratamientos produjeron diferencias significativas en la actividad de la CAT tanto en la región anterior (KW= 14,4;  $p < 0,05$ ; Apéndice 11) como la posterior (KW= 30,8508;  $p < 0,05$ ; Apéndice 12). La prueba Mann-Whitney reveló diferencias significativas entre regiones (Mann-Whitney= 1077,0;  $p < 0,05$ ; Apéndice 13) y con respecto al tiempo de exposición, sólo para la región anterior (Mann-Whitney= 428,5;  $p < 0,05$ ; Apéndice 14).



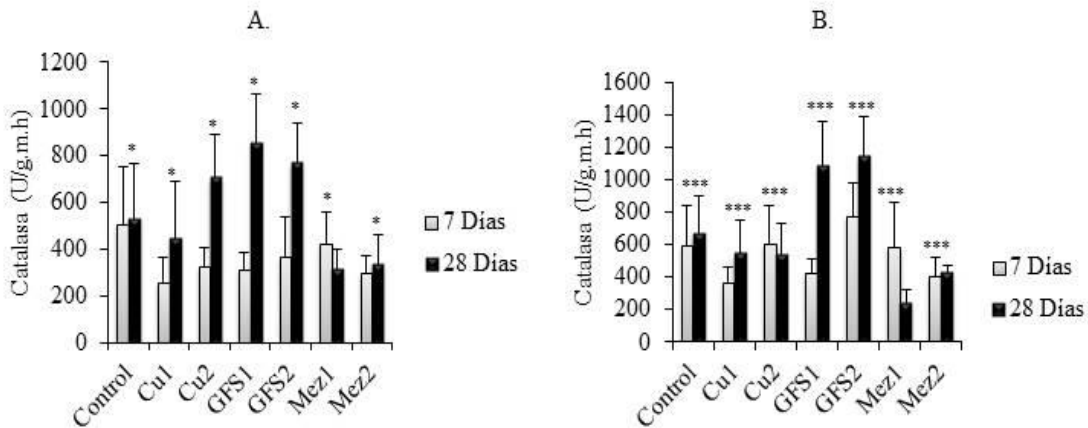


Figura 4. Actividad enzimática de la catalasa (U/g.m.h.), en el tegumento de la región anterior (A) y posterior (B) de *Eisenia andrei* controles y expuestas por 7 y 28 días a cobre (Cu1= 1,5 g de cobre/kg de sustrato; Cu2= 3 g de cobre/kg de sustrato), glifosato (GFS1= 0,9 g de glifosato/kg de sustrato; GFS2= 1,8 g de glifosato/kg de sustrato) y las mezclas de ambos (Mez1= Cu2+GFS1; Mez2= Cu1+GFS2). Las barras expresan las medias y tendencia de la desviación estándar. (\*\*\*) Indican diferencias  $p < 0,001$ .

#### Tioles totales (-SH)

En la Figura 5 se muestran los resultados de los tioles totales evaluados en la región anterior (A) y posterior (B) de *E. andrei* expuesta a los distintos tratamientos por 7 y 28 días. Las concentraciones promedio de grupos tioles en los dos periodos de exposición para la región anterior y posterior de organismos controles oscilaron entre 1 342,17  $\mu\text{moles -SH/g.m.h}$  y 1 792,96  $\mu\text{moles -SH/g.m.h}$ , respectivamente. Los tratamientos no tuvieron efecto sobre esta variable en la región anterior (ANOVA= 1,67;  $p > 0,05$ ; Apéndice 16) y posterior (ANOVA= 1,80;  $p > 0,05$ ; Apéndice 18), ni tampoco el factor tiempo tuvo efecto sobre los -SH de la región anterior (T-Student= 59,30;  $p > 0,05$ ; Apéndice 21) y posterior (T-Student= 42,25;  $p > 0,05$ ; Apéndice 22). Por el contrario, entre los -SH de ambas regiones se encontraron diferencias significativas (T-Student= -2,035;  $p < 0,05$ ; Apéndice 20).

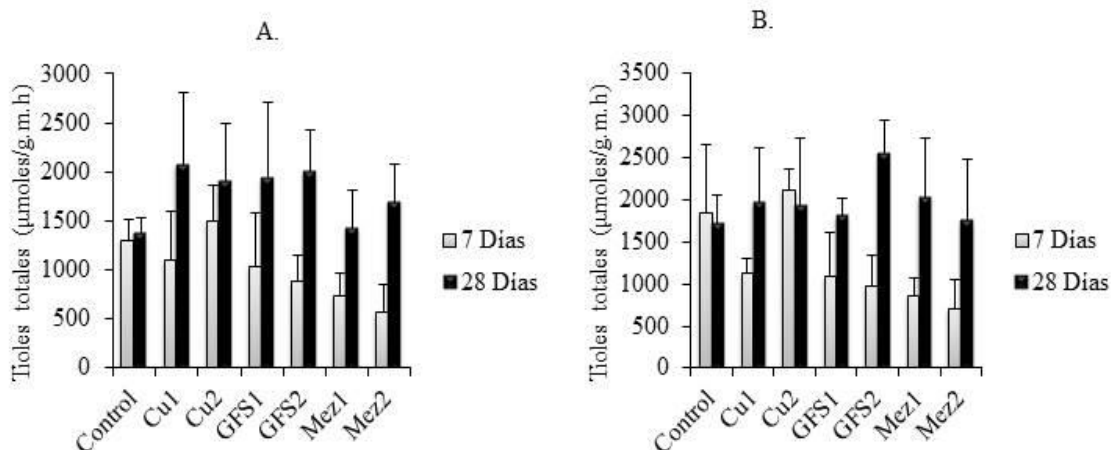


Figura 5. Contenido de grupos tioles totales (mmol/L), en el tegumento de la región anterior (A) y posterior (B) de *Eisenia andrei* controles y expuestas por 7 y 28 días a cobre (Cu1= 1,5 g de cobre/kg de sustrato; Cu2= 3 g de cobre/kg de sustrato), glifosato (GFS1= 0,9 g de glifosato/kg de sustrato; GFS2= 1,8 g de glifosato/kg de sustrato) y las mezclas de ambos (Mez1= Cu2+GFS1; Mez2= Cu1+GFS2). Las barras expresan las medias y tendencia de la desviación estándar. (\*\*\*) Indican diferencias  $p < 0,001$ .

### Biomarcador de estrés oxidativo

#### Peroxidación de lípidos (MDA)

Los niveles de MDA en ambas regiones de *E. andrei* expuesta por 7 y 28 días a los distintos tratamientos se muestran en la Figura 6. En la región anterior, a los 7 días de exposición se encontraron descensos en la mayoría de los tratamientos, comparado con el grupo no expuesto (Control=  $160,15 \pm 67,15$  nmoles de MDA/g.m.h.), observándose el valor más bajo en el tratamiento con la dosis menor de glifosato (GFS1=  $86,02 \pm 31,13$  nmoles de MDA/g.m.h), mientras que, a los 28 días se evidenciaron aumentos en todos los grupos en comparación con su control respectivo (Control=  $136,02 \pm 32,60$  nmoles de MDA/g.m.h) registrándose los valores más altos en los tratamientos con Cu2=  $912,68 \pm 171,53$  nmoles de MDA/g.m.h y Mez2=  $796,62 \pm 261,67$  nmoles de MDA/g.m.h (Figura 6A). En la región posterior también variaron mucho los niveles de MDA a los 7 días; en comparación con el grupo no expuesto (Control=  $136,62$  nmoles de MDA/g.m.h); los expuestos a las mezclas tuvieron ligeros descensos y los tratados con la dosis menor de glifosato exhibieron el valor más

bajo (GFS1= 87,18±34,78 nmoles de MDA/g.m.h), mientras que, los promedio más altos se registraron en Cu1 y GFS2 (Cu1= 209,59±95,97 nmoles de MDA/g.m.h; GFS2= 208,33±63,38 nmoles de MDA/g.m.h). A diferencia, a los 28 días se observaron incrementos en la mayoría de los tratamientos (Cu1= 686,96±63,38 nmoles de MDA/g.m.h; GFS2= 754,45±368,62 nmoles de MDA/g.m.h; Mez2= 813,74±188,63 nmoles de MDA/g.m.h), siendo el grupo expuestos a la concentración más alta del metal el que mostró el mayor valor (Cu2= 1019,23±218,44 nmoles de MDA/g.m.h) en comparación con el grupo no expuesto (Control= 141,56±40,04 nmoles de MDA/g.m.h) (Figura 6B).

El análisis de varianza ANOVA reveló que los diferentes tratamientos ejercieron un efecto significativo sobre los niveles de malondialdehído en la región anterior (ANOVA= 2,36;  $p < 0,05$ ; Apéndice 23) y posterior (ANOVA= 2,68;  $p < 0,05$ ; Apéndice 25) de *E. andrei*. Así mismo, la prueba T-Student evidenció diferencias significativas entre los tiempos de exposición tanto para región anterior (T-Student= -9,88;  $p < 0,05$ ; Apéndice 28) como para la región posterior (T-Student= -9,403;  $p < 0,05$ ; Apéndice 29). Por el contrario, reveló que no existe diferencias significativas para región (T-Student= -0,57642;  $p > 0,05$ ; Apéndice 27) (Apéndices 27, 28, 29).

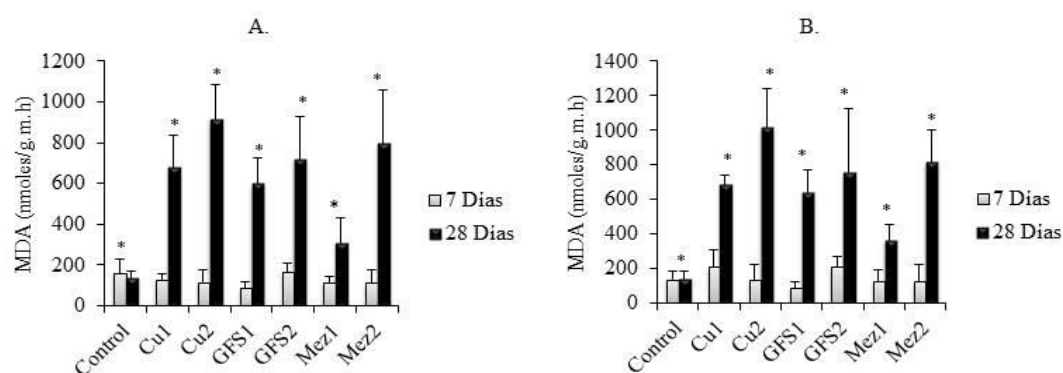


Figura 6. Niveles de malondialdehído (MDA) (nmol de MDA/g.m.h), en el tegumento de la región anterior (A) y posterior (B) de *Eisenia andrei* controles y expuestas por 7 y 28 días a cobre (Cu1= 1,5 g de cobre/kg de sustrato; Cu2= 3 g de cobre/kg de sustrato), glifosato (GFS1= 0,9 g de glifosato/kg de sustrato; GFS2= 1,8 g de glifosato/kg de sustrato) y las mezclas de ambos (Mez1= Cu2+GFS1; Mez2= Cu1+GFS2). Las barras expresan las medias y tendencia de la desviación estándar. (\*\*\*) Indican diferencias  $p < 0,001$ .

