



**¿Es costoso afrontar el Cambio Global? Estudio  
integrado de biomarcadores y costos metabólicos en  
*Aporrectodea caliginosa*.**

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

En cumplimiento parcial de los requisitos

Para optar al grado de

**Doctor en Ecología y Biología Evolutiva**

Facultad de Ciencias

Por

Cristóbal Narváez Ordóñez

Marzo, 2021

Director de Tesis: Dr. Pablo Sabat Kirkwood

Co-director de tesis: Dr. Juan Carlos Sánchez Hernández



## INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE DOCTORADO

**Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato**

**CRISTÓBAL NARVÁEZ ORDÓÑEZ**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ecología y Biología Evolutiva, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día \_\_\_\_\_ de 2021.

*Dr. Pablo Sabat Kirkwood*

**Director de Tesis**

\_\_\_\_\_

*Dr. Juan Carlos Sánchez Hernández*

**Co-director de Tesis**

\_\_\_\_\_

### **Comisión de Evaluación de la Tesis**

*Dra. Carezza Botto*

**Presidenta Comisión**

\_\_\_\_\_

*Dra. Karin Maldonado*

**Evaluadora**

\_\_\_\_\_

*Dra. Caren Vega*

**Evaluadora**

\_\_\_\_\_

*Dr. Francisco Bozinovic*

**Evaluador**

\_\_\_\_\_

Santiago, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2021



**Cristóbal Narváez Ordóñez**

Nació en Santiago, Chile en 1987. Durante su infancia y juventud se caracterizó por su tranquilidad y el gusto por la música, estudiar y leer. En 2006 hace ingreso a Biología Ambiental en la facultad de Ciencias de la Universidad de Chile y durante su estadía en el pre y posgrado consolida su interés en la ecología y establece su línea de investigación bajo la cotutela de los Doctores Pablo Sabat y Juan Carlos Sánchez, en el laboratorio de Ecofisiología Animal.

## **Agradecimientos**

Me gustaría agradecer en primer lugar a mi tutor, Pablo Sabat, por haberme dado la oportunidad de ingresar a su laboratorio cuando era un estudiante de pregrado sin experiencia en investigación. Agradezco todos sus consejos, enseñanzas y su tremenda ayuda a lo largo de los años que me han ayudado a crecer como científico y más importante aún, como persona. También agradezco a mi cotutor, Juan Carlos Sánchez por su confianza en mis ideas desde la primera vez que trabajamos juntos, por su significativo aporte a mi desarrollo profesional y personal, y por su incalculable aporte a esta tesis.

Agradezco a las doctoras Carezza Botto, Karin Maldonado, Caren Vega y al doctor Francisco Bozinovic por aceptar formar parte de la comisión evaluadora de esta tesis, por sus valiosos aportes durante su etapa de proyecto, y sus correcciones para que quedara de la mejor forma posible.

Tampoco me olvido de quienes participaron activamente de este proyecto, Andrés Sazo por llevarme a terreno a buscar las lombrices y por ayudarme a establecerlas en el laboratorio. Agradezco a Carolina Contreras y Guido Pavez por su gran amistad, los almuerzos y las galletas en la sobremesa, a Claudia Faure por su gran ayuda en un momento crucial del desarrollo de esta tesis. Agradezco de igual forma al resto del team Ecofisio: Natalia Ramírez, Isaac Peña-Villalobos, Felipe Álvarez, Lucas Navarrete y Yanina Poblete.

Nuevamente, mis amigos de la vida Camilo Barriga, Camilo Céspedes, Eduardo Flores, Raúl Guevara, Christofer Oros y Luis Ramírez, fueron un pilar fundamental durante esta etapa, sin ellos hubiera terminado esta tesis un año antes (?).

También agradezco a mi familia Mari, Juan, Paulina, Javier, Florencia y Arturo por su constante apoyo y amor, sin ustedes, nada de esto sería posible.

Finalmente agradezco a Andrea por su inmenso amor, confianza, apoyo, por creer siempre en mí y por ayudarme a creer en mí mismo.

Agradezco al Center of Applied Ecology and Sustainability (CAPES) la oportunidad de realizar esta investigación y a ANID PIA/BASAL FB0002 por el financiamiento.

Esta tesis de doctorado fue financiada por la beca CONICYT 2117

## Índice de Materias

<b>Índice de Tablas</b> .....	<b>vii</b>
<b>Índice de Figuras</b> .....	<b>viii</b>
<b>Índice de Abreviaturas</b> .....	<b>ix</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>x</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xi</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 El cambio global: consideraciones generales .....	1
1.2 Perturbaciones de origen natural y antrópico .....	2
1.3 Pesticidas en el escenario del cambio global.....	4
1.4 Lombrices; ingenieros ecosistémicos y su impacto en el suelo. ....	7
1.5 ¿Es energéticamente costoso detoxificar contaminantes ambientales?.....	8
1.6 El uso de pesticidas en Chile .....	10
<b>2 HIPÓTESIS</b> .....	<b>13</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
3.1 Objetivos generales .....	15
3.2 Objetivos específicos.....	15
<b>4 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>16</b>
4.1. Reactivos .....	16
4.2. Lombrices y suelo .....	16
4.3 Diseño experimental.....	17
4.4 Propiedades fisicoquímicas del suelo y residuos de clorpirifós .....	18
4.5. Tasa metabólica estándar.....	19
4.6. Homogenización de tejidos .....	20
4.7. Biomarcadores de lombrices .....	20
4.8. Actividad enzimática en suelos y heces .....	22
4.9. Análisis de datos.....	23
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>24</b>
5.1 Concentración de clorpirifós y masa corporal.....	24
5.2 Tasa metabólica estándar.....	25

5.3 Marcadores bioquímicos .....	28
5.3.1 Esterasas en lombrices .....	28
5.3.2 Esterasas en heces .....	32
5.3.3 Esterasas en suelo .....	34
5.3.4 Estrés oxidativo.....	37
5.4 Análisis factorial exploratorio .....	42
<b>6. DISCUSIÓN .....</b>	<b>45</b>
6.1 Efecto de la temperatura, humedad y pesticida sobre la masa corporal y la tasa metabólica .....	45
6.2 Efecto del cambio global sobre las esterasas.....	48
6.3 Cambios en el estado oxidativo.....	51
6.4 Análisis global.....	53
6.5 Conclusiones .....	55
<b>8. REFERENCIAS .....</b>	<b>59</b>

## Índice de Tablas

Tabla 1: Tratamientos experimentales .....	17
Tabla 2: Concentraciones de clorpirifós medidas por HPLC en los suelos de los tratamientos comparadas con la concentración nominal.....	24
Tabla 3: ANOVA de 3 vías (humedad, temperatura y pesticida) para la tasa metabólica estándar medida a dos temperaturas de lombrices sometidas a los tratamientos .....	27
Tabla 4: Efecto de la temperatura sobre el $Q_{10}$ de la tasa metabólica estándar de los individuos de <i>A. caliginosa</i> . .....	28
Tabla 5: ANOVA de tres vías (humedad, temperatura y pesticida) para la actividad esterásica de lombrices sometidas a los tratamientos .....	28
Tabla 6: Matriz de correlación de Pearson de SMR y esterásas en individuos de <i>A. caliginosa</i> sometidos a distintos tratamientos durante 12 semanas .....	31
Tabla 7: ANOVA de 3 vías (humedad, temperatura y pesticida) para la actividad esterásica de las heces de los individuos sometidos a los tratamientos durante 12 semanas .....	32
Tabla 8: ANOVA de tres vías (humedad, temperatura y pesticida) para la actividad esterásica de los suelos utilizados en los tratamientos .....	34
Tabla 9: ANOVA de tres vías (humedad, temperatura y pesticida) para los marcadores de estrés oxidativo de lombrices sometidas a los tratamientos.....	37
Tabla 10: ANOVA de tres vías (humedad, temperatura y pesticida) para los marcadores de estrés oxidativo de lombrices sometidas a los tratamientos .....	39
Tabla 11: Matriz de correlación de Pearson de SMR y marcadores de estrés oxidativo en individuos de <i>A. caliginosa</i> sometidos a distintos tratamientos durante 12 semanas .....	41
Tabla 12: Valores de cargas factoriales para las variables analizadas en los individuos de <i>A. caliginosa</i> sometidos a los ocho tratamientos simulando diferentes escenarios de cambio global durante 12 semanas .....	42



## Índice de Figuras

Figura 1: Principales procesos fisicoquímicos y biológicos que contribuyen a la distribución, degradación y toxicidad de los pesticidas en los ecosistemas terrestres.....	5
Figura 2: Promedio de masa corporal de los individuos de <i>Aporrectodea caliginosa</i> expuestos durante 12 semanas a los ocho tratamientos que simulan distintos escenarios de cambio global.....	25
Figura 3: Promedio de producción de CO <sub>2</sub> previo al inicio de los tratamientos, medida a 10 y a 20 °C.....	26
Figura 4: Promedio de producción de CO <sub>2</sub> posterior a los tratamientos, medida a 10 y a 20 °C.....	27
Figura 5: Promedio de actividad específica de CbE- $\alpha$ NA, CbE- $\alpha$ NB, CbE-4-NPA, BChE y AChE en individuos de <i>A. caliginosa</i> sometidos a los distintos tratamientos durante 12 semanas.....	30
Figura 6: Mapa de calor de matriz de correlaciones de SMR y esterazas en individuos de <i>A. caliginosa</i> sometidos a distintos tratamientos durante 12 semanas.....	31
Figura 7: Promedio de actividad específica de CbE- $\alpha$ NA en las heces de los individuos sometidos a los distintos tratamientos en distintas semanas.....	33
Figura 8: Promedio de actividad específica de CbE- $\alpha$ NA en los suelos de los tratamientos en distintas semanas.....	36
Figura 9: Promedio de concentraciones de ácido úrico, peróxido y MDA en individuos de <i>A. caliginosa</i> sometidos a los distintos tratamientos durante 12 semanas.....	38
Figura 10: Promedio de concentraciones de GSH, GSSG y GSH/GSSG en individuos de <i>A. caliginosa</i> sometidos a los distintos tratamientos durante 12 semanas.....	40
Figura 11: Mapa de calor de matriz de correlaciones de SMR y marcadores de estrés oxidativo en individuos de <i>A. caliginosa</i> sometidos a distintos tratamientos durante 12 semanas.....	41
Figura 12: Diagrama de vías de análisis factorial exploratorio.....	43
Figura 13: <i>Scree plot</i> del análisis de factores.....	44
Figura 14: Plot del análisis de factores de los datos de SMR y marcadores bioquímicos de los individuos de <i>Aporrectodea caliginosa</i> expuestos a los ocho tratamientos.....	44
Figura 15: Resumen ilustrativo de las principales conclusiones de este estudio con respecto a la capacidad detoxificadora de la lombriz, su homeostasis oxidativa, presupuesto energético y masa corporal.....	55

## Índice de Abreviaturas

$\alpha$ -NA:	$\alpha$ -naftil acetato
$\alpha$ -NB:	$\alpha$ -naftil butirato
AChE:	Acetilcolinesterasa
BChE:	Butirilcolinesterasa
CbE:	Carboxilesterasa
CPF:	Clorpirifós
GSH:	Glutati3n reducido
GSSG:	Glutati3n oxidado
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Per3xido de hidr3geno
MDA:	Malondialdehido
OF:	Organofosforado
P-NPA/4-NPA:	Para nitrofenil acetato/ 4 nitrofenil acetato
ROS:	Especies reactivas del ox3geno
SMR:	Tasa metab3lica est3ndar
TAC:	Capacidad total antioxidante
TBARS:	Sustancias reactivas al 3cido tiobarbit3rico
WHC:	Capacidad de retenci3n del agua

## RESUMEN

El *Cambio Global* considera tanto los cambios en el sistema climático a escala planetaria, como las distintas actividades antrópicas generadas por el gran incremento de la población humana de las últimas décadas. Los distintos modelos climáticos predicen un aumento de hasta 5°C en la temperatura y una reducción de hasta 100 mm/década en las precipitaciones para la región central de Chile, y considerando estos modelos, el uso de pesticidas se vería fuertemente afectado, causando una reducción en su concentración en el ambiente debido al incremento de la tasa de volatilización y degradación fisicoquímica y biológica. Dicho efecto se vería atenuado al aumentar las tasas de aplicación, dosis y tipos de plaguicidas. Durante los últimos años, las lombrices han sido propuestas como organismos biorremediadores, pero podrían verse afectadas en este nuevo escenario debido a los altos costos de detoxificación de pesticidas, los cuales se sumarían al consumo de energía extra para sobrevivir en condiciones desfavorables de temperatura y humedad. En esta tesis, se analizó el efecto de la interacción del aumento de la temperatura, la disminución de humedad y la exposición a una dosis subletal de un pesticida organofosforado sobre el desempeño bioquímico y energético de una especie de lombriz endógena (*Aporrectodea caliginosa*) de amplia distribución global. Se encontró que la combinación de los tres factores produce inhibiciones en todas las actividades esterásicas, lo que sugiere un rol de tampón o *buffer* disminuyendo la concentración del pesticida en el organismo. Junto con ello, la combinación de estos tres estresores produce un desbalance en el estado oxidativo asociado a la producción de especies reactivas del oxígeno y un aumento de los costos metabólicos derivado del despliegue de los procesos que buscan proteger y librar al organismo del efecto de los estresores. Estos efectos llevan a una disminución significativa en la masa corporal de los individuos después de 12 semanas de tratamiento, lo que podría tener un efecto poblacional y podría causar una disminución

en los tamaños poblacionales de distintas especies de lombrices, llevando incluso a la extinción local.

## **ABSTRACT**

Global Change considers changes in the climate system on a planetary scale, as well as the different anthropocentric activities that have happened due to the constant growth of human population throughout the last decades. Different climate models predict Chile's average temperature to rise at least 5°C, and a decrease in precipitation by 100 mm/decade for its central regions. Considering these models, the use of pesticides could be strongly affected, causing a reduction of its concentration in the environment due to the increase in volatilization rates, as well as its physicochemical and biological degradation rates. This effect could be attenuated by increasing the types of pesticides to use, their dosage, and their application rate. During the last few years, earthworms have been proposed as bioremediation organisms, but they could also be affected by this new scenario, due to the high metabolic cost of pesticide detoxification, which would end up adding extra consumption of the energy that is usually reserved to surviving through unfavorable temperature and humidity conditions. In this thesis, the effect of the interaction between the increase in temperature, the decrease in humidity and the exposure to a sublethal dose of organophosphate pesticide, over the biochemical and energetic performance of an endogeic earthworm of worldwide distribution (*Aporrectodea caliginosa*). It was found that the combination of these three factors produces the inhibition of all esterase activities, which suggests a buffering role, thus decreasing internal pesticide concentration in the organism. Also, the combination of these stressing factors causes an imbalance in the oxidative state associated to the production of Reactive Oxygen Species, and an increase on overall metabolic expenditure derived from the display of processes that takes place to protect the organism and relieve it from stress. These effects lead to a significant decrease in the body mass of individuals after 12 weeks of

treatment, which could have a population effect and could cause a decrease in the population sizes of different species of worms, even leading to local extinction.

# 1 INTRODUCCIÓN

## *1.1 El cambio global: consideraciones generales*

El clima se define como la descripción estadística en términos de promedio y variabilidad de las variables meteorológicas (temperatura, precipitación, humedad y vientos) sobre un período de tiempo, normalmente establecido en un intervalo de 30 años y en una región determinada (Intergovernmental Panel on Climate Change, IPCC, 2013). No obstante, el sistema climático cambia con el tiempo bajo la influencia de sus propias dinámicas internas y también por el efecto de fuerzas externas naturales (e.g., erupciones volcánicas, variaciones solares) y también de impactos antropogénicos, tales como el cambio en la composición de la atmósfera y el cambio del uso del suelo (IPCC, 2013). En muchos casos, las actividades humanas son los principales causantes de los cambios en el sistema climático. Cuando estos cambios suceden a escala planetaria, entonces podemos asumir que estamos ante un fenómeno de **cambio global**. El incremento de la población humana en las últimas décadas es un gran causante del cambio global y, por lo tanto, el término incluye la contaminación, el uso de pesticidas, la economía, el uso de los recursos, energía, desarrollo de medios de transporte, comunicaciones, uso del suelo, urbanización y globalización. El concepto de cambio global también abarca distintos fenómenos como los cambios a escala planetaria en la circulación atmosférica, circulación oceánica, clima, ciclo de carbono, ciclo de nitrógeno, ciclo del agua, cambios en la dinámica del hielo marino, en el nivel del mar, redes tróficas, diversidad biológica, contaminación, entre muchos otros. (International Geosphere-Biosphere Programme, IGBP, 2015).

Los cambios del sistema climático como consecuencia directa de actividades antropogénicas se deben principalmente a la quema de combustibles fósiles, que causa un aumento

de la concentración de gases de efecto invernadero (CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, NO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>). Se ha documentado extensamente que dicho aumento comenzó a ser significativo a mediados del siglo XIX como consecuencia del proceso de industrialización (Garreaud 2011). En las siguientes secciones, se analizará en mayor detalle las causas naturales y de origen antrópico que están causando el cambio global del planeta.

### *1.2 Perturbaciones de origen natural y antrópico*

Los ecosistemas son entidades dinámicas y variables en el tiempo y el espacio, y estos patrones de variabilidad son modulados por eventos conocidos como perturbaciones. Se puede definir una perturbación como cualquier evento discreto en el tiempo que puede desorganizar el ecosistema, comunidad o la estructura de la población, y cambia los recursos, la disponibilidad de sustratos o el ambiente físico (White y Pickett, 1985).

La literatura científica describe distintos tipos de perturbaciones, tanto de origen natural como antrópico. Entre las naturales, se distinguen las perturbaciones asociadas al viento, que causan un impacto espacialmente muy amplio, pudiendo suceder desde unos pocos metros cuadrados hasta cientos de kilómetros cuadrados (Fischer et al., 2013). Este tipo de perturbaciones físicas, causan desecación del suelo con sus consecuentes cambios en la comunidad descomponedora y sus efectos en las redes tróficas, interacciones especie-específicas y estabilidad del ecosistema (González et al., 2014; Turner et al., 1998). También se pueden observar perturbaciones asociadas con el agua, como son las sequías, que incrementan la dureza de los suelos (Anh et al., 2014), dificultando la dispersión geográfica de la fauna. Además de estas y otras perturbaciones de origen natural, se debe considerar el efecto del ser humano sobre los ecosistemas nativos, los cuales son convertidos en tierras de cultivos, práctica que se conoce como agricultura. Dicha práctica lleva a la pérdida de carbono orgánico del suelo (Murty et al., 2002; Oogle et al., 2005) a través de una alteración intensa que perturba su estructura (Six et al., 2002),

disminuye la macroporosidad (Pagliai et al., 2004), acelera la erosión (Pimental et al., 1976; García-Orenes et al., 2009) y disminuye la cantidad y la abundancia de especies de la fauna del suelo (Filser et al., 1995).

Existe consenso en que el efecto más importante e inmediato del cambio global es el incremento de la temperatura media ambiental. El promedio de la temperatura global ha aumentado aproximadamente en 1°C desde principios del siglo XX y se observa una clara tendencia de calentamiento global a largo plazo, a pesar de no registrarse un incremento anual progresivo. Este aumento de la temperatura se debe en gran parte al aumento en la concentración de CO<sub>2</sub> y otras emisiones gaseosas introducidas a la atmósfera por la acción del ser humano. Actualmente, la concentración promedio de CO<sub>2</sub> alcanza unas 360 ppm, que corresponde a un 30% sobre el valor preindustrial (280 ppm), y se estima que durante los próximos 20 años ese valor preindustrial se duplique (Garreaud 2011). Algunos modelos climáticos predicen lo que sucedería con la temperatura superficial del planeta cuando se alcance el doble de concentración de CO<sub>2</sub>. La mayoría de las estimaciones predicen un incremento de 2-3°C, con los valores más bajos cercanos a +1°C y los más altos de +5°C (Schwartz 2008). Estos aumentos de temperatura superficial son los responsables de la disminución del tamaño de los glaciares y casquetes polares, la reducción de la cubierta de nieve en el hemisferio norte, el aumento del nivel del mar (National Oceanic and Atmospheric Administration, NOAA) y la disminución de las precipitaciones y de la humedad del suelo en las regiones de clima mediterráneo (Christensen et al., 2007).

En Chile, durante los últimos años se ha observado una disminución significativa de lluvias en la zona centro y sur (Quintana y Aceituno, 2006), con una reducción de las precipitaciones de hasta 100 mm/década en el sector de Valdivia (Garreaud 2011). Según los modelos PRECIS (Providing Regional Climates for Impact Studies), que es un RCM (Regional Climate Model) desarrollado por el Hadley Centre del Reino Unido sobre la base de Modelos



Globales de este mismo centro de investigación, la temperatura de la zona central podría aumentar hasta en 5°C entre fines de siglo XXI (2070-2100 bajo el peor escenario de emisión de gases de efecto invernadero, A2) y según la condición actual (1960-1990) (Garreaud 2011).

