

## **PRODUCCIÓN DE CELOMOCITOS DE *Eisenia fetida* EN CULTIVOS DE LABORATORIO PARA ESTUDIOS DE GENOTOXICIDAD**

Curieses S<sup>1,2</sup>, Sáenz ME<sup>1,2</sup>, Di Marzio WD<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Programa de Investigación en Ecotoxicología, Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Luján, [www.priet.unlu.edu.ar](http://www.priet.unlu.edu.ar)

<sup>2</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas CONICET

\* autor para correspondencia: [dimarzio@speedy.com.ar](mailto:dimarzio@speedy.com.ar); [ecotoxicologia@mail.unlu.edu.ar](mailto:ecotoxicologia@mail.unlu.edu.ar)

### **RESUMEN**

Las lombrices de tierra son utilizadas como organismos de prueba en evaluaciones de la contaminación ambiental. Se emplean en estudios de toxicidad aguda y crónica determinando como variables de respuesta mortalidad, crecimiento y reproducción. Asimismo el grupo ofrece la posibilidad de realizar evaluaciones sobre biomarcadores de estrés oxidativo y genotoxicidad. En el último caso se utilizan células aisladas por extrusión del líquido celomático denominadas celomocitos. Dentro de ellos existen tres grupos principales con funciones diferenciadas: eleocitos, amebocitos y granulocitos. Las proporciones relativas de estos tipos celulares en el organismo están relacionadas con el estado nutricional y fisiológico. El cultivo de estos animales en el laboratorio es relativamente sencillo y constituye un medio para obtener células de un modo no-invasivo o destructivo. En este trabajo presentamos un conjunto de índices que nos permitan reconocer el estado trófico de los individuos antes de su utilización en estudios ecotoxicológicos.

**PALABRAS CLAVE:** celomocitos, oligoquetos, ecotoxicidad, suelos, lodos industriales

### **INTRODUCCIÓN**

La evaluación de riesgo ecotoxicológico en ambientes contaminados no puede basarse únicamente en el análisis químico de los polucionantes presentes. Este enfoque puede resultar incompleto, ya que no brinda información del efecto letal o subletal que ejercen las sustancias tóxicas presentes sobre los organismos. Dentro de los efectos subletales de nuestro interés, están aquellos que se manifiestan a partir del daño sobre la estructura del material genético producido por sustancias genotóxicas.

En este sentido es importante el desarrollo de herramientas a nivel molecular o celular que sirvan de indicadores de la exposición y del efecto de contaminantes, comúnmente llamados, biomarcadores sobre los organismos naturales. Un biomarcador es una variación medible, a nivel bioquímico, celular, fisiológico o de comportamiento, que se puede evaluar en un tejido, en un fluido corporal o en el organismo entero y que provee una evidencia de la exposición y/o el efecto tóxico de uno o más polucionantes químicos (Calisi et al, 2009).

Las lombrices de tierra son organismos que habitan el suelo y constituyen aproximadamente el 60-80% de la biomasa del mismo (Li *et al.* 2009). Son especies muy importantes en la ecología del

suelo, ya que participan en la regulación de la descomposición y en los procesos de ciclado de nutrientes, afectando la estructura, fecundidad y productividad del suelo. Al estar íntimamente ligados al suelo estos organismos pueden ser utilizados en estudios de toxicidad, ya que pueden ser afectados por la acumulación de ciertas sustancias, como por ejemplo metales, (Rocco *et al.* 2011, Maleri *et al.* 2008) y a otras sustancias tales como pesticidas o mezclas complejas. Una ventaja adicional que presentan es que se pueden criar en el laboratorio. *Eisenia fetida* es una especie utilizada en este tipo de evaluaciones ecotoxicológicas y está recomendada en protocolos internacionales OECD (1984, 2004), ISO (1993), US EPA (1996) como organismo de prueba.

Por otro lado, el fluido celómico de las lombrices, tiene un papel análogo a la sangre, ya que es responsable de la distribución del polucionante hacia los tejidos. Además este fluido actúa como comunicación entre el interior y el ambiente que rodea al animal, por lo que pueden evaluarse diferentes biomarcadores. Los celomocitos son las células presentes en este fluido, se trata de un grupo morfológicamente diverso y funcionalmente versátil de células, en el cual su composición relativa puede variar según la estación del año, las condiciones de vida, y la condición general del animal (Adamiwicz 2005). Es difícil establecer un criterio de clasificación para estos tipos celulares, debido no sólo a los diferentes tipos que pueden encontrarse entre animales de diferentes especies, sino también a la presencia de distintos estadios de maduración de las células. Sin embargo, una clasificación basada en las propiedades citomorfométricas, ultraestructurales e histoquímicas permite distinguir tres tipos celulares principales: Eleocitos (células cloragógenas), amebocitos hialinos y amebocitos granulares o granulocitos (Adamowicz 2005).