En esta investigación se estimaron BMs fisiológicos (LDH y PT), del sistema antioxidante (CAT y tioles totales) y de estrés oxidativo (MDA) para evaluar los efectos individuales del cobre, del glifosato y de las mezclas de ambos químicos en la región corporal anterior y posterior de *E. andrei* expuesta por 7 y 28 días. En general, la sensibilidad de los BMs fue diferente en ambas regiones del organismo y los cambios observados en la mayoría de los casos fueron dependientes de la concentración y del tipo de tratamiento así como, del tiempo de exposición.

Los cambios más determinantes se observaron a los 28 días de exposición, periodo en el cual todos los tratamientos tuvieron efectos estimulantes sobre la actividad de LDH, proteínas totales y los niveles de MDA en ambas regiones corporales del organismo, no siendo éste el caso a los 7 días, en donde los resultados mostraron variaciones para cada tratamiento en ambas regiones. De los marcadores de defensas antioxidantes evaluados, sólo la CAT fue afectada en ambas regiones, exhibiendo también un patrón de respuesta cambiante en los distintos grupos experimentales en los dos periodos de exposición. Tales resultados sugieren que la especie en estudio desarrolla distintas estrategias bioquímicas durante el tratamiento agudo y crónico con los tóxicos probados, posiblemente para atenuar su toxicidad y controlar el desarrollo de daños oxidativos excesivos que pongan en riesgo su crecimiento, reproducción y sobrevivencia.

### **Biomarcadores fisiológicos: LDH y PT**

Excepto GFS2, los demás tratamientos provocaron aumentos en la actividad de LDH en las dos regiones corporales de *E. andrei* durante los dos periodos de exposición, evidenciando la sensibilidad de este BM para detectar tempranamente efectos asociados con el metabolismo energético del organismo sujeto a la contaminación aguda y crónica con cobre, glifosato y a sus mezclas. La LDH es una enzima clave involucrada en la producción anaeróbica de energía, reciclando el poder reductor NADH y participando en la ruta gluconeogénica (Tripathi *et al.*, 2011), cuya actividad ha sido previamente demostrada en lombrices (Shekari *et al.*, 2008).

Los aumentos de LDH observados en este estudio podrían estar asociados con una mayor actividad de la enzima necesaria para satisfacer una mayor demanda de energía en el organismo asociado a su vez, con las estrategias de compensación bioquímicas para sobrellevar el estrés inducido por la exposición a los tóxicos, aseveración ésta que concuerda con lo sugerido previamente por Owagboriayea *et al.* (2020). Estos autores en tres especies distintas de lombrices encontraron que luego de 2 semanas de la exposición a glifosato, LDH exhibió aumentos significativos asociados con el desarrollo de estrés oxidativo en el tejido corporal de las lombrices. En concordancia con lo evidenciado por los referidos autores, en el presente estudio la estimulación de LDH se asoció con incrementos en los niveles de MDA a los 28 días de exposición a todos los tratamientos, lo que permite inferir que en ese periodo (largo plazo) posiblemente es cuando el organismo optimiza los ajustes fisiológicos para mantener la homeostasis metabólica y, los cambios en la actividad de la enzima estuvieron relacionados con los daños oxidativos del tejido, tal como lo sugiere los incrementos en el marcador de reacciones de lipoperoxidación (MDA) y de estrés oxidativo.

Resultados similares a los de esta investigación, fueron registrados por Rico *et al.* (2016) en *E. fetida* y otras especies de lombrices expuestas a diferentes pesticidas, donde evidenciaron que bajas concentraciones de pesticidas provocaron aumentos en LDH, efecto que desapareció con el aumento de la concentración del tóxico (Tripathi *et al.*, 2009). Owagboriayea *et al.* (2020) observaron que las actividades de LDH y GST aumentaron en tres especies de lombrices de tierra (*Alma millsoni*, *Eudrilus eugeniae* y *Libyodrilus violaceus*) expuestas a glifosato, resultados que relacionaron con los ajustes bioquímicos y fisiológico de estos organismos impuestos por el estrés de la exposición al herbicida. Rodríguez-Seijo *et al.* (2018) registraron un aumento similar en LDH en lombrices de tierra expuestas a microplásticos de polietileno y lo asociaron con el consumo de energía y daños celulares debidos a la peroxidación de lípidos y estrés oxidativo impuesto por la exposición al contaminante.

Recientemente, Lammertyn *et al.* (2021) no encontraron efectos del pesticida antrazina sobre la actividad de LDH en *E. fetida* a los 7 días de expuesta, sin embargo, a

los 28 días de exposición el pesticida provocó aumentos significativos en la enzima. En contraste a lo observado en este estudio para *E. andrei*, Samal *et al.* (2019) en *Eudrilus eugeniae* no detectó cambios en LDH expuesta a glifosato a pesar de que reportó incrementos en MDA, lo que pone en evidencia que los mecanismos bioquímicos que se activan frente a estresores químicos puede variar entre las especies.

El nivel de toxicidad de los químicos ambientales puede cambiar cuando éstos interactúan, formando parte de mezclas complejas de dos o más tóxicos. La coexistencia de contaminantes puede aumentar la toxicidad (sinergismo), permanecer igual (aditivo) o disminuirla (antagonismo), dependiendo de factores ambientales, así como de la biodisponibilidad y biotransformación de los tóxicos (Alengebawy *et al.*, 2021). La biodisponibilidad de químicos en el suelo depende a su vez, en el caso de los metales, de las reacciones de especiación química de éstos así como, de las reacciones de formación de complejos con ligandos moleculares en el interior del organismo (Li *et al.*, 2020). En el presente estudio, la actividad de LDH en los organismos expuestos a las dos mezclas del metal y el herbicida también exhibió incrementos en comparación con el grupo control, sin embargo, estos aumentos fueron similares a los observados en los tratamientos individuales con el herbicida, pero aproximadamente 2 veces menor que los observados en los organismos expuestos individualmente al cobre. Tales resultados ponen en evidencia un posible efecto interactivo entre ambos químicos que atenúa la respuesta enzimática.

En el contexto anterior, algunos autores han evaluado el efecto combinado de metales y pesticidas por considerarlo de mayor utilidad para inferir sobre la toxicidad de estos químicos, ya que en el medio ambiente natural éstos se encuentran formando parte de mezclas complejas (Uwizeyimana *et al.*, 2017). Efectos interactivos diversos de mezclas de contaminantes han sido reportados en lombrices. Un efecto antagónico fue observado en la toxicidad de una mezcla del pesticida acetoclor y cobre en comparación con la acción por separado de ambos químicos sobre el crecimiento y la reproducción de *E. fetida* (Liang y Zhou, 2003). Wang *et al.* (2015) evaluó el efecto de cadmio combinado con varios pesticidas en lombrices y reveló que, 11 de las mezclas probadas tuvieron efecto sinérgico y 5 de ellas mostraron acción antagónica, concluyendo que el

aumento de la toxicidad es lo más frecuente cuando los químicos coexisten en mezclas complejas.

Un patrón similar de respuesta al de LDH exhibió el contenido de proteínas totales en ambas regiones corporales de *E. andrei*; incrementaron con todos los tratamientos químicos a los 28 días de exposición, indicando que, ante la situación de estrés pudo estimularse de la síntesis de proteínas como estrategia bioquímica para controlar la bioacumulación, facilitar la biotransformación y excreción de los productos metabólicos de ambos tóxicos. No obstante, es importante destacar que la activación de tales mecanismos bioquímicos no fue suficiente para evitar el estrés oxidativo que se desarrolló en ambas regiones del organismo durante ese periodo.

En el contexto anterior, se conoce que la exposición a contaminantes ambientales orgánicos e inorgánicos induce la activación de mecanismos moleculares para compensar el estrés químico; muchos de ellos dependientes de péptidos, proteínas y enzimas (Mincarelli *et al.*, 2019). En lombrices, la tolerancia a contaminantes orgánicos y a metales depende de la inducción de un tipo particular de proteínas de bajo peso molecular; las metalotioneínas (MT) (Kowald *et al.*, 2016), así como de otras proteínas de alto peso molecular en poliquetos (Marcano *et al.*, 1996) que participan directamente en la fijación y compartimentalización intracelular de los metales, como antioxidantes que regulan los niveles de EROs (Dallinger *et al.*, 2000; Fisker *et al.*, 2013; Mustonen *et al.*, 2014). Adicionalmente, aumentos en las proteínas totales puede ser consecuencia de la síntesis de proteínas con función de enzimas antioxidantes encargadas de controlar la sobreproducción de radicales libres que genera la exposición a contaminantes (Givaudan *et al.*, 2014; Salvio *et al.*, 2016; Mkhinini y Jastrzębska, 2019). Aunque en el presente estudio no se evaluaron las concentraciones de MT, la ausencia de cambios en los tioles totales (-SH) en ambas regiones corporales de *E. andrei* por la acción de los tratamientos, así como los cambios en la enzima CAT podrían indicar que tanto esta enzima como otras proteínas (posiblemente MTs u otras proteínas similares) son las que principalmente ejercen el rol de defensa antioxidante celular.

La importancia de las MT en el control de la toxicidad en suelos contaminados con agroquímicos contentivos de metales como cobre fue recientemente evidenciada por

Hattab *et al.* (2009); sus resultados revelaron bioacumulación de metales (Cu, Cd, Pb y Zn) en *E. andrei* acompañado de aumentos en MT y MDA. Defarge *et al.* (2018) encontraron una significativa correlación positiva entre las concentraciones de metales en los tejidos de diferentes especies de lombrices y el contenido de MT.