### *1.3 Pesticidas en el escenario del cambio global*

Los pesticidas han sido utilizados históricamente para combatir las plagas agrícolas, aumentar el rendimiento de las cosechas y disminuir el riesgo de pérdidas de éstas. A pesar de estos beneficios, el uso de pesticidas en la agricultura convencional es una amenaza para la calidad del suelo y la biodiversidad del agroecosistema (Stavi et al., 2006). La producción agrícola ha aumentado significativamente desde el inicio del siglo XX para atender las demandas de alimentación propias del crecimiento demográfico. La población mundial aumentó desde 2,5 mil millones en 1950 a 7,3 mil millones de 2015 y se estima que será unos 9,7 mil millones en 2050 (United Nations, UN, 2015). Este aumento de la población no habría sido posible sin el crecimiento en la producción de alimentos, el cual viene sostenido con la introducción de los pesticidas. De hecho, la producción de pesticidas también ha experimentado un aumento significativo desde 1950, con un consumo de 0,2 millones de toneladas en ese año, a más de 5 millones en el año 2000 (Food and Agriculture Organization, FAO 2017). En la actualidad, el gasto mundial de pesticidas a nivel de productores ascendió a casi US\$56 mil millones entre los años 2008 y 2012, y de ese total, un 30% corresponde a organofosforados (OFs), con el clorpirifós (CPF) como el principal insecticida organofosforado utilizado en USA (Environmental Protection Agency EPA, 2017). Se estima que un 45% de los pesticidas aplicados llega y permanece en las cosechas, y por lo tanto grandes cantidades entran al medio ambiente (Gavrilescu 2005). Además del aire y el agua, el suelo representa el compartimento ambiental donde los pesticidas son principalmente acumulados (Caldas et al., 1999; Sánchez-Brunete et al., 2004; de Souza Pinheiro y de Andrade, 2009; Bergh et al., 2011; Schaafsma et al., 2015) (Figura 1). En el suelo, los pesticidas están sujetos a procesos

fisicoquímicos y biológicos muy diversos que condicionan su transformación y degradación, produciendo metabolitos que pueden ser tan tóxicos como el compuesto original. De esta forma, la persistencia de los pesticidas en los suelos agrícolas puede resultar en una gran amenaza para los organismos no-diana (Devine y Furlong, 2007).

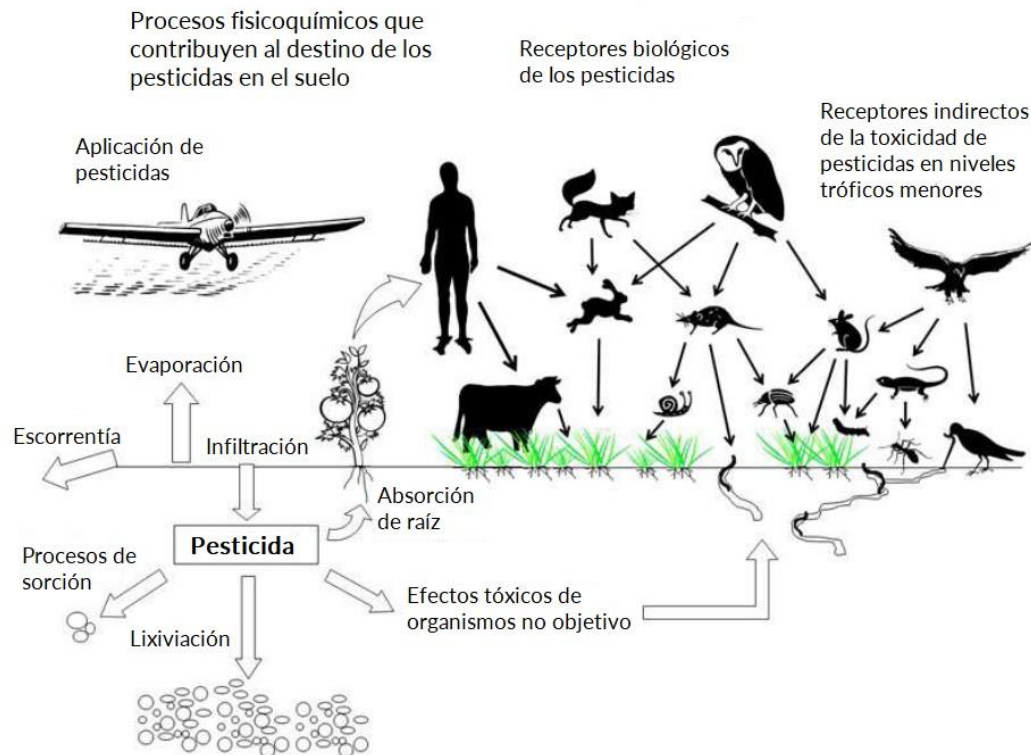


Figura 1: Principales procesos fisicoquímicos y biológicos que contribuyen a la distribución, degradación y toxicidad de los pesticidas en los ecosistemas terrestres (esquema conceptual tomado de Sanchez-Hernandez 2011).

El mecanismo de toxicidad aguda de los pesticidas OFs consiste en la inhibición irreversible de la enzima acetilcolinesterasa (AChE, EC 3.1.1.7) en los sistemas nerviosos y neuromuscular (Maxwell 1992, Chanda et al., 1997). La manifestación clínica de dicha inhibición incluye temblores, salivación, convulsiones e incluso la muerte del organismo por colapso cardio-respiratorio en vertebrados ectotermos y endotermos (World Health Organization WHO 1986;

Maxwell 1992; Costa 2006; Čolović et al., 2013). En los últimos años distintos estudios han intentado vincular respuestas conductuales a la inhibición de la AChE en diversos grupos tales como aves (White et al., 1983; Hart 1993), peces (Sandahl et al., 2009; Sismeiro-Vivas et al., 2007; Ren et al., 2016) y lombrices (Capowiez et al., 2010; Pereira et al., 2010; Jordaan et al., 2012; Martínez Morcillo et al., 2013; Jouni et al., 2018).

Diversas investigaciones han documentado que las esterasas carboxilesterasa (CbE, EC 3.1.1.1) y butirilcolinesterasa (BChE, EC 3.1.1.8) poseen una mayor afinidad por los pesticidas OFs que la AChE (Wogram et al., 2001; Fourcy et al., 2002; Wheelock et al., 2008; Sánchez-Hernández y Wheelock 2009; Narváez et al., 2016). Gracias a esta interacción química se le ha atribuido un rol de “buffer” a las enzimas CbE y BChE (Russel y Overstreet, 1987; Sanchez et al., 1997). Debido a esta mayor afinidad por los pesticidas OFs, estas enzimas actúan como ligandos moleculares o *bioscavengers*, capaces de fijar irreversiblemente las moléculas de OF circulantes, reduciendo así la probabilidad de interacción del plaguicida con la diana molecular (e.g., AChE cerebral y muscular). Dicha particularidad hace que estas esterasas sean consideradas biomarcadores de susceptibilidad; su afinidad por los pesticidas OFs y sus niveles de actividad contribuyen a las diferencias interespecíficas que los organismos manifiestan ante este tipo de plaguicidas (Masson y Lockridge, 2010; Wheelock et al., 2008).

*Paralelamente, se ha descrito la presencia de esterasas detoxificadoras de pesticidas en el tracto digestivo de Lumbricus terrestris (Sanchez-Hernandez et al., 2009) así como en las heces frescas de esta misma especie (Sanchez-Hernandez et al., 2018). Considerando estos y otros estudios, se ha propuesto que el tracto digestivo de diversas especies de lombrices es capaz de detoxificar pesticidas OFs a través de la existencia de CbEs y BChEs luminales, las cuales actúan como una barrera en contra de la absorción de pesticidas (bioscavengers), además de*

*formar un mecanismo potencial para la disipación de pesticidas en el suelo (Sanchez-Hernandez et al., 2014a y 2018; Jouni et al., 2018).*

#### *1.4 Lombrices; ingenieros ecosistémicos y su impacto en el suelo.*

Las amenazas de los pesticidas en la biota del suelo han llevado a desarrollar métodos biológicos para facilitar y acelerar su degradación. Durante los últimos años se han utilizado las lombrices (e.g. *Eisenia fetida*, familia Lumbricidae, Savigny 1826; *Lumbricus terrestris*, familia Lumbricidae, Linnaeus 1758) para la restauración y biorremediación de suelos debido a su rol en la estimulación de la microbiota edáfica, además de generar un impacto significativo en la estructura del suelo (Butt 2008; Boyer y Wratten, 2010; Rodriguez-Campos et al., 2014). Las lombrices tienen una función importante en el proceso de formación del suelo y en la promoción de su fertilidad, ya que modifican las propiedades fisicoquímicas y biológicas del suelo incorporando la materia orgánica y moviendo una gran cantidad de suelo a través de su continua excavación, alimentación y depósito de heces (Blouin et al., 2013). Estos procesos mejoran la estructura del suelo mediante el aumento de la macroporosidad, que afecta la aireación, la dinámica del agua, la descomposición de la materia orgánica (Wen et al., 2006; Ruiz et al., 2011), estimulan y dispersan los microorganismos del suelo, facilita la liberación de nutrientes (Barley y Jennings, 1959) y causa una mejora en el crecimiento de las plantas (Edwards y Lofty, 1980). Debido a que las lombrices están en constante contacto con las partículas del suelo y con los microorganismos presentes en él a través de la piel y el tracto digestivo (Jager et al., 2003; Drake y Horn, 2007), ellas resultan significativamente afectadas por los contaminantes que alcanzan el suelo y, por lo tanto, resultan un organismo excelente para el monitoreo del impacto de la contaminación de suelos.

En toxicología ambiental, un nutrido número de especies han sido utilizadas para evaluar el impacto de contaminantes orgánicos y metales en los organismos del suelo. Clásicamente, las

lombrices se han clasificado en tres grandes grupos ecológicos: epígeas, endógeas y anécicas. Las lombrices epígeas habitan sobre el suelo mineral, no forman madrigueras y se alimentan preferentemente de material vegetal en descomposición. De hecho, estas lombrices se encuentran en pilas de compost, estiércol de ganado, o en la hojarasca. Las especies endógeas viven en los primeros 15-20 cm de la capa superficial del suelo. Se las considera geófagas, es decir, ingieren grandes cantidades de suelo mineral del que obtienen los nutrientes. Las especies de este grupo ecológico construyen galerías horizontales semipermanentes, las que pueden obstruir con sus propias excretas (*casts*). Finalmente, las especies anécicas construyen madrigueras verticales permanentes y de gran longitud (hasta 3 metros) en el suelo mineral, y salen a la superficie para alimentarse de material vegetal en descomposición y de otros residuos orgánicos que llegan a arrastrar e introducir en sus madrigueras (Bouché 1977).

### *1.5 ¿Es energéticamente costoso detoxificar contaminantes ambientales?*

Debido a las características anteriormente descritas, en los últimos años, las lombrices han sido propuestas como organismos biorremediadores (proceso llamado vermirremediación, Sinha et al., 2008). Con respecto al proceso de detoxificación, este es bastante costoso desde el punto de vista metabólico, ya que el estrés oxidativo asociado a los procesos de detoxificación de tóxicos como metales pesados o pesticidas pueden inducir cambios compensatorios en el metabolismo energético de los organismos debido al aumento de los gastos energéticos asociados con el despliegue de procesos de detoxificación (Narváez et al., 2016).

Algunos estudios han documentado el efecto de la temperatura sobre la dinámica de la tasa metabólica en lombrices (Precht et al., 1973; Fitzpatrick et al., 1987; Al-Habbib e Ismael, 1989; Khan et al., 2007). En general se observa que el metabolismo energético (estimado mediante la determinación del consumo de O<sub>2</sub> o la producción de CO<sub>2</sub>) aumenta con el incremento de la temperatura. Aun menos estudios han documentado los costos metabólicos asociados a la

detoxificación en anélidos y se ha observado que el glicógeno disminuye por la regulación interna de metales como Al o Ni en *Dendrobaena octaedra* (Holmstrup et al., 2011). De forma similar, lípidos, carbohidratos, crecimiento y fecundidad disminuyeron significativamente en *Nereis diversicolor*, un poliqueto que muestra cierta tolerancia a los metales (Pook et al., 2009). En la lombriz endógena *Allolobophora chlorotica* se observó una disminución de las energías de reserva asociada al estrés por pesticidas (Givaudan et al., 2014). ***Debido a que el presupuesto energético (i.e., la energía disponible para los procesos de mantención, reproducción y/o crecimiento) en animales es limitado y dinámico (Weiner 1992), el uso de recursos energéticos hacia procesos biológicos como el mantenimiento del metabolismo, la reproducción o el crecimiento puede verse alterado como consecuencia de la asignación de reservas energéticas preferencialmente hacia los procesos de detoxificación, viéndose comprometidos otros procesos biológicos (Narváez et al., 2016).***

Sumado al costo energético, la detoxificación produce un desbalance en el estado oxidativo del organismo (homeostasis oxidativa de la célula). Muchas enzimas transferasas y oxidorreductasas, así como moléculas endógenas de bajo peso molecular, (e.g., glutatión) son considerados biomarcadores de estrés oxidativo (Saint-Denis et al., 1999) ya que pueden ser medidas y se puede evaluar sus capacidades antioxidantes que les permiten proteger a las células de los efectos adversos causados por las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas durante el metabolismo oxidativo celular y la detoxificación de los xenobióticos. El principal efecto tóxico de las ROS en la célula es la peroxidación lipídica, donde las ROS reaccionan con los ácidos grasos insaturados de la membrana celular para generar un metabolito llamado malondialdehído (MDA) (Papadimitriou y Loubourdis, 2002). El MDA es, por tanto, un indicador o biomarcador de daño oxidativo intracelular indirecto. A pesar de su importancia, se han realizado pocos estudios en estrés oxidativo y defensas antioxidantes en lombrices expuestas a pesticidas. Se ha

documentado que la exposición de lombrices a metales produce una disminución en los niveles de glutatión reducido (GSH, que es capaz de donar un equivalente de reducción a otras moléculas, como los ROS, para neutralizarlos) y un aumento en las actividades de las enzimas glutatión-S-transferasas (GST, EC 2.5.1.18, que cataliza la conjugación de GSH a sustratos xenobióticos para su detoxificación), glutatión peroxidasa (GPx, EC 1.11.1.9, cataliza la conversión de hidroperóxidos lipídicos a alcoholes, hidroperóxidos libre a agua, y GSH a su forma oxidada, GSSG) y glutatión reductasa (GR, EC 1.6.4.2, cataliza la reacción de GSSG a GSH) en *Aporrectodea caliginosa* (Maity et al., 2018). Ha sido establecido que el glutatión y las enzimas antioxidantes dependientes de este tripéptido tienen una función protectora contra la reactividad inducida por los metales (Maity et al., 2008). Para la misma especie, se pudo observar un aumento en la actividad GST luego de una exposición aguda a un pesticida OF (Sanchez-Hernandez et al., 2014b). También se ha observado una disrupción del sistema antioxidante en *Eisenia fetida* expuesta al fungicida azoxistrobina. Dicha exposición produce un aumento en la actividad de superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1, cataliza la dismutación del radical superóxido en oxígeno molecular o peróxido de hidrógeno), en la actividad de GST, en la cantidad de ROS y en la cantidad de MDA, que es un subproducto de la degradación de las membranas causada por los ROS (Han et al., 2014).

### *1.6 El uso de pesticidas en Chile*

Uno de los principales sectores económicos y estratégicos en Chile es la agricultura. Ello ha llevado a que Chile sea un país con un elevado consumo de pesticidas, especialmente en su zona central (SAG, 2012). Uno de los insecticidas más utilizados en Chile (el segundo insecticida más vendido) corresponde al CPF, un plaguicida de amplio espectro (SAG, 2012). El CPF se usa para combatir las plagas de Escama de San José (*Diaspidiotus perniciosus*, *Quadraspidiotus perniciosus*), Escama blanca (*Hemiberlesia rapax*), huevos de Arañita roja (*Tetranychus urticae*), Chanchitos

blancos (*Pseudococcus sp.*), Conchuela grande café (*Parthenolecanium persicae*), entre otras (Dow Agrosciences). Las predicciones climatológicas estiman que las incidencias de estas plagas incrementarán como consecuencia del cambio climático (Deutsch et al., 2018).

La temperatura y humedad son unas de las variables más importantes que afectan la supervivencia, crecimiento, reproducción y abundancia de los ectotermos y por lo tanto de las lombrices, y es muy probable que sean fuertemente afectados por el cambio climático (Eggleton et al., 2009). El uso de los fitosanitarios también se vería afectado, causando una reducción en la concentración de plaguicidas en el ambiente debido a un incremento en la tasa de volatilización y degradación fisicoquímica y biológico. Dicho efecto se vería atenuado al aumentar las tasas de aplicación, dosis y tipos de plaguicidas (Bloomfield et al., 2006; Kattwinkel et al., 2011). ***Frente a este nuevo escenario, de conflicto entre las plagas y los pesticidas y en un contexto de calentamiento global, las especies no-objetivo podrían verse aún más afectadas. Específicamente, las lombrices podrían ver disminuida su capacidad de biorremediación debido a los altos costos de la detoxificación de pesticidas, los cuales se sumarían al consumo de energía extra para sobrevivir en condiciones desfavorables de temperatura y humedad.***

En esta tesis doctoral se buscó estudiar el efecto sinérgico del aumento de la temperatura, la disminución de la humedad y la exposición a una dosis subletal de un pesticida organofosforado sobre el desempeño bioquímico (CbEs, BChE y AChE) y energético de una especie de lombriz endógena ampliamente distribuida en el mundo. Hasta donde conocemos, no existen estudios de los efectos del cambio global sobre la capacidad detoxificadora y sus costos metabólicos. Por tanto, los resultados de esta tesis contribuyen al entendimiento de la relación entre los efectos de estos factores de estrés ambiental con la biogeografía de *L. terrestris* y establecen las herramientas biológicas para estimar la distribución de otras especies endémicas de Chile, donde la economía



depende en gran medida de una agricultura intensiva que requiere el uso permanente de plaguicidas.

## 2 HIPÓTESIS

La detoxificación de pesticidas OFs es un proceso metabólicamente costoso, que incluye el despliegue de procesos a nivel molecular (inducción enzimática, síntesis de macromoléculas) y de síntesis enzimática y protección y que reducen el impacto del pesticida. Además, el aumento de temperatura y la disminución de humedad del ambiente resulta ser un desafío para las lombrices endógeas, de modo que la exposición a un pesticida OF en un contexto de cambio climático (i.e., un aumento de la temperatura y una disminución de la humedad del suelo), provocan diversos efectos sobre los sistemas de detoxificación de xenobióticos y sus metabolitos, cambios metabólicos que pueden afectar el estado oxidativo, costos metabólicos *per se* y finalmente una re-asignación de materia y energía a distintas funciones biológicas.

### *Predicciones*

1. Lombrices expuestas a suelos contaminados con un pesticida OF junto con un estrés térmico (alta temperatura) e hídrico (baja humedad) del suelo presentarán una mayor inhibición de las esterasas detoxificantes (CbE y BChE) y de las esterasas implicadas en el mecanismo de acción tóxica del OF (AChE).
2. Las lombrices expuestas a una concentración subletal de un pesticida OF, y al efecto de la alta temperatura y baja humedad del suelo, presentarán mayores costos metabólicos reflejados en una mayor tasa metabólica estándar.
3. Las lombrices expuestas a suelos contaminados con un plaguicida OF, junto con el efecto de la alta temperatura y la baja humedad del suelo, sufrirán un cambio en la homeostasis oxidativa, reflejado en un aumento de la capacidad antioxidante total (TAC), de la cantidad de peróxidos de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), y un aumento en el daño a las membranas lipídicas (peroxidación lipídica). Por el contrario, tales factores de estrés causarán una transformación

de glutatión reducido (GSH) en glutatión oxidado (GSSG) que se reflejará en una disminución del cociente GSH/GSSG.

4. Los individuos que se vean expuestos a una concentración subletal del pesticida, y al efecto de la alta temperatura y de la baja humedad del suelo, presentarán una menor masa corporal como consecuencia de la reasignación de recursos energéticos hacia la generación de mecanismos de detoxificación de pesticidas.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 *Objetivos generales*

Analizar el efecto del plaguicida CPF, de la temperatura y la humedad del suelo sobre parámetros bioquímicos, fisiológicos y de historia de vida en la lombriz endógena *A. caliginosa*.

#### 3.2 *Objetivos específicos*

1. Explorar la variación de los marcadores bioquímicos (TAC, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peroxidación lipídica, GSH, GSSG, GSH/GSSG, y actividad CbE, BChE y AChE) en lombrices sometidas al efecto del pesticida (0 y 20 mg/kg), de la temperatura (10 y 20°C) y la humedad del suelo (25 y 35%).
2. Cuantificar los cambios en las tasas metabólicas asociadas a la detoxificación de CPF en lombrices bajo el efecto de la temperatura y la humedad del suelo.
3. Examinar la variación de la masa corporal en lombrices expuestas al efecto del pesticida, de la temperatura y la humedad del suelo.

## 4 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Reactivos

Los reactivos fueron obtenidos de Merck Chile, Fermelo y Los Alquimistas. Los sustratos para los ensayos de esterasas, ej.,  $\alpha$ -naftil acetato ( $\alpha$ -NA),  $\alpha$ -naftil butirato ( $\alpha$ -NB), 4-nitrofenil acetato (4-NPA) fueron preparados en etanol a una concentración inicial de 20 mM (solución madre) y mantenidos a 4°C. El pesticida organofosforado Clorpirifós 48EC (48% w/v, ingrediente activo) fue comprado en CALS Company (Santiago, Chile).

### 4.2. Lombrices y suelo

Individuos adultos y con clitelo desarrollado de *Aporrectodea caliginosa* (Savigny, 1826) fueron recolectados en la Rinconada de Maipú (Maipú, Santiago; 33°29'52.5"S 70°49'34.1"W), utilizando cuidadosamente una horqueta para retirar a los individuos del suelo sin dañarlos. En el mismo lugar, se recolectó suelo utilizando una pala para su posterior procesamiento y uso en los distintos tratamientos. Los individuos recolectados mediante este método (n = 160) fueron depositados en una caja plástica y llevados al Laboratorio de Ecofisiología Animal en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, donde se mantuvieron a 15°C y en oscuridad (periodo de aclimatación de 4 semanas) hasta iniciar los bioensayos. El suelo recolectado, que corresponde a uno de tipo Mollisol (Casanova et al., 2013), fue tamizado a un tamaño de partículas inferior a 2 mm y subsecuentemente secado al aire durante cuatro semanas. Las propiedades fisicoquímicas del suelo fueron pH = 7,54  $\pm$  0,3, conductividad eléctrica = 213,8  $\pm$  18,4  $\mu$ S cm<sup>-1</sup>, capacidad de retención de agua máxima (WHC) = 0,54  $\pm$  0,01 g H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> suelo seco.

