



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

DEFENSAS ANTIOXIDANTES EN EL FLUIDO CELÓMICO DEL ERIZO
NEGRO *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758) ESTIMULADO CON
INÓCULOS BACTERIANOS

(Modalidad: Tesis de Grado)

GABRIELA LIVICT APARICIO MARVAL

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR POR EL TÍTULO DE LICENCIADA EN BIOANÁLISIS

CUMANÁ, 2018

DEFENSAS ANTIOXIDANTES EN EL FLUIDO CELÓMICO DEL ERIZO
NEGRO *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758) ESTIMULADO CON
INÓCULOS BACTERIANOS

APROBADO POR:

Prof. Edgar Zapata Vívenes
Asesor

INDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTO	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABLAS	iv
RESUMEN	v
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	5
Organismos	5
Manutención en el Laboratorio	5
Ensayos de inoculación	5
Obtención de fluido celómico (FC).....	6
Producción de anión superóxido.....	6
Actividad fagocítica	6
Análisis enzimáticos.....	7
Catalasa.....	7
Superóxido dismutasa	8
Grupos sulfhidrilos totales (-SH)	8
Peroxidación de lípidos.....	9
Proteínas totales	9
Salud de los erizos.....	10
Análisis Estadísticos	10
RESULTADOS.....	11
DISCUSIÓN	19
CONCLUSIONES	25
BIBLIOGRAFÍA	26
HOJAS DE METADATOS	33

DEDICATORIA

A

Dios y la bella milagrosa Virgen de Valle por haberme permitido alcanzar este gran logro y dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

Mis padres Jesús y Lida por ser mi apoyo incondicional día tras día y siempre confiar en mí a pesar de los obstáculos. Sin ustedes no hubiese sido posible alcanzar este sueño los AMO.

Mis bellas hermanas, amigas confidentes Lida y Fabiola.

Mi querido compañero de vida Jesús Villarroel por tu gran amor, paciencia y apoyo incondicional.

A mis 2 grandes amores mi hijo bello Jesús por ser mi mayor bendición y a mi sobrina preciosa Kamila; los amo mis chiquitos bellos son la alegría de nuestras vidas.

Finalmente, a mí por el gran esfuerzo, dedicación y sacrificio a lo largo de mi carrera.

AGRADECIMIENTO

A

Mi querido Prof. Edgar Zapata por su gran ayuda, colaboración, dedicación y asesoría en el curso de la investigación gran profesional y amigo.

Al Instituto Oceanográfico de Venezuela por prestarme su colaboración en el traslado al área de muestreo.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Niveles de anión superóxido ($\text{O}_2^\bullet$) en fluido celómico del erizo *E. lucunter* inoculados con distintas cepas bacterianas. (*) El asterisco muestra diferencias significativas $*p<0,05$. (C) control, (E.c.) *Escherichia coli*, (M.c.) *Micrococcus lysodeikticus*, (S.s.) solución salina y (V.p.) *Vibrio parahaemolyticus* 11
- Figura 2. Niveles de formazán en fluido celómico del erizo *E. lucunter* inoculados con *M. lysodeikticus*, *E.coli* y *V. parahaemolyticus*. (*) El asterisco muestra diferencias significativas $*p<0,05$. (C) control, (E.c.) *Escherichia coli*, (M.c.) *Micrococcus lysodeikticus*, (S.s.) solución salina y (V.p.) *Vibrio parahaemolyticus* 12
- Figura 3. Actividad de Catalasa (CAT) en fluido celómico del erizo *E. lucunter* inoculados con distintas cepas bacterianas (control, solución salina, *M. lysodeikticus*, *E.coli* y *V. parahaemolyticus*). (*) El asterisco muestra diferencias significativas $p<0,05$. (C) control, (E.c.) *Escherichia coli*, (M.c.) *Micrococcus lysodeikticus*, (S.s.) solución salina y (V.p.) *Vibrio parahaemolyticus*..... 13
- Figura 4. Actidad de superóxido dismutasa (SOD) en fluido celómico del erizo *E. lucunter* inoculados con distintas cepas bacterianas. (C) control, (E.c.) *Escherichia coli*, (M.c.) *Micrococcus lysodeikticus*, (S.s.) solución salina y (V.p.) *Vibrio parahaemolyticus* 13
- Figura 5. Niveles de grupos sulfhidrilos totales en fluido celómico del erizo *E. lucunter* inoculados con distintas cepas bacterianas. (C) control, (E.c.) *Escherichia coli*, (M.c.) *Micrococcus lysodeikticus*, (S.s.) solución salina y (V.p.) *Vibrio parahaemolyticus*..... 14
- Figura 6. Concentraciones de sustancias que reaccionan al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en fluido celómico del erizo *E. lucunter* inoculados con distintas cepas bacterianas. (C) control, (E.c.) *Escherichia coli*, (M.c.) *Micrococcus lysodeikticus*, (S.s.) solución salina y (V.p.) *Vibrio parahaemolyticus*..... 15
- Figura 7. Concentración de proteínas (PT) en fluido celómico del erizo *E. lucunter* inoculados con distintas cepas bacterianas. (C) control, (E.c.) *Escherichia coli*, (M.c.) *Micrococcus lysodeikticus*, (S.s.) solución salina y (V.p.) *Vibrio parahaemolyticus*. (*) El asterisco muestra diferencias significativas $p<0,05$ 16
- Figura 8. Tiempo de recuperación invertida *E. lucunter* inoculados con distintas cepas bacterianas, grupo control y solución salina. (C) control, (E.c.) *Escherichia coli*, (M.c.) *Micrococcus lysodeikticus*, (S.s.) solución salina y (V.p.) *Vibrio parahaemolyticus*..... 16
- Figura 9. Análisis de componentes principales en fluido celómico del erizo *E. lucunter* inoculados con distintas cepas bacterianas..... 17

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Porcentajes de erizos infectados y síntomas en organismos inyectados con solución salina (SS), <i>Micrococcus lysodeikticus</i> (ML), <i>Escherichia coli</i> (EC) y de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (VP). Control (C). Respuesta positiva (+), intermedia (+/-) y negativa (-).....	18
---	----

RESUMEN

El sistema de defensa inmunológico en los erizos de mar está conformado por células circundantes (celomocitos) y factores humorales con actividad lítica (péptidos y proteínas) contenidas en el fluido celómico (FC). La fagocitosis es uno de los mecanismos de defensa inmunológico mediada por los celomocitos que elimina agentes extraños a través de la generación de especies reactivas al oxígeno (ERO). Las ERO pueden alterar el estado redox-celular, causando posibles daños moleculares dependiendo de la capacidad antioxidante del FC. Para evaluar el sistema de defensa antioxidante en el FC del erizo *E. lucunter* se procedió a inocular, vía intra-membrana peristomial, tres cepas bacterianas vivas por separado: *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Micrococcus lysodeikticus*. Después de 16 h post-inyección se determinaron la actividad fagocítica (AF), producción de anión superóxido ($\bullet\text{O}_2$), actividad de las enzimas catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD), niveles de lipoperoxidación (LPO), grupo sulfhidrilos (-SH) y proteínas totales (PT). Adicionalmente, se estimó la capacidad de los organismos de enderezarse de la posición invertida y los cambios externos de la testa. La AF, CAT, producción de $\bullet\text{O}_2$ y PT mostraron incrementos marcados, asociados significativamente en los organismos inoculados con las distintas bacterias. Los niveles de LPO, actividad de SOD y -SH no mostraron variaciones entre los organismos inoculados y no inoculados. El tiempo para voltearse es ligeramente reducido en algunos de los organismos inmunológicamente estimulados; mostrando a su vez un bajo porcentaje de pérdida y movimientos reducidos de sus espinas. El incremento significativo en la AF, producción de $\bullet\text{O}_2$ y la concentración de PT en *E. lucunter* en presencia de estimulantes bacterianos vivos muestra la efectividad del sistema inmune, tanto celular como humoral. En adición, los datos indican que CAT juega un papel preponderante en el FC para evitar cambios en el estatus antioxidante que pudieran estar asociados al estadillo respiratorio de los celomocitos. La efectiva capacidad de respuesta antioxidante de *E. lucunter* en organismos inmuno-estimulados por bacterianas garantiza su sobrevivencia en el hábitat natural.

INTRODUCCIÓN

Los equinodermos son invertebrados exclusivamente marinos que habitan en aguas poco profundas, y son considerados uno de los grupos más importantes en la estructura de las comunidades bentónicas, ocupando diferentes nichos ecológicos (Ruppert y Barnes, 1996). Uno de los grupos más representativos de este phylum son los erizos de mar. Estos organismos se caracterizan por poseer forma globular o discoidal, carecen de brazos y de un esqueleto interno, están constituidos por numerosas placas calcáreas formando un caparazón en las que se encuentran las espinas móviles (Summers *et al.*, 1993).

El erizo negro *Echinometra lucunter* es una especie de relativa abundancia en la costa nororiental de Venezuela, desde las costas del estado Falcón hasta los estados Sucre y Nueva Esparta (Zoppi, 1967; Cruz-Motta, 2007)., la misma presenta potencialidades para el maricultivo debido a su rápido crecimiento, buena adaptación al cautiverio y cantidad de gónadas producidas en corto tiempo (Reyes-Luján *et al.*, 2015). Además, se conoce que sus gónadas poseen altos niveles de proteínas, siendo considerado de alto valor bromatológico (Arzola, 2015). La condición fisiológica de los erizos podrían alterarse por infecciones inducidas por los microorganismo patógenos presentes en el agua de mar, limitando así las expectativas de cultivo y comercialización de la especie.

Las enfermedades producidas por bacterias pueden regular las poblaciones de erizos, inclusive pueden provocar grandes mortandades (Gilles y Pearse, 1986; Carpenter, 1988). Tales microorganismos pueden ocasionar lesiones en las paredes de la testa de los erizos, pérdida de la pigmentación del epitelio, desprendimiento y crecimiento irregular en las puntas de las espinas, necrosis de tejidos musculares, dificultad en la alimentación y locomoción (Baer y Young, 2000). Entre las anomalías externas más comunes identificadas se encuentran

los cambios en la coloración de la testa, las mismas pueden variar entre verdosas, rojas o negras (Wang *et al.*, 2012). Los géneros bacterianos frecuentemente aislados de áreas corporales de erizos lesionados son *Vibrio*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Clostridium* y *Pseudomonas* (Wang *et al.*, 2013); estos microorganismos suelen ser comensales, pero presentan un alto potencial patógeno. Por lo general, los individuos más propensos a enfermarse son los que presentan signos de estrés asociado a una deficiencia inmunológica.