En este estudio, las concentraciones de proteínas totales encontradas en las lombrices de tierra tratadas con las mezclas fueron similares a las obtenidas en los anélidos expuestos a las dosis de metal y de glifosato por separado, por lo que se puede inferir que, la coexistencia de ambos químicos en el sustrato no altera la acción perjudicial de ambos. Para la misma especie en estudio *E. andrei*, Castillejo (2020) reportó resultados, no encontrando interacción entre ambos químicos que modificaran su efecto sobre la concentración de proteínas. Zhou *et al.* (2013) y Zhang *et al.* (2020) reportaron que las interacciones exhibidas por herbicidas y los metales pesados se deben a que ambos compiten por la vía de entrada al interior de las lombrices de tierra, disminuyendo así la capacidad de ingreso de uno con respecto al otro compuesto.

### **Biomarcadores de defensas antioxidante: CAT y -SH**

En *E. andrei*, todos los tratamientos afectaron significativamente la actividad de la enzima CAT en ambas regiones, tales cambios variaron para cada tratamiento y, en la región anterior dependieron del tiempo de exposición. Exceptuando los grupos Cu2 y GFS2 en la región anterior, a los 7 días de exposición la actividad de CAT en ambas regiones disminuyó en todos los tratamientos. Sin embargo, a los 28 días en ambas regiones la actividad enzimática fue cambiante, observándose descenso en algunos casos (Cu1, MZ1 y MZ2) y aumentos en otros (Cu2, GFS1 y GFS2). Tales variaciones de esta enzima sugieren su importancia como estrategia de defensa antioxidante celular que se activa ante un posible incremento en la producción y remoción de oxirradicales; específicamente a los originados por la degradación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u otros peróxidos orgánicos (Holzinger *et al.*, 2022) que pudieron desencadenar el estrés oxidativo en el organismo a los 28 días de exposición; evidenciado por niveles de MDA incrementados en todos los tratamientos para ese periodo.



A pesar de que  $H_2O_2$  no es un radical libre, éste puede difundir a través de las membranas y al reaccionar con metales de transición genera el radical hidroxilo ( $\bullet OH$ ); uno de los oxiradicales más perjudiciales, inductor de reacciones de oxidación de lípidos y proteínas de membranas que dañan la integridad y funcionamiento celular (Di Giulio *et al.*, 1995). El desarrollo de patologías oxidativas, mediadas por este hidroperóxido en el tejido muscular de *E. andrei* pudo alterar la tasa de recambio proteica y provocar descensos en la actividad CAT, cuando la demanda de la enzima supera los niveles basales de ésta y la capacidad de síntesis se encuentra disminuida o por el contrario, aumentos de la actividad enzimática, sí la tasa de recambio favorece la biosíntesis en comparación con la de degradación proteica. Dentro de este contexto, Mincarelli *et al.* (2019) investigaron el efecto del cobre sobre la expresión de genes que codifican para CAT y SOD en *E. andrei* y no encontraron aumento en la expresión génica de estas enzimas, concluyendo que posiblemente las respuestas adaptativas de enzimas antioxidantes pueden no activarse en condiciones de excesivo estrés oxidativo mediado por el cobre. Otros autores incluso han encontrado regulación negativa de la expresión génica de enzimas antioxidantes por el cobre (Gaete *et al.*, 2010; Zheng *et al.*, 2013).

Coincidente con los resultados de esta investigación, Zhou *et al* (2013) empleó tratamientos similares a los de este estudio y, evidenció un marcado descenso de CAT asociado con un aumento de los niveles lipoperoxidación en *E. fetida* expuesta a Cu (200 mg Cu/kg de sustrato), sin embargo, glifosato y la mezcla del metal con el herbicida no afectaron la actividad de la enzima, contrastando estos últimos resultados con los encontrados en la presente investigación, donde el tratamiento individual con glifosato produjo aumentos en la actividad de CAT de ambas regiones a los 28 días de exposición. Los incrementos de la enzima coincidieron con aumentos de las proteínas, lo que permite inferir que los aumentos en la actividad de CAT posiblemente en esos grupos, sea por inducción de la síntesis de la enzima. Variaciones en los resultados entre diferentes autores posiblemente sean debidas a las diferencias inter e intraespecíficas entre los mecanismos bioquímicos que pueden exhibir los distintos organismos para enfrentar el estrés inducido por diferentes sustancias químicas, potencialmente contaminantes (Hochachka y Somero, 2002).

En concordancia con los resultados de esta investigación, Lummato *et al.* (2013), encontró incrementos de CAT en lombrices tratadas individualmente con glifosato. Efectos similares de la exposición al glifosato en lombrices de tierra han sido descritos en otras investigaciones (Marcano *et al.*, 2017; Garcia-Perez *et al.*, 2020). García-Pérez *et al.* (2014) y Dzul-Caamal y Rendón-Von (2017), señalaron aumentos en la actividad de la catalasa en *E. foetida* cuando fue expuesta a diferentes concentraciones de glifosato. Similarmente, Salvio *et al.* (2016) expusieron a *Octolasion cyaneum* a 134 y 535 µg de glifosato/kg de sustrato y asociaron los incrementos encontrados a la activación de defensas celulares como las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatióna peroxidasa (GPx) y glutatióna reductasa (GR), las cuales resultaron estimuladas probablemente por un incremento en la producción de EROs durante la exposición al herbicida.

La respuesta de *E. andrei* a los tratamientos con las mezclas tuvo un comportamiento similar en ambas regiones en los dos periodos de exposición; descensos en la actividad de CAT en comparación con el grupo no expuesto, reflejando estos resultados una atenuación en el potencial de defensa antioxidante para contrarrestar la sobreproducción de radicales libres, posiblemente por una demanda excesiva y saturación de las concentraciones basales de la enzima y una baja tasa de síntesis. Es conocido que tanto cobre como glifosato coexisten en suelos contaminados y la interacción entre ellos alteran el mecanismo de acción tóxico que expresan los organismos (Hussain *et al.*, 2009). A diferencia de lo revelado en este estudio, donde no se logró comprobar interacción alguna entre cobre y glifosato, Zhou *et al.* (2013) en *E. foetida* expuesta a una mezcla similar demostraron que la presencia de glifosato disminuyó la biodisponibilidad y toxicidad del cobre debido a su alto potencial de acción como agente quelante. Según Tsui *et al.* (2005), la capacidad de acomplejamiento entre el cobre y el glifosato puede cambiar la solubilidad, interferir con su biodisponibilidad, bioacumulación y mecanismos de toxicidad de ambos sobre los organismos.

En contraste a lo observado para CAT, ninguno de los tratamientos afectó el otro BM de defensa antioxidante (grupos -SH) evaluado en este estudio, revelando estos resultados que tales moléculas no tuvieron un rol importante como parte de las

estrategias antioxidantes en *E. andrei* que controlan el desbalance generado por el estrés oxidativo observado en el organismo a largo plazo. Es posible que, junto con CAT otras proteínas (SOD, GPx, GST, Mt, entre ellas) sean las que median el proceso. En este sentido, se conoce que la carencia de activación de algunas respuestas antioxidantes puede ser debido al mismo estrés oxidativo inducido por concentraciones excesivas del tóxico de prueba o alternativamente, podría deberse a una estrategia de optimización de activación selectiva de la expresión génica de moléculas específicas y de mayor utilidad (Mincarelli *et al.*, 2019). Al respecto, Brulle *et al.* (2007) evidenciaron que la exposición de *E. fetida* a cadmio produjo una activación a nivel de transcripción de MTs que tienen una alta afinidad y facilitan una destoxificación más rápida y eficaz del metal, en detrimento de otras proteínas menos relevantes para la adaptación inmediata y supervivencia.

### **Biomarcador de daño oxidativo: MDA**

La peroxidación lipídica es un mecanismo bien establecido de lesión celular y se utiliza como indicador del estrés oxidativo en células y tejidos (Ifemeje *et al.*, 2015 citado por Samal *et al.*, 2019). Los peróxidos de lípidos son inestables y se descomponen para formar una serie compleja de compuestos que incluyen compuestos de carbonilo reactivos (Gaete *et al.*, 2010). En especial, la peroxidación de lípidos (LPO) ha sido reportada como la mayor contribuyente para la pérdida de la funcionabilidad celular bajo situaciones de estrés oxidativo, modificando la permeabilidad de sistemas membranales (mitocondrias o microsomas), produciendo así disrupción de la energía, incluso muerte celular (Schettino *et al.*, 2012). Dado que el MDA es un producto de descomposición peroxidativa de lípidos producido por el ataque de los radicales libres a los ácidos grasos insaturados, la medición de MDA se ha utilizado como indicador del peróxido lipídico (Li *et al.*, 2022). Además, refleja indirectamente el grado de la lesión celular (Chen *et al.*, 2020). Puede interactuar con proteínas y ADN para cambiar la actividad de las proteínas, dañar el ADN e inducir mutaciones genéticas; por lo tanto, su concentración es usada como un indicador de estrés oxidativo para medir el estado de daño oxidativo endógeno del cuerpo (Li *et al.*, 2018).

En el presente estudio, las concentraciones de MDA en ambas regiones del tejido corporal de *E. andrei* exhibieron incrementos significativos a los 28 días de exposición a todos los tratamientos, indicando el desarrollo de una condición de estrés oxidativo, posiblemente inducida por una sobreproducción del radical  $\cdot\text{OH}$  debido al aumento en el metabolismo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  mediado por la reacción de la CAT que también aumentó su actividad en ese periodo.

En diferentes estudios se han empleado MDA como marcador de estrés oxidativo y reportado incrementos en sus concentraciones en lombrices de tierra expuestas a pesticidas, metales pesados y microplásticos, entre otros contaminantes (Hackenberger *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2021; Sheng *et al.*, 2021), sugiriendo que la toxicidad de tales sustancias químicas está mediada por una sobreproducción de radicales libres y estrés oxidativo. En este contexto, se conoce que en lombrices de tierra al igual que en otros organismos, el principal blanco de acción de los radicales libres son las ácidos grasos polinsaturados de los lípidos de membranas, con los que interactúan y catalizan reacciones de formación de peróxidos lipídicos y daños oxidativos a las proteínas que generan pérdida de la integridad estructural y funcional de las membranas celulares (Samal *et al.*, 2019).

Por otra parte, Holzinger *et al.* (2022) contrario a sus expectativas, encontraron niveles más bajos de MDA en *E. fetida* expuesta a diferentes contaminantes orgánicos, revelando la dificultad para interpretar tales resultados, que podrían ser producto de la complejidad de la respuesta al estrés oxidativo y las diferentes vías involucradas en el proceso. Tales argumentos son válidos para justificar los descensos de MDA observados en la región anterior de la especie en estudio a los 7 días de exposición en la mayoría de los tratamientos.