### 4.3 Diseño experimental

Con el fin de analizar la hipótesis propuesta, se realizó un experimento factorial durante 90 días, donde los individuos fueron sometidos a dos temperaturas, dos humedades y dos concentraciones del pesticida anteriormente descrito, obteniendo ocho tratamientos de simulación de cambio global (Tabla 1). Los tratamientos fueron llevados a cabo en un régimen de oscuridad permanente (Lowe y Butt, 2005).

Tabla 1. Tratamientos experimentales con cuatro réplicas cada uno

Tratamiento	Abreviación	Temperatura	Humedad	[CPF]	N° botellas	N° indiv.
Control	C	10 °C <sup>a</sup>	35 % <sup>b</sup>	0 mg/kg	4	5
Contaminación	P <sup>c</sup>	10 °C	35 %	20 mg/kg <sup>d</sup>	4	5
Sequía	D <sup>c</sup>	10 °C	25 %	0 mg/kg	4	5
Cambio global 1	CG1	10 °C	25 %	20 mg/kg	4	5
Calentamiento global	GW <sup>c</sup>	20 °C	35 %	0 mg/kg	4	5
Cambio global 2	CG2	20 °C	35 %	20 mg/kg	4	5
Cambio climático	CC	20 °C	25 %	0 mg/kg	4	5
Cambio global 3	CG3	20 °C	25 %	20 mg/kg	4	5

<sup>a</sup> Temperatura sugerida por Butt 1992.

<sup>b</sup> Humedad sugerida por Lowe y Butt, 1999.

<sup>c</sup> Abreviación de la palabra en inglés (Pollution, Drought, Global Warming)

<sup>d</sup> Basada en el rango de concentraciones detectada en suelos agrícolas (Racke, 1993).

Muestras de suelo (200 g suelo seco y tamizado) fueron puestas en botellas de plástico (volumen 300 mL), para obtener 4 réplicas por tratamiento. A cada botella con suelo, se le agregó la cantidad apropiada de CPF (considerando la concentración del ingrediente activo) para lograr una concentración nominal de 20 mg kg<sup>-1</sup> (8,3 µL CPF 48%/200 g suelo). Esta cantidad de CPF fue agregada en primer lugar a la cantidad de agua necesaria para lograr el 25 ó 35 % de humedad del suelo (50 y 70 mL H<sub>2</sub>O, correspondiente al 46,5 y al 65 % de WHC) y finalmente al suelo seco. Las botellas fueron mantenidas durante 24 h en la cámara climática (10 o 20 °C) para lograr el equilibrio. Un total de 160 lombrices fueron pesadas (0,65 ± 0,13 g, promedio ± DE), seleccionadas al azar y liberadas en grupos de cinco individuos en cada botella, para así lograr 20 individuos por cada grupo experimental. La masa corporal continuó siendo registrada cada dos

semanas, cuando fueron extraídas de las botellas, y puestas individualmente en una placa Petri durante 24 h con el objetivo de tomar muestras de heces para su posterior análisis enzimático. Durante este proceso, y cada dos semanas, el suelo de cada botella fue renovado (basado en la cinética de degradación de CPF según el estudio de Sánchez Hernández et al., 2018) con suelos tratados con pesticida y previamente mantenidos a 10 ó 20 °C durante 24 h para equilibrar. Las lombrices de todos los tratamientos fueron alimentadas con ~2 g de hojarasca (hojas caídas de *Morus alba*) por botella cada semana (Sánchez Hernández et al., 2014b). Semana por medio se tomó una muestra de 10 g de suelo de cada botella para analizar posteriormente la actividad hidrolítica de esterasas. Al final del tiempo de tratamiento, se tomó la mitad de los individuos de cada tratamiento (n = 10) y fueron congeladas inmediatamente a -80 °C para subsecuentes análisis bioquímicos, mientras que a la otra mitad del grupo experimental se le realizó medición de la tasa metabólica estándar (SMR).

#### *4.4 Propiedades fisicoquímicas del suelo y residuos de clorpirifós*

La concentración del CPF fue determinada en las muestras de tierra al inicio del experimento para comparar la concentración nominal (20 mg/kg) con la concentración observada (concentración de CPF medida en los suelos). La extracción de las muestras se realizó siguiendo el método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) descrito en el método oficial AOAC 2007 (Lehotay 2007), con algunas modificaciones para muestras de suelo (Asensio-Ramos et al., 2010). Las muestras (2.5 gr peso húmedo) fueron agitadas vigorosamente durante 1 minuto con 5 mL de acetonitrilo (grado HPLC) con ácido acético 1%, Na-acetato y sulfato de magnesio; seguido de sonicación (5 minutos, 50 W) y centrifugación (4.500×g durante 5 minutos). Los sobrenadantes (1 mL) fueron limpiados por extracción dispersiva de la fase sólida con 50 mg de amina primaria-secundaria (40 m, tamaño partícula), y luego centrifugada a 10.000×g durante 5 minutos. Los sobrenadantes fueron filtrados (0.45 µm), y las alícuotas (20 µL) fueron inyectadas

en un cromatógrafo líquido Agilent Series 1200 equipado con un autoinyector, bomba cuaternaria, cámara termostataada para columna, detector de series de diodos y detector de fluorescencia.

El CPF fue separado usando una columna Agilent Eclipse Plus LC-18 (0.46×150 mm, 5 µm tamaño partícula) a una tasa de flujo de 0.8 mL\*min<sup>-1</sup> con el siguiente programa de disolventes: acetonitrilo 70% (disolvente A), H<sub>2</sub>O 30% (disolvente B) a t = 0 min, luego se incrementó A a 100% en 8 min y se mantuvo por 2 min, seguido de una disminución a 70% A en 1 min, y manteniendo por 4 min para equilibrio de la columna. El detector de series de diodos fue ajustado a 290 nm (ancho de banda = 8, longitud de onda de referencia = 360 nm), y la cuantificación y el espectro (200 a 600 nm) fueron realizados usando estándar de CPF preparados en acetonitrilo (grado HPLC). La tasa de recuperación de CPF desde suelos contaminados fue de un 98%. Se usó etil paraoxón [O,O-dietil O-(4-nitrofenil) fosfato] como estándar interno.

#### *4.5. Tasa metabólica estándar*

La tasa metabólica estándar se determinó de manera indirecta midiendo la producción de CO<sub>2</sub> (V<sub>CO2</sub>) utilizando un sistema de respirometría de flujo cerrado. Las mediciones fueron realizadas antes y después de los 90 días de duración de los tratamientos experimentales. Brevemente, las lombrices fueron pesadas y depositadas en una jeringa (20 mL) sellada herméticamente dentro de un incubador (Peltier IPP110, Memmert, Schwabach, Alemania) con temperatura controlada (10° ó 20° ± 0,5 °C) y en oscuridad durante dos horas. Los individuos fueron depositados dentro de la jeringa junto a una tela absorbente con la cantidad de agua destilada necesaria para tener una atmósfera con al menos un 15% de humedad relativa con el objetivo de evitar la desecación de la piel. Luego de dos horas, la mitad del aire de la jeringa fue inyectado en el sistema de respirometría, donde pasó por un analizador de vapor de agua (RH 300 Water Vapor Analyzer, Sable Systems) y una columna de Driedrita antes de pasar por un analizador de O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> modelo Fox Box (Sable System, Henderson, Nevada) calibrado con una mezcla conocida de oxígeno



(20%) y nitrógeno (80%) certificada por cromatografía (INDURA, Chile). La información de salida del analizador de CO<sub>2</sub> (%) y del flujómetro fueron digitalizadas usando una interfaz universal (UI-2 Data Acquisition Interface, Sable Systems) y registradas en un computador personal con el software de adquisición de datos EXPEDATA (Sable Systems).

#### *4.6. Homogenización de tejidos*

Los individuos congelados fueron rebanados en trozos de 1 cm de longitud y homogenizados (1:10, w/v) individualmente utilizando un homogenizador Ultra Turrax T25 (Janke and Kunkel, Breisgau, Alemania) a 14000 rpm, 4 veces durante 10 s con 1 min de intervalo, en buffer helado Tris-HCl 20 mM pH = 7.6, 1 mM EDTA. Los homogenizados fueron centrifugados (9000 g, 20 min, 4 °C) para obtener el sobrenadante, que fue congelado a -80 °C para su posterior análisis bioquímico.

#### *4.7. Biomarcadores de lombrices*

La actividad esterásica y el estado oxidativo fueron determinados espectrofotométricamente utilizando un lector de microplacas Thermo Scientific Multiskan GO a 25 °C. La actividad de CbE fue determinada usando los sustratos  $\alpha$ -NA,  $\alpha$ -NB y 4-NPA. La concentración de proteínas total fue cuantificada siguiendo el método de Bradford (1976) usando albúmina de suero bovino como estándar. La actividad de CbE usando  $\alpha$ -NA y  $\alpha$ -NB se determinó según el método descrito por Thompson (1999). El medio de reacción (250  $\mu$ L, volumen final) contuvo Tris-HCl 0.1 M (pH 7.4) y  $\alpha$ -NA o  $\alpha$ -NB 20 mM, y fue incubado durante 10 min a 25 °C con la muestra. La reacción fue detenida añadiendo el cromóforo Fast Red ITR 0.1 % disuelto en una mezcla de SDS 5%/Triton X-100 5%. Las muestras fueron mantenidas durante 30 min a 25 °C en oscuridad. La absorbancia del complejo Naftol-Fast Red ITR fue leído a 530 nm y la actividad específica calculada utilizando un coeficiente de extinción molar de  $14 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . La actividad de CbE

utilizando 4-NPA fue determinada siguiendo el método de Thompson (1999). El medio de reacción (250  $\mu\text{L}$ , volumen final) estaba compuesto de Tris-HCl 0.1 M (pH 7.4) con la muestra. La reacción se inició con 10  $\mu\text{L}$  de 4-NPA 20 mM. La reacción se detuvo con 50  $\mu\text{L}$  de SDS 2% en Tris 2%. La formación de para-nitrofenol fue monitoreada a 405 nm y cuantificada usando un coeficiente de extinción molar de  $0.008 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Las actividades BChE y AChE fueron determinadas de acuerdo con el método de Wheelock y colaboradores (2005), adaptado de Ellman y colaboradores (1961). El medio de reacción (200  $\mu\text{L}$ , volumen final) estaba compuesto de buffer fosfato 0.1 M (pH 8.0) con 320  $\mu\text{M}$  (concentración final) ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) 10 mM y 10  $\mu\text{L}$  de la muestra. La reacción fue iniciada con BTCi (BChE) o ATCI (AChE) 60 mM y la formación del producto fue monitoreada durante 8 min a 412 nm. La actividad específica fue calculada usando el coeficiente de absorción molar de  $8.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

La capacidad antioxidante total fue medida según el método reductor de Apak y colaboradores (2004). El kit de ensayo producido por Cell Biolabs OxiSelect™, (San Diego, CA; # STA-360) se basa en la producción de un reactivo cromogénico. El medio de reacción (250  $\mu\text{L}$ , volumen final) contenía 180  $\mu\text{L}$  del búfer de reacción y 20  $\mu\text{L}$  de la muestra. Se leyó la absorbancia inicial a 490 nm y luego se inició la reacción con el ion cobre dejando incubar durante 5 min. La reacción fue monitoreada nuevamente a 490 nm. La capacidad antioxidante de las muestras fue calculada usando una curva de estándar elaborada con ácido úrico. La peroxidación lipídica fue medida mediante la cuantificación de las especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) siguiendo el procedimiento de Ohkawa y colaboradores (1979). De forma breve, las muestras fueron incubadas durante 5 minutos con 100  $\mu\text{L}$  de SDS 10%, luego se le añadió 250  $\mu\text{L}$  de ácido tiobarbitúrico (TBA), se sellaron los tubos y fueron incubados durante 45 min a 95°C. Se procedió a enfriarlos con hielo y centrifugarlos a 3000 rpm durante 5 min. Finalmente, se tomaron 200  $\mu\text{L}$  (volumen final) y se registró la absorbancia a 532 nm. La concentración de MDA en las muestras

fue calculada con una curva estándar de MDA. La concentración de peróxidos acuosos fue medida siguiendo el protocolo de Jiang y colaboradores (1990). El medio de reacción contenía 20  $\mu\text{L}$  de la muestra y 200  $\mu\text{L}$  del reactivo working color (sorbitol 100 mM + xylenol 125  $\mu\text{M}$  + sulfato amonio ferroso 25 mM) y se dejó incubar durante 25 min a 25°C. La absorbancia fue leída a 560 nm. La concentración de peróxidos acuosos fue calculada usando una curva estándar de peróxido de hidrógeno. La concentración total de glutatión (GSH+GSSG) y de GSSG fue determinada siguiendo el método de Rahman et al (2007) con algunas modificaciones. Brevemente, la muestra fue incubada con ácido tricloroacético (TCA, 5 %) en hielo durante 5 minutos para eliminar las proteínas, luego fue centrifugada durante 5 minutos a 10000 rpm a 4°C. Se tomaron 100  $\mu\text{L}$  del sobrenadante y se le añadió 120  $\mu\text{L}$  de una mezcla 1:1 de glutatión reductasa (GR, EC 1.8.1.7) y DTNB en búfer potasio-fosfato EDTA (KPE). Luego de 30 segundos de agitación, se le añadió 60  $\mu\text{L}$  de NADPH y la formación del producto fue monitoreada durante 1 minuto a 412 nm. Para la cuantificación de GSSG, se añadió 2  $\mu\text{L}$  de 2-vinilpiridina (1/10 en KPE) al sobrenadante y se dejó incubar durante al menos una hora a temperatura ambiente. Luego se le añadió 6  $\mu\text{L}$  de trietanolamina (1:6 en KPE) y se dejó incubar durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se siguió el mismo protocolo anteriormente descrito. La concentración de GSH y GSSG fueron calculadas usando una curva estándar.

#### *4.8. Actividad enzimática en suelos y heces*

Las suspensiones de suelos y heces fueron preparadas según Sanchez-Hernandez et al. (2018), con algunas modificaciones. En breve, una cantidad de suelo o de heces fueron dispersadas en agua destilada (1:25, w/v) y agitadas vigorosamente durante 5 minutos a temperatura ambiente (~22 °C). Luego se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión y se le añadió tampón Tris-HCl 0.1 M y  $\alpha$ -NA 20 mM y la mezcla fue incubada durante 30 minutos, con agitación cada 10 minutos. La reacción se detuvo con SDS 2,5 % y luego fue centrifugada durante 3 minutos. Se tomaron 200  $\mu\text{L}$  del

sobrenadante y se le añadió el cromóforo Fast Red ITR 2,5 % en Tritón X-100 2,5 %, la mezcla fue incubada durante 20 minutos y luego su absorbancia fue leída a 530 nm.

#### 4.9. Análisis de datos

Para comprobar los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas de los datos, se utilizaron las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene de forma previa a los análisis que se describen a continuación. En el caso de las variables que no presentaron una distribución normal, los datos fueron transformados logarítmicamente para realizar los análisis. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas (ANOVA MR) para detectar diferencias en la masa corporal de los tratamientos a lo largo del experimento. Se realizaron ANOVA de tres vías para analizar el efecto de los tres factores sobre el SMR y los distintos marcadores bioquímicos, y cuando se observó un efecto significativo, se realizó una prueba *a posteriori* de Tukey. Utilizando el SMR y los marcadores bioquímicos, se llevó a cabo un mapa de calor de correlaciones para observar cómo se asocian las distintas variables entre ellas. Finalmente se realizó un análisis factorial exploratorio con el objetivo de reducir el número de variables (SMR a 10 y 20 °C, marcadores esterásicos y de estrés oxidativo) a un número menor de dimensiones. Se utilizaron los programas estadísticos STATISTICA® (Kolmogorov-Smirnov, Levene, ANOVA, ANOVA MR, ANOVA 3 vías), GraphPad Prism®, JAMOVI® (matrices de correlación, mapas de calor y *scree plot*) y JASP® (cargas factoriales y diagrama de vías) para Windows®.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Concentración de clorpirifós y masa corporal

La Tabla 2 resume las concentraciones (promedio  $\pm$  DE) del clorpirifós en los suelos utilizados en los tratamientos con el pesticida. Para los cuatro tratamientos analizados se observó que las concentraciones correspondieron al 75% aproximadamente de la concentración nominal (20 mg/kg). La razón de esta discrepancia pudo deberse a distintas razones como, por ejemplo, la degradación del CPF en CPF-oxon (metabolito altamente tóxico del CPF) durante la conservación de los suelos, o un procedimiento de contaminación del suelo no suficientemente homogéneo. Al comienzo del experimento se registró la muerte de algunos individuos en los tratamientos más severos (CC y CG3) debido a la baja humedad inicial (10%), por lo que se decidió elevar este valor a un 25% tomando de referencia datos de la literatura científica (Lowe y Butt, 2005). Al inicio de los tratamientos (semana 0) la masa corporal de las lombrices ( $n = 160$ ) tuvo un valor promedio de  $0,65 \pm 0,1$  g. Durante el desarrollo de los tratamientos, se observó una disminución significativa de la masa en los grupos sometidos a escenarios más “severos” (ANOVA MR:  $F_{(42,816)} = 5,66$ ;  $p < 0,05$ ; Figura 2), registrando una disminución de un 39,1 % en el grupo CG3 (temperatura 20 °C; 25 % humedad y 20 mg/kg de CPF), y un aumento de un 26,2 % en el grupo control y de un 32,7% en el grupo GW (temperatura 20 °C; 35 % humedad y 0 mg/kg de CPF).

Tabla 2: Concentraciones de clorpirifós medidas por HPLC en los suelos de los tratamientos comparadas con la concentración nominal (promedio  $\pm$  DE,  $n = 4$ ).

Concentración nominal	Concentración medida ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) <sup>a</sup>			
	Contaminación	Cambio global 1	Cambio global 2	Cambio global 3
20 $\text{mg kg}^{-1}$	$14,7 \pm 1,04$	$17,6 \pm 2,27$	$16,3 \pm 1,19$	$15,2 \pm 4,37$

<sup>a</sup> Las diferencias estadísticas entre los tratamientos fue analizada con la prueba no-paramétrica de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ), y no se encontraron diferencias significativas.

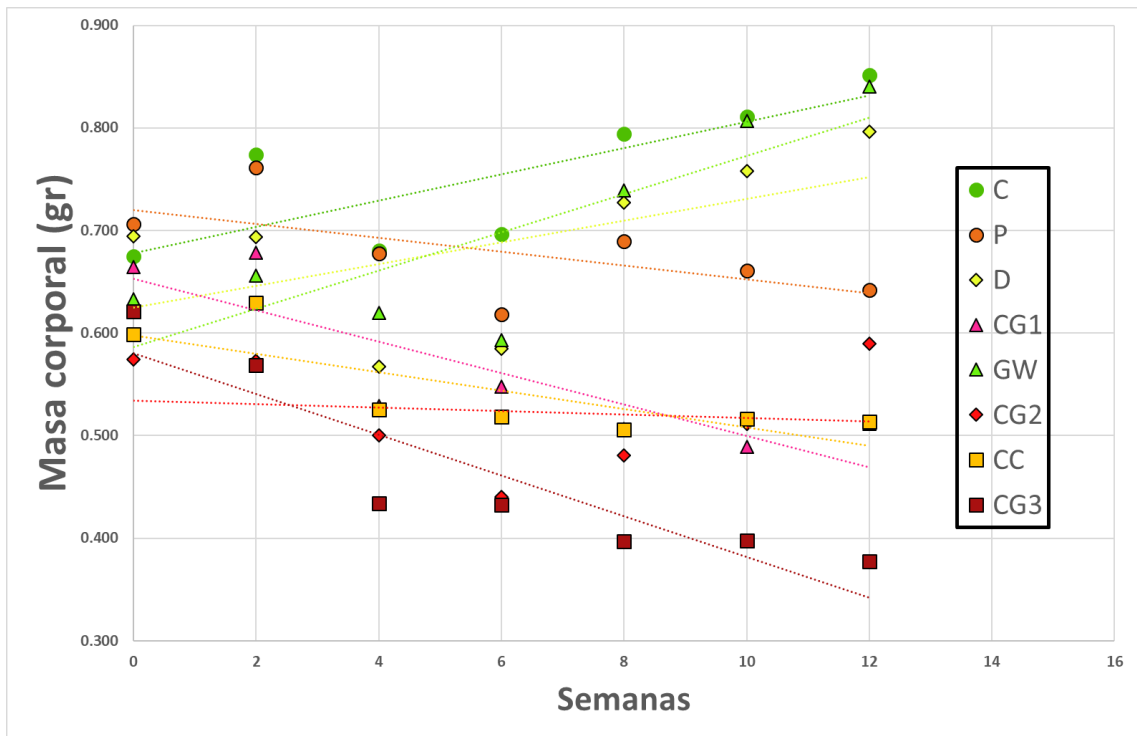


Figura 2: Promedio de masa corporal de los individuos de *A. caliginosa* expuestos durante 12 semanas a los ocho tratamientos (C: control, P: contaminación, D: sequía, CG1: cambio global 1, GW: calentamiento global, CG2: cambio global 2, CC: cambio climático, CG3: cambio global 3) que simulan distintos escenarios de cambio global.

### 5.2 Tasa metabólica estándar

El  $V_{CO_2}$  fue significativamente mayor en las lombrices medidas a 20 °C (650,27 mL CO<sub>2</sub> gr<sup>-1</sup> hr<sup>-1</sup>) de forma previa al inicio de los tratamientos (Prueba T pareada:  $t_{(27)} = 9,869$ ;  $p < 0,0001$ ; Figura 3), registrando un 54% de aumento con respecto a las mediciones realizadas a 10 °C (422,31 mL CO<sub>2</sub> gr<sup>-1</sup> hr<sup>-1</sup>).

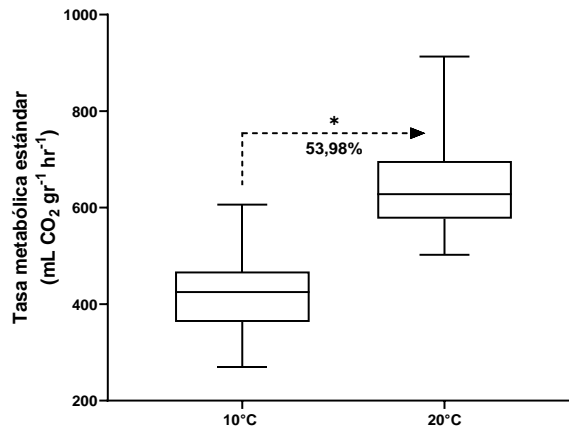


Figura 3: Promedio de producción de CO<sub>2</sub> previo al inicio de los tratamientos, medida a 10 y a 20 °C. Asterisco denota diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en una prueba de T.