Los erizos, así como otros invertebrados, no poseen un sistema inmune adaptativo, sino que dependen totalmente de las respuestas de inmunidad innata para la protección contra patógenos (Rendón y Balcázar, 2003; Antón y Salazar, 2009). La inmunidad en los erizos de mar está a cargo de diversos tipos de células denominadas celomocitos (fagocitos o amebocitos, granulocitos traslucidos, esférulas rojas y células vibrátiles) y sustancias bacteriolíticas contenidas en el fluido celómico (FC) (Hibino *et al.*, 2006). Los celomocitos, además de actuar como respuestas inmunes celulares, participan en los procesos de excreción, locomoción, protección de las vísceras e inmunidad humoral (Tarima *et al.*, 2007).

El sistema inmunológico en los invertebrados marinos puede ser inducido mediante invasiones bacterianas en el medio natural o estimulado experimentalmente por inoculación de microorganismos, conllevando a incrementar la actividad de diversos agentes antibacterianos, número de celomocitos, encapsulación y la capacidad fagocítica (Bastidas, 2016). La primera línea de defensa celular contra la acción de microorganismos es la fagocitosis. Al igual que en vertebrados, durante la fagocitosis el agente extraño es englobado, internalizado y destruido dentro del celomocito, produciéndose un aumento en el consumo de oxígeno, fenómeno conocido como “estallido respiratorio” (Mydlarz *et al.*, 2006).

Los procesos fagocíticos están ligados a la activación del sistema enzimático asociados a las membranas celulares, que catalizan la reducción del oxígeno molecular en anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), y este a su vez es convertido a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Livingstone, 2001). El $\text{O}_2^{\bullet-}$ también puede reaccionar con el óxido nítrico produciendo el peroxinitrilo (ONOO^-). El H_2O_2 por acción de mieloperoxidasa en presencia de cloro (Cl^-) puede generar el ácido hipocloroso; compuesto extremadamente tóxico. Otra ERO que es altamente reactiva es el radical hidroxilo ($\text{OH}^{\bullet}$); los efectos dañinos de este oxiradical $\text{OH}^{\bullet}$ en la célula son numerosos y afectan a todo tipo de biomoléculas, entre ellas destacan desnaturalización de las proteínas que conlleva a inactivación enzimática, daños en el ADN y peroxidación lipídica (Di Giulio *et al.*, 1995).

La sobreproducción de las ERO puede conducir a anomalías funcionales características de estrés oxidativo, el cual se produce por un desbalance desfavorable entre las sustancias oxidantes y las defensas antioxidantes. Uno de los índices más frecuentemente utilizados para estimar el daño oxidativo es la determinación de la peroxidación lipídica. Este parámetro puede ser determinado espectrofotométricamente mediante la técnica de sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS), resultando como producto final el malondialdehído (MDA) (Rodríguez *et al.*, 2001).

El sistema de defensa antioxidante (SDAO) en los organismos aerobios está conformado por moléculas (enzimas y no enzimas), que coordinan y protegen los riesgos que conlleva el daño oxidativo. Una de las enzimas de importancia dentro del SDAO es la superóxido dismutasa (SOD), una metaloproteína que tiene una amplia distribución en el organismo, la cual dismuta el oxígeno para formar peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y su principal función es la protección contra el $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Halliwell y Gutteridge, 1999; Chihuailaf *et al.*, 2002). Adicionalmente, la catalasa (CAT) es otra enzima con funciones antioxidantes,

encargada de degradar rápidamente al H_2O_2 hasta H_2O y O_2 (Goth y Pay, 1996).

Otras sustancias con potencialidades antioxidantes son las moléculas que contienen grupos tioles o sulfhidrilos (-SH); grupos funcionales que desempeñan un papel importante en los sistemas biológicos; actuando como agentes reductores u oxidantes, que participan en muchos aspectos determinantes en la estructura y función de las proteínas. Los -SH presentan funciones relacionadas con los procesos de tiolación de proteínas, involucrando en la formación de mezclas de disulfuros entre el glutatión reducido (GSH) y residuos de cisteínas de cadenas polipeptídicas (Rubino *et al.*, 2004)., jugando un papel importante en la estabilidad, en el plegamiento, en la unión de metales, en la catálisis enzimática y en la regulación de la actividad proteica, son químicamente activos, con baja masa molecular que actúan como antioxidantes endógenos y amortiguadores redox, siendo importantes en la homeostasis celular (González y Muñoz, 2003).

Se ha demostrado la efectividad de las respuestas inmunológicas en erizos, tanto moleculares y celulares, estimulados por distintos antígenos de origen bacterianos (Dheilly, 2010; Dheilly *et al.*, 2012; Bastida, 2016). Sin embargo, en los erizos no se conoce como actúan las defensas antioxidantes del FC en presencia de alta actividad fagocítica; condición que conlleva a una elevada producción de $\cdot\text{O}_2$. En tal sentido, esta investigación evaluó la capacidad del sistema de defensa antioxidante, específicamente las actividades de las enzimas SOD y CAT, además de los niveles de grupos -SH, para evitar los posibles daños peroxidativos en lípidos en el FC de *E. lucunter* cuando es estimulado por distintas cepas bacterianas. Adicionalmente, se estimaron parámetros de condición fisiológica y de comportamiento por causas de infecciones bacterianas inoculadas experimentalmente.

METODOLOGÍA

Organismos

Los ejemplares de *E. lucunter* (con talla de 4 a 6 cm de diámetro) fueron colectados de manera manual a profundidades de 1 a 5 m en la Ensenada de Turpialito (10° 26' 56" N, 64° 02' 00" O). Esta localidad se encuentra situada a 3 km al este de la ciudad de Cumaná, en la costa sur del golfo de Cariaco. La abundancia de *E. lucunter* en la zona es de 1,2 individuos por m² (Reyes, 2015). Los ejemplares fueron capturados (por buceo libre) sin distinguir su sexo ni etapa reproductiva.

Manutención en el Laboratorio

Los erizos fueron transportados en envases isotérmicos hasta el laboratorio y se colocaron en acuarios de 40 cm³, a razón de un organismo por cada 5 litros de agua de mar filtrada, con suficiente aireación, temperatura promedio del agua 25 ± 1°C; pH 7,9-8,1 y salinidad de 36 UPS. Los organismos fueron alimentados con una mezcla de macroalgas deshidratadas (*Sargassum*, *Padina*, *Ulva*). Los animales fueron alimentados diariamente y el agua de mar de los acuarios fue renovada cada dos días. Estas condiciones se mantuvieron durante una semana previo a los ensayos de inoculación.

Ensayos de inoculación

Cuatro grupos de erizos por separado, constituidos de 10 organismos cada uno, se les inyectaron, cuidadosamente dentro de la cavidad peristomial (entrada aboral), concentraciones conocidas de las siguientes bacterias: *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Micrococcus lysodeikticus*. Al primer y segundo grupo, se les inoculó 10 µl de una solución contentiva de ~1 x 10⁸ células/ml de *E. coli* y *V. parahaemolyticus*, disueltas en agua de mar estéril. Ambas cepas obtenidas por dilución de 1:20 en un cultivo de infusión cerebro-corazón (BHI). Las cepas bacterianas fueron suministradas por el Laboratorio de Bacteriología del Hospital Universitario Antonio Patricio de Alcalá.

Al tercer grupo de animales se les inyectó 10 µl de una solución de *M. lysodeikticus* (SIGMA N°4698) ($\sim 1 \times 10^8$). Al grupo cuarto grupo de organismos se les inyectó el mismo volumen de agua de mar micro-filtrada y estéril (considerada solución salina). Adicionalmente, se tomó como grupo control a los organismos provenientes del campo no estresados por punción. Una vez inyectados cada uno de los organismos fueron devueltos a sus respectivos acuarios. La obtención del fluido celómico se realizó a las 16 horas post-inyección.

Obtención de fluido celómico (FC)

Para ello, se insertó una aguja hipodérmica, previamente contentiva de 200 µl de agua de mar estéril y EDTA a 4 mmol/l. El volumen de FC obtenido dependió del tamaño del ejemplar analizado (~ 1 ml). El FC fue colocado en un tubo eppendorf en hielo y se adicionó 20 mmol/l Tris 0,5 mol/l de NaCl y 30 mmol/l de ácido etilendiami-tetracético (ISO-EDTA, pH 7,50) como solución anticoagulante (Matranga et al., 2006).

Producción de anión superóxido

Se mezclaron 100 µl de fluido celómico con 100 µl de NBT (2 mg/ml en agua de mar filtrada) incubando posteriormente en cámara oscura por una hora a temperatura ambiente. La formación de depósitos de formazán se detuvo añadiendo 100 µl de metanol. Se centrifugó a 3 000 g por 10 minutos. Los precipitados de formazán se lavaron dos veces con alcohol etílico 70,0% y se secaron al aire. Se disolvieron en una mezcla de 120 µl de KOH 2 mol/l y 140 µl dimetil-sulfóxido (DMSO). Se procedió a leer la absorbancia a 620 nm (Ballarin et al., 1994).

Actividad fagocítica

La actividad fagocítica de los celomocitos fue determinada mediante la reducción del azul de tetrazolium (NBT) a formazán (Cooper et al., 1995).

utilizando como antígeno un extracto no viable de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (zymozan). Se mezclaron 100 µl del extracto de zymozan (10 µg/ml) con 100 µl de suspensión de celomocitos ($\sim 6 \times 10^5$ cel/ml) del FC, y luego se incubó por 15 minutos. Posteriormente, se le agregó 100 µl de una solución de NBT (2 mg/ml) en buffer fosfato salino (BFS), se mezcló y se incubó por 24 horas a 16°C bajo oscuridad.

La especificidad del método se probó agregando 50 µl (20 mg/ml BFS) de la enzima superóxido dismutasa (SOD). Para extraer el formazán (producto de la reducción del NBT), se agregaron 200 µl de bromuro de hexadeciltrimetilamonio 0,1%, usado como agente antimicrobiano y surfactante (detergente), y 400 µl de buffer fosfato 100 mmol/l pH 6,2. Seguido de un período de incubación de 3 horas a 37°C y una centrifugación posterior a 2 000 g por 15 minutos, se procedió a medir la absorbancia a 510 nm. Estas lecturas fueron comparadas con una curva patrón de formazán realizado con bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium (Sigma-Aldrich Cat. M2128). Como control se cuantificó el formazán en FC incubado con NBT sin antígeno. Los resultados se expresaron en µg de formazán/ml.

