

Estudio de la actividad angiogénica de la lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*).

Felipe Cayupi G^{1*}, Luis Grau C¹, Jorge Guzmán S¹, Nelson Lobo V¹,
David Lemus², Marcela Fuenzalida².

¹Alumno Escuela de Medicina, Universidad de Chile.²Programa de Anatomía y Biología del Desarrollo, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Resumen

Rev Chil Estud Med 2008; 5(1): 7-11. **Introducción:** La angiogénesis es la ramificación de capilares preexistentes, fundamental en el desarrollo y mantención de estructuras corporales, encontrándose regulada por la proporción entre factores pro y antiangiogénicos. En las últimas décadas se ha usado el fluido celómico de lombriz *E. Foetida* (EF) como fuente de compuestos biológicamente activos. La membrana alantocoriónica (MAC) de pollo es un modelo muy utilizado para experimentar angiogénesis in vivo y mediante el cual estudiamos la eventual modificación de este proceso por parte del sobrenadante de EF. **Metodología:** Se obtuvo sobrenadante de EF mediante la centrifugación a 1000G y 10000G del homogenizado de lombriz. Para cada velocidad de centrifugación se realizaron tres diluciones (5%, 1% y 0.1% v/v) procediéndose a la instilación de éstas sobre la MAC de huevos previamente preparados (n=6 c/grupo). Como control se utilizaron huevos instilados con suero fisiológico (n=3). Tras 48 horas de incubación post instilación, se extrajo un trozo de MAC de cada huevo, posterior preparación de muestras histológicas y conteo de vasos sanguíneos presentes mediante microscopía. **Resultados:** Los resultados demuestran que el número de vasos sanguíneos se reduce significativamente con el sobrenadante preparado a 1000G, en sus tres diluciones ($p < 0,05$), no modificándose con las tres diluciones del sobrenadante preparado a 10000G. **Conclusiones:** La existencia de algún compuesto presente a 1000G, pero sedimentado a 10000G de centrifugación, sería responsable del efecto antiangiogénico del sobrenadante de lombriz, que podría usarse como fuente sencilla de sustancias para tratar patologías donde el proceso angiogénico se encuentra aumentado, como cáncer o artritis reumatoide.

Keywords: angiogénesis, sobrenadante, vasos sanguíneos, antiangiogénico.

Introducción

EL TÉRMINO angiogénesis corresponde a la ramificación y extensión de capilares ya existentes con el fin de dar soporte nutricional a tejidos determinados y eliminar sus desechos metabólicos. Este proceso se encuentra gobernado por un balance entre factores pro y antiangiogénicos, siendo activado por factores de crecimiento como el Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular (VEGF) y el Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF), y reprimido por inhibidores como la Trombospondina y la Angiostatina. En condiciones normales los capilares no aumentan de tamaño ni número; sin embargo, en ocasiones, por ejemplo durante la formación de

nuevo endometrio después de la menstruación o en el daño tisular, estos vasos comienzan a dividirse rápidamente. Esta proliferación es, por lo general, de corta duración, inactivándose luego de una o dos semanas¹.

El interés que cobra el estudio del proceso de angiogénesis radica en su rol clave dentro de diversas patologías, en las cuales este mecanismo está alterado, tales como: Retinopatía Diabética, Artritis Reumatoide¹ y proliferación de células tumorales, las que pueden activar la angiogénesis mediante la liberación de factores de crecimiento como el ya citado VEGF². La eventual regulación de la angiogénesis puede convertirse en posible tratamiento a esos trastornos¹.

*Correspondencia a felipe_ge123@hotmail.com

Grupo	Sustancia Instilada	Velocidad de Centrifugación	Concentración
A	Sobrenadante <i>E. foetida</i>	1000G	5% v/v
B	Sobrenadante <i>E. foetida</i>	1000G	1% v/v
C	Sobrenadante <i>E. foetida</i>	1000G	0,1% v/v
D	Sobrenadante <i>E. foetida</i>	10000G	5% v/v
E	Sobrenadante <i>E. foetida</i>	10000G	1% v/v
F	Sobrenadante <i>E. foetida</i>	10000G	0,1% v/v
H	Suero Fisiológico	-	-

Tab. 1: Grupos experimentales y control utilizados.

