



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

RESPUESTAS CITOTÓXICAS Y GENOTÓXICAS DEL ERIZO DE MAR
Lytechinus variegatus UTILIZANDO LA FRACCIÓN ACUOSA DE
ACEITE QUEMADO DE MOTOR DE BOTE, CON UN
MONITOREO ESPACIO-TEMPORAL EN LA BAHÍA
DE MOCHIMA, VENEZUELA
(Modalidad: Tesis de Grado)

THAIS ANDREINA VELÁSQUEZ BEAUFOND

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADA EN BIOLOGÍA

CUMANÁ, MARZO DE 2017

RESPUESTAS CITOTÓXICAS Y GENOTÓXICAS DEL ERIZO DE MAR
Lytechinus variegatus UTILIZANDO LA FRACCIÓN ACUOSA DE ACEITE
QUEMADO DE MOTOR DE BOTE, CON UN MONITOREO ESPACIO-
TEMPORAL EN LA BAHÍA DE MOCHIMA, VENEZUELA

APROBADO POR:

MSc. Carol Lárez
Asesora

Dra. Carmen Alfonsi
Co-asesora

Dr. Edgar Zapata
Jurado principal

Dra. Sinatra Salazar
Jurado principal

DEDICATORIA

A mis padres Yssa Inés Beaufond González y Luis Emilio Velásquez Landaeta, porque no hay distancia que pueda separarnos, aunque estemos lejos.

A mis hermanos, María Virginia Mago Beaufond y Luis David Velásquez Lizardo, si pueden soñarlo, pueden lograrlo.

De manera muy especial dedico este trabajo a Gladys Josefina González Rivas, abuela por consanguinidad y madre de corazón, mi logro es tuyo también.

A mi persona, porque sólo se fracasa, cuando se deja de intentar.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, padre y creador; arquitecto de esta obra en la que sólo soy un instrumento de su amor.

A mis padres Yssa Beaufond y Luis Velásquez, por ser los pilares que me sostienen. Los amo.

A mi mamita Gladys González por estar conmigo en todo momento, desde mis primeros pasos, en mis caídas, mis alegrías y cosechando a mi lado los frutos obtenidos. Te amo.

A mis tías Nanci Beaufond y Begoña Pérez, Eddy Velásquez y Lizbell Velásquez, por ser esos angelitos que me cuidan aquí en la tierra.

A la Universidad de Oriente, la Casa más alta, mi casa, por acogerme y brindarme oportunidades de crecer profesionalmente.

Al personal del IOV, en especial al equipo de trabajo del Laboratorio de Genética Marina.

A la Prof. Carmen Alfonsi, por sus valiosos consejos de tutora y amiga, que con su paciencia y dedicación hizo posible esta meta.

A mi tutora Cárol Lárez, Por ser mi guía en este caminar, con su paciencia, comprensión y dedicación.

Al Señor Rubén Penott, jefe de la Estación de Investigaciones Marina Mochima del IDEA Mochima; por el apoyo prestado para el desarrollo de esta investigación.

A los profesores del Departamento de Biología, quienes sembraron en mí la semilla del conocimiento.

A la Comisión de Investigación de la Universidad de Oriente, quien financió este estudio, enmarcado en el proyecto bajo el código CI. 2-030601-1244/05.

A todos esos ángeles que Dios colocó en mi camino, cuyos nombres permanecen anónimos pero que de una u otra forma contribuyeron con este logro.

A todos ustedes, GRACIAS.

INDICE GENERAL

LISTA DE TABLAS	VII
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
RESUMEN	X
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	7
Colecta de organismos	7
Obtención de la FAAQMB	9
Cálculo del CL ₅₀	9
Bioensayo de toxicidad aguda	9
Extracción de hemolinfa	10
Ensayos citotóxicos.....	11
Viabilidad Celular (VC).....	11
Tiempo de Retención de Rojo Neutro (TRRN).....	11
Ensayos de genotoxicidad.....	12
Prueba de Micronúcleos (MN)	12
Ensayo Cometa	12
Análisis estadísticos.....	13
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
Pruebas de toxicidad aguda.....	14
Ensayos citotóxicos.....	15
Viabilidad celular.....	15
Tiempo de Retención de Rojo Neutro	16
Ensayos genotóxicos.....	18
Prueba de micronúcleos	18
Ensayo cometa	19
Estudio <i>in situ</i>	21
Viabilidad celular.....	21
Tiempo de Retención de Rojo Neutro	22

Prueba de micronúcleos	24
Ensayo cometa	25
CONCLUSIONES	29
APÉNDICES	30
BIBLIOGRAFÍA	32

LISTA DE TABLAS

Tabla		Pág.
1.	Estimaciones de las concentraciones letales medias (CL_{50}) a 96 horas, de distintos organismos marinos expuestos a distintos lubricantes disueltos en agua de mar.	15

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pág.
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, adscrita a la fundación de Investigaciones De Estudios Acuáticos (IDEA).	8
2. Viabilidad Celular en celomocitos de <i>L. variegatus</i> expuestos a distintas concentraciones subletales de FAAQMB durante 96 h, en condiciones controladas.	16
3. Tiempo de Retención de Rojo Neutro en celomocitos de <i>L. variegatus</i> , a distintas concentraciones subletales de FAAQMB en condiciones controladas, luego de 96 horas de exposición.	17
4. Micronúcleos en celomocitos de <i>L. variegatus</i> , a distintas concentraciones subletales de FAAQMB en condiciones controladas, luego de 96 horas de exposición.	19
5. Número de cometas en celomocitos de <i>L. variegatus</i> , de acuerdo al tipo de cometa, a distintas concentraciones subletales de FAAQMB en condiciones controladas, luego de 96 h de exposición.	20
6. Viabilidad celular (VC) en celomocitos de <i>L. variegatus</i> , 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/ sequía, Baja/sequía, Baja/lluvia y Alta/lluvia.	22
7. Tiempo de Retención de Rojo Neutro (TRRN) en celomocitos de <i>L. variegatus</i> 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/ sequía, Baja/sequía, Baja/lluvia y Alta/lluvia.	23
8. Micronúcleos en celomocitos de <i>L. variegatus in situ</i> , 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/ sequía, Baja/sequía, Baja/lluvia y Alta/lluvia.	24

9. Número de cometas en celomocitos de *L. variegatus in situ*, 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 + (H₂O₂) durante las temporadas Alta/ sequía (A), Baja/sequía (B), Baja/lluvia (C) y Alta/ lluvia (D).....26

RESUMEN

El constante tránsito de embarcaciones con motores fuera de borda en la bahía de Mochima trae como consecuencia la liberación de aceite en la columna de agua, que pudiera ser asimilado por la biota marina. Con el fin de evaluar las respuestas a distintos niveles celulares en *Lythechinus variegatus*, se sometieron 48 organismos a concentraciones subletales (0 %, 1 %, 3 % y 5 %) de la fracción acuosa de aceite quemado de motor de bote (FAAQMB), mediante un bioensayo de toxicidad aguda de 96 h con extracción interdiaria de hemolinfa en los organismos expuestos; partiendo de un CL₅₀ de 6,24%. Se midió el tiempo de retención de rojo neutro (TRRN) para estimar citotoxicidad y se aplicaron las pruebas de presencia de micronúcleos (Mn) y ensayo cometa para detectar daños del ADN. También se consideró la respuesta *in situ* en cuatro localidades localizadas en la bahía de Mochima (Mangle Quemao, Isla Larga, Sene Váquira y Cercanías IDEA), durante las épocas de lluvia y sequía, 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 FAAQMB (H=20,01 y P<0,001) luego de 96 h (H=14,78 y P<0,001); con presencia de cometas tipo1 (H=15,0172 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 época de sequía con mayor afluencia de turistas hubo daño significativo a distintos niveles celulares en *L. variegatus*; siendo similar para todas las localidades. Es posible que las concentraciones de FAAQMB en la bahía de Mochima sean mínimas y actualmente no generen alteraciones en la biota; aun así *L. variegatus* demostró ser una especie sensible al xenobiótico y con la aplicación de más pruebas bioquímicas y monitoreos ambientales, pudiese servir de alerta temprana para prevenir alteraciones poblacionales a largo plazo en esta zona del Parque Nacional Mochima.

INTRODUCCIÓN

La toxicidad derivada de la contaminación tiene diferentes efectos sobre los organismos acuáticos (Carballo *et al.*, 2010), quienes responden a tales efectos tóxicos de manera integral en sus diferentes niveles de organización: subcelular, celular, tejidos, órganos y sistemas (Uribe, 2008); lo que permite evaluar y predecir los cambios ambientales generados por el contaminante antes de que se manifiesten a nivel de población o comunidad (Espina y Vanegas, 2005).

El uso de organismos bentónicos para la evaluación de la calidad y/o condición ecológica de los ambientes marinos ofrece algunas ventajas (Diaz *et al.*, 2004; Ruellet y Dauvin, 2007), tales como: su escasa movilidad, los distintos niveles de tolerancia al estrés, respuesta a las perturbaciones ambientales, abundancia, distribución y su papel ecológico (Borja *et al.*, 2008; Patrício *et al.*, 2009).

Los erizos de mar son animales pequeños y espinosos que componen la clase Echinoidea en el phylum Echinodermata. Estos organismos se encuentran en todos los océanos del mundo, por lo general habitan en las aguas poco profundas. Se han utilizado como organismos modelo en biología desde los años 1800 después de la invención del microscopio (Smith *et al.*, 2006). Presentan simetría radial pentamérica durante su fase adulta. Poseen un sistema acuático vascular, un sistema nervioso simple y radial, y la reproducción sexual con fecundación externa (Branco *et al.*, 2014). Son exclusivamente marinos y están dotados de una capacidad muy limitada de la locomoción, lo que justifica su uso como biosensores ambientales (Coteur *et al.*, 2003).

En América, el erizo verde *Lytechinus variegatus* se distribuye desde el sureste de los Estados Unidos hasta Brasil (Hendler *et al.*, 1995); y en Venezuela desde las costas del estado Falcón hasta los estados Sucre y Nueva Esparta (Cruz Motta, 2007). Las poblaciones de *L. variegatus* son comunes en aguas tranquilas, especialmente en pastos de hierbas marinas; aunque son frecuentes sobre rocas o arena a poca profundidad (Espinoza *et al.*, 2008). Las espinas son verdes, rojizas, moradas o blancas, con una

longitud de hasta 20 mm y un diámetro entre 1 a 2 mm (Domínguez *et al.*, 2007).

En Venezuela se han realizado estudios en *L. variegatus* para determinar desarrollo larval en condiciones de laboratorio (Gómez, 2000, Gómez y Gómez, 2005), aspectos nutricionales (Buitrago *et al.*, 2003), el ciclo reproductivo (Montealegre y Gómez, 2005) y producción de larvas y postlarvas en condiciones de laboratorio (Buitrago y Lodeiros, 2005), desarrollo y crecimiento (Dominguez *et al.*, 2007). En el campo también se han estudiado aspectos referentes a: ecología de la especie en la bahía de Mochima (Rodríguez y Losada, 1986), biología del erizo verde en el estado Nueva Esparta (Montealegre, 1999), su abundancia en la isla de Margarita (Gómez, 2002), y la relación diámetro-peso, con proporción cromática en las islas de Margarita y Cubagua (Gómez, 2003).

Las células inmunes o celomocitos de los erizos de mar son un modelo útil para el estudio de la respuesta inmune ante la acción de compuestos tóxicos, ya que juegan un papel importante en los mecanismos de defensa, activados por las condiciones externas adversas, (Matranga *et al.*, 2000). Éstas son células libres en la cavidad celómica que pueden infiltrarse en los tejidos y órganos, actúan en respuesta a lesiones y agentes citotóxicos y ejercen la inmensa mayoría de las funciones inmunes (Ramírez y García, 2010).