Al finalizar los tratamientos experimentales (día 90), la producción de CO<sub>2</sub> fue afectada significativamente por la humedad (ANOVA MR:  $F_{(2,113)} = 14,32$ ;  $p < 0,0001$ ), la concentración de pesticida ( $F_{(1,123)} = 27,87$ ;  $p < 0,0001$ ), por la interacción humedad\*temperatura ( $F_{(3,123)} = 3,824$ ;  $p = 0,0117$ ) y por la interacción temperatura\*humedad\*pesticida ( $F_{(3,123)} = 3,217$ ;  $p < 0,05$ ). En el caso de las lombrices medidas a 10 °C, se observó un aumento de un 86 % de la producción de CO<sub>2</sub> en el tratamiento de “cambio global 3” con respecto al control (Figura 4a), mientras que en las lombrices medidas a 20 °C, se observa una tendencia hacia un aumento en la producción de CO<sub>2</sub> en los tratamientos más desafiantes, pero estas diferencias no fueron significativas (Figura 4b).

Tabla 3: ANOVA de 3 vías (humedad, temperatura y pesticida) para la tasa metabólica estándar medida a dos temperaturas de lombrices sometidas a los tratamientos. Asteriscos denotan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

t° de medición	Efecto	% de variación	F	gl	p
10°C	Humedad	25,2	31,47	1,61	<0,0001*
	Temperatura	2,656	3,318	1,61	0,0734
	Pesticida	20,58	25,7	1,61	<0,0001*
	Humedad*Temperatura	10,5	13,12	1,61	0,0006*
	Humedad*Pesticida	0,05891	0,07357	1,61	0,7871
	Temperatura*Pesticida	5,407	06,753	1,61	0,0117*
	Humedad*Temperatura*Pesticida	4,477	5,592	1,61	0,0212*
20°C	Humedad	10,09	8,243	1,62	0,0056*
	Temperatura	0,5766	0,4711	1,62	0,495
	Pesticida	8,045	6,574	1,62	0,0128*
	Humedad*Temperatura	0,01163	0,0095	1,62	0,9226
	Humedad*Pesticida	0,5419	0,4428	1,62	0,5083
	Temperatura*Pesticida	0,04653	0,03802	1,62	0,846
	Humedad*Temperatura*Pesticida	3,667	2,996	1,62	0,0885

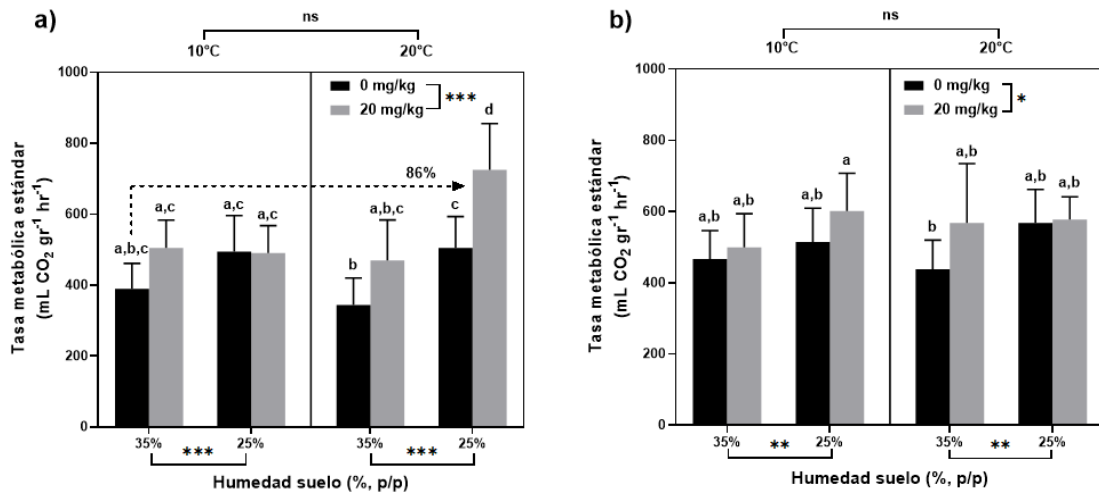


Figura 4: Promedio de producción de CO<sub>2</sub> posterior a los tratamientos, medida a 10 (panel a) y a 20 °C (panel b). Asteriscos denotan diferencias significativas; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ . Distintas letras denotan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) después de una prueba a posteriori de Tukey.

Se calculó el  $Q_{10}$  para el SMR previo y posterior a los tratamientos y se pudo observar una disminución del coeficiente luego de que los individuos de *A. caliginosa* fueran sometidos durante 12 semanas a los distintos tratamientos (Tabla 4).



Tabla 4: Efecto de la temperatura sobre el  $Q_{10}$  de la tasa metabólica estándar de los individuos de *A. caliginosa*.

Temperatura de medición	SMR pre-tratamientos	SMR post-tratamientos
10°C	422,31	465,39
20°C	650,27	547,09
$Q_{10}$	1,54	1,18

### 5.3 Marcadores bioquímicos

#### 5.3.1 Esterasas en lombrices

Al realizar el ANOVA de tres vías, se observa una inhibición de la actividad esterásica en los tratamientos más severos en todos los marcadores analizados (Figuras 4 y 5). En los cinco marcadores, se observó un efecto significativo del pesticida sobre la actividad esterásica y que explica una gran parte de su variación (49,15 – 78,4 %). Para el caso de  $\alpha$ -NA se encontró un efecto de la interacción de los tres factores sobre la actividad esterásica (Tabla 5), pero dicho efecto no está presente en el  $\alpha$ -NB. Dicho efecto sí puede verse en la CbE-4-NPA y en BChE. Finalmente, en la AChE se observa un gran efecto del pesticida sobre su actividad.

Tabla 5: ANOVA de tres vías (humedad, temperatura y pesticida) para la actividad esterásica de lombrices sometidas a los tratamientos. Asteriscos denotan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Esterasa	Efecto	% de variación	F	gl	p
CbE- $\alpha$ NA	Humedad	2,451	6,805	1,62	<b>0,0114*</b>
	Temperatura	13,86	38,49	1,62	<b>&lt; 0,0001*</b>
	Pesticida	50,45	140,1	1,62	<b>&lt; 0,0001*</b>
	Humedad*Temperatura	4,569	12,69	1,62	<b>0,0007*</b>
	Humedad*Pesticida	0,3044	0,8452	1,62	0,3615
	Temperatura*Pesticida	2,071	5,75	1,62	<b>0,0195*</b>
	Humedad*Temperatura*Pesticida	2,902	8,059	1,62	<b>0,0061*</b>
CbE- $\alpha$ NB	Humedad	0,3072	0,9918	1,60	0,3233
	Temperatura	0,8174	2,639	1,60	0,1095
	Pesticida	68,57	221,3	1,60	<b>&lt; 0,0001*</b>
	Humedad*Temperatura	0,6886	2,223	1,60	0,1412
	Humedad*Pesticida	2,327	7,512	1,60	<b>0,0081*</b>
	Temperatura*Pesticida	2,080	6,714	1,60	<b>0,012*</b>
	Humedad*Temperatura*Pesticida	0,06197	0,2	1,60	0,6563
CbE-4-NPA	Humedad	5,93	14,12	1,63	<b>0,0004*</b>
	Temperatura	8,501	20,24	1,63	<b>&lt; 0,0001*</b>
	Pesticida	49,15	117	1,63	<b>&lt; 0,0001*</b>
	Humedad*Temperatura	4,784	11,39	1,63	<b>0,0013*</b>

	Humedad*Pesticida	1,51	3,594	1,63	0,0626
	Temperatura*Pesticida	0,4636	1,104	1,63	0,2974
	Humedad*Temperatura*Pesticida	2,208	5,258	1,63	<b>0,0252*</b>
BChE	Humedad	7,954	40,2	1,60	< <b>0,0001*</b>
	Temperatura	0,29	1,465	1,60	0,2308
	Pesticida	69,29	350,2	1,60	< <b>0,0001*</b>
	Humedad*Temperatura	0,235	1,187	1,60	0,2802
	Humedad*Pesticida	3,974	20,08	1,60	< <b>0,0001*</b>
	Temperatura*Pesticida	0,1769	0,8941	1,60	0,3482
	Humedad*Temperatura*Pesticida	0,9028	4,562	1,60	<b>0,0368*</b>
AChE	Humedad	3,132	16,69	1,62	<b>0,0001*</b>
	Temperatura	1,477	7,874	1,62	<b>0,0067*</b>
	Pesticida	78,4	418	1,62	< <b>0,0001*</b>
	Humedad*Temperatura	0,0005251	0,002799	1,62	0,958
	Humedad*Pesticida	1,256	6,698	1,62	<b>0,0120*</b>
	Temperatura*Pesticida	0,4625	2,465	1,62	0,1215
	Humedad*Temperatura*Pesticida	0,1073	0,5719	1,62	0,4524

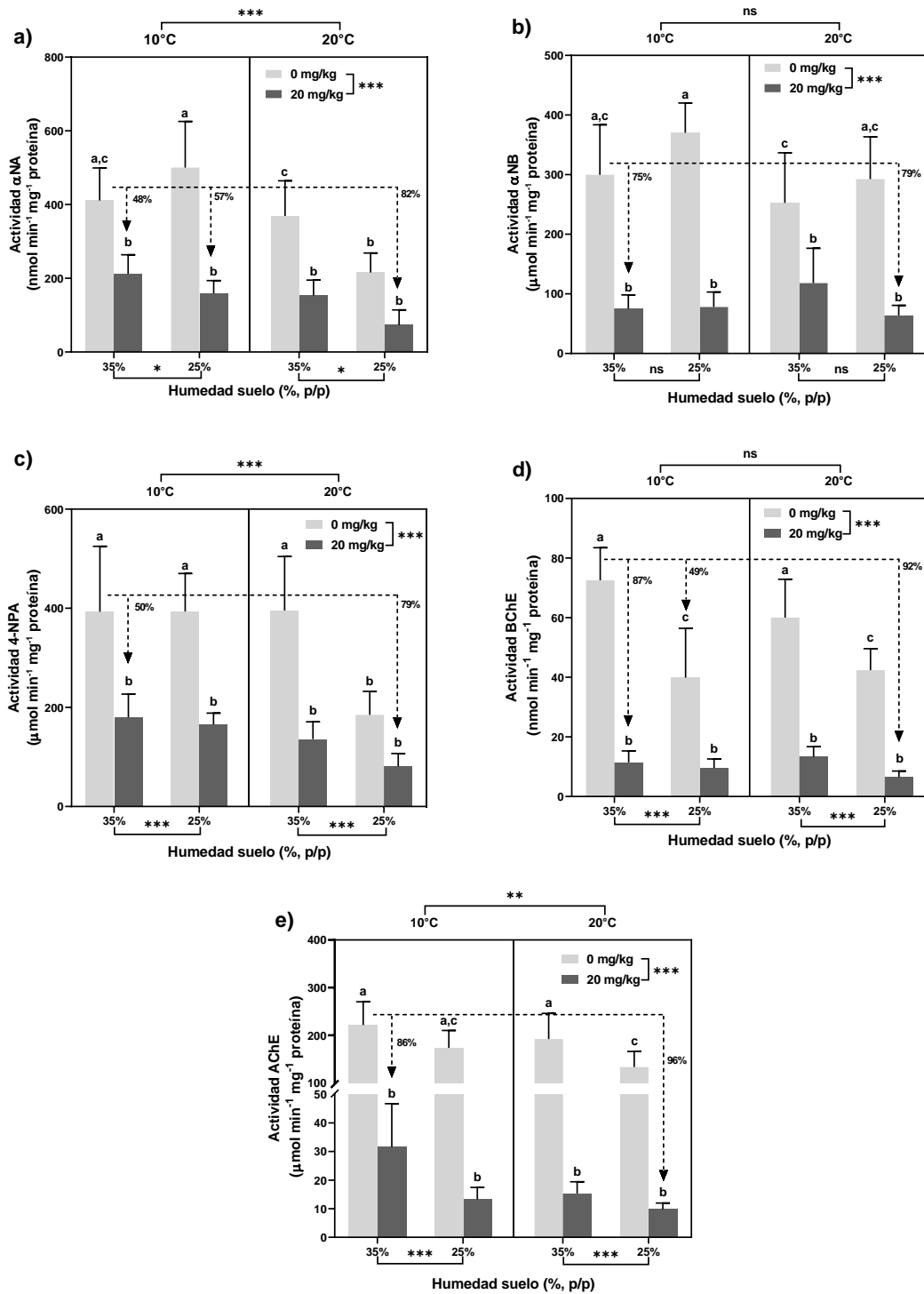


Figura 5: Promedio de actividad específica de a) CbE- $\alpha$ NA, b) CbE- $\alpha$ NB, c) CbE-4-NPA, d) BChE y e) AChE en individuos de *A. caliginosa* sometidos a los distintos tratamientos durante 12 semanas. Asteriscos denotan diferencias significativas para ANOVA 3 vías, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) después de una prueba *a posteriori* de Tukey.

El mapa de calor de correlaciones (Figura 6, Tabla 6) entre el SMR y los marcadores de esterasas dio como resultado una serie de correlaciones negativas entre el metabolismo medido a 10 y a 20°C y todas las esterasas, mientras que SMR 10°C y SMR 20°C se correlacionaron de forma positiva entre ellas. Las esterasas se correlacionaron de forma positiva y significativa entre ellas.

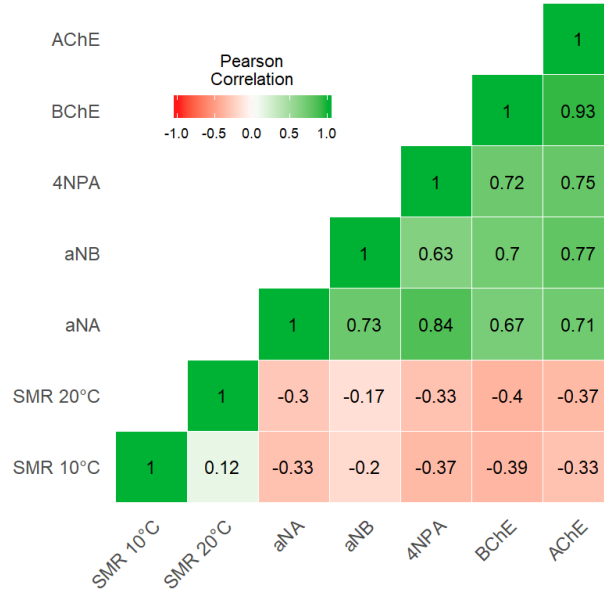


Figura 6: Mapa de calor de matriz de correlaciones de SMR y esterasas en individuos de *A. caliginosa* sometidos a distintos tratamientos durante 12 semanas. Los coeficientes de correlación de los marcadores están coloreados desde rojo (-1) hasta verde (1).

Tabla 6: Matriz de correlación de Pearson de SMR y esterasas en individuos de *A. caliginosa* sometidos a distintos tratamientos durante 12 semanas. Asteriscos denotan diferencias significativas, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

		SMR 10°C	SMR 20°C	aNA	aNB	4-NPA	BChE	AChE
SMR 10°C	r	1	0,128	<b>-0,307**</b>	-0,177	<b>-0,408***</b>	<b>-0,405***</b>	<b>-0,34**</b>
	p		0,283	<b>0,01</b>	0,149	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,004</b>
SMR 20°C	r		1	<b>-0,312**</b>	-0,197	<b>-0,35**</b>	<b>-0,397***</b>	<b>-0,39***</b>
	p			<b>0,009</b>	0,109	<b>0,003</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
aNA	r			1	<b>0,716***</b>	<b>0,844***</b>	<b>0,662***</b>	<b>0,692***</b>
	p				<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
aNB	r				1	<b>0,639***</b>	<b>0,705***</b>	<b>0,79***</b>
	p					<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
4-NPA	r					1	<b>0,729***</b>	<b>0,758***</b>
	p						<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
BChE	r						1	<b>0,929***</b>
	p							<b>&lt;0,001</b>
AChE	r							1
	p							

### 5.3.2 Esterasas en heces

La actividad esterásica de las muestras de heces de los individuos sometidos a los tratamientos fueron analizadas mediante ANOVA de tres vías. En la mayoría de los sets de datos se observó una inhibición significativa de las esterazas en los tratamientos más severos (Figura 7) y un efecto significativo de al menos uno de los tres factores (temperatura, humedad y pesticida), pero no de la interacción de éstos (Tabla 7).

Tabla 7: ANOVA de 3 vías (humedad, temperatura y pesticida) para la actividad esterásica de las heces de los individuos sometidos a los tratamientos durante 12 semanas. Asteriscos denotan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

<b>Marcador</b>	<b>Efecto</b>	<b>% de variación</b>	<b>F</b>	<b>gl</b>	<b>p</b>
Semana 4	Humedad	0,1299	0,2409	1,50	0,6257
	Temperatura	14,59	27,06	1,50	<b>&lt;0,0001*</b>
	Pesticida	32,50	60,27	1,50	<b>&lt;0,0001*</b>
	Humedad*Temperatura	2,092	3,879	1,50	0,0544
	Humedad*Pesticida	0,0000591	0,00011	1,50	0,9917
	Temperatura*Pesticida	3,249	6,025	1,50	<b>0,0176*</b>
	Humedad*Temperatura*Pesticida	7,277	13,50	1,50	<b>0,0006*</b>
Semana 6	Humedad	0,006508	0,005243	1,46	0,9426
	Temperatura	1,759	1,417	1,46	0,2400
	Pesticida	33,56	27,04	1,46	<b>&lt;0,0001*</b>
	Humedad*Temperatura	0,4219	0,3399	1,46	0,5627
	Humedad*Pesticida	0,01104	0,008894	1,46	0,9253
	Temperatura*Pesticida	5,812	4,683	1,46	<b>0,0357*</b>
	Humedad*Temperatura*Pesticida	1,688	1,360	1,46	0,2495
Semana 8	Humedad	17,66	19,61	1,41	<b>&lt;0,0001*</b>
	Temperatura	28,59	31,74	1,41	<b>&lt;0,0001*</b>
	Pesticida	2,815	3,125	1,41	0,0846
	Humedad*Temperatura	26,03	28,90	1,41	<b>&lt;0,0001*</b>
	Humedad*Pesticida	1,646	1,827	1,41	0,1839
	Temperatura*Pesticida	1,215	1,349	1,41	0,2522
	Humedad*Temperatura*Pesticida	3,416	3,793	1,41	0,0584
Semana 10	Humedad	10,15	13,87	1,54	<b>0,0005*</b>
	Temperatura	7,689	10,51	1,54	<b>0,0020*</b>
	Pesticida	26,53	36,25	1,54	<b>&lt;0,0001*</b>
	Humedad*Temperatura	5,362	7,328	1,54	<b>0,0091*</b>
	Humedad*Pesticida	0,05413	0,074	1,54	0,7867
	Temperatura*Pesticida	6,993	9,557	1,54	<b>0,0031*</b>
	Humedad*Temperatura*Pesticida	0,01073	0,01467	1,54	0,9041
Semana 12	Humedad	10,52	11,85	1,43	<b>0,0013*</b>
	Temperatura	0,07558	0,08510	1,43	0,7719
	Pesticida	26,65	30,00	1,43	<b>&lt;0,0001*</b>
	Humedad*Temperatura	1,238	1,394	1,43	0,2442
	Humedad*Pesticida	8,350	9,401	1,43	<b>0,0037*</b>
	Temperatura*Pesticida	6,508	7,327	1,43	<b>0,0097*</b>

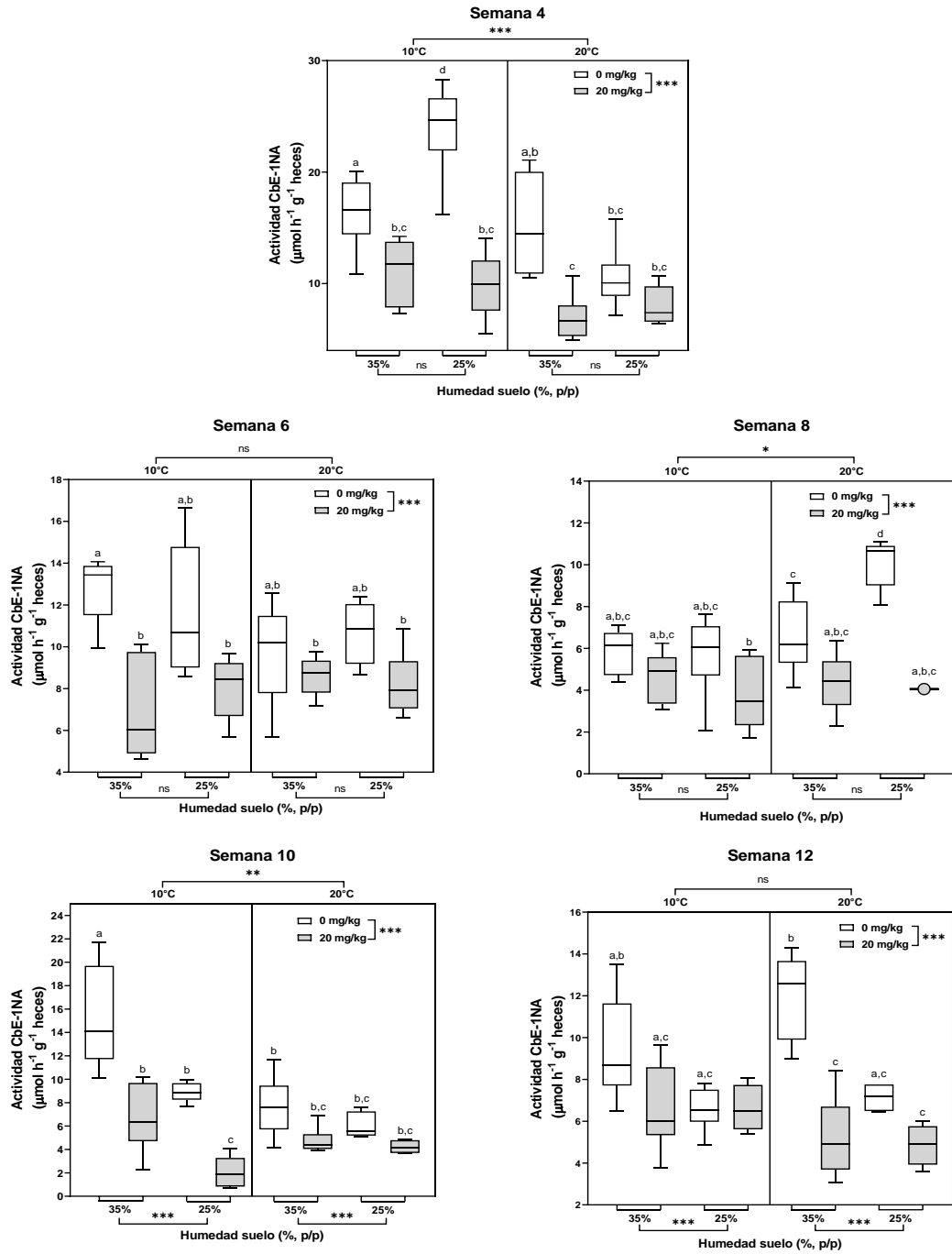


Figura 7: Promedio de actividad específica de CbE- $\alpha$ NA en las heces de los individuos sometidos a los distintos tratamientos en distintas semanas (2, 4, 6, 8, 10, 12). Asteriscos denotan diferencias significativas para ANOVA tres vías, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) después de una prueba *a posteriori* de Tukey.

