

# EFFECTO CITOTÓXICO Y GENOTÓXICO DE LA FRACCIÓN ACUOSA DE LUBRICANTES USADOS EN MOTORES FUERA DE BORDA, EN EL ERIZO DE MAR *Lytechinus variegatus*, EN LA BAHÍA DE MOCHIMA, VENEZUELA

CAROL LÁREZ<sup>1\*</sup>, THAIS VELÁSQUEZ<sup>2</sup>, RUBÉN PENOTT<sup>1</sup>, CARMEN ALFONSI<sup>3</sup> & SINATRA SALAZAR<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Estación de Investigaciones Marina Mochima, Fundación IDEA

\*Autor de correspondencia: carollarez@yahoo.es

<sup>2</sup>Departamento de Biología, Escuela de Ciencias, Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente  
thaina44@hotmail.com

<sup>1</sup>Estación de Investigaciones Marina Mochima, Fundación IDEA  
rubenpenottmaita@hotmail.com

<sup>3</sup>Instituto Oceanográfico de Venezuela, Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente  
calfonsir@hotmail.com, <http://orcid.org/0000-0002-7950-285>

<sup>4</sup>Instituto Oceanográfico de Venezuela, Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente  
salazarsinatra32@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0003-4893-063>

**RESUMEN:** Cuarenta y ocho ejemplares del erizo verde *Lytechinus variegatus*, se sometieron a concentraciones subletales (0%, 1%, 3% y 5%) de la fracción acuosa de lubricantes usados de motores fuera de borda (FALUMFB), mediante un bioensayo de toxicidad aguda de 96 h. Se midió el tiempo de retención de rojo neutro y se aplicaron las pruebas de presencia de micronúcleos (MN) y ensayo cometa. Se consideró la respuesta *in situ* en cuatro localidades de la bahía de Mochima, durante la temporada seca y lluviosa, alternadas con las temporadas de alta y baja afluencia de turistas en un período de un año (entre 2013 y 2014). Los resultados citotóxicos indicaron una respuesta similar en los individuos para todas las concentraciones del contaminante, con diferencias significativas en relación al tiempo de exposición ( $H=10,76$  y  $P<0,01$ ). Las pruebas genotóxicas detectaron mayor presencia de MN en las células de organismos sometidos al 5% de FALUMFB ( $H=20,01$  y  $P<0,001$ ) luego de 96 h ( $H=14,78$  y  $P<0,001$ ); con presencia de cometas tipo 1 ( $H=15,017$  y  $P<0,01$ ), tipo 2 ( $H=9,59$  y  $P>0,05$ ) y tipo 3 ( $H=15,85$  y  $P<0,01$ ). Las respuestas medidas *in situ* determinaron que durante la temporada seca con mayor afluencia de turistas, hubo daño significativo a distintos niveles celulares en *L. variegatus*, similares todas las localidades. Posiblemente las concentraciones de FALUMFB en la bahía de Mochima sean mínimas no generen alteraciones en la biota

**Palabras clave:** erizo verde, daños al ADN, contaminación, bahía de Mochima.

**ABSTRACT:** 48 specimens of the green hedgehog *Lytechinus variegatus* were subjected to sublethal concentrations (0%, 1%, 3% and 5%) of the aqueous fraction of lubricants used for outboard motors (FALUMFB), by means of an acute toxicity bioassay of 96 h. Neutral red retention time was measured and the micronucleus (MN) and comet assay tests were applied. The *in situ* response was considered in four locations in the bay of Mochima, during the dry and rainy season, alternating with the seasons of high and low tourist influx in a period of one year (between 2013 and 2014). The cytotoxic results indicated a similar response in the individuals for all concentrations of the contaminant, with significant differences in relation to the exposure time ( $H=10.76$  and  $P<0.01$ ). Genotoxic tests detected a greater presence of MN in the cells of organisms subjected to 5% FALUMFB ( $H=20.01$  and  $P<0.001$ ) after 96 h ( $H=14.78$  and  $P<0.001$ ); with the presence of type 1 comets ( $H=15.017$  and  $P<0.01$ ), type 2 ( $H=9.59$  and  $P>0.05$ ) and type 3 ( $H=15.85$  and  $P<0.01$ ). The responses measured *in situ* determined that during the dry season with the highest influx of tourists, there was significant damage at different cellular levels in *L. variegatus*, similar to all localities. Possibly the concentrations of FALUMFB in the bay of Mochima are minimal and do not generate alterations in the biota

**Keywords:** green hedgehog, DNA damage, pollution, Mochima bay

## INTRODUCCIÓN

Los erizos son organismos exclusivamente marinos y están dotados de una capacidad limitada de la locomoción, lo que justifica su uso como biosensores ambientales (COTEUR *et al.* 2003) y como posibles organismos modelo, que pudiesen dar respuesta a

la incertidumbre de los efectos perjudiciales de los lubricantes usados de motores fuera de borda. Por todos estos motivos, en este estudio, se utilizó el erizo verde *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea), por ser considerado como una de las especies bentónicas con mayor valor de constancia y abundancia en la bahía de Mochima (HIDALGO *et al.* 1999).

Minimizar la liberación a los mares de sustancias de origen antropogénico es importante y Venezuela no escapa a la contaminación del medio marino (LÁREZ *et al.* 2004; AMUNDARAÍN 2019). La bahía de Mochima junto con el Golfo de Santa Fe, constituye parte de la zona marino-costera del Parque Nacional Mochima de gran actividad turística, donde el medio principal de transporte son los botes con motores fuera de borda; cuyo constante tránsito, promueve el riesgo de liberación de aceite y combustible en la columna de agua.

Daños citotóxicos y genotóxicos inducidos por concentraciones subletales de sustancias químicas a través del uso de bioensayos; son herramientas útiles en evaluaciones ecotoxicológicas cuyos protocolos cuantitativos y altamente sensibles, generan una respuesta a corto plazo sobre el efecto de compuestos tóxicos (URIBE 2008; MUNIZ *et al.* 2013).