Desde el año de 2000 se ha sugerido el uso de celomocitos, como biosensores ambientales. En la última década esclareció el uso de estas células y sus respuestas a los trastornos ambientales, reforzándolos y consagrándolos como indicadores para diferentes entornos de condiciones adversas. Existen cuatro tipos de celomocitos para los erizos de mar: amebocitos fagocíticos, esférulas rojas, esférulas incoloras y esférulas vibrátiles (Branco *et al.*, 2014), clasificadas como marcadores biológicos para diferentes factores de estrés ambientales como la contaminación por metales (Pinsino *et al.*, 2008) y la fracción soluble de aceite (Borges *et al.*, 2010). Son varios los estudios que han establecido cambios en la proporción de celomocitos de diferentes especies de erizos, entre ellos: *Lytechinus variegatus* (Koros, 1993), *Paracentrotus lividus* (Matranga *et al.*,

2000), *Strongylocentrotus purpuratus* (Hillier y Vacquier, 2003), *Echinometra lucunther* (Tucunduva y Machado, 2008) y *Strongylocentrotus droebachiensis* (Anglès d'Auriac *et al.*, 2014).

Una medida eficaz de evaluar la toxicidad ambiental relevante en los sitios contaminados es la aplicación de bioensayos; ya que integran la respuesta de los factores ambientales y de los compuestos tóxicos (Uribe, 2008). Para determinar las dosis subletales en ensayos de toxicidad aguda, es necesario calcular el valor de la concentración letal media de un contaminante (CL_{50}); prueba que se ha realizado antes en individuos adultos de los erizos *L. variegatus* y *Echinometra lucunther* provenientes de la bahía de Mochima, utilizando la fracción acuosa de aceite quemado de motor (Velásquez *et al.*, 2012); y en el desarrollo embrionario de *Paracentrotus lividus*, colectados en la bahía de Madagh (Algeria), expuestos a cuatro contaminantes metálicos, cadmio, cobre, plomo y zinc (Dermeche, *et al.*, 2012).

El uso de Biomarcadores (BKS) es un criterio útil, sensible y con mayor capacidad de integración de los efectos del contaminante sobre los organismos. Los BKS pueden definirse como respuestas o alteraciones bioquímicas, fisiológicas, morfológicas y/o histopatológicas a distintos niveles de organización biológica, ocasionadas por la exposición a contaminantes (Marigómez *et al.*, 2004; Rendón, 2005). Por otra parte, bioensayos que determinen daños citotóxicos y genotóxicos inducidos por concentraciones subletales de sustancias químicas son herramientas útiles en evaluaciones ecotoxicológicas; con protocolos cuantitativos, altamente sensibles y con una respuesta a corto plazo (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 de 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). Lowe *et al.* (1992) describieron el uso del ensayo de TRRN *in vitro* para demostrar el daño inducido por contaminantes en diferentes tipos de células del cangrejo *Limanda*

limanda. Canty *et al.* (2009) aplicaron TRRN en celomocitos de *Asterias rubens* y hemocitos de *Mytilus edulis* para comparar respuestas citotóxicas. Por su parte, Antón (2011) demostró estabilidad lisosomal en hemocitos del bivalvo *Pinctada imbricata* mediante el empleo de esta técnica.

Para la evaluación de microlesiones en el material genético existen dos técnicas ampliamente utilizadas: la inducción de Micronúcleos (MN) y el ensayo Cometa. Estos ensayos presentan ventajas respecto a los métodos citogenéticos por su alta sensibilidad, posibilidad de evaluarse en células que no se encuentran en división, no requieren del conocimiento detallado del cariotipo, son de bajo costo, así como también fáciles y rápidos de realizar (Zalacaín *et al.*, 2005; Lárez y Alfonsi, 2014).

La prueba de MN se fundamenta en el proceso de división celular, y su aparición puede ocurrir en diferentes momentos después del daño de ADN, dependiendo de la cinética y el mecanismo de la inducción. Cuando el material genético contenido en el núcleo se replica y divide equitativamente da lugar a dos células hijas idénticas, sin embargo este proceso puede darse de manera errónea, produciéndose pérdida cromosómica. El ADN que se desprende y que, por tanto no se incorpora correctamente al núcleo de la célula hija, origina un nuevo núcleo de menor tamaño que el primario denominado “micronúcleo”, visible fácilmente al microscopio óptico (Zalacaín *et al.*, 2005). El ensayo de MN fue desarrollado originalmente con especies de mamíferos (Hedle, 1983 citado por Bolognesi *et al.*, 2011) y hoy es ampliamente aplicado en peces y otros organismos acuáticos, incluidos los gusanos, mejillones, ostras, cangrejos y erizos de mar (Branco *et al.*, 2014).

La prueba de MN está considerada como un ensayo práctico, universalmente validado y accesible tecnológicamente, útil para evaluar la inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos (Zalacaín *et al.*, 2005). Por su parte, Bolognesi *et al.*, (2011) afirman que este procedimiento es más fácil y rápido que otros análisis microscópicos, considerando también que muchos organismos acuáticos tienen pequeños cromosomas difíciles de analizar. Algunos de los trabajos que destacan en cuanto a la aplicación de la

técnica de micronúcleos son el de Siu *et al.* (2004), quienes evaluaron la respuesta de *Perna viridis* expuestos al Benzopireno; y en la comparación de respuestas genotóxicas del mejillón *Mytilus edulis* y la estrella de mar *Asterias Rubens* sometidos a dos agentes tóxicos: metanosulfonato de metilo y ciclofosfamida (Canty *et al.*, 2009). También se ha realizado esta prueba en monitoreos ambientales, ejemplo de esto fue la evaluación de contaminación en las costas algerianas, utilizando al bivalvo *Mytilus galloprovincialis* (Taleb *et al.*, 2007).

Por otro lado, el ensayo cometa basado en la migración de fragmentos provenientes de la ruptura del ADN durante la electroforesis, dando la apariencia de la cola de un cometa, es utilizado para lesiones en sitios álcali-lábiles del ADN (Zhu *et al.*, 2005). Comparado con otros ensayos de genotoxicidad, el ensayo cometa se distingue por su demostrada sensibilidad para detectar bajos niveles de daño al ADN, rápida realización, análisis de los datos a nivel de células individuales, pequeño tamaño de la muestra requerida, flexibilidad y bajo costo, aplicable a cualquier población de células eucariotas (Collins, 2004). Se ha aplicado ensayo cometa a los bivalvos *Cassostrea virginica* (Nacci *et al.*, 1996), *M. galloprovincialis* para evaluar los efectos del derrame petrolero en las costas gallegas en condiciones de laboratorio (Laffon *et al.*, 2006), *M. edulis* y la estrella de mar *A. rubens*, estableciendo comparaciones de las respuestas genotóxicas de ambas especies en dos localidades del Reino Unido sometidos a agentes tóxicos (Canty *et al.*, 2009).

En Venezuela, el medio marino no está exento a la contaminación por xenobióticos. En las costas del estado Sucre han incrementado significativamente los niveles de contaminantes en los ecosistemas marino-costeros, especialmente en sedimentos, valores que posiblemente se encuentren asociados a procesos de industrialización, tráfico marítimo y otras actividades antropogénicas (Zapata, 2012). La bahía de Mochima junto con el Golfo de Santa Fe, constituye parte de la zona marino-costera del Parque Nacional Mochima y representa una región 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 masa de agua.

El aceite usado de motor de botes es un líquido de color pardo a negro que puede ejercer impacto sobre los ecosistemas marinos, por la presencia de sus componentes potencialmente tóxicos, tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos, compuestos clorados y metales pesados (Nusetti *et al.*, 2005; Antón, 2011). Parte de estos genotóxicos pueden solubilizarse, haciéndose persistentes en la masa de agua, disponibles para la biota a través de sedimentos y alimentos (Espina y Vanegas, 2005). Por tal motivo se hace imprescindible realizar evaluaciones ecotoxicológicas en organismos representativos de los sistemas ecológicos, con el fin de establecer los efectos que pueden causar dosis no letales de xenobióticos (Zapata, 2012).

En el presente estudio se seleccionó al erizo verde *Lytechinus variegatus*, considerado como una de las especies bentónicas con mayor valor de constancia y abundancia en la bahía de Mochima (Hidalgo *et al.*, 1999) como posible organismo modelo que pudiese dar respuesta a la incertidumbre de los efectos del aceite quemado de motores fuera de borda sobre la biota.

Las respuestas a distintos niveles celulares de *L. variegatus*, expuestos a la FAAQMB acumulada en la masa de agua, pudiesen en un futuro, de una manera no invasiva, dar un aporte para el desarrollo de planes o programas de conservación de la bahía de Mochima.

Con el fin de evaluar las respuestas citotóxicas y genotóxicas en celomocitos del erizo verde como especie sensible a la contaminación de la bahía de Mochima, se realizó un bioensayo de toxicidad aguda; empleando como agente contaminante la FAAQMB, complementado con un monitoreo espacio-temporal *in situ* en cuatro localidades, durante los tiempos de lluvia y sequía, alternados con las temporadas de alta y baja afluencia de turistas.

METODOLOGÍA

Colecta de organismos

Los organismos se colectaron de forma manual, tanto para los ensayos de laboratorio como para el *in situ*; y fueron seleccionados de acuerdo a su talla (7 a 8,50 cm de longitud total, medida con Vernier), diámetro (4 a 5 cm aproximadamente, medido con Vernier) y peso (150 g a 200 g en balanza digital APX-200). Los ejemplares destinados al bioensayo y las muestras del estudio *in situ* (refrigeradas) fueron trasladados hasta el laboratorio de Genética del Instituto Oceanográfico de Venezuela.

La colecta de las unidades experimentales tuvo lugar en la bahía de Mochima, situada dentro del Parque Nacional Mochima, en la vertiente norte de la cordillera de la costa nororiental del país; entre los 10°24'55''-10°20'02'' N y 64°19'30'' - 64°22'30'' O, con un área superficial aproximada de 29 km² (Figura 1). Es un cuerpo de agua largo y semi-estrecho. La anchura es muy variable, desde 0,3 km en la zona más estrecha hasta 3,5 km en la más ancha. Se abre al norte por una boca de 1,7 km de ancho y una profundidad de 60 m aproximadamente (Cervigón *et al.*, 1988).

De acuerdo con las características fisicoquímicas del agua de la Bahía de Mochima descritas originalmente por Cervigón (1988), los diferentes parámetros ambientales muestran cierta estacionalidad relacionados con los periodos de sequía y lluvia. La temperatura presenta un intervalo de variación que oscila de 20 °C a 28 °C. La salinidad varía muy poco estacionalmente y tiene un valor medio de $36,6 \times 10^{-3}$ (Ruiz, 1995).

Cuatro localidades de la bahía de Mochima fueron destinadas 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 (Figura 1). Los muestreos se realizaron tomando en cuenta las temporadas de sequía (desde noviembre de 2013 hasta abril del 2014) y lluvia (desde Mayo 2014 hasta noviembre 2014), de acuerdo a lo establecido en el boletín climatológico del Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMEH, 2014). También se tomó en cuenta la

afluencia de turistas en distintas épocas del año 2014, considerando las temporadas altas correspondientes a diciembre del 2013 (navidad) y agosto del 2014 (vacaciones) y las temporadas bajas en los períodos intermedios con pocos visitantes; distribuyendo los muestreos de la siguiente manera:

1. Diciembre 2013: Temporada de sequía con alta afluencia de turistas.
2. Marzo 2014: Temporada de sequía con baja afluencia de turistas.
3. Mayo 2014: Temporada de lluvia con baja afluencia de turistas.
4. Agosto 2014: temporada de lluvia con alta afluencia de turistas (Apéndice 1).