Análisis enzimáticos

La actividad de las enzimas antioxidantes fue determinada en un espectrofotómetro Perkin-Elmer UV/VIS Lambda 2S, bajo condiciones de temperatura controlada a $26 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Los ensayos enzimáticos se realizaron por triplicado en un volumen final de 1 ml. Las estimaciones de las actividades enzimáticas específicas (U/g de masa húmeda del tejido) se realizaron en el programa UV Winlab Lambda 25 bajo ambiente Windows.

Catalasa

La actividad de la enzima CAT se determinó por el descenso de la concentración del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a una longitud de onda de 240 nm (Coeficiente de Extinción= 40 l cm/mmol). La mezcla de incubación estuvo constituida por buffer fosfato $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{PO}_4$ 50 mmol/l a pH 7,5 y H_2O_2 50

mmol/l. A la cubeta experimental de cuarzo, se le agregó 800 µl de buffer fosfato y 50 µl del extracto enzimático. Se mezcló rápidamente y se midió el cambio de absorbancia por 3 minutos. Se dio inicio a la reacción adicionando 150 µl de H₂O₂ (Aebi, 1984).

Superóxido dismutasa

La actividad enzimática de la superóxido dismutasa (SOD, EC: 1.15.1.1) se determinó mediante la utilización de un Kit Bioxytech SOD-525 (SIGMA), el cual se fundamenta en la medición del incremento de la tasa de auto-oxidación del 5,5,6a,11b-tetrahidro-3,9,10-trihidrobenczo[c]fluoreno (TTF), mediado por la enzima SOD en solución acuosa alcalina, para producir un cromógeno con un máximo de absorbancia a 525 nm (Nebot *et al.*, 1993).

Para medir la actividad se le añadió a la cubeta experimental 900 µl de buffer, 40 µl de fluido celómico, 30 µl de 1-metil-2-vinil-piridinium trifluorometanosulfonato en HCl, mezclado e incubado a 37 °C por 1 minuto. Luego se agregó 30 µl TTF y se agitó nuevamente. Posteriormente se midió el cambio de absorbancia a 525 nm por 2 minutos. La actividad de SOD es definida como la actividad que dobla la tasa de autooxidación de la línea base ($V_s/V_c=2$).

La relación entre el cociente V_s/V_c y la actividad de SOD es descrita por la siguiente ecuación: $V_s/V_c = 1 + [SOD]/\alpha \times [SOD] + \beta$. Donde V_s = tasa del contenido de SOD en la muestra, V_c = promedio de las muestras blancos (SOD=0), α = coeficiente experimental y β = coeficiente de unidades en SOD-525.

Grupos sulfhidrilos totales (-SH)

La concentración de grupos sulfhidrilos totales se determinó por el método de Ellman (1958). En la cubeta experimental se añadieron 50 µl de fluido celómico, 500 µl de ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB), 250 µl de agua destilada, 200 µl de buffer Tris y 50 µl de la muestra se incubó por 10 minutos a

temperatura ambiente. Luego se midió la absorbancia a 412 nm, contra un blanco constituido por todos los reactivos a excepción del extracto. Se usó al glutatión reducido (3 mmol/l) como estándar.

Peroxidación de lípidos

La peroxidación de lípidos fue estimada por el método de análisis de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) siguiendo el protocolo estandarizado para bivalvos propuesto por Livingstone *et al.* (1990). Se tomaron 250 μ l de FC y se colocaron en baño de agua a 37°C por 15 minutos. Al término de este tiempo, los mismos se retiraron del baño de agua y se colocaron en baño de hielo, adicionando a cada tubo 250 μ l de solución cromógena contentiva de ácido tricloroacético 12,5%, ácido clorhídrico 1 mol/l para detener la reacción, luego a cada tubo se le añadió 500 μ l ácido tiobarbitúrico al 1,0%, se agitaron los tubos y se colocaron en baño de agua a 90°C con agitación constante por 30 minutos.

Posteriormente se retiraron del baño de agua y se colocaron nuevamente en baño de hielo para ser enfriados y luego centrifugados a 1 500 *g* por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante final se transfirió a la celda del espectrofotómetro para su medición a 532 nm, con un blanco constituido por todos los reactivos a excepción del extracto. La concentración de TBARS se calculó usando un coeficiente de extinción de $1,56 \times 10^5$ l cm/mmol. Los resultados son expresados en nmol de TBARS por mg de proteínas.

Proteínas totales

La concentración de proteínas se determinó por el método de Biuret. Se tomaron 0,8 ml de FC y 3 ml del reactivo de Biuret, se agitaron suavemente y se dejaron reposar por 20 minutos; luego se midió la absorbancia a 540 nm. Se contrastó con una curva patrón realizada con albúmina de suero de bovino (10 mg/ml). Los resultados fueron expresados en miligramos por cada mililitro de FC (Robinson y Hogden, 1940).

Salud de los erizos

El estado de salud de los erizos se determinó mediante el tiempo de recuperación de una posición invertida. Los erizos fueron colocados en posición invertida (boca arriba) en fondo del acuario. Se estimó el tiempo que tardó el organismo en voltearse para alcanzar su posición original (Tailor *et al.*, 2014). Adicionalmente, en organismos sensibilizados se monitorio diariamente durante una semana algunos síntomas, tales como cambios de coloración, pérdidas de espinas, comportamientos anormales.

Análisis Estadísticos

Se calcularon los promedios y varianzas de todas las variables para cada uno de los grupos estudiados. Los resultados de los tratamientos en los grupos estudiados se compararon con los controles a través de un análisis de varianza de una vía. Se realizó un análisis de componentes principales entre los parámetros determinados Para los análisis estadísticos se empleó el programa estadístico Statgraphic Plus versión 5.1 en ambiente Windows. (Sokal y Rohlf, 1981).

RESULTADOS

En la figura 1 se muestran niveles de anión superóxido ($\bullet\text{O}_2$) en erizos inoculados con distintas cepas bacterianas y no inoculados, los mismos mostraron variación significativa entre los grupos experimentales ($F_s=4,07$; $p<0,05$). Los promedios más elevados de $\bullet\text{O}_2$ fueron encontrados en los erizos inyectados *E. coli* y *V. parahaemolyticus* en contraste con el grupo control, inyectados con solución salina y *M. lysodeikticus*.

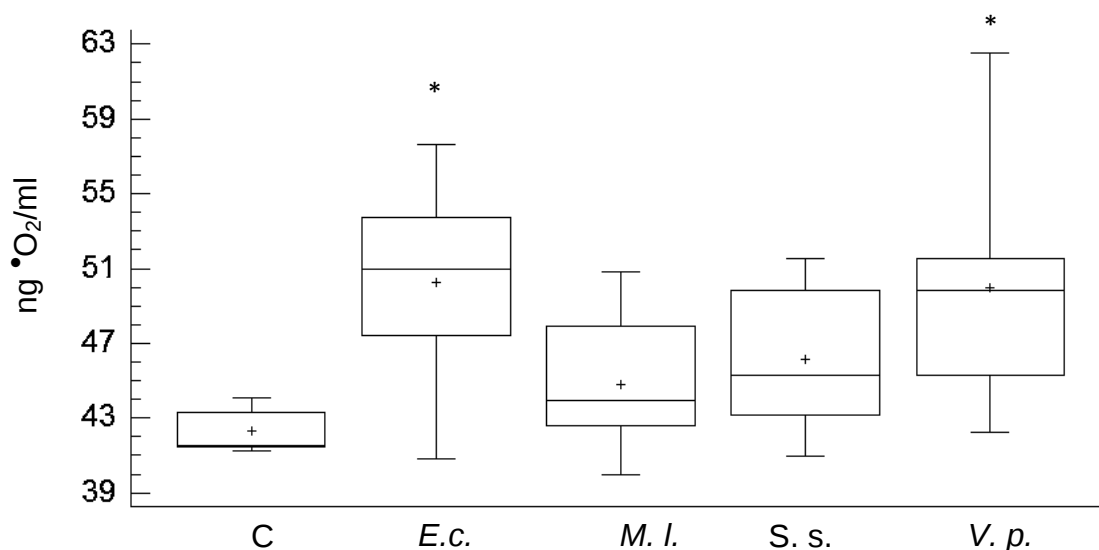


Figura 1. Niveles de anión superóxido ($\bullet\text{O}_2$) en fluido celómico del erizo *E. lucunter* inoculados con distintas cepas bacterianas. (*) El asterisco muestra diferencias significativas $*p<0,05$. (C) control, (E.c.) *Escherichia coli*, (M.c.) *Micrococcus lysodeikticus*, (S.s.) solución salina y (V.p.) *Vibrio parahaemolyticus*

En la figura 2 se muestra la actividad fagocítica de los celomocitos, estimada mediante los niveles de formazán, tanto en organismos aparentemente sanos (no inoculados), inoculados con solución salina e inyectados con las distintas bacterias. Se observó un incremento estadísticamente significativo en todos los erizos inyectados ($F_s=7,14$; $p<0,05$).

La mayor actividad de fagocitosis fue registrada en los erizos inyectados con *V. parahaemolyticus* (2,78 veces en contraste al control), seguidos por el grupo formado por los organismos inyectados con *M. lysodeikticus* y *E. coli*, inclusive los inyectados con solución salina.

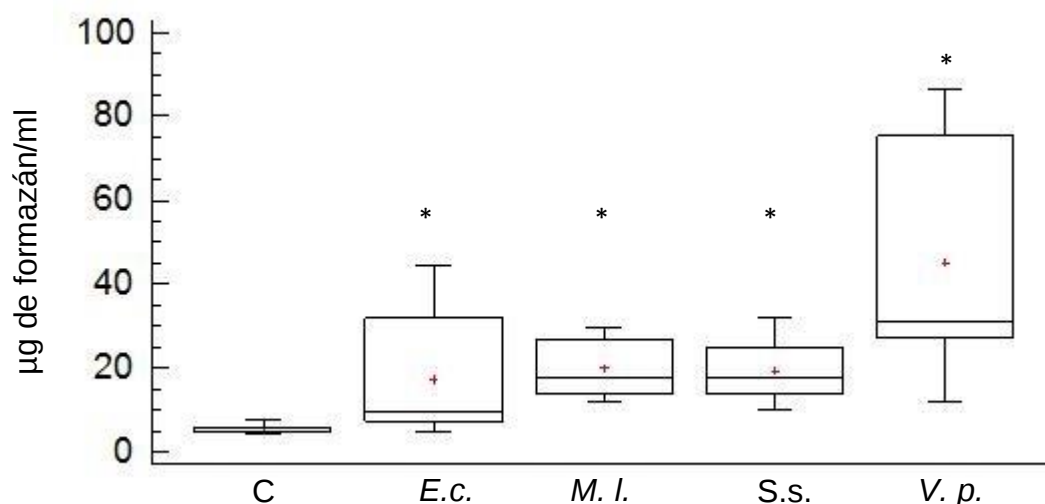


Figura 2. Niveles de formazán en fluido celómico del erizo *E. lucunter* inoculados con *M. lysodeikticus*, *E. coli* y *V. parahaemolyticus*. (*) El asterisco muestra diferencias significativas $*p < 0,05$. (C) control, (E.c.) *Escherichia coli*, (M.c.) *Micrococcus lysodeikticus*, (S.s.) solución salina y (V.p.) *Vibrio parahaemolyticus*

La actividad de CAT mostró incrementos significativos en los organismos inoculados con las cepas bacterianas con respecto al control ($F_s = 5,13$; $p < 0,05$), no así en los organismos inyectados con solución salina y controles (Fig. 3). Se registraron los mayores promedios de CAT en los organismos inoculados con *V. parahaemolyticus* (4,39 veces) seguido de *M. lysodeikticus* (4,32 veces) y *E. coli* (2,77 veces) con respecto a los no inyectados. Los organismos inyectados con solución salina no mostraron diferencias con respecto al control.