En general, los distintos tratamientos afectaron significativamente el contenido de MDA, de proteínas totales y la actividad de CAT en ambas regiones de *E. andrei*, siendo mayores los cambios de estos BMs en la región corporal posterior, lo que sugiere una distribución estratégica de las moléculas que conforman las defensas antioxidantes para regular los inductores de daños oxidativos, preservando las estructuras reproductivas en la región anterior y activando preferiblemente en la región posterior los

mecanismos necesarios para bioacumular, detoxificar y facilitar la eliminación de los xenobióticos. Dentro de este contexto, se conoce que el tracto intestinal de las lombrices se localiza hacia la región posterior que finaliza en un poro o abertura anal (Morgan *et al.*, 2002); rodeando al intestino se encuentra el tejido cloragógeno con una función análoga al hígado de vertebrados, relacionada con el metabolismo de nutrientes esenciales, así como con los procesos de excreción de productos de desecho, detoxificación y eliminación de contaminantes (Stürzenbaum *et al.*, 2004). Conociendo que el cobre afectó la reproducción en *L. terrestris* (Kamitani y Kaneko, 2007) y *E. fetida* (Spurgeon y Hopkin, 1996; Zaltauskaite y Sodiene, 2014), el establecimiento de un gradiente de los antioxidantes a lo largo del cuerpo de *E. andrei* pudiera representar una ventaja adaptativa que le garantizan la supervivencia en suelos contaminados con químicos orgánicos e inorgánicos.

En *Eiseia* ssp, Hernández *et al.* (2016), reportó aumentos significativos de grupos tioles y proteínas totales en ambas regiones corporales del organismo, sugiriendo la importancia de estos BMs como mecanismos de defensa antioxidante contra la toxicidad inducida por cadmio, y la protección al tejido reproductivo localizado hacia la región anterior. Estos autores, mencionan que, frente al tratamiento con cadmio, *E. andrei* presenta una capacidad diferencial para modular respuestas bioquímicas a lo largo de su cuerpo que le permite tolerar el metal manteniendo una eficacia reproductiva y su supervivencia. En el anélido poliqueto *Laeonereis acuta* también se demostró la presencia de un gradiente antioxidante en las regiones anterior, media y posterior y la CAT de la región media fue afectada perjudicialmente por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Da Rosa *et al.*, 2005).

## CONCLUSIONES

Todos los biomarcadores evaluados en la región anterior y posterior de *E. andrei*, excepto los -SH totales, fueron afectados por los tratamientos individuales y las mezclas de cobre y glifosato, demostrándose su utilidad como señales de alerta temprana en el monitoreo de la contaminación terrestre.

Los efectos de los tratamientos fueron dependientes del tiempo de exposición, siendo a los 28 días de exposición donde *E. andrei* exhibió los mayores efectos perjudiciales asociados al estrés oxidativo desarrollado en el tejido corporal del organismo.

Los cambios en los BMs de la condición fisiológica (LDH y PT) se asociaron claramente con los cambios en el índice de estrés oxidativo (MDA), no siendo así para los BMs de las defensas antioxidantes (CAT y -SH).

Los tratamientos probados afectaron mayormente los BMs de la región posterior de *E. andrei* donde se localiza el tejido para la bioacumulación, detoxificación y excreción de contaminantes.

Todos los tratamientos a los 28 días, produjeron estrés oxidativo en ambas regiones corporales de *E. andrei*.

## RECOMENDACIONES

Ampliar la batería de biomarcadores, por ejemplo incluir análisis de metalotioneinas y otras moléculas y enzimas antioxidantes que faciliten la comprensión de los mecanismos de acción tóxica de las sustancias probadas.

Incluir junto con el estudio de los BMs, el análisis de factores ambientales tales como, la materia orgánica, carbono orgánico, pH y temperatura del suelo que permitan inferir sobre la biodisponibilidad de los tóxicos de prueba.

Realizar pruebas de toxicidad aguda con diferentes presentaciones comerciales de glifosato y herbicidas de otras marcas.

Realizar pruebas de toxicidad aguda con *Eisenia andrei* en suelos inmediatamente rociados con cobre y glifosato para evaluar su efecto en condiciones reales.

## BIBLIOGRAFÍA

- Andersson, M.; Breccia, J. y Hatti-Kaul, R. 2000. Stabilizing effect of chemical additives against oxidation of lactate dehydrogenase. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 32(3): 145-153.
- Alengebawy, A.; Abdelkhalek, S.; Qureshi, S. y Wang, M. 2021. Heavy metals and pesticides toxicity in agricultural soil and plants: ecological risks and human health implications. *Toxics*, 9: 42.
- Baba, S. y Bhatnagar, A. 2018. Role of thiols in oxidative stress. *Current Opinion in Toxicology*, 7: 133-139.
- Barbosa, A.; Müller, E.; Moraes, G.; Umigi, R.; Toledo, S. y Ferreira, R. 2010. Perfil da aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase e biometria do fígado de codornas japonesas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39(2): 308-312.
- Brulle, F.; Mitta, G.; Leroux, R.; Lemièrre, S.; Leprêtre, A. y Vandebulcke, F. 2007. La fuerte inducción del gen de la metalotioneína después de la exposición al cadmio afecta transitoriamente la expresión de muchos genes en *Eisenia fetida*: ¿un mecanismo de compensación? *Bioquímica y Fisiología Comparativas Parte C: Toxicología y Farmacología*, 144(4): 334-341.
- Calisi, A.; Lionetto, M. y Schettino, T. 2011. Respuesta de biomarcadores en la lombriz de tierra *Lumbricus terrestris* expuesta a contaminantes químicos. *Ciencia del Medio Ambiente Total*, 409(20): 4456-4464.
- Castillejo, A. 2020. Influencia de la presencia del glifosato en la toxicidad del cobre sobre el crecimiento y la reproducción de la lombriz de tierra californiana *Eisenia andrei* (Annelida: Oligochaeta). Trabajo de grado. Departamento de Biología, Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela.
- Castillo, M. 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: estandarización, intercalibración, resultados y aplicación. En: *Conceptos generales*. Castillo, G. (ed). Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. Ciudad de México, México. Págs.17-22.
- Chen, Y.; Liu, X.; Leng, Y. y Wang, J. 2020. Respuestas de defensa en lombrices de tierra (*Eisenia fetida*) expuestas a microplásticos de polietileno de baja densidad en suelos. *Ecotoxicología y Seguridad Ambiental*, 187: 109788.
- Chowdhury, S. y Saikia, K. 2020. Oxidative stress in fish: a review. *Journal of Scientific Research*, 12(1): 145-160.
- Claiborne, A. 1984. Catalase activity. En: *Handbook of methods for oxygen radical research*. Greenwald, R. (ed). Novena edición. Greenwald and Press, Inc. Florida, Estados Unidos. Págs. 283-284.
- Cortés, C.; Marcano, L.; Marcano, E. y Zapata-Vívenes, E. 2015. Inmunotoxicidad de malatión y clorpirifos en la lombriz de tierra *Eisenia* sp. (Annelida: Oligochaeta). *Saber*, 27(4): 530-536.



- Da Rosa, C.; Iurman, M.; Abreu, P.; Geracitano, L. y Monserrat, J. 2005. Antioxidant mechanisms of the Nereidid *Laeonereis acuta* (Anelida: Polychaeta) to cope with environmental hydrogen peroxide. *Physiological and Biochemical Zoology*, 78(4): 641-649.
- Dallinger, R.; Berger, B.; Gruber, C.; Hunziker, P. y Sturzenbaun, S. 2000. Metallothioneins in terrestrial invertebrates: Structural aspects, biological significance and implications for their use as biomarkers. *Cellular and Molecular Biology*, 46(2): 331-346.
- Das, P.; Barua, S.; Sarkar, S.; Kumar, S.; Mukherjee, S.; Goswami, L.; Das, S.; Bhattacharya, S.; Karak, N. y Bhattacharya, S. 2018. Mechanism of toxicity and transformation of silver nanoparticles: Inclusive assessment in earthworm-microbe-soil-plant system. *Geoderma*, 314: 73-84.
- Deherty, V.; Ogunkuade, O. y Kanife, U. 2010. Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in some selected fishes in Lagos, Nigeria *American Eurasian. Journal of Agriculture and Environmental Sciences*, 7(3): 359-365.
- Defarge, N.; De Vendômois, J. y Séralini, G. 2018. Toxicidad de formulantes y metales pesados en herbicidas a base de glifosato y otros pesticidas. *Informes de Toxicología*, 5: 156-163.
- Depledge, M.; Aagaard, A. y Gyorkos, P. 1995. Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioral biomarkers. *Marine Pollution Bulletin*, 21: 19-27.
- Di Giulio, R.; Washburn, P.; Wenning, R.; Winston, G. y Jewell, C. 1995. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 8(12): 1103-1123.
- Dzul-Caamal, R. y Rendón-von, O. 2017. Efectos de un herbicida formulado con glifosato sobre el peso corporal, proteínas y defensas antioxidantes en la lombriz de tierra, *Eisenia foetida*. *Jaina Boletín Informativo*, 28(2): 35-43.
- Ellman, G.; Courtney, K.; Andres, J. y Featherstone, R. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2): 88-95.
- Essien, O. y John, I. 2010. Impact of crude-oil spillage pollution and chemical remediation on agricultural soil properties and crop growth. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 14(4): 147-154.
- Fernández, R. 2016. Respuestas biológicas a contaminantes del entorno de Doñana. Integración de metodologías ómicas que evalúan el estrés ambiental en animales de ecosistemas acuáticos. Tesis doctoral. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba. Córdoba, España.
- Ferreira, T. 2015. Biomarcadores enzimáticos e ecotoxicidade por cobre em *Eisenia andrei* (Bouché 1972). Tesis de maestría. Centro de Ciencias Rurales,

Universidad Federal de Santa María. Santa María, Brasil.

