

Ensayo estandarizado (ISO 17512) de comportamiento de evitación de suelos contaminados II. Respuesta de distintos biomarcadores tras la exposición a dimetoato en la lombriz de tierra *Aporrectodea caliginosa*.

Martínez-Morcillo S.*, Asensio G., Míguez-Santiyán M.P., Soler F., Hernández-Moreno D., Pérez-López M.*

Unidad de Toxicología. Facultad de Veterinaria (UEx). Avda de la Universidad s/n. 10003 Cáceres.

Resumen: En la primera parte del presente estudio, publicado en 2021, se mostraron los resultados obtenidos al aplicar el ensayo estandarizado de la Organización Internacional de Normalización (ISO) 17512-1:2008. En dicho trabajo se evaluó la toxicidad producida por el plaguicida organofosforado dimetoato en el suelo, utilizando la capacidad de repulsión o evitación que presentan las lombrices de tierra de la especie *Aporrectodea caliginosa*. En esta segunda parte, para evaluar los efectos subletales producidos por el dimetoato sobre las lombrices, se han determinado como biomarcadores la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE, cuya inhibición es el principal mecanismo de acción de este tipo de compuestos) y la actividad glutatión S-transferasa (GST, que comúnmente se activa como mecanismo de detoxificación de plaguicidas). Las concentraciones seleccionadas han sido 0,06, 0,3 y 1,5 mg/kg de suelo, ensayada cada una de ellas por triplicado, empleando 10 lombrices por cada réplica.

La actividad AChE se inhibió significativamente en la exposición a las tres concentraciones empleadas. No se ha producido aumento de la actividad GST que, por el contrario, aparece significativamente inhibida a la concentración más alta de plaguicida ensayada. La falta de una inducción de la actividad GST puede deberse a que el mecanismo de detoxificación no se ha puesto en marcha por el corto tiempo de exposición al plaguicida. Estos resultados reflejan la sensibilidad de la AChE como biomarcador de la contaminación de los suelos con organofosforados.

Palabras clave: lombriz de tierra, dimetoato, organofosforado, biomarcador, colinesterasa, glutatión s-transferasa.

Abstract: *Standardized avoidance test (ISO 17512) for contaminated soils II. Response of different biomarkers after exposure to dimethoate in earthworm *Aporrectodea caliginosa*.*

In the first part of this study, published in 2021, the results obtained when applying the standardized test of the International Organization of Standardization (ISO) 17512-1:2008 were shown. In this study, the toxicity produced by the pesticide organophosphate dimethoate in the soil was evaluated, using the capacity of repulsion or avoidance that presents the earthworms *Aporrectodea caliginosa*. To evaluate the sublethal effects produced by dimethoate on worms, the activities of the acetylcholinesterase enzyme (AChE, the inhibition of which is the main mechanism of action of this type of compound) and glutathione S-transferase enzyme (GST, which is commonly activated as a pesticide detoxification mechanism) have been determined. The commercial product called DIMAFID40, whose active substance is the organophosphate pesticide dimethoate, was used. The selected concentrations were 0.06, 0.3 and 1.5 mg / kg of soil, each one tested in triplicate, using 10 worms per replicate.

The AChE activity was significantly inhibited after exposure to the three assayed concentrations. With respect to GST activity, it was not increased but significantly inhibited after exposition to the highest concentration of pesticide. The non-appearance of an induction of GST activity may be due to the fact that the detoxification mechanism has not been started because the time of exposure to the pesticide has been too short. These results reflect the sensibility of AChE as a biomarker of the contamination in soils with organophosphate.

Keywords: earthworm, dimethoate, organophosphate, biomarker, cholinesterase, glutathione s-transferase.

Introducción

Los ensayos estandarizados constituyen una herramienta de máxima actualidad en Ecotoxicología. Concretamente, para poder evaluar la presencia y efecto de los contaminantes en los suelos, los ensayos de evitación con lombrices poseen una gran relevancia como herramientas de alerta temprana, como pusimos de manifiesto en un trabajo previo (Asensio et al., 2021), al evaluar la capacidad de las lombrices para detectar la contaminación de un suelo y responder huyendo de éste. Por otro lado, el uso de biomarcadores en Ecotoxicología es una herramienta fundamental en la evaluación de la exposición y efectos de diferentes sustancias potencialmente tóxicas. Uno de los más utilizados es la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), principal diana de los compuestos organofosforados, que producen la inhibición de dicha actividad, de modo que la enzima resulta un marcador muy sensible de los efectos que estos plaguicidas tienen en los organismos del suelo (Schreck y col., 2008). Otra enzima cuya actividad es ampliamente analizada en estudios toxicológicos es glutatión S-transferasa (GST), enzima de biotransformación de fase II implicada en el metabolismo de los plaguicidas. El estudio de este mecanismo de las lombrices como herramienta para “descontaminarse” de los compuestos tóxicos, puede proporcionar importante información sobre la capacidad de adquirir resistencias en organismos del suelo (Sanchez-Hernandez y col., 2014). En todo caso, si bien estos biomarcadores no proporcionan directamente información sobre los efectos que los productos químicos producen en los niveles más altos de organización biológica, sí que proporcionan una información valiosa que sirve como alerta temprana del impacto biológico de los xenobióticos (Pérez-López y col., 2002).

