



ARTÍCULO ORIGINAL

Efecto del Diclofenaco sobre la fecundación de *Tetrapygnus niger* “erizo negro de mar”

Effect of Diclofenac on the fertilization of *Tetrapygnus niger* “black sea urchin”

Gina Zavaleta-Espejo¹, José Saldaña-Jiménez¹, Willian Blas-Cerdán¹ y Deyvi Meléndez – Rodríguez¹

¹ Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo

RESUMEN

El diclofenaco es un (AINES) cuyo nombre químico es 2-[2-[(2,6-diclorofenil) amino] fenil] acético, que posee propiedades analgésicas y antiinflamatorias. En la presente investigación se evaluó el efecto del diclofenaco a diferentes concentraciones sobre la fecundación de *Tetrapygnus niger* “erizo negro de mar”. Cada grupo experimental estuvo conformado por cinco gotas de óvulos y dos gotas de espermatozoides en 120 mL, de agua de mar previamente filtrada a un pH 7,1 y a la temperatura de 19 ± 1 °C; expuestos a 25 ppm; 50 ppm, 75 ppm y 100 ppm del diclofenaco. La determinación del efecto del diclofenaco en el proceso de fecundación se realizó a través del recuento de óvulos que presentaron la membrana de fertilización a los 30 minutos de exposición. Los resultados obtenidos evidencian que a mayor concentración del diclofenaco a 100 ppm disminuye el porcentaje de fecundación hasta alcanzar un 36%; esto se debería probablemente a que el fármaco estaría ocasionando la desestabilización de la membrana plasmática del espermatozoide, no permitiendo el normal proceso de fecundación. Por otro lado el análisis de varianza mostró diferencias significativas entre las diferentes concentraciones, conformando cuatro grupos estadísticamente homogéneos en función a su efecto.

Palabras claves: Diclofenaco, fecundación, *Tetrapygnus niger*, óvulo, espermatozoide.

ABSTRACT

Diclofenac is a (AINES) whose chemical name is 2 - [2 - [(2, 6 - dichlorophenyl) amino] phenyl] acetic, which has analgesic and antiinflammatory properties. In this research was evaluated the effect of different concentrations of diclofenac on the process of fertilization of *Tetrapygnus niger* “black sea urchin”. Each experimental group consisted of five drops of eggs and two drops of sperm in 120 mL of previously filtered seawater at pH 7.1 and temperature of 19 ± 1 °C, exposed to 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm and 100 ppm of diclofenac. Determining the effect of diclofenac in the fertilization process was performed by counting of eggs presented fertilization membrane at thirty minutes of exposure. The results obtained show that the higher concentration of diclofenac at 100 ppm decreases the percentage of fertilization until it reaches 36%; this is probably due to the fact that the drug would be causing the destabilization of the plasma membrane of the sperm, not allowing the normal process of fertilization. On the other hand, the analysis of variance showed significant differences between the different concentrations, forming four statistically homogeneous groups according to their effect.

Keywords: Diclofenac, fertilization, *Tetrapygnus niger*, ovule, sperm

INTRODUCCIÓN

Los fármacos son componentes biológicamente activos, empleados para restablecer la salud; estas sustancias pueden tener efectos parecidos, incluyendo los adversos en los humanos y animales, ya que comparten muchos receptores y moléculas blanco similares, que se han conservado a través de la evolución ¹. El uso de los fármacos, en la actualidad puede tornarse irracional debido al desconocimiento acerca de su dosificación y aplicación, a la automedicación por parte de las personas; así como también el exceso de la propaganda farmacéutica entre otros; el aumento del consumo del diclofenaco sin prescripción médica en los últimos años ha creado una preocupación con respecto a estos antiinflamatorios, ya que su consumo en altas dosis traería como consecuencia una contaminación mayor en los ambientes acuáticos de este fármaco como los reportados por Borgmann².

Los agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINES) son los fármacos recetados con mayor frecuencia en todo el mundo. Sin embargo, su utilidad clínica sigue estando limitada principalmente por los efectos secundarios nocivos que producen sobre todo en el tracto gastrointestinal ³. El diclofenaco es un (AINES) cuyo nombre químico es 2-[2-[(2,6-diclorofenil) amino] fenil] acético, que posee propiedades analgésicas y antiinflamatorias ⁴.