### 5.3.3 Esterasas en suelo

Se realizaron ANOVAs de tres vías con la actividad esterásica de las muestras de suelo obtenidas cada dos semanas (semanas 2, 4, 6, 8, 10 y 12) y en todos los sets de datos se observó una inhibición significativa de las esterazas en los tratamientos más severos (Figura 8). En la mayoría de las semanas se obtuvo un efecto significativo de los tres factores (temperatura, humedad y pesticida) pero no de la interacción de éstos (Tabla 8).

Tabla 8: ANOVA de tres vías (humedad, temperatura y pesticida) para la actividad esterásica de los suelos utilizados en los tratamientos. Asteriscos denotan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Marcador	Efecto	% de variación	F	gl	p
Semana 2	Humedad	29,36	62,02	1,24	<0,0001*
	Temperatura	25,35	53,54	1,24	<0,0001*
	Pesticida	26,02	54,96	1,24	<0,0001*
	Humedad*Temperatura	0,4359	0,9206	1,24	0,3469
	Humedad*Pesticida	6,630	14,00	1,24	0,0010*
	Temperatura*Pesticida	0,5049	1,066	1,24	0,3120
	Humedad*Temperatura*Pesticida	0,3307	0,6985	1,24	0,4115
Semana 4	Humedad	22,57	20,37	1,24	0,0001*
	Temperatura	13,06	11,78	1,24	0,0022*
	Pesticida	17,60	15,88	1,24	0,0005*
	Humedad*Temperatura	11,59	10,46	1,24	0,0035*
	Humedad*Pesticida	0,7077	0,6384	1,24	0,4321
	Temperatura*Pesticida	0,09901	0,08932	1,24	0,7676
	Humedad*Temperatura*Pesticida	7,768	7,008	1,24	0,0141*
Semana 6	Humedad	18,93	11,74	1,24	0,0022*
	Temperatura	4,964	3,080	1,24	0,0920
	Pesticida	34,33	21,30	1,24	0,0001*
	Humedad*Temperatura	0,4825	0,2993	1,24	0,5894
	Humedad*Pesticida	0,5497	0,3410	1,24	0,5647
	Temperatura*Pesticida	1,414	0,8774	1,24	0,3583
	Humedad*Temperatura*Pesticida	0,6418	0,3981	1,24	0,5340
Semana 8	Humedad	36,50	38,22	1,24	<0,0001*
	Temperatura	10,88	11,39	1,24	0,0025*
	Pesticida	19,54	20,46	1,24	0,0001*
	Humedad*Temperatura	1,012	1,059	1,24	0,3136
	Humedad*Pesticida	8,993	9,414	1,24	0,0053*
	Temperatura*Pesticida	0,03550	0,03716	1,24	0,8488
	Humedad*Temperatura*Pesticida	0,1100	0,1151	1,24	0,7373
Semana 10	Humedad	31,49	33,41	1,24	<0,0001*
	Temperatura	19,46	20,64	1,24	0,0001*
	Pesticida	23,78	25,22	1,24	<0,0001*
	Humedad*Temperatura	1,233	1,308	1,24	0,2641
	Humedad*Pesticida	0,2497	0,2649	1,24	0,6115
	Temperatura*Pesticida	0,9147	0,9703	1,24	0,3344
	Humedad*Temperatura*Pesticida	0,2471	0,2622	1,24	0,6133

Semana 12	Humedad	13,20	8,045	1,24	<b>0,0091*</b>
	Temperatura	2,605	1,588	1,24	0,2197
	Pesticida	22,45	13,69	1,24	<b>0,0011*</b>
	Humedad*Temperatura	6,185	3,770	1,24	0,0640
	Humedad*Pesticida	3,657	2,230	1,24	0,1484
	Temperatura*Pesticida	5,608	3,418	1,24	0,0768
	Humedad*Temperatura*Pesticida	6,924	4,221	1,24	0,0510



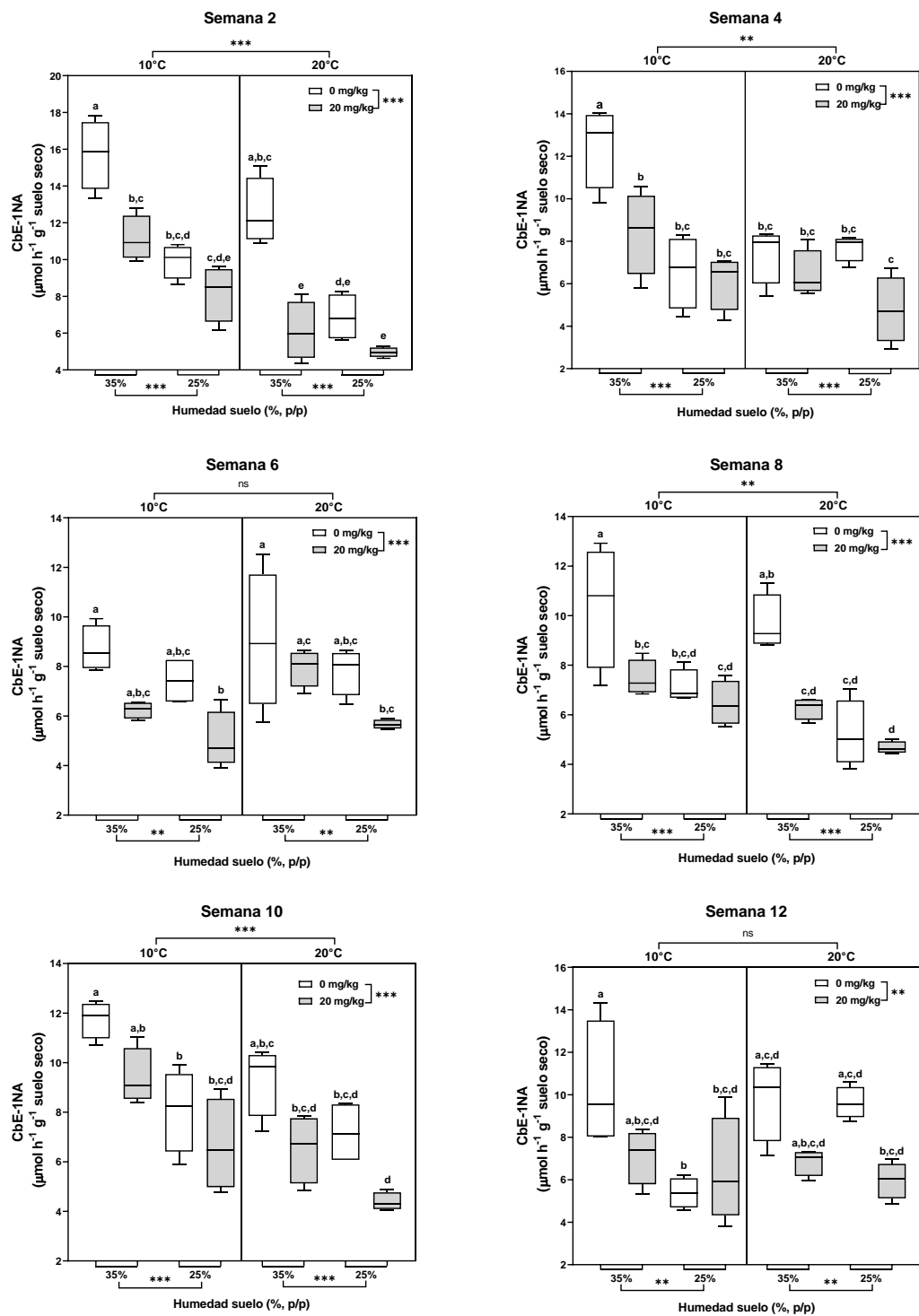


Figura 8: Promedio de actividad específica de CbE- $\alpha$ NA en los suelos de los tratamientos en distintas semanas (2, 4, 6, 8, 10, 12). Asteriscos denotan diferencias significativas para ANOVA de tres vías, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) después de una prueba *a posteriori* de Tukey.

### 5.3.4 Estrés oxidativo

El ANOVA de tres vías reveló que los tres factores afectaron de forma significativa la concentración de ácido úrico (TAC) (Tabla 9) pudiéndose observar una disminución en todos los tratamientos con respecto al control (Figura 9a). A pesar de esto, sólo las interacciones humedad\*temperatura y humedad\*pesticida afectaron de forma significativa a TAC. Los peróxidos acuosos se vieron afectados significativamente por el pesticida, la interacción humedad\*temperatura y la interacción de los tres factores (Tabla 9). Si bien no es totalmente clara, se observa una tendencia al aumento de los peróxidos en la temperatura baja cuando disminuye la humedad y hay CPF (Figura 9b). Finalmente, la peroxidación lipídica se vio afectada por la temperatura y las interacciones humedad\*temperatura y temperatura\*pesticida (Tabla 9); se observa una disminución de MDA en los tratamientos expuestos a 10 °C, mientras que, en los tratamientos expuestos a una alta temperatura, se aprecia un aumento de MDA (Figura 9c).

Tabla 9: ANOVA de tres vías (humedad, temperatura y pesticida) para los marcadores de estrés oxidativo de lombrices sometidas a los tratamientos. Asteriscos denotan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Marcador	Efecto	% de variación	F	gl	p
TAC	Humedad	2,879	4,383	1,65	<b>0,0402*</b>
	Temperatura	18,99	28,92	1,65	<b>&lt; 0,0001*</b>
	Pesticida	4,279	6,515	1,65	<b>0,0131*</b>
	Humedad*Temperatura	18,46	28,11	1,65	<b>&lt; 0,0001*</b>
	Humedad*Pesticida	4,468	6,802	1,65	<b>0,0113*</b>
	Temperatura*Pesticida	1,821	2,772	1,65	0,1007
	Humedad*Temperatura*Pesticida	0,3632	0,5529	1,65	0,4598
Peróxidos acuosos	Humedad	1,791	1,607	1,64	0,2094
	Temperatura	0,6717	0,6029	1,64	0,4403
	Pesticida	6,396	5,741	1,64	<b>0,0195*</b>
	Humedad*Temperatura	6,777	6,083	1,64	<b>0,0163*</b>
	Humedad*Pesticida	0,000006574	0,0000058	1,64	0,9981
	Temperatura*Pesticida	3,909	3,508	1,64	0,0656
	Humedad*Temperatura*Pesticida	5,996	5,382	1,64	<b>0,0235*</b>
Peroxidación lipídica	Humedad	4,12	6,495	1,65	<b>0,0132*</b>
	Temperatura	7,486	11,8	1,65	<b>0,001*</b>
	Pesticida	0,3177	0,5008	1,65	0,4817
	Humedad*Temperatura	34,07	53,7	1,65	<b>&lt; 0,0001*</b>
	Humedad*Pesticida	0,2942	0,4638	1,65	0,4983
	Temperatura*Pesticida	11,61	18,31	1,65	<b>&lt; 0,0001*</b>
	Humedad*Temperatura*Pesticida	0,01473	0,02322	1,65	0,8794

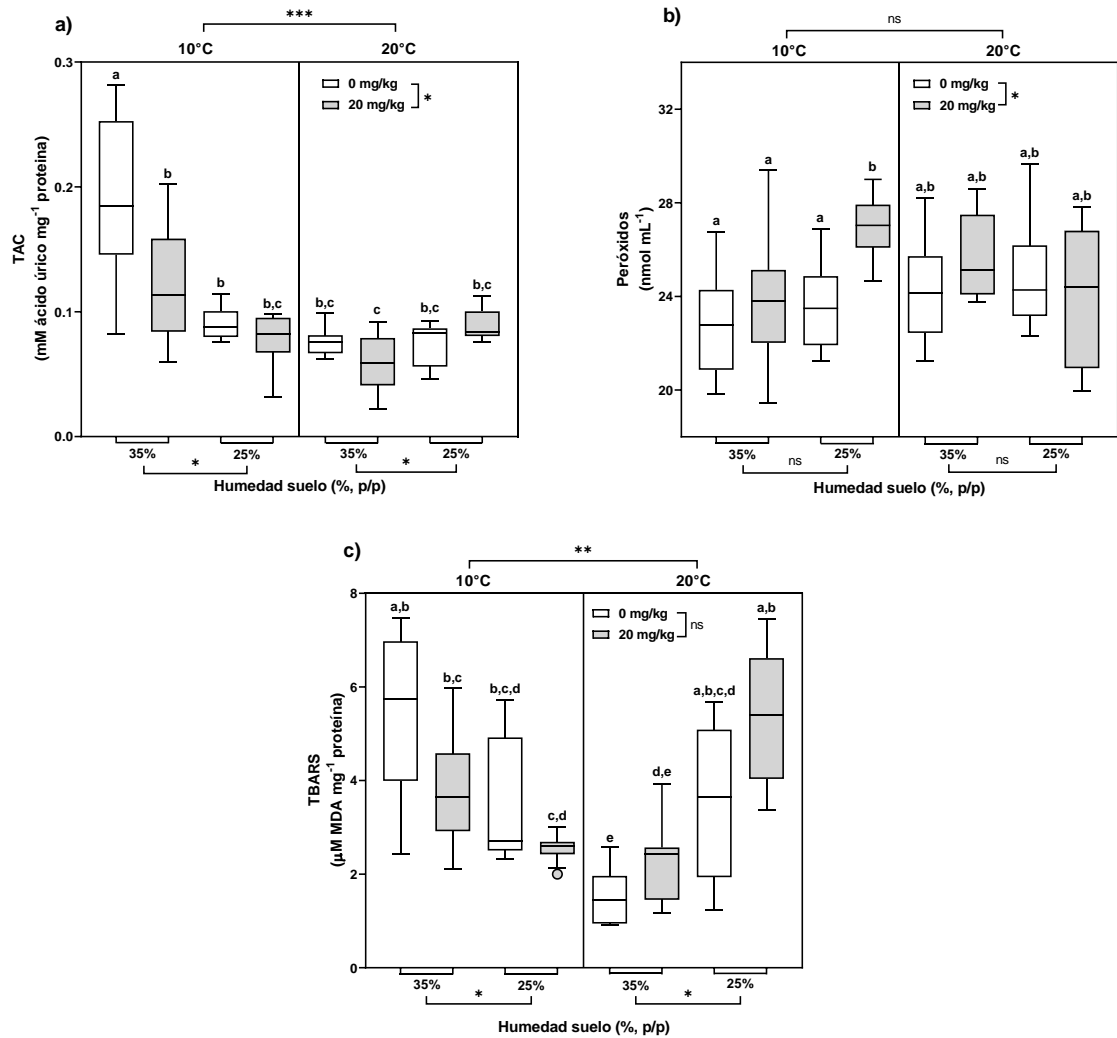


Figura 9: Promedio de concentraciones de: a) ácido úrico, b) peróxido y c) MDA en individuos de *A. caliginosa* sometidos a los distintos tratamientos durante 12 semanas. Los círculos corresponden a outliers. Asteriscos denotan diferencias significativas para ANOVA de tres vías, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) después de una prueba *a posteriori* de Tukey.

El análisis del GSH, GSSG y su relación GSH/GSSG arrojó una disminución en los niveles de los tres marcadores en los tratamientos más severos (Figura 10). Específicamente, en GSH se observó un efecto significativo de la humedad, de la temperatura y de la interacción entre estos dos factores (Tabla 10, Figura 10a). Para el caso del GSSG, no se observó efecto significativo de ninguno de los tres factores, y sólo la interacción humedad\*temperatura tuvo un efecto sobre la concentración

de GSSG (Figura 10b). Cuando se analiza la relación GSH/GSSG, también se observa una disminución en los tratamientos más severos, y dicho efecto es causado por la humedad, la temperatura y la interacción entre ellos dos (Figura 10c).

Tabla 10: ANOVA de tres vías (humedad, temperatura y pesticida) para los marcadores de estrés oxidativo de lombrices sometidas a los tratamientos. Asteriscos denotan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Marcador	Efecto	% de variación	F	gl	p
GSH	Humedad	6,324	8,181	1,59	<b>0,0058*</b>
	Temperatura	23,83	30,83	1,59	<b>&lt; 0,0001*</b>
	Pesticida	1,23	1,591	1,59	0,2121
	Humedad*Temperatura	25,04	32,4	1,59	<b>&lt; 0,0001*</b>
	Humedad*Pesticida	0,3547	0,4589	1,59	0,5008
	Temperatura*Pesticida	0,6006	0,777	1,59	0,3816
	Humedad*Temperatura*Pesticida	0,00112	0,001449	1,59	0,9698
GSSG	Humedad	2,472	2,029	1,64	0,1592
	Temperatura	3,554	2,918	1,64	0,0924
	Pesticida	1,498	1,23	1,64	0,2715
	Humedad*Temperatura	10,87	8,92	1,64	<b>0,004*</b>
	Humedad*Pesticida	0,1485	0,1219	1,64	0,7281
	Temperatura*Pesticida	1,865	1,531	1,64	0,2204
	Humedad*Temperatura*Pesticida	0,00009435	0,0000775	1,64	0,993
GSH/GSSG	Humedad	4,882	6,295	1,59	<b>0,0149*</b>
	Temperatura	31,95	41,2	1,59	<b>&lt; 0,0001*</b>
	Pesticida	0,2992	0,3858	1,59	0,5369
	Humedad*Temperatura	19,76	25,47	1,59	<b>&lt; 0,0001*</b>
	Humedad*Pesticida	0,3126	0,4031	1,59	0,528
	Temperatura*Pesticida	0,01659	0,02139	1,59	0,8842
	Humedad*Temperatura*Pesticida	0,001741	0,002245	1,59	0,9624

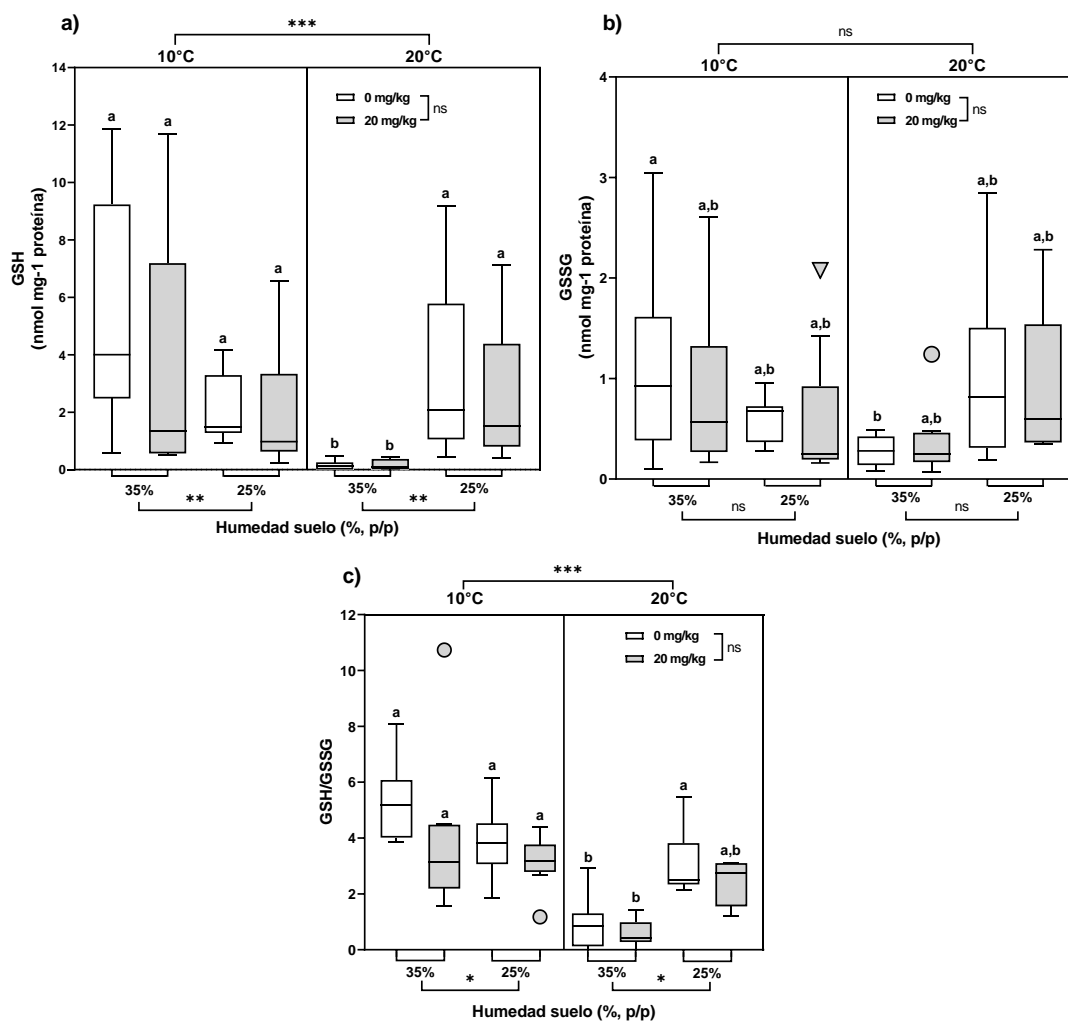


Figura 10: Promedio de concentraciones de: a) GSH, b) GSSG y c) GSH/GSSG en individuos de *A. caliginosa* sometidos a los distintos tratamientos durante 12 semanas. Los triángulos y círculos corresponden a outliers. Asteriscos denotan diferencias significativas para ANOVA de tres vías, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) después de una prueba *a posteriori* de Tukey.