Estos biomarcadores permiten llevar a cabo una evaluación de los efectos subletales que los contaminantes producen en las lombrices de tierra, proporcionando información importante acerca del mecanismo de acción de la sustancia (Mosleh y col., 2003). Sería por ejemplo el caso de la ya mencionada actividad enzimática AChE, que debería ser un buen marcador de exposición a los insecticidas organofosforados (Mazzia y col., 2018). Es importante destacar que, en las lombrices de tierra, como en la mayoría de los organismos, el músculo se contrae gracias a los impulsos nerviosos mediados por la acetilcolina, cuya concentración en las terminales sinápticas nerviosas depende de la actividad AChE (Rodríguez y col., 2018). Pero es importante identificar otros biomarcadores que puedan ayudar a detectar la presencia específica de un pesticida en el medio, o las diversas vías de metabolismo y eliminación o resistencia de sustancias tóxicas (Edwards, 2004). En este sentido, Sanchez-Hernandez y col. (2014) sugieren que la ausencia de una respuesta clara de evitación observada en las lombrices expuestas a ciertos pesticidas podría explicarse como una tolerancia aumentada de las lombrices a concentraciones altas de plaguicidas organofosforados, asociado a la inducción y/o inhibición de ciertas vías de biotransformación por parte de estos contaminantes, entre las que se encuentran, en un lugar destacado, las GST.

Con estas consideraciones, el objetivo del presente estudio ha sido evaluar los efectos subletales provocados en las lombrices de tierra, mediante el empleo de los biomarcadores enzimáticos AChE y GST, así como analizar la existencia de correlación entre las respuestas de las actividades enzimáticas analizadas (AChE y GST) en los animales

*e-mail: marcospl@unex.es

expuestos a diferentes concentraciones de DIMAFID40, tras la realización de un ensayo estandarizado de evitación.

Materiales y métodos

Ensayo de evitación

El ensayo de evitación y los reactivos empleados han sido explicados previamente en el artículo que puede consultarse en la página web de la Revista de Toxicología, publicado recientemente (Asensio et al., 2021).

Preparación de las muestras para los análisis enzimáticos

Inmediatamente finalizado el ensayo, los animales se congelaron a -80°C para la realización del análisis bioquímico. Las lombrices se diseccionaron separando el músculo del tejido digestivo. Una vez pesado, se hicieron homogeneizados (1:10 p/v) mediante un homogeneizador de vidrio Potter, en tampón frío 50 mM Tris, 1mM EDTA y 1% Triton X-100 pH 7,5. El homogeneizado se centrifugó durante 120 min a 12000 g

La concentración total de proteínas se determinó utilizando el método descrito por Bradford (1976), basado en la formación de un complejo entre el colorante azul brillante de Coomassie y las proteínas, produciendo un cambio en la coloración del reactivo a una tonalidad azul de intensidad proporcional a la cantidad de proteínas presente en la muestra, medible a una absorbancia de 595 nm.

La actividad AChE se determinó de acuerdo al método de Ellman y col. (1961) adaptado a microplaca. Los reactivos utilizados fueron tampón NaPO_4 (0,1 M, pH 8), acetiltiocolina yodada (ATChI) y ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) (DTNB). Se preparó una solución de trabajo compuesta por 1,6 ml de DTNB y 48,4 ml de tampón fosfato de sodio, que se mantuvo en hielo y en condiciones de oscuridad. Se adicionaron a la placa de 96 pocillos 5 μl de muestra, 235 μl de mezcla de reacción y 10 μl de acetiltiocolina, y se midió inmediatamente la actividad del ensayo colorimétrico utilizando el lector de placas a una absorbancia de 412 nm. Todas las mediciones se realizaron por triplicando utilizando como blanco tampón fosfato.