Eisenia foetida es un invertebrado del Phylum Anélida y cuyas propiedades medicinales en varios remedios datan del año 1.340 d.C.³. En las últimas décadas se ha usado su fluido celómico como una nueva fuente de compuestos biológicamente activos⁴. Uno de los compuestos encontrados, denominado Factor Citolítico Celómico-1 (CCF-1), ha sido catalogado como el responsable de los efectos citolíticos, opzonizantes y hemolíticos del fluido celómico de la lombriz⁵. Otro importante compuesto, denominado G-90 posee propiedades antioxidantes⁶, anticoagulantes⁷ y retarda el crecimiento de líneas tumorales en ratón⁴. Además, un péptido pequeño con propiedades antibacterianas denominado OEP3121 ha sido purificado a partir del fluido celómico de *E. foetida*⁸. Especial interés han cobrado los análogos de leucocitos en *E. foetida*, denominados Celomocitos, que *in vitro* presentan propiedades citotóxicas que retardan el crecimiento de líneas de tumores de mamíferos y de fibroblastos de ratón⁹. Estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio evidenciaron la disminución en la angiogénesis en ratón tras la aplicación de sobrenadante y sedimento de *E. foetida*, en comparación con sobrenadante tumoral TA3-MTXR (datos no publicados).

Un modelo muy utilizado para experimentar angiogénesis *in vivo* es la membrana alantocoriónica (MAC) de pollo, que corresponde a una membrana extraembrionaria que se forma el cuarto día de incubación al producirse la fusión del corión y el alantoides. En la MAC encontramos una delgada capa de capilares sanguíneos en rápida pro-

liferación, que permite una observación directa y proporciona un medio ideal para experimentar con moléculas que intervienen en el desarrollo de los vasos sanguíneos¹⁰.

En base a lo anteriormente expuesto, sostenemos que el sobrenadante *E. foetida* induce modificaciones de la angiogénesis en MAC de pollo. Con el fin de comprobar dicha hipótesis nos propusimos estudiar la actividad angiogénica de la lombriz roja californiana sobre MAC, mediante la preparación de sobrenadante de *E. foetida* a partir de la centrifugación de homogenizado de lombriz a distintas velocidades y diluciones, evaluando la actividad angiogénica de esta sustancia sobre MAC y comparándola con la de una sustancia control (suero fisiológico).

Materiales y Métodos

Preparación de la Membrana Alantocoriónica

Los huevos se incubaron a 37,5 °C durante 48 horas. Posteriormente, se les realizó un orificio en el cascarón, y se extrajeron aproximadamente 2ml de albúmina con una pipeta Pasteur acodada, lo que permitió el descenso del alantocorion y su desprendimiento de la cáscara. Se abrió una pequeña ventana de aproximadamente 2,5cm de largo por 2cm de ancho. Se selló dicha ventana con cinta adhesiva transparente y luego cada huevo fue llevado a la cámara de incubación, donde se conservaron a 37,5 °C hasta el día 8¹⁰.

Obtención de Sobrenadante de *E. foetida*

Se procedió al lavado de las lombrices con abundante agua destilada para eliminar la tierra. Una vez limpias, se incubaron en agua destilada estéril, a 4 °C, en un vaso de precipitado, para de este modo eliminar la tierra de su interior. A las 12 horas, se tomaron las lombrices limpias y se depositaron en un tubo homogenizador junto a suero fisiológico, en una proporción de 1ml de suero por 1g de lombriz. Se obtuvo así el homogenizado de *E. foetida*. Posteriormente, se centrifugó el homogenizado a 1000G y 10000G por 5 minutos a temperatura ambiente, obteniéndose los dos tipos de sobrenadante. Para cada concentración se realizaron diluciones de 5%, 1% y 0,1% v/v, estableciéndose los distintos grupos experimentales (Tabla 1).

Instilación de la MAC con la sustancia de prueba

Se abrieron las ventanas que anteriormente se habían generado, introduciéndose los filtros de metilcelulosa impregnados con 5 μ l de sobrenadante de *E. foetida* (6 huevos para cada grupo experimental) y de sustancia control, suero fisiológico (3 huevos). Los filtros permanecieron en contacto con la MAC durante 48 horas, tras lo cual se extrajo una porción de membrana alantocoriónica adyacente al lugar donde introdujimos el filtro¹⁰.

Preparación de muestras histológicas y conteo de vasos sanguíneos

Una vez obtenidas las muestras, se fijaron y tiñeron con Hematoxilina Eosina y Alcian Blue¹⁰.

