



# Cambios histológicos y morfométricos en la lombriz de tierra inducidos por la exposición al explosivo TNT (2,4,6-trinitrotolueno)



Fuchs, Julio S.<sup>1,2</sup>; Formosa Lemoine, Florencia<sup>1</sup>; Castro, Gerardo D.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>UNIDEP-CONICET, Departamento de Investigaciones en Bioseguridad y Toxicología, Instituto de Investigaciones Científicas y Técnicas para la Defensa (CITEDEF), Juan B. de La Salle 4397, 1603 Villa Martelli, provincia de Buenos Aires, Argentina. <sup>2</sup>Escuela de Hábitat y Sostenibilidad, Universidad Nacional de General San Martín (UNSAM), Avenida 25 de Mayo y Francia, 1650 San Martín. E-mail: jfuchs@citedef.gob.ar

## INTRODUCCIÓN:

Los compuestos químicos explosivos se liberan al ambiente durante la fabricación, el manejo, el uso y la eliminación de municiones en sitios militares en todo el mundo. Las consecuencias para el ambiente y la salud humana derivan de la contaminación de aguas subterráneas y superficiales, suelos y sedimentos. En todo el mundo, los suelos están contaminados por dichos compuestos ya sea debido a operaciones de fabricación, actividades militares, conflictos de diferentes niveles, quema o detonaciones abiertas, vertido de municiones, etc. Los explosivos como el 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) y sus productos de descomposición suelen disponerse lentamente en muchas matrices ambientales, por lo que producen contaminación a largo plazo en los sitios donde fueron liberados. Las lombrices son organismos esenciales para el ecosistema suelo. Se encargan de preservar la textura y estructura del suelo mediante el incremento de la aeración y el drenaje por medio de la descomposición de materia orgánica. Estos anélidos se utilizan ampliamente como organismos para el monitoreo de sistemas terrestres, como indicadores sensibles de la calidad de suelos frente a un amplio espectro de xenobióticos y por ello decidimos ensayar el impacto tóxico del TNT en este organismo.

El objetivo de este trabajo fue evaluar cambios histológicos y morfométricos en la lombriz de tierra inducidos por la exposición al explosivo TNT (2,4,6-trinitrotolueno) por la vía de ingreso cutánea.

## MATERIALES Y METODOS:

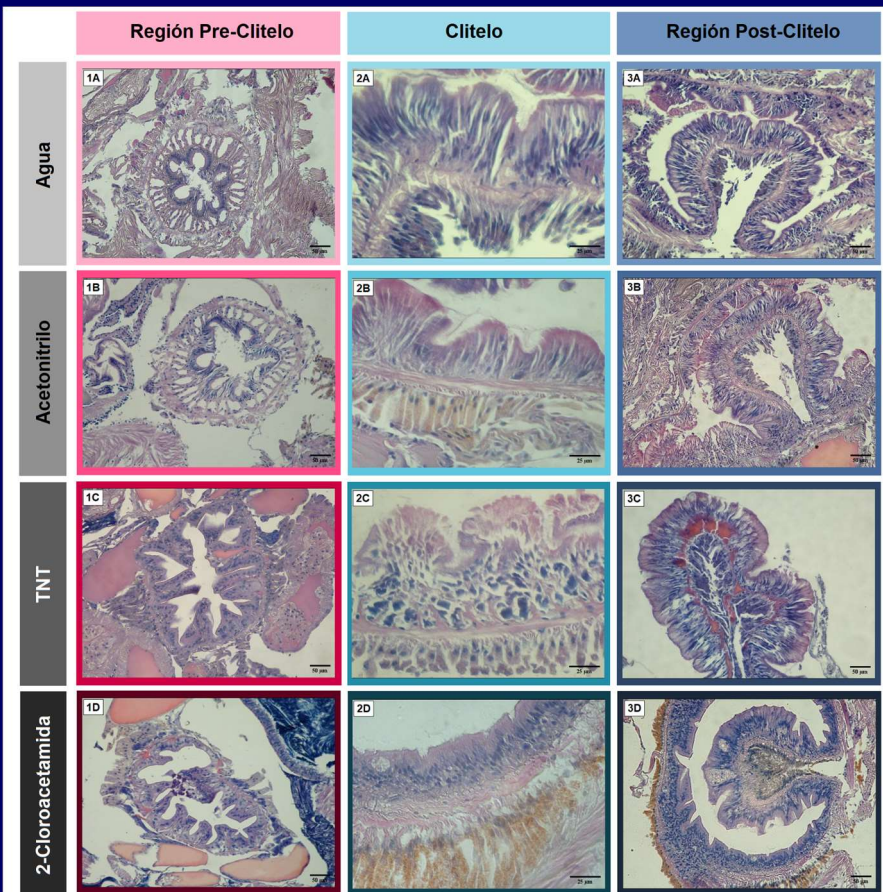
• Grupos de cinco (5) lombrices (*Eisenia foetida*) con pesos entre 300 y 500 mg fueron expuestas durante 72 horas a dos concentraciones subletales de TNT (1-2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ); al compuesto 2-cloroacetamida (1,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) como control positivo y a los correspondientes controles de acetonitrilo y agua, utilizando el método de ensayo de papel de filtro (OECD 207). Las lombrices se obtuvieron de la colonia de nuestro bioterio, iniciada a partir de ejemplares donados por la Dra. Cristina Zalazar y la Dra. Carolina Masin del Bioterio de Oligoquetos terrestres del INTEC-Universidad Nacional del Litoral.