Los equinoideos son organismos ecológicamente importantes en todos los sistemas marinos litorales del mundo. Su estudio ha estado relacionado con la genética, distribución, comportamiento, fisiología, crecimiento, reproducción, bioquímica y ecología ^{5,6}. *Tetrapygus niger* “erizo negro de mar” es un herbívoro de amplio espectro dietario capaz de consumir algas tanto fijas en el sustrato como libres, tiene una alta densidad e intenso pastoreo que pueden generar y mantener zonas desprovista de vegetación ⁷; esta especie habita aguas someras, se encuentra tanto en los niveles inferiores del intermareal rocoso en ambientes expuestos y protegidos ⁸; se distribuye desde Paita en Perú hasta el estrecho de Magallanes en Chile y desempeña un rol importante en la estructura y organización de las comunidades que integra ^{9,10}.

T. niger es un organismo dioico, que no presenta dimorfismo sexual, una hembra puede expulsar millones de óvulos en un volumen de 10 - 20 ml; el macho expulsa los espermatozoides en proporciones similares ⁶. La fecundación comienza cuando el espermatozoide se pone en contacto con el óvulo. En primer lugar el espermatozoide del erizo de mar es atraído hacia el gameto femenino por quimiotaxis, a través de una molécula llamada resact que se encuentra en la capa gelatinosa del óvulo, posteriormente se realiza la reacción acrosómica mediante las interacciones de la membrana celular del espermatozoide con compuestos de la capa gelatinosa del óvulo. Estos compuestos se unen a receptores específicos localizados sobre la membrana celular del espermatozoide. Esta unión aumenta la respiración, abre canales iónicos de calcio en la membrana celular, activa las bombas de hidrógeno, el pH intracelular aumenta ¹¹.

En particular *T. niger*, constituye uno de los organismos modelo, más utilizados en los estudios de fecundación y desarrollo embrionario temprano; debido a la fácil obtención de sus gametos, la realización de la fecundación y además las etapas del desarrollo embrionario pueden ser identificadas claramente ¹². Es una especie que tiene un rápido crecimiento, sus gónadas maduran en corto tiempo y se tiene la facilidad de mantenerlos en cautiverio ¹³.

Se han realizado estudios referidos al efecto toxicológico y teratogénico del extracto metanólico de *Cinnamomun zeylanicum* “canela” sobre huevos de *T. niger* encontrando que la canela es ligeramente tóxico y posee efecto citotóxico sobre el erizo de mar ¹⁴. Por otro Hwang et al. ¹⁵ estudiaron el efecto adverso del triclosan (TCS) sobre los parámetros reproductivos y desarrollo embrionario de *Strongylocentrotus nudus* “erizo de mar. Además la investigación de Valdez ¹⁶ reporta que el diclofenaco tiene un efecto tóxico, presentando daño oxidativo y genético sobre *Daphnia magna* en condiciones de laboratorio.

Debido a la importancia de *T. niger* “erizo de mar” el cual desempeña un rol importante en la estructura y organización de las comunidades que integra y considerando al diclofenaco como un fármaco peligroso y bioacumulable para el medio ambiente es que en el presente trabajo se determinó el efecto del diclofenaco a diferentes concentraciones sobre el proceso de fecundación de *Tetrapygyus niger* “erizo negro de mar”.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico:

Se utilizaron treinta especímenes de *Tetrapygyus niger* “erizo negro de mar”, entre aproximadamente 60 y 80 gramos, asegurando su madurez sexual.

Fármaco:

Se utilizaron grageas de Diclofenaco sódico por 100 mg. Laboratorio Novartis.

Colecta de especímenes

Se realizó en la zona pedregal del puerto Salaverry, el muestreo fue aleatorio sistemático colectando los especímenes de aproximadamente 60 – 80 g, asegurando que se encuentren sexualmente maduros. Los erizos de mar fueron recolectados con la ayuda de una espátula y fueron transportados al laboratorio en condiciones naturales en agua de mar en depósitos de plástico.