La enzima superóxido dismutasa (SOD) no evidenció cambios significativos en su actividad entre los organismos inoculados con cepas bacterianas y no

inoculados (Fig. 4); aunque sus mayores valores se registraron en los organismos inoculados con *V. parahaemolyticus* ($F_s=1,25$; $p>0,05$).

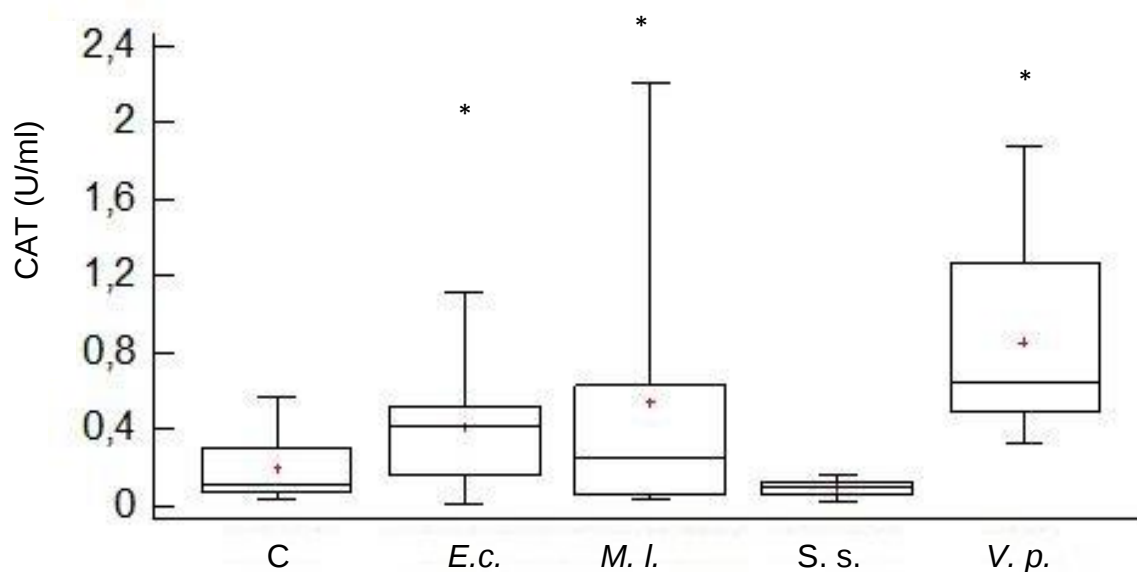


Figura 3. Actividad de Catalasa (CAT) en fluido celómico del erizo *E. lucunter* inoculados con distintas cepas bacterianas (control, solución salina, *M. lysodeikticus*, *E.coli* y *V. parahaemolyticus*). (*) El asterisco muestra diferencias significativas $p<0,05$. (C) control, (E.c.) *Escherichia coli*, (M.c.) *Micrococcus lysodeikticus*, (S.s.) solución salina y (V.p.) *Vibrio parahaemolyticus*

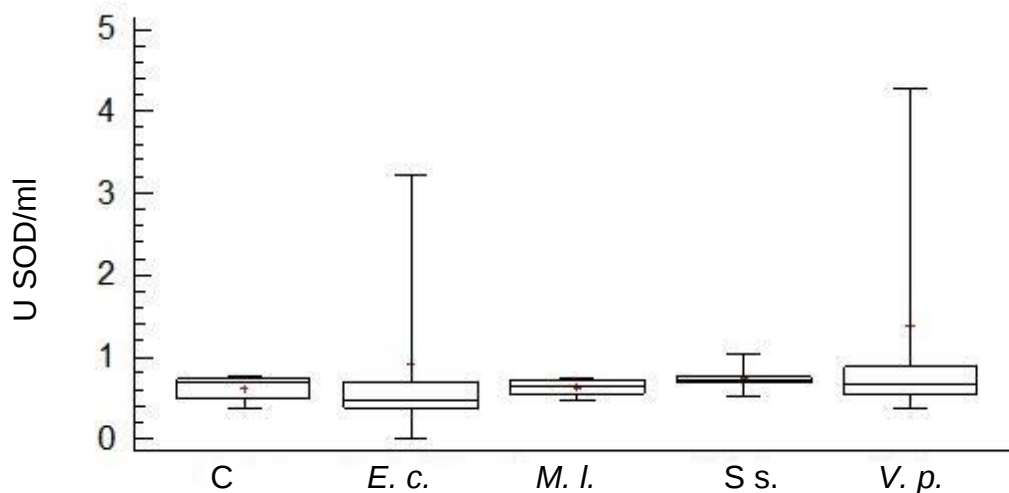


Figura 4. Actividad de superóxido dismutasa (SOD) en fluido celómico del erizo *E. lucunter* inoculados con distintas cepas bacterianas. (C) control, (E.c.) *Escherichia coli*, (M.c.) *Micrococcus lysodeikticus*, (S.s.) solución salina y (V.p.) *Vibrio parahaemolyticus*

Los niveles de grupos tioles (-SH) en el fluido celómico de los organismos aparentemente sanos e inoculados con las distintas bacterias no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($F_s=0,77$; $p>0,05$). Los promedios en los niveles de los grupos -SH en los organismos experimentales oscilaron entre 11,26 a 17,23 mmol de -SH/ml (Fig. 5).

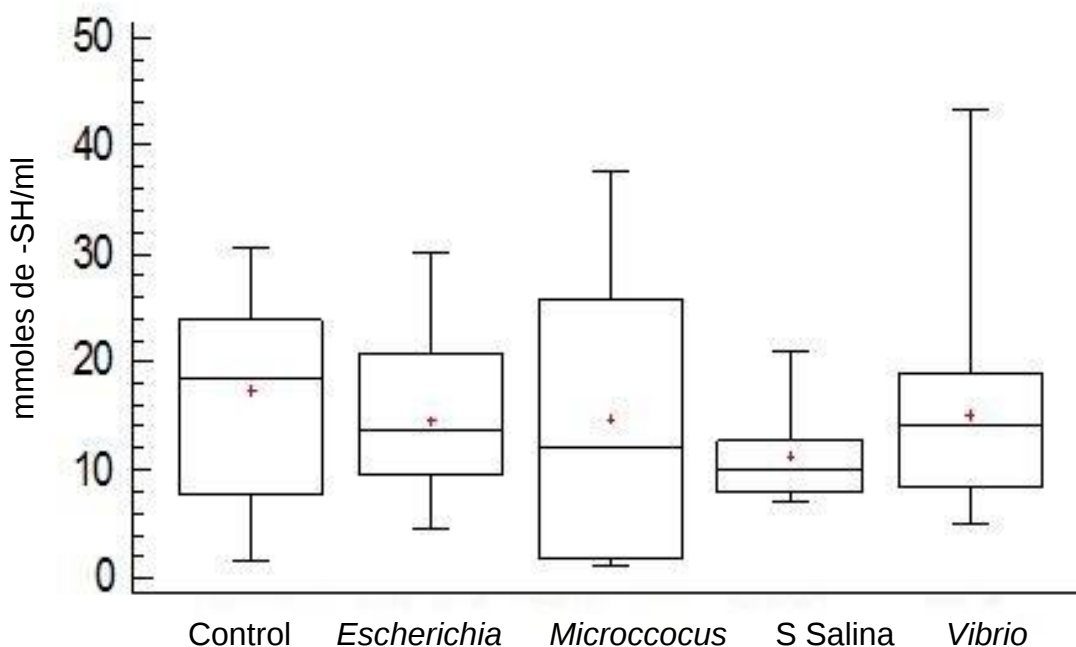


Figura 5. Niveles de grupos sulfhidrilos totales en fluido celómico del erizo *E. lucunter* inoculados con distintas cepas bacterianas. (C) control, (E.c.) *Escherichia coli*, (M.c.) *Micrococcus lysodeikticus*, (S.s.) solución salina y (V.p.) *Vibrio parahaemolyticus*

En la figura 6 se muestran los niveles de peroxidación lipídica, estimada mediante la producción de sustancias que reaccionan al ácido tiobarbitúrico (TBARS). No fueron evidenciadas diferencias significativas entre los organismos experimentales ($F_s=0,84$; $p>0,05$); aunque se observaron los mayores promedios en los erizos inyectados con *M. lysodeikticus* y *V. parahaemolyticus*.