Los marcadores citotóxicos son diversos y algunos están referidos a la funcionalidad de las membranas celulares. Ejemplo de ello, es la estimación del Tiempo de Retención del Rojo Neutro (TRRN), basado en la capacidad que tienen los lisosomas de células viables para retener el colorante, visualizado a través de microscopía óptica (ANTÓN 2011). Esta técnica ha sido utilizada para demostrar el daño inducido por diferentes contaminantes en el crustáceo *Limanda limanda* (LOWE *et al.* 1992); en el equinodermo *Asterias Rubens* y los bivalvos: *Mytilus edulis* (CANTY *et al.* 2009) y *Pinctada imbricata* (ANTÓN 2011).

Las microlesiones en el material genético se han evaluado por dos técnicas ampliamente utilizadas: el Test de Micronúcleos (MN) y el ensayo Cometa. El primero está considerado como un ensayo práctico, útil para evaluar la inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos, universalmente validada y accesible tecnológicamente (ZALACAIN *et al.* 2005). Se ha aplicado ésta técnica en *Perna viridis* (SIU *et al.* 2004); *Mytilus galloprovincialis* (TALEB *et al.* 2007) *Mytilus edulis* y *Asterias Rubens* (CANTY *et al.* 2009).

El ensayo cometa está basado en la migración de fragmentos provenientes de la ruptura del ADN, que dan la apariencia de la cola de un cometa y es utilizado para evaluar lesiones (ZHU *et al.* 2005). Esta técnica se ha empleado en los bivalvos *Cassostrea virginica* (NACCI *et al.* 1996), *Mytilus galloprovincialis* (LAFFON *et al.* 2006), *M. edulis* y la estrella de mar *A. rubens* (CANTY *et al.* 2009).

Esta investigación evaluó la respuesta de *L. variegatus* a niveles citotóxicos y genotóxicos, de la fracción acuosa de lubricantes usados de motores fuera de borda (FALUMFB) en bioensayo de toxicidad aguda y en un monitoreo espacio temporal en la bahía de Mochima, Venezuela.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Colecta de organismos

La colecta de las unidades experimentales tuvo lugar en la bahía de Mochima, dentro del Parque Nacional Mochima, en la vertiente norte de la cordillera de la costa nororiental de Venezuela; entre los 10°24'55"-10°20'02" N y 64°19'30" - 64°22'30" O, con un área superficial aproximada de 29 Km<sup>2</sup> de la costa. Cuatro localidades fueron seleccionadas para la realización del estudio *in situ*: Mangle Quemao (MQ), Isla Larga (IL), Sene Váquira (SV) y Cercanías de la Estación de Investigaciones Marina Mochima, adscrita a la Fundación IDEA (Fig. 1). Los muestreos se realizaron en consideración a la temporada seca (2013-2014) y lluviosa; alternados con la afluencia de turistas, distribuyendo los muestreos de la siguiente manera:

1. Diciembre 2013: Temporada seca con alta afluencia de turistas.
2. Marzo 2014: Temporada seca con baja afluencia de turistas.
3. Mayo 2014: Temporada lluviosa con baja afluencia de turistas.
4. Agosto 2014: temporada lluviosa con alta afluencia de turistas.

Los organismos fueron colectados de forma manual, tanto para los ensayos de laboratorio como para la detección *in situ* y seleccionados de acuerdo a su talla (7 a 8,50 cm de longitud total), diámetro (4 a 5 cm) y peso (150 a 200 g). Los ejemplares destinados al bioensayo y las muestras del estudio *in situ* (refrigeradas) se trasladaron hasta el laboratorio de Genética del Instituto Oceanográfico de Venezuela.

### Obtención de la FALUMFB

La FALUMFB fue obtenida a partir de una mezcla de aceite usado de motores fuera de borda (200 ml) y de agua de mar filtrada (1800 ml) en una relación 1:9 v/v; mantenida en agitación constante durante un período de 24 horas a temperatura ambiente; posteriormente la

mezcla resultante fue dejada en reposo durante una hora. Por separación diferencial con un embudo rudimentario, se colectó la fracción acuosa, empleada como solución patrón (100% v/v), al descartar la capa más densa de aceite (ANTÓN 2011).

#### Bioensayo de toxicidad aguda

Ejemplares de *L. variegatus* adultos fueron aclimatados durante una semana previa al bioensayo, en acuarios de 40 l de capacidad, con agua de mar filtrada (salinidad 36 ‰; pH  $7,6 \pm 0,2$ ; temperatura  $25 \pm 1$  °C) y aireación constante.

A partir del  $CL_{50}$  calculado (6,24%) para la FALUMFB, fueron establecidas las dosis subletales (0, 1, 3 y 5%), para determinar daños a distintos niveles celulares en los celomocitos del erizo verde. En acuarios rectangulares de 6 l de capacidad, se expusieron 48 organismos (6 individuos en cada acuario, con una réplica) a las diferentes concentraciones establecidas, con aireación constante durante 96 h y fue realizada la extracción interdiaria de hemolinfa a las 0, 48 y 96 h en los organismos expuestos. La extracción de la hemolinfa se realizó mediante punción directa a la región oral de cada erizo, con ayuda de una jeringa hipodérmica, con la que se extrajo cuidadosamente 5 ml del fluido celómico, almacenado en tubos de ensayo de 20 ml de capacidad, con buffer ISO-EDTA.

La hemolinfa se centrifugó a 800 rpm, durante 5 min, a fin de concentrar los celomocitos del fluido inicial. El precipitado se lavó y resuspendió con buffer ISO-EDTA a pH 7,8 en tubos Eppendorf de 1,5 ml de capacidad, a una temperatura de aproximadamente 4 °C para su posterior centrifugación a 1200 rpm durante 3 min.

#### Detección *in situ*

Fueron capturados diez organismos en cada una de las cuatro localidades, por muestreo temporal realizado (para un total de 160 individuos). La hemolinfa extraída fue resguardada en tubos de ensayo con buffer ISO-EDTA en una relación 1:3.

#### Viabilidad celular (VC)

Mediante la tinción con azul Tripano fue posible establecer la diferenciación entre células viables (translúcidas) y no viables (teñidas de azul), determinándose el porcentaje de viabilidad celular. Una suspensión de celomocitos de 25  $\mu$ l se mezcló con una solución al 0,4 % de colorante (25  $\mu$ l). Las

células se observaron por microscopía óptica a 40X. Se usó la cámara de Neubauer para contar el número de células viables y concentración celular total (expresada en porcentaje).