Diseño experimental

Se realizó un diseño completamente al azar para tal fin se preparó cuatro concentraciones del diclofenaco con agua de mar previamente filtrada dos veces a las concentraciones de 100 ppm; 75 ppm; 50 ppm; 25 ppm y el grupo control, se realizaron tres repeticiones para cada ensayo.

Obtención de los gametos de *T. niger* “erizo de mar”

El sexaje de los individuos se determinó al observar el color de los gametos. Los óvulos de *T. niger* fueron de color rojo vinoso y el esperma fue blanco cremoso. Para la obtención de las gónadas se realizó cuidadosamente la disección de los erizos por el eje ecuatorial, con una tijera de disección. Se obtuvo las gónadas femeninas y masculinas, posteriormente se lavaron con agua de mar filtrada y con la ayuda de un gotero se removían las gónadas con el fin de liberar los gametos así como también para eliminar el tejido celómico y restos internos, óvulos y los espermatozoides fueron colocados en placas Petri ^{17,18}, posteriormente lavados se usaron en el proceso de fecundación.

Fecundación de *T. niger* “erizo negro de mar”

Se realizó el sorteo de cada una de las concentraciones en los respectivos vasos de precipitación, posteriormente se colocó 120 ml de cada concentración en su respectivo vaso con cinco gotas de óvulos y 2 gotas de espermatozoides ¹⁹, dejando 30 minutos hasta la formación de la membrana de fertilización ²⁰; después se agregaron unas 6 gotas de formol al 40% a todos los vasos. Los experimentos se realizaron por triplicado con diferentes grupos de erizos negros de mar en diferentes fechas.

Evaluación del efecto del diclofenaco en el proceso de fecundación de *T. niger* “erizo negro de mar”

Para evaluar el efecto del diclofenaco sobre el proceso de fecundación, se realizó el conteo de óvulos con la membrana de fertilización en base a 100 óvulos fecundados totales por cada tratamiento, realizadas con la ayuda de un microscopio Olympus CX 21 a 40X. Los datos fueron tomados a los 30 minutos de exposición al fármaco.

Análisis estadístico:

Los datos obtenidos fueron organizados en tablas, se realizó el análisis de varianza para la comparación de los diferentes tratamientos ensayados y la prueba de contraste de medias de Tukey con una probabilidad de error de 0,05; utilizando el programa Infostat versión libre actualizada 2018 para Windows ²¹.

RESULTADOS

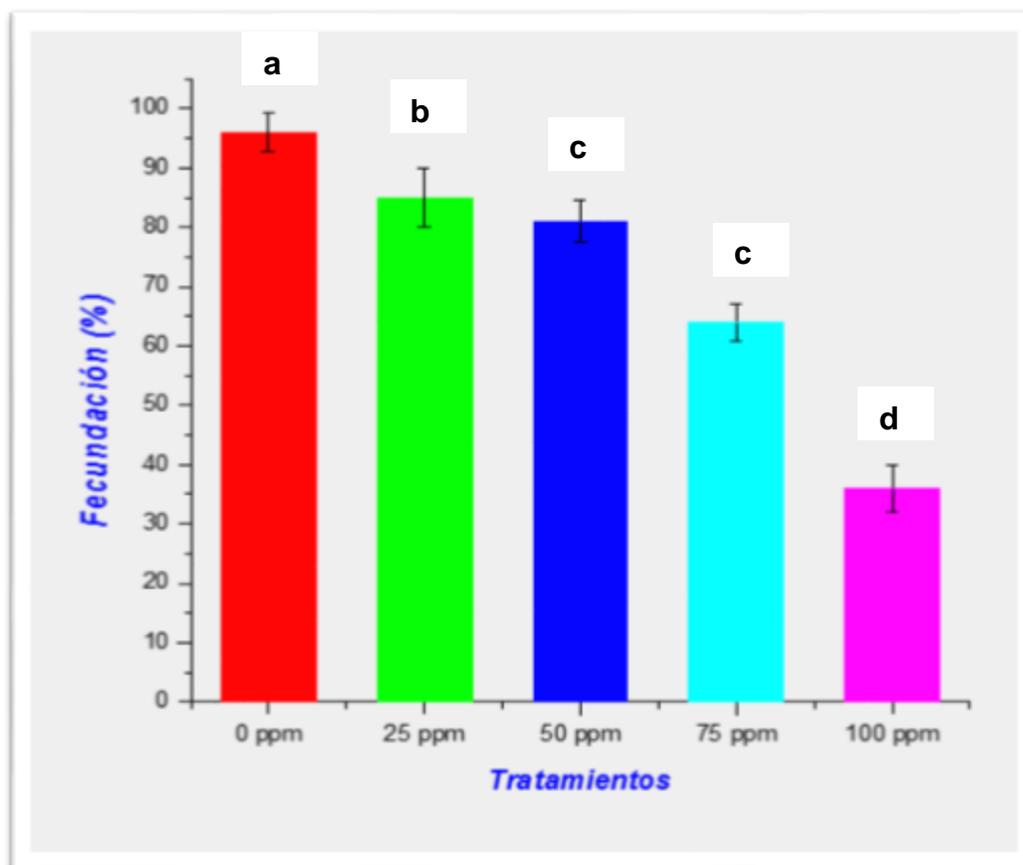
Para evaluar el efecto del diclofenaco en el proceso de fecundación de *Tetrapygus niger* “erizo negro de mar” se presenta los siguientes resultados en figuras y tablas. En la tabla 1 y figura 1 se presenta el promedio del porcentaje de fecundación en óvulos de *T. niger* a diferentes concentraciones y a 30 minutos de exposición del diclofenaco, observando que a mayor concentración del fármaco el porcentaje de fecundación va disminuyendo.

