

RESPUESTAS BIOQUÍMICAS EN LA LOMBRIZ DE TIERRA *Eisenia andrei* EXPUESTA A CADMIO

BIOCHEMICAL RESPONSES IN THE EARTHWORM *Eisenia andrei* EXPOSED TO CADMIUM

JUANNY HERNÁNDEZ, EDGAR ZAPATA-VÍVENES, LEIDA MARCANO, ELENA MARCANO, OSMAR NUSETTI

Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Escuela de Ciencias, Departamento de Biología,
Laboratorio de Bioquímica y Ecotoxicología, Cumaná, Venezuela
E-mail: ezapata@udo.edu.ve / edzapata2002@yahoo.com

RESUMEN

Se evaluaron los efectos de la acumulación del cadmio (Cd) sobre los niveles de metalotioneínas (MT), proteínas totales (PT), grupos sulfhidrilos (-SH) y sustancias que reaccionan al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en las regiones corporales media-anterior (MA) y media-posterior (MP) de la lombriz de tierra *Eisenia andrei*. Los ejemplares se expusieron a concentraciones de 0; 2,50 y 10,30 mg de Cd/kg de suelo, durante 7, 15 y 21 días. Los organismos expuestos exhibieron incrementos en los niveles de Cd proporcionalmente a las concentraciones y períodos de exposición; las mayores cantidades se acumularon en la región MP. El tratamiento con Cd provocó aumentos en MT, -SH y PT en ambas regiones, observándose los mayores valores en la región MA. Las concentraciones de TBARS incrementaron en relación dosis-períodos de exposición, encontrándose los niveles más elevados en MA. El incremento en los productos de lipoperoxidación probablemente se encuentra asociado a la carga corporal del Cd, lo cual podría afectar los mecanismos encargados de la defensa contra especies reactivas del oxígeno. Las concentraciones de MT en organismos expuestos evidencian su importancia como una respuesta efectiva de defensa contra la toxicidad de Cd. Las respuestas bioquímicas en ambas regiones forman parte del sistema de defensa molecular por ingreso de Cd, las cuales evitan perturbaciones oxidativas mayores en el tejido, especialmente en órganos de función reproductiva (clítelo). *Eisenia andrei* presenta una capacidad diferencial a lo largo de su cuerpo que permite modular respuestas de ajustes moleculares, lo cual podría facilitar la desintoxicación del metal, tolerancia y eficacia de sobrevivencia en suelos contaminados con Cd.

PALABRAS CLAVE: Tioles, malondialdehído, metalotioneínas, proteínas.

ABSTRACT

The cadmium (Cd) bioaccumulation on metallothioneins (MT), total proteins (TP), sulfhydryl groups (-SH) and tiobarbituric acid reaction substances (TBARS) levels were determined in medium-anterior (MA) and medium-posterior (MP) corporal regions of the earthworm *Eisenia andrei*. The organisms were exposed to concentrations of 0; 2.50 and 10.30 mg Cd/kg of substrate, during 7, 15 and 21 days. Cd levels increased in the exposed organisms proportionally to the concentrations and duration of exposure; this metal was mostly accumulated to the MP region. Cd-treatment caused increases in the MT, -SH and TP levels in both corporal regions, with the highest values in MA. TBARS concentrations increased in doses-days relationship, showed the highest levels in MA; this increment is probably associated to the Cd-bioaccumulation that can affect the mechanisms of defenses against reactive oxygen species. MT concentrations in exposed organisms suggest their relevance as effective response of molecular defense against Cd toxicity. These corporal biochemical responses associated to Cd-uptake form part of the molecular defense system that avoids interferences on the reproductive tissue (clitellum), allowing to accumulate the highest quantity of Cd in the MP region. *Eisenia andrei* has a differential capacity along its body to modulate adjustments of molecular responses, which could allow the tolerance and effectiveness of survival in Cd-polluted soils.

KEY WORDS: Thiols, malondialdehyde, metallothionein, proteins.

INTRODUCCIÓN

La presencia de cadmio (Cd) en el suelo y el riesgo que implica su ingreso a la cadena alimentaria ha generado una creciente preocupación. La introducción de este metal al ambiente presenta causales antropogénicos, teniendo como fuente principal el uso intensivo de fertilizantes, incineradores de desechos municipales, fabricación de baterías, combustión de fósiles, uso de pinturas y actividades mineras (Bonomelli *et al.* 2003). Su disponibilidad en el

medio y posterior acumulación en los organismos puede resultar en perturbaciones bioquímicas (Žaltauskaitė y Sodienė 2010, Yang *et al.* 2012, Vasseur y Bonnard 2014).

En los estudios ecotoxicológicos se emplean actualmente protocolos estandarizados para la cuantificación de respuestas biológicas denominadas biomarcadores que, en ciertos casos, reflejan efectos a nivel molecular, fisiológico y en el comportamiento de la biota, siendo de mucha utilidad en evaluaciones ambientales (Bartell

2006, Sánchez-Hernández 2006). Diversos marcadores moleculares (enzimas desintoxicantes, moléculas quelantes y defensas antioxidantes) han sido efectivamente evaluados en diversas especies de anélidos. Principalmente han sido aplicados en lombrices de tierra, las cuales han sido propuestas como modelos biológicos ideales para evaluar toxicidad en suelos impactados por contaminación química (Gastaldi *et al.* 2007, Gaete *et al.* 2010, Ali y Naaz 2013).

Las lombrices de tierra por vivir en contacto directo con el sustrato y por su condición de alimentarse por ingesta de sedimentos y materia orgánica en descomposición mientras va excavando galerías en el suelo, se encuentran continuamente expuestas a metales pesados (Cd, Hg, Pb y Cu), los cuales pueden ser acumulados con gran facilidad en sus tejidos (Rana *et al.* 2013, Goswami *et al.* 2014); acumulación que dependerá de la disponibilidad del compuesto en el ambiente, tamaño corporal, estado fisiológico y reproductivo de los organismos (Podolak *et al.* 2011). La toxicidad de metales pesados, tales como el Cd, está mediada por un efecto hormético en la inhibición de las enzimas antioxidantes y una sobreproducción de oxiradicales (Zhang *et al.* 2009a,b), lo que puede conllevar a procesos de lipoperoxidación de membranas y otros daños oxidativos (Scott-Fordsmand y Weeks 2000, Beytut y Aksakal 2002).

