

## 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 un trabajo anterior de nuestro laboratorio estudiamos las alteraciones histológicas producidas en lombrices de tierra (*Eisenia foetida*) por exposición al explosivo TNT. Estos análisis se utilizan como organismos para el monitoreo de sistemas terrestres y como indicadores sensibles de la calidad de los suelos frente a un espectro variado de xenobióticos. El explosivo RDX (1,3,5-trinitro-1,3,5-triazaciclohexano) es un compuesto de la familia de las ciclonitraminas, con un uso amplio en nuestro país en actividades relacionadas con la defensa y la minería. Sus propiedades fisicoquímicas difieren marcadamente de las del TNT y esto supone también diferencias importantes en su destino ambiental y, por supuesto, en su toxicocinética y acción tóxica.

El objetivo de este trabajo fue evaluar cambios histológicos y morfométricos en la lombriz de tierra inducidos por la exposición al explosivo RDX por la vía de ingreso cutánea.

## MATERIALES Y METODOS:

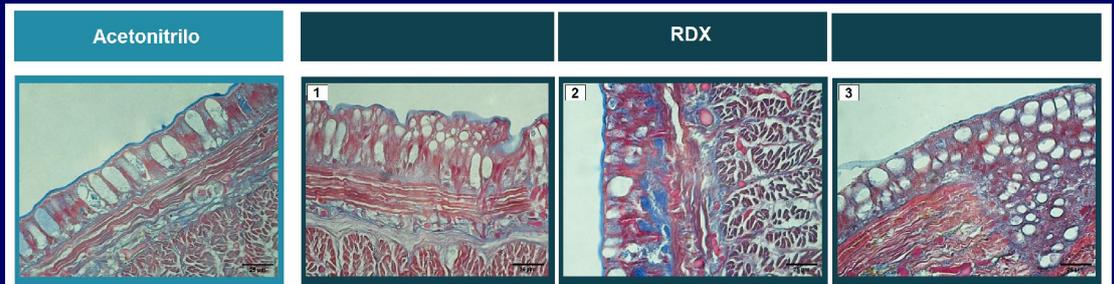
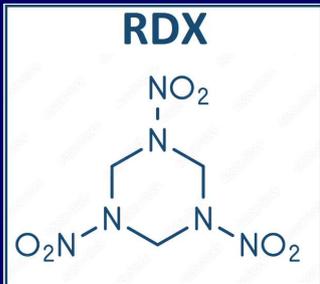
• Grupos de ocho (8) lombrices (*Eisenia foetida*) con pesos entre 300 y 500 mg fueron expuestas durante 72 horas a cuatro concentraciones subletales de RDX (de 2, 4, 8 y 16  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) y al correspondiente control (acetónitrilo), utilizando el método de ensayo de papel de filtro (OECD 207). Las lombrices se obtuvieron de la colonia de nuestro bioterio, iniciada a partir de ejemplares donados por el 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 ( $P_i$ ) y al final del experimento ( $P_f$ ) el peso de cada animal, y su cambio se calculó como porcentaje respecto al peso inicial:  $100 * (P_f - P_i)/P_i$ .

• 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 tiñeron con coloración de hematoxilina-eosina. Adicionalmente, se realizó el método de tinción con 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 la capas musculares circular y longitudinal.

## RESULTADOS:

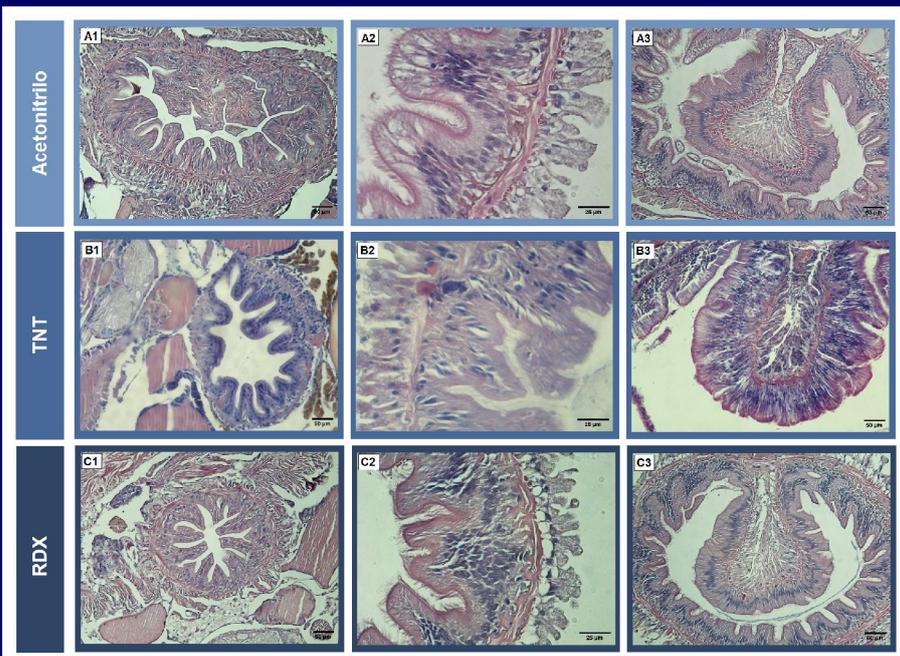
### Cortes de la pared corporal utilizando tinción con tricrómico de Masson