En la figura 2A se observa el óvulo rodeado de espermatozoides, figura 2B se observa el cigoto con la membrana de fertilización.

En la tabla 2 se observa el análisis de varianza y la prueba de contraste de medias de Tukey para el proceso de fecundación a las diferentes concentraciones y 30 minutos de exposición al diclofenaco.

Tabla 1. Porcentajes de fecundación de *Tetrapygnus niger* “erizo negro de mar” a diferentes concentraciones y 30 minutos de exposición al diclofenaco.

Tratamientos	Porcentaje de fecundación
0 ppm	96 ±3
25 ppm	85 ±5
50 ppm	81 ±4
75 ppm	64 ±3
100 ppm	36 ±4



Las letras (a-d) representan los 4 grupos estadísticamente homogéneos según el test de comparación múltiple de medias (Tukey). Los promedios relacionados con la misma letra no presentan diferencias significativas entre ellos para un valor de $p < 0,05$.

Fig. 1 Porcentaje de fecundación de *Tetrapygnus niger* “erizo negro de mar” a diferentes concentraciones y 30 minutos de exposición al diclofenaco.

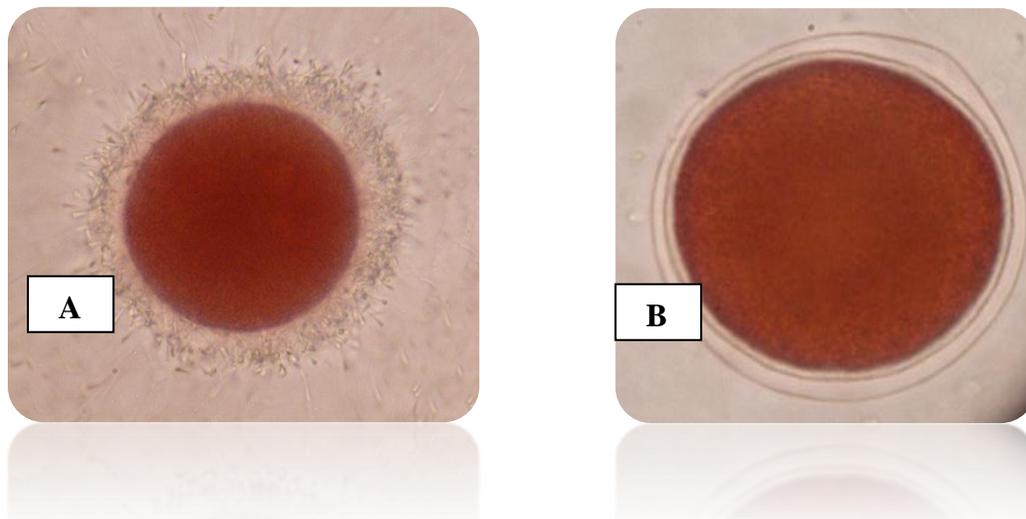


Fig. 2 Proceso de fecundación en *Tetrapygus niger* “erizo negro de mar” A. óvulo rodeado por espermatozoides B. Cigoto mostrando la membrana de fertilización a los 30 minutos de exposición al fármaco (Aumento 40X).