Las lombrices de tierra poseen mecanismos adaptativos que les permiten mantener la homeostasis de metales esenciales y controlar la toxicidad de los no esenciales. Entre éstos mecanismos se encuentran la reducción del transporte a través de la membrana celular, compartimentación del metal en lisosomas y la formación de complejos con proteínas (metalotioneínas o metaloproteínas similares) y otros ligandos moleculares ricos en grupos tioles (Morgan y Morgan 1998, Stürzenbaum *et al.* 2004). La inducibilidad de estas proteínas por metales pesados ha sido ampliamente demostrada en anélidos (Stürzenbaum *et al.* 2001, Homa *et al.* 2015).

La mayoría de las investigaciones ecotoxicológicas realizadas en anélidos han tenido como objetivo principal determinar respuestas bioquímicas y fisiológicas tomando como órgano de análisis el tejido muscular completo. No obstante, se ha evidenciado que los anélidos presentan diferentes respuestas fisiológicas a lo largo de su cuerpo (Lucan-Bouche *et al.* 1999, Ferreira-Cravo *et al.* 2007). En tal sentido, esta investigación tuvo como propósito evaluar el perfil de acumulación corporal del Cd y su

relación con los niveles de metalotioneínas, proteínas totales, grupos sulfhidrilos y lipoperoxidación en distintas regiones corporales de la lombriz de tierra *E. andrei* expuesta a concentraciones subletales de Cd.

MATERIALES Y MÉTODOS

Organismos

Los ejemplares de *Eisenia andrei* ($1,0 \pm 0,2$ g) fueron obtenidos del vivero inversiones B.V.C., ubicado en la ciudad de Cumaná, estado Sucre. Los mismos fueron mantenidos bajo condiciones controladas ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) en un sustrato constituido por abono orgánico y mantenido en un porcentaje de humedad del 30-35% con agua desionizada (pH).

Bioensayos de toxicidad

Los ensayos de toxicidad con Cd fueron realizados según Polo *et al.* (2011); desarrollados en envases de plástico de 340 cm^3 de capacidad, contentivos de un sustrato orgánico con base en estiércol equino y desechos vegetales (Polo *et al.* 2012), al que se le agregó la solución de Cd y se mezcló homogéneamente antes de colocar los organismos. Se escogieron las concentraciones de 0 (considerada control); 2,50 y 10,30 mg de Cd/kg de suelo. Tales concentraciones garantizaron la sobrevivencia de las lombrices durante los períodos de exposición.

Se emplearon 24 organismos clitelados para cada una de las concentraciones durante un período agudo (7 días), y dos crónicos (15 y 21 días), con sus respectivos controles. Transcurridos los lapsos de exposición al metal se tomaron tres grupos de ocho organismos cada uno, los cuales fueron escindidos quirúrgicamente de forma transversal en la porción media del cuerpo, obteniéndose las regiones media-anterior (MA) y media-posterior (MP). En cada porción corporal se disecó el tracto digestivo y posteriormente lavado con buffer fosfato de potasio (pH 7,5). Los tejidos de cada región fueron conservados a -40°C , por un período menor a una semana, previo a la realización de los análisis.

Cadmio

La determinación del contenido de Cd en las regiones MA y MP de las lombrices controles y expuestas fue realizado por espectrofotometría de absorción atómica según Rojas de Astudillo *et al.* (2002). Los tejidos fueron deshidratados a 60°C durante 3 días o hasta alcanzar un peso constante. Se procedió a realizar una pre-digestión por 24 horas con 5 mL de ácido nítrico al 69% a

temperatura ambiente. Seguidamente las muestras fueron digeridas a 60°C por 4 horas, y luego a 80°C por 2 horas. Posteriormente, se filtraron sobre papel Whatman N° 42, completándose a un volumen final a 10 mL con agua desionizada. La absorbancia específica del Cd en las muestras fue cuantificada en un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo 403. La validación del método se realizó con material de referencia certificado CRM de hepatopáncreas de langosta (TORT-2) de la *Nacional Research Council of Canadá* (Nova Scotia, Canadá), obteniéndose un porcentaje de recuperación del metal del 95-98%.

Metalotioneínas

La cuantificación de metalotioneínas se realizó empleando la metodología propuesta por Viarengo *et al.* (1997). El tejido fue homogenizado 1:4 en un buffer Tris-HCl 20 mol/L a pH 8,6, conteniendo sacarosa 500 mmol/L, leupeptina 6 µmol/L, ácido fenil-metil-sulfonil fluoruro 0,5 mmol/L y ditioneitol 2 mmol/L. El homogenizado fue centrifugado a 30.000 g por 20 min. Al sobrenadante se le adicionó 1,5 mL de etanol frío (-20°C) y 80 µL de cloroformo por cada mililitro y luego fue centrifugado a 6.000 g por 10 min a 4°C. El sobrenadante resultante se mezcló con 1 mg de ARN, 40 µL de HCl al 37 % y 3 mL de etanol frío (concentración final de 87%), y fue mantenido a -20°C por una hora. Una nueva centrifugación a 6.000 g por 10 min fue realizada. El precipitado obtenido fue resuspendido con etanol al 87%, cloroformo al 1% y buffer de homogenización, luego se centrifugó a 6.000 g por 10 min en un ambiente saturado de nitrógeno.

