



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

RESPUESTAS INMUNOLÓGICAS INNATAS EN EL ERIZO VERDI-BLANCO
Lytechinus variegatus (ECHINOIDEA: TOXOPNEUSTIDAE) INFECTADO
EXPERIMENTALMENTE CON BACTERIAS
(Modalidad: Tesis de Grado)

MARIÁNGEL JOSÉ BASTIDAS MORENO

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

CUMANÁ, 2017

RESPUESTAS INMUNOLÓGICAS INNATAS EN EL ERIZO VERDI-BLANCO
Lytechinus variegatus (ECHINOIDEA: TOXOPNEUSTIDAE) INFECTADO
EXPERIMENTALMENTE CON BACTERIAS

APROBADO POR:



Prof. Edgar Zapata-Vívenes
Asesor



Profa. Yanet Antón
Jurado principal



Profa. Raquel Salazar
Jurado principal

DEDICATORIA

A

Dios, guía espiritual de mi vida

Mi madre Risis Moreno, quien supo seguir junto conmigo esta lucha, dándome aliento para poder alcanzar lo que hoy he logrado. Te Amo.

Mi padre José Bastidas, por expresarme su alegría y satisfacción sincera ante mis logros.

Mi hermano Miguel Bastidas, que le sirva de ejemplo para que en un mañana logre lo que desee.

Mi abuela Rosa Rodríguez[†], que día a día pedía a Dios mediante sus oraciones que me iluminara y que en vida me colmó de cariño.

Mis tías y tíos por sus valiosos estímulos.

Todos mis amigos: Karen, Carmen, Vanessa, Milagro, Ericka y Eduardo, porque el sentimiento de la amistad nos fortalece en cualquier circunstancia.

Ricardo, por su constante e invaluable apoyo.

A todos los que saben de mi cariño y afecto.

AGRADECIMIENTO

A

Dios, por haberme otorgado la fuerza y la voluntad necesaria para emprender mis estudios.

Mi madre, por ser tan especial y única. Gracias por todo el apoyo que siempre me has brindado y especialmente por confiar en mí.

Mi asesor Prof. Edgar Zapata, que con su paciencia, dedicación y apoyo guió en todo momento el desarrollo de este trabajo.

Todas aquellas personas de la Universidad de Oriente, especialmente a los trabajadores del Instituto Oceanográfico y la estación de Turpialito, que me prestaron su valiosa colaboración a lo largo de esta investigación.

A todos mi eterna gratitud.

ÍNDICE

	Pág.
LISTA DE FIGURAS.....	VI
LISTA DE TABLAS.....	VIII
RESUMEN.....	IX
INTRODUCCIÓN.....	1
METODOLOGÍA.....	7
RESULTADOS.....	12
DISCUSIÓN.....	23
CONCLUSIONES.....	33
BIBLIOGRAFÍA.....	34

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
1. Ubicación geográfica del área de colecta de <i>Lytechinus variegatus</i>	7
2. Fagocitos de <i>Lytechinus variegatus</i> observados a 100X en microscopio óptico.....	12
3. Esférulas incoloras en organismos controles de <i>Lytechinus variegatus</i> , observados a 100X en microscopio óptico.....	13
4. Esférulas rojas en organismos controles de <i>Lytechinus variegatus</i> observados a 100X.....	14
5. Célula vibrátil en organismos controles de <i>Lytechinus variegatus</i> , observado a 100X en microscopio óptico.....	14
6. Celomocitos de <i>Lytechinuus variegatus</i> observados a 100X en microscopio óptico.....	15
7. Número total de celomocitos (NTC) en el fluido celómico de <i>Lytechinus variegatus</i> , en organismos no inoculados e inoculados con las distintas bacterias (<i>Micrococcus lysodeikticus</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Vibrio parahaemolyticus</i>).....	16
8. Porcentaje de viabilidad celular de los celomocitos de <i>Lytechinus variegatus</i> . Controles e infectados con las diferentes bacterias (<i>Micrococcus lysodeikticus</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Vibrio parahaemolyticus</i>).....	16
9. Contaje diferencial de celomocitos de <i>Lytechinus variegatus</i> . Controles e infectados con las diferentes bacterias (<i>Micrococcus lysodeikticus</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Vibrio parahaemolyticus</i>).....	17
10. Actividad fagocítica en el fluido celómico de <i>Lytechinus variegatus</i> controles e infectados con las diferentes bacterias (<i>Micrococcus</i>	