La hidrólisis de la acetiltiocolina en colina y acetato por la actividad AChE presente en la muestra, puede medirse como aumento de absorbancia a 412 nm por la reacción producida gracias a la unión de la tiocolina al DTNB, produciendo el anión 5-tio-2-nitrobenzoato, un compuesto cromógeno de color amarillo, medible a dicha longitud de onda. La actividad enzimática específica se calculó teniendo en cuenta un coeficiente de extinción molar de $13\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

La actividad GST se determinó de acuerdo al método de Habig y col. (1974), utilizando como sustratos 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (CDNB) y glutatión reducido (GSH). Con estos dos reactivos se preparó una mezcla de reacción de uso diario, utilizando tampón fosfato de potasio a pH 6,5 y se mantuvo en hielo y en condiciones de oscuridad. Se añadieron 200 μl de esta mezcla de reacción a la placa de 96 pocillos y 50 μl de una dilución 1:50 procedente del homogeneizado de lombriz. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado, utilizando un blanco como control negativo, al que se adicionó tampón en lugar de muestra. La lectura de la placa se realizó midiendo la absorción del conjugado CDBN-GSH espectrofotométricamente a 340 nm, cada 30 segundos durante 5 minutos para analizar la cinética de la enzima. La actividad enzimática específica se determinó utilizando el coeficiente de extinción molar de $9,6\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Análisis de los datos

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa GraphPad Prism 7. El tamaño de muestra fue de 30 individuos por tratamiento analizado, divididos en tres subgrupos compuestos por 10 individuos cada uno. El análisis de la normalidad de las muestras se realizó con el test de Shapiro-Wilk. Una vez confirmada la ausencia de normalidad de los datos, el análisis de las diferencias significativas de las actividades enzimáticas se determinó con el test de Kruskal-Wallis

(pruebas no paramétricas), mediante comparaciones múltiples. El estudio de las correlaciones entre las actividades enzimáticas AChE y GST se realizó mediante el test de Spearman para muestras no paramétricas. En todas las pruebas estadísticas, se asumió que $p < 0,05$ era estadísticamente significativo.

Resultados y discusión

Los valores medios de la actividad enzimática AChE \pm desviación estándar (DE) de las lombrices de tierra en cada uno de los grupos de tratamiento del ensayo, se pueden observar en la tabla 1. En dicha tabla, también se reflejan los porcentajes de actividad e inhibición de esta enzima, para cada uno de los grupos de tratamiento, utilizando como referencia el grupo control (100% de actividad), ya que estos animales no están expuestos a dimetoato en ninguna de las dos secciones de la caja. Se observan diferencias significativas entre cada uno de los grupos de tratamiento comparados con la actividad enzimática del grupo control (100% de actividad), con un P valor $< 0,0001$ (****) para las lombrices expuestas a dimetoato a una concentración de 0,06 y 1,5 mg/kg de suelo, y un P valor $< 0,001$ (***) para las expuestas a 0,3 mg/kg de suelo. Por tanto, la actividad AChE fue significativamente inferior en las lombrices expuestas a todas las concentraciones de plaguicida empleadas en el ensayo, incluso a la más baja (bastante inferior a la que recomienda el fabricante de DIMAFID40 emplear), con respecto a las que no estuvieron expuestas.

Tabla 1. Cálculo de actividad enzimática media AChE \pm desviación estándar a las distintas concentraciones de tratamiento. Las dos últimas columnas muestran los porcentajes de actividad e inhibición de la actividad enzimática.

Concentración dimetoato (mg/kg)	Actividad AChE (media \pm DE)	% Actividad AChE	% Inhibición AChE
Control	176 \pm 56,59	100	0
0,06	45,8 \pm 40,95 ****	26,02	73,98
0,3	94,43 \pm 102,2 ***	53,65	46,34
1,5	20,98 \pm 27,75 ****	11,92	88,08

Diferencias significativas ($p < 0,01$ ***; $p < 0,001$ ****) con respecto al grupo control.

Al observar los porcentajes de actividad AChE de todas las lombrices expuestas a diferentes concentraciones de dimetoato con respecto al control, se confirma que en todas las concentraciones se obtuvieron actividades AChE inhibidas significativamente. Incluso a la menor concentración de 0,06 la actividad respecto al grupo control se inhibió en un porcentaje de 74%, llegando a inhibirse un 88% en los animales expuestos a 1,5 mg/kg.

Los datos expuestos anteriormente (recogidos en la tabla 1) se refieren al número total de lombrices de tierra utilizadas en cada uno de los contenedores. Es decir, se tiene en cuenta la actividad enzimática AChE de todos los animales, sin considerar que hubieran o no evitado el suelo contaminado. Sin embargo, en la figura 1 se representa la actividad enzimática AChE (media \pm DE) de las lombrices de tierra expuestas a cada concentración de dimetoato empleada, pero separadas en dos grupos (control y tratado) dependiendo su posición en el contenedor al final de la prueba de evitación (para ver detalles del diseño experimental, como se ha indicado anteriormente, consulte el trabajo de Asensio y col., 2021). A pesar de que no se observaron diferencias significativas entre las actividades enzimáticas de ambos grupos, en los resultados obtenidos puede observarse que la actividad en los suelos de tratamiento con dimetoato tiende a ser ligeramente inferior a la de los animales que quedaron en la sección control.