Para realizar el conteo, se utilizó un microscopio de luz, equipado con una rejilla micrométrica graduada cuadrilátera, dividida en 100 cuadrados de 30 μ m por 30 μ m, la cual se encuentra debajo del lente del ocular derecho. Se utilizó el microscopio con el objetivo mayor (40x). Se consideró un área de 9000 μ m², lo cual corresponde a una fila de la rejilla graduada (10 campos). Así se realizó el minucioso conteo de vasos sanguíneos, basándose en la ubicación de los glóbulos rojos y, principalmente, en el endotelio de los vasos sanguíneos. La medición se realizó en los segmentos de tejido de MAC adyacentes o cercanos a fragmentos de filtro¹⁰.

Modelos animales utilizados en el estudio

En el presente estudio se utilizaron lombrices de tierra rojas californianas adultas (*Eisenia foetida*)

y embriones de pollo (*Gallus gallus*)

Análisis estadístico

Para analizar los resultados obtenidos, se utilizó el método estadístico Test *t* de Student en el programa *Stata 9*©, el cual permite evaluar las diferencias entre medias empíricas. Las medias comparadas corresponden a la densidad promedio de vasos sanguíneos (DPVS) por grupo experimental y grupo control¹⁰.

Los resultados fueron expresados en gráficos de barras aisladas, con las variables densidad de vasos sanguíneos promedio en 9000 μ m² (DVSP) en el eje de las ordenadas y el grupo correspondiente en el eje de las abscisas.

Resultados

Tras realizar el conteo de vasos sanguíneos el grupo control presentó una DVSP igual a $3,36 \pm 0,19$ (Figuras 1 y 2).

Los grupos expuestos al sobrenadante obtenido a 1000G presentaron una DVSP menor que el grupo control ($p < 0,05$). El grupo expuesto a un sobrenadante concentrado al 0,1% v/v (grupo A) presentó una DVSP de $1,21 \pm 0,105$. Por otro lado, el grupo sometido a una concentración igual al 1% v/v (grupo B) mostró tener una DVSP de $2,24 \pm 0,15$. Por último, el grupo sometido al sobrenadante concentrado al 5% v/v (grupo C) mostró tener una DVSP igual a $1,71 \pm 0,15$ (Figura 1).

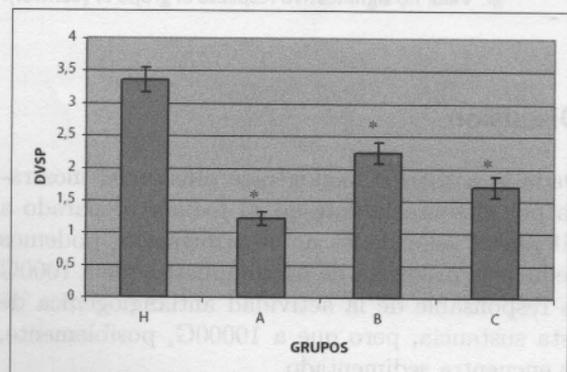


Fig. 1: Resumen del efecto angiogénico de las diferentes concentraciones del sobrenadante de *E. foetida* obtenido a 1000G. El grupo H es el grupo control. El grupo A corresponde a una concentración igual a 0.1% v/v; el grupo B a 1% v/v y el grupo C al 5% v/v. Las barras representan el promedio \pm error estadístico. DVSP: Densidad de vasos sanguíneos promedio en 9000 μ m². *: Valor $p < 0,05$ respecto

al grupo H (control).

Una segunda parte de los huevos fue instilada con sobrenadante obtenido a 10000G. Un primer grupo fue expuesto a este sobrenadante concentrado al 0,1% v/v (grupo D), presentando una DVSP igual a $3,56 \pm 0,25$. Un segundo grupo fue sometido al sobrenadante concentrado al 1% v/v (grupo E), encontrándose una DVSP de $3,37 \pm 0,16$. Por último, un tercer grupo fue expuesto al sobrenadante concentrado al 5% v/v (grupo F), hallándose en este caso una DVSP igual a $3,73 \pm 0,16$. En los tres casos, no se encontraron diferencias estadísticas significativas en comparación al grupo control (Figura 2).