Acetonitrilo: Características histológicas de la pared corporal de la lombriz de tierra, aspecto normal del tejido epidérmico y capas musculares. (600x).

RDX: Cambios histopatológicos en lombrices de tierra tratadas con RDX (8  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). 1. Se observa erosión y leve proliferación celular en el tejido epitelial. 2. Aumento de secreción mucosa y agrandamiento de células glandulares. 3. Desprendimiento de la cutícula, proliferación, agrandamiento e infiltración celular. (600x).

### Cortes de diferentes regiones utilizando tinción hematoxilina-eosina



Alteraciones histológicas en la lombriz de tierra (*Eisenia foetida*) por exposición externa (método de ensayo de papel de filtro OECD 207) a TNT o RDX. Los daños observados son coherentes con una mayor liposolubilidad del TNT, que favorece la absorción y distribución del compuesto hasta zonas más internas del organismo (ej. tubo digestivo).

A. Control. 1. Corte transversal de la primera sección del tubo digestivo: aspecto normal (Hematoxilina-eosina 200X). 2. Corte transversal de la zona clitelar: aspecto normal del epitelio intestinal, la membrana basal y el tejido cloragógeno (600X). 3. Corte transversal de la zona post-clitelo: aspecto normal del tifoso, epitelio intestinal y tejido cloragógeno. (200X).

B. TNT (1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). 1. Corte transversal de la primera sección del tubo digestivo: Se observa tejido levemente inflamado (200X). 2. Corte transversal de la zona clitelar: Se observan cuerpos de Russell, inflamación y lisis celular en tejido cloragógeno (600X). 3. Corte transversal de la zona post-clitelo: Cambios histopatológicos en lombrices tratadas, se observa congestión e inflamación (200X).

C. RDX (8  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). 1. Corte transversal de la primera sección del tubo digestivo: Tejido epitelial conservado con presencia de células inflamatorias (200X). 2. Corte transversal de la zona clitelar: Hiperplasia de enterocitos, tejido cloragógeno con edema y lisis celular leve (600X). 3. Corte transversal de la zona post-clitelo: Arquitectura conservada con inflamación leve (200X).

## CONCLUSIONES:

Se observaron alteraciones estructurales significativas en distintos tejidos y zonas anatómicas de la lombriz de tierra *Eisenia foetida*, en todas las concentraciones ensayadas. Las principales alteraciones se detectaron en la pared corporal (epidermis), como proliferación y agrandamiento de células glandulares, desprendimiento de cutícula, erosión y pérdida del epitelio glandular y alteraciones en la arquitectura de las capas musculares (más intensas para 8 y 16  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). No se observaron cambios relevantes en las vellosidades y el tejido cloragógeno del intestino.

En general, los resultados de este estudio sugieren que el RDX tiene un impacto menos severo en la lombriz de tierra en comparación con lo observado con el TNT. El RDX provocó una mayor proliferación celular glandular infiltrante, pero menor respuesta inflamatoria, vacuolización, pérdida del epitelio glandular en la pared corporal, menor daño en el tejido intestinal y cloragógeno respecto al TNT.

No se observó la pérdida de peso corporal en los ensayos realizados, a diferencia de lo ocurrido con el TNT anteriormente.

Estas alteraciones producidas por la exposición a este explosivo son consistentes con el mecanismo de estrés celular provocado por la actividad oxidante del RDX o reactividad de sus metabolitos. Además, el RDX difiere marcadamente del TNT en su liposolubilidad y reactividad química. Frente a la capacidad limitada de defensa de un organismo como la lombriz de tierra, estudios en curso tratarán de establecer la correlación del daño con cambios bioquímicos y la presencia de metabolitos reactivos críticos en relación con la viabilidad celular.