#### TRRN

Se preparó una solución madre con 20 mg del colorante rojo neutro (Sigma Chemical, St. Louis) en 1 ml de dimetil sulfóxido (LOWE & PIPE 1994); a partir de la cual se obtuvo la solución de trabajo, de la que se tomaron 10  $\mu$ l de la solución madre del colorante y 5 ml de agua de mar con EDTA.

Se colocaron 10  $\mu$ l de hemolinfa y 10  $\mu$ l de la solución de trabajo en una cámara de Neubauer. Las muestras

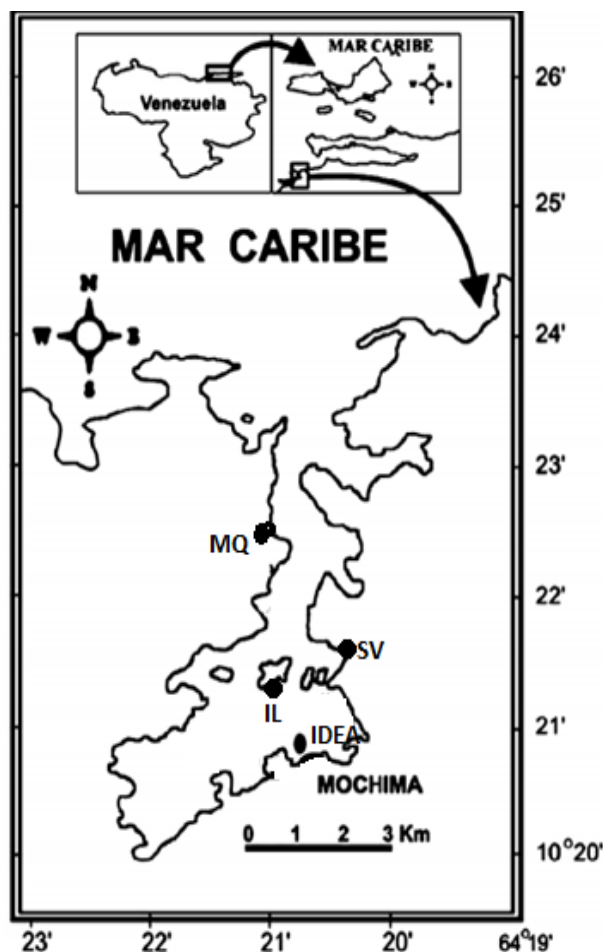


Fig. 1. Ubicación geográfica del área de muestreo en la bahía de Mochima, Venezuela: Mangle Quemao (MQ), Isla Larga (IL), Sene Váquira (SV) y cercanías de la Estación de Investigaciones Marina Mochima (IDEA).

fueron observadas a 40X en un microscopio óptico, para identificar las células que presentaron una coloración o pigmentación roja en el citosol como células dañadas. El TRRN se estimó por conteo manual cada 5 min de la población celular hasta que el 50 % de la misma se tiñera de rojo.

#### Test de Micronúcleos (MN)

Se aplicó el método descrito por JHA (2004), con algunas modificaciones, fueron cuidadosamente extendidos 200  $\mu$ l de hemolinfa sobre una lámina portaobjetos y dejadas secar al aire durante 30 min; posteriormente el frotis fue fijado en metanol por 15 min y luego teñido con Giemsa (diluido al 5 % en buffer fosfato) durante 20 min. El exceso de colorante se eliminó por lavado con agua destilada. Una vez secas las láminas se examinaron bajo el microscopio para observación de MN en 1 000 células.

#### Ensayo cometa

Fue utilizada la metodología del ensayo cometa propuesta por SINGH *et al.* (1988). El conteo de cometas se realizó según el tamaño de la cola por clasificación visual, recomendada por COLLINS (2004). El método clasifica el nivel de daño a la célula en cuatro categorías que van de cero (células sin migración) a cuatro (casi todo el ADN en la cola); basado en la migración de fragmentos provenientes de la ruptura del ADN durante la electroforesis, lo que origina la apariencia de la cola de un cometa.

#### Análisis Estadístico

En el bioensayo de toxicidad aguda y el estudio *in situ*, se estimaron y compararon daños a distintos niveles celulares en celomocitos mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, ya que los datos no cumplieron con los supuestos de normalidad, de acuerdo a lo establecido en SOKAL & ROHLF (2009). Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Statgraphics Centurión.

## RESULTADOS

#### Bioensayo de toxicidad aguda

La proporción viable de células del erizo verde se mantuvo sobre el 80 %, en todas las concentraciones utilizadas durante las 96 h de exposición. No se obtuvieron diferencias significativas entre las concentraciones aplicadas ( $H=6,84$  y  $P>0,05$ ) y el tiempo de exposición ( $H=4,05$  y  $P>0,05$ ).

Se observaron diferencias significativas respecto al TRRN en celomocitos; en relación al tiempo de exposición al contaminante ( $H=10,76$  y  $P<0,01$ ) (Fig. 2), indistintamente de la concentración de FALUMFB aplicada ( $H=5,24$  y  $P>0,1$ ), durante las 96 horas de exposición a dosis subletales del contaminante.

El tiempo mínimo de retención fue estimado en 11 min para los organismos expuestos, contrariamente los organismos controles exhibieron tiempos de retención mayores a los 20 min.

La presencia de células micronucleadas evidenció daño significativo en el material genético a nivel de los celomocitos durante las 96 h de exposición a la FALUMFB. Se observó una respuesta similar entre los individuos expuestos al 1 % y 3 % del contaminante; mientras que, en los expuestos al 5 % del xenobiótico, fue evidente un incremento en la recurrencia de micronúcleos ( $H=20,02$  y  $P<0,001$ ) con diferencias muy significativas, al alcanzar las 96 h del ensayo de toxicidad aguda ( $H=14,79$  y  $P<0,001$ ), con una proporción de 12,17 ‰ MN (Fig. 3).