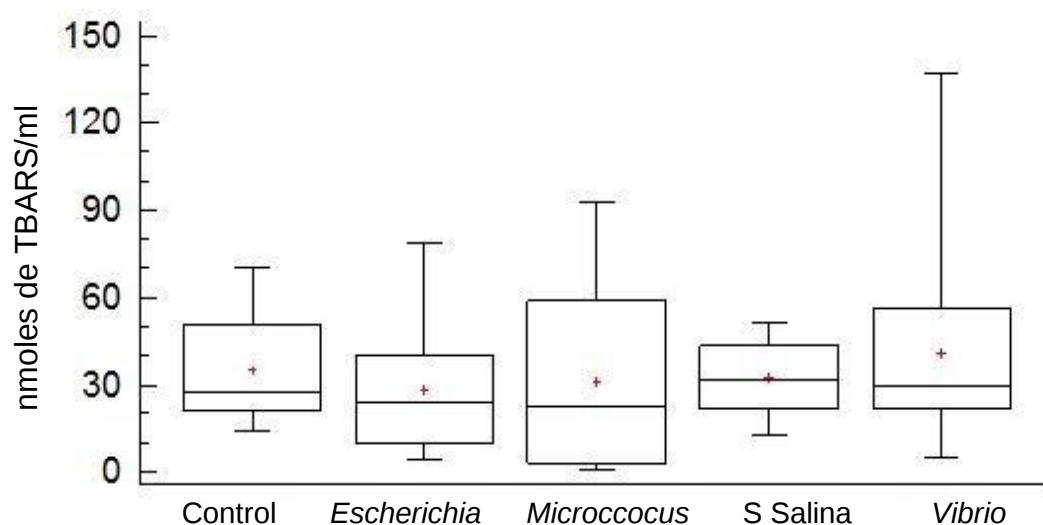


Figura 6. Concentraciones de sustancias que reaccionan al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en fluido celómico del erizo *E. lucunter* inoculados con distintas cepas bacterianas. (C) control, (E.c.) *Escherichia coli*, (M.c.) *Micrococcus lysodeikticus*, (S.s.) solución salina y (V.p.) *Vibrio parahaemolyticus*

En la figura 7 se muestran los niveles de proteínas totales por mililitro de fluido celómico en erizos estimulados con bacterias y controles. Los resultados indican diferencias estadísticamente significativas, en especial en los organismos inyectados *V. parahemolyticus* los cuales obtuvieron los mayores promedios, seguido por *E. coli*, *M. lysodeikticus* presentó promedios similares al grupo control y al grupo inyectado con solución salina.

El tiempo de recuperación de posición invertida es un indicador de la salud de los erizos, existiendo mucha variabilidad en los datos, obteniéndose poca diferencia entre los organismos inoculados con las distintas cepas bacterianas y los no inoculados ($F_s=1,42$; $p=0,26$). El tiempo más reducido fue observado en los organismos controles (<40 s). Los organismos inoculados presentaron promedios entre 60 a 120 s (Fig. 8).

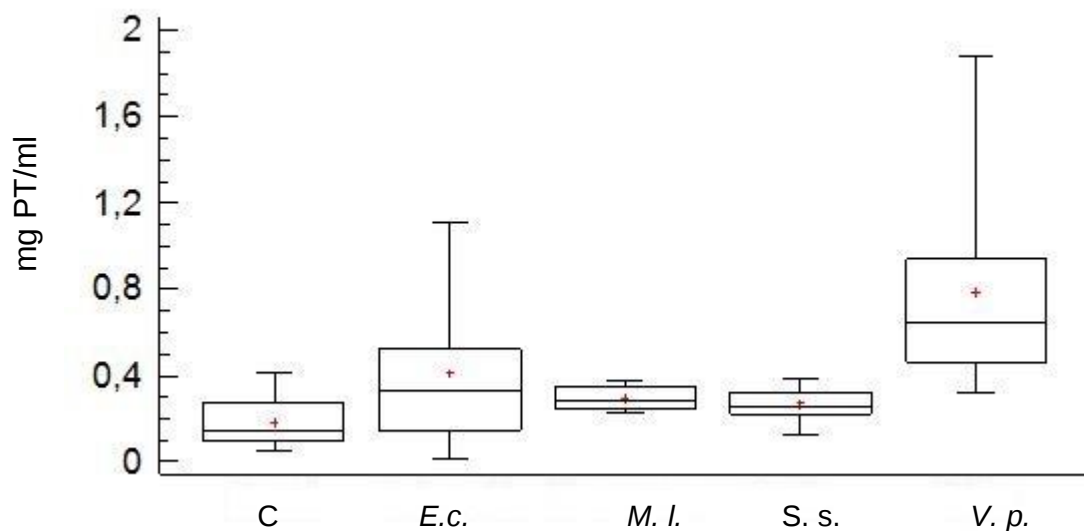


Figura 7. Concentración de proteínas (PT) en fluido celómico del erizo *E. lucunter* inoculados con distintas cepas bacterianas. (C) control, (E.c.) *Escherichia coli*, (M.c.) *Micrococcus lysodeikticus*, (S.s.) solución salina y (V.p.) *Vibrio parahaemolyticus*. (*) El asterisco muestra diferencias significativas $p < 0,05$.

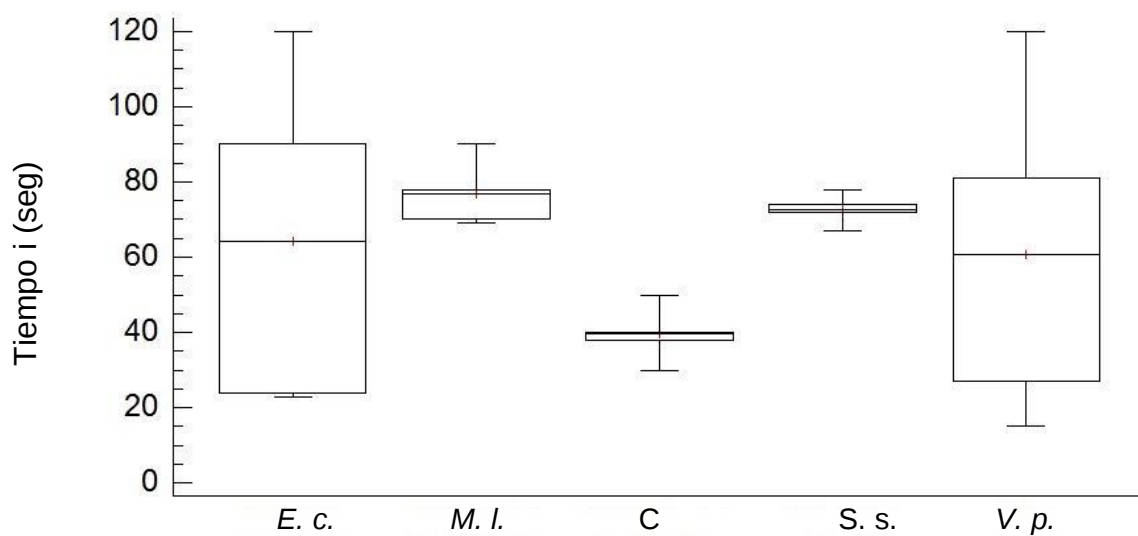


Figura 8. Tiempo de recuperación invertida *E. lucunter* inoculados con distintas cepas bacterianas, grupo control y solución salina. (C) control, (E.c.) *Escherichia coli*, (M.c.) *Micrococcus lysodeikticus*, (S.s.) solución salina y (V.p.) *Vibrio parahaemolyticus*.

El análisis de componentes principales (ACP) en fluido celómico del erizo *E. lucunter* inoculados con distintas cepas bacterianas mostró que las variables estimadas explican el 85,73% de la variabilidad de los datos. Donde se puede observar asociaciones lineales entre fagocitosis, $\cdot\text{O}_2$, CAT y los niveles proteínas totales.

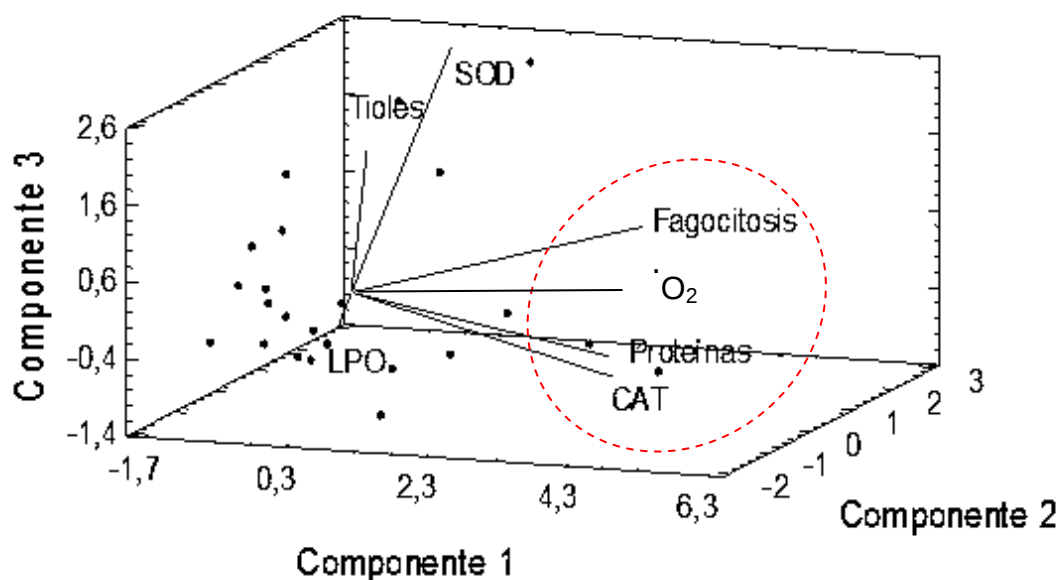


Figura 9. Análisis de componentes principales en fluido celómico del erizo *E. lucunter* inoculados con distintas cepas bacterianas.

Los organismos inoculados con bacterias no muestran síntomas externos evidentes con respecto a los organismos controles. En la tabla 1 se muestran solo un 1-10 % de fragilidad o pérdidas de espinas de los individuos enfermos. En los organismos inyectados con *M. lysodeikticus*, *E. coli* y *V. parahaemolyticus* se observaron entre una frecuencia del 30 al 35 % de los organismos con dobleces o pérdidas significativas de espinas (1 al 10 % en su testa). Sin embargo, se evidenciaron movimientos de espinas normales, coloración normal de la testa (negruzca-morada), estimulación oral, movimiento del tubos digestivos y coloración del fluido celómico (con tonos entre rosado

claro a oscuro) entre los organismos controles e inyectados. No fueron observados desoves aparentes en el agua del acuario.

	C	S.S.	ML	EC	VP
Organismos con Espinas perdidas	0%	0%	30%	35%	40%
Movimiento de espinas	+	+	+	+	+
Coloración de la testa	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Estimulación oral	+	+	+	+	+
Movimiento del tubo	+	+	+	+	+
Desove	0%	0%	0%	0%	0%
Coloración del fluido celómico	Característico	Característico	Característico	Característico	Característico

Tabla 1. Porcentajes de erizos infectados y síntomas en organismos inyectados con solución salina (SS), *Micrococcus lysodeikticus* (ML), *Escherichia coli* (EC) y de *Vibrio parahaemolyticus* (VP). Control (C). Respuesta positiva (+), intermedia (+/-) y negativa (-).