	<i>lysodeikticus, Escherichia coli</i> y <i>Vibrio parahaemolyticus</i>).....	18
11.	Actividad de Lisozima en el fluido celómico de <i>Lytechinus variegatus</i> controles e infectados con las diferentes bacterias (<i>Micrococcus lysodeikticus, Escherichia coli</i> y <i>Vibrio parahaemolyticus</i>).....	19
12.	Proteínas totales (mg/ml) en el fluido celómico de <i>Lytechinus variegatus</i> . Controles e infectados con las diferentes bacterias (<i>Micrococcus lysodeikticus, Escherichia coli</i> y <i>Vibrio parahaemolyticus</i>).	20
13.	Contenido de ácido nucleícos (µg/ml) en el fluido celómico de <i>Lytechinus variegatus</i> . Controles e infectados con las diferentes bacterias (<i>Micrococcus lysodeikticus, Escherichia coli</i> y <i>Vibrio parahaemolyticus</i>).....	21
14.	Tiempo de recuperación (en segundos) de la posición invertida de los erizos controles e infectados con las diferentes bacterias (<i>Micrococcus lysodeikticus, Escherichia coli</i> y <i>Vibrio parahaemolyticus</i>).....	21

LISTA DE TABLAS

	Pág.
1. Síntomas en organismos controles e inyectados con solución salina, <i>Micrococcus lysodeikticus</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	22

RESUMEN

Las poblaciones de los erizos pueden verse afectadas por enfermedades causadas por bacterias tanto en su hábitat como en maricultivos, inclusive pueden conllevar a mortandades. Las infecciones bacterianas en los erizos son evitadas por acción de un sistema inespecífico de defensas inmunológicas constituido por células circundantes (celomocitos) y una serie de péptidos y proteínas de actividad microbicida. En este sentido, se evaluaron las respuestas inmunológicas innatas tales como: número y tipos de celomocitos, actividad fagocítica, lisozimas y proteínas totales, en el erizo verdi-blanco *Lytechinus variegatus* estimulados experimentalmente por distintos inóculos bacterianos. Los organismos fueron inyectados por separado con una suspensión de cepas bacterianas: *Micrococcus lysodeikticus*, *Escherichia coli* y *Vibrio parahaemolyticus*, en la musculatura de la linterna de Aristóteles a través de orificio bucal. Se usaron como organismos controles un grupo de erizos inyectados sólo con solución salina (agua de mar estéril) y otro grupo no inyectado. Adicionalmente, el tiempo de recuperación desde una posición invertida y aspectos externos de los organismos fueron determinados como índices de salud. El fluido celómico (FC) fue colectado a las 24 horas post-estimulación para determinar los parámetros celulares y bioquímicos. En el FC se detectó la presencia de cuatro tipos de celomocitos: fagocitos o amebocitos, esférulas incoloras, esférulas rojas y células vibrátiles. El número total de celomocitos (NTC) y porcentaje de viabilidad no mostraron diferencias significativas en los erizos estimulados, sin embargo, se evidenció un aumento en el porcentaje de células esférulas incoloras. En adición, la actividad fagocítica incrementó en los organismos estimulados con las distintas cepas bacterianas. Un incremento en la actividad de lisozima fue observado mayormente en los organismos inoculados con *M. lysodeikticus*. El sistema inmunitario de *L. variegatus* responde positivamente al estímulo experimental con bacterias, demostrando la eficiencia del sistema inmune. Al parecer, los organismos fueron capaces de modular las líneas de defensa innata frente a una situación de estrés por bacterias, especialmente las células granulares y fagocíticas. *L. variegatus* presentó un alto potencial para activar las respuestas inmunológicas tales como la fagocitosis, producción de lisozimas y cambios en el porcentaje de celomocitos en presencia de cepas bacteriana.

INTRODUCCIÓN

Los equinodermos son invertebrados exclusivamente marinos y generalmente habitan en aguas poco profundas, siendo uno de los grupos más importantes en la estructura de las comunidades bentónicas marinas (Ruppert y Barnes, 1996). Dentro de la Clase Echinoidea se encuentran los erizos de mar, caracterizados por poseer forma globular o discoidal, carecen de brazos y de un esqueleto interno. Estos organismos están constituidos por numerosas placas calcáreas formando un caparazón en