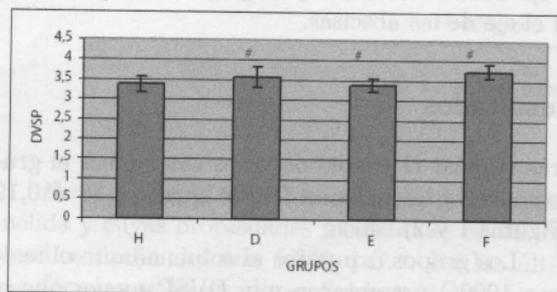


Fig. 2: Resumen del efecto angiogénico de las diferentes concentraciones del sobrenadante de *E. foetida* obtenido a 10000G. El grupo H es el grupo control. El grupo D corresponde a una concentración igual a 0.1% v/v; el grupo E a 1% v/v y el grupo F al 5% v/v. Las barras representan el promedio \pm error estadístico. DVSP: Densidad de vasos sanguíneos en $9000 \mu\text{m}^2$. #: Valor no significativo respecto al grupo H (control).

Discusión

Dada la actividad angiogénica diferencial mostrada por el sobrenadante de *E. foetida* preparado a diferentes velocidades de centrifugación, podemos deducir la presencia de un compuesto que a 1000G es responsable de la actividad antiangiogénica de esta sustancia, pero que a 10000G, posiblemente, se encuentra sedimentado.

Estos resultados son concordantes con los obtenidos en estudios previos en nuestro laboratorio (datos no publicados), donde tanto el sedimento como el sobrenadante a 1000G de centrifugación fueron responsables de una angiogénesis disminuida respecto al grupo control. También nuestra investigación concuerda con las que anteriormente han identificado diversas actividades biológicas y caracterizado a los compuestos responsables de ellas en

el fluido celómico de la lombriz *E. foetida*^{4,5,6,7,8,9}.

A diferencia de lo esperado, el efecto antiangiogénico del sobrenadante de *E. foetida* preparado a 1000G no resulta ser concentración dependiente. Si bien no tenemos una explicación rotunda para esta observación, a nuestro parecer, podría deberse a las bajas concentraciones utilizadas y, más aun, a las estrechas diferencias entre ellas. Para futuros estudios proponemos someter las MAC a concentraciones más elevadas de esta sustancia de prueba y con diferencias más destacadas entre ellas.

Lo novedoso de nuestro estudio radica en que mediante el uso de distintas velocidades de centrifugación logramos delimitar un rango de tamaño en el cual podríamos encontrar el compuesto que en el sobrenadante de *E. foetida* es responsable de esta marcada actividad antiangiogénica. Para ello, proponemos futuros estudios tendientes a caracterizar la actividad de este compuesto en forma aislada. Técnicas que nos parecen apropiadas para este fin son, por ejemplo, la electroforesis y la cromatografía de exclusión molecular del sobrenadante obtenido a un rango mayor de velocidades de sedimentación.

El hecho de que un invertebrado tan común presente estas excepcionales capacidades no es menor, pues la producción de un compuesto que inhiba la proliferación endotelial en patologías tan nocivas como el cáncer a partir de la lombriz *E. foetida* tendría una complejidad metodológica insignificante en comparación con las enormes proyecciones terapéuticas que estarían implicadas, tales como un posible control del crecimiento tumoral en una afección pandémica como lo es el cáncer.

Conclusiones

Mediante nuestra investigación pudimos observar una angiogénesis disminuida ($p < 0,05$) a causa del sobrenadante de *E. foetida* preparado a 1000G de centrifugación, sin modificación de ésta por parte del sobrenadante a 10000G respecto de la sustancia control, suero fisiológico. La existencia de un compuesto presente a 1000G, pero sedimentado a 10000G de centrifugación, sería responsable del efecto antiangiogénico del sobrenadante de lombriz. Tras la futura identificación, caracterización y aislamiento de tal sustancia podría utilizarse el sobrenadante de la lombriz *E. foetida* como fuente sencilla de sustancias para tratar patologías donde el proceso angiogénico se encuentra aumentado, tales como cáncer o artritis reumatoide.

Notas y Agradecimientos

El presente protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Bioética para Experimentación en Animales con el número CBA # 0172 FMUCH.

La realización de la presente investigación fue posible gracias al financiamiento brindado por ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Especiales agradecimientos a la Sra. Irma Orellana, por su gran colaboración, disposición y voluntad de trabajar con nosotros y al Dr. Aníbal Guerrero por su gran paciencia y colaboración.