El precipitado fue mezclado con 150 µL de NaCl 250 mmol/L, 150 µL de HCl 1 mol/L y EDTA 4 mmol/L. Luego se agregó a las muestras 4,2 mL NaCl 2 mol/L, DTNB 0,4 mmol/L y buffer fosfato de sodio 200 mmol/L. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente, protegida de la luz durante 30 minutos, luego fue centrifugada a 3.000 g por 15 min y se leyó la absorbancia a 412 nm en un espectrofotómetro UV/VIS Lambda 2S Perkin-Elmer. Para estimar las cantidades de metalotioneínas en el tejido se consideró como masa relativa arbitraria a MT tipo 2 en *E. foetida* (15 Kda) (Gruber *et al.* 2000). Se usó como sustancia referencial glutatión reducido (GSH). Las concentraciones de metalotioneínas fueron expresadas en µg de MT/g de masa húmeda.

Proteínas y tioles totales (-SH)

La cuantificación de proteínas totales se realizó siguiendo la metodología propuesta por

Lowry *et al.* (1951), usando como estándar albúmina de suero bovino. Los resultados fueron expresados en µg de proteínas/g de masa húmeda. La cuantificación de grupos tioles se realizó por el método de Ellman (1958). Los resultados se expresaron como µmoles de -SH por g de masa húmeda, empleando GSH como estándar.

Peroxidación de lípidos

La peroxidación lipídica fue estimada por la formación de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (Nusetti *et al.* 2001). Los tejidos fueron homogenizados en una proporción de 50 mg/mL en buffer fosfato de sodio pH 7,5. El homogenizado fue centrifugado a 12.000 g por 20 minutos (4°C). A 250 µL de los sobrenadantes se les añadieron 250 µL de ácido tricloroacético 12,5% y HCl 0,8 mol/L. Posteriormente, se les agregaron 500 µL de solución de ácido tiobarbitúrico al 1%. Estos fueron colocados en baño de agua a 80°C con agitación constante por 30 minutos. Luego, centrifugados a 1.500 g durante 10 min a 4°C. Los sobrenadantes fueron transferidos para su posterior medición a 535 nm, contra un blanco constituido por todos los reactivos a excepción del extracto. La concentración de TBARS se estimó usando un coeficiente de extinción de $1,56 \times 10^5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Los valores fueron expresados en nmoles de TBARS por g de masa húmeda.

Análisis estadísticos

Los niveles de MT, -SH, PT y TBARS de la región anterior (MA) y posterior (MP) fueron comparados en los organismos bajo tratamiento (dosis y períodos de exposición) mediante un análisis de varianza multifactorial (Sokal y Rohlf 1979). Se realizó la prueba *a posteriori* de Duncan, empleando el programa estadístico computarizado Statgraphic Plus versión 5.1.

RESULTADOS

Contenido de Cd y Metalotioneínas

En la Figura 1 se muestran los niveles de Cd incorporados en el tejido muscular de *E. andrei* expuesta a diferentes concentraciones durante 7, 15 y 21 días. Se evidenció incremento en los niveles de Cd incorporado en ambas porciones corporales de las lombrices con relación a las concentraciones ($F_s = 76,84; p < 0,001$) y períodos de exposición ($F_s = 13,81; p < 0,001$). Adicionalmente, se encontró interacción entre ambos factores ($F_s = 9,29; p < 0,001$). Los valores máximos fueron registrados en la región MP a la concentración de 10,30 mg de Cd/kg de suelo durante los períodos crónicos de exposición.

Los niveles de MT fueron elevados en ambas regiones corporales de organismos expuestos al Cd con respecto a sus controles, en asociación a las concentraciones de exposición usadas ($F_s = 105,06$; $p < 0,001$). No obstante, a 21 días se

observó ligero descenso en las concentraciones de MT en los organismos expuestos a la más alta concentración (Fig. 2). Los niveles de MT encontrados en la MA fueron mayores en comparación con la MP ($F_s = 1,45$; $p < 0,001$).

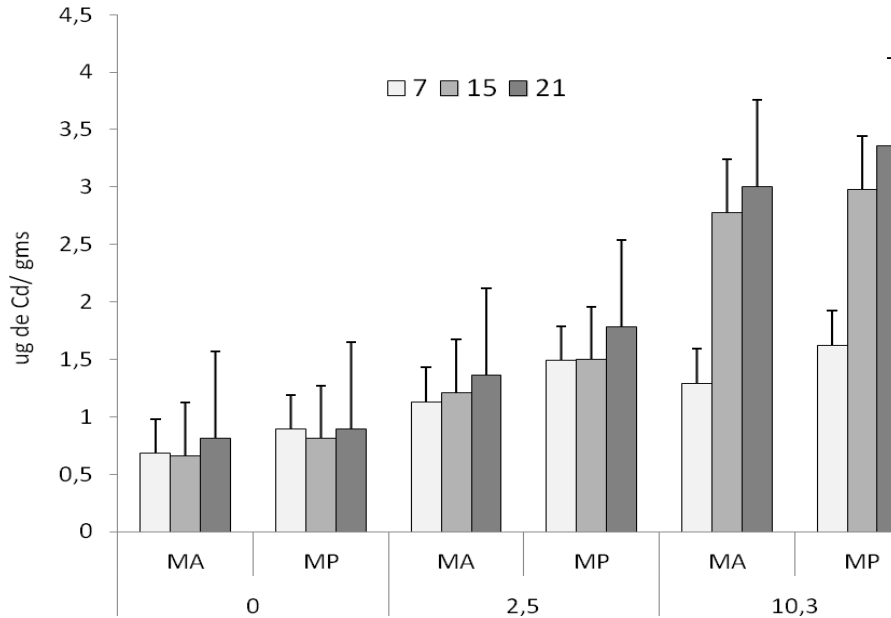


Figura 1. Niveles de cadmio (Cd) en la región media-anterior (MA) y media-posterior (MP) de *Eisenia andrei* expuesta a diferentes dosis (0; 2,50 y 10,30 mg de Cd/kg sustrato) durante 7, 15 y 21 días. Los resultados se expresan en microgramos de Cd por gramos de masa seca de tejido.