Tras la exposición del erizo verde a la FALUMFB durante 96 h, se observó la disminución de núcleos íntegros a medida que aumentó la concentración del xenobiótico ( $H=14,23$  y  $P<0,01$ ), con un concomitante incremento de núcleos con estelas de ADN de diferentes longitudes y con diferencias significativas a partir de la exposición a la concentración del 1% del contaminante, con colas tipo 1 ( $H=15,02$  y  $P<0,01$ ), tipo 2 ( $H=9,59$  y  $P>0,05$ ), y tipo 3 ( $H=15,86$  y  $P<0,01$ ) (Fig. 4).

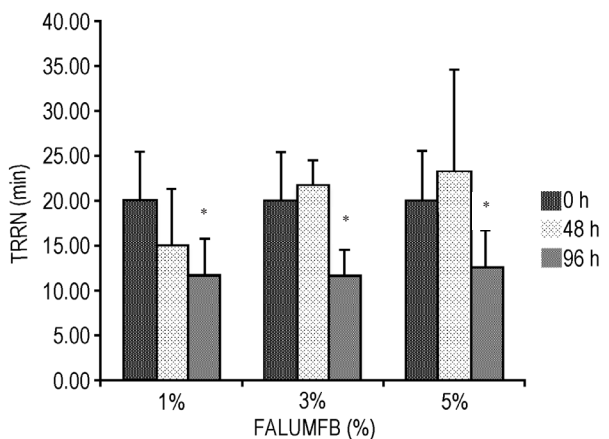


Fig. 2. Tiempo de Retención de Rojo Neutro en celomocitos de *L. variegatus*, expuesto a distintas concentraciones subletales de FALUMFB durante de 96 horas.

Detección *in situ*

Los organismos mostraron una viabilidad celular óptima para todas las localidades y las distintas temporadas del año; sin diferencias significativas para el factor localidad ( $H=0,68$  y  $P > 0,05$ ), sin embargo, altamente significativas para la época del año ( $H=28,60$  y  $P < 0,001$ ).

Durante la temporada seca disminuyó considerablemente el número de células viables, cuando la afluencia de turistas fue mayor, con apenas un 79,06 % de VC en Isla Larga. En contraste, al disminuir la presencia de turistas se incrementó el número de células vivas, con membranas íntegras, en un 90,52 % VC en la localidad Sene Váquira. En la temporada lluviosa se observaron valores intermedios de celomocitos vivos en comparación con los de la temporada seca, que estuvo entre 81,69 % y 88,78 % durante baja y alta afluencia de turistas respectivamente (Fig. 5).

El análisis estadístico no reveló diferencias significativas para el TRRN en los celomocitos, entre las cuatro localidades de la bahía de Mochima ( $H= 1,24$  y  $P>0,05$ ). Para el tiempo de retención del colorante y la época del año las diferencias si fueron significativas ( $H=94,79$  y  $P<0,01$ ) considerándose la temporada con alta afluencia de turistas aunada al tiempo de sequía, el periodo de mayor estrés citotóxico para *L. variegatus*; reflejado en la disminución de su capacidad para retener el rojo neutro a 4 min aproximadamente; mientras que, durante la época de lluvia el TRRN alcanzó 21,4 min cuando fue temporada alta de concurrencia turística (Fig. 6).

En celomocitos no se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de MN entre localidades ( $H=3,27$  y  $P> 0,01$ ) mientras que entre temporada la diferencias si fueron significativas ( $H=8,80$  y  $P < 0,01$ ), aun cuando el número de anomalías no excedía a dos células micronucleadas por cada 1 000 registradas. La mayor incidencia de MN se presentó durante la temporada seca (Fig. 7), cuando la afluencia de turistas fue mayor (alta/seca), con un valor de 2 % en la localidad de Mangle Quemao (MQ).

La comparación estadística de los distintos tipos de daños del ADN, entre las distintas localidades y temporadas, arrojó diferencias significativas con cometas tipo 0 ( $H=13,72$  y  $P < 0,01$ ), tipo 1 ( $H=11,35$  y  $P < 0,01$ ) y tipo 2 ( $H=18,13$  y  $P < 0,01$ ), sólo durante la temporada seca cuando la afluencia de turistas fue

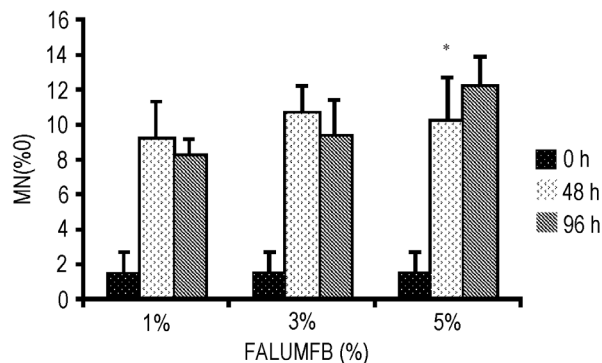


Fig. 3. Micronúcleos en celomocitos de *L. variegatus*, expuesto a concentraciones subletales de FALUMFB en condiciones controladas, durante de 96 horas.

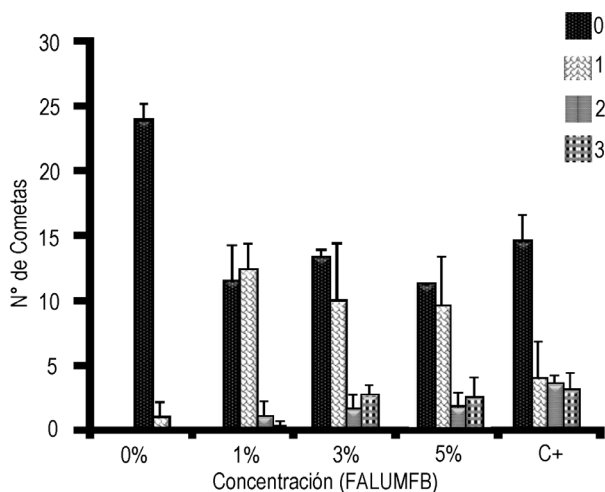


Fig. 4. Número de cometas en celomocitos de *L. variegatus*, de acuerdo al tipo de cometa, por exposición a dosis subletales de FALUMFB en condiciones controladas, durante de 96 horas.