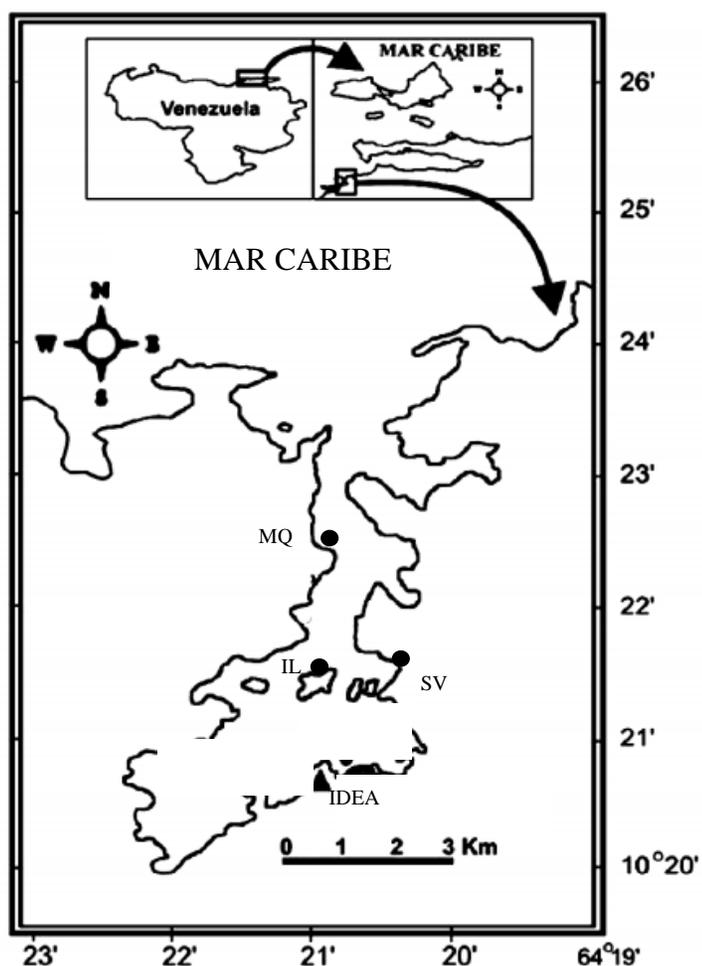


Figura 1. Ubicación geográfica del área de muestreo en la bahía de Mochima, Venezuela: Mangle Quemao (MQ), Isla Larga (IL), Sene Váquira (SV) y cercanías de la Estación de Investigaciones Marina Mochima, adscrita a la fundación de Investigaciones De Estudios Acuáticos (IDEA).

Obtención de la FAAQMB

Se obtuvo la FAAQMB a partir de una mezcla de aceite quemado de motor y de agua de mar filtrada en una relación 1:9 v/v. Para la realización de esta mezcla se tomó un volumen de 200 ml del aceite lubricante, y se diluyó en 1800 ml de agua de mar filtrada en un matraz erlenmeyer de 2000 ml de capacidad.

La mezcla resultante se mantuvo en agitación constante (con magnetos sobre planchas de agitación) durante un período de 24 horas, a temperatura ambiente y se dejó reposar durante una hora. Luego, por separación diferencial utilizando un embudo de separación rudimentario, se colectó la fracción acuosa, empleada como solución patrón (100% v/v), descartando la capa más densa de aceite (Antón, 2011).

Cálculo del CL₅₀

Para la realización del CL₅₀ (con una réplica) previamente fueron aclimatados los ejemplares de *L. variegatus* durante siete días aproximadamente, en los tanques disponibles en la estación de investigaciones marina de Mochima, con agua de mar filtrada (salinidad 36 ‰; pH $7,6 \pm 0,2$; temperatura 25 ± 1 °C) y aireación constante.

Se expusieron 50 organismos (5 organismos por tratamiento, con una réplica), a 5 concentraciones ascendentes de la FAAQMB (0, 3, 5, 7 y 9%) durante 96 h, con monitoreo cada 24 h, evaluando la mortalidad de los individuos a fin de determinar la concentración que resulta letal para el 50% de los organismos (CL₅₀). Para ello, se empleó el programa desarrollado por Stephan *et al.* (1978); mediante un ensayo estático, sin recambio de agua; de acuerdo a lo sugerido por Zapata y Pedrero (2008).

Bioensayo de toxicidad aguda

Para las pruebas de toxicidad aguda con dosis subletales los organismos de *L. variegatus* adultos fueron transportados vivos en cavas desde la Estación de Investigaciones Marinas de Mochima, hasta el laboratorio de genética del Instituto Oceanográfico de Venezuela (IOV), aclimatados durante una semana en acuarios (40 L de capacidad) con

agua de mar filtrada (salinidad 36 ‰; pH $7,6 \pm 0,2$; temperatura 25 ± 1 °C) y aireación constante.

Para el estudio *in situ* fueron capturados diez organismos de las cuatro localidades, en cada muestreo temporal realizado (para un total de 160 individuos); los cuales fueron regresados a su entorno (Apéndice 2). La hemolinfa extraída se resguardó en tubos de ensayo con buffer ISO-EDTA en una relación 1:3. Las muestras fueron refrigeradas y transportadas en cavas hasta el laboratorio de genética del IOV para los estudios de laboratorio.

A partir del CL_{50} calculado (con un valor de 6,24% para la FAAQMB) se determinaron las dosis subletales para determinar los daños a distintos niveles celulares en los celomocitos de *L. variegatus*. Se expusieron 48 organismos en acuarios rectangulares de 6 L de capacidad (6 individuos en cada acuario, con una réplica) a las distintas concentraciones subletales (0, 1, 3 y 5%), con aireación constante durante 96 h, monitoreos cada 24 h y extracción interdiaria de hemolinfa en los organismos expuestos para realizar estudios de daños a distintos niveles celulares a las 0, 48 y 96 h.

Extracción de hemolinfa

La extracción de hemolinfa se llevó a cabo las 0, 24, 48 y 96 h. Se realizó punción directa a la región oral de *L. variegatus*, utilizando una jeringa hipodérmica de 5 ml de capacidad. Se extrajeron cuidadosamente 5 ml del fluido, y fue almacenado en tubos de ensayo de 20 ml de capacidad, contentivos de buffer ISO-EDTA: TRIS (trishidroximetilaminometano) 1 M, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 1M, NaCl 1M y agua de mar filtrada y esterilizada, en una relación 1:3.

La hemolinfa se centrifugó a una baja velocidad (800 rpm) durante 5 min, a fin de concentrar los celomocitos del fluido inicial (tanto para el bioensayo, como para las muestras *in situ*). El precipitado fue lavado y resuspendido 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.

Ensayos citotóxicos

Viabilidad Celular (VC)

Mediante la tinción con azul Tripano fue posible la diferenciación entre células viables (translúcidas) y no viables (teñidas de azul), y así determinar el porcentaje de viabilidad celular en celomocitos de *L. variegatus*. En este procedimiento, una suspensión de celomocitos (25 μ l) se mezcló con una solución al 0,4% de colorante (25 μ l). Las células fueron observadas por microscopía óptica con una magnificación de 400X. Se usó la cámara de Neubauer para contar el número de células viables y concentración celular total (expresada en porcentaje).

Tiempo de Retención de Rojo Neutro (TRRN)

La citotoxicidad de los compuestos puede ser abordada a través de pruebas cuyo fundamento es la absorción de colorantes supravitales. Tal es el caso de la aplicación de la prueba con Rojo Neutro, cuya acumulación ocurre por entrapamiento de la forma protonada del colorante dentro del ambiente ácido del lisosoma o por unión a cargas ácidas fijas, tales como polisacáridos ácidos dentro de la matriz del lisosoma. Como respuesta se observa una disminución en la capacidad de las células para asimilar y retener al colorante Rojo Neutro en el interior del organelo la cual es indicadora de la estabilidad lisosomal (Antón, 2011).

Para el Tiempo de Retención de Rojo Neutro (TRRN) se preparó una solución madre de rojo neutro (RN) con 20 mg del colorante (Sigma Chemical, St. Louis) en 1 ml de dimetil sulfóxido (Lowe y Pipe, 1994); a partir de la cual se obtuvo la solución de trabajo, usando 10 μ l de la solución madre de RN y 5 ml de agua de mar con EDTA.

Se añadieron 10 μ l de hemolinfa y 10 μ l de la solución de trabajo de RN; y se midió el tiempo de retención de RN. Las muestras fueron observadas a 400X, identificando las células que presenten una coloración o pigmentación roja en el citosol como células dañadas, con ciertas dificultades de englobar el líquido en sus lisosomas. 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.

Ensayos de genotoxicidad

Prueba de Micronúcleos (MN)

Se aplicó la prueba de Micronúcleos (MN) en celomocitos descrita por Jha (2004), con algunas modificaciones. Se extendieron 200 μ l de hemolinfa cuidadosamente sobre un portaobjetos y se dejaron secar al aire durante 30 min; los portaobjetos se fijaron en metanol durante 15 min, seguido de una tinción con Giemsa (5%) durante 20 min. El exceso de colorante se eliminó por lavado dos veces en agua destilada. Una vez secas las láminas portaobjetos se examinaron bajo el microscopio para observación de MN en mil células.

Ensayo Cometa

Para el ensayo cometa, láminas portaobjetos fueron recubiertas previamente con 150 μ l de agarosa y debidamente rotuladas. Se colocaron 25 μ l de hemolinfa sobre la lámina recubierta de agarosa seguida una nueva capa de 150 μ l de agarosa. Los portaobjetos se incubaron a continuación en solución de lisis pH 10 (NaCl 2,5 mM, TRIS 10 mM y EDTA 100 mM) durante 1 h; después se lavaron con agua destilada y se colocaron en la cámara electroforética previamente llena con buffer de electroforesis (EDTA 1 mM y NaOH 300 mM), durante 20 minutos. Se aplicaron 20V durante 10 min y luego se sacaron las láminas para ser sumergidas en buffer neutralizante (para evitar cambios bruscos de pH). Los mic rogeles replicados en los portaobjetos se tiñeron con bromuro de Etidio y se observaron en un microscopio de epifluorescencia.

El conteo de cometas se realizó según el tamaño de la cola por clasificación visual, recomendada por Collins (2004). El método consiste en clasificar el nivel de daño en 5 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, dando la apariencia de la cola de un cometa, es utilizado para lesiones en sitios álcali-lábiles del ADN (Zhu *et al*, 2005).

Análisis estadísticos

Se estimaron y compararon daños a distintos niveles celulares en celomocitos de *L. variegatus* luego de un bioensayo de toxicidad aguda; mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, ya que los datos no cumplieron con los supuestos del Análisis de Varianza (ANOVA).

Para el estudio *in situ* se analizaron las respuestas citotóxicas y genotóxicas mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa computarizado Statgraphics Centurión, de acuerdo a lo establecido en Sokal y Rohlf (2009).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta investigación se evidenció la efectividad que presenta *L. variegatus* para modular sus respuestas citotóxicas y genotóxicas en presencia de concentraciones subletales de la FAAQMB; fundamentadas en la variación del TRRN, inducción de micronúcleos y formación de cometas. Estas variables también se estimaron en la respuesta *in situ* del erizo verde, en cuatro localidades de la bahía de Mochima, durante un biomonitoreo espacio-temporal con diferentes niveles de afluencia turística y pluviosidad, lo que complementó la información.