Tabla 2. Análisis de varianza de la fecundación de *Tetrapygus niger* “erizo negro de mar” a diferentes concentraciones a 30 minutos de exposición al diclofenaco.

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	6492.27	4	1623.07	110.16	<0.0001
Concentración	6492.27	4	1623.07	110.16	<0.0001
Error	147.33	10	14.73		
Total	6639.6014				

DISCUSIÓN

Los erizos de mar son importantes consumidores de algas y como tal desempeñan un papel clave en el ecosistema. Sirven para el reciclaje de los elementos minerales y degradan la materia orgánica hasta un nivel que pueda ser nuevamente aprovechado por los productores primarios²². Los bioensayos con los gametos de erizos de mar se han utilizado como un método sensible, sencillo y confiable para monitorear y evaluar la contaminación marina²³.

De acuerdo a los resultados obtenidos para evaluar el efecto del diclofenaco sobre el proceso de fecundación de *Tetrapygus niger* “erizo negro de mar” podemos observar (tabla 1 y figura 1) que el porcentaje de fecundación va disminuyendo a medida que se incrementan las concentraciones hasta obtener un 36% a 100 ppm, resultados similares a los obtenidos por Hwang et al.¹⁵ encontrando que

el triclosan disminuye el porcentaje de fecundación a las concentraciones de 0.1; 0.5; 1.0 (uM) a diferencia de la investigación de Manzo et al. ¹² quienes obtuvieron que la capacidad de fertilización de los espermatozoides fue ligeramente afectada por nanoparticulas de ZnO.

Este bajo porcentaje de fecundación en *T. niger* a diferentes concentraciones del diclofenaco, probablemente se debería a que el fármaco competiría con algunos receptores de membrana celular del espermio encargados de activar a las proteínas Rho – cinasas, que se encuentran en la región acrosómica, pieza intermedia y flagelo, las cuales activan las vías de transducción de señales, encargadas de la hiperactivación, reconocimiento celular entre el espermatozoide y óvulo, aumento de la concentración del calcio citosólico, exocitosis de los gránulos corticales y la polimerización de la actina ²⁴. En la figura 2A se observa a un óvulo no fecundado a los 30 minutos; estos resultados podrían deberse a la desestabilización de la membrana plasmática del espermatozoide en respuesta al diclofenaco, y por consiguiente la alteración de la integridad funcional de la membrana celular ¹⁵. Los espermatozoides se componen de una sola célula altamente especializada, que al ser expuesta a sustancias tóxicas, puede resultar en un daño inmediato, por lo tanto, reducir o suprimir su capacidad de fertilización. Estas alteraciones a nivel de la membrana probablemente podrían explicar el bajo porcentaje de fecundación, afectando el éxito reproductivo ²⁵.

Estos resultados encontrados se deben a que el diclofenaco afecta el proceso de fecundación; así como también podemos mencionar que los factores ambientales como la temperatura ^{26,27} y la oxigenación juegan un papel muy importante en el proceso de fecundación, ya que los erizos de mar son organismos de tamaño pequeño y los cambios ambientales impactan de manera relevante en su desarrollo y supervivencia ²⁸.

Las diferencias del efecto de las diferentes concentraciones del diclofenaco sobre el proceso de fecundación confirmadas por el análisis de varianza (tabla 2) que evidenció la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos, por lo tanto se aplicó la prueba de comparación de promedios de Tukey (figuras 1) estableciéndose la conformación de cuatro grupos estadísticamente homogéneos en función a su efecto.