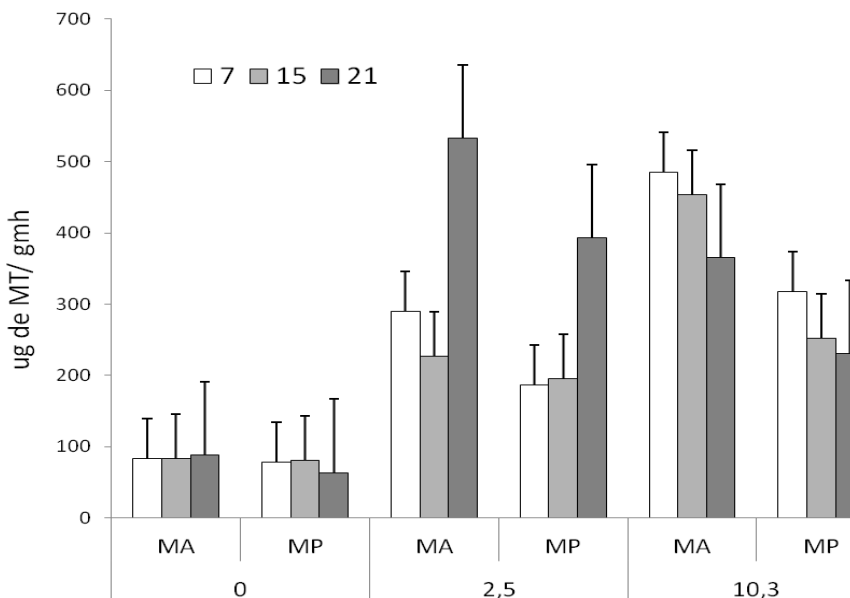


Figura 2. Niveles de metalotioneínas (MT) en la región media-anterior (MA) y media-posterior (MP) de *Eisenia andrei* expuesta a diferentes dosis (0; 2,50 y 10,30 mg de Cd/kg sustrato) durante 7, 15 y 21 días. Los resultados se expresan en microgramos de MT por gramos de masa húmeda de tejido.

Proteínas Totales, Tioles Totales y Peroxidación de lípidos

Las concentraciones de proteínas totales (PT) en ambas porciones corporales de las lombrices

experimentales mostraron diferencias significativas por efecto de las diferentes concentraciones ($F_s = 108,03$; $p < 0,001$) y períodos de exposición ($F_s = 3,63$; $p < 0,05$); incluyendo interacción entre ambos factores ($F_s =$

3,27; $p < 0,05$) (Fig. 3). La relación entre las concentraciones de PT y Cd acumulado en esta región fue determinada mediante la relación $PT = 5,67 \text{ Cd} + 37,70$; registrando un coeficiente de correlación de 0,563 ($r^2 = 31,70\%$), indicando una

relación moderadamente fuerte entre las variables. Las mayores concentraciones de PT entre las regiones estudiadas fueron encontradas en la región MA de organismos expuestos ($F_s = 69,9$; $p < 0,001$).

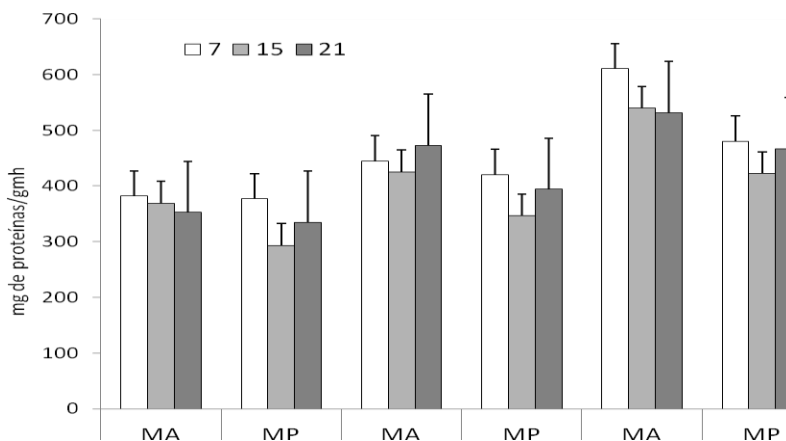


Figura 3. Niveles de proteínas totales (PT) en la región media-anterior (MA) y media-posterior (MP) de *Eisenia andrei* expuesta a diferentes dosis (0; 2,50 y 10,30 mg de Cd/kg sustrato) durante 7, 15 y 21 días. Los resultados se expresan en miligramos de PT por gramos de masa húmeda de tejido.

En las porciones de los organismos expuestos a Cd se observó incremento en los niveles de grupos -SH en los diferentes períodos ($F_s = 15,64$; $p < 0,001$) y dosis de exposición ($F_s = 122,42$; $p < 0,001$); observándose interacciones significativas entre estos factores ($F_s = 7,36$; $p < 0,001$) (Fig. 4). Se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de grupos -SH entre las regiones estudiadas ($F_s = 45,45$; $p < 0,001$), detectándose mayores concentraciones en la región MA con respecto a MP. Se observó incremento en las concentraciones de TBARS de las lombrices

xperimentales por efecto de las diferentes concentraciones de exposición ($F_s = 19,17$; $p < 0,001$) a medida que transcurrían los períodos de exposición ($F_s = 4,79$; $p < 0,05$). Sin embargo, no se encontró interacción entre ambos factores ($F_s = 0,59$; $p > 0,001$). De igual manera, se observaron diferencias significativas en los niveles de TBARS entre las porciones ($F_s = 2,32$; $p < 0,001$), detectándose mayores concentraciones en la región MA (Fig. 5).