- Filser, J.; Koehler, H.; Ruf, A.; Römbke, J.; Prinzing, A. y Schaefer, M. 2008. Ecological theory meets soil ecotoxicology: challenge and chance. *Basic and Applied Ecology*, 9(4): 346-355.
- Fisker, K.; Holmstrup, M. y Sorensen, J. 2013. Variation in metallothionein gene expression is associated with adaptation to copper in the earthworm *Dendrobaena octaedra*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology y Pharmacology*, 157(2): 220-226.
- Fontanetti, C.; Nogarol, L.; De Souza, R.; Perez, D. y Maziviero, G. 2011. Bioindicadores y biomarcadores en la evaluación de la toxicidad del suelo. *Contaminación del Suelo*, 1: 143-168.
- Ifemeje, J.; Udedi, S.; Okechukwu, A.; Nwaka, A.; Lukong, C.; Anene, I. y Ezeude, I. 2015. Determinación de proteína total, superóxido dismutasa, actividad de catalasa y peroxidación lipídica en la macrofauna del suelo (lombrices de tierra) del basurero municipal a cielo abierto de Onitsha. *Revista de Investigación e Informes Científicos*, 6(5): 394-403.
- Gaete, H.; Hidalgo, M.; Neaman, A. y Ávila, G. 2010. Evaluación de la toxicidad de cobre en suelos a través de biomarcadores de estrés oxidativo en *Eisenia foetida*. *Química Nova*, 33(3): 566-570.
- Gao, Y.; Li, H.; Li, X. y Sun, Z. 2016. Combined subacute toxicity of copper and antiparasitic albendazole to the earthworm (*Eisenia fetida*). *Environmental Science and Pollution Research*, 23(5): 4387-4396.
- García-Pérez, J.; Alarcón-Gutiérrez, E. y Díaz-Fleischer, F. 2020. Efecto interactivo de los herbicidas a base de glifosato y el espesor de la capa orgánica del suelo sobre el crecimiento y la reproducción de la lombriz de tierra tropical *Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857). *Ecología del Suelo Aplicada*, 155: 103648.
- García-Pérez, J.; Alarcón-Gutiérrez, E.; Perroni, Y. y Barois, I. 2014. Earthworm communities and soil properties in shaded coffee plantations with and without application of glyphosate. *Applied Soil Ecology*, 83: 230-237.
- Gimsing, A.; Borggaard, O. y Bang, M. 2004. Influence of soil composition on adsorption of glyphosate and phosphate by contrasting Danish surface soils. *European Journal of Soil Science*, 55(1): 183-191.
- Givaudan, N.; Binet, F.; Bot, L. y Wiegand, C. 2014. Earthworm tolerance to residual agricultural pesticide contamination: field and experimental assessment of detoxification capabilities. *Environmental and Pollution*, 192: 9-18.
- Hackenberger, D.; Stjepanović, N.; Lončarić, Ž. y Hackenberger, B. 2018. Efectos agudos y subcrónicos de tres herbicidas sobre biomarcadores y reproducción en la lombriz de tierra *Dendrobaena veneta*. *Chemosphere*, 208: 722-730.

- Hattab, S.; Dridi, B.; Chouba, L.; Kheder, M. y Bousetta, H. 2009. Photosynthesis and growth responses of pea *Pisum sativum* L. under heavy metals stress. *Journal of Environmental Sciences*, 21(11): 1552-1556.
- Hernández, J.; Zapata-Vívenes, E.; Marcano, L.; Marcano, E. y Nusetti, O. 2016. Respuestas bioquímicas en la lombriz de tierra *Eisenia andrei* expuesta a cadmio. *Saber*, 28(3): 536-545.
- Hochachka, P. y Somero, G. 2002. *Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution*. Oxford university press. New York, Estados Unidos.
- Holzinger, A.; Mair, M.; Lücker, D.; Seidenath, D.; Opel, T.; Langhof, N., Otti, O. y Feldhaar, H. 2022. Comparison of fitness effects in the earthworm *Eisenia fetida* after exposure to single or multiple anthropogenic pollutants. *Science of the Total Environment*, 92: 156387.
- Huang, C.; Ge, Y.; Yue, S.; Zhao, L. y Qiao, Y. 2021. Los microplásticos agravan la toxicidad conjunta de la lombriz de tierra *Eisenia fetida* con cadmio al alterar su disponibilidad. *Ciencia del Medio Ambiente Total*, 753: 142042.
- Hussain, S.; Siddique, T.; Saleem, M.; Arshad, M. y Khalid, A. 2009. Impacto de los pesticidas en la diversidad microbiana del suelo, enzimas y reacciones enzimas y reacciones bioquímicas. *Advances in Agronomy*, 102: 159-200.
- Kamitani, T. y Kaneko, N. 2007. Species-specific heavy metal accumulation patterns of earthworms on a floodplain in Japan. *Ecotoxicología y Seguridad Ambiental*, 66(1): 82-91.
- Kniss, A. 2017. Tendencias a largo plazo en la intensidad y toxicidad relativa del uso de herbicidas. *Comunicaciones sobre la Naturaleza*, 8(1): 1-7.
- Koch, C. y Sures, B. 2018. Concentraciones ambientales y toxicología del 2, 4, 6-tribromofenol (TBP). *Contaminación Ambiental*, 233: 706-713.
- Kowald, G.; Stürzenbaum, S. y Blindauer, C. 2016. Earthworm *Lumbricus rubellus* MT-2: unión de metales y plegamiento de proteínas de un verdadero cadmio-MT. *Revista Internacional de Ciencias Moleculares*, 17(1): 65.
- Kwiatkowska, M.; Nowacka-Krukowska, H. y Bukowska, B. 2014. El efecto del glifosato, sus metabolitos e impurezas sobre la actividad de la acetilcolinesterasa eritrocítica. *Toxicología Ambiental y Farmacología*, 37(3): 1101-1108.
- Lammertyn, S.; Masín, C.; Zalazar, C. y Fernandez, M. 2021. Biomarkers response and population biological parameters in the earthworm *Eisenia fetida* after short term exposure to atrazine herbicide. *Ecological Indicators*, 121: 107173.
- Liang, J. y Zhou, Q. 2003. Single and binary-combined toxicity of methamidophos, acetochlor and copper acting on earthworms *Eisenia foelide*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 71: 1158-1166.
- Li, X.; Wang, M.; Chen, W. y Uwizeyimana, H. 2018. Ecological risk assessment of polymetallic sites using weight of evidence approach. *Ecotoxicology and*

*Environmental Safety*, 154: 255-262.

- Li, X.; Wang, M.; Jiang, R.; Zheng, L. y Chen, W. 2020. Evaluation of joint toxicity of heavy metals and herbicide mixtures in soils to earthworms (*Eisenia fetida*). *Journal of Environmental Science*, 94: 137-146.
- Li, X.; Li, M.; Sun, N.; He, F.; Chu, S.; Zong, W.; Niu, Q. y Liu, R. 2022. Response of earthworm coelomocytes and catalase to pentanone and hexanone: a revelation of the toxicity of conventional solvents at the cellular and molecular level. *Environmental Science and Pollution Research*, 29: 44282-44296.
- Livingstone, D. 2001. Contaminant stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 42(8): 656-666.
- Lowry, O.; Rosebrough, N.; Farra, A. y Randall, R. 1951. Protein measurement with the folin reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- Lummato, M.; Di Fiori, E.; Sabatini, S.; Cacciatore, L.; Cochón, A.; De Molina, M. y Juárez, A. 2013. Evaluation of biochemical markers in the golden mussel *Limnoperna fortunei* exposed to glyphosate acid in outdoor microcosms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 95: 123-129.
- Marcano, E.; Marcano, L.; Cortesía, A. y Nusetti, O. 2013. Efectos cotóxicos de clorpirifos y malation en la lombriz de tierra *Eisenia* sp. (Annelida: Oligochaeta). *Revista Argentina de Ecotoxicología y Contaminación Ambiental*, 4(1):156-166.
- Marcano, L.; Hernández, J.; Zapata-Vivenes, E. y León, A. 2017. Effects of contaminated natural soil by Glyphosan SL on biochemical responses of the earthworm *Eisenia* sp. *Journal of Toxicology and Environmental*, 9(10): 92-97.
- Marcano, V.; Morales, A.; Sipman, H. y Calderon, L. 1996. A first checklist of the lichen-forming fungi of the Venezuelan Andes. *Tropical Bryology*, 12(1): 193-23.
- Mesnage, R.; Teixeira, M.; Mandrioli, D.; Falcioni, L.; Ducarmon, Q.; Zwittink, R. y Antoniou, M. 2021. Uso de metagenómica y metabolómica de escopeta para evaluar el impacto del glifosato o Roundup MON 52276 en la microbiota intestinal y el metaboloma sérico de ratas Sprague-Dawley. *Perspectivas de Salud Ambiental*, 129(1): 170-205.
- Mincarelli, L.; Tiano, L.; Craft, J.; Marcheggiani, F. y Vischetti, C. 2019. Evaluation of gene expression of different molecular biomarkers of stress response as an effect of copper exposure on the earthworm *Eisenia andrei*. *Ecotoxicology*, 28: 938-948.
- Mkhinini, J. y Jastrzębska, E. 2019. Herbicide toxicity to the California earthworms *Eisenia fetida* and *Dendrobaena veneta*. *Ecological Chemistry and Engineering*, 19(9): 1133-1137.
- Morgan, A.; Turner, M. y Morgan, J. 2002. Morphological plasticity in metal

- sequestering earthworm chlogocytes: morphometric electron microscopy provides a biomarker of exposure in field populations. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21: 610-618.
- Mustonen, M.; Haimi, J.; Vaisanen, A. y Knott, K. 2014. Metallothionein gene expression differs in earthworm populations with different exposure history. *Ecotoxicology*, 23(9): 1-12. DOI: 10.1007/s10646-014-1338-z.
- Niva, C.; Niemeyer, J.; Júnior, F.; Nunes, M.; De Sousa, D.; Aragão, C. y Römbke, J. 2016. Soil ecotoxicology in Brazil is taking its course. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(11): 11363-11378.
- Nuseti, S.; González, J.; Nusetti, O.; Zapata, E.; Obregon, F. y Lima, L. 2015. Efecto del cadmio sobre los niveles de zinc, taurina, aminoácidos neurotransmisores, peroxidación de lípidos y actividad de la lactato deshidrogenasa en la retina de ratas. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*, 48(3): 175-190.
- Owagboriayea, F.; Dedekab, G.; Bamideleb, J.; Aladesidab, A.; Isiborc, P.; Feyisolad, R. y Adelekea, M. 2020. Biochemical response and vermiremediation assessment of three earthworm species (*Alma millsoni*, *Eudrilus eugeniae* and *Libyodrilus violaceus*) in soil contaminated with a glyphosate-based herbicide. *Ecological Indicators*, 108: 105678.
- Pernía, B.; De Sousa, A.; Reyes, R. y Castrillo, M. 2008. Biomarcadores de contaminación por cadmio en las plantas. *Interciencia*, 33(2): 152-189.
- Plant, J.; Smith, D.; Smith, B. y Williams, L. 2001. Environmental geochemistry at the global scale. *Applied Geochemistry*, 16(11-12): 1291-1308.
- Pohanka, M. 2019. Toxicidad de las nanopartículas de cobre y cobre y su impacto en las funciones básicas del organismo. *Bratislavské Lekárske Listy*, 120(6): 397-409.
- Polo, A.; Marcano, L.; Granadillo, M.; Marcano, E.; Cortesia, C. y Hernandez, J. 2011. Crecimiento y reproducción de la lombriz roja californiana (*Eisenia andrei*) en sustratos con cadmio. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*, 45(2): 123-134.
- Rendón-von, O. y Dzul-Caamal, R. 2017. Residuos de glifosato en aguas subterráneas, agua potable y orina de agricultores de subsistencia de localidades de agricultura intensiva: una encuesta en Hopelchén, Campeche, México. *International Journal Environmental Research Public Health*, 14(6): 595.
- Rico, A.; Sabater, C. y Castillo, M. 2016. Lethal and sub-lethal effects of five pesticides used in rice farming on the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicología y Seguridad Ambiental*, 127: 222-229.
- Rodríguez-Seijo, A.; Da Costa, J.; Rocha-Santos, T.; Duarte, A. y Pereira, R. 2018. Oxidative stress, energy metabolism and molecular responses of earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to low-density polyethylene microplastics. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(33): 33599-33610.