Con respecto a la actividad enzimática GST (media \pm DE) en los animales expuestos a las distintas concentraciones de tratamiento con dimetoato, aparecen representadas en la tabla 2. Así mismo, se expresa la actividad de la enzima en porcentaje con respecto al grupo control (100%). Los resultados reflejan las actividades enzimáticas de todos los animales presentes en cada contenedor de tratamiento,

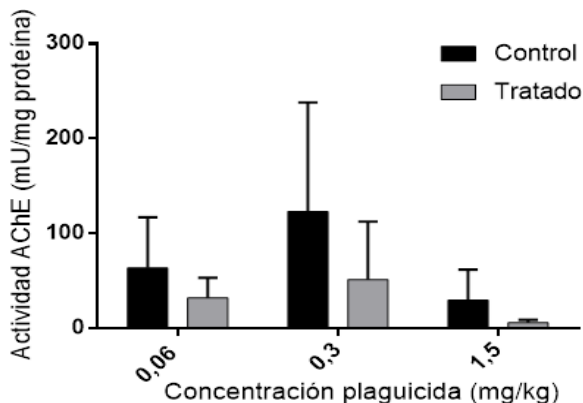


Figura 1. Diferencias en la actividad enzimática AChE de las lombrices de tierra teniendo en cuenta si su posición final en la prueba de evitación fue la sección de suelo sin dimetoato (Control) o con las distintas concentraciones de dicho plaguicida (Tratado).

Tabla 2. Valores de actividad enzimática media GST \pm desviación estándar y porcentaje de actividad GST con respecto al control de las lombrices expuestas a cada una de las concentraciones de dimetoato ensayadas.

Concentración dimetoato (mg/kg)	Actividad media GST \pm desviación estándar	% Actividad GST
Control	45,65 \pm 21,45	100
0,06	33,61 \pm 13,93	73,63
0,3	57,87 \pm 32,75	126,77
1,5	19,62 \pm 10,14 ****	42,98

Diferencias significativas ($p < 0,001$ ****) con respecto al grupo control.

independientemente de su posición final en una sección u otra de suelo en la prueba de evitación. Al estudiar las diferencias entre cada uno de los grupos de tratamiento con respecto al grupo control, que no estaba expuesto a dimetoato, solamente se observan diferencias significativas en los valores de la actividad enzimática GST de los animales expuestos a las concentraciones más altas del pesticida dimetoato con respecto al grupo control, es decir, las lombrices expuestas a 1,5 mg/kg de suelo (**** P valor $< 0,0001$), en las que la actividad enzimática GST es significativamente inferior a la del grupo control.

En la figura 2 se muestra, por separado, la actividad media de GST de las lombrices de tierra que quedaron en cada una de las secciones tras finalizar la prueba de evitación (suelos control y tratados). Por una parte, se observa la actividad de los animales que aparecieron en el suelo libre de dimetoato y, al lado, la de los animales que quedaron en la sección con las distintas concentraciones del plaguicida. Aunque no se observan diferencias significativas, entre la concentración más baja

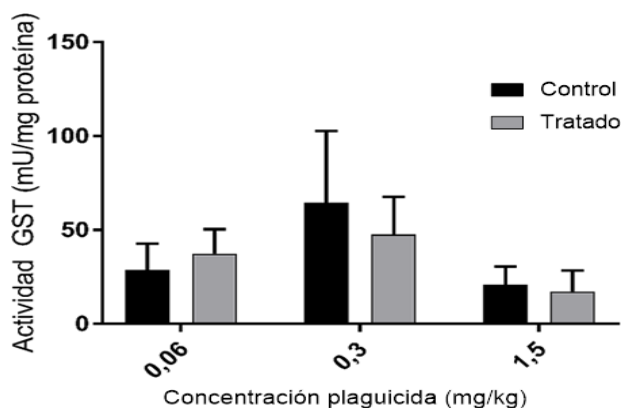


Figura 2. Diferencias en la actividad GST entre las lombrices que quedaron en las distintas secciones del contenedor en la prueba de evitación (sección control sin dimetoato o sección de tratamiento con las distintas concentraciones del plaguicida).

y la intermedia, parece que hay una tendencia al aumento de la actividad de este biomarcador. Sin embargo, a la concentración más baja, en contra de lo esperado, parece que haya una inhibición de la enzima. Tampoco se observaron diferencias significativas entre los animales que quedaron en una u otra sección del contenedor.