Los eleocitos se originan a partir del tejido cloragógeno que rodea al intestino y esta presente en muchas especies de oligoquetos. Estas células son responsables de mantener constante el pH y el balance iónico. Se encargan de sintetizar pigmentos respiratorios y son capaces de almacenar sustancias endógenas, tales como glucógeno y lípidos, y sustancias exógenas tales como pigmentos o metales. Los eleocitos juegan un papel importante en los procesos inmunológicos de las lombrices, ya que producen sustancias bactericidas, y participan de reacciones tales como la encapsulación y la formación de cuerpos marrones (Adamowicz y Wojtaszek 2001). Los eleocitos presentan como característica principal la presencia de los cloragosomas, los cuales poseen una membrana frágil y propensa a romperse liberando su contenido.

Los amebocitos hialinos, participan en el transporte y almacenamiento de sustancias nutritivas, la coagulación del fluido celómico y la curación de heridas, participan además en reacciones inmunitarias, tanto en la defensa humoral como celular, la fagocitosis, la encapsulación y la nodulación. Generalmente son pequeños, con un núcleo central o periféricamente ubicado, que puede tener diferentes formas, ya sea oval o arriñonado. Su citoplasma posee pocos gránulos basófilos, y se caracterizan sobre todo, por su capacidad de formar pseudópodos. Algunos autores utilizan el tipo de pseudópodos formados para realizar una clasificación entre amebocitos tipo I y tipo II (Adamowicz y Wojtaszek 2001). Los granulocitos, en general, constituyen la menor población de los tres tipos celulares, son muy pequeños y su pequeño núcleo se encuentra periféricamente ubicado. Se caracterizan por la presencia de gránulos acidófilos ubicados en el citoplasma. Debido a sus características distintivas cada grupo celular podría comportarse de manera diferente ante un mismo biomarcador por lo que algunos autores han caracterizado estas respuestas diferenciales (Di Marzio *et al.* 2005).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se utilizaron organismos comprados en un comercio local (Troli Lombricultura, Exaltación de la Cruz). Al llegar al laboratorio los organismos fueron lavados con solución salina (CINa 0.9 %) para remover los restos de tierra original, se determinó el peso inicial y fueron colocados en recipientes de plástico para su cultivo. Se utilizó un suelo control extraído de la reserva ecológica del campo experimental de la Universidad Nacional de Luján caracterizado por Di Marzio *et al.* (2007). Las

características físico-químicas del mismo se describen en la Tabla 1. Fue secado a 105 °C por 48 hs, molido con un molinillo industrial y tamizado a 1000 µm e hidratado al 75% de su capacidad de retención de agua. Posteriormente se agregó 10%, respecto al peso seco, de forraje base alfalfa previamente triturado. Se homogeneizó y se dejó reposar durante diez días. Se colocaron 2000 individuos en 12 kg de suelo, tres juveniles por cada adulto con clítelo. Las condiciones de cultivo se mantuvieron constantes, pH 6.6, humedad: 60% y temperatura: 22 °C.

Se realizaron extrusiones en el tiempo inicial, para caracterizar la proporción de celomocitos de los organismos a su llegada al laboratorio, a los 30, 60 y 90 días. Para la recolección de celomocitos se siguió el método no invasivo de Eyambe *et al.* (1991) con la modificación introducida por Di Marzio *et al.* (2005). En el medio de extrusión el método original utilizaba un agente mucolítico, el cual no es necesario debido a la baja concentración de mucus producida por *E. fetida*.

Tabla 1. Características fisicoquímicas del suelo utilizado en los cultivos de *Eisenia fetida*.