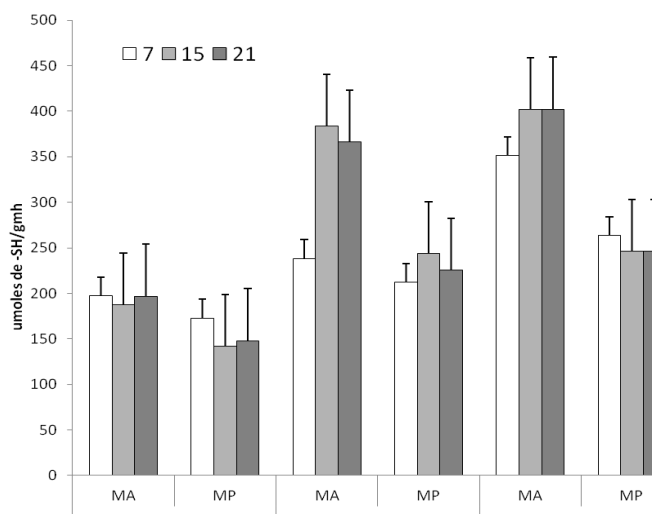


Figura 4. Niveles de tioles totales (-SH) en la región media-anterior (MA) y media-posterior (MP) de *Eisenia andrei* expuesta a diferentes dosis (0; 2,50 y 10,30 mg de Cd/kg sustrato) durante 7, 15 y 21 días. Los resultados se expresan en micromoles de -SH por gramos de masa húmeda de tejido.

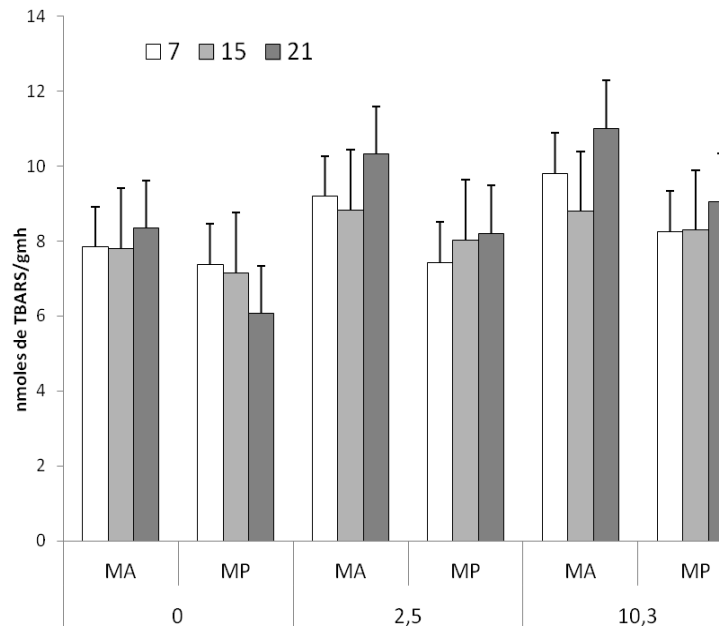


Figura 5. Niveles de sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) en la región media-anterior (MA) y media-posterior (MP) de *Eisenia andrei* expuesta a diferentes dosis (0; 2,50 y 10,30 mg de Cd/kg sustrato) durante 7, 15 y 21 días. Los valores están expresados en nanomoles de TBARS/g de masa húmeda.

DISCUSIÓN

Las concentraciones de Cd en la región MP demuestran que *E. andrei* acumula este metal de forma diferencial a lo largo del cuerpo, posiblemente modulando respuestas de ajustes frente a una condición de estrés químico inducida por la exposición a suelos contaminados. Al parecer, la mayor disposición del Cd hacia la región MP en *E. andrei* puede representar un mecanismo de desintoxicación del Cd y a su vez, protección de su tejido reproductivo (clíelo). Existen evidencias que la disponibilidad de Cd en los suelos afectan la viabilidad de los gametos, desarrollo sexual y producción de capullos (cocones) en las lombrices de tierra *Lumbricus terrestris* (Cikutovic *et al.* 1999) y *Eisenia fetida* (Spurgeon y Hopkin 1996, Žaltauskaitė y Sodienė 2010).

Similar a lo observado en *E. andrei*, en *L. rubellus* el Cd bioacumulado se distribuyó en el canal alimentario posterior, lo cual evita la diseminación de grandes cantidades del metal en otros tejidos de la lombriz, representando una estrategia de desintoxicación basada en inmovilización acumulativa del metal (Morgan *et al.* 1989). Esta capacidad de bioacumular cantidades significativas de Cd hacia la región posterior-caudal ha sido reportada como una habilidad de eliminación de metales pesados principalmente en especies autotómicas (Lucan-Bouche *et al.* 1999, Bouché *et al.* 2000, Vidal y Horne 2003).

La región MP de *E. andrei* presenta un gran porcentaje del intestino, lo cual le confiere a esta área corporal una mayor absorción de nutrientes, siendo ésta la principal ruta de ingreso de metales pesados en anélidos en comparación con la captación externa a través del tegumento corporal (Morgan *et al.* 2002, Stürzenbaum *et al.* 2004). Alrededor del intestino se encuentra un agregado difuso de células que forman una interfase fisiológica entre el epitelio alimentario, los vasos sanguíneos y el fluido celómico denominado tejido cloragógeno (TCG). Este tejido posee una función similar al hígado de los vertebrados y es determinante en la tolerancia de las lombrices de tierra al Cd y otros metales (Stürzenbaum *et al.* 2001). Se ha demostrado que en el TCG existen compartimientos conocidos como cloragosomas destinados para el depósito de metales en forma de gránulos electrodensos, y estructuras vesiculares específicas para contener Cd denominadas cadmosomas (Gruber *et al.* 2000, Morgan *et al.* 2004, Morgan y Turner 2005).