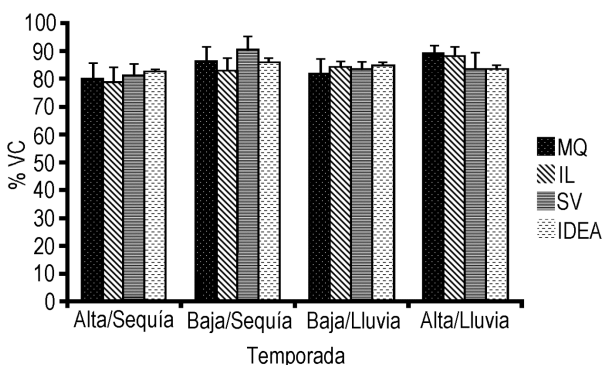


Fig. 5. Viabilidad celular *in situ* en celomocitos de *L. variegatus*, en cuatro localidades de la bahía de Mochima: Mangle Quemao (MQ), Isla Larga (IL), Sene Váquira (SV) y Estación IDEA (IDEA), durante las temporadas alta/seca, baja/seca, baja/lluviosa y alta/lluviosa.

mayor, específicamente en la localidad de Mangle Quemao (Fig. 8), con disminución en el número de cometas tipo cero.

## DISCUSIÓN

### Bioensayo de toxicidad aguda

El test de viabilidad celular es una prueba básica que permite estimar la calidad de las células con las que se está trabajando, de allí su importancia como parámetro para continuar con otros ensayos. Estudios previos sobre moluscos bivalvos, en los que se ha empleado lubricantes usados disueltos en agua de mar, han arrojado un porcentaje de células viables similar a los obtenidos en el erizo verde. En hemocitos de *Lima scabra*, se ha estimado el porcentaje de viabilidad entre 88 y 97% (SÁNCHEZ 2008). Por su parte, ANTÓN (2011) encontró viabilidad celular entre 88 y 94% en hemocitos de *Pintada imbricata*; mientras que, ZAPATA *et al.* (2012) determinaron la viabilidad celular en hemocitos de *Perna viridis*, con promedios similares entre 78,50 y 89,40%.

Los valores reducidos del TRRN al alcanzar el 50% de células dañadas están asociados al deterioro de las membranas lisosomales (LOWE & PIPE 1994), producto de la exposición de los organismos a la FALUMFB. NASCIMENTO *et al.* (2002) indicaron que en invertebrados marinos los TRRN oscilan entre 60 y 120 minutos. Sin embargo, este marcador citoplasmático indicó una evidente reducción en la capacidad lisosomal para retener el colorante, al cabo de 96 h de exposición. Se conoce que en moluscos y equinodermos, los lisosomas son los organelos con mayor capacidad de acumulación y homeostasis de xenobióticos, incluyendo hidrocarburos y metales pesados (ANTÓN 2011).

La tolerancia de los celomocitos a nivel cromosómico posiblemente se vio afectada cuando los individuos fueron expuestos a una dosis subletal cercana al  $CL_{50}$  calculado en estudio; comprometiendo la integridad de la actividad mitótica y por ende, generando la presencia de pequeños fragmentos citoplasmáticos contentivos de cromatina (MN) no incorporados en los núcleos hijos durante la anafase en división celular. En contraste, otras investigaciones hacen referencia a la presencia de células micronucleadas en condiciones controladas de experimentación, con un índice de MN menor que el producido por la FALUMFB en *L. variegatus*; hecho ocurrido en embriones del erizo *Hemicentrotus pulcherrimus* expuestos a Mitomicina C (SAOTOME &

HAYASHI 2003), en hemocitos de *Perna viridis* por acción de Benzopireno (SIU *et al.* 2004) y en *M. galloprovincialis* por la influencia del Niquel (DALLAS *et al.* 2013).

Los resultados del ensayo cometa permitieron establecer que los celomocitos de *L. variegatus* fueron sensibles a la FALUMFB, evidenciando cometas con colas de mayor longitud de manera proporcional la concentración del contaminante. En otros invertebrados se ha demostrado una relación dosis-respuesta entre el nivel de roturas de la cadena de ADN y las concentraciones de sustancias tóxicas (SIU *et al.* 2004; CANTY *et al.* 2009) también, incremento en los daños en el material genético conforme aumentó el tiempo de exposición al contaminante (BHAGAT & INGOLE 2015).

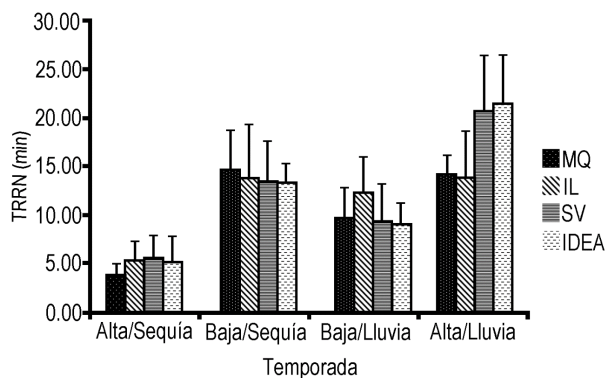


Fig. 6. Tiempo de Retención de Rojo Neutro *in situ* en celomocitos de *L. variegatus* en cuatro localidades de la bahía de Mochima: Mangle Quemao (MQ), Isla Larga (IL), Sene Váquira (SV) y Estación IDEA (IDEA) durante las temporadas alta/seca, baja/seca, baja/lluviosa y alta/lluviosa.

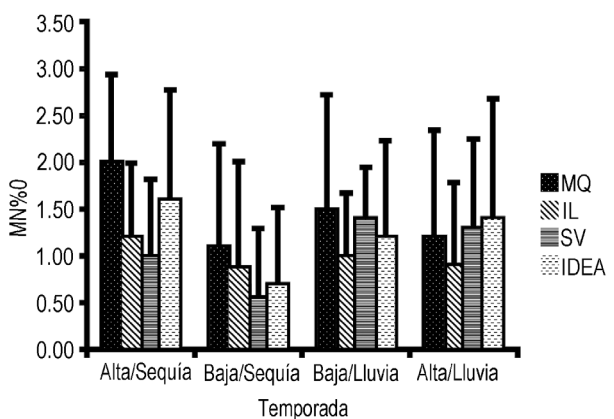


Fig. 7. Micronúcleos *in situ* en celomocitos de *L. variegatus*, en cuatro localidades de la bahía de Mochima: Mangle Quemao (MQ), Isla Larga (IL), Sene Váquira (SV) y Estación IDEA (IDEA), durante las temporadas alta/seca, baja/seca, baja/lluviosa y alta/lluviosa.