Los analgésicos como el diclofenaco resultan tóxicos para los crustáceos y dañinos para los peces; por otro lado de acuerdo a la clasificación de peligro ambiental y valoración de riesgo de ingredientes farmacéuticos en Suecia (2002) el diclofenaco está clasificado como peligroso para el ambiente, y se considera además potencialmente bioacumulable ²⁹. Muchos contaminantes orgánicos e inorgánicos que se originan desde las actividades humanas, industriales, productos químicos tales como los pesticidas, fármacos, vertientes residuales domesticas son depositados y concentrados en los sedimentos acuáticos. Algunos de estos contaminantes químicos son muy persistentes, mientras que otros son más susceptibles a transformaciones físicas, químicas o biológicas ³⁰. Por otro lado Jones et al. ³¹ categorizaron como ambientalmente dañino a los analgésicos como el diclofenaco, dado que la concentración que mata al 50% de la población (EC50) obtenidas para este grupo de fármacos

fluctuó entre 10 y 100 mg/L para crustáceos y peces³². Diversos estudios han demostrado la toxicidad de este fármaco en mamíferos, pero poco son los estudios sobre el efecto del diclofenaco en especies marinas¹⁶.

CONCLUSIONES

En el proceso de fecundación de *Tetrapygnus niger* “erizo negro de mar” en el cual no se empleó el diclofenaco se obtuvo un porcentaje de fecundación del 96%.

El porcentaje de fecundación en *T. niger* “erizo negro de mar” disminuye conforme se incrementan las diferentes concentraciones empleadas del diclofenaco, alcanzando valores del 36% a 100 ppm.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fent K, Weston A, Caminada D. Review Ecotoxicology of human pharmaceuticals. Aquatic Toxicology. 2006; 76:122–159.
2. Borgmann U, Bennie D, Bal A, Palabrica V. Effect of a mixture of seven pharmaceuticals on *Hyalella azteca* over multiple generations. Chemosphere. 2007; 66: 1278-1283.
3. Rivera-Ordoñez A. AINES Su mecanismo de acción en el sistema nervioso central. Anestesiología. 2006; volumen 29 N° 1: 36-40.
4. Martínez V, Paredes J, Valmaseda E, Berini L, Gay-Escoda C. 2004. Eficacia analgésica del diclofenaco sódico vs. Ibuprofeno después de la extracción quirúrgica de un tercer molar inferior incluido. Med Oral Patol Cir Bucal. 2004; 9: 444-453.
5. Marin-Guirao A, Vita R, Marin A. Sensibilidad de anfípodos y erizos de Mar Mediterráneo a sustancias tóxicas de referencia. Ciencias Marinas. 2002; 28(4): 407-417.
6. Navarrete A, Camus P, Felipe L. Variación ambiental y patrones dietarios del erizo negro *Tetrapygnus niger* en costas intermareales rocosas del norte de Chile. Revista Chilena de Historia Natural. 2008; 8: 305-319.
7. Perreault M, Borgeaud C, Gaymer C. Impact of grazing by the sea urchin *Tetrapygnus niger* on the kelp *Lessonia trabeculata* in Northern Chile. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 2014; 453(2014) 22-27.
8. Larrain A. Biodiversidad de equinodermos chilenos. Estado actual del conocimiento y sinopsis biosistemática. Gayana Zool- 1995; 59(1): 73-79.
9. Zamora S, Stotz W. Ciclo reproductivo de *Tetrapygnus niger* (Echinodermata: Echinoidea) en las localidades de la IV Región, Coquimbo, Chile. Revista Chilena de Historia Natural. 1993; 66:155-169.
10. Vásquez J. Estructura y organización de huirales submareales de *Lessonia trabeculata*. Ph. D. Tesis Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. 1989.
11. Gilbert F. Biología del desarrollo. Editorial panamericana. 7ma edición. 2003.