Estudios comparativos en un amplio rango de especies, incluyendo lombrices de tierra, sugieren que el Cd puede ser incorporado dentro de gránulos ricos en azufre en lisosomas modificados (Das *et al.* 2000). El ingreso del Cd al TCG induce la síntesis de proteínas, péptidos y tioles de distintas masas moleculares que acomplejan metales. Los incrementos de MT encontrados en *E. andrei* expuesta a Cd corrobora la capacidad que tienen estas proteínas de ser inducidas en presencia de dicho metal. En general, los niveles

de MT estuvieron relacionados con las concentraciones de Cd bioacumuladas intra-regiones, correspondiendo directamente con el tiempo y las dosis de exposición. No obstante, a pesar de que la MA presentó los menores promedios de Cd mostró concentraciones de MT ligeramente superiores en comparación con MP. Se ha propuesto que los iones de Cd ingresan a través de canales de calcio, y una vez absorbidos a nivel del epitelio intestinal, se unen a ligandos moleculares que facilitan su transporte a través del fluido celómico (Morgan *et al.* 2002), que posteriormente son compartimentalizados en liposomas y gotas de lípidos, para luego ser biotransformados y finalmente excretados (Stürzenbaum *et al.* 2001, Homa *et al.* 2005). Los mecanismos de bioacumulación de metales pesados pueden variar entre las especies, sin embargo, por lo general un organismo puede tolerar altas concentraciones de estos químicos del ambiente, evitando la ingesta de alimento contaminado, disminuyendo la absorción intestinal, acumulándolo en forma no tóxica y/o excretándolo eficientemente (Bengtsson *et al.* 1992).

Las concentraciones de Cd encontradas en la región MA en los organismos expuestos sugiere la presencia de mecanismos moleculares eficaces, tales como MT, proteínas enlazadoras de Cd (CdBP) y tioles de bajo peso molecular que facilitan la inmediata interacción con el metal, su transporte hacia la región caudal y efectiva desintoxicación del mismo, lo cual permitiría modular los efectos deletéreos en el tejido germinal. En este contexto, los celomocitos (células circulantes en el fluido celómico) cumplen un papel preponderante en el transporte de Cd mediado por la síntesis de isoformas específicas de MT en una sub-población celular derivada del TCG, la misma facilita el tráfico de metales hacia los compartimientos de excreción (Homa *et al.* 2005, 2015). Además, el ligero descenso observado en los niveles de MT a los 21 días y a la dosis más alta en ambas regiones se encuentra compensado con un incremento en los niveles de proteínas y grupos sulfhidrilos totales, formando parte de la activación de mecanismos alternativos que controlan la toxicidad del metal en períodos de exposición crónica.

Las concentraciones de proteínas totales (PT) y tioles totales (-SH) en la región MA pone en evidencia los ajustes bioquímicos en la defensa contra la toxicidad causada por Cd o la reducción de posibles daños oxidativos en la porción clitelar. Algunos autores han demostrado que las MT y otras proteínas similares ricas en -SH pueden desempeñar un rol protector contra el estrés oxidativo en organismos expuestos a compuestos

pro-oxidantes (Viarengo *et al.* 2000, Zapata-Vívenes y Nusetti 2007). Según Stürzenbaum *et al.* (2004), *E. andrei* sintetiza tres clases de proteínas de alto peso molecular (CdBP) con afinidad por Cd. Tales CdBP han sido ampliamente reportadas en diferentes especies de lombrices de tierras: *Lumbriculus variegatus* (Bauer-Hilty *et al.* 1989), *Dendrobae narubidus* (Morgan *et al.* 1989), *Tubifex tubifex* (Gillis *et al.* 2004) y *Eisenia foetida* (Suzuki *et al.* 1980, Stürzenbaum *et al.* 1998).

En este estudio se evidenció daños lipoperoxidativos en ambas porciones corporales, lo que indica que este metal puede modificar la eficiencia del sistema de defensa antioxidante en ambas regiones de la lombriz de tierra, causando desajustes en los niveles fisiológicos de moléculas que conjugan radicales libres. Recientemente se ha propuesto que a pesar de que el Cd no es un metal metabolizado mediante el ciclo redox de xenobióticos, el mismo se encuentra relacionado con un incremento de malondialdehído (MDA) (Marcano 2006, Bouraoui *et al.* 2015). Los niveles diferenciales de TBARS entre MA y MP muestran la posible variabilidad en las defensas antioxidantes a lo largo de su cuerpo. Detalles similares han sido reportados en los poliquetos *Laeonereis acuta* (Da Rosa *et al.* 2005, Ferreira-Cravo *et al.* 2007), *Eurythoe complanata* (Zapata-Vívenes 2012) y *Hediste diversicolor* (Bouraoui *et al.* 2015), mostrando estas especies variabilidad en las actividades de las enzimas antioxidantes en las regiones anterior, media y posterior.

CONCLUSIÓN

Eisenia andrei acumuló Cd de manera proporcional a la concentración del metal y al tiempo de exposición, sin embargo presentó mayor contenido en la región MP. Incrementos significativos de MT, grupos tioles y proteínas totales en ambas regiones corporales constituyen mecanismos de defensa importante contra la toxicidad del Cd, cuya activación podrían estar asociadas a evitar mayores perturbaciones oxidativas en los órganos de reproducción. *E. andrei* presenta una capacidad diferencial para modular respuestas bioquímicas a lo largo de su cuerpo, lo cual le podría permitir la desintoxicación del metal, tolerancia y eficacia para sobrevivir frente a concentraciones subletales de Cd.