- Salvio, C.; Menone, M.; Rafael, S.; Iturburu, F. y Manetti, P. 2016. Survival, reproduction, avoidance behavior and oxidative stress biomarkers in the earthworm *Octolasion cyaneum* exposed to glyphosate. *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology*, 96(3): 314-319.
- Samal, S.; Mishra, C. y Sahoo, S. 2019. Setal-epidermal, muscular and enzymatic anomalies induced by certain agrochemicals in the earthworm *Eudrilus eugeniae* (Kinberg). *Environmental Science and Pollution Research*, 26(8): 8039-8049.
- Santana, N.; Ferreira, P.; Tarouco, C.; Schardong, I.; Antonioli, Z.; Nicoloso, F. y Jacques, R. 2019. Earthworms and mycorrhization increase copper phytoextraction by *Canavalia ensiformis* in sandy soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 182: 109-122.
- Schettino, T.; Caricato, A.; Calisi, M.; Giordano, E. y Lionetto, M. 2012. Biomarker approach in marine monitoring and assessment: new insights and perspectives. *Open Environmental Sciences*, 6: 20-27.
- Shekari, M.; Sendi, J.; Etebari, K.; Ziaee, A. y Shadparvar, A. 2008. Effects of *Artemisia annua* L. (Asteracea) on nutritional physiology and enzyme activities of elm leaf beetle, *Xanthogaleruca luteola* Mull. (Coleoptera: Chrysomellidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 91(1): 66-74.
- Sheng, Y.; Liu, Y.; Wang, K.; Cizdziel, J.; Wu, Y. y Zhou, Y. 2021. Ecotoxicological effects of micronized car tire wear particles and their heavy metals on the earthworm (*Eisenia fetida*) in soil. *Science of the Total Environment*, 793:148613. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.148613.
- Sierra, E.; Méndez, M.; Sarria, V. y Cortés, M. 2008. Electrooxidación de glifosato sobre electrodos de níquel y cobre. *Química Nova*, 31(2): 220-226.
- Spurgeon, D y Hopkin, S. 1996. Effects of metal-contaminated soils on the growth, sexual development, and early cocoon production of the earthworm *Eisenia fetida*, with particular reference to zinc. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 35(1): 86-95.
- Stephensen, E.; Sturve, J. y Förlin, L. 2002. Effects of redox cycling compounds on glutathione content and activity of glutathione-related enzymes in rainbow trout liver. *Comparative Biochemical Physiology*, 133: 435-442.
- Stürzenbaum, S.; Georgiev, O.; Morgan, J. y Kille, P. 2004. Cadmium in earthworms: from genes to cells. *Environmental Science y Technology*, 38(23): 6283-6289.
- Sokal, R. y Rohlf, F. 1969. *The principles and practices of statistics in biological research*. W.H. Freeman. San Francisco, EE.UU.
- Taiz, L.; Zeiger, E. y Moller, I. 2017. *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. Artmed Editora LTDA. Porto Alegre, Brasil.
- Tripathi, G; Kachhwaha, N. y Dabi, I. 2009. Impact of phorate on malate dehydrogenases, lactate dehydrogenase and proteins of epigeic, anecic

- andendogeic earthworms. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 95: 100-105.
- Tripathi, G.; Kachhwaha, N.; Dabi, I. y Bandooni, N. 2011. Temperature dependent alterations in metabolic enzymes and proteins of three ecophysiologicaly different species of earthworms. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54: 769-776.
- Tsui, M.; Wang, W. y Chu, L. 2005. Influence of glyphosate and its formulation (Roundup (R)) on the toxicity and bioavailability of metals to *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Pollution*, 138: 59-68.
- US EPA (Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos). 1993. *EPA Reregistration eligibility document, glyphosate. Office of prevention, pesticides and toxic substances*. United States Environmental Protection Agency. Washington DC, Estados Unidos.
- Uwizeyimana, H.; Wang, M.; Chen, W. y Khan, K. 2017. Los efectos eco-tóxicos de plaguicidas y mezclas de metales pesados sobre las lombrices de tierra en el suelo. *Toxicología y Farmacología Ambiental*, 55: 20-29.
- Van Bruggen, A.; He, M.; Shin, K.; Mai, V.; Jeong, K.; Finckh, M. y Morris, Jr. 2018. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Science of the Total Environment*, 616: 255-268.
- Wallace, D. y Djordjevic, A. 2020. Heavy metal and pesticide exposure: A mixture of potential toxicity and carcinogenicity. *Opinión Actual en Toxicología*, 19: 72-79.
- Wang, K.; Mu, X.; Qi, S.; Chai, T.; Pang, S.; Yang, Y. y Jiang, J. 2015. Toxicity of a neonicotinoid insecticide, guadipyr, in earthworm (*Eisenia fetida*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 114: 17-22.
- Wang, M.; Cheng, F. y Si, Y. 2009. The inhibition of the combined pollution of copper and glyphosate to the seed germination and root elongation of wheat. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 4: 591-596.
- Wang, Z. y Cui, Z. 2016. Accumulation, biotransformation, and multi-biomarker responses after exposure to arsenic species in the earthworm *Eisenia fetida*. *Toxicology Research*, 5: 500-510.
- Yashin, A.; Yashin, Y.; Xia, X. y Nemzer, B. 2017. Antioxidant activity of spices and their impact on human health: a review. *Antioxidants*, 6(7): 1-18.
- Zaltauskaite, L. y Sodiene, E. 2014. Effects of cadmium and lead on the life-cycle parameters of juvenile earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 103: 9-16.
- Zapata-Vívenes, E. y Aparicio, G. 2019. Defensas antioxidantes en el fluido celómico del erizo negro *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758) estimulado con inóculos bacterianos. *Revista Ciencias Marinas y Costera*, 11(1): 27-42.
- Zhang, C.; Dai, J.; Chen, X.; Li, H. y Lavelle, P. 2020. Effects of a native earthworm species (*Amyntas morrisi*) and *Eisenia fetida* on metal fractions in a multi-metal

polluted soil from South China. *Acta Oecology*, 102: 103503.

Zheng, K.; Liu, Z.; Li, Y.; Cui, Y. y Li, M. 2013. Respuestas toxicológicas de lombrices de tierra (*Eisenia fetida*) expuestas a suelos contaminados con metales. *Investigación de la Ciencia Ambiental y la Contaminación*, 20(12): 8382-8390.

Zhou, C.; Wang, Y.; Li, C.; Sun, R.; Yu, Y. y Zhou, D. 2013. Subacute toxicity of copper and glyphosate and their interaction to earthworm (*Eisenia fetida*). *Environmental Pollution*, 180: 71-77.



## APÉNDICES

Apéndices 1. Prueba de Kruskal-Wallis de la actividad enzimática de la LDH (U/g.m.h.) en el tegumento de la región anterior de *E. andrei* controles y expuestas a dosis subletales de cobre, glifosato y sus mezclas de cobre y glifosato.

Tratamiento	Recuento	Promedio	De	KW	P
Control	12	2,65344	0,621033	21,1963	0,0016914
Cu1	12	4,99640	2,386280		
Cu2	12	7,68831	5,001990		
GFS1	12	4,00066	1,207320		
GFS2	12	4,09113	1,723780		
MEZ1	12	4,51130	1,348580		
MEZ2	12	4,89859	1,379010		
Total	84	4,69140	2,691860		

De: desviación estándar, KW: Kruskal-Wallis y P: probabilidad.

Apéndices 2. Prueba de Kruskal-Wallis de la actividad enzimática de la LDH (U/g.m.h.) en el tegumento de la región posterior de *E. andrei* controles y expuestas a dosis subletales de cobre, glifosato y sus mezclas de cobre y glifosato.

Tratamiento	Recuento	Promedio	De	KW	P
Control	12	2,48378	0,423358	35,5481	0,0000033
Cu1	12	4,78432	1,680440		
Cu2	12	7,80520	4,282020		
GFS1	12	4,66007	1,276620		
GFS2	12	4,90345	1,930280		
MEZ1	12	6,33693	1,998460		
MEZ2	12	6,22056	1,835120		
Total	84	5,31347	2,639250		

De: desviación estándar, KW: Kruskal-Wallis y P: probabilidad.

Apéndices 3. Prueba de Mann-Whitney de la actividad enzimática de la LDH (U/g.m.h.) en el tegumento de la región anterior y posterior de *E. andrei* controles y expuestas a dosis subletales de cobre, glifosato y sus mezclas de cobre y glifosato.

Región	Recuento	Promedio	De	MW	P
Anterior	84	4,69140	2,69186	646,5	0,0404323
Posterior	84	5,31347	2,63925		
Total	168				

De: desviación estándar, MW: Mann-Whitney y P: probabilidad.

Apéndices 4. Prueba de Mann-Whitney de la actividad enzimática de la LDH (U/g.m.h.) en el tegumento de la región anterior de *E. andrei* controles y expuestas a dosis subletales de cobre, glifosato y sus mezclas de cobre y glifosato durante 7 y 28 días.

Tiempo	Recuento	Promedio	De	MW	P
7 días	42	3,58311	1,22268	423,0	0,0001569
28 días	42	5,79970	3,26458		
Total	84				

De: desviación estándar, MW: Mann-Whitney y P: probabilidad.

Apéndices 5. Prueba de Mann-Whitney de la actividad enzimática de la LDH (U/g.m.h.) en el tegumento de la región posterior de *E. andrei* controles y expuestas a dosis subletales de cobre, glifosato y sus mezclas de cobre y glifosato durante 7 y 28 días.