• Como criterio de valoración subletal, se determinó el porcentaje (%) de pérdida del peso corporal de las lombrices, evaluando al inicio (Pi) y al final del experimento (Pf) el peso de cada animal, y su cambio se calculó como porcentaje respecto al peso inicial:  $100 \cdot (Pf - Pi)/Pi$ .

• Inmediatamente luego de la exposición, cada lombriz fue sacrificada para su disección y análisis histológico. Se obtuvieron muestras de la región pre-clitelo, clitelo y post-clitelo. Las secciones se cortaron transversalmente y se fijaron por 24 horas en formol buffer (10%). Posteriormente se procesaron, se infiltraron en parafina, se cortaron y se tñieron con coloración hematoxilina-eosina. Adicionalmente, solo a cortes de la zona del clitelo se les realizó el método de tinción tricrómico de Masson. Esta tinción permite resaltar las estructuras del tejido conjuntivo, destacando las fibras colágenas en el estroma celular, la cutícula y células glandulares productoras de mucus en la epidermis, en comparación con las fibras musculares de las capas musculares circular y longitudinal.

## RESULTADOS:

Cortes de diferentes regiones utilizando tinción hematoxilina-eosina



Características histológicas de región Pre-Clitelo (1), Clitelo (2) y Post Clitelo (3).

- Corte transversal de la primera sección del tubo digestivo en lombrices controles con agua (1A) y acetonitrilo (1B), de aspecto normal.
- Cambios histopatológicos de la primera sección del tubo digestivo en lombrices tratadas con TNT (2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) (1C) y con 2-cloroacetamida (1,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) (1D). Se observa tejido levemente inflamado (1C) y presencia de plasmocitos en luz del tubo (1D). (Hematoxilina-Eosina 200X).
- Corte transversal de la zona Clitelo de la lombriz de tierra, aspecto normal del epitelio intestinal, membrana basal y tejido cloragógeno en lombrices controles (2A-2B).
- Cambios histopatológicos con núcleos celulares alterados, vellosidades que exhiben hiperplasia e inflamación (2C) y vellosidades fusionadas, leve inflamación y tejido cloragógeno alterado (2D). Hematoxilina-Eosina 600X.
- Corte transversal de la zona Post-Clitelo, aspecto normal del tifloso, epitelio intestinal y tejido cloragógeno en lombrices controles (3A-3B).
- Cambios histopatológicos en lombrices tratadas, arquitectura alterada en epitelio e inflamación leve (3C); vellosidades fusionadas e infiltrado inflamatorio en tejido conectivo de la membrana basal (3D). Hematoxilina-Eosina 200X.