AGRADECIMIENTO

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

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI A, NAAZI. 2013. Earthworm biomarkers: The new tools of environmental impact assessment. *Biosci. Biotech. Res. Comm.* 6(2):163-169.
- BARTELL S. 2006. Biomarkers, bioindicators, and ecological risk assessment-a brief review and evaluation. *Environ. Bioindicators.* 1(1):60-73.
- BAUER-HILTY A, DALLINGER R, BERGER B. 1989. Isolation and partial characterization of a Cd-binding protein from *Lumbricus variegates* (Oligochaeta, Annelida). *Comp. Biochem. Physiol.* 94(2):373-379.
- BENGTSSON G, EK H, RUNDGREN, S. 1992. Evolutionary response of earthworm to long-term metal exposure. *Oikos.* 63(2):289-297.
- BEYTUT E, AKSAKAL A. 2002. The effect of long-term supplemental dietary cadmium on lipid peroxidation and antioxidant system in the liver and kidneys of rabbits. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 26:1055-1060.
- BONOMELLI C, BONILLA C, VALENZUELA A. 2003. Efecto de la fertilización fosforada sobre el contenido de cadmio en cuatro suelos de Chile. *Pesq. Agropec. Bras.* 38(10):1179-1186.
- BOUCHÉ M, HABETS F, RISBOURG S, VERNET G. 2000. Toxic effects and biocumulation of cadmium in aquatic oligochaete *Tubifex tubifex*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 46(3):246-251.
- BOURAOUI Z, GHEDIRA J, BOUSSETTA H. 2015. Biomarkers responses in different body regions of the Polychaeta *Hediste diversicolor* (Nereidae, Polychaete) exposed to copper. *J. Integrated Coast. Zone Manage.* 15(3):371-376.
- CIKUTOVIC M, FITZPATRICK L, GOVEN A, VENABLES B, GIGGLEMAN M, COOPER E. 1999. Wound healing in earthworms *Lumbricus terrestris*: A cellular-based biomarker for assessing sublethal chemical toxicity. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 62(2):508-514.
- DAS K, DEBACKER V, BONGUEGNEAU M. 2000. Metallothioneins in marine mammals. *Cell. Mol. Biol.* 46(2):283-294.
- DA ROSA C, IURMAN M, ABREU P, GERACITANO L, MONSERRAT M. 2005. Antioxidant mechanisms of the nereidae *Laeonereis acuta* (Annelida: Polychaeta) to cope with environmental hydrogen peroxide. *Physiol. Biochem. Zool.* 78(4):641-649.
- ELLMAN G. 1958. A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Arch. Biochem. Biophys.* 74(2):443-450.
- FERREIRA-CRAVO M, REINHARDT F, BARROS T, RIBAS J, SALOMA-DE FREITAS D, MACHADO M, GERACITANO L, MONSERRAT J. 2007. Antioxidant responses and reactive oxygen species generation in different body regions of the estuarine Polychaeta *Laeonereis acuta* (Nereididae). *Chemosphere.* 66(7):1367-1374.
- GAETE H, HIDALGO M, NEAMAN A, ÁVILA G. 2010. Evaluación de la toxicidad de cobre en suelos a través de biomarcadores de estrés oxidativo en *Eisenia foetida*. *Quim. Nova.* 33(3):566-570.
- GASTALDI L, RANZATO E, CAPRÌ F, HANKARD P, PÉRÈS G, CANESI L, VIARENGO A, PONS G. 2007. Application of a biomarker battery for the evaluation of the sublethal effects of pollutants in the earthworm *Eisenia andrei*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 146(3):398-405.
- GILLIS P, REYNOLDSON T, DIXON D. 2004. Natural variation in a metallothionein-like protein in *Tubifex tubifex* in the absence of metal exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 58(1):22-28.
- GOSWAMI L, SARKAR S, MUKHERJEE S, DAS S, BARMAN S, RAUL P, BHATTACHARYA P, MANDAL N, BHATTACHARYA S, BHATTACHARYA S. 2014. Vermicomposting of Tea Factory Coal Ash: Metal accumulation and metallothionein response in *Eisenia fetida* (Savigny) and *Lampito mauritii* (Kinberg). *Bioresour. Technol.* 166:96-102.
- GRUBER C, STÜRZENBAUM S, GEHRIG P, HUNZIKER P, BURKHARD B, REINHARD D. 2000. Isolation and characterization of a self-sufficient one domain protein (Cd)-Metallothionein from *Eisenia foetida*. *Eur. j. Biochem.* 247(2):295-311.
- HOMA J, OLCHAWA E, STÜRZENBAUM S, MORGAN J, PIYTYCZ B. 2005. Early-phase