En el mapa de calor de la matriz de correlaciones (Figura 11, Tabla 11) se puede observar que los niveles de TAC y de GSH se correlacionan de forma negativa con la tasa metabólica. Todos los marcadores bioquímicos se correlacionan de forma positiva, y la mayoría significativamente, entre ellos, con excepción de los peróxidos, que se correlacionan de forma negativa y significativa con el resto de los marcadores.

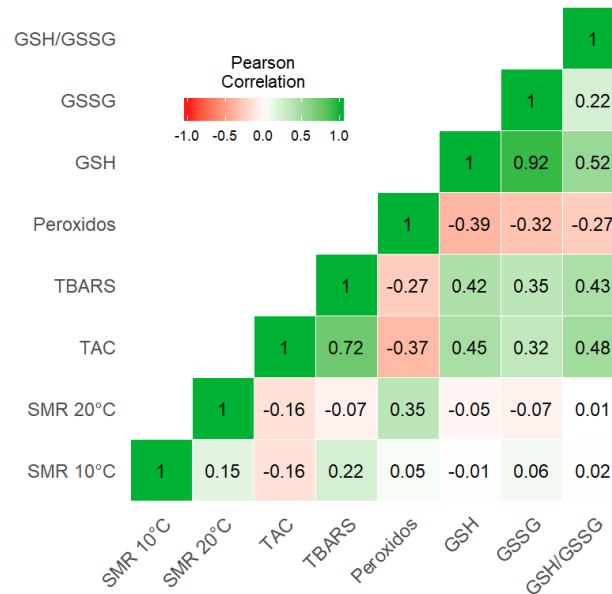


Figura 11: Mapa de calor de matriz de correlaciones de SMR y marcadores de estrés oxidativo en individuos de *A. caliginosa* sometidos a distintos tratamientos durante 12 semanas. Los coeficientes de correlación de los marcadores están coloreados desde rojo (-1) hasta verde (1).

Tabla 11: Matriz de correlación de Pearson de SMR y marcadores de estrés oxidativo en individuos de *A. caliginosa* sometidos a distintos tratamientos durante 12 semanas. Asteriscos denotan diferencias significativas, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

		SMR 10°C	SMR 20°C	TAC	Peróx.	TBARS	GSH	GSSG	GSH/GSSG
<b>SMR 10°C</b>	r	1	0,128	-0,187	0,098	0,133	-0,005	0,092	0,01
	p		0,283	0,113	0,412	0,261	0,969	0,45	0,932
<b>SMR 20°C</b>	r		1	-0,157	<b>0,357**</b>	-0,064	-0,061	-0,071	0,006
	p			0,189	<b>0,002</b>	0,593	0,622	0,563	0,96
<b>TAC</b>	r			1	<b>-0,353**</b>	<b>0,726***</b>	<b>0,452***</b>	<b>0,304*</b>	<b>0,477***</b>
	p				<b>0,002</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,011</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>Peróxidos</b>	r				1	<b>-0,267*</b>	<b>-0,39**</b>	<b>-0,306**</b>	<b>-0,263*</b>
	p					<b>0,023</b>	<b>0,001</b>	<b>0,01</b>	<b>0,029</b>
<b>TBARS</b>	r					1	<b>0,418***</b>	<b>0,333**</b>	<b>0,427***</b>
	p						<b>&lt;0,001</b>	<b>0,005</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>GSH</b>	r						1	<b>0,913***</b>	<b>0,515***</b>
	p							<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>GSSG</b>	r							1	0,22
	p								0,074
<b>GSH/GSSG</b>	r								1
	p								

#### 5.4 Análisis factorial exploratorio

Debido a que se pudo observar distintas correlaciones significativas, tanto en las esterasas como en los marcadores de estrés oxidativo, se realizó un análisis factorial exploratorio, donde se pudo observar una estructura de dos factores dentro de las variables analizadas. Las esterasas se correlacionaron positivamente con el factor 1, asociado a una respuesta detoxificadora, mientras que el metabolismo se asoció de forma negativa con dicho factor. El segundo factor, se asocia con una respuesta oxidante, observando un aumento de GSH, GSSG, TAC y TBARS, y una disminución de los peróxidos (Tabla 12 y Figura 12).

Tabla 12: Valores de cargas factoriales para las variables analizadas en los individuos de *A. caliginosa* sometidos a los ocho tratamientos simulando diferentes escenarios de cambio global durante 12 semanas.

El método de extracción corresponde a componentes principales, mientras que el método de rotación corresponde a Varimax.

	<b>Factor 1</b>	<b>Factor 2</b>	<b>Unicidad</b>
<b>AChE</b>	0,913		0,131
<b>BChE</b>	0,898		0,172
<b>GSH</b>		0,894	0,199
<b>GSSG</b>		0,832	0,287
<b>Peróxidos</b>		-0,540	0,611
<b>SMR 10°C</b>	-0,476		0,768
<b>SMR 20°C</b>	-0,448		0,772
<b>TAC</b>		0,696	0,413
<b>TBARS</b>		0,717	0,485
<b>P-NPA</b>	0,911		0,167
<b><math>\alpha</math>NA</b>	0,859		0,259
<b><math>\alpha</math>NB</b>	0,792		0,365

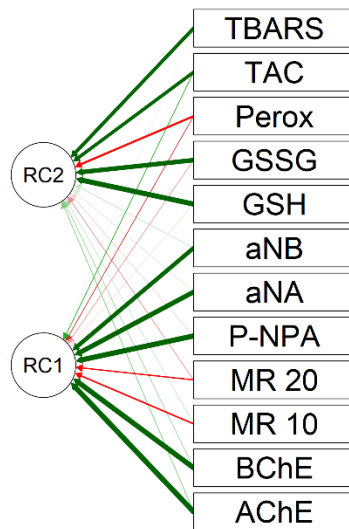


Figura 12: Diagrama de vías de análisis factorial exploratorio. El grosor de las flechas corresponde a la magnitud de la asociación, mientras que el color corresponde al signo de dicha asociación (rojo = negativo, verde = positivo)

La Figura 13 corresponde al *scree plot* donde se puede observar que 12 factores fueron extraídos usando 12 variables y se utilizaron los factores cuyo eigenvalue fuera mayor a 1. La Figura 14 muestra el *score plot* de ambos factores escogidos. La inspección del *score plot* muestra que hay una clara separación de los tratamientos en dos grupos con respecto al factor 1, donde la diferencia corresponde a la presencia y la ausencia del pesticida.



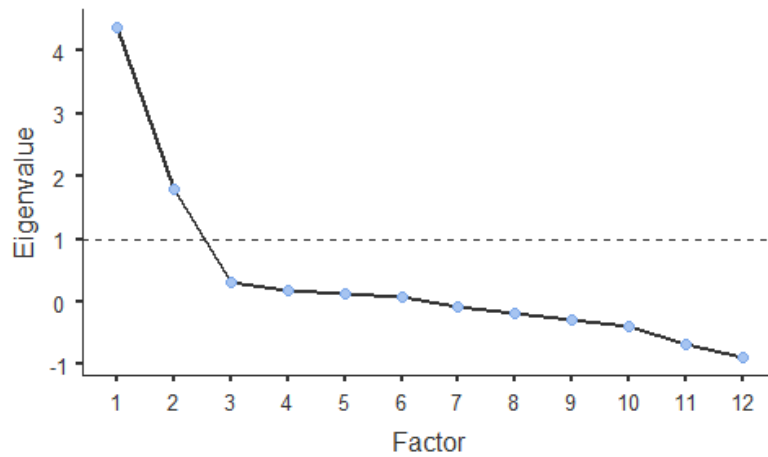


Figura 13: *Scree plot* del análisis de los doce factores obtenidos a partir de las doce variables consideradas. La línea segmentada corresponde al *eigenvalue* 1.

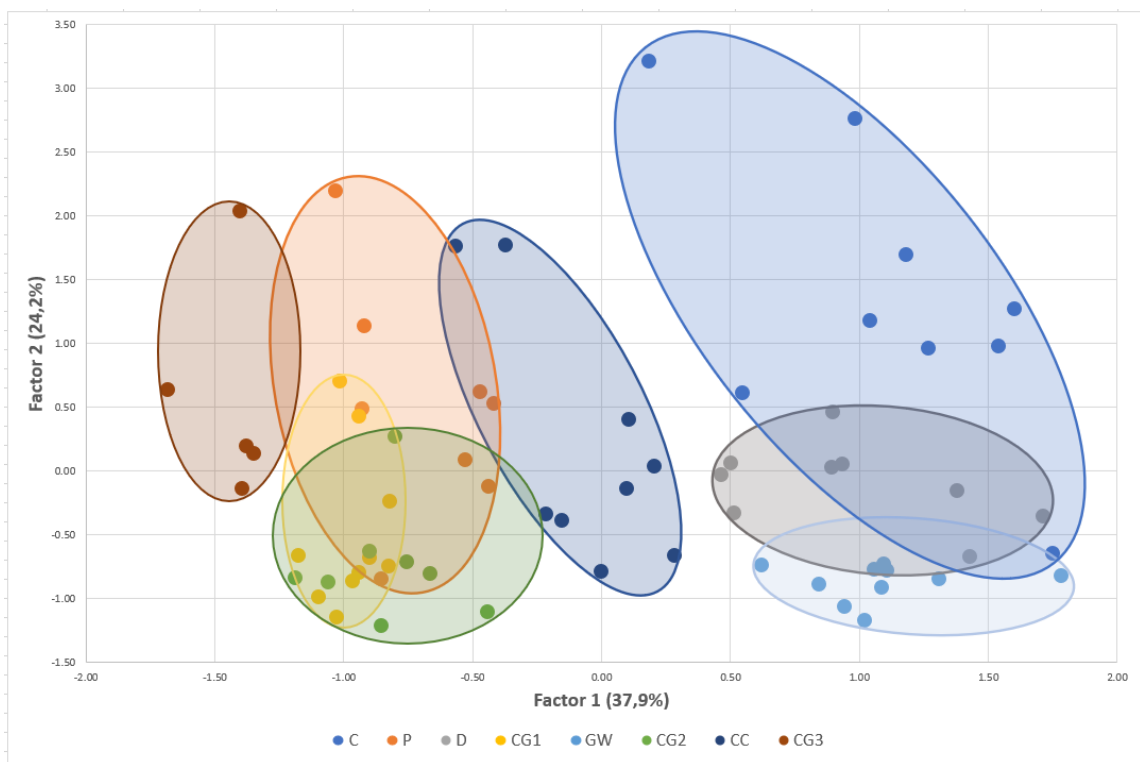


Figura 14: Plot del análisis de factores de los datos de SMR y marcadores bioquímicos (CbE- $\alpha$ NA, CbE- $\alpha$ NB, CbE-P-NPA, BChE, AChE, TAC, Peróxidos, TBARS, GSH y GSSG) de los individuos de *Aporrectodea caliginosa* expuestos a los ocho tratamientos (C: control, P: contaminación, D: sequía, CG1: cambio global 1, GW: calentamiento global, CG2: cambio global 2, CC: cambio climático, CG3: cambio global 3) que simulan distintos escenarios de cambio global.

## 6. Discusión

### 6.1 Efecto de la temperatura, humedad y pesticida sobre la masa corporal y la tasa metabólica

El objetivo central de esta tesis fue simular los efectos de tres factores ambientales (temperatura, humedad del suelo y exposición a pesticida), mediante un estudio experimental que incluyó ocho tratamientos durante 12 semanas con individuos de *A. caliginosa*, los que simulaban distintos escenarios de cambio global. Esto con el objetivo de estimar el efecto de las actividades antrópicas y el cambio global sobre distintos marcadores bioquímicos, la tasa metabólica y la masa corporal.

Los tratamientos más severos causaron una disminución significativa de la masa corporal de las lombrices a lo largo del experimento, observándose una disminución de un 22,9 % en el tratamiento CG1 y un 39,1 % en el tratamiento CG3. La concentración del pesticida utilizada en este estudio correspondió a una dosis subletal (20 mg de CPF kg<sup>-1</sup> de suelo), mientras que la concentración letal media de CPF para *A. caliginosa* ha sido estimada en 755 mg kg<sup>-1</sup> (Ma y Bodt, 1993), por lo que se esperaba una alta tasa de sobrevivencia en este estudio, la cual se logró una vez modificado el valor de humedad del suelo. Algunos autores han sugerido que la exposición a CPF puede llevar a cambios en la masa corporal y en la tasa de crecimiento en distintas especies (Reinecke y Reinecke, 2007; Sanchez-Hernandez et al., 2014b y 2018) y estos cambios serían debido a los costos energéticos implicados en la detoxificación de contaminantes (Spurgeon y Hopkin, 1996; Narváez et al., 2016).

La literatura científica aporta muy pocos estudios que hayan cuantificado el efecto de los contaminantes sobre el desempeño energético y aún son menos los enfocados en invertebrados como las lombrices. Holmstrup y colaboradores (2011) cuantificaron la disminución de un polisacárido asociado a la reserva de energía debido a la contaminación por metales, mientras que Givaudan y colaboradores (2014) también observaron la disminución en la energía de reserva en

lombrices expuestas a suelos agrícolas contaminados con pesticidas. Khan y colaboradores (2007) observaron en *Lumbricus terrestris* un aumento, y posterior disminución (a partir de los 18°C) del consumo de O<sub>2</sub> junto con el aumento de la temperatura. También reportaron cómo variaba el consumo de O<sub>2</sub> bajo exposición a distintos metales y a distintas temperaturas. En este estudio se midió el desempeño energético de lombrices expuestas a tratamientos que simulaban escenarios de cambio global, pero se realizó mediante respirometría de flujo cerrado. Con esta técnica, se pudo registrar un aumento en la producción de CO<sub>2</sub> hacia los tratamientos más severos, con un efecto marcadamente significativo ejercido por la humedad, el pesticida y la interacción de ambos factores.

Estos hallazgos sugieren que el presupuesto energético de las lombrices es flexible: en respuesta a un aumento de la energía destinada a la activación del sistema inmune, los animales pueden reducir otro componente de su presupuesto (Degen 2006). Esto implica que la exposición a un pesticida OF, bajo un contexto de cambio climático, genera el despliegue de mecanismos fisiológicos asociados a la detoxificación para poder librar al organismo de tal estrés ambiental. Dichos mecanismos son costosos y generan un impacto sobre el presupuesto energético y, en este caso, sobre la energía destinada al mantenimiento, lo que se traduce en una pérdida de masa corporal de hasta un 39% en el tratamiento más severo (CG3).

Diversos estudios han documentado que la relación de las tasas metabólicas con la temperatura (típicamente representada como el efecto Arrhenius o  $Q_{10}$ ) presenta una variación interespecífica significativa entre invertebrados ectotermos como también una variación en el rango de temperatura que se mide. En general, se han observado casos donde el metabolismo es una función de la temperatura con un  $Q_{10}$  cercano a 2,0 – 2,5 (lo que se denomina un efecto sin compensación, Precht et al., 1973), y otros casos donde se observa una respuesta compensatoria con valores de  $Q_{10}$  menor a 2,0. Para el caso de las lombrices, se ha documentado un amplio rango

de valores de  $Q_{10}$ . Por ejemplo, en *Lumbricus terrestris* (especie anécica), se observa una alta compensación en el rango óptimo de temperaturas ( $Q_{10} = 1,3$ ; 10 - 15 °C), compensación parcial en el rango subóptimo ( $Q_{10} = 1,8$ ; 5 - 10°C) y una ausencia de compensación en condiciones más cálidas ( $Q_{10} = 2,2$ ; 15 - 20°C) (Fitzpatrick et al., 1987). Contrario a esto, Heine y Larink (1993) reportaron un  $Q_{10} = 2,6 - 3,2$  en la misma especie para el rango de 8 – 13°C. Phillipson y Bolton (1976) documentaron un  $Q_{10} = 2.1$  en *Aporrectodea rosea* (especie endógena) medida a 5 – 10°C. *Dendrobaena atheca* mostró una compensación metabólica perfecta ( $Q_{10} = 1,1 - 1,3$ ) para el intervalo 10 – 30°C (Al-Habbib e Ismael, 1989).

Esta gran variabilidad en la respuesta a la temperatura, sin embargo, es difícil de explicar, en parte por los distintos métodos que se han utilizado para su determinación. No obstante, en el presente estudio se pudo observar una compensación parcial antes de iniciar los tratamientos ( $Q_{10} = 1,54$ ) y una compensación completa al final de estos ( $Q_{10} = 1,18$ ). La falta de estudios que relacionen el metabolismo en invertebrados ectotermos con la exposición a un aumento de temperatura, disminución de humedad y/o pesticida también hace difícil la comparación de los resultados de esta tesis con los datos de la literatura disponible. Al considerar las predicciones de este estudio, esperábamos un aumento del metabolismo al finalizar los 90 días de tratamientos y, por lo tanto, una mantención o un aumento del  $Q_{10}$  con respecto a las mediciones previas a los tratamientos ( $Q_{10}$ : 1,54). De otra forma, también se debe considerar un error en la estimación de las tasas de respiración. Existe un problema al interpretar los datos de la producción de CO<sub>2</sub> en lombrices ya que una parte del CO<sub>2</sub> de la sangre puede estar unido como CaCO<sub>3</sub>, generando una subestimación de la tasa real (Uvarov, 1998). La compensación completa observada al final de los tratamientos sugiere que *A. caliginosa* tolera un aumento de temperatura de 10 °C, una de las razones de su amplia distribución mundial, pero si dicho aumento va acompañado de un estrés hídrico y de una exposición a CPF, se observa una tendencia al aumento de los costos metabólicos.

Estos resultados indican que incluso las lombrices más tolerantes --y por lo tanto ampliamente distribuidas-- se verían afectadas por el cambio global, y las lombrices que presentan una distribución más acotada e incluso las especies endémicas, podrían disminuir drásticamente sus tamaños poblacionales.

### *6.2 Efecto del cambio global sobre las esterasas*

En todas las esterasas analizadas se observó que el mayor efecto sobre su actividad fue el ejercido por el CPF, registrándose una inhibición máxima de un 96% de la actividad AChE en el tratamiento GC3 comparado con el tratamiento control (Figura 5). El efecto de la temperatura aportó entre un 1,5 y 13,8 % de la variación total de la actividad de las esterasas, mientras que el efecto de la humedad aportó entre un 2,4 y 8,0 % (Tabla 4). Estos resultados indican que la actividad esterásica, incluso de la AChE, sería afectada prácticamente solo por el pesticida, mientras que la temperatura y humedad del suelo no tendrían un efecto significativo. Diversos autores han documentado el efecto inhibitorio de los pesticidas sobre la actividad esterásica en lombrices (Jordaan et al., 2012; Martínez-Morcillo et al., 2013; Sánchez-Hernández et al., 2014b y 2018; Jouni et al., 2018). Los resultados obtenidos en esta tesis son congruentes con lo reportado por Sánchez-Hernández y colaboradores (2014b), en *Aporrectodea caliginosa*. Efectivamente, la exposición de individuos a una dosis subletal de CPF generó inhibiciones entre 87 y 97 % en la actividad de AChE, comparable con los resultados de este estudio, en el que se encontró que la inhibición de la AChE llegó hasta un 96 % en el tratamiento más severo (e.g., CG3). En el caso de las CbEs y la BChE se observaron inhibiciones entre un 79 y 92 % al comparar el tratamiento CG3 con el control. Estos resultados son esperables considerando que la misma especie expuesta a la mitad de la dosis de otro pesticida OF (paratión) presentó inhibiciones de 40-60 % en las mismas esterasas (Jouni et al., 2018). La capacidad de las CbEs y BChE para actuar como *bioscavengers* ha sido documentada en distintos estudios (Russel y Overstreet, 1987; Chanda et

al., 1997; Sanchez et al., 1997) y ha sido establecido que el metabolito *oxon* del OF se une al sitio activo de la enzima, reduciendo la disponibilidad de las moléculas OF que podrían inhibir la actividad de la AChE. En el tratamiento sólo con pesticida (e.g., P) es posible que las CbEs y la BChE se estén uniendo al CPF-*oxon* por las inhibiciones medias a altas comparadas con el control (74,65 % de inhibición para CbE- $\alpha$ NB, 53,5 % de inhibición para CbE-P-NPA y 84,24 % de inhibición para BChE), mientras que en el tratamiento CG3, las inhibiciones de las CbEs alcanzan valores de 78,8 – 91,0 % que indican que la capacidad detoxificadora de las CbEs y BChE está casi saturada.

En distintos estudios se ha sugerido que la inhibición de colinesterasas puede ser considerada como una alerta temprana al ser observada como cambios en la masa corporal, en la tasa de reproducción o en la sobrevivencia (Reinecke y Reinecke, 2007; Sanchez-Hernandez et al., 2014b). Los datos obtenidos en este estudio son congruentes con esta asociación, ya que en el tratamiento que sólo tuvo presencia de pesticida (e.g., P) se pudo observar una disminución del 10 % de la masa corporal, mientras que en el tratamiento CG3 la pérdida de masa corporal fue de un 39 %. La inhibición esterásica observada en este estudio apoya lo sugerido antes, ya que el pesticida, junto con el aumento de la temperatura y la disminución de humedad, están generando el despliegue de mecanismos asociados a la detoxificación y a la sobrevivencia de alto costo energético, los que impactan negativamente el presupuesto energético y generan una disminución de la masa corporal.