Con respecto al estudio de correlaciones, como se indicó pertinentemente en la sección de material y métodos, se realizó el test de Spearman para analizar la existencia de una posible correlación entre los dos biomarcadores analizados en el presente ensayo. De esta forma, comparando las actividades enzimáticas AChE y GST en cada grupo de tratamiento, solamente se observó la existencia de una correlación estadísticamente significativa entre las actividades GST y AChE de los animales expuestos a la concentración más baja empleada de DIMAFID40 (0,06 mg/kg). El P valor fue de 0,0062 y el valor de $R^2 = -0,4879$ (figura 3). Se observa que dicha correlación es negativa, sugiriendo que la inhibición de la AChE se relaciona directamente con la inducción de la GST, estableciendo desconocidos mecanismos toxicológicos que interrelacionan ambos biomarcadores en el proceso de detoxificación. Teniendo en cuenta la concentración ambiental predecible del pesticida, estos datos carecerían de relevancia, puesto que este fenómeno solo se está produciendo a concentraciones muy inferiores a las que se encontrarían en el campo. Sin embargo, para interpretar los datos de modo fidedigno, sería conveniente realizar un estudio de toxicidad crónica o subcrónica.

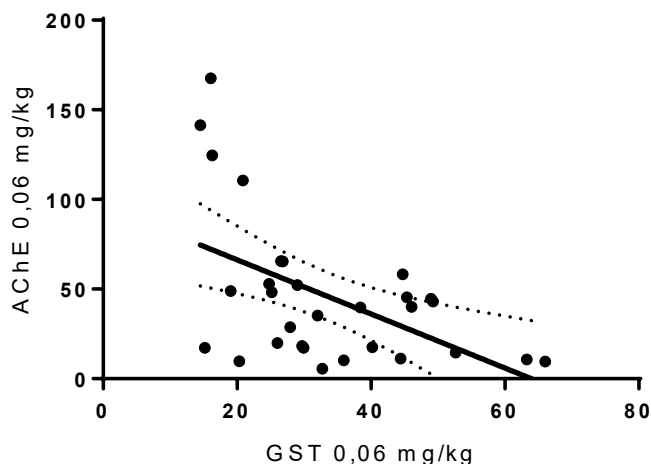


Figura 3. Representación gráfica de la correlación negativa entre las enzimas glutatión S-transferasa y acetilcolinesterasa en lombrices de tierra expuestas a una concentración de DIMAFID40 de 0,06 mg/kg.

Existe una literatura extensa sobre los efectos que tienen los plaguicidas organofosforados y carbamatos inhibiendo la enzima AChE en una amplia variedad de organismos. Concretamente, en lombrices de tierra, esta enzima se emplea como un biomarcador muy extendido de la calidad de los suelos, debido a la importancia de estos organismos en los suelos y a la sensibilidad de la enzima a bajas concentraciones de los plaguicidas, durante un periodo corto de exposición. Por tanto, en este caso la dificultad radica en encontrar estudios que reúnan el análisis del mismo plaguicida, empleando unas concentraciones iguales o similares, en la misma especie de lombriz de tierra y con unos tiempos de exposición parecidos. Wang y col. (2012) llevaron a cabo un estudio en el que compararon la toxicidad aguda producida en *Eisenia foetida* por 24 plaguicidas diferentes y observaron que se producía una gran variación en la respuesta dependiendo de la categoría química del plaguicida. De forma similar, Galindo-Guzmán y col. (2019) compararon los efectos de distintos plaguicidas OFs, como malatión, diazinón, metamidofós y dimetoato, sobre la AChE de *Eisenia foetida* y también demostraron que se producía una inhibición significativa de la actividad a concentraciones de entre 1 y 10 mg/l de todos los OFs.

En *Lumbricus terrestris*, otra especie ampliamente utilizada en estos ensayos, también se han obtenido inhibiciones de la actividad enzimática AChE. Araneda y col. (2014) observaron este efecto en la actividad AChE de animales de esa especie expuestos a suelos convencionalmente utilizados en agricultura con un historial de uso de plaguicidas, principalmente OFs. También Martínez-Morcillo y col. (2013) obtuvieron resultados similares en *Lumbricus terrestris* expuestas a clorpirifós.

En el caso de la lombriz de tierra empleada en nuestro estudio, Schreck y col. (2008), expusieron a lombrices de la especie *Aporrectodea caliginosa nocturna* a una mezcla de plaguicidas y fungicidas. Entre los plaguicidas estaba el OF etil-clorpirifós, frente al que se vio una inhibición de la actividad AChE como biomarcador de neurotoxicidad. También Olvera-Velona y col. (2008) estudiaron la actividad AChE de *Aporrectodea caliginosa* expuesta al OF etil-paratión, observando que ésta disminuía significativamente a una concentración de 0,7 mg/kg del plaguicida, que era la concentración recomendada de aplicación.