Así mismo, en larvas y celomocitos del erizo de mar *L. variegatus* se observaron lesiones en el ADN, tras la exposición a una variedad de agentes genotóxicos (REYNARDY & BODNAR 2015) y más reciente, en el erizo *Paracentrotus lividus*, se evidenció la genotoxicidad inducida por nanopartículas de óxido de cobre, en células espermáticas (GALLO *et al.* 2018). No se han hallado otros estudios que evalúen la sensibilidad relativa del erizo adulto o equinodermos maduros utilizando el ensayo cometa en condiciones experimentales similares. *L. variegatus* parece responder de forma similar a los invertebrados marinos antes mencionados, lo que permite considerarlo como un buen biosensor.

La efectividad del ensayo se corroboró al utilizar un agente genotóxico conocido ( $H_2O_2$ ) sobre una muestra limitada de células durante la corrida electroforética. De esta manera se descartó la posibilidad de que la desnaturalización del ADN fuera provocada por la

exposición prolongada al buffer electroforético o a causa de la no difusión de sal de la solución de lisis desde la agarosa hacia el tampón; actuando como electrolito y facilitando la migración de ADN (ZUÑIGA 2009).

Las sustancias químicas que se encuentren en el aceite usado varían dependiendo de la marca y del tipo de aceite que se usa, de las condiciones del motor en el que se usó el aceite, así como también de las altas presiones y temperaturas a las que se someten las piezas automotrices que generan metales pesados como: cadmio, cromo, arsénico, cobre y plomo; capaces de causar efectos nocivos sobre los seres vivos y cuya toxicidad dependerá, de la forma orgánica e inorgánica así como particulada o disuelta en que se encuentren estos metales, todo esto aunado a la variación de los parámetros fisicoquímicos del agua en que se encuentren los organismos (GONZÁLEZ *et al.* 2007; REYES *et al.* 2016; FONG *et al.* 2017).

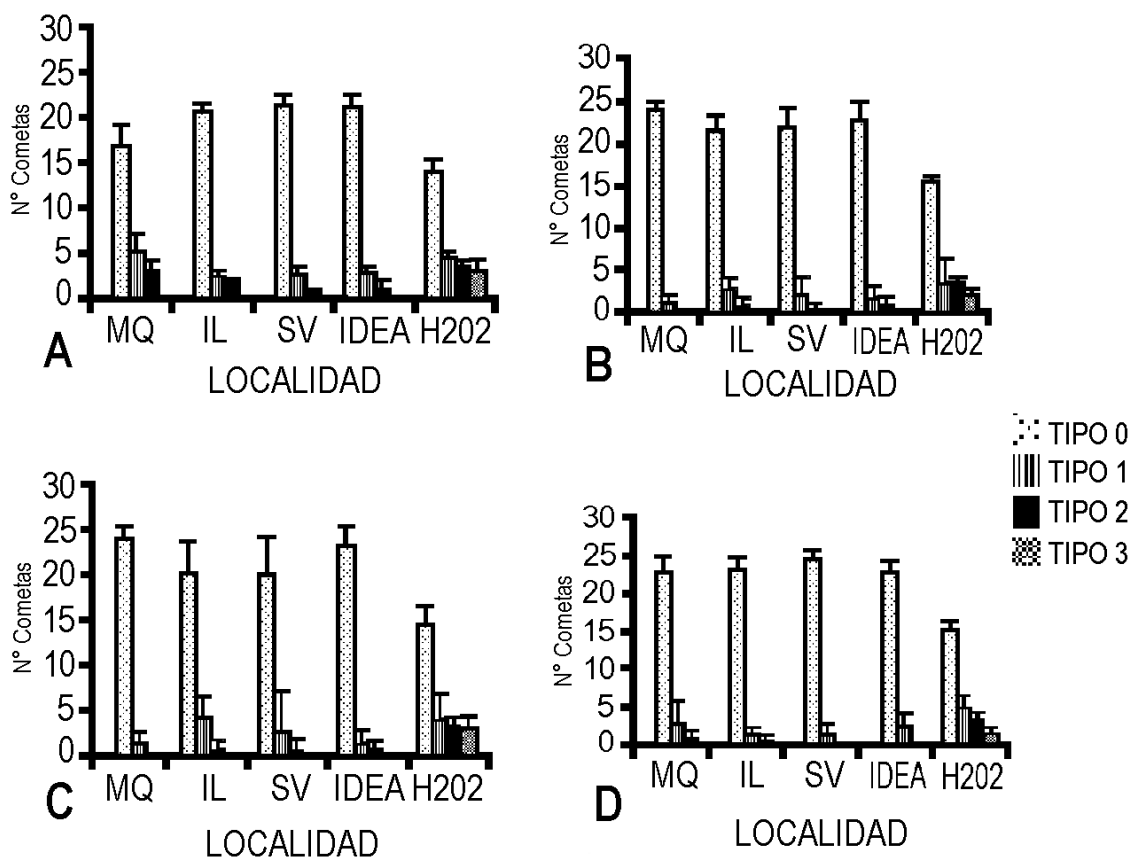


Fig. 8. Número de cometas *in situ* en celomocitos de *L. variegatus*, en cuatro localidades de la bahía de Mochima: Mangle Quemao (MQ), Isla Larga (IL), Sene Váquira (SV) y Estación IDEA (IDEA), comparado con un control + ( $H_2O_2$ ) durante las temporadas alta/seca (A), baja/seca (B), baja/lluviosa (C) y alta/lluviosa (D).

Los lubricantes residuales, también contienen hidrocarburos alifáticos de cadena lineal e hidrocarburos aromáticos policíclicos; estos últimos son compuestos orgánicos no polares que debido a su baja solubilidad en agua, en el medio marino tienden a adsorberse a las fases orgánicas disponibles como los tejidos de los seres vivos o la porción orgánica de los sedimentos y partículas en suspensión donde el grado de acumulación en invertebrados y peces dependerá de la capacidad de un compuesto para ser incorporado a un organismo (biodisponibilidad) y de la fisiología del organismo.