DISCUSIÓN

El incremento significativo en la actividad fagocítica demuestra la capacidad de respuesta inmunológica celular de *E. lucunter* en presencia de invasiones bacterianas. Se demostró el estallido oxidativo de los celomocitos en presencia de *E. coli*, *V. parahaemolyticus* y *M. lysodeikticus*, fundamentado con el incremento de la disponibilidad del anión superóxido ($\bullet\text{O}_2$) y de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), como mecanismo de defensa bajo inmuno-estimulación bacteriana. Con esto se evidenció la activación de los sistemas bioquímicos antimicrobianos que resultan en la formación de ERO (Smith, 2012). El $\bullet\text{O}_2$ tiene un rol preponderante como sustancia de acción bactericida, detalles que han sido demostrado de igual manera en hemocitos de moluscos-bivalvos (Donaghy *et al.*, 2012). En este caso, el incremento en la formación de $\bullet\text{O}_2$, junto a la capacidad de fagocitosis, representan la típica respuesta de estallido respiratorio en los celomocitos, al igual que ocurre en las células blancas de mamíferos.

Al parecer, al igual que en mamíferos, la formación de las ERO ($\bullet\text{O}_2$ y H_2O_2) en invertebrados es mediada por la enzima NADPH oxidasa contenida en las membranas de las células fagocitarias (Pipe, 1992; Buggé *et al.*, 2006; Donaghy *et al.*, 2012). Similarmente, en camarones y moluscos, se ha demostrado la producción de intermediarios reactivos del oxígeno ($\bullet\text{O}_2$ y H_2O_2) en células fagocíticas de organismos estimulados por bacterias (Roch, 1999; Campa-Cordova *et al.*, 2002). Con estos detalles se fundamenta la efectividad de las defensas inmunes en *E. lucunter*, y su accionar mediante el estallido respiratorio de los celomocitos en contra invasiones bacterianas inducidas experimentalmente.

La estimulación de las respuestas del sistema inmunológico celular y humoral en *E. lucunter* estimulado con bacterias vivas, ha sido evidenciado en el erizo verdi-blanco *L. variegatus* (Bastidas, 2016). Es así como en condiciones

metabólicas normales, existe un balance entre los eventos oxidativos, tales como la producción de ERO y los sistemas de defensa antioxidantes (barredores de radicales libres), que permite el mantenimiento de la homeostasis celular (Calderón, 2005). En un estudio realizado por Yen y Chen (2008) se reportó incrementos en el número de celomocitos circundantes en el fluido celómico en el camarón *Litopenaus vannamei* estimulado con distintos antígenos (durante 24 a 48 horas); de igual forma se demostró un aumento en la actividad fagocítica, acción de fenoloxidasas y estallido respiratorio; estos autores observaron que tal estímulo permitió la resistencia de los organismos contra una cepa de *Vibrio alginolyticus*.

Cuando la fagocitosis es un proceso activo, las ERO pueden sobrepasar la capacidad de las defensas antioxidantes produciendo desequilibrios moleculares (Dolmatova *et al.*, 2003; Majeske *et al.*, 2013). El daño molecular especialmente a los lípidos de membranas depende de la acción de las defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas. En este estudio, una actividad fagocítica elevada en *E. lucunter* fue asociado con un incremento de la actividad de la CAT. Posiblemente se deba a la producción y posterior utilización de H_2O_2 como agente bactericida; el cual sirve de sustrato de CAT para ser transformado a sustancias más inocuas.

La actividad de CAT en *E. lucunter* sometido a la estimulación bacteriana evita que los posibles incrementos de los niveles de TBARS inducidos por las ERO. CAT puede mantener en concentraciones fisiológicamente estables al H_2O_2 , descomponiéndolo en $2H_2O$ y O_2 , limitando así, la sobreproducción de radicales libres de alta toxicidad, tal como $\bullet OH$ (Storey, 1996). Beaumont (2010) muestra que los mayores promedios de lípidos peroxidados y daños a proteínas en el erizo *Evechinus chloroticus* están asociados a un incremento de la producción de H_2O_2 . Estos hallazgos fundamentan la acción antioxidante de CAT para evitar la propagación del daño oxidativo, especialmente en las membranas de los celomocitos de *E. lucunter* sensibilizados con las cepas de bacterias.

A pesar de la formación intracelular de $\bullet\text{O}_2$ en organismos inmuno-estimulados, la actividad de SOD no presentó variación. Posiblemente, la actividad de la SOD es suficiente para barrer $\bullet\text{O}_2$, transformándolo a H_2O_2 , que a su vez es removido por la CAT. En crustáceos, se ha demostrado la capacidad removedora de $\bullet\text{O}_2$ por parte de la SOD (Holmblad y Söderhäll, 1999). En otros estudios realizados con el holoturio *E. fradatrix* se demostró la producción de $\bullet\text{O}_2$, junto a SOD, en amebocitos en presencia de tanto de la toxina como de la bacteria *Yersinia pseudotuberculosis* incubados por 24 horas (Dolmatova et al., 2003).

En el erizo *Paracentrotus lividus* sensibilizados con pro-bióticos *Lactobacillus paracasei*, un recombinante de la misma especie y *Saccharomyces cerevisiae* (zymozán A), se ha observado que pueden incrementar las respuestas inmunes tales como la actividad de lisozimas y producción de óxido nítrico (NO). De la misma manera, en *P. lividus* se ha demostrado que la aplicación de zymozán A y organismos infectados con vibrios proveen efectos beneficiosos en la función inmune del organismo (Cipriano et al., 2016).

Las proteínas en el fluido celómico de *E. lucunter* desempeñan un papel dominante en el metabolismo celular debido a su doble rol tanto estructural como funcional (actividad inmune). El aumento significativo en los niveles de proteínas totales en el fluido celómico de los erizos inmuno-estimulados con los distintos microorganismos forma parte de las respuestas inespecíficas inmuno-modulatorias de *E. lucunter*. Parece ser una respuesta común que las proteínas y algunos péptidos en el fluido celómico son de relativa abundancia cuando los erizos son invadidos por microbios. Dheilly (2010) observó inducción en las proteínas de estrés y desintoxicadoras en *Strongylocentrotus purpuratus* inyectado con lipopolisacáridos (LPS) bacterianos.

Un posible incremento del número de celomocitos en el fluido celómico puede contribuir al resultado de los niveles de proteínas. Una de las proteínas más abundantes dentro de los celomocitos es la actina del citoesqueleto; La cual

permite el movimiento ameboideo y la formación de pseudópodos, pudiendo migrar activamente desde el tejido conectivo peristomial de la cavidad celómica a los sitios de invasión o daño (Brockton *et al.*, 2008). También se ha señalado que la vitelogenina en celomocitos puede incrementar, exhibiendo actividad celomo-aglutinante y antibacterial. Esta proteína está localizada en los granulocitos no coloreados que la descargan al fluido celómico en respuesta a una situación de estrés (Cervello *et al.*, 1994).

El sistema inmune en *E. lucunter* fue estimulado similarmente por las tres cepas bacterianas, demostrando así la inespecificidad de la respuesta. De igual manera, se ha demostrado la misma acción inespecífica en *L. variegatus* (Bastidas, 2016) y *P. lividus* (Dheilly, 2010). Estas investigaciones sugieren que las respuestas inmunológicas tempranas no difieren en organismos inyectados con lipopolisacáridos, bacterias y solución salina, sugiriendo que los mecanismos inmunes también responden al trauma experimental.

Se conoce que los lipopolisacaridos (LPS) contentivos en la membrana exterior de las bacterias, especialmente Gram negativas, son los más potentes estimuladores para el sistema inmune innato en erizos (Beutler y Rietschel, 2003), (Shao *et al.*, 2015), tal como es el caso de *V. parahemoliticus*. En las bacterias existen ciertas proteínas de reconocimiento, las mismas forman partes de patrones de identificación moleculares, por ejemplo, las proteínas 185/333. Estos patrones han sido localizados en fagocitos filopodiales, amebocitos asociados al intestino y las esférulas no coloreadas (Majeske *et al.*, 2013)

Los niveles de tioles totales (–SH) no mostraron variabilidad en el fluido celómico de los organismos aparentemente sanos e inoculados con las distintas cepas bacterianas. Posiblemente la acción de CAT como enzima antioxidante, es suficiente para regular la producción de ERO en el fluido celómico. No obstante, en la mayoría de los sistema celulares, uno de los tioles con mayor capacidad antioxidante es el glutatión reducido (GSH) (Dale y Russo, 1988; Van-Laer *et al.*, 2013). GSH es la principal protagonista en la destrucción de

intermediarios de ERO, cumpliendo una serie de funciones como mantener el balance redox en las células, protegiéndola del estrés oxidativo (Lawrence y Balzhin, 1998). Este tiol de baja masa molecular actúa como antioxidante endógeno y amortiguador redox, siendo importante en la homeostasis celular. La capacidad de los erizos de recuperación de su posición invertida demostró que su condición física no es afectada por la invasión bacteriana ni por el estímulo del trauma post-inyección. Esto garantiza su defensa contra los depredadores en organismos sensibilizados, puesto que esta habilidad constituye una estrategia para su sobrevivencia en el medio natural. Este tipo de respuesta anatómica ha sido comúnmente usada como marcador de salud en erizos expuestos a sustancias contaminantes (Raposo, 2017), genotóxicos (Canty et al., 2009) e infecciones bacterianas (Bastidas, 2016).

Asimismo, pocos síntomas de infección fueron hallados en organismos estimulados por bacterias. Aunque, solo de 1 a 10 % presentaron algunos de estos síntomas eventuales tales como cambios de coloración, lesiones en la testa, pérdidas de espinas. Casi la totalidad de los organismos infectados permanecieron en condiciones óptimas aparentes. Asumiendo que *E. lucunter* puede tolerar altas concentraciones de inóculos bacteriales. Esta capacidad le confiere la habilidad de sobrevivencia a medios impactados por entorobacterias.

El sistema inmune y antioxidante de *E. lucunter* puede garantizar la resistencia de estos organismos a infecciones bacterianas en el medio. De allí, que en su hábitat natural existe poca frecuencia de evidencias de síntomas de afecciones o enfermedades provocadas por microorganismos. Se presume que estas ventajas permiten que la especie sea abundante y pueda desplazar a otras especies similares en los ecosistemas coralinos en el golfo de Cariaco. Aunque, se ha observado mortandades en otras especies de erizos producidas por bacterias en otras latitudes (Watts et al., 2007). En Curazao, fue reportada una alta mortalidad del erizo *Meona ventricosa* (Nagelkerken et al., 1999)

caracterizada por una progresiva pérdida de espinas y posterior muerte, provocada por bacterias gran negativas del género *Pseudoalteromonas*, el cual produce tetradoxina. Adicionalmente, estos autores indujeron experimentalmente tal infección en *L. variegatus* con una de las bacterias aisladas resultando en síntomas similares.