Pruebas de toxicidad aguda

La concentración letal media (CL_{50}) para los organismos expuestos fue 6,24% de la FAAQMB (Apéndice 3). Esta prueba tiene una gran relevancia en los programas de monitoreo ambiental, para determinar las fuentes, los efectos y la toxicidad de los compuestos provenientes en las descargas industriales y urbanas (Zapata y Pedrero, 2008).

Las pruebas de toxicidad aguda son de gran utilidad porque permiten la construcción de bases de datos para la comparación de la sensibilidad de las especies a los contaminantes o de la toxicidad de un grupo de compuestos en una especie en particular, de una manera rápida y económica (Ramírez y Mendoza, 2008); y en este estudio permitió la comparación de la sensibilidad que tiene *L. variegatus* en relación a otras especies que han sido propuestas como organismos centinelas en la evaluación de los cambios que se suscitan en las zonas marino-costeras, especialmente en presencia de contaminantes.

En la tabla 1 se puede observar que *L. variegatus* es menos tolerante a la presencia de lubricantes disueltos en el agua que otros equinodermos, como el erizo negro *Echinometra lucunter* cuyo CL_{50} para las mismas concentraciones de FAAQMB fue de 7,34%, con diferencias estadísticamente significativas (Velásquez *et al.*, 2012). También resultó ser más sensible que algunos bivalvos como *Pinctada imbricata*, el cual fue tolerante al 100% de la fracción acuosa del fuel oil n°6 (Nusetti *et al.*, 2004) y al 83% de

la FALUMV, de acuerdo a lo determinado por Antón (2011); y que otros invertebrados marinos como el poliqueto *Eurythoe complanata*, con un CL₅₀ de 13,99% de FALUMV (Nusetti *et al.*, 2005).

Tabla 1 Estimaciones de las concentraciones letales medias (CL₅₀) a 96 horas, de distintos organismos marinos expuestos a distintos lubricantes disueltos en agua de mar.

Especie	Contaminante	CL ₅₀	Referencia
<i>Pinctada imbricata</i>	Fuel oil n°6	100%	Nusetti <i>et al.</i> , (2004)
<i>Eurythoe complanata</i>	FALUMV	13,99%	Nusetti <i>et al.</i> (2005)
<i>Pinctada imbricata</i>	FALUMV	83%	Antón (2011),
<i>Echinometra lucunter</i>	FAAQMB	7,34%	Velásquez <i>et al.</i> , (2012)
<i>Lytechinus variegatus</i>	FAAQMB	6,24%	Este trabajo

Ensayos citotóxicos

Viabilidad celular

Mediante la tinción con azul tripano fue posible la diferenciación entre células viables (translúcidas) y no viables (teñidas de azul); y así se determinó el porcentaje de VC. 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); con una proporción viable de células sobre el 80% de los celomocitos contados en la cámara de Neubauer para todas las concentraciones durante las 96 h de exposición, tal como se muestra en la figura 3.

Estudios previos empleando lubricantes usados disueltos en agua de mar obtuvieron un porcentaje de células viables en otros invertebrados marinos similar a los del erizo verde. Sánchez (2008) estimó el porcentaje de viabilidad en hemocitos de *Lima scabra* expuestos a FALUMV (88–97%) sin diferencias significativas durante 3 días de exposición. Antón (2011) estimó el porcentaje de viabilidad (PV) de hemocitos en *Pinctada imbricata* expuestos a la FALUMV a los 3 días, los organismos presentaron PV entre 88-94% en todos los grupos experimentales. Zapata *et al.* (2012) empleando

tinción diferencial con eosina amarilla (0,1%) en agua de mar filtrada y estéril, también determinó la viabilidad celular en hemocitos de *Perna viridis*, con promedios similares (78,50-89,40%).

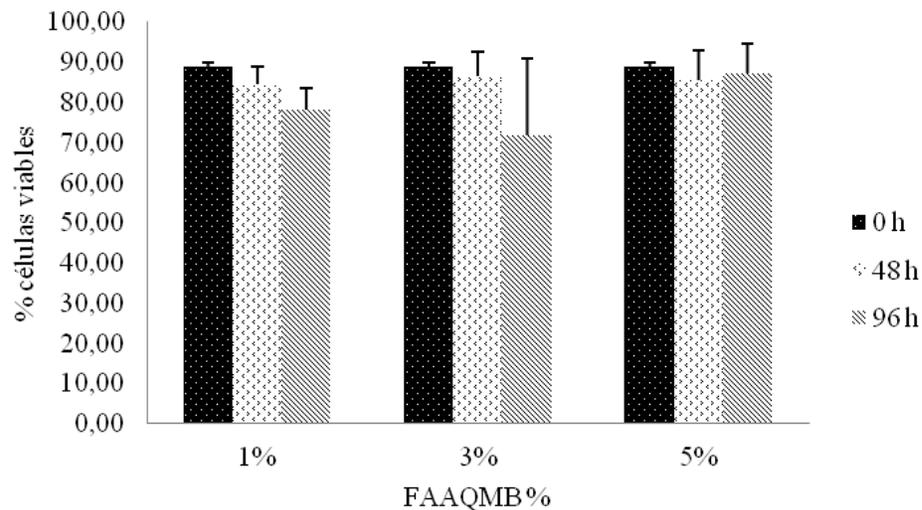


Figura 2. Viabilidad Celular en celomocitos de *L. variegatus* expuestos a distintas concentraciones subletales de FAAQMB durante 96 h, en condiciones controladas.

Con este método se garantizó la integridad de la membrana y número de células vivas para la realización de las pruebas genotóxicas; ya que una viabilidad menor del 70% de las células diana, debe considerarse como toxicidad no aceptable para la realización del ensayo cometa (Zúñiga, 2009).

Tiempo de Retención de Rojo Neutro

La evaluación de la citotoxicidad de un xenobiótico es un dato clave a la hora del análisis de los resultados (Zuñiga, 2009). En la figura 3 se observa el TRRN en celomocitos de *L. variegatus*, a distintas concentraciones subletales de la FAAQMB en condiciones controladas, durante las 96 horas de exposición. Se observaron diferencias significativas en relación al tiempo de exposición al contaminante ($H=10,76$ y $P<0,01$), indistintamente de la concentración de FAAQMB aplicada, pues las diferencias estadísticas para este factor no fueron significativas ($H=5,24$ y $P> 0,1$).

Este marcador citoplasmático indicó una evidente reducción en la capacidad lisosomal para retener el colorante en organismos, después de 96 h de exposición. 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. Este daño está asociado a una alta incidencia de desestabilización de las membranas lisosomales, que a su vez podría influenciar la reducción de la viabilidad celular. 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).

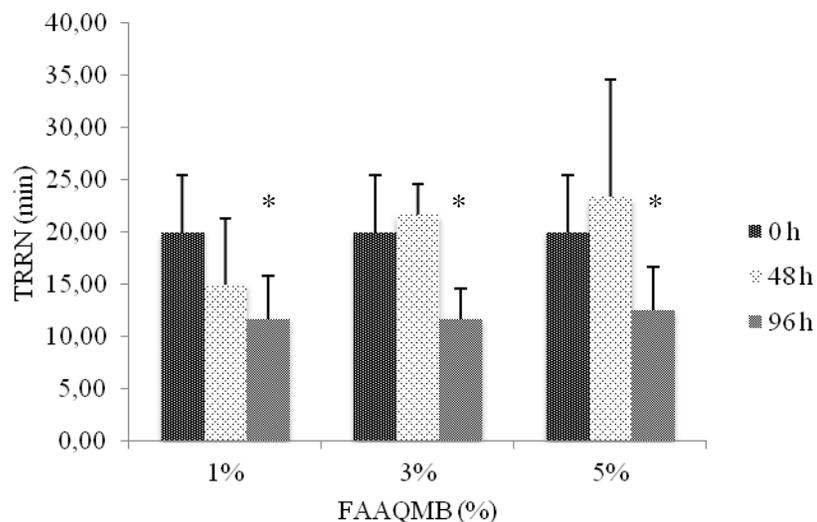


Figura 3. Tiempo de Retención de Rojo Neutro en celomocitos de *L. variegatus*, a distintas concentraciones subletales de FAAQMB en condiciones controladas, luego de 96 horas de exposición.

Estudios previos aportan información sobre la disminución de la estabilidad lisosomal en otros organismos acuáticos. Antón (2011) afirma que ejemplares del bivalvo *Pinctada imbricata* expuestos a las crecientes concentraciones de FALUMV presentaron poblaciones de hemocitos con baja capacidad de retener el colorante rojo neutro, mostrando una relación proporcional entre dosis usadas y la respuesta obtenida, ya que el tiempo mínimo para observarse daños a nivel lisosomal fue estimado en una hora. Por su parte, Zapata *et al.* (2012) encontraron que el porcentaje de hemocitos de *Perna*

viridis con reducida capacidad de retener en sus compartimientos lisosomales el rojo neutro fue significativamente alto en los organismos colectados, observándose efectos celulares en los primeros 15 minutos de ensayo. Estos resultados son comparables con los obtenidos en *L. variegatus* durante el presente estudio, siendo similar su respuesta ante exposición prolongada a la fracción soluble de lubricantes usados. Las células celómicas de bivalvos y el erizo verde son marcadores de estrés efectivos a este nivel celular.

Ensayos genotóxicos

Prueba de micronúcleos

La presencia de micronúcleos evidenció un estrés significativo en los celomocitos de *L. variegatus*, durante las 96 h de exposición a la FAAQMB. La formación de pequeños núcleos circundantes en el citoplasma respondió a la concentración del xenobiótico y el tiempo de exposición.

En la figura 4 se puede observar una respuesta similar entre los individuos expuestos al 1% y 3% de contaminante; mientras que los expuestos al 5 % del xenobiótico, reflejaron un incremento en la formación de pequeños núcleos ($H=20,02$ 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.

Es posible que la tolerancia de los celomocitos a este nivel celular se vea potencialmente afectada cuando los individuos son expuestos de forma prolongada a una dosis subletal cercana al CL_{50} en este mismo estudio; comprometiendo la integridad de la actividad mitótica en los celomocitos y por ende generando la presencia de pequeños fragmentos citoplasmáticos contentivos de cromatina (MN) no incorporados en los núcleos hijos durante la anafase de división celular. Otros estudios hacen referencia a la incidencia de MN en condiciones controladas, con un índice de MN menor que el producido por la FAAQMB en *L. variegatus*. Saotome y Hayashi (2003) evaluaron la frecuencia de MN en embriones del erizo *Hemicentrotus pulcherrimus*, la cual aumentó directamente con la

concentración de Mitomicina C (5,7 ‰). Dallas *et al.* (2013) determinaron que la influencia del Ni tuvo un efecto significativo en la incidencia de MN de *Mytilus galloprovincialis*, (8,49 MN por 1000 células). Por su parte, Siu *et al.* (2004) aplicaron la prueba de MN para la detección de genotoxicidad en hemocitos de *Perna viridis* por acción de Benzopireno, con una frecuencia de 2,13‰. Estos últimos autores mencionados, afirman que la rotura de cadenas de ADN y la formación de micronúcleos en los hemocitos de *Perna viridis* pueden ser potencialmente utilizados como biomarcadores convenientes de la exposición a genotóxicos en el medio marino.