Los efectos de inhibición enzimática AChE de *Aporrectodea caliginosa* también fueron observados por Sanchez-Hernandez y col. (2014) en lombrices de tierra expuestas al OF clorpirifós. En este caso, los autores realizaron un análisis de las isoformas de la AChE del músculo de las lombrices de tierra, observando la existencia de múltiples isoformas de la AChE en este tejido y, que éstas tienen diferente sensibilidad a los OFs. Esta información podría contribuir a explicar por qué en nuestro ensayo se produce una baja tasa de mortalidad incluso a la concentración más alta de dimetoato utilizada y, sin embargo, la inhibición de la actividad AChE es significativa incluso en las lombrices expuestas a la concentración más baja ensayada.

Puesto que en el presente estudio el comportamiento de evitación de las lombrices de tierra al suelo contaminado con dimetoato (ver Asensio et al., 2021) no aparecería como tal hasta la concentración más alta ensayada (1,5 mg/kg), mientras que la actividad AChE se ve significativamente inhibida incluso a la concentración más baja (0,6 mg/kg), podría establecerse que la actividad AChE ha resultado un marcador mucho más sensible que la respuesta de evitación, para evaluar la exposición de la lombriz de tierra a los OFs. A este dato contribuye que, entre las lombrices de tierra expuestas a la concentración de dimetoato más elevada que quedaron en la sección de tratamiento tras finalizar la prueba estandarizada, casi todas presentaban inhibición de la actividad AChE del 100%. Debido a esto, la capacidad de evitar el suelo de estos animales podría haberse visto truncada por la alta inhibición de la enzima, que produciría efectos en las funciones fisiológicas de la lombriz, provocando una hiperestimulación colinérgica que impediría el movimiento normal de las lombrices, resultando imposible que detectaran y huyeran del suelo contaminado. Por este motivo, se establece la importancia del análisis de la actividad AChE como una fuente de información de la exposición de la lombriz de tierra a los OFs.

Con respecto a la actividad enzimática GST, no se observó un aumento significativo de ésta en las lombrices tratadas con dimetoato con respecto a las que pertenecían al grupo control. Es más, a la concentración de plaguicida más alta ensayada (1,5 mg/kg), la GST no solo no sufrió una activación, sino que se inhibió significativamente. Este hecho podría explicarse por el corto tiempo de exposición de las lombrices al dimetoato, ya que 48 horas podría no ser suficiente tiempo como para que se produjera una activación de ser mecanismo de detoxificación. También podría deberse a que las concentraciones de plaguicida resultaran demasiado elevadas o, por el contrario, demasiado bajas, como para que se produjera la activación de la enzima.

El papel de la GST en el metabolismo de fase II para la detoxificación de plaguicidas está ampliamente estudiado. Por ejemplo, Velki y col. (2019) realizaron estudios de expresión génica y comprobaron que, tras la exposición a tres plaguicidas durante 48 horas, se producía una regulación positiva del gen *gst*, lo que sugería que esta enzima

resultaba vital en la detoxificación de estos compuestos. Sin embargo, la respuesta de esta enzima a los contaminantes resulta algo controvertida, debido a que son muchos los estudios que muestran una gran variabilidad en la respuesta dependiendo tanto de la especie de lombriz que se utilice como del contaminante a ensayar como de las concentraciones empleadas de este. A pesar de ello, parece que uno de los factores más determinantes de la respuesta de la enzima a los plaguicidas es la duración de la exposición a éstos.

De esta forma, Sanchez-Hernandez y col. (2014) expusieron a lombrices de la especie *Aporrectodea caliginosa* a concentraciones de clorpirifós de 0,51 y 10 mg/kg de suelo durante 3 y 21 días y observaron un aumento significativo de la actividad de la enzima GST con la exposición a corto plazo (3 días) a ambas concentraciones; mientras que ante la exposición de 21 días no hubo ninguna respuesta. Otros autores han reportado este tipo de respuestas de inducción de la enzima GST, como Velki y col. (2014), que utilizaron gran variedad de especies de lombrices pertenecientes a distintas categorías ecológicas y observaron un aumento significativo de la actividad GST tras 28 días de exposición a pirimifós. Sin embargo, estas respuestas no siguieron un patrón dependiente de la dosis, es decir, las variaciones dependieron del plaguicida, el tiempo de exposición y la especie de lombriz.

Por otra parte, muchos autores han reportado una ausencia de inducción de la enzima GST ante la exposición a plaguicidas, produciéndose incluso en algunos casos, una respuesta de inhibición enzimática. Stokke y Stenersen (1993) expusieron a *Eisenia andrei* a inductores potenciales de enzimas de biotransformación, y sugirieron que la inducibilidad podría no ser una propiedad de las enzimas de biotransformación de las lombrices de tierra. Podría asociarse a que las lombrices de tierra se alimentan de detritos, debido a su papel como descomponedores de la materia orgánica. Por tanto, estos animales no están expuestos a metabolitos secundarios de plantas, a los que sí se encuentran expuestos otros animales como artrópodos herbívoros y, por este motivo, sus enzimas de biotransformación no habrían evolucionado para adaptarse a estos metabolitos tóxicos.