	Promedio	Desvío estándar
pH	6.6	0.26
Carbono Orgánico (g/kg)	19.3	4.80
P disponible (mg/kg)	26.8	8.24
Nitrógeno total (g/kg)	1.7	0.42
Contenido de arcilla (%)	28.5	4.93
Contenido de limo (%)	48.5	8.25
Contenido de arena (%)	23.0	4.09
Capacidad de intercambio de cationes (cm <sup>3</sup> /kg)	30.3	5.37

El medio de extrusión consiste en etanol 5% en solución salina (CINa 0.9%) y 2.5 mg/mL de EDTA. 24 hs antes de la extrusión se colocan 5 organismos clitelados, previamente pesados, en una cápsula de Petri con papel de filtro para depurar su contenido intestinal. En el momento de la extrusión los animales fueron nuevamente pesados y se colocaron en un tubo de ensayo con 2 mL de solución de extrusión por animal y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 minutos. Los animales fueron nuevamente colocados en suelo y los celomocitos obtenidos fueron lavados dos veces con PBS, y centrifugados a 300 g y temperatura ambiente. La viabilidad se determinó con Azul de tripano 0.4%.

Se determinó el índice trófico absoluto como:

Lombrices índice trófico absoluto (LITA)

$$LITA = \frac{N^{\circ}Eleocitos}{N^{\circ}Celomocitos}$$

Y el índice trófico relativo como:

Lombrices índice trófico relativo (LITAR):

$$LITAR = \frac{N^{\circ}Eleocitos}{N^{\circ}Celomocitos * phsh}$$

Además el índice corporal de celomocitos totales (ICCT) como:

$$ICCT = \text{Log} \frac{N^{\circ}Celomocitos}{phsh}$$

Donde *phsh* es el peso húmedo sin heces y expresado en gramos.

El conteo de células se realizó en una cámara de Neubauer con un volumen de  $6.4 \times 10^{-5}$  mL. Se realizaron 3 conteos dobles independientes en cada extrusión, calculando el promedio de las medias de cada conteo para obtener el número de células por mL. Se obtuvo el número de células totales y para cada tipo celular. Se utilizó un microscopio Nikon modelo Eclipse 600 provisto de cámara de video CCD y programa de análisis de imágenes Image-Pro Plus V4.0 (Media Cybernetics, Maryland, EUA).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los tres tipos principales de celomocitos estudiados pueden verse en la Figura 1.

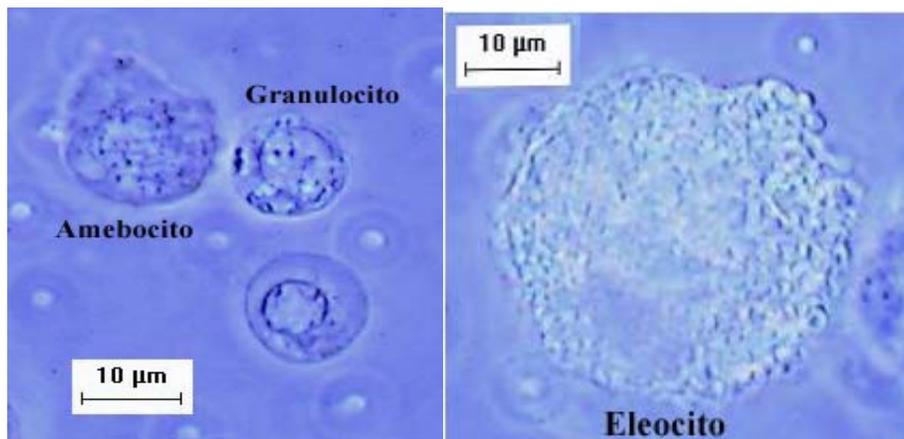


Figura 1. Fotomicrografías de los tres tipos celulares de celomocitos presentes en *Eisenia fetida*. MCx1000 cf.

El peso promedio de los organismos clitelados al arribar al laboratorio fue de  $0.3539 \pm 0.019$  g, aumentando más del 50% a los 30 días de cultivo (Tabla 2). La proporción de celomocitos cambió en el tiempo de cultivo como se muestra en la Figura 2, observándose un aumento en la cantidad de eleocitos y un detrimento en la cantidad de amebocitos, conforme transcurre el tiempo en el cultivo. La viabilidad de los celomocitos fue mayor al 90 % en todas las extrusiones realizadas.