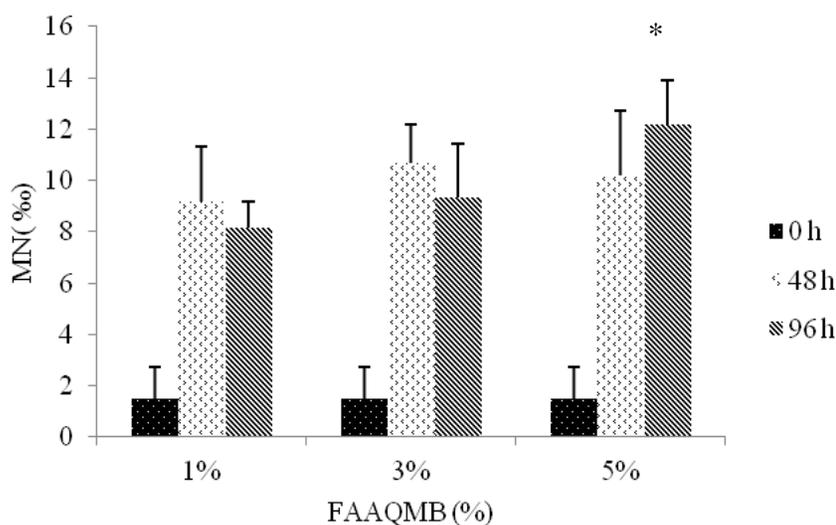


Figura 4. Micronúcleos en celomocitos de *L. variegatus*, a distintas concentraciones subletales de FAAQMB en condiciones controladas, luego de 96 horas de exposición.

Ensayo cometa

Los individuos expuestos al xenobiótico respondieron a las distintas concentraciones de la FAAQMB, con diferencias estadísticas muy significativas con respecto al grupo control. La figura 5 representa gráficamente el número de cometas en celomocitos de *L. variegatus*, en condiciones controladas. Fue posible observar 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 del 1% de la exposición a la FAAQMB, 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). Este resultado permite inferir que, los celomocitos responden de forma efectiva a la presencia de la FAAQMB, reflejando cometas con mayor rotura de cadenas de ADN conforme aumenta la concentración del contaminante.

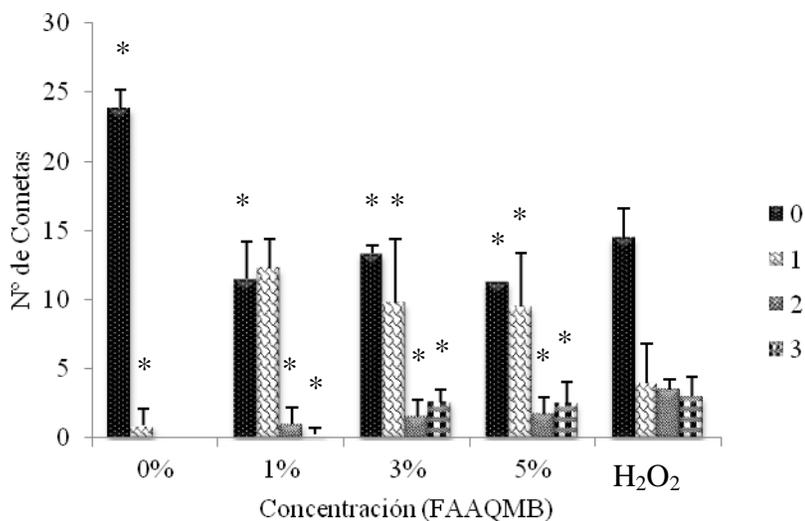


Figura 5. Número de cometas en celomocitos de *L. variegatus*, de acuerdo al tipo de cometa, a distintas concentraciones subletales de FAAQMB en condiciones controladas, luego de 96 h de exposición.

Este resultado fue similar al obtenido por Siu *et al.* (2004) quienes demostraron una relación dosis-respuesta entre el nivel de roturas de la cadena de ADN y las concentraciones de Benzopireno en hemocitos de *P. viridis*; cuando compararon el contenido de ADN en la cola y la longitud de la cola en los cometas. Bhagat e Ingole (2015) también mostraron que el daño del ADN en las células del caracol marino *Planaxis sulcatus* aumentó al aumentar el tiempo de exposición al Cloruro de Mercurio (HgCl₂); y su sensibilidad a la contaminación por metales. Estos estudios reafirman la utilidad de ensayo cometa para la detección de daños en el ADN tras la exposición a potenciales compuestos genotóxicos. Canty *et al.* (2009), realizaron estudios integrados de laboratorio dirigidos a múltiples respuestas de biomarcadores en la estrella de mar (*Asterias rubens*) y el mejillón (*Mytilus edulis*) expuestos a una gama de concentraciones de genotoxinas de acción directa e indirecta: Sulfonato de Metilo Metano (MMS) y Ciclofosfamida (CP), respectivamente, con el fin de determinar si la

genotoxicidad expresada produce efectos en los niveles más elevados de organización biológica. Se observaron relaciones claras de dosis-respuesta en cada especie, siendo el equinodermo la especie más sensible. Los autores concluyeron que los equinodermos son relativamente más sensibles que los moluscos bivalvos. 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; aún así *L. variegatus* parece responder de forma similar a los invertebrados marinos antes mencionados, considerándose un sensor efectivo.

La efectividad del ensayo se corroboró al utilizar como agente inductor genotóxico conocido Peróxido de Hidrógeno (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).

Estudio *in situ*

Se evidenció la respuesta del erizo verde a distintos niveles celulares, en condiciones naturales. Un monitoreo espacio-temporal probó a *L. variegatus* como posible sensor ambiental en cuatro localidades de la bahía de Mochima (Isla Larga, Sene Váquira, Mangle Quemao y las cercanías al IDEA) considerando los periodos de pluviosidad y la afluencia turística.

Viabilidad celular

Los organismos estudiados mostraron una viabilidad celular óptima para todas las localidades y las distintas estaciones del año; con diferencias no significativas para el factor localidad ($H=0,68$ y $P > 0,05$) y altamente significativas para la época del año ($H=28,60$ y $P < 0,001$); de modo que, la pluviosidad y/o la presencia antrópica pudieran tener relevancia en la alteración de la estabilidad de las células celómicas.

Durante la época de sequía disminuyó considerablemente el número de células viables, cuando la afluencia de turistas era mayor, con apenas un 79,06% de VC en Isla Larga. En contraste, al disminuir la presencia de los temporadistas, se incrementó el número de células vivas, con membranas íntegras, en un 90,52% VC en Sene Váquira. La época lluviosa mantuvo valores intermedios de celomocitos vivos, en comparación los de la estación de sequía, oscilando entre 81,69% en temporada baja y 88,78% en temporada alta (figura 6).

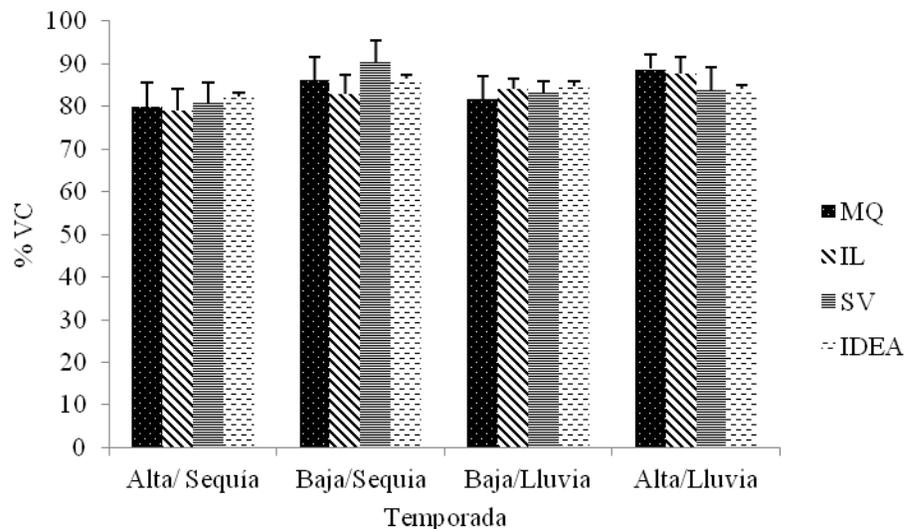


Figura 6. Viabilidad celular (VC) en celomocitos de *L. variegatus*, en cuatro localidades de la bahía de Mochima: Mangle Quemao (MQ), Isla Larga (IL), Sene Váquira (SV) y Estación IDEA (IDEA), durante las temporadas alta/ sequía, Baja/sequía, Baja/ lluvia y Alta/lluvia.

Tiempo de Retención de Rojo Neutro

Para determinar citotoxicidad se midió el TRRN *in situ*, en celomocitos de *L. variegatus*. Los resultados estadísticos mostraron diferencias no significativas para las cuatro localidades de la bahía de Mochima ($H= 1,24$ y $P>0,05$); y diferencias significativas entre el tiempo de retención del colorante y la época del año ($H=94,79$ y $P<0,01$); Siendo la temporada alta, aunada al tiempo de sequía, el periodo de mayor estrés citotóxico para *L. variegatus*.

En la figura 7 se observa claramente una alteración de la estabilidad de las membranas lisosomales durante la época de sequía, con una alta afluencia de turistas; reflejada en la disminución de su capacidad para retener el RN a 4 min aproximadamente. Mientras que, durante la época de lluvia el TRRN alcanzó 21,4 min, cuando era temporada alta. Posiblemente, los factores relacionados a la escasa pluviosidad durante la época de sequía generaron el estrés ambiental causante de la perturbación en el óptimo funcionamiento de los celomocitos.

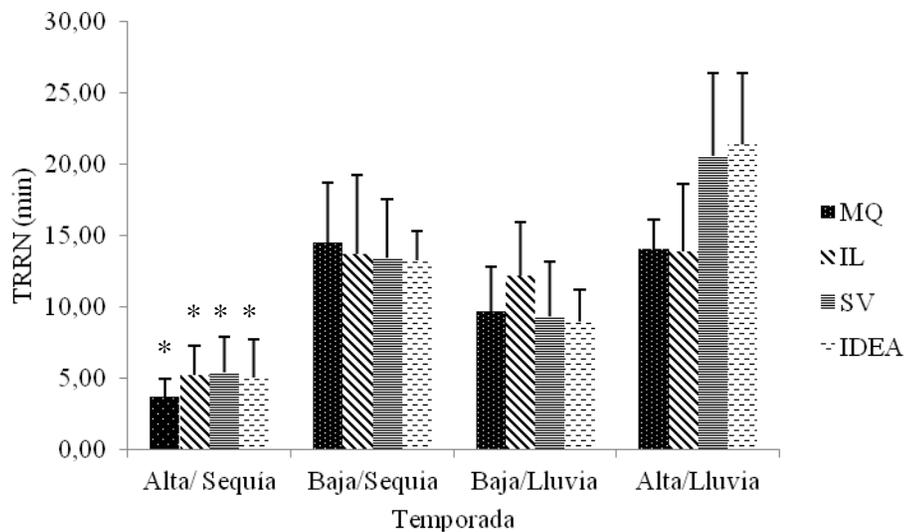


Figura 7. Tiempo de Retención de Rojo Neutro (TRRN) en celomocitos de *L. variegatus* en cuatro localidades de la bahía de Mochima: Mangle Quemao (MQ), Isla Larga (IL), Sene Váquira (SV) y Estación IDEA (IDEA) durante las temporadas alta/ sequía, Baja/sequía, Baja/ lluvia y Alta/ lluvia.

Al respecto, Taleb *et al.* (2007), infirieron un descenso en el tiempo de retención del rojo neutro en hemocitos de *Mytilus galloprovincialis* en zonas con altos niveles de contaminación orgánica en el mar mediterráneo; y sugieren que el nivel de estrés del organismo es proporcional a la contaminación de las aguas circundantes, en particular, por los hidrocarburos poliaromáticos, que tienden a estar bioacumulados en algunos orgánulos como los lisosomas, induciendo la desestabilización continua de la membrana lisosomal. Otros estudios han afirmado que durante el verano, el aumento de la temperatura del agua reduce la estabilidad de la membrana lisosomal (Tremblay *et al.*,

1998, citado por Taleb *et al.*, 2007), lo que pudiera explicar la disminución en el TRRN para los ejemplares de *L. variegatus* estudiados.