12. Manzo M, Migliotta L, Ramotta G, Buono S, Di Francia G. Embryotoxicity and spermotoxicity of nanosized ZnO for Mediterranean sea urchin *Paracentrotus lividus*. Journal of Hazardous Material. 2013; 254-255: 1-9.
13. Pizarro F, Parra-Lepe M, Astorga D. Estudio y comparación de la actividad antibacteriana de dos erizos de mar (*Loxochinus albus* y *Tetrapigus niger*) frente a *Escherichia coli*. Rev. Ciencia Joven. 2012; 1: 71-75.
14. Huamán S, Hurtado H, Kong V, León C, León D, Lister P, Miñano K, Orrego F, Santillán L. Estudio toxicológico y teratogénico del extracto metanólico de *Cinnamomun zeylanicum* (canela). Revista Horizonte Medico. 2003; volumen 14 N° 23.
15. Hwang J, Suh S, Chang M, Yun S, Kwon T. Effects of triclosan on reproductive parameters and embryonic development of sea urchin, *Strongylocentrotus nudus*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2013; 100: 148-152.
16. Valdes A. Evaluación de la toxicidad producida por diclofenaco sobre *Daphia magna*. Tesis para obtener el título de maestro en ciencias quimicobiologicas. Instituto Politécnico Nacional. México D.F. 2009.
17. Gustafon T, Wolpert L. The Cellular basis of morphogenesis and sea urchin development. Int. Rev. Cytol. 1963; 15: 139-214.
18. Estus S, Blumer J. Critical period of phenytoin teratogenic action in the sea urchin, *Arbacia punctulata* embryo. J Pharmaol Exp. 1989; 251 (2): 782-9.
19. Beltrán R. Efectos de la piridina irradiada con Láser Ultravioleta (337nm) en la fecundación y segmentación temprana de *Tetrapigus niger* L. Trabajo de habilitación para promoción docente de profesor auxiliar a profesor asociado. Universidad Nacional de Trujillo, Perú. 2000.
20. Garmendia J, Menchaca I, Belzunce M, Revilla M. Protocolo del test de toxicidad de sedimentos marinos con larvas del erizo de mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). Revista de Investigación Marina. 2009; 11: 1-25.
21. Di Rienzo J, Casanoves F, Balzarina M, Gonzalez L, Tablada M, Robledo C. Infostat versión 2018. Centro de Transferencia Infostat, FCA. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina. <http://www.infostat.com.ar>.
22. Lawrence J. On the relationships between marine plants and sea urchins. Oceanography and Marine Biology: an Annual Review. 1975; 13: 213-286.
23. Fernández N. Evaluación biológica de la contaminación marina costera mediante bioensayos con embriones del erizo de mar *Paracentrotus lividus*. Tesis doctoral. Tesis doctoral. Universidad de Vigo. España. 2002.
24. Urióstegui C, Martínez-Cadena G, López-Godínez J, Castellano L, Nichisaki T, Darszon A, García-Soto J. Rho kinase (ROCK) in sea urchin sperm: Its role in regulating the intracellular pH during the acrosome reaction. Biochemicals and Biophysical Research. 2007; 364: 470-475.
25. Pruski A, Nahon S, Escande M, Francois C. Ultraviolet radiation induces structural and chromatin damage in Mediterranean Sea-urchin spermatozoa. Mutation Research. 2009; 673: 67-73.
26. Salamanca M, Fernández N, César A, Antón R, López P, Devalls A. Improved sea-urchin embryo bioassay for in situ evaluation of dredged material. Ecotoxicology. 2009; 18:1051-1057.
27. Olaechea P, Panéz J, Gonzáles-Figueroa H. Desarrollo embrionario de *Tetrapygnus niger* (Molina, 1782) “Erizo Negro” en diferentes temperaturas. Biotempo 2006; Volumen 6:27-31.
28. Figueroa J, Luer R, Ortega M, Ureta N, Velásquez F. Efectos en la sobrevivencia de las larvas de erizo de mar *Loxechinus albus*, producto de la exposición a diferentes concentraciones iones de cobre liberados por componentes presentes en pinturas antiincrustantes. Rev. Ciencia Joven 2012; 1:64-68.
29. Coutu S, Rossi L, Barry D, Chèvre N. Methodology to account for uncertainties and tradeoffs in pharmaceutical environmental hazard assessment. Journal of Environmental Management. 2012; 98:183-190.

30. Carballo O, Arencibia G, Concepción J, Isla M. Los bioensayos de toxicidad en sedimentos marinos. *Revista de toxicología en línea* 2012; 33-69.
31. Jones O, Voulvoulis N, Lester J. Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceutical. *Water Research*. 2002; 36: 5013-5022.
32. Barceló D, López M. Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. Fundación Nueva Cultura del Agua. Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales-CSIC (Barcelona). 2001. Disponible en <http://www.unizar.es/fnca/varios/panel/15.pdf>.

Correspondencia: gzavaleta@unitru.edu.pe