De una forma similar, Hans y col. (1993) observaron que la respuesta de *Pheretima posthuma* ante tres plaguicidas (aldrín, endosulfano y lindano) se veía incrementada en una fase inicial de la exposición y, después, disminuía hasta los valores normales. Este efecto se explicaba por la presencia de varias isoformas de la GST, por lo que sería conveniente realizar un estudio más amplio con cada una de las isoformas. Además, puesto que en este estudio la exposición a los plaguicidas se realizó durante un periodo total de un mes, el pico de GST observado en un tiempo corto de exposición en realidad aludiría a una semana de tratamiento. Este tiempo es mucho mayor que el empleado en nuestro ensayo de 48 horas, que podría resultar demasiado breve, y ayudaría a explicar la ausencia de respuesta de la GST observada en nuestro ensayo.

Schreck y col. (2008) observaron que se producía una falta de respuesta de inducción de la actividad GST utilizando una mezcla de insecticidas (clorpirifós y λ -cihalotrina) y fungicidas (folpet, miclobutanil, metalaxil y fosetil) en *Aporrectodea caliginosa* durante 3, 7, 14 y 34 días de exposición. Booth y O'Halloran (2001) estudiaron la respuesta de *Aporrectodea caliginosa* a dos plaguicidas, diazinón y clorpirifós. Las dos concentraciones de diazinón ensayadas (12 y 60 mg/kg) inhibieron significativamente la actividad GST de las lombrices de tierra. Por otra parte, las concentraciones de 4 y de 28 mg/kg de clorpirifós no afectaron a la actividad GST. Estos autores concluyeron que era posible que la enzima se inhibiera a concentraciones bajas del plaguicida y se indujera a concentraciones más altas. Sin embargo, en este caso, unas concentraciones demasiado altas de plaguicida no serían realistas con la exposición que ocurre en el campo.

Teniendo en cuenta que en nuestro estudio la actividad de la enzima AChE se encuentra significativamente inhibida a todas las dosis de dimetoato ensayadas, incluso a la concentración más baja, no cabe duda de que el dimetoato ha penetrado en la lombriz de tierra y ha producido un efecto en ésta. Por lo tanto, la ausencia de una activación

significativa de la enzima GST no puede atribuirse a que la concentración de dimetoato haya sido insuficiente para producir un efecto en la lombriz. Una posible explicación de esta ausencia de activación de la enzima puede ser que 48 horas no sea un tiempo suficiente de exposición como para que se ponga en marcha todo el mecanismo de detoxificación. Esto sería coherente teniendo en cuenta la respuesta observada por Velki y Hackenberger (2013), en *Eisenia andrei* utilizando un rango de concentraciones de entre 0,03 y 3 mg/kg de dimetoato similares a las empleadas en nuestro estudio: durante 4 semanas de exposición en total. En este caso, los autores observaron un aumento de la actividad GST tras 10 días de exposición a las dosis más bajas de dimetoato y, tras 15 días para el resto de las dosis. Es decir, probablemente podría observarse la inducción de la enzima aumentando el tiempo de exposición de las lombrices al dimetoato.

Conclusiones

A la vista de los resultados expuestos en el presente trabajo mediante el análisis de dos biomarcadores diferentes tras la realización de la prueba ABR (ISO 17512-1:2008) se puede concluir que el pesticida causó una inhibición significativa de la actividad AChE en los animales expuestos a todas las dosis empleadas, presentando una inhibición de 46% en los animales expuestos a las concentraciones que se encontrarían en las condiciones de campo. Por el contrario, la actividad GST no presentó una inducción significativa en los animales expuestos respecto a los grupos no tratados, sugiriendo la posible necesidad de estudios con exposiciones más prolongadas en el tiempo. A la vista de los resultados, la determinación de la actividad AChE resulta un marcador mucho más sensible que la respuesta de evitación, para evaluar la exposición de la lombriz de tierra a pesticidas anticolinesterásicos.