Prueba de micronúcleos

La prueba de Kruskal-Wallis estimó diferencias no significativas para el factor localidad ($H=3,27$ y $P > 0,01$) y diferencias significativas para el factor temporada ($H=8,80$ y $P < 0,01$) en la prueba de MN, aun cuando el número de anomalías no excedía a 2 células micronucleadas. En la figura 9 se puede observar que la mayor incidencia de MN se presentó durante la época de sequía, cuando la afluencia de turistas era mayor (alta/sequía), con un valor de 2 ‰ en la localidad de Mangle Quemao (MQ). Este resultado pudiera deberse a la presencia antrópica, aunada a la contaminación acumulada en un periodo de escasa pluviosidad (INAMEH, 2014).

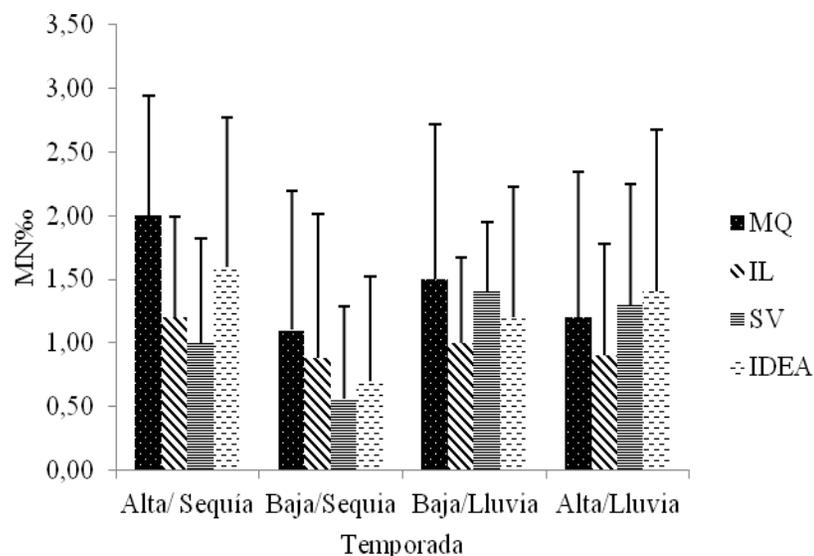


Figura 8. Micronúcleos en celomocitos de *L. variegatus in situ*, en cuatro localidades de la bahía de Mochima: Mangle Quemao (MQ), Isla Larga (IL), Sene Váquira (SV) y Estación IDEA (IDEA), durante las temporadas alta/ sequía, Baja/sequía, Baja/ lluvia y Alta/ lluvia.

Saotome y Hayashi (2003) utilizaron el ensayo de MN en erizos de mar para evaluar la contaminación marina en la bahía de Tokio; obteniendo una respuesta hiposmótica a la baja salinidad del agua de mar, en lugar de a los contaminantes químicos, como se

esperaba (con una frecuencia desde 3,8 hasta 24,8 ‰;) en comparación con la frecuencia (5,8 ‰) inducida por mitomicina C en una proporción de 10 g/ml para el control positivo.

Ensayo cometa

Los celomocitos del erizo verde respondieron de forma efectiva, con un número elevado de núcleos íntegros en relación a los presentes en los bioensayos y a los obtenidos por exposición al H₂O₂. La comparación estadística del número de cometas con distintos tipos de daño entre las distintas localidades y temporadas, arrojó diferencias significativas sólo durante la temporada sequía, cuando la afluencia de turistas era mayor, específicamente en la localidad de Mangle Quemao (Apéndice 4). Este resultado pudiera ser consecuencia de la escasa movilidad del agua durante la época de sequía, concentrando los contaminantes presentes, acentuado por la presencia antrópica en la temporada alta.

La figura 10 muestra en forma detallada el número de cometas en celomocitos de *L. variegatus* obtenido del monitoreo espacio-temporal, clasificados según el tipo de cola observados bajo el microscopio de fluorescencia; y comparados con un agente inductor conocido (H₂O₂). Es posible observar que hay poca presencia de daños tipo 1 y 2 en los ejemplares estudiados, por lo que se infiere que en general, las perturbaciones ambientales no comprometieron el correcto funcionamiento a este nivel celular; sólo los ejemplares de Mangle Quemao presentaron diferencias estadísticas muy significativas, en relación a las otras localidades sólo durante la temporada de sequía con mayor afluencia de turistas (alta/sequía). 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, expuestos a la FAAQMB como agente genotóxico; y probar la efectividad del erizo verde como sensor biológico de

contaminación. En primera instancia fue posible evidenciar el efecto citotóxico producto de la exposición de 96 h al contaminante aún a bajas concentraciones, observado en la disminución del TRRN. También se reflejó la genotoxicidad en la presencia de MN, acentuada cuando los organismos se expusieron durante 96 h a altas dosis subletales de FAAQMB. En el ensayo cometa, las lesiones encontradas en el ADN del erizo verde se observaron en todas las dosis de FAAQMB. Esto se debió a la eliminación de las proteínas acompañantes del ADN y el desenrollamiento del mismo lo que permitió un mayor acceso del xenobiótico utilizado, corroborando la sensibilidad de esta técnica.

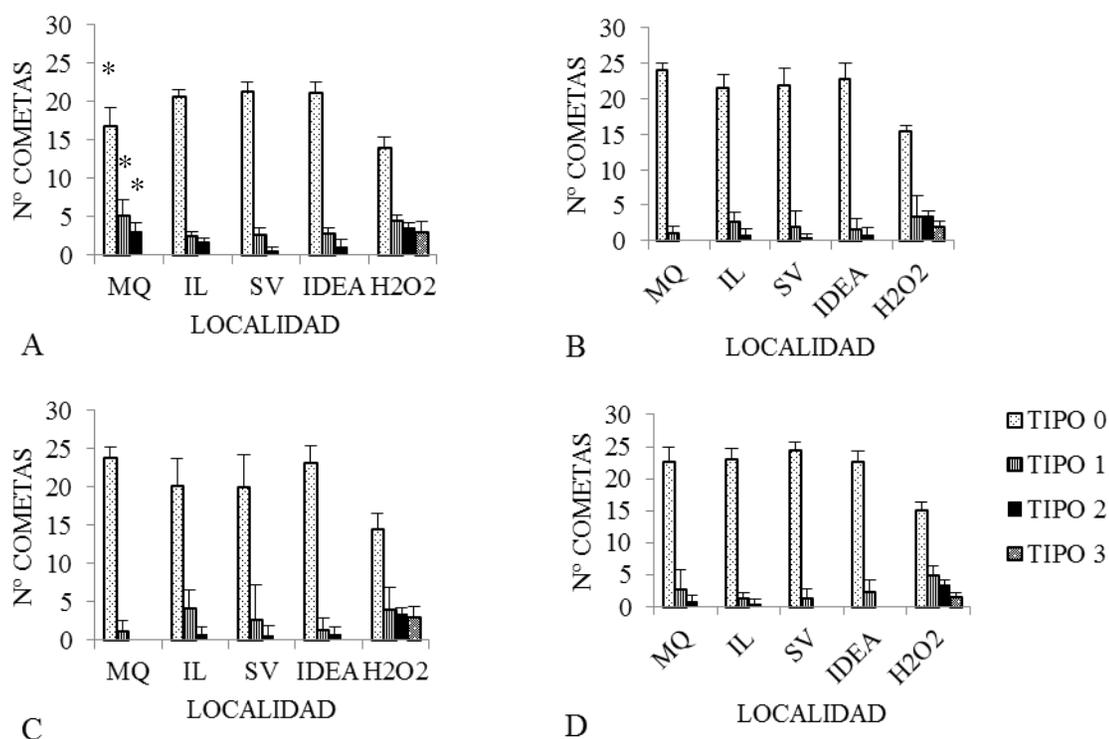


Figura 9. Número de cometas en celomocitos de *L. variegatus* in situ, en cuatro localidades de la bahía de Mochima: Mangle Quemao (MQ), Isla Larga (IL), Sene Váquira (SV) y Estación IDEA (IDEA), comparado con un control + (H_2O_2) durante las temporadas Alta/ sequía (A), Baja/sequía (B), Baja/lluvia (C) y Alta/ lluvia (D).

Los celomocitos del erizo verde *in situ* mantuvieron un funcionamiento celular y genético eficiente, en contraste con los resultados obtenidos en los bioensayos. Se evidenció un incremento significativo en la respuesta a distintos niveles celulares en la época de menor pluviosidad, cuando la escasa movilidad de agua y la evaporación

concentran los posibles contaminantes en la columna de agua; aunada a la temporada alta, donde el tráfico de botes y la influencia antrópica es mayor. *L. variegatus* pudiera usarse 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.

CONCLUSIONES

El erizo verde (*L. variegatus*) resultó ser una especie sensible a la contaminación producida por la FAAQMB, con un LC₅₀ de 6, 24 %.

A nivel citotóxico, el tiempo de exposición al contaminante comprometió significativamente la integridad de las membranas lisosomales, aún a bajas concentraciones.

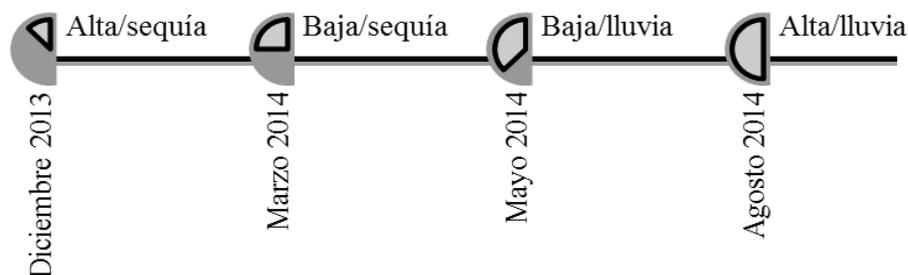
Se evidenció pérdida de ADN con respecto a las distintas concentraciones de FAAQMB y el tiempo de exposición. Con un incremento en el número de micronúcleos al 5 % de FAAQMB, luego de 96 h de exposición y la presencia de cometas tipo 0, 1, 2, y 3 en función de las concentraciones subletales.

En el estudio *in situ* de *L. variegatus*, los celomocitos emitieron una respuesta efectiva ante las posibles perturbaciones ambientales durante la temporada alta que coincide con la época de sequía, a distintos niveles celulares, para las cuatro localidades.

En contraste con las respuestas obtenidas por los mismos marcadores bajo condiciones controladas, los celomocitos del erizo verde *in situ* mantuvieron un funcionamiento celular y genético eficiente. *L. variegatus* pudiera ser utilizado como sensor de contaminación en monitoreos regulares para futuras evaluaciones de calidad de agua en la bahía de Mochima.

APÉNDICES

Apéndice 1. Distribución espacio temporal de los muestreos realizados para la evaluación de las respuestas citotóxicas y genotóxicas en celomocitos de *L. variegatus* en la bahía de Mochima.



Apéndice 2. Número de organismos capturados durante los muestreos espacio-temporales en las distintas localidades de la bahía de Mochima.

Muestreos Localidad	Alta/sequía	Baja/sequía	Baja/lluvia	Alta/lluvia
Mangle Quemao	10	10	10	10
Sene Váquira	10	10	10	10
Isla larga	10	10	10	10
Cercanías IDEA	10	10	10	10

Apéndice 3. CL_{50} para *L. variegatus* sometido a distintas concentraciones de la FAAQMB, empleando el Método de Logit.