Existen otros métodos para la obtención de celomocitos de las lombrices de tierra. Entre estos pueden citarse la punción intracelómica, en la cual se introduce una pipeta Pasteur en el celoma de un segmento posterior al clitelo (Stein *et al.* 1982). Permite la obtención de un buen número de células pero puede causar la muerte del animal. Otros métodos utilizan la estimulación eléctrica o ultrasonido para estimular la extrusión de las células. En nuestro caso, se prefiere la extrusión mediante el uso de etanol como agente irritante, ya que es sencillo y permite obtener un número de células adecuado para las evaluaciones posteriores, no reduce la viabilidad de las mismas y las lombrices se recuperan totalmente al cabo de 15 días post-extrusión.

En las Figuras 2 y 3 se representa la proporción de las diferentes clases de celomocitos: amebocitos, eleocitos y granulocitos en diferentes tiempos de cultivo y en relación al peso de los individuos.

Tabla 2. Peso de los organismos con clíelo y cantidad de celomocitos por individuo. En ambos casos se indica promedio y desvío estándar.

	Inicial	30 días	60 días	90 días
Peso (g) individuos con clíelo con heces	0.3539 ± 0.019	0.5705 ± 0.020	0.5491 ± 0.068	0.4638 ± 0.042
CV %	5.5	3.5	12.4	9
Peso (g) individuos con clíelo sin heces	0.2391 ± 0.028	0.3136 ± 0.034	0.2812 ± 0.038	0.3187 ± 0.070
CV%	11.7	10.8	13.5	22
Nº celomocitos/mL	$2.83 \times 10^5$ ± $4.22 \times 10^4$	$4.83 \times 10^5$ ± $2.48 \times 10^4$	$6.50 \times 10^5$ ± $6.96 \times 10^4$	$5.34 \times 10^5$ ± $6.28 \times 10^4$
CV %	14.9	5.1	10.7	12

Puede notarse el cambio en la proporción de los eleocitos desde su arribo al laboratorio hasta al menos 90 días en las condiciones de cultivo descritas. En este caso la proporción de los mismos aumenta en relación al peso promedio el cual se estabilizó a partir de los 30 días. Resulta adecuado contar con un indicador del estado trófico relativo de los individuos a ser utilizados en estudios posteriores de genotoxicidad o actividad enzimática, entre otros. En este sentido los valores obtenidos LITA, LITAR y ICCT (Tabla 3) resultaron ser sensibles a los cambios del medio de cultivo empleado y permiten definir un tiempo de adaptación y estabilización de las poblaciones de células en el líquido celómico superior a 30 días. Por otro lado el LITAR superior a 1.85 puede tomarse como un valor de referencia del estado trófico de los animales a utilizar independientemente del tiempo de cultivo.

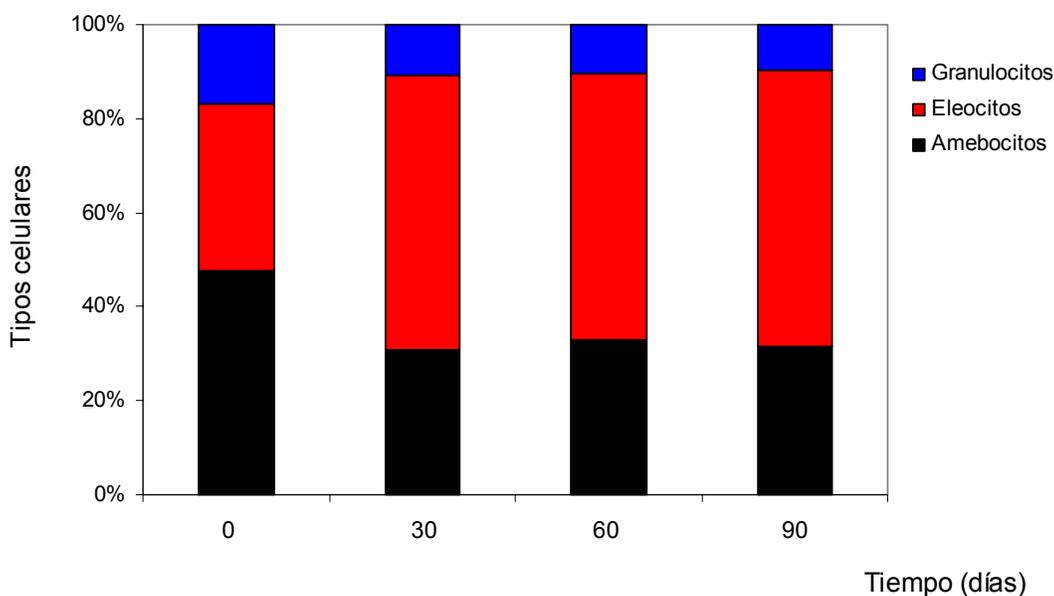


Figura 2. Proporción de las diferentes clases de celomocitos: amebocitos, eleocitos y granulocitos en diferentes tiempos de cultivo.