#### Detección *in situ*

Los factores relacionados a la escasa pluviosidad durante la época de sequía generaron posiblemente, el estrés ambiental causante de la perturbación en los celomocitos. TALEB *et al.* (2007) señalaron que durante el verano, el aumento de la temperatura del agua reduce la estabilidad de la membrana lisosomal, lo que explicaría la disminución en el TRRN para los ejemplares de *L. variegatus* estudiados.

Las lesiones del material genético por presencia de células micronucleadas se encontró en baja frecuencia y los resultados pudieran atribuirse a la presencia antrópica, aunada a la contaminación acumulada en un periodo de escasa pluviosidad (INAMEH 2014).

En el caso del ensayo cometa se observó poca presencia de daños tipo 1 y 2 en los ejemplares estudiados, infiriéndose que las perturbaciones ambientales no comprometieron el correcto funcionamiento a este nivel celular. Sólo los ejemplares provenientes de Mangle Quemao presentaron diferencias estadísticas muy significativas, en relación a las otras localidades durante la temporada seca con mayor afluencia de turistas (alta/seca). De acuerdo a la información obtenida en conversaciones personales con los habitantes de la zona y lo observado durante los muestreos, esta localidad en particular ha sido modificada para el disfrute de los bañistas desplazando la biota marina.

Los bioensayos realizados en este estudio fueron orientados a evaluar la respuesta de los celomocitos a distintos niveles celulares, cuando los organismos estuvieron expuestos a la FALUMFB como agente contaminante; probando la efectividad del erizo verde como sensor biológico de contaminación. En primera instancia fue posible evidenciar el efecto citotóxico producto de la exposición durante 96 h al contaminante aún a bajas concentraciones, observado en la disminución

del TRRN. También se evidenció el efecto genotóxico de la FALUMFB por la presencia de MN, acentuada cuando los organismos se expusieron durante 96 h a altas dosis subletales. En el ensayo cometa las lesiones encontradas en el ADN del erizo verde se observaron con todas las dosis utilizadas del xenobiótico. Esto se debió a la eliminación de las proteínas acompañantes del ADN y el desenrollamiento del mismo, lo que permite corroborar la sensibilidad de esta técnica (URREGO *et al.* 2005).

Los celomocitos de los erizos, *in situ*, mantuvieron el funcionamiento celular y la integridad del material genético en contraste con los resultados obtenidos en los bioensayos. Se evidenció un incremento significativo en la respuesta a distintos niveles celulares (tisular y organelos) en la época de menor pluviosidad, cuando la escasa movilidad de agua y la evaporación promueven la concentración de los contaminantes existentes en la columna de agua; aunado a la temporada alta, durante la cual la influencia antrópica: por el tránsito de botes y presencia de turistas es mayor. Dada la sensibilidad de *L. variegatus*, se propone el uso de este equinodermo en monitoreos regulares dentro de la bahía de Mochima como sensor de contaminación para futuras evaluaciones de calidad de agua y prever efectos a largo plazo.

Los resultados obtenidos permiten concluir que en la mayor parte de los fondos en las áreas de estudio probablemente no hay una severa contaminación; hecho relacionado con la naturaleza y distribución espacial de los xenobióticos, la densidad de población de los organismos que allí habitan, la influencia de las corrientes marinas, la pluviosidad y/o la presencia antrópica.

Los estudios ecotoxicológicos dan un aporte para el desarrollo de planes o programas de conservación, los que podrían aplicarse a la bahía de Mochima. Por tal motivo se hace imprescindible realizar evaluaciones en organismos representativos de los sistemas ecológicos, con el fin de establecer los efectos que pueden causar dosis no letales de los xenobióticos.

#### AGRADECIMIENTO

Este artículo está dedicado a la memoria del Profesor Julio E. Pérez.

#### REFERENCIAS

AMUNDARAÍN, O. 2019. *Determinación de una metodología de recuperación de aceites lubricantes usados en vehículos automotores mediante extracción con ácido acético y el uso de agregados*