RESULTADOS CALCULADOS USANDO EL MÉTODO DE LOGIT					
CONCENTRACIÓN (%)	EXPUESTOS	MUERTOS	MUERTE (%)	LOG (10)	VALOR LOGIT
9	5	5	100	0,954	2,1972
7	5	3	60	0,845	0,4055
5	5	0	0	0,699	-2,1972
3	5	0	0	0,477	-2,1972
CONTROL	5	0	0		
$LC_{50} = 6,24\%$					
CON UN 95% DE CONFIANZA. LÍMITES DE 3,9 Y 12%					

Apéndice 4. Comparación estadística del número de cometas de distintos tipos, entre e localidades y temporadas de muestreo en el estudio in situ.

tipo de cometa/Localidad	Temporada	Valor H	Valor P
0	Alta/Sequía	12,23	0,01*
	Baja/Sequía	5,39	0,14
	Baja/Lluvia	4,52	0,21
	Alta/Lluvia	1,06	0,79
1	Alta/Sequía	10,35	0,02*
	Baja/Sequía	0,6	0,9
	Baja/Lluvia	7,89	0,05
	Alta/Lluvia	3,07	0,38
2	Alta/Sequía	13,69	0,003**
	Baja/Sequía	5,52	0,14
	Baja/Lluvia	2,83	0,42
	Alta/Lluvia	8,5	0,05
	Localidad	H	P
Tipo de cometa/Temporada	Localidad	Valor H	Valor P
0	MQ	13,72	0,003**
	IL	6,93	0,07
	SV	2,34	0,5
	IDEA	3,4	0,33
1	MQ	11,35	0,01*
	IL	7,59	0,05
	SV	1,56	0,67
	IDEA	4,89	0,18
2	MQ	18,13	0,0004***
	IL	8,19	0,05
	SV	3,81	0,28
	IDEA	1,65	0,65

BIBLIOGRAFÍA

Anglès d'Auriac, M.; Hobaek, A.; Christie, H.; Gundersen, H.; With Fagerli, C.; Haugstetter, J. y Norderhaug, K. 2014. New microsatellite loci for the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* using universal M13 labelled markers. *BMC Research Notes*. Disponible en <<http://www.biomedcentral.com/1756-0500/7/699>> (27/01/15).

Antón, M. 2011. Parámetros citológicos, inmunológicos y estabilidad lisosomal en hemocitos del bivalvo *Pinctada imbricata* expuesto a fracciones solubles de lubricantes usados de vehículos. Trabajo de pregrado. Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.

Benítez, R. 2007. Efecto del cadmio sobre la población celular celómica y su acumulación en los tejidos del tunicado *Pyura vittata* (Stimpson, 1852). Trabajo de pregrado. Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.

Benítez, R. 2012. Caracterización parcial de proteínas enlazadoras de cadmio en *Ascidia nigra* (Savigny, 1816). Para optar al título de *Magister Scientiarum* en biología aplicada, mención ecotoxicología. Cumaná. Venezuela.

Bhagat, J. e Ingole, B. 2015. Genotoxic potency of mercuric chloride in gill cells of marine gastropod *Planaxis sulcatus* using comet assay. *Environmental Science and Pollution Research*. 22: 10758.

Bolognesi, C. y Hayashi, M. 2011. Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis* 26: 205-213.

Borges, J.; Branco, P.; Pressinotti, L.; Severino, D. y Silva, J. 2010. Cristaloides intranucleares de erizos de mar de la Antártida como un biomarcador de la contaminación por petróleo. *Polar Biology*, 33: 843-849.

Borja, A.; Bricker, S.; Dauer, D.; Demetriades, N.; Ferreira, J.; Forbes, A.; Hutchings, X.; Jia, P.; Kenchington, R.; Marques, J. y Zhu, C. 2008. Overview of integrative tools and methods in assessing ecological integrity in estuarine and coastal systems worldwide. *Marine Pollution Bulletin*, 56: 1519-1537.

Branco P.; Figueiredo D. y Da Silva J. 2014. Nuevos conocimientos sobre el sistema inmunitario innato de erizo de mar: coelomocytes como biosensores para el estrés ambiental. *OA Biología* 2: 2.

Buitrago, E. y Lodeiros, C. 2005. Producción de larvas y postlarvas del erizo verdiblanco del Caribe *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea) en condiciones de cultivo. *Revista de Biología Tropical*, 53: 319-328.

Buitrago, E.; Lodeiros, C.; Lunar, C.; Indorf, F.; Frontado, K.; Pulido, M. y Vásquez, Z.

2003. Efecto de la densidad larvaria sobre el desarrollo, crecimiento y supervivencia del erizo *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea). 31P^{STP} Scientific meeting of the Association of marine laboratories of the Caribbean, Trinidad & Tobago.

Canty, M.; Hutchinson, T.; Brown, R.; Jones, M. y Jha, A. 2009. Linking genotoxic responses with cytotoxic and behavioural or physiological consequences: Differential sensitivity of echinoderms (*Asterias rubens*) and marine molluscs (*Mytilus edulis*). *Aquatic Toxicology*, 94: 68–76.

Caraballo, L. 1968. Sedimentos recientes de la Bahía de Mochima. *Boletín del Insituto. Oceanográfico de Venezuela*, 7 (2): 45 – 64.

Carballo, O.; Arencibia, G.; Concepción, J. e Isla Molleda, M. 2010. Los Bioensayos de Toxicidad en Sedimentos Marinos. *RETEL, revista de toxicología en línea*, p. 33-69 Disponible en < <http://hdl.handle.net/1834/3670>>.

Cervigon, E.; Manrique, R y Mendez, E. 1988. La ictiofauna de la Bahía de Mochima. Estación de Investigaciones Marinas de Mochima, *Fundaciencia*.

Collins, A. 2004. The Comet Assay for DNA Damage and Repair. Principles, Applications, and Limitations. *Molecular Biothechnology*; 26: 249-259.

Coteur, G.; Gosselin, P.; Wantier, P.; Chambost-Manciet, Y.; Danis, B.; Pernet, P.; Warnau, M. y Dubois, P. 2003. Echinoderms as Bioindicators, Bioassays, and Impact Assessment Tools of Sediment Associated Metals and PCBs in the North Sea. *Environmental Contamination and Toxicology*, 45(2): 190-202.

Cruz-Motta, J. 2007. Análisis espacial de las comunidades tropicales intermareales asociadas a los litorales rocosos de Venezuela. *Ciencias Marinas*, 33: 133-148.

Dallas, L.; Bean, T.; Turner, A.; Lyons, B. y Jha, A. 2013. Oxidative DNA damage may not mediate Ni-induced genotoxicity in marine mussels: Assessment of genotoxic biomarkers and transcriptional responses of key stress genes. *Mutation Research*, 754: 22-31.

Dermeche, S.; Chahrour, F. y Boutiba, Z. 2012. Evaluation of the toxicity of metal pollutants on embryonic development of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) (Echinodermata Echinoidea). *Biodiversity Journal*, 3(3): 165-172.

Díaz, R.; Solan, M. y Valente, R. 2004. A review of approaches for classifying benthic habitats and evaluating habitat quality. *Journal of Environmental Management*, 73: 165–181.

Domínguez, A.; Rosas, J.; Velásquez, A.; Cabrera, T. y Mata, E. 2007. Desarrollo, supervivencia y crecimiento del erizo *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816) (Echinodermata: Echinoidea) alimentado con microalgas a dos salinidades y temperaturas diferentes. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 42: 49-57.

Espina S. y Vanegas C. 2005. Ecotoxicología y contaminación. En: *Golfo de México Contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias*. Botello, A.; Rendón, J.; Gold, G. y Agraz, C. (eds). Segunda Edición, Universidad Autónoma de Campeche México, 79-120 pp.

Espinoza, G.; Reyes, J.; Himmelman, J. y Lodeiros C. 2008. Actividad reproductiva de los erizos *Lytechinus variegatus* y *Echinometra lucunter* (Echinodermata: Echinoidea) en relación con factores ambientales en el Golfo de Cariaco, Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, 56: 341-350.

Gómez, A. 2000. Abundancia de *Lytechinus variegatus* (Echinoidea: Toxopneustidae) en la isla de Cubagua, Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, 48: 125-131.

Gómez, A. 2002. Abundancia de erizo *Lytechinus variegatus* (Lamarck) en la costa Norte, Este y Oeste de la Isla de Margarita (Venezuela). *Acta Científica Venezolana*, 53: 15-20.

Gómez, A. 2003. Relación diámetro-peso y proporción cromática del erizo *Lytechinus variegatus* (Echinoidea: Toxopneustidae) en las islas de Margarita y Cubagua, Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, 51: 83-86.

Gómez, O. y Gómez, A. 2005. Desarrollo embrionario y larval de *Lytechinus variegatus* (Echinoidea: Toxopneustidae) en condiciones de laboratorio en la Isla de Margarita-Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, 53: 313-318.

Gross, P.; Al Sharif, W.; Clow, L. y Smith, L. 1999. Inmunidad Equinodermo y la evolución del sistema de complemento. *Developmental and Comparative Immunology*, 23: 429 - 442.

Hendler, G.; Miller, J.; Pawson, D. y Kier, P. 1995. *Sea stars, sea urchins, and allies: Echinoderms of Florida and the Caribbean*. Smithsonian Institutions. Washington, USA.

Hidalgo, L.; Méndez, E.; Martínez, L. y López, I. 1999. Estructura ecológica de los equinodermos en cuatro estaciones de la bahía de Mochima, edo. Sucre Venezuela. *Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela*, 38: 163.

Hillier, B. y Vacquier, V. 2003. Amassin, an olfactomedin protein, mediates the massive intercellular adhesion of sea urchin coelomocytes. *The Journal of Cell Biology*, 160: 597-604.

INAMEH. 2014. Boletín climatológico mensual Disponible en <www.inameh.gob.ve>. (13/02/15).

Jha, A. 2004. Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 552: 1-17.

Koros, A. 1993. Neuroendocrine marker expression on sea urchin coelomocytes and other immunoregulatory parameters may be used to monitor environmental changes. *Marine Environmental Research*, 35: 137-140.

Laffon, B.; Aldao, I.; Pérez, B.; Pásaro, E. y Méndez, J. 2006. Primer paso en los efectos del fuel prestige sobre el medio ambiente marino: biodisponibilidad, bioacumulación y daño en el ADN. *Ciencias Marinas*, 32: 389-399.

Lárez, C. y Alfonsi, C. 2014. Genotoxicidad en células sanguíneas de *Ancistrus brevifilis* (eigenmann, 1920); (siluriformes, loricariidae) bajo condiciones controladas y en dos localidades del río Manzanares, estado Sucre, Venezuela. *Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela*, 53 (1): 65-77.

Lowe, D. y Pipe, R. 1994. Contaminant induced lisosomal membrane damage in marine mussel digestive cells: an in vitro study. *Aquatic Toxicology*, 30: 357-365.

Lowe, D.; Moore, M. y Evans, B. 1992. Contaminant impact on interactions of molecular probes with lysosomes in living hepatocytes from *Limanda limanda*. *Marine Ecological Progress Series*, 91: 131-140.

Marigómez, I.; Soto, M.; Orbea, A.; Cancio, I. y Cajaraville, M. 2004. Biomonitoring of environmental pollution along the basque coast, using molecular, cellular and tissue level biomarker: an integrative approach. En: *Oceanography marine of environment of the basque Country*. Borja, A. y Collins, M. (eds). Elsevier science, Amsterdam, 335-364 pp.

Márquez, B.; Marín, B.; Díaz, J. y Troccoli, L. 2008. Biomasa, densidad y composición zooplanctónica de la bahía de Mochima, Venezuela. *Gayana* 72 (1):52-67.