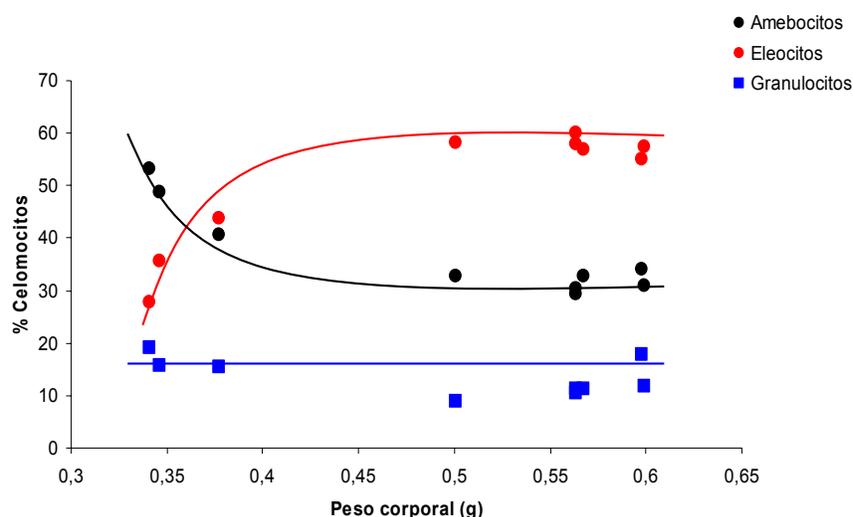


Figura 3. Proporción de las diferentes clases de celomocitos: amebocitos, eleocitos y granulocitos en relación al peso húmedo.

Las proporciones de los diferentes tipos de celomocitos pueden variar según la especie y la estación del año en la cual se realice la obtención de células (Kurek *et al.* 2002).

Tabla 3. Valores de los índices obtenidos en diferentes tiempos de cultivo.

Días	0	30	60	90
LITA	0.36	0.58	0.57	0.59
LITAR	1.49	1.85	2.01	1.85
ICCT	6.07	6.19	6.36	6.22

Dentro de una misma especie, esta proporción puede verse afectada por la edad de los organismos y su nutrición (Di Marzio *et al.* 2005), la temperatura a la cual se encuentra, y la presencia de contaminantes, tales como metales que puedan afectar el balance entre los celomocitos y las bacterias que habitan el líquido celómico (Olchawa *et al.* 2006). Si bien los tres tipos de celomocitos presentan una actividad asociada al sistema inmune, los Eleocitos son funcionalmente semejantes a los hepatocitos de vertebrados, estos participan en el metabolismo y almacenamiento de glucógeno y lípidos, en la excreción y en el transporte de nutrientes mediante el fluido celómico entre diferentes células y tejidos (Olchawa *et al.* 2006). Así una proporción elevada de eleocitos sobre los amebocitos y los granulocitos en el líquido celómico reflejaría un buen estado nutricional de los organismos, permitiendo su uso para evaluaciones posteriores. El aumento del índice trófico de los animales en cultivo revela que este resulta adecuado para la obtención de organismos fisiológicamente sanos que pueden ser utilizados para evaluaciones ecotoxicológicas. Los celomocitos han demostrado ser sensibles a evaluaciones in vivo de suelos de áreas polucionadas, tales como hornos de coque (Salagovic *et al.* 1995), suelos regados con aguas residuales (Quiao *et*

al. 2007), suelos agrícolas que reciben la aplicación de pesticidas (Reinecke y Reinecke 2007), suelos con presencia de PHA (Di Marzio *et al.* 2005). Asimismo han resultado útiles a la hora de evaluar suelos con la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Cl<sub>2</sub>Cd (Maleri *et al.* 2008) y otros metales o compuestos (Calisi *et al.* 2009). Además la utilización de linfocitos de sangre periférica y de células con funciones análogas en los diferentes grupos de invertebrados y vertebrados, resultan ser sensibles a la presencia de xenobióticos. Se han utilizado células sanguíneas de renacuajos para evaluar la acción genotóxica de compuestos organofosforados (Yin *et al.* 2009). También se utilizaron ejemplares del género *Corbicula* sp para evaluar el agua del Río Paraná, demostrando ser sensibles a la presencia de tóxicos comparando su respuesta con el uso de células en cultivo (Caffetti *et al.* 2008). Asimismo muchos poliquetos se utilizan para la evaluación genotóxica de muestras marinas posiblemente contaminadas con PAHs, mostrando diferente sensibilidad (Lewis y Gallogay 2008).