- immunodetection of metallothionein and heat shock proteins in extruded earthworm coelomocytes after dermal exposure to metals ions. *Environ. Pollut.* 135(2):275-280.
- HOMA J, RARAT A, KRUK J, COCQUERELLE C, PLYTYCZ B, VANDENBULCKE F. 2015. Dermal exposure of *Eisenia andrei* earthworms: Effects of heavy metals on metallothionein and phytochelatin synthase gene expressions in coelomocytes. *Environ. Toxicol. Chem.* 34(6):1397-404.
- LOWRY O, ROSEBROUGH N, FARR A, RANDALL R. 1951. Protein measurement with the folin reagent. *J. Biol. Chem.* 193(1):265-275.
- LUCAN-BOUCHE M, BIAGIANTI S, ARSAC F, VERNET C. 1999. An original decontamination process developed by aquatic oligochaete *Tubifex tubifex* exposed to copper and lead. *Aquat. Toxicol.* 45:9-17.
- MARCANO E. 2006. Efectos del cadmio sobre los niveles de glutatión reducido (GSH) y actividades de enzimas antioxidantes en relación con la peroxidación de lípidos en la lombriz de tierra *Eisenia foetida*. Cumaná, Venezuela: Universidad de Oriente, Escuela de Ciencias, Departamento de Biología [Trabajo de Grado Licenciatura en Biología], pp. 70.
- MORGAN J, MORGAN A. 1998. The distribution and intracellular compartmentation of metals in the endogenic earthworm *Aporrectodea caliginosa* sampled from unpolluted and a metal-contaminated site. *Environ. Pollut.* 99(2):167-175.
- MORGAN A, TURNER M. 2005. Quantitative ultrastructure of metal-sequestering cells reflects intersite and interspecies differences in earthworm metal burdens. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 49(1):45-52.
- MORGAN A, TURNER M, MORGAN J. 2002. Morphological plasticity in metal-sequestering earthworm clhrogocytes: Morphometric electron microscopy provides a biomarker of exposure in field populations. *Environ. Toxicol. Chem.* 21(3):610-618.
- MORGAN J, NOREY C, MORGAN A. 1989. A comparison of the cadmium-binding protein isolated from the posterior alimentary canal of the earthworms *Dendrodilus rubidus* and *Lumbricus rubellus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 92C:15-21.
- MORGAN A, STÜRZEMBAUM S, WINTERS C, GRIME G, AZIZ N, KILLE P. 2004. Differential metallothionein expression in earthworm (*Lumbricus rubellus*) tissues. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 578(1):11-19.
- NUSETTI O, ESCALPÉS M, SALAZAR G, NUSETTI S, PULIDO S. 2001. Biomarkers of oxidative stress in the polychaete *Eurythoe complanata* (Amphinomidae) under short term copper exposure. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 66(5):576-581.
- POLO A, MARCANO L, GRANADILLO M, MARCANO E, CORTESÍA C, HERNÁNDEZ J. 2011. Crecimiento y reproducción de la roja californiana (*Eisenia andrei*) en sustratos con cadmio. *Bol. Centro Invest. Biol.* 45(2):119-130.
- POLO A, MARCANO L, MARTÍNEZ R. 2012. Evaluación de la calidad del humus producido por *Eisenia andrei* a partir de tres sustratos orgánicos. *Bol. Centro Invest. Biol.* 46(3):263-282.
- PODOLAK L, PIOTROWSKA E, KLIMEK M, KLIMEK B, KRUK J, PLYTYCZ B. 2011. Effects of nickel, zinc, and lead-contaminated soil on burrowing rate and coelomocytes of the earthworm, *Allolobophora chlorotica*. *Folia Biologica (Kraków)*. 99(3-4):91-97.
- RANA A, DUTTA A, NAAZ M, KUMARI S, FAROOQUI S. 2013. Uptake and kinetics of bioaccumulation of heavy metals (lead and cadmium) from contaminated soil using *Eisenia foetida*. *Res. Rev. J. Ecol.* 2(2):8-14.
- ROJAS DE ASTUDILLO L, CHANG I, AGARD J, BEKELE I, HUBBAND R. 2002. Heavy metals in green mussel (*Perna viridis*) and oysters (*Crassostreas* sp) from Trinidad and Venezuela. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42(4):410-415.
- SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ J. 2006. Earthworm biomarkers in ecological risk assessment. *In: Reviews of environmental contamination and toxicology*. Springer, New York, USA, pp. 85-126.
- SCOTT-FORDSMAND J, WEEKS J. 2000. Biomarkers in earthworms. Springer, New York, USA, pp. 117-159.
- SOKAL R, ROHLF F. 1979. *Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación*

- biológica. H. Blume Ediciones, Madrid, España, pp. 872.
- STÜRZENBAUM S, KILLE P, MORGAN A. 1998. The identification, cloning and characterization of earthworm metallothionein. *FEBS Lett.* 431(3):437-442.
- STÜRZENBAUM S, WINTERS C, GALAY M, MORGAN A, KILLE P. 2001. Metal ion trafficking in earthworms: Identification of a cadmium-specific metallothionein. *J. Biol. Biochem.* 276(36):34013-34018.
- STÜRZENBAUM S, GEORGIEV O, MORGAN J, KILLE P. 2004. Cadmium in earthworms: from genes to cells. *Environ. Sci. Technol.* 38(23):6283-6289.
- SUZUKI K, YAMAMAURA M, MORI T. 1980. Cadmium-binding proteins induced in the earthworm. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 9(4):415-424.
- SPURGEON D, 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. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 35(1):86-95.
- VASSEUR P, BONNARD M. 2014. Ecogenotoxicology in earthworms: A review. *Current Zool.* 60(1-2):255-272.
- VIARENGO A, PANZOANO E, DONDERO F, FABBRI R. 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in Mediterranean and Antarctic molluscs. *Mar. Environ. Res.* 44(1):69-84.
- VIARENGO A, BURLANDO B, CARATTO N, PANFOLI I. 2000. Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cell. Mol. Biol.* 46(2):407-417.
- VIDAL D, HORNE A. 2003. Mercury toxicity in the aquatic oligochaete *sparganophilus pearsei* II: Autotomy as a novel form of protection. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 45(4):462-467.
- YANG X, SONG Y, ACKLAND M, LIU Y, CAO X. 2012. Biochemical responses of earthworm *Eisenia fetida* exposed to cadmium-contaminated soil with long duration. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 89(6):1148-1153.
- ŽALTAUSKAITĖ J, SODIENĖ I. 2010. Effects of total cadmium and lead concentrations in soil on the growth, reproductions and survival of earthworm *Eisenia fetida*. *Ekol.* 56(1-2):10-16.
- ZAPATA-VÍVENES E. 2012. *Eurythoe complanata* Pallas 1766 (Polychaeta: Amphinomididae) como organismo sensor de contaminación en costas del estado Sucre, Venezuela. Cumaná, Venezuela: Universidad de Oriente, Instituto Oceanográfico de Venezuela [Tesis Doctorado en Ciencias Marinas], pp. 160.
- ZAPATA-VÍVENES E, NUSETTI O. 2007. Protection of glycolytic enzymes by metallothioneins from oxidative damage in digestive gland of green lipped mussel *Perna viridis*. *J. Shell. Res.* 26(2):1-10.
- ZHANG Y, SHEN G, YU Y, ZHU H. 2009a. The hormetic effect of cadmium on the activity of antioxidant enzymes in the earthworm *Eisenia fetida*. *Environ. Pollut.* 157(11):3064-3068.
- ZHANG X, LU Y, SHIA Y, CHEN C, YAN Z, LID Y, FENG Y. 2009b. Antioxidant and metabolic responses induced by cadmium and pyrene in the earthworm *Eisenia fetida* in two different systems: contact and soil tests. *Chem. Ecol.* 25(3):205-215.