Matranga, V.; Toia, G.; Bonaventura, R. y Muller, W. 2000. Cellular and Biochemical responses to environmental and experimentally induced stress in sea urchin coelomocytes. *Cell Stress & Chaperones*, 5: 113-120.

Montealegre, S. 1999. Aspectos biológicos de erizo *Lytechinus variegatus* (Lamarck) (Echinodermata: Echinoidea: Toxopneustidae) en tres localidades del sur de la Isla de Margarita, Venezuela. Trabajo de grado. Escuela de Ciencias Aplicadas del Mar, Universidad de Oriente, Boca de Río.

Montealegre, S. y Gómez, A. 2005. Ciclo reproductivo de *Lytechinus variegatus* (Echinoidea: Toxopneustidae) en el sur de la Isla de Margarita, Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, 53: 305-312.

Muniz, P.; Lana, P.; Venturini, N.; Elias, R.; Vallarino, E.; Bremec, C.; Martins, C. y Sandrini, L. 2013. Un manual de protocolos para evaluar la contaminación marina por efluentes domésticos, 130 pp.

- Nacci, D.; Cayula, S. y Jackim, E. 1996. Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. *Aquatic Toxicology*, 35: 197-210.
- Nusetti, O.; Marcano, L.; Zapata, E.; Esclapés, M.; Nusetti, S. y Lodeiros, C. 2004. Respuestas inmunológicas y de enzimas antioxidantes en la ostra perla *Pinctada imbricata* (Mollusca: Pteridae) expuesta a niveles subletales de fuel oil No. 6. *Interciencia* 29: 324–329.
- Nusetti, O.; Zapata, E.; Esclapés, M. y Rojas, M. 2005. Antioxidant enzymes and tissue regeneration in *Eurythoe complanata* (Polichaeta: Amphinomididae) exposed to used vehicle crankcase oil. *Archives Environmental Contaminants Toxicology*, 48: 1.
- Patrício, J.; Neto, J.; Teixeira, H.; Salas, F. y Marques, J. 2009. The robustness of ecological indicators to detect long-term changes in the macrobenthos of estuarine systems. *Marine Environmental Research*, 68: 25-36.
- Pinsino, A.; Della Torre, C.; Sammarini, V.; Bonaventura, R.; Amato, E. y Matranga, V. 2008. Sea urchin coelomocytes as a novel cellular biosensor of environmental stress: a field study in the Tremeiti Island Marine Protected Area, Southern Adriatic Sea, Italy, *Cellular Biologic Toxicology*, 24: 541-52.
- Quintero, A.; Bonilla, J.; Serrano, L.; Amaro, M.; Rodríguez, B; Terejova, G. y Figueroa, Y. 2004. Características ambientales de la bahía de Mochima y adyacencias de la cuenca de Cariaco, Venezuela. *Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela*, 43 (1 y 2): 49-64.
- Ramírez y García, 2010. Echinoderm immunity. USA, *ISJ* 7: 211-220.
- Ramírez y Mendoza, 2008. *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo: La experiencia en México*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales Instituto Nacional de Ecología. México, D. F. 414 pp.
- Rendón, J. 2005. Uso de biomarcadores en ecosistemas acuáticos. En: *Golfo de México Contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias*. Botello, A., Rendón, J.; Gold, G. y Agraz-Hernández, C. (eds). Segunda Edición, Universidad Autónoma de Campeche México, 121-140 pp.
- Rodríguez, J. y Losada, F. 1986. Efecto del apareamiento de *Lytechinus variegatus* y *Echinometra lucunter* sobre las comunidades marinas de la bahía de Mochima, Venezuela. *Boletín del Instituto de Oceanografía de Venezuela*, 25: 69-84.
- Ruellet, T. y Dauvin, J. 2007. Benthic indicators: Analysis of the threshold values of ecological quality classifications for transitional waters. *Marine Pollution Bulletin*, 54: 1707-1714.
- Ruiz, A. 1995. Biomasa y productividad foliar de *Thalassia testudinum* banks ex konig

en la bahía de Mochima, edo. Sucre, Venezuela. Trabajo de pregrado. Departamento de Biología. Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.

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. Trabajo de Pregrado. Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.

Saotome, K.; y Hayashi, M. 2003. Application of a sea urchin micronucleus assay to monitoring aquatic pollution: influence of sample osmolality. *Mutagenesis* 1(18): 73-76.

Siu, W.; Cao, J.; Jack, R.; Wu, R.; Richardson, B.; Xu, L. y Lama, P. 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*). *Aquatic Toxicology*, 66:381-39.

Smith, L.; Rast, J.; Brockton, V.; Terwilliger, D.; Nair, S.; Buckley, K. y Majeske, A. 2006. The sea urchin immune system. *ISJ, immune sistem journal* 3: 25-39.

Sokal, R. y Rohlf, F. 2009. *Introduction to Biostatistics*. Segunda edición. Ed. Blume. Madrid. 366 pp.

Stephan, C.; Brush, K.; Smith, R.; Burke, J. y Andrew, R. 1978. A computer program for calculating an LC₅₀. En: *Protocolos estándares para bioensayos de toxicidad con especies acuáticas y terrestres*. Rodríguez, J. y Escaplés, M. (eds). Versión 2.0. PDVSA. INTEVEP.

Taleb, Z.; Benghali, S.; Kaddour, A. y Boutiba, Z. 2007. Monitoring the biological effects of pollution on the Algerian west coast using mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Oceanología*, 49: 543-564.

Tucunduva, M. y Machado, J. 2008. Innate immune response in the sea urchin *Echinometra lucunter* (Echinodermata). *Journal of Invertebrate Pathology*, 98: 58-62

Uribe, R. 2008. Ensayo de citotoxicidad aguda con celomocitos de la lombriz de tierra *Eisenia foetida*. En Ramírez y Mendoza (eds). Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo: La experiencia en México. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales Instituto Nacional de Ecología. Mexico, D:F. 225- 232 pp.

Velásquez, T.; Lárez, C. y Alfonsi, C. 2012. Lc₅₀ en *Echinometra lucunter* y *Lytechinus variegatus* provenientes de la bahía de Mochima, utilizando la fracción acuosa de aceite quemado de motor. IX Congreso científico UDO, Sucre.

Zalacain, M.; Sierrasesúmaga, L. y Patiño, A., 2005. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *Anales del Sistema sanitario de Navarra*, 28: 227-236.

Zapata, E. 2012. *Eurythoe complanata* Pallas, 1766 (Polychaeta: Amphinomidae) como organismo sensor de contaminación en costas del estado Sucre, Venezuela. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Doctor en Ciencias Marinas. Universidad de Oriente. 160 p.

Zapata, E.; Rojas L.; Sánchez, G. y Barreto, M. 2012. Metales pesados y biomarcadores relacionados en *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae) recolectado en las costas del estado Sucre, Venezuela. *Ciencias Marinas*, 38 (3): 517–528

Zapata y Pedrero, 2008. Ensayo de toxicidad aguda con larvas y juveniles de los peces tilapia, carpa y cíclidos. En Ramirez y Mendoza (eds). *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo: La experiencia en México*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales Instituto Nacional de Ecología. Mexico, D. F. 155-166 pp.

Zhu, L.; Huang, Y. y Liu, G. 2005. Using DNA damage to monitor wáter enviroment. *Chin. J. Oceanol. Limnol.*, 23 (3): 340-348

Zuñiga, L. 2009. Optimizaciones metodológicas del ensayo cometa y su aplicación en monitorización humana. Tesis Doctoral en Genética, Universidad Autónoma de Barcelona, España.

HOJA DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6

Título	RESPUESTAS CITOTÓXICAS Y GENOTÓXICAS DEL ERIZO DE MAR <i>Lytechinus variegatus</i> UTILIZANDO LA FRACCIÓN ACUOSA DE ACEITE QUEMADO DE MOTOR DE BOTE, CON UN MONITOREO ESPACIO-TEMPORAL EN LA BAHÍA DE MOCHIMA, VENEZUELA. (Modalidad: Tesis de Grado)
---------------	--

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Velásquez Beaufond Thais Andreina	CVLAC	20344449
	e-mail	Thaina44@hotmail.com
	e-mail	velbeaufond@gmail.com

Palabras o frases claves:

<i>Lytechinus variegatus</i>
Citotoxicidad
Genotoxicidad
Bahía Mochima
Biosensor

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Biología	

Resumen (abstract):

El constante tránsito de embarcaciones con motores fuera de borda en la bahía de Mochima trae como consecuencia la liberación de aceite en la columna de agua, que pudiera ser asimilado por la biota marina. Con el fin de evaluar las respuestas a distintos niveles celulares en *Lythechinus variegatus*, se sometieron 48 organismos a concentraciones subletales de (0 %, 1 %, 3 % y 5 %) de la fracción acuosa de aceite quemado de motor de bote (FAAQMB), mediante un bioensayo de toxicidad aguda de 96 h con extracción interdiaria de hemolinfa en los organismos expuestos; partiendo de un CL₅₀ de 6,24%. Se midió el tiempo de retención de rojo neutro (TRRN) para estimar citotoxicidad y se aplicaron las pruebas de presencia de micronúcleos (Mn) y ensayo cometa para detectar daños del ADN. También se consideró la respuesta *in situ* en cuatro localidades localizadas en la bahía de Mochima (Mangle Quemao, Isla Larga, Sene Váquira y Cercanías IDEA), durante las épocas de lluvia y sequía, 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 FAAQMB (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=15,0172 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 época de sequía con mayor afluencia de turistas hubo daño significativo a distintos niveles celulares en *L. variegatus*; siendo similar para todas las localidades. Es posible que las concentraciones de FAAQMB en la bahía de Mochima sean mínimas y actualmente no generen alteraciones en la biota; aun así *L. variegatus* demostró ser una especie sensible a la FAAQMB y con la aplicación de más pruebas bioquímicas y monitoreos ambientales, pudiese servir de alerta temprana para prevenir alteraciones poblacionales a largo plazo en esta zona del Parque Nacional Mochima.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

Contribuidores:

Apellidos Nombres	y	ROL / Código CVLAC / e-mail	
LÁREZ CAROL	ROL	CA	<input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	14285478	
	e-mail	carollarez@gmail.es	
	e-mail		
ALFONSI CARMEN	ROL	CA	<input checked="" type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	5880562	
	e-mail	calfonsir@hotmail.com	
	e-mail		
SALAZAR SINATRA	ROL	CA	<input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	10.047.204	
	e-mail	ssalazar@udo.edu.ve	
	e-mail		
ZAPATA EDGAR	ROL	CA	<input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	12269219	
	e-mail	ezapatavivenes@gmail.com	
	e-mail		

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

2017	03	17
------	----	----

Lenguaje: **SPA**

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
VELÁSQUEZ T.docx	Aplication/Word

Alcance:

Espacial : **Nacional** **(Opcional)**

Temporal: **Temporal** **(Opcional)**

Título o Grado asociado con el trabajo:

Licenciatura en Biología

Nivel Asociado con el Trabajo:

Licenciatura

Área de Estudio:

Biología

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

Universidad de Oriente

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CUN°0975

Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano
Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ
Vicerrector Académico
Universidad de Oriente
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.

UNIVERSIDAD DE ORIENTE
SISTEMA DE BIBLIOTECA
RECIBIDO POR Martínez
FECHA 5/8/09 HORA 5:30

Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

JUAN A. BOLANOS CUNVELO
Secretario



C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

JABC/YGC/manuja

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 6/6

Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009): “Los trabajos de grados son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y solo podrá ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Concejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Concejo Universitario, para su autorización”.

Thais Velásquez

Autor

Carol Lárez

Asesora

Carmen Alfonsi

Co-asesora

Sinatra Salazar

Jurado principal

Edgar Zapata

Jurado principal