Los incrementos de la actividad fagocítica, producción de $\bullet\text{O}_2$, la actividad antioxidante de CAT y niveles de proteínas en el fluido celómico del erizo negro *E. lucunter* inmuno-estimulado por inoculación bacteriana son el reflejo de los mecanismos de respuesta del organismo ante la invasión de patógenos o cuerpos extraños. Adicionalmente, se demostró la capacidad de las defensas antioxidantes para evitar lipoperoxidación en las membranas de los celomocitos, y su acoplamiento con las repuestas inmunológicas en el estallido oxidativo. El sistema inmunológico celular (actividad fagocítica- $\bullet\text{O}_2$), humoral (niveles de proteínas) y el sistema antioxidante enzimático (CAT) muestran ser respuestas relevantes, las cuales pueden garantizar la sobrevivencia de los organismos en presencia de invasiones bacterianas

CONCLUSIONES

El aumento significativo de la actividad fagocítica, la producción de $\bullet\text{O}_2$ y niveles de proteínas totales en los organismos inyectados con las diferentes cepas bacterianas nos indican la efectividad del sistema de defensa celular y humoral en *Echinometra lucunter* ante la invasión de microorganismos.

El aumento en la enzima CAT deja mostrar el papel preponderante como barredor de peróxidos en fluido celómico bajo una intensa actividad fagocítica (estallido celular), evidenciado la aceleración del sistema antioxidante enzimático para evitar daño lipoperoxidativo.

No se observaron daños oxidativos en los lípidos (LPO), cambios en la actividad en la enzima SOD ni variación en los niveles de grupos $-\text{SH}$ por sensibilización bacterial en el fluido celómico de *E. lucunter*.

El tiempo para voltearse es ligeramente alterado en algunos de los organismos bacterio-estimulados, los cuales coinciden con pérdida y movimiento reducido de sus espinas.

BIBLIOGRAFÍA

- Aebi, H. 1984. Catalase *in vitro*. *Methods in Enzimology*, 105: 121-126.
- Anton, Y. y Salazar, R. 2009. El sistema inmune de los invertebrados. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 10: 1-10.
- Arzola, K. 2015. Composición bioquímica y defensas antioxidantes en el erizo negro *Echinometra lucunter* (linnaeus, 1758) (Echinodermata: Echinoidea) en distintos estadíos reproductivos. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología. Universidad de Oriente. Cumaná.
- Babior, B.M.; Kipnes, R.S. y Curnutte, J.T. 1973. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J. Clin. Invest.*, 52: 741–744.
- Babior, B. 1978. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *N. Engl. J. Med.*, 298: 659–668.
- Ballarin, L.; Cima, F. y Sabbadin, A. 1994. Phagocytosis in the colonial ascidian *Botryllus schlosseri*. *Dev. Comp. Immunol.*, 18: 467-81.
- Bastidas, 2016. Respuestas inmunológicas innatas en el erizo verdi-blanco *Lytechinus variegatus* (Echinoidea: Toxopneustidae) infectado experimentalmente con bacterias. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Bioanálisis. Universidad de Oriente. Núcleo Sucre.
- Bauer, J.C. y Young, C.M. 2000. Epidermal lesions and mortality caused by vibriosis in deep-sea Bahamian echinoids: a laboratory study. *Dis. Aquat. Org.* 39: 193–199.
- Beaumont, T. 2010. The free radicals theory of ageing: does it apply to Antarctic and temperate sea urchin. A thesis submitted in fulfilment of the degree of Master of Science- Marine Science. University of Atago. New Zealand.
- Beutler, B. y Rietschel, E.T., 2003. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nature Review Immunology*, 3: 169-176.
- Brockton, V. Henson, J.H.; Raftos, D.A.; Majeske, A.J.; Kim, Y.O. y Smith, L.C. 2008. Localization and diversity of 185/333 proteins from the purple sea urchin – unexpected protein-size range and protein expression in a new coelomocyte type. *Journal Cell Science*, 121: 339-348.

Buggé, D.M.; Hégaret, H.; Wikfors, G.H. y Allam, B. 2006. Oxidative burst in hard clam (*Mercenaria mercenaria*) haemocytes. *Fish Shell. Immunol.*, 23:188-196].

Calderón, R. 2005. La apoptosis en biología y patología. *Revista Peruana de Cardiología*, 31: 119-128.

Campa-Cordova, A. Hernández- Saavedra. N. Y., De Pilippis, R. 2002. Generation of Superoxide anion and SOD activity in hemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to β -glucan and sulphate polysaccharide. *Fish and Shellfish Immunity*, 12: 353 – 366.

Canty, M.N.; Hutchinson, T.H.; Brown, R.J.; Jones, M.R. y Jha, A.N., 2009. Linking genotoxic responses with cytotoxic and behavioral or physiological consequences: differential sensitivity of echinoderms (*Asterias rubens*) and marine molluscs (*Mytilus edulis*). *Aquat. Toxicol.*, 94: 68–76.

Carpenter, R. 1988. Mass mortality of a Caribbean Sea urchin: immediate effect on community metabolism and other herbivores. *Proceedings of Natural Academic Science of USA*, 85: 511-514.

Cervello, M.; Arizza, V.; Lattuca, G.; Parrinello, N. y Matranga, V. 1994. Detection of vitellogenin in a subpopulation of sea urchin coelomocytes. *Eur. J. Cell Biol.*, 64: 314-319.

Céspedes, M. y Ela, M. 1996 Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar radicales libres. *Rev. Cubana Inv. Biomed.*, 15: 75-8.

Chihuailaf, R.; Contreras, P. y Wittwer, F. 2002. Patogénesis del estrés oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud animal. *Veterinaria México*, 33: 265-283.

Cipriano-Maack, A.N. 2016. Immunostimulatory effects of different aspects of aquaculture on the host response in the edible sea urchin, *paracentrotus lividus*. PhD Thesis, University College Cork. 206 pp.

Cooper, E.; Raftos D.; Zhang, Z. y Kelly, K. 1995. Purification and characterisation of tunicate opsonins and cytokine-like proteins. En: *Techniques in Fish Immunology-4: Immunology and pathology of aquatic invertebrates*. Stolen J. S. (Ed). SOS Publications: Fair Haven, pp: 43-54.

Couter, G.; Warnau, M.; Jangoux, M. y Dubois, P. 1999. Reactive oxygen species (ROS) production by amoebocytes of *Asterias rubens* (Echinodermata). *Fish. Shell. Immunol.*, 12:187–200.

Dale, B. y Russo, P. 1988 Sulfhydryl groups are involved in the activation of sea urchin eggs. *Gam. Res.*, 19(2): 161-168.

Di Giulio, R.; Benson, W.; Sander, B. Y Vanveld, P. 1995. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation and toxicity. En: Rand, G.M. (Ed). *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Second Edition. pp. 223-255.

Dikkeboom, R., Tijangel, J.M.G.H., Mulder, E.C., van der Knaap, W.P.W., 1987. Hemocytes of the pond snail *Lymnaea stagnalis* generate reactive forms of oxygen. *J. Invertebr. Pathol.*, 49: 321–331.

Donaghy, L.; Kraffe, E.; Le Goic, N.; Lambert, C., Volety, A.K. y Soudant, P. 2012. Reactive Oxygen Species in Unstimulated Hemocytes of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*: A Mitochondrial Involvement. *PLoS ONE*, 7: e46594.
Lemaitre, B.; Reichhart, J. y Hoffmann, J. 1997. Drosophila host defense: Differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proceedings of Natural Academic Science of USA*, 94: 14614-14619.

Dheilly, N. 2010. Proteomic analysis of sea urchin immune responses and characterisation of highly variable immune response proteins. A thesis submitted to Macquarie University in partial fulfillment of the requirements of the degree of Doctor of Philosophy. Sydney, NSW, Australia.

Dheilly, N.; Haynes, P.; Raftos, D. y Nair S. 2012. Time course proteomic profiling of cellular responses to immunological challenge in the sea urchin, *Haliotis erythrogramma*. *Developmental and Comparative Immunology*, 37: 243–256.

Dolmatova, L. Elisekina, M., Timchenko, N., kovalera, A., y Shitkova, O., 2003. Generation of reactive oxygen species in the different fractions of the hemocytes of holothurian *Eupentasia fraudatrix* in response to the thermolabile toxin of *Yersenia pseudotuberculosis* in vitro. *Chinese journal of Limnology and Oceanology* 21(4):293-304.

Ellman, G. 1958. Quantitative determination of peptides by sulfhydryl (-SH) groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, 82: 70-77.

Gilles, K. y Pearse, J. 1986. Disease in sea urchins *Strongylocentrotus purpuratus*: experimental infection and bacterial virulence. *Dis. Aquat. Organ.*, 1: 105- 114.

Goth, L. y Pay, A. 1996. Genetic heterogeneity in acatalasemia. *Electrophile*, 17: 1302-1303.

González, L. y Muñoz, R. 2003. El papel de los residuos de cisteína en la estructura y función de las proteínas. *Revista en Educación Bioquímica*, 22: 2-10.

Gross, P; Al-Sharif, W.; Clow, L. y Smith L. 1999. Echinoderm immunity and the evolution of the complement system. *Dev. Comp. Immunol.*, 23: 429-44.

Halliwell, B. y Gutteridge, J. 1999. *Free radicals in biology and medicine*. 3^o edición. Oxford. University Press. Oxford, RU. 936 pp.

Hibino, T. Loza-Coll, M. y Messier, C. 2006. The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome. *Develop. Biol.*, 300: 349-365.

Holmblad, T. y Söderhäll, K., 1999. Cell adhesion molecules and antioxidant enzymes in a crustacean, possible role in immunity. *Aquaculture*, 172: 111-123.

Huerta, M.; Ortega, M.; Cobos, M.; Herrera.; Díaz-Cruz, A. y Guinzberg, P. 2005. Estrés oxidativo y el uso de antioxidantes en animales domésticos. *Interciencias*, 30: 728-734.

Jangoux, M. 1987. Diseases of Echinodermata. I. Agents microorganisms and protistans. *Dis. Aquat. Organ.*, 2: 147-162.

Kumari, J. y Sahoo, P. 2006. Dietary beta-1,3 glucan potentiates innate immunity and disease resistance of Asian catfish, *Clarias batrachus* (L.). *J. Fish Dis.*, 29:95-101.