- de nanopartículas de SiO<sub>2</sub> como adsorbentes en la fase final de purificación. Trab. Grad. Lic. Química, Universidad Central de Venezuela, Caracas, 99 pp.
- ANTÓN, M. 2011. *Parámetros citológicos, inmunológicos y estabilidad lisosomal en hemocitos del bivalvo Pinctada imbricata expuesto a fracciones solubles de lubricantes usados de vehículos*. Trab. Grad. Lic. Biología, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela, 46 pp.
- BHAGAT, J. & B. INGOLE. 2015. Genotoxic potency of mercuric chloride in gill cells of marine gastropod *Planaxis sulcatus* using comet assay. *Environ. Scienc. Poll. Res.* 22: 107-158.
- CANTY, M., T. HUTCHINSON, R. BROWN, M. JONES & A. JHA. 2009. Linking genotoxic responses with cytotoxic and behavioral or physiological consequences: Differential sensitivity of echinoderms (*Asterias rubens*) and marine molluscs (*Mytilus edulis*). *Aquat. Toxicol.* 94: 68-76.
- COLLINS, A. 2004. The comet assay for DNA damage and repair. Principles, applications, and limitations. *Mol. Biothech.* 26: 249-259.
- COTEUR, G., P. GOSSELIN, P. WANTIER, Y. CHAMBOST-MANCIET, B. DANIS, P. PERNET, M. WARNAU, & P. DUBOIS. 2003. Echinoderms as bioindicators, bioassays, and impact assessment tools of sediment associated metals and PCBs in the North Sea. *Environ. Cont. Toxicol.* 45(2): 190-202.
- DALLAS, L., T. BEAN, A. TURNER, B. LYONS & A. JHA. 2013. Oxidative DNA damage may not mediate Ni-induced genotoxicity in marine mussels: Assessment of genotoxic biomarkers and transcriptional responses of key stress genes. *Mutat. Res.* 754: 4-13.
- FONG, W., E. QUIÑONEZ & C. TEJADA. 2017. Caracterización físico-química de aceites usados de motores para su reciclaje. *Prospect.* 15(2): 135-144.
- GALLO, A., L. MANFRA, R., BONI, A., ROTINI, L., MIGLIORE & E. TOSTI. 2018. Cytotoxicity and genotoxicity of CuO nanoparticles in sea urchin spermatozoa through oxidative stress. *Environ. Internat.* 118: 325-333.
- GONZÁLEZ, J. J., C. ÁLVAREZ, M. A. FRANCO & T. NÚÑEZ. 2007. Contaminación. Centro Oceanográfico de Vigo. Instituto Español de Oceanografía (IEO) Disponible en: <https://digital.csic.es/bitstream/10261/116066/1/Contaminacion.pdf> (revisada junio 2019).
- HIDALGO, L., E. MÉNDEZ, L. MARTÍNEZ & I. LÓPEZ. 1999. Estructura ecológica de los equinodermos en cuatro estaciones de la bahía de Mochima, edo. Sucre Venezuela. *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela* 38: 163.
- INAMEH. 2014. Boletín climatológico mensual. Disponible en [www.inameh.gob.ve](http://www.inameh.gob.ve) (revisada febrero 2015).
- JHA, A. 2004. Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview. *Mutat. Res. Fund. Mol. Mechan Mutag.* 552: 1-17.
- LAFFON, B., I. ALDAO, B. PÉREZ, E. PÁSARO & J. MÉNDEZ. 2006. Primer paso en los efectos del fuel del prestigio sobre el medio ambiente marino: biodisponibilidad, bioacumulación y daño en el ADN. *Cienc. Mar.* 32: 389-399.
- LÁREZ, J., A. CARRERO & M. GARCÍA. 2004. Las zonas costeras de Venezuela: una aproximación a su definición conceptual y a sus principales problemas ambientales. *Rev. Invest. Cient.* 56: 143-156.
- LOWE, D., M. MOORE & B. EVANS. 1992. Contaminant impact on interactions of molecular probes with lysosomes in living hepatocytes from *Limanda limanda*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 91: 131-140.
- LOWE, D. & R. PIPE. 1994. Contaminant induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cells: an in vitro study. *Aquat. Toxicol.* 30: 357-365.
- MUNIZ, P., P. LANA, N. VENTURINI, R. ELIAS, E. VALLARINO, C. BREMEC, C. MARTINS & L. SANDRINI. 2013. *Un manual de protocolos para evaluar la contaminación marina por efluentes domésticos*, 130 pp. Editorial Universidad de la República de Argentina. ISBN: 978-9974-0-0899-1. Disponible en <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/109450> (agosto 2020).
- NACCI, D., S. CAYULA & E. JACKIM. 1996. Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. *Aquat. Toxicol.* 35: 197-210.
- NASCIMENTO I.A., M.B. LEITE & L.K. MARTINS. 2002. *Uso de biomarcadores para diagnóstico ambiental: Proteínas de estresse e interidade da membrana lisossômica*. En: *Métodos em ecotoxicologia marinha: Aplicações no Brasil*. Eds. I.A. Nascimento, P.M. Sousa y M. Nipper. Artes Gráficas e Industrias, San Pablo, Brasil, 207-232.

- REYES, Y.C., I. VERGARA, O.E. TORRES, M. DÍAZ-LAGOS & E.E. GONZÁLEZ. 2016. Contaminación por metales pesados: implicaciones en salud, ambiente y seguridad alimentaria. *Rev. Ing. Invest. y Des.* 16 (2): 66-77.
- REINARDY, H. & A. BODNAR. 2015. Profiling DNA damage and repair capacity in sea urchin larvae and coelomocytes exposed to genotoxicants. *Mutagenesis* 30: 829-839.
- SÁNCHEZ, G. 2008. *Biomarcadores de estrés oxidativo e inmunotoxicidad en el pecten Lima scabra (Born, 1178) sometido a fracciones acuosas de lubricantes usados de motores de vehículos.* Trab. Grad. Lic. Biología, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela, 53 pp.
- SAOTOME, K. & M. HAYASHI. 2003. Application of a sea urchin micronucleus assay to monitoring aquatic pollution: influence of sample osmolality. *Mutagenesis* 1(18): 73-76.
- SIU, W., J. CAO, R. JACK, R. WU, B. RICHARDSON, L. XU & P. LAMA. 2004. Application of the comet and micronucleus assays to the detection of B[a]P genotoxicity in haemocytes of the green-lipped mussel (*Perna viridis*). *Aquat. Toxicol.* 66:381-39.
- SINGH, N., M. MCCOY, R. TICE & E. SCHNEIDER. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* 175: 184-191.
- SOKAL, R. & F. ROHLF. 2009. *Introduction to Biostatistics.* Segunda edición. Ed. Blume. Madrid. 366 pp.
- TALEB, Z., S. BENGHALI, A. KADDOUR & Z. BOUTIBA. 2007. Monitoring the biological effects of pollution on the Algerian west coast using mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Oceanología* 49: 543-564.
- URIBE, R. 2008. *Ensayo de citotoxicidad aguda con celomocitos de la lombriz de tierra Eisenia foetida.* En: *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo: La experiencia en México.* Eds. Ramírez & Mendoza. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales Instituto Nacional de Ecología. México, DF. 225- 232.
- URREGO, R., A. PAREJA, N. VÁSQUEZ & M. MÁRQUEZ. 2005. El ensayo cometa: una técnica para evaluar genotoxicidad en el ADN de oocitos bovinos. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 18(3): 222-227.
- ZALACAÍN, M., L. SIERRASESÚMAGA & A. PATIÑO. 2005. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *Ana Sist. Sanit. Navar.* 28: 227-236.
- ZAPATA, E., L. ROJAS, G. SÁNCHEZ & M. BARRETO. 2012. Metales pesados y biomarcadores relacionados en *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae) recolectado en las costas del estado Sucre, Venezuela. *Cienc. Mar.* 38 (3): 517-528.
- ZHU, L., Y. HUANG & G. LIU. 2005. Using DNA damage to monitor water environment. *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 23 (3): 340-348.
- ZUÑIGA, L. 2009. *Optimizaciones metodológicas del ensayo cometa y su aplicación en monitorización humana.* Trab. Grad. Doctor en Genética, Universidad Autónoma de Barcelona, España, 243 pp.

RECIBIDO: MARZO 2021

ACEPTADO: JUNIO 2021