Referencias

1. FOLKMAN J. Fighting cancer by attacking its blood supply. *Sci Am* 1996; 275(3): 150-154.
2. CARMELIET P, JAIN RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407(6801): 249-257.
3. COOPER EL, HRZENJAK TM, GRDISA M. Alternative sources of fibrinolytic, anticoagulative, antimicrobial and anticancer molecules. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2004; 17(3): 237-244.
4. HRZENJAK T, HRZENJAK M, KASUBA V, EFENBERGER-MARINCULIC P, LEVANAT S. A new source of

biologically active compounds—earthworm tissue (*E. foetida*, *Lumbricus rubelus*). *Comp Biochem Physiol Comp Physiol* 1992; 102(3): 441-447.

5. BILEJ M, BRYL L, BESCHIN A, LUCAS R, VERCAUTEREN E, HANUSOVA R, DE BAETSELIER P. Identification of a cytolytic protein in the coelomic fluid of *E. foetida* earthworms. *Immunol Lett* 1995; 45(1-2): 123-128.
6. GRDISA M, POPOVIC M, HRZENJAK T. Glycolipoprotein extract (G90) from earthworm *E. Foetida* exerts some antioxidative activity. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2001; 128(4): 821-825.
7. POPOVIC M, HRZENJAK TM, BABIC T, KOS J, GRDISA M. Effect of earthworm (G-90) extract on formation and lysis of clots originated from venous blood of dogs with cardiopathies and with malignant tumors. *Pathol Oncol Res* 2001; 7(3): 197-202.
8. LIU YQ, SUN ZJ, WANG C, LI SJ, LIU YZ. Purification of a novel antibacterial short peptide in earthworm *E. foetida* *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2004; 36(4): 297-302.
9. ENGELMANN P, KISS J, CSONGEI V, COOPER EL, NEMETH P. Earthworm leukocytes kill HeLa, HEP-2, PC-12 and PA317 cells in vitro *J Biochem Biophys Methods* 2004; 61(1-2): 215-227.
10. LEMUS D, DABANCENS A, ILLANES J. Antiangiogenic effect of betamethasone on the chick CAM stimulated by TA3 tumor supernatant *Biol Res* 2001; 34(3-4): 227-236.

Introducción

La RESISTENCIA VASCULAR pulmonar fetal es muy elevada en comparación con la observada en el recién nacido o en el adulto, tendiendo incluso a aumentar hacia el término de la gestación y previo al nacimiento. Esta alta resistencia vascular pulmonar determina que solo el 2-10% del gasto cardíaco pulmonar fetal pase a los pulmones¹, mientras que el 90% del gasto cardíaco derecho cruza por el ductus arteriosus hacia la aorta descendente. Algunos de los mecanismos implicados en mantener la alta resistencia vascular pulmonar fetal son: la baja presión parcial de oxígeno (PO₂), la baja producción de vasodilatadores como óxido nítrico (NO) y prostaglandina (PGI₂), y la producción aumentada de vasoconstrictores como endotelina-1 (ET-1) (Fig. 1).^{2,3,4}

La adaptación a la vida extrauterina requiere una rápida transición de la circulación pulmonar desde un estado de bajo flujo y alta resistencia a la que se encuentra in utero a un estado

de alto flujo y baja resistencia a los pocos minutos después de nacer^{2,3}. La habilidad de acomodar un aumento de 10 veces del flujo sanguíneo pulmonar requiere rápidas adaptaciones funcionales y estructurales que permitan la caída de la resistencia vascular pulmonar en el período postnatal inmediato. La liberación de sustancias vasodilatadoras como NO y PGI₂ juega un rol fundamental en establecer una eficiente circulación pulmonar en el recién nacido^{2,3,4}.

Dentro de los mecanismos que contribuyen al cambio de la reactividad vascular pulmonar durante el proceso de desarrollo fetal y posteriormente durante el desarrollo post-natal, se encuentra el sistema óxido nítrico soluble (NOS) - óxido nítrico (NO) - guanilil ciclasa soluble (sGC) - GMP cíclico (cGMP) - fosfodiesterasa 5 (PDE5)^{4,5,6}. En esta vía, el NO es producido por la conversión de L-arginina a L-citrulina, principalmente por acción de la enzima NOS endotelial (eNOS). El NO difunde del endotelio hacia las capas musculares del vaso