Tiempo	Recuento	Promedio	De	MW	P
7 días	42	4,48075	2,06213	346,0	0,0019949
28 días	42	6,14619	2,90313		
Total	84				

De: desviación estándar, MW: Mann-Whitney y P: probabilidad.

Apéndices 6. Prueba de Kruskal-Wallis de la concentración de proteínas (mg/g.m.h.) en el tegumento de la región anterior de *E. andrei* controles y expuestas a dosis subletales de cobre, glifosato y sus mezclas de cobre y glifosato.

Tratamiento	Recuento	Promedio	De	KW	P
Control	12	82,6445	15,5651	8,81138	0,184467
Cu1	12	84,4360	29,4673		
Cu2	12	93,4114	53,8068		
GFS1	12	82,0963	33,2044		
GFS2	12	110,5610	33,1516		
MEZ1	12	98,8642	21,0508		
MEZ2	12	100,3040	49,6867		
Total	84	93,1881	36,1819		

De: desviación estándar, KW: Kruskal-Wallis y P: probabilidad.

Apéndices 7. Prueba de Kruskal-Wallis de la concentración de proteínas (mg/g.m.h.) en el tegumento de la región posterior de *E. andrei* controles y expuestas a dosis subletales de cobre, glifosato y sus mezclas de cobre y glifosato.

Tratamiento	Recuento	Promedio	De	KW	P
Control	12	86,4789	32,6205	24,5	0,0004224
Cu1	12	78,7619	32,5987		
Cu2	12	98,0875	46,3007		
GFS1	12	125,8740	25,2191		
GFS2	12	137,4120	31,0578		
MEZ1	12	97,5728	16,8315		
MEZ2	12	107,1720	27,2449		
Total	84	104,4800	35,9627		

De: desviación estándar, KW: Kruskal-Wallis y P: probabilidad.

Apéndices 8. Prueba de Mann-Whitney de la concentración de proteínas (mg/g.m.h.) en el tegumento de la región anterior y posterior de *E. andrei* controles y expuestas a dosis subletales de cobre, glifosato y sus mezclas de cobre y glifosato.

Región	Recuento	Promedio	De	MW	P
Anterior	84	93,1881	36,1819	722,5	0,0219991
Posterior	84	104,4800	35,9627		
Total	168				

De: desviación estándar, MW: Mann-Whitney y P: probabilidad.

Apéndices 9. Prueba de Mann-Whitney de la concentración de proteínas (mg/g.m.h.) en el tegumento de la región anterior de *E. andrei* controles y expuestas a dosis subletales de cobre, glifosato y sus mezclas de cobre y glifosato durante 7 y 28 días.

Tiempo	Recuento	Promedio	De	MW	P
7 días	42	77,0282	28,9210	467,5	0,0000294
28 días	42	109,3480	35,7594		
Total	84				

De: desviación estándar, MW: Mann-Whitney y P: probabilidad.

Apéndices 10. Prueba de Mann-Whitney de la concentración de proteínas (mg/g.m.h.) en el tegumento de la región posterior de *E. andrei* controles y expuestas a dosis subletales de cobre, glifosato y sus mezclas de cobre y glifosato durante 7 y 28 días.

Tiempo	Recuento	Promedio	De	MW	P
7 días	42	92,8235	38,5468	358,0	0,0013823
28 días	42	116,1360	29,2226		
Total	84				

De: desviación estándar, MW: Mann-Whitney y P: probabilidad.

Apéndice 11. Prueba de Kruskal-Wallis de la actividad enzimática de la catalasa (U/g.m.h.) en el tegumento de la región anterior de *E. andrei* controles y expuestas a dosis subletales de cobre, glifosato y sus mezclas de cobre y glifosato.

Tratamiento	Recuento	Promedio	De	KW	P
Control	12	518,913	228,8230	14,4508	0,0249865
Cu1	12	354,811	200,1460		
Cu2	12	517,819	241,8310		
GFS1	12	584,349	322,2030		
GFS2	12	572,206	263,2490		
MEZ1	12	369,403	122,5400		
MEZ2	12	318,355	99,2071		
Total	84	462,265	238,6610		

De: desviación estándar, KW: Kruskal-Wallis y P: probabilidad.

Apéndice 12. Prueba de Kruskal-Wallis de la actividad enzimática de la catalasa (U/g.m.h.) en el tegumento de la región posterior de *E. andrei* controles y expuestas a dosis subletales de cobre, glifosato y sus mezclas de cobre y glifosato.

Tratamiento	Recuento	Promedio	De	KW	P
Control	12	631,091	229,314	30,8508	0,000027
Cu1	12	456,880	178,393		
Cu2	12	574,716	200,885		
GFS1	12	758,336	393,789		
GFS2	12	958,974	290,413		
MEZ1	12	412,632	262,610		
MEZ2	12	416,572	85,4646		
Total	84	601,314	306,201		

De: desviación estándar, KW: Kruskal-Wallis y P: probabilidad.

Apéndices 13. Prueba de Mann-Whitney de la actividad enzimática de la catalasa (U/g.m.h.) en el tegumento de la región anterior y posterior de *E. andrei* controles y expuestas a dosis subletales de cobre, glifosato y sus mezclas de cobre y glifosato.

Región	Recuento	Promedio	De	MW	P
Anterior	84	462,265	238,661	1077,0	0,0006379
Posterior	84	601,314	306,201		
Total	168				

De: desviación estándar, MW: Mann-Whitney y P: probabilidad.

Apéndices 14. Prueba de Mann-Whitney de la actividad enzimática de la catalasa (U/g.m.h.) en el tegumento de la región anterior de *E. andrei* controles y expuestas a dosis subletales de cobre, glifosato y sus mezclas de cobre y glifosato durante 7 y 28 días.

Tiempo	Recuento	Promedio	De	MW	P
7 días	42	355,936	150,722	428,5	0,0001287
28 días	42	568,594	263,490		
Total	84				

De: desviación estándar, MW: Mann-Whitney y P: probabilidad.

Apéndices 15. Prueba de Mann-Whitney de la actividad enzimática de la catalasa (U/g.m.h.) en el tegumento de la región posterior de *E. andrei* controles y expuestas a dosis subletales de cobre, glifosato y sus mezclas de cobre y glifosato durante 7 y 28 días.

Tiempo	Recuento	Promedio	De	MW	P
7 días	42	536,764	223,748	175,5	0,117446
28 días	42	665,865	362,222		
Total	84				

De: desviación estándar, MW: Mann-Whitney y P: probabilidad.

Apéndices 16. Análisis de varianza del contenido de grupos tioles totales  $\mu\text{mol/L}$  de -SH/ (U/g.m.h.) en el tegumento de la región anterior de *E. andrei* controles y expuestas a dosis subletales de cobre, glifosato y sus mezclas de cobre y glifosato.

Fuente de variación	Sc	Gl	Mc	Fs	Valor-P
Entre grupos	3,73918	6	623197,0	1,67	0,1389
Intra grupos	2,86784	77	372447,0		
Total	3,24176	83			

Sc: suma de cuadrados, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

Apéndice 17. Promedio del contenido de grupos tioles totales  $\mu\text{mol/L}$  de -SH/ (U/g.m.h.) en el tegumento de la región anterior de *E. andrei* controles y expuestas a dosis subletales de cobre, glifosato y sus mezclas de cobre y glifosato.

Tratamiento	Recuento	Promedio	De
Control	12	1342,16	174,863
Cu1	12	1593,13	780,023
Cu2	12	1710,22	502,894
GFS1	12	1492,87	781,273
GFS2	12	1446,14	668,305
MEZ1	12	1089,72	467,418
MEZ2	12	1139,76	663,110
Total	84	1402,00	624,959

De: desviación estándar.

Apéndices 18. Análisis de varianza del contenido de grupos tioles totales  $\mu\text{mol/L}$  de -SH/ (U/g.m.h.) en el tegumento de la región posterior de *E. andrei* controles y expuestas a dosis subletales de cobre, glifosato y sus mezclas de cobre y glifosato.

Fuente de variación	Sc	Gl	Mc	Fs	Valor-P
Entre grupos	5,15625	6	859374,0	1,80	0,1109
Intra grupos	3,68422	77	478470,0		
Total	4,19984	83			

Sc: suma de cuadrados, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

Apéndice 19. Promedio del contenido de grupos tioles totales  $\mu\text{mol/L}$  de -SH/ (U/g.m.h.) en el tegumento de la región posterior de *E. andrei* controles y expuestas a dosis subletales de cobre, glifosato y sus mezclas de cobre y glifosato.

Tratamiento	Recuento	Promedio	De
Control	12	1792,95	586,408
Cu1	12	1556,00	625,718
Cu2	12	2032,78	560,652
GFS1	12	1457,96	527,732
GFS2	12	1763,48	899,444
MEZ1	12	1449,76	787,206
MEZ2	12	1232,85	769,655
Total	84	1612,26	711,341

De: desviación estándar.

Apéndices 20. Prueba T-Student del contenido de grupos tioles totales  $\mu\text{mol/L}$  de -SH/ (U/g.m.h.) en el tegumento de la región anterior y posterior de *E. andrei* controles y expuestas a dosis subletales de cobre, glifosato y sus mezclas de cobre y glifosato.

Región	Recuento	Promedio	De	Ts	P
Anterior	84	1402,00	624,959	-2,03512	0,0434298
Posterior	84	1612,26	711,341		
Total	168				

De: desviación estándar, Ts: T-Student y P: probabilidad.

Apéndices 21. Prueba de T-Student del contenido de grupos tioles totales  $\mu\text{mol/L}$  de -SH/ (U/g.m.h.) en el tegumento de la región anterior de *E. andrei* controles y expuestas a dosis subletales de cobre, glifosato y sus mezclas de cobre y glifosato durante 7 y 28 días.

Tiempo	Recuento	Promedio	De	Ts	P
7 días	42	1025,81	443,144	59,30	0,194567
28 días	42	1778,20	551,679		
Total	84				

De: desviación estándar, Ts: T-Student y P: probabilidad.

Apéndices 22. Prueba de T-Student del contenido de grupos tioles totales  $\mu\text{mol/L}$  de -SH/ (U/g.m.h.) en el tegumento de la región posterior de *E. andrei* controles y expuestas a dosis subletales de cobre, glifosato y sus mezclas de cobre y glifosato durante 7 y 28 días.

Tiempo	Recuento	Promedio	De	Ts	P
7 días	42	1251,50	634,231	42,25	0,214561
28 días	42	1973,01	596,213		
Total	84				

De: desviación estándar, Ts: T-Student y P: probabilidad.