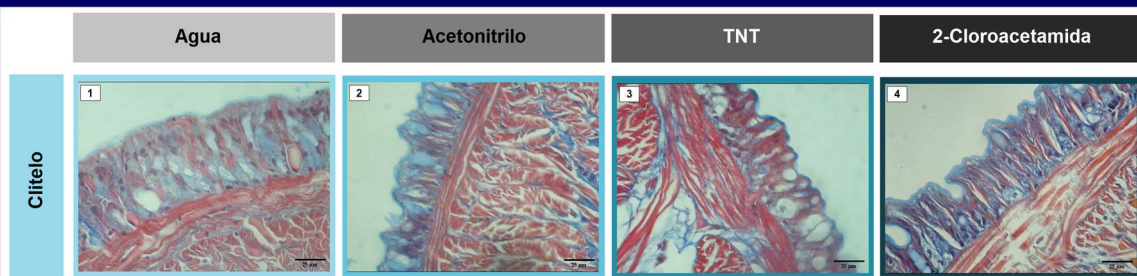
	% de pérdida de peso corporal
Control Acetonitrilo	-7,71 $\pm$ 7,92
TNT 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	-15,60 $\pm$ 6,38 <sup>a,b</sup>
TNT 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	-26,94 $\pm$ 2,21 <sup>c</sup>
Control Agua	-9,99 $\pm$ 5,70
2-Cloroacetamida	-17,00 $\pm$ 4,86 <sup>d</sup>

- a.  $p > 0,05$  comparado con "Control Acetonitrilo".
- b.  $p < 0,05$  comparado con "TNT 2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ " (\*).
- c.  $p < 0,001$  comparado con "Control Acetonitrilo" (\*\*\*).
- d.  $p > 0,05$  comparado con "Control Agua".

## CONCLUSIONES:

- ✓ La exposición a la concentración más alta de TNT ensayada (2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) llevó a una pérdida significativa en el peso de los ejemplares.
- ✓ La exposición a TNT (1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  y 2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) reveló daños histológicos con un significativo efecto tanto en el epitelio simple, como en las células glandulares de la epidermis y la alteración del epitelio intestinal, mostrando procesos inflamatorios, hiperplasia, alteración en núcleos celulares y arquitectura alterada de las vellosidades, lo que conduciría a la reducción del área efectiva para la absorción de nutrientes.
- ✓ La tinción con Tricrómico de Masson permitió revelar daños en la epidermis, diferenciando claramente de las capas musculares externa e interna.
- ✓ La exposición a 2-cloroacetamida (1,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) también mostró efectos histopatológicos significativos en ambos tejidos. En la epidermis se observó la alteración del epitelio simple, mientras que en el intestino se observaron vellosidades fusionadas, inflamación con infiltración de tejido y alteración del tejido cloragógeno.
- ✓ Estas alteraciones producidas por la exposición al explosivo son coherentes con un mecanismo de estrés celular provocado por la actividad oxidante del mismo TNT o de sus metabolitos, frente a la capacidad limitada de defensa de un organismo simple como la lombriz de tierra. Estudios en curso tratarán de establecer la correlación del daño con cambios bioquímicos que se consideran críticos para la viabilidad celular.

Cortes de la región clitelar utilizando tinción tricrómico de Masson



- 1 y 2: Características histológicas de la epidermis de la zona del clitelo de lombriz de tierra, aspecto normal del tejido epidérmico de lombrices controles.
- 3: Cambios histopatológicos en lombrices tratadas con TNT (2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), se observa epidermis alterada que exhibe distorsión de la arquitectura glandular e hiperplasia.
- 4: Cambios histopatológicos en lombrices tratadas con 2-cloroacetamida (1,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), exhibiendo hiperplasia leve, núcleos celulares y arquitectura glandular parcialmente preservados. Tricrómico de Masson 600 X.