Al observar la gran inhibición de la actividad AChE y tomando en consideración la baja tasa de recuperación de la actividad AChE fosforilada (Collange et al., 2010), es imposible no preguntarse cómo siguen viviendo estos individuos. Es posible que distintas formas de AChE con distinta sensibilidad hacia los OF permitan que individuos con una alta inhibición continúen vivos. Principato y colaboradores (1978) describieron tres isoformas (un monómero, un dímero y un

tetrámero) de la AChE en esta misma especie, mientras que Sanchez-Hernandez y colaboradores (2014b) describieron un nuevo monómero que podría ensamblarse y formar los dímeros, trímeros y tetrámeros. De esta forma, es posible que la inhibición observada en este estudio corresponda sólo a la inhibición de una de las isoformas de la AChE, mientras que las otras isoformas pueden estar experimentando inhibiciones más bajas. Otra posible respuesta a esta interrogante puede ser que en las lombrices se han observado dos sistemas de transmisión nerviosa, el ya conocido colinérgico (acetilcolina) y el dopaminérgico. Este último fue sugerido por Gardner (1979) cuando encontró evidencia de que la octopamina podría funcionar como un neurotransmisor en el sistema nervioso central de *Lumbricus terrestris*. Se hipotetiza entonces que, frente a la gran inhibición de la AChE y el colapso del sistema colinérgico, el sistema dopaminérgico tome protagonismo con la octopamina como sistema de transmisión principal.

Los análisis realizados en las deyecciones de las lombrices mostraron que, la actividad de CbE fue inhibida en la mayoría de los tratamientos más severos respecto a los controles. Además, las lombrices incubadas en suelos tratados con el pesticida siempre presentaron una mayor inhibición de la actividad CbE. Distintos estudios han catalogado a las heces de lombrices como *hot spots* de actividad microbiana, además del aporte de nutrientes al suelo (Kizilkaya y Hespén, 2004; Aira et al., 2010; Sanchez-Hernandez et al., 2014c). De la misma manera, las heces de las lombrices actúan como vehículo de inoculación de enzimas activas al suelo y debido al elevado contenido en materia orgánica de las heces (van Groenigen et al., 2019), esta matriz ofrece un micro-hábitat adecuado para la estabilización de enzimas extracelulares. Una de las observaciones más comunes en la enzimología de suelos, es la interacción entre las enzimas extracelulares provenientes de microorganismos, raíces de las plantas y meso y macrofauna que habita el suelo, y los complejos organominerales del suelo (Nannipieri et al., 2002). De este modo, las arcillas y la materia orgánica del suelo ofrecen un soporte físico para la fijación de las enzimas

protegiéndolas frente a factores de estrés como un incremento elevado de la temperatura del suelo o pérdida de humedad del mismo (Burns y Dick, 2002). Por lo tanto, el alto contenido de materia orgánica de las heces de las lombrices contribuye a estabilizar y mantener activas las enzimas extracelulares que se liberan desde su tracto digestivo (Aira et al., 2010; Sanchez-Hernandez et al., 2104a). Este aporte de actividad CbE desde las heces hacia el suelo, permite incrementar la capacidad de atenuación natural del suelo frente a agentes químicos como los pesticidas organofosforados, actuando las enzimas CbE como *scavengers* eficientes de pesticidas OF, inmovilizando al pesticida y así disminuyendo su disponibilidad y toxicidad en el suelo. Esto se ve reflejado en el análisis de la actividad esterásica de los suelos, donde se observan inhibiciones en todas las semanas de muestreo (semanas 2, 4, 6, 8, 10 y 12), lo que en conjunto sugiere que *A. caliginosa* actuaría como un facilitador para mejorar las actividades enzimáticas del suelo que podría tener posteriores aplicaciones en la biorremediación.

### 6.3 Cambios en el estado oxidativo

Es conocido que los distintos organismos han desarrollado mecanismos para protegerse de los efectos nocivos del aumento en la producción de ROS y el principal mecanismo corresponde a la activación de sistemas antioxidantes (Sabat et al., 2017). En este estudio, la exposición crónica a los distintos tratamientos que simulan distintos escenarios del cambio global parece haber generado distintos niveles de estrés oxidativo en *A. caliginosa*. En efecto, se observó una disminución significativa de la capacidad total antioxidante en todos los tratamientos comparados con el control, aun cuando se observó una tendencia (no significativa) hacia el aumento de los peróxidos a baja temperatura y un patrón no muy claro en el daño a las membranas celulares cuantificado mediante el MDA (Figura 9). Curiosamente, estos resultados no son congruentes con lo documentado para otras especies de anélidos. Por ejemplo, en *Lumbricus terrestris* expuestas a biochar (producto rico en carbono obtenido cuando biomasa es quemada con poco o nada de



oxígeno [Lehman 2015]) durante 30 días, se observó un aumento de TAC (Sanchez-Hernandez et al., 2019), mientras que esta especie expuesta durante 18 semanas a 20 mg kg<sup>-1</sup> de CPF evidenció una disminución de TAC y un aumento en la peroxidación lipídica (Sanchez-Hernandez et al., 2018). Una posible explicación a esta incongruencia es que, en nuestro caso, hay una disminución en los niveles de antioxidantes, pero podría haber un menor número de pro-oxidantes, lo que estaría ocasionando ese patrón no tan claro de diferencias en el daño a las membranas celulares. También es posible que no se haya observado un aumento del daño intracelular en la cuantificación de MDA porque los individuos de *A. caliginosa* podrían tolerar una concentración subletal moderada de CPF y así hacer frente de una forma efectiva al estrés oxidativo. De acuerdo con esto, Wu y colaboradores (2011) observaron que individuos de *Eisenia fetida* expuestos durante 2 días a un hidrocarburo policíclico aromático exhibían un aumento significativo de MDA, pero a los 28 días de exposición este efecto ya no se observaba.

En este estudio se pudo observar una disminución significativa de GSH y GSH/GSSG solamente en dos tratamientos (e.g., GW y CG2). Distintos estudios han documentado la variación en los niveles de GSH, GSSG y su relación como consecuencia de un estresor ambiental. Por ejemplo, se ha observado una disminución de GSH y GSH/GSSG y un aumento de GSSG frente a la exposición a metales en la lombriz *Lampito mauritii* (Maity et al., 2008); un aumento de GSH y GSSG y una disminución de GSH/GSSG en *Eisenia fetida* expuesta a tetrabromobisfenol A (un retardante del fuego) (Xu et al., 2009) y un aumento de GSH en *Eisenia fetida* expuesta a ftalato de di-*n*-butilo (DBP, usado como plastificante y aditivo en adhesivos) (Du et al., 2015). El GSH es un tripéptido que se encuentra en gran cantidad en las células y tiene un rol fundamental en la defensa antioxidante del sistema ya que su grupo sulfhidrilo puede unirse con el carbono o el cloro de muchos contaminantes. Debido a que en las células existe un equilibrio entre las formas reducida y oxidada del glutatión, con el GSH como la forma predominante y químicamente activa,

de esta forma, la razón GSH/GSSG es considerada un índice de estado redox celular (Schafer y Buettner, 2001). La disminución del GSH con respecto al control en este estudio puede ser debido a la acción de las enzimas GST y GPx que actúan en conjunto con el GSH. La GST cataliza la conjugación de GSH con xenobióticos electrofílicos para su posterior remoción, de esta forma, su activación va acompañada de una disminución de GSH y una resíntesis simultánea para volver a los niveles normales. El GSH también captura ROS de forma no enzimática o en una reacción catalizada por la GPx a través de la oxidación de dos moléculas de GSH para formar una molécula de GSSG. De esta forma, la actividad de GPx y GST causan una disminución en los niveles de GSH celular, que vuelven a la normalidad por la resíntesis y por la reducción de GSSG mediada por la GR. Considerando lo anterior, el estrés oxidativo generado por los distintos tratamientos estaría causando una disminución del GSH en los tratamientos GW y CG2, mientras que en los tratamientos más severos, CC y CG3, habría una aparente recuperación de los niveles de GSH, posiblemente debido al alto desbalance oxidativo y, por lo tanto, se estaría observando los procesos de resíntesis de GSH y reducción de GSSG a GSH.

#### *6.4 Análisis global*

El análisis factorial realizado sobre todas las variables medidas directamente en las lombrices, entregó una estructuración de dos factores donde se puede diferenciar de forma clara que el factor 1 (Factor detoxificador) agrupa a los marcadores esterásicos junto con el SMR, mientras que el factor 2 (Factor oxidativo) agrupa a todos los marcadores relacionados con el estado oxidativo (Figura 12). Además de esto, se pudo observar una alta correlación positiva entre los marcadores CbE- $\alpha$ NA, CbE- $\alpha$ NB y CbE-P-NPA ( $r = 0,72$ ;  $p < 0,001$ ;  $r = 0,64$ ;  $p < 0,001$ ;  $r = 0,84$ ;  $p < 0,001$ ), lo que es esperable, ya que se trata de distintos sustratos para la misma enzima (Figura 6). Lo mismo se puede observar para los marcadores AChE y BChE ( $r = 0,93$ ;  $p < 0,001$ ), ambas enzimas

hidrolizan ésteres de colina. En los marcadores de estado oxidativo, se pudo apreciar una alta correlación positiva entre GSH y GSSG ( $r = 0,92$ ;  $p < 0,001$ ), ambos marcadores forman parte del sistema rédox del glutatión. También se observa una alta correlación positiva entre TAC y TBARS. En distintos estudios se han utilizado estos dos marcadores como índice de protección y daño frente al estrés oxidativo (Sanchez-Hernandez et al., 2019; Wu et al., 2011). El gráfico del análisis de factores (Figura 14) muestra una distribución con respecto al Factor detoxificador, donde se observa que los tratamientos con pesticida tienen valores negativos mientras que los tratamientos sin pesticida tienen valores positivos, con excepción del control que tiene valores positivos y negativos. Los tratamientos con pesticida se ubican hacia la izquierda, y los tratamientos sin pesticida hacia la derecha del gráfico. En cuanto al Factor 2, no parece haber una clara diferenciación ya que los cuatro tratamientos que quedan más abajo no son agrupables en una categoría (e.g., todos con baja humedad). Esto sugiere que el factor que más aporta a la variabilidad de todos los datos es la presencia/ausencia del CPF por sobre la temperatura y la humedad.

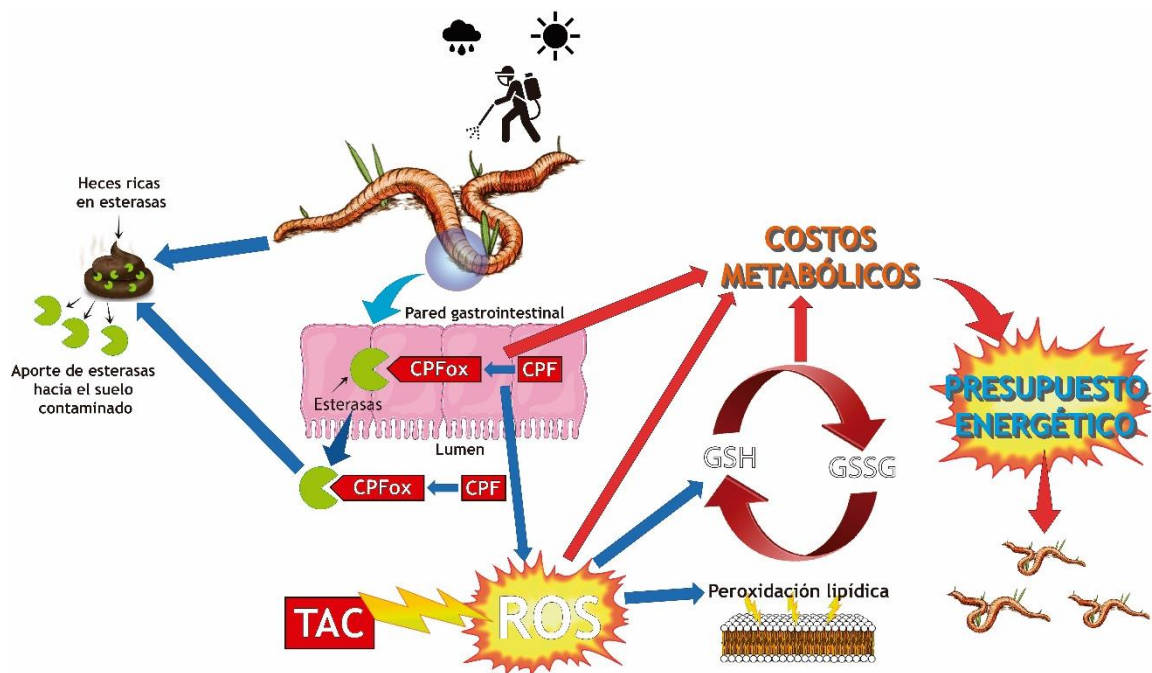


Figura 15: Resumen ilustrativo de las principales conclusiones de este estudio con respecto a la capacidad detoxificadora de la lombriz, su homeostasis oxidativa, presupuesto energético y masa corporal (véase texto para detalles).

## 6.5 Conclusiones

Las conclusiones de este estudio son las siguientes:

1. Se observó una serie de inhibiciones significativas en las esterazas (AChE, CbE, BChE) después de 12 semanas de exposición de las lombrices a suelos tratados con una dosis subletal (20 mg/kg) de CPF. Este impacto fue mayor en las lombrices que además fueron sometidas a un estrés térmico e hídrico, combinación que refleja un escenario de cambio global.
2. Las inhibiciones de la actividad CbE observadas en las heces de *A. caliginosa* y en las muestras de suelos sugieren un aporte de actividad CbE desde las heces hacia el suelo, lo que permite una disminución de la concentración del CPF en los suelos contaminados.

3. La exposición de las lombrices a los tres factores genera un desbalance en el estado oxidativo, reflejado en el aumento de los peróxidos, la disminución de TAC y la disminución de GSH y GSSG. Este desbalance no produce daño oxidativo en las membranas por lo que estos escenarios de cambio global no generarían daño a nivel celular en *A. caliginosa*.
4. Se observaron distintas sensibilidades de los marcadores a los factores utilizados para la exposición de los individuos, por lo que se recomienda utilizar una batería de marcadores para así tener una imagen más amplia de lo que está sucediendo a nivel bioquímico, tanto en la detoxificación como en el estado oxidativo.
5. El leve aumento del metabolismo con el aumento de temperatura sugiere que *A. caliginosa* tolera de buena forma esa temperatura alta, pero al sumar el estrés hídrico y la exposición a CPF, el metabolismo aumenta más. Esto sugiere que, frente a un escenario de cambio global, los costos metabólicos serán mayores.
6. La exposición durante 12 semanas a una concentración subletal de CPF, produce una disminución en la masa corporal de *A. caliginosa*, la cual se ve exacerbada frente al estrés térmico e hídrico.

En resumen, en este estudio se pudo observar que el efecto nocivo de la exposición a pesticidas se ve incrementado o exacerbado por el aumento de la temperatura ambiental y la disminución de la humedad del suelo, generando una serie de efectos adversos que se manifiestan a diversas escalas. La primera respuesta se observó a nivel bioquímico, como un mecanismo compensatorio que permite a los organismos hacer frente a los estresores ambientales. Esta primera respuesta tendría consecuencias sobre el presupuesto energético probablemente a través de la reasignación de recursos destinados a la detoxificación. Este impacto, además, se observaría a una escala orgánica, mediante la disminución de las tasas de crecimiento de los individuos que lleva a

una reducción significativa de la masa corporal. A su vez, esta reducción de la masa corporal podría traducirse en una disminución en la capacidad de reproducción de esta especie. Estos resultados son de particular importancia para el caso de Chile, donde la economía depende en gran medida de la agricultura, por lo tanto, el uso indiscriminado de pesticidas es una problemática constante. Además, los modelos climáticos predicen un aumento de las temperaturas y una disminución de las precipitaciones para la zona central de Chile, es decir, en un futuro no-muy-lejano las especies de lombrices endémicas de Chile, que probablemente sean menos resistentes que *A. caliginosa*, se verán expuestas a condiciones ambientales muy estresantes, lo que causaría una merma significativa en sus tamaños poblacionales llevando incluso a la extinción de estas especies endémicas. Esto podría generar un impacto significativo sobre la comunidad de lombrices, y consecuentemente habría una disminución en la capacidad biorremediadora observada en estas especies (Jouni et al., 2018) y un consiguiente aumento en la biodisponibilidad de los plaguicidas en los suelos. De esta manera, este aumento traería graves consecuencias sobre la biota edáfica y sobre las especies receptoras indirectas de la toxicidad de pesticidas en niveles tróficos menores.

Finalmente, de este estudio es posible extraer las siguientes implicaciones ambientales:

1. Efectos sinérgicos derivados de la interacción pesticida y cambio climático podrían derivar en una disminución de las poblaciones de lombrices de tierra, en particular, las endógeas y anécicas (siendo estos grupos los más abundantes en la agricultura), alterando la dinámica de las comunidades microbianas con las que establecen relaciones tróficas, alterando los ciclos de nutrientes del suelo, así como la estructura (relación micro-macroagregados) y textura del suelo.
2. Posibles alteraciones de las comunidades de organismos que dependen de las lombrices de tierra desde el punto de vista trófico.

3. Las lombrices ejercen una acción significativa en el desarrollo de la rizosfera, por lo que una disminución de la biomasa de lombrices en el suelo bajo estrés químico (pesticidas y humedad) y físico (elevada temperatura) podría, indirectamente, afectar el crecimiento y desarrollo de la comunidad vegetal.
4. Los hallazgos de este estudio corroboran la capacidad de algunas especies de lombrices como *L. terrestris* o *A. caliginosa* en facilitar la biodegradación de contaminantes orgánicos como los pesticidas. En este sentido, las respuestas de las lombrices a estresores adicionales tales como modificaciones de la temperatura y humedad del suelo afectarían seriamente la supervivencia y biomasa de lombrices terrestres, comprometiendo así la estrategia de inocular suelos contaminados por pesticidas con lombrices.

## 8. Referencias

Al-Habbib O.A.M., Ismael A.H. 1989. The effect of acclimation to constant and changing temperatures on the respiration rate of the earthworm *Dendrobaena atheca*. Journal of Biological Research 20, 129-137

Aira M., Lazcano C., Gómez-Brandón M., Domínguez J. 2010. Ageing effects of casts of *Aporrectodea caliginosa* on soil microbial community structure and activity. Applied Soil Ecology 46, 143-146

Anh P.T.Q., Gomi T., MacDonald L.H., Mizugaki S., Khoa P.V., Furuichi T. 2014. Linkages among land use, macronutrient levels, and soil erosion in northern Vietnam: a plot-scale study. Geoderma 232-234, 352-362

Apak R., Güçlüç K.G., Özyürek M., Karademir S.E. 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric iron reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52, 7970-7981

Asensio-Ramos M., Hernández-Borges J., Ravelo-Pérez L.M., Rodríguez-Delgado M.A. 2010. Evaluation of a modified QuEChERS method for the extraction of pesticides from agricultural, ornamental and forestal soils. Analytical and Bioanalytical Chemistry 396, 2307-2319

Barley K.P., Jennings A.C. 1959. Earthworms and soil fertility. III. The influence of earthworms on the availability of nitrogen. Australian journal of agricultural research 10, 164-370



Bergh C., Torgrip R., Emenius G., Östman C. 2011. Organophosphate and phthalate esters in air and settled dust – a multi-location indoor study. *Indoor Air* 21, 67-76

Bloomfield J.P., Williams R.J., Goody D.C., Cape J.N., Guha P. 2006. Impacts of climate change on the fate and behaviour of pesticides in surface and groundwater – a UK perspective. *Science of the Total Environment* 369, 163-177

Blouin M., Hodson M.E., Delgado E.A., Baker G., Brussaard L., Butt K.R., Dai J., Dendooven L., PERes G., Tondoh J.E., Cluzeau D., Brun J.J. 2013. A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services. *European Journal of Soil Science* 64, 161-182

Bouché M.B. 1977. Strategies Lombriciennes. *Ecological Bulletins* 25, 122-132

Boyer S., Wratten S.D. 2010. The potential of earthworms to restore ecosystem services after opencast mining – a review. *Basic Applied Ecology* 11, 196-203

Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254

Burns R.G., Dick R.P. 2002. *Enzymes in the Environment*. CRC Press.

Butt K.R. 1992. The intensive production of *Lumbricus terrestris* L. for soil amelioration. *Soil Biology and Biochemistry* 24, 1321-1325

Butt K. 2008. Earthworms in soil restoration: Lesson learned from United Kingdom case studies of land reclamation. *Restoration Ecology* 16(4), 637-641

Caldas E.D., Coelho R., Souza L.C.K.R., Silva S.C. 1999. Organochlorine pesticides in water, sediment, and fish Paranoa Lake of Brasilia, Brazil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 62, 199-206

Capowiez Y., Dittbrenner N., Rault M., Triebkorn R., Hedde M., Mazzia C. 2010. Earthworm cast production as a new behavioural biomarker for toxicity testing. *Environmental Pollution* 158, 388-393

Casanova M., Salazar O., Seguel O., Luzio W. 2013. The Soils of Chile. En Hartemink A.E. (eds), *World Soils Book Series*. Springer Science+Business Media Dordrecht DOI: 10.1007/978-94-007-5949-7

Chanda S.M., Mortensen S.R., Moser V.C., Padilla S. 1997. Tissue-specific effects of chlorpyrifos on carboxylesterase and cholinesterase activity in adult rats: an *in vitro* and *in vivo* comparison. *Fundamental and Applied Toxicology* 38, 148-157

Christensen J.H., Hewitson B., Busuioc A., Chen A., Gao X., Held I., Jones R., Kolli R.K., Kwon W-T., Laprise R., Magaña Rueda V., Mearns L., Menéndez C.G., Räisänen J., Rinke A., Sarr A., Whetton P. 2007. Regional Climate Projections. En: Solomon S, Qin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt KB, Tignor M, Miller HL (eds.), *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.