Apéndices 23. Análisis de varianza de los niveles de MDA (U/g.m.h.) en el tegumento de la región anterior de *E. andrei* controles y expuestas a dosis subletales de cobre, glifosato y sus mezclas de cobre y glifosato.

Fuente de variación	Sc	Gl	Mc	Fs	Valor-P
Entre grupos	1,30766	6	217944,0	2,36	0,0382
Intra grupos	7,11496	77	92402,1		
Total	8,42262	83			

Sc: suma de cuadrados, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

Apéndice 24. Promedio de los niveles de MDA (U/g.m.h.) en el tegumento de la región anterior de *E. andrei* controles y expuestas a dosis subletales de cobre, glifosato y sus mezclas de cobre y glifosato.

Tratamiento	Recuento	Promedio	De
Control	12	148,086	51,8817
Cu1	12	404,469	307,376
Cu2	12	515,144	433,046
GFS1	12	342,780	281,745
GFS2	12	443,614	324,992
MEZ1	12	212,803	130,200
MEZ2	12	455,199	400,203
Total	84	360,299	318,555

De: desviación estándar.

Apéndices 25. Análisis de varianza de los niveles de MDA (U/g.m.h.) en el tegumento de la región posterior de *E. andrei* controles y expuestas a dosis subletales de cobre, glifosato y sus mezclas de cobre y glifosato.

Fuente de variación	Sc	Gl	Mc	Fs	Valor-P
Entre grupos	1,64635	6	274391,0	2,68	0,0203
Intra grupos	7,86908	77	102196,0		
Total	9,51543	83			

Sc: suma de cuadrados, Gl: grados de libertad, Mc: medias cuadráticas, Fs: Fisher y P: probabilidad.

Apéndice 26. Promedio de los niveles de MDA (U/g.m.h.) en el tegumento de la región posterior de *E. andrei* controles y expuestas a dosis subletales de cobre, glifosato y sus mezclas de cobre y glifosato.

Tratamiento	Recuento	Promedio	De
Control	12	139,092	43,2346
Cu1	12	448,282	259,988
Cu2	12	577,822	487,393
GFS1	12	364,815	302,945
GFS2	12	481,393	380,696
MEZ1	12	247,017	145,172
MEZ2	12	468,340	388,040
Total	84	389,537	338,591

De: desviación estándar.



Apéndices 27. Prueba de T-Student de los niveles de MDA (U/g.m.h.) en el tegumento de la región anterior y posterior de *E. andrei* controles y expuestas a dosis subletales de cobre, glifosato y sus mezclas de cobre y glifosato.

Región	Recuento	Promedio	De	Ts	P
Anterior	84	360,299	318,555	-0,576422	0,56511
Posterior	84	389,537	338,591		
Total	168				

De: desviación estándar, Ts: T-Student y P: probabilidad.

Apéndices 28. Prueba T-Student de los niveles de MDA (U/g.m.h.) en el tegumento de la región anterior de *E. andrei* controles y expuestas a dosis subletales de cobre, glifosato y sus mezclas de cobre y glifosato durante 7 y 28 días.

Tiempo	Recuento	Promedio	De	Ts	P
7 días	42	126,809	52,6803	-9,88494	0,0
28 días	42	593,790	301,5950		
Total	84				

De: desviación estándar, Ts: T-Student y P: probabilidad.

Apéndices 29. Prueba T-Student de los niveles de MDA (U/g.m.h.) en el tegumento de la región posterior de *E. andrei* controles y expuestas a dosis subletales de cobre, glifosato y sus mezclas de cobre y glifosato durante 7 y 28 días.

Tiempo	Recuento	Promedio	De	Ts	P
7 días	42	147,105	80,2195	-9,40327	0,0
28 días	42	631,970	324,3980		
Total	84				

De: desviación estándar, Ts: T-Student y P: probabilidad.

Apéndices 30. Promedios de los parámetros estudiados en el tegumento de la región anterior y posterior de *E. andrei* controles y expuestas a diferentes tratamientos con dosis subletales de cobre, glifosato y sus mezclas de cobre y glifosato.

Parámetros bioquímicos	R.A $\bar{x} \pm DE$	R.P $\bar{x} \pm DE$
Catalasa	462,26±238,66	601,31±306,2*
Tioles	1402,0±624,95	1612,26±711,34*
Proteína	93,18±36,18	104,48±35,96*
MDA	360,29±318,55	389,53±338,59ns
LDH	4,69±2,69	5,31±2,63*

R.A=Región anterior; R.P= Región posterior; El asterisco (\*) muestra diferencias significativas  $p<0,05$  y ns: no significativo  $p>0,05$ .

Apéndice 31. Promedios de los parámetros estudiados en el tegumento de la región anterior y posterior de *E. andrei* controles y expuestas a diferentes tratamientos con dosis subletales de cobre, glifosato y sus mezclas de cobre y glifosato durante 7 y 28 días.

Parámetros bioquímicos	R.A		R.P	
	7 $\bar{X} \pm DE$	28 $\bar{X} \pm DE$	7 $\bar{X} \pm DE$	28 $\bar{X} \pm DE$
Catalasa	355,93±150,72	568,59±263,49*	536,76±223,74	665,86±362,22 <sup>ns</sup>
Tioles	1025,8±443,14	1778,2±551,6 <sup>ns</sup>	1251,5±634,2	1973,01±596,21 <sup>ns</sup>
Proteína	77,02±28,92	109,34±35,75*	92,82±38,54	116,13±29,22*
MDA	126,80±52,68	593,79±301,59*	147,10±80,21	631,97±324,39*
LDH	3,58±1,22	5,79±3,26*	4,48±2,06	6,14±2,90*

R.A=Región anterior; R.P= Región posterior; El asterisco (\*) muestra diferencias significativas  $p<0,05$  y ns: no significativo  $p>0,05$ .

## HOJAS DE METADATOS

### Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6

<b>Título</b>	Efectos del cobre, el glifosato y su interacción sobre biomarcadores moleculares en la lombriz de tierra <i>Eisenia andrei</i> (Annelida: Oligochaeta)
<b>Subtítulo</b>	

#### Autor (es):

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Salazar C. Loreanny del C.	<b>CVLAC</b>	25 100 645
	<b>e-mail</b>	<i>loreanny.slzr@gmail.com</i>
	<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:

<i>eisenia andrei</i>
cobre
glifosato
catalasa
estrés oxidativo

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

### Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Biología

### Resumen (abstract):

En este estudio se evaluaron los efectos agudos (7 días) y crónicos (28 días) del cobre, glifosato y sus mezclas sobre biomarcadores moleculares en la región anterior y posterior de *Eisenia andrei*. Se utilizaron lombrices de tierra cliteladas y se distribuyeron en seis grupos, cada uno conformado por ocho réplicas, contenidos en 200 g de sustrato mezclado con los tratamientos experimentales (dos concentraciones de cobre, dos de glifosato a diferentes concentraciones y dos soluciones de mezcla alternando dosis baja y alta de ambos compuestos), y con agua destilada para el tratamiento control. Para cada tratamiento, se contaminaron aleatoriamente 10 lombrices adultas de peso similar en cada recipiente plástico. El experimento duró 28 días y cada dos semanas se cambió el medio de cultivo para reemplazar los contaminantes y los micronutrientes. Por cada tratamiento experimental, transcurridos los 7 y 28 días de exposición se tomaron al azar cinco lombrices para la determinación de los parámetros fisiológicos (lactato deshidrogenasa; LDH y proteínas totales; PT), las defensas antioxidantes (catalasa y tioletos totales) y daño oxidativo (concentración de malondialdehído; MDA). Los resultados muestran que la actividad de LDH aumentó significativamente en los organismos sujetos a los distintos tratamientos en cada región; en esta variable se encontraron diferencias entre las dos regiones corporales y entre los tiempos de exposición para cada región. Las PT sólo de la región posterior fueron afectadas por los tratamientos; el tiempo de exposición afectó esta variable en las dos regiones y entre cada región también variaron las PT. La actividad de la enzima CAT fue afectada por todos los tratamientos químicos en ambas regiones, tales efectos fueron diferentes entre las regiones y el tiempo de exposición sólo afectó la actividad de CAT en la región posterior. Se observaron incrementos significativos de MDA en ambas regiones corporales de *E. andrei*, principalmente a los 28 días. Los diferentes tratamientos ejercieron un efecto significativo sobre los niveles de MDA en las dos regiones. Tales efectos fueron diferentes entre los tiempos de exposición tanto para región anterior como para la región posterior, sin embargo, no existieron diferencias significativas entre regiones para esta variable. En general, los incrementos en los BMs fisiológicos (LDH y PT) y de defensas antioxidantes (CAT) principalmente en la región posterior de *E. andrei* durante el periodo de exposición crónico (28 días) no fueron suficientes para evitar el desarrollo de estrés oxidativo, tal como lo evidencia el incremento de MDA en ambas regiones para ese periodo. Las diferencias encontradas entre los BMs en ambas regiones corporales sugiere una distribución estratégica de las moléculas que conforman las defensas antioxidantes para regular los inductores de daños oxidativos, preservando las estructuras reproductivas en la región anterior y activando preferiblemente en la región posterior los mecanismos necesarios para bioacumular, destoxificar y facilitar la eliminación de los xenobióticos.

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

### Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Marcano Leida del V.	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	8 219 437
	e-mail	<i>Leimar0501@gmail.com</i>
	e-mail	
Martins Carmen	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	11376329
	e-mail	<i>Beatrizmh17@gmail.com</i>
	e-mail	
Anton Yanet	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	<i>Yanetanton2019@gmail.com</i>
	e-mail	
	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

### Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
10	03	2023

Lenguaje: spa.

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

**Archivo (s):**

<b>Nombre de archivo</b>	<b>Tipo MIME</b>
NSUTTG_SCLD2023	Word 1997-2003

**Alcance:**

**Espacial:** Nacional (Opcional)

**Temporal:** Temporal (Opcional)

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

Licenciado en Biología

**Nivel Asociado con el Trabajo:** Licenciado

**Área de Estudio:** Biología

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

Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre

# 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"**.

Letdo 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.



Cordialmente,

**JUAN A. BOLANOS CUNDELE**  
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/maruja

Apartado Correos 094 / Telfs: 4008042 - 4008044 / 8008045 Telefax: 4008043 / Cumaná - Venezuela

## 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”.

Loreanny Salazar

---

Loreanny del C. Salazar C.  
AUTORA



---

Leida del V. Marcano  
TUTORA