Por lo tanto la optimización de técnicas de cultivo en el laboratorio que permitan obtener organismos en un buen estado de salud, es una herramienta útil a la hora de utilizar a las lombrices de tierra para determinar el potencial genotóxico de muestras ambientales.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Adamowicz A, 2005. Morphology and ultrastructure of the earthworm *Dendrobaena veneta* (Lumbricidae) coelomocytes. *Tissue and Cell* 37: 125-133

Adamowicz A, Wojtaszek J, 2001. Morphology and phagocytotic activity of coelomocytes in *Dendrobaena veneta* (Lumbricidae). *Zoologica Polonidae* 46(1-4):91-104

Calisi A, Lionetto MG, Schettino T, 2009. Pollutant- induces alterations of granulocyte morphology in the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72 :1369-1377

Caffetti J, Mantovani MS, Pastori MC, Fenocchio AS, 2008. First genotoxicity study of Parana river water from Argentina using cells from the clam *Corbicula fluminea* (Veneroida Corbiculidae) and Chinese hamster (*Cricetulus griseus*, Rodentia, Cricetidae) K1 cells in the comet assay. 2008. *And. Molec. Biol.* 31, 2, 561-565

Di Marzio W, Saenz, ME, Lemiere S, Vasseur P, 2005. Improved Single-Cell Electrophoresis Assay for detecting DNA damage in *Eisenia foetida*. *Env. And Molec. Mutagenesis* 46: 246-252

Di Marzio W, Saenz ME, Montivero C, Alberdi JL, Tortorelli M, Ambrini G, 2007 Genotoxicity of aqueous elutions of industrial soils. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 79: 483-487

Eyambe G, Goven A, Fitzpatrick L, Venables B, Cooper E, 1991. E. A non-invasive technique for sequential collectio of earthworm (*Lumbricus terrestris*) leukocytes during subchronic immunotoxicity studies. *Laboratory animals* 25: 61-67.

ISO, 1993. International Organization for Standardization, Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate, No.11268-1. ISO, Geneve.

Kurek A, Plytycz B, 2003. Annual changes in coelomocytes of four earthworm species. In the 7<sup>th</sup> international symposium on earthworm ecology- Cardiff- Wales 2002- *Pedobiología* 47, 689-701.

Lewis C, Galloway T, 2008. Genotoxic damage in polychaetes: A study of species and cell-type sensitivities. *Mut. Res.* 654: 69-75.

Li M, Liu Z, Xu Y, Cui Y, Li D, Kong Z, 2009. Comparative effects of Cd and Pb on biochemical response and DNA damage in the earthworm *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta). *Chemosphere* 74: 621-625.

Maleri R, Fourie F, Reinecke A, Reinecke S, 2008. Photometric application of the MTT – and NRR assays as biomarkers for the evaluation of cytotoxicity ex vivo in *Eisenia andrei*. *Soil biology & Biochemistry* 40: 1040-1048

OECD, 1984. Organization for economic Cooperation and Development, Guideline for the Testing of Chemical No. 207. Earthworm Acute Toxicity Test.

OECD, 2004. Organization for economic Cooperation and Development, Guideline for the Testing of Chemical No. 222. Earthworm Reproduction Test.

Olchawa E, Bzowska M, Stürzenbaum, S Morgan A, Plytycz B, 2006. Heavy metals affect the coelomocyte-bacteria balance in earthworms: Environmental interactions between abiotic and biotic stressors. *Environ. Poll.* 142: 373-381.

US EPA, 1996. Ecological Effects Test Guidelines OPPTS 850.6200 Earthworm Subchronic Toxicity Test, EPA 712-C-96-167.

Yin X, Zhu G, Bing Li, X, Liu S, 2009. Genotoxicity evaluation of chlorpyrifos to amphibian Chinese toad (Amphibian:Anura) by comet assay and Micronucleus test. *Mut. Res.* 680: 2-6