Lawrence, J. y Balzhin, A. 1998. Life-history strategies and the potencial of sea urchins for aquaculture. *J Shellfish. Res.*, 17: 1515-1522.

Little, T.; Hultmark, D. y Read, A. 2005. Invertebrate immunity and the limits of mechanistic immunology. *Nature Immunol.*, 6: 651-654.

Livingstone, D.; García-Martínez, P.; Michel, J.; Narbonne, J.; O'Hara, S.; Ribera, D. y Wiston, G. 1990. Oxiradicals production as a pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel *Mytilus edulis* L. and other molluscs. *Func. Ecol.*, 4: 415-424.

Liu, H.; Kelly, M. y Cook, E. 2007. The effect of diet type on growth and fatty-acid composition of sea urchin larvae, *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) (Echinodermata). *Rev. Aquat.*, 264: 247-262.

Majeske, A.; Christopher, J.; Bayne, L. y Smith C. 2013. Aggregation of Sea urchin phagocytes is augmented in vitro by lipopolysaccharide. *Public Library of Science*, 8: 61419.

Matranga, V.; Pinsino, A.; Celi, M.; Di Bella, G. y Natoli, A. 2006. Impacts of UV-B radiation on short-term cultures of sea urchin coelomocytes. *Mar. Biol.*, 149: 25-34.

Mydlarz, L.; Jones, L.; and C. Drew Harvell. 2006. Innate Immunity, environmental drivers, and disease ecology of marine and freshwater invertebrates, *An. Rev. Ecol. Evol. System.*, 37: 251–88.

Nagelkerken I, van der Velde G, Gorissen MW, Meijer GJ, van't Hof T, den Hartog C. 2000. Importance of mangroves, seagrass beds and the shallow coral reef as a nursery for important coral reef fishes, using a visual census technique. *Estuar Coast Shelf Sci* 51:31–44

Nebot, C.; Moutet, M.; Huet, P.; J. Yadan, J. y Chau-diere, J. 1993. Spectrophotometric assay of superoxide dismutase activity based on the activated autoxidation of a tetracyclic catechol. *Anal. Biochem.*, 214: 442-451.

Ohkawa, H.; Ohishi N. y Yagi, K. 1978. Assay for lipidperoxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Rev. Anal. Biochem.*, 95(2):351-358.

Pipe, R., 1992. Generation of reactive oxygen metabolites by the hemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Dev. Comp. Immunol.*, 17: 211–219.

Raposo, D. 2017. Respuestas inmunológicas y estabilidad de las membranas lisosomales en el erizo verde-blanco *Lytechinus variegatus* (Echinoidea: Toxopneustidae) expuesto a cobre. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Bioanálisis. Universidad de Oriente. Núcleo Sucre.

Reiter, R.J. 1995. The pineal gland and melatonin in relation to aging: a summary of the theories and of the data. *Exp. Gerontol.*, 30: 199–212.

Rendón, L. y Balcazar, J. 2003. Inmunología de camarones: Conceptos básicos y recientes avances. *Aquatic*, 19: 27-33.

Reyes-Luján, J. 2015. Influencia de los factores ambientales sobre el ciclo reproductivo y la gametogénesis de *Echinometra lucunter* (Echinodermata: Echinoidea) en el nor-oriente de Venezuela, estado Sucre. Trabajo de grado

para obtener el título de Doctor en Ciencias Marinas. Instituto Oceanográfico de Venezuela. Universidad de Oriente, Cumaná.

Robinson H. y Hogden, C. 1940. Relationship to the protein which bears a quantitative production of a stable color conditions necessary for the proteins: a study of the determination of serum concentration. *J. Biol. Chem.*, 35:707-725.

Roch, P., 1999. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture*, 172 (1-2): 125- 145.

Rodríguez, J. y Le Moullac. 2000. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture*, 191: 109-119.

Rodríguez, J.; Menéndez, J. y Trujillo, Y. 2001. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev. Cub. Med. Mil.*, 30(1): 36-44.

Rubino, F.; Verduci, C.; Giampiccolo, R.; Pulvirenti, S.; Brambilla, G. y Colombi, A. 2004. Characterization of the disulfides of bio-thiols by electrospray ionization and triple-quadrupole tandem mass spectrometry. *J. Mass. Spectrom.*, 39: 1408-1416.

Shao, B. 2015. Minimum network constraint on reverse engineering to develop biological regulatory networks. *J. Theor. Biol.*, 380:9-15.

Smith, L. 2012. Innate immune complexity in the purple sea urchin: diversity of the Sp185/333 system. *Frontier of Immunology*, 3: 1-14.

Sokal, R. y Rohlf, J. 1981. *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*. Segunda edición. WH Freeman. New York.

Splettstoesser, W. y Schuff-Werner, P. 2002. Oxidative stress in phagocytes - "The enemy within". *Micro. Res. Tech.*, 57: 441-455.

Storey, K. 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J Med. Biol. Res.*, 29(12): 1715-1733.

Tarima, K.; Machado, J. y Lawrence, J. 2007. Edible sea urchins: Biology and Ecology. Segunda edición. Elsevier Science Technology. New York. Pags. 135-158.

Taylor J.; Lovera C.; Whaling P.; Buck, K.; Pane, E. y Barry, J. 2014. Physiological effects of environmental acidification in the deep-sea urchin *Strongylocentrotus fragilis*. *Biogeosciences*, 11: 1413–1423.

Van-Laer, K.; Hamilton, C. y Messens, J. 2013. Low-Molecular-Weight Thiols in Thiol-Disulfide Exchange. *Antiox. Red. Signal.*, 18(13): 1642-1653.

Watts, S.; McClintock, J. y Lawrence, J. 2007. Ecology of *Lytechinus*. En: *Edible Sea Urchins: Biology and Ecology*. Lawrence, J. (ed). Elsevier, Amsterdam. Págs. 473-497.

Wang, Y.N.; Feng, N.S.; Li, Q.; Ding, J.; Zhan, Y.Y. y Chang, Y.Q. 2012. Isolation and characterization of bacteria associated with a syndrome disease of sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* in North China. *Aquacult. Res.*, 1–10.

Wang, Y.N.; Chang, Y.Q. y Lawrence J.M. 2012. Disease in sea urchin. En: *Edible Sea Urchins: Biology and Ecology*. Lawrence, J. (ed). Elsevier, Amsterdam. Págs. 179-186.

Yeh.; Che. 2008. Immunomodulation by carrageenans in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. Department of Aquaculture, College of Life Sciences, National Taiwan Ocean University, Keelung, Taiwan, 202, ROC.

HOJAS DE METADATOS

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

Título	“DEFENSAS ANTIOXIDANTES EN EL FLUIDO CELÓMICO DEL ERIZO NEGRO <i>Echinometra lucunter</i> (Linnaeus, 1758) ESTIMULADO CON INÓCULOS BACTERIANOS “
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Aparicio Gabriela	CVLAC	18.417.210
	e-mail	Gabylucha081@hotmail.com
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Erizos
celomocitos
inmunológico
péptidos
fagocitosis
antioxidante
inocular
inmuno-estimulados

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

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Salud	Bioanálisis

Resumen (abstract):

Resumen

El sistema de defensa inmunológico en los erizos de mar está conformado por células circundantes (celomocitos) y factores humorales con actividad lítica (péptidos y proteínas) contenidas en el fluido celómico (FC). La fagocitosis es uno de los mecanismos de defensa inmunológico mediada por los celomocitos que elimina agentes extraños a través de la generación de especies reactivas al oxígeno (ERO). Las ERO pueden alterar el estado redox-celular, causando posibles daños moleculares dependiendo de la capacidad antioxidante del FC. Para evaluar el sistema de defensa antioxidante en el FC del erizo *E. lucunter* se procedió a inocular, vía intra-membrana peristomial, tres cepas bacterianas vivas por separado: *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Micrococcus lysodeikticus*. Después de 16 h post-inyección se determinaron la actividad fagocítica (AF), producción de anión superóxido ($\bullet\text{O}_2$), actividad de las enzimas catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD), niveles de lipoperoxidación (LPO), grupo sulfhidrilos (-SH) y proteínas totales (PT). Adicionalmente, se estimó la capacidad de los organismos de enderezarse de la posición invertida y los cambios externos de la testa. La AF, CAT, producción de $\bullet\text{O}_2$ y PT mostraron incrementos marcados, asociados significativamente en los organismos inoculados con las distintas bacterias. Los niveles de LPO, actividad de SOD y -SH no mostraron variaciones entre los organismos inoculados y no inoculados. El tiempo para voltearse es ligeramente reducido en algunos de los organismos inmunológicamente estimulados; mostrando a su vez un bajo porcentaje de pérdida y movimientos reducidos de sus espinas. El incremento significativo en la AF, producción de $\bullet\text{O}_2$ y la concentración de PT en *E. lucunter* en presencia de estimulantes bacterianos vivos muestra la efectividad del sistema inmune, tanto celular como humoral. En adición, los datos indican que CAT juega un papel preponderante en el FC para evitar cambios en el estatus antioxidante que pudieran estar asociados al estadillo respiratorio de los celomocitos. La efectiva capacidad de respuesta antioxidante de *E. lucunter* en organismos inmuno-estimulados por bacterianas garantiza su sobrevivencia en el hábitat natural.

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

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Dr. Zapata Edgar	ROL	CA ☐ A ☒ S ☒ T ☐ U ☐ J ☒ U ☒ X
	CVLAC	12.269.219
	e-mail	
	e-mail	
	ROL	CA ☐ A ☒ S ☒ T ☐ U ☐ J ☒ U ☒ X
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	ROL	CA ☐ A ☐ S ☐ T ☐ U ☐ J ☒ U ☒ x
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2018	05	11

Lenguaje: SPA

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

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
PG-EdgarL.doc	Aplication/word

Alcance:

Espacial: UNIVERSAL

Temporal: INTEMPORAL

Título o Grado asociado con el trabajo:

Licenciado en Bioanálisis

Área de Estudio:

Licenciatura en Bioanálisis

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

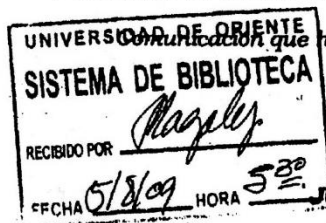
Cumaná, 04 AGO 2009

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"**.

Letido 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.



Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

JUAN A. BOLANOS CUNTELE
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/maruja

Apartado Correos 094 / Telfs: 4008042 - 4008044 / 8008045 Telefax: 4008043 / Cumaná - Venezuela

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”.

Gabriela Aparicio
AUTOR

Dr. Edgar Zapata
ASESOR