Collange B., Wheelock C.E., Rault M., Mazzia C., Capowiez Y., Sanchez-Hernandez J.C. 2010. Inhibition, recovery and oxime-induced reactivation of muscle esterases following chlorpyrifos exposure in the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Environmental Pollution* 158, 2266-2272

Čolović M.B., Krstić D.Z., Lazarević-Pašti T.D., Bondžić A.M., Vasić V.M. 2013. Acetylcholinesterase inhibitors: Pharmacology and toxicology. *Current Neuropharmacology* 11, 315-335

Costa L.G. 2006. Current issues in organophosphate toxicology. *Clinica Chimica Acta* 366, 1-13

de Souza Pinheiro A., de Andrade J.B. 2009. Development, validation and application of a SDME/GC-FID methodology for the multiresidue determination of organophosphate and pyrethroid pesticides in water. *Talanta* 79, 1354-1359

Degen A.A. 2006. Effect of macroparasites on the energy budget of small mammals. En: Morand S., Krasnov B.R., Poulin R. (eds.), *Micromammals and macroparasites: from evolutionary ecology to management*. Springer-Verlag, Tokyo, pp. 371-400

Deutsch C.A., Tewksbury J.J., Tigchelaar M., Battisti D.S., Merrill S.C. 2018. Increase in crop losses to insect pests in a warming climate. *Science* 361, 916-919

Devine G.J., Furlong M.J. 2007. Insecticide use: contexts and ecological consequences. *Agricultural and Human Values* 24, 281-306

Drake H.L., Horn M.A. 2007. As the worm turns: the earthworm gut as a transient habitat for soil microbial biomes. *Annual review of Microbiology* 61, 169-189

Du L., Li G., Liu M., Li Y., Yin S., Zhao J. 2015. Biomarker responses in earthworms (*Eisenia fetida*) to soils contaminated with di-*n*-butyl phthalates. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 4660-4669

Edwards C.A., Lofty J.R. 1980. Effects of earthworms inoculation upon the root growth of direct drilled cereals. *Journal of Applied Ecology* 17, 533-543

Eggleton P., Inward K., Smith J., Jones D.T., Sherlock E. 2009. A six year study of earthworm (Lumbricidae) populations in pasture woodland in southern England shows their responses to soil temperature and soil moisture. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 1857-1865

Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V., Feather-Stone R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7, 88-95

Environmental Protection Agency (EPA). 2017. Pesticides Industry Sales and Usage. 2008-2012 Market Estimates. By Donald Atwood and Claire Paisley-Jones. Biological and Economic Analysis Division. Office of Pesticide Programs. Office of Chemical Safety and Pollution Prevention.

Filser J., Fromm H., Roland F.N., Winter K. 1995. Effects of previous intensive agricultural management on microorganisms and the biodiversity of soil fauna. *Plant and Soil* 170, 123-129

Fischer A., Marshall P., Camp A. 2013. Disturbances in deciduous temperate forest ecosystems of the northern hemisphere: their effects on both recent and future forest development. *Biodiversity and Conservation* 22, 1863-1893

Fitzpatrick L.C., Goven A.J., Earle B., Rodríguez J., Briceno J., Venables B.J. 1987. Thermal acclimation, preference and effects in CO<sub>2</sub> in the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 87A, 1015-1016

Food and Agriculture Organization (FAO). 2017. <http://www.fao.org/faostat/en/#home> sitio visitado el 15 de mayo de 2018

Fourcy D., Jumel A., Heydorff M., Lagadic L. 2002. Esterases as biomarkers in *Nereis* (Hediste) *diversicolor* exposed to temephos and *Bacillus thuringiensis var. israelensis* used for mosquito control in coastal wetlands of Morbihan (Brittany, France). *Marine Environmental Research* 54, 755-759

García-Orenes F., Cerdà A., Mataix-Solera J., Guerrero C., Bodí M.B., Arcenegui V., Zornoza R., Sempere J.G. 2009. Effects of agricultural management on surface soil properties and soil-water losses in eastern Spain 106, 117-123

Gardner C.R. 1979. Octopamine and synephrine evoke a different response to other monoamines on the body wall of *Lumbricus terrestris*. *Neuropharmacology* 18, 435-439

Garreaud R. 2011. Cambio Climático: Bases físicas e impactos en Chile. *Revista Tierra Adentro* – INIA 93

Gavrilescu M. 2005. Fate of pesticides in the environment and its bioremediation. *Engineering in Life Sciences* 5(6), 497-526

Givaudan N., Binet F., Le Bot B., Wiegand C. 2014. Earthworm tolerance to residual agricultural pesticide contamination: Field and experimental assessment of detoxification capabilities. *Environmental Pollution* 192, 9-18

González G., Jean Lodge D., Richardson B.A., Richardson M.J. 2014. A canopy trimming experiment in Puerto Rico: The response of litter decomposition and nutrient release to canopy opening and debris deposition in a subtropical wet forest. *Forest Ecology and Management* 332, 32-46

Han Y., Zhu L., Wang J., Wang J., Xie H., Zhang S. 2014. Integrated assessment of oxidative stress and DNA damage in earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to azoxystrobin. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 107, 214-219

Hart A.D.M. 1993. Relationships between behavior and the inhibition of acetylcholinesterase in birds exposed to organophosphorus pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12 (2), 321-336

Heine O., Larink O. 1993. Food and cast analyses as a parameter of turn-over of materials by earthworms (*Lumbricus terrestris* L.). *Pedobiologia* 37, 245-256

Holmstrup M., Sørensen J.G., Overgaard J., Bayley M., Bindesbøl A., Slotsbo S., Fisker K.V., Maraldo K., Waagner D., Laboriau R., Asmund G. 2011. Body metal concentrations and glycogen reserves in earthworms (*Dendrobaena octaedra*) from contaminated and uncontaminated forest soil. *Environmental pollution* 159, 190-197

Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). 2013. Annex III: Glossary [Planton S. (ed.)]. In *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Stocker TF, D Qin, GK Plattner, M Tignor, SK Allen, J Boschung, A Nauels, Y Xia, V Bex, PM Midgley (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.

International Geosphere-Biosphere Programme (IGBP). Earth system definitions. <http://www.igbp.net/globalchange/earthsystemdefinitions.4.d8b4c3c12bf3be638a80001040.html> sitio visitado el 19 de diciembre de 2019

Jager T., Fleuren R.H., Hogendoorn E.A., de Korte G. 2003. Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta). *Environmental Science & Technology* 37, 3399-3404

Jiang Z.Y., Alison C.S., Wolff W., Wolff S.P. 1990. Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation. *Federation of European Biochemical Societies* 268, 69-71

Jordaan M.S., Reinecke S.A., Reinecke A.J. 2012. Acute and sublethal effects of sequential exposure to the pesticide azinphos-methyl on juvenile earthworms (*Eisenia andrei*). *Ecotoxicology* 21, 649-661

Jouni F., Sanchez-Hernandez J.C., Mazzia C., Jobin M., Capowiez Y., Rault M. 2018. Interspecific differences in biochemical and behavioral biomarkers in endogeic earthworms exposed to ethyl-parathion. *Chemosphere* 202, 85-93

Khan M.A.Q., Ahmed S.A., Salazar A., Gurumendi J., Khan A., Vargas M., von Catalin B. 2007. Effect of temperature on heavy metal toxicity to earthworm *Lumbricus terrestris* (Annelida: Oligochaeta). *Environmental Toxicology* 22, 487- 494

Kizilkaya R., Hepsen S. 2004. Effect of biosolid amendment on enzyme activities in earthworm (*Lumbricus terrestris*) casts. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 167, 202-208

Kattwinkel M., Kühne J., Foit K., Liess M. 2011. Climate change, agricultural insecticide exposure, and risk for freshwater communities. *Ecological Applications* 21, 2068-2081

Lehman J. 2015. Biochar for environmental management: an introduction, en: Lehman J., Stephen J. (Eds.), *Biochar for Environmental Management: Science, Technology and Implementation*, 2da edición, Routledge Taylor & Francis Group, London UK, pp. 1

Lehotay S.J. 2007. Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: collaborative study. *Journal of AOAC International* 90, 485-520

Lowe C.N., Butt K.R. 1999. Interspecific interactions between earthworms: a laboratory-based approach. *Pedobiologia* 43, 808-817



Lowe C.N., Butt K.R. 2005. Culture techniques for soil dwelling earthworms: A review. *Pedobiologia* 49, 401-413

Ma W., Bodt J. 1993. Differences in toxicity of the insecticide chlorpyrifos to six species of earthworms (*Oligochaeta*, *Lumbricidae*) in standardized soils tests. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 50, 864-870

Maity S., Roy S., Chaudhury S., Bhattacharya S. 2008. Antioxidant responses of the earthworm *Lampito mauritii* exposed to Pb and Zn contaminated soil. *Environmental Pollution* 151, 1-7

Maity S., Poráčová J., Dey P., Vašková J., Vaško L., Sedlák V., Blaščáková M. 2018. Antioxidant responses in the earthworm *Aporrectodea caliginosa* of eastern Slovakia: application of principal component analysis as a tool to identify metal contaminated areas. *Environmental Monitoring and Assessment* 190, 21

Martínez Morcillo S., Yela J.L., Capowiez Y., Mazzia C., Rault M., Sanchez-Hernandez J.C. 2013. Avoidance behaviour response and esterase inhibition in the earthworm, *Lumbricus terrestris*, after exposure to chlorpyrifos. *Ecotoxicology* 22, 597-607

Masson P., Lockridge O. 2010. Butyrylcholinesterase for protection from organophosphorus poisons: catalytic complexities and hysteretic behavior. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 494, 107-120

Maxwell D.M. 1992. The specificity of carboxylesterase protection against the toxicity of organophosphorus compounds. *Toxicology and Applied Pharmacology* 114, 306-312

Murty D., Kirschbaum M.U.F., McMurtrie R.E., McGilvray H. 2002. Does conversion of forest to agricultural land change soil carbon and nitrogen? A review of the literature. *Global Change Biology* 8, 105-123

Nannipieri P., Kandeler E., Ruggiero P. 2002. Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. *Enzymes in the Environment*. Marcel Dekker, New York, 1-33

Narváez C., Ríos J.M., Píriz G., Sanchez-Hernandez J.C., Sabat P. 2016. Subchronic exposure to chlorpyrifos affects energy expenditure and detoxification capacity in juvenile Japanese quails. *Chemosphere* 144, 775-784

National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA). Global Climate Change Indicators. <https://www.ncdc.noaa.gov/monitoring-references/faq/indicators.php> sitio visitado el 07 de abril de 2020.

Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. 1979. Assay for lipids peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 95, 351-358

Oogle S.M., Breidt F.J., Paustian K. 2005. Agricultural management impacts on soil organic carbon storage under moist and dry climatic conditions of temperate and tropical regions. *Biogeochemistry* 72, 87-121

Pagliai M., Vignozzi N., Pellegrini S. 2004. Soil structure and the effect of management practices. *Soil and Tillage Research* 79, 131-143

Papadimitriou E., Loumbourdis N.S. 2002. Exposure of the frog *Rana ridibunda* to copper: Impact on two biomarkers, lipid peroxidation, and glutathione. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 69, 885-891

Pereira J.L., Antunes S.C., Ferreira A.C., Gonçalves F., Pereira R. 2010. Avoidance behavior of earthworms under exposure to pesticides: Is it always chemosensorial? *Journal of Environmental Science and Health Part B* 45(3), 229-232

Phillipson J., Bolton P.J. 1976. The respiratory metabolism of selected lumbricidae. *Oecologia* 22, 135-152

Pimental D., Terhune E.C., Dyson-Hudson R., Rochereau S., Samis R., Smith E.A., Denman D., Reifschneider D., Shepard M. 1976. Land degradation: effects on food and energy resources. *Science* 194, 149-155

Pook C., Lewis C., Galloway T. 2009. The metabolic and fitness costs associated with metal resistance in *Nereis diversicolor*. *Marine Pollution Bulletin* 58, 1063-1071

Precht H., Laudien H., Havsteen B. 1973. II. The normal temperature range, en: Precht H., Christophersen J., Hensel H., Larcher W. (Eds.), *Temperature and Life*, Springer-Verlag, Berlin.

Principato G.B., Vittoria Ambrosini M., Menghini A., Giovannini E., Dell'Agata M. 1978. Multiple forms of acetylcholinesterase in *Allolobophora caliginosa*: purification and partial characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology* 61C, 147-151

Quintana J., Aceituno P. 2006. Trends and interdecadal variability of rainfall in Chile. *Proceedings of 8 ICSHMO, Foz do Iguacu, Brazil* 371-372

Racke K.D. 1993. Environmental fate of chlorpyrifos. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 131, 1-150

Rahman I., Kode A., Biswas S.K. 2007. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols* 1(6), 3159-3165

Ren Q., Zhang T., Li S., Ren Z., Yang M., Pan H., Xu S., Chon T-S. 2016. Integrative characterization of toxic response of Zebra Fish (*Danio rerio*) to deltamethrin based on AChE activity and behavior strength. *The Monitoring and Assessment of Aquatic Toxicology* <https://doi.org/10.1155/2016/7309184>

Reinecke S.A., Reinecke A.J. 2007. Biomarker response and biomass change of earthworms exposed to chlorpyrifos in microcosms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 66, 92-101

Rodriguez-Campos J., Dendooven L., Alvarez-Bernal D., Contreras-Ramos S.M. 2014. Potential of earthworms to accelerate removal of organic contaminants from soil: A review. *Applied Soil Ecology* 79, 10-25

Ruiz E., Alonso-Azcarate J., Rodriguez L. 2011. *Lumbricus terrestris* L. activity increases the availability of metals and their accumulation in maize and barley. *Environmental Pollution* 159, 722-728

Russel R.W., Overstreet D.H. 1987. Mechanisms underlying sensitivity to organophosphorus anticholinesterase compounds. *Progress in Neurobiology* 28, 45-52

Sabat P., Narváez C., Peña-Villalobos I., Contreras C., Maldonado K., Sanchez-Hernandez J.C., Newsome S.D., Nespolo R., Bozinovic F. 2017. Coping with Salt Water Habitats: Metabolic and Oxidative Responses to Salt Intake in the Rufous-Collared Sparrow. *Frontiers in Physiology* 8, 654

Saint-Denis M., Labrot F., Arnaud C., Thybaud E., Ribera D. 1999. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil: effects of benzo(a) pyrene. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 1837-1846

Sanchez J.C., Fossi M.C., Focardi S. 1997. Serum "B" esterases as a nondestructive biomarker for monitoring the exposure of reptiles to organophosphorus insecticides. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 37, 45-52

Sánchez-Brunete C., Albero B., Tadeo J.L. 2004. Multiresidue determination of pesticides in soil by gas chromatography-mass spectrometry detection. *Agrochemical and Food Chemistry* 52, 1445-1451

Sanchez-Hernandez J.C., Mazzia C., Capowiez Y., Rault M. 2009. Carboxylesterase activity in earthworm gut contents: potential (eco)toxicological implications. *Comparative Biochemistry and Physiology* 150C, 503-511

Sanchez-Hernandez J.C., Wheelock C.E. 2009. Tissue distribution, isozyme abundance and sensitivity to chlorpyrifos-oxon of carboxylesterases in the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Environmental Pollution* 157, 264-272

Sanchez-Hernandez J.C. 2011. Pesticide Biomarkers in Terrestrial Invertebrates, *Pesticides in the Modern World – Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment*, Dr. Margarita Stoytcheva (Ed.), ISBN: 978-953-307-457-3, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/pesticides-in-the-modern-world-pests-control-and-pesticides-exposure-and-toxicity-assessment/pesticide-biomakers-in-terrestrial-invertebrates>

Sanchez-Hernandez J.C., Aira M., Domínguez J. 2014a. Extracellular pesticide detoxification in the gastrointestinal tract of the earthworm *Aporrectodea caliginosa*. *Soil Biology & Biochemistry* 79, 1-4

Sanchez-Hernandez J.C., Narvaez C., Sabat P., Martínez-Morcillo S. 2014b. Integrated biomarker analysis of chlorpyrifos metabolism and toxicity in the earthworm *Aporrectodea caliginosa*. *Science of the Total Environment* 490, 445-455

Sanchez-Hernandez J.C., Martínez Morcillo S., Notario del Pino J., Ruiz P. 2014c. Earthworm activity increases pesticide-sensitive esterases in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 75, 186-196

Sanchez-Hernandez J.C., Notario del Pino J., Capowiez Y., Mazzia C., Rault M. 2018. Soil enzyme dynamics in chlorpyrifos-treated soils under the influence of earthworms. *Science of the Total Environment* 612, 1407-1416

Sanchez-Hernandez J.C., Ríos J.M., Attademo A.M., Malcevski A., Andrade Cares X. 2019. Assessing biochar impact on earthworms: Implications for soil quality promotion. *Journal of Hazardous Materials* 366, 582-591

Sandahl J.F., Baldwin D.H., Jenkins J.J., Scholz N.L. 2009. Comparative thresholds for acetylcholinesterase inhibition and behavioral impairment in coho salmon exposed to chlorpyrifos. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 136-145

Schaafsma A., Limay-Rios V., Baute T., Smith J., Xue Y. 2015. Neonicotinoid insecticide residues in surface waters and soil associated with commercial maize (corn) fields in southwestern Ontario. *PLoS ONE* 10(2):e0118139.

Schafer F.Q., Buettner G.R. 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulphide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine* 30, 1191-1212

Schwartz S.E. 2008. Uncertainty in climate sensitivity: Causes, consequences, challenges. *Energy and Environmental Science* 1, 430-453

Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). 2012. Informe de venta de plaguicidas de uso agrícola en Chile. Año 2012. División Protección Agrícola y Forestal, Subdepartamento de Viñas y Vinos, Inocuidad y Biotecnología, Sección Inocuidad.

Singh B.K., Walker A., Morgan J.A.W., Wright D.J. 2003. Effects of soil pH on the biodegradation of chlorpyrifos and isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* 69(9), 5198-5206

Sinha R.K., Bharambe G., Ryan D. 2008. Converting wasteland into wonderland by earthworms – A low-cost nature's technology for soil remediation: A case study of vermiremediation of PAHs contaminated soil. *The Environmentalist* 28, 466-475

Sismeiro-Vivas J., Abrantes N., Pereira J.L., Castro B.B., Gonçalves F. 2007. Short-term effects of Quirlan® (chlorfenvinphos) on the behavior and acetylcholinesterase activity of *Gambusia holbrooki*. *Environmental Toxicology* 22, 194-202

Six J., Feller C., Deneff K., Ogle S.M., Sa J.C.M., Albrecht A. 2002. Soil organic matter, biota and aggregation in temperate and tropical soils – effects of no-tillage. *Agronomie* 22, 755-775

Spurgeon D.J., Hopkin S.P. 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, 86-95



Stavi I., Bel G., Zaady E. 2006. Soil functions and ecosystems services in conventional, conservation, and integrated agricultural systems. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 36, 1-13

Thompson H.M. 1999. Esterases as markers of exposure to organophosphates and carbamates. *Ecotoxicology* 8, 369-384

Turner M.G., Baker W.L., Peterson C.J., Peet R.K. 1998. Factors influencing succession: Lessons from large, infrequent natural disturbances. *Ecosystems* 1, 511-523

United Nations (UN). 2015. Department of Economic and Social Affairs, Population Division. *World Population Prospects: The 2015 Revision, Key Findings and Advance Tables*. Working Paper No. ESA/P/WP.241. United Nations New York, 2015

Uvarov A.V. 1998. Respiration activity of *Dendrobaena octaedra* (Lumbricidae) under constant and diurnally fluctuating temperature regimes in laboratory microcosms. *European Journal of Soil Biology* 34(1), 1-10

van Groenigen J.W., van Groenigen K.J., Koopmans G.F., Stokkermans L., Vos H.M.J., Lubbers I.M. 2019. How fertile are earthworm casts? A meta-analysis. *Geoderma* 338, 525-535

Weiner J. 1992. Physiological limits to sustainable energy budgets in birds and mammals: ecological implications. *Trends in Ecology and Evolution* 7(11), 384-388

Wen B., Liu Y., Hu X.Y., Shan X.Q. 2006. Effect of earthworms (*Eisenia fetida*) on the fractionation and bioavailability of rare earth elements in nine Chinese soils. *Chemosphere* 63, 1179-1186

Wheelock C.E., Shan G., Ottea J. 2005. Overview of carboxylesterases and their role in the metabolism of insecticides. *Journal of Pest Science* 30, 75-83

Wheelock C.E., Phillips B.M., Anderson B.S., Miller J.L., Miller M.J., Hammock B.D. 2008. Applications of carboxylesterase activity in environmental monitoring and toxicity identification evaluation (TIEs). *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 195, 117-178

White D.H., Mitchell C.A., Hill E.F. 1983. Parathion alters incubation behavior of laughing gulls. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 31, 93-97

White P.S., Pickett S.T.A. 1985. Natural disturbance and patch dynamics: an introduction. En *The Ecology of Natural Disturbance and Patch Dynamics* (Pickett STA y White PS eds), pp 3-13, Academic Press

Wogram J., Sturm A., Segner H., Liess M. 2001. Effects of parathion on acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and carboxylesterase in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) following short-term exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20,1528-1531

World Health Organization (WHO). 1986. Organophosphorus insecticides: A general introduction. *Environmental Health Criteria* 63

Wu S., Wu E., Qiu L., Zhong W., Chen J. 2011. Effects of phenanthrene on the mortality, growth, and anti-oxidant system of earthworms (*Eisenia fetida*) under laboratory conditions. Chemosphere 83, 429-434

Xu Y., Gu X., Wang X., Sun C., Xu X, Sun J., Zhang B. 2009. The hydroxyl radical generation and oxidative stress for the earthworm *Eisenia fetida* exposed to tetrabromobisphenol A. Ecotoxicology 18, 693-699