Referencias

- 1 Araneda A. Seasonal response of avoidance behaviour and esterase inhibition (acetylcholinesterase and carboxylesterase) of the earthworm *Lumbricus terrestris* after exposure to pesticides in a conventional and organic apple orchard. Tesis doctoral. Universidad de Concepción (Chile), 2014.
- 2 Asensio G, Míguez Santiyán MP, Soler F, Hernández-Moreno D, Martínez-Morcillo S, Pérez-López M. Ensayo estandarizado (ISO 17512) de comportamiento de evitación de suelos contaminados. Efecto del pesticida dimetoato sobre la lombriz de tierra *Aporrectodea caliginosa*. Rev. Toxicol. 2021; 38, 8-11.
- 3 Booth LH, O'Halloran K. A comparison of biomarker responses in the earthworm *Aporrectodea caliginosa* to the organophosphorus insecticides diazinon and chlorpyrifos. Environ. Toxicol. Chem. 2001; 20, 2494-2502.
- 4 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 1976; 72, 248-254.
- 5 Edwards CA. Earthworm ecology, 2nd edition, CRC Press, 2004.
- 6 Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. 1961; 7, 88-95.
- 7 Galindo-Guzmán M, Flores-Loyola E, Gallegos-Robles MA, Fortis-Hernández M, Figueroa-Viramontes U, Vázquez-Vázquez C. Acetilcolinesterasa de *Eisenia foetida* como indicador de contaminación por plaguicidas organofosforados. Rev. Int. Contam. Ambient. 2019; 35, 115-124.
- 8 Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J. Biol. Chem. 1974; 249(22), 7130-7139.
- 9 Hans RK, Khan MA, Farooq M, Beg MU. Glutathione S-transferase activity in an earthworm (*Pheretima posthuma*) exposed to three insecticides. Soil Biol. Chem. 1993; 25, 509-511.
- 10 Martínez-Morcillo S, Yela JL, Capowiez Y, Mazzia C, Rault M, Sanchez-Hernandez JC. Avoidance behaviour response and esterase inhibition in the earthworm, *Lumbricus terrestris*, after exposure to chlorpyrifos. Ecotoxicol. 2013; 22, 597-607.
- 11 Mazzia C, Munir K, Wellby M, Rault M, Capowiez Y, Gooneratne R. Nerve conduction velocity as a non-destructive biomarker in the earthworm *Aporrectodea caliginosa* exposed to insecticides. Environ. Sci. Poll. Res. Int. 2018; 25, 24362-24367.
- 12 Mosleh YY, Ismail SM, Ahmed MT, Ahmed YM. Comparative toxicity and biochemical responses of certain pesticides to the mature earthworm *Aporrectodea caliginosa* under laboratory conditions. Environ. Toxicol. 2003; 18, 338-346.
- 13 Olvera-Velona A, Capowiez Y, Mascle O, Ortiz-Hernandez L, Benoit P. Assessment of the toxicity of ethyl-parathion to earthworms (*Aporrectodea caliginosa*) using behavioural, physiological and biochemical markers. Appl. Soil Ecol. 2008; 40, 476-483.
- 14 Pérez-López M, Nóvoa-Valiñas MC, Melgar-Riol MJ. Glutathione S-transferase cytosolic isoforms as biomarkers of polychlorinated biphenyl (Arochlor-1254) experimental contamination in rainbow trout. Toxicol. Lett. 2002; 136, 97-106.
- 15 Rodríguez AM, Zunino MP, Dambolena JS. Optimización de ensayos de medición de acetilcolinesterasa en *Sitophilus zeamais* (Mots.). Rev. Fac. Cienc. Exactas Fís. Nat. 2018; 5, 51-58.
- 16 Sanchez-Hernandez JC, Narvaez C, Sabat P, Martinez Mocillo S. Integrated biomarker analysis of chlorpyrifos metabolism and toxicity in the earthworm *Aporrectodea caliginosa*. Sci. Total Environ. 2014; 490, 445-455.
- 17 Schreck E, Geret F, Gontier L, Treillhou M. Neurotoxic effect and metabolic responses induced by a mixture of six pesticides on the earthworm *Aporrectodea caliginosa nocturna*. Chemosphere 2008; 71, 1832-1839.
- 18 Stokke K, Stenersen J (1993). Non-inducibility of the glutathione transferases of the earthworm *Eisenia andrei*. Comp. Biochem. Physiol. 1993; 106, 153-756.
- 19 Velki M, Hackenberger BK. Inhibition and recovery of molecular biomarkers of earthworm *Eisenia andrei* after exposure to organophosphate dimethoate. Soil Biol. Biochem. 2013; 57, 100-108.
- 20 Velki M, Hackenberger BK, Loncaric Z, Hackenberger DK. Application of microcosmic system for assessment of insecticide effects on biomarker responses in ecologically different earthworm species. Ecotoxicol. Environ. Saf. 2014; 104, 110-119.
- 21 Velki M, Weltmeyer A, Seiler TB, Hollert H. Acute toxicities and effects on multixenobiotic resistance activity of eight pesticides to the earthworm *Eisenia andrei*. Environ. Sci. Poll. Res. Int. 2019; 26, 4821-4832.
- 22 Wang Y, Cang T, Zhao X, Yu R, Chen L, Wu C, Wang Q. Comparative acute toxicity of twenty-four insecticides to earthworm, *Eisenia fetida*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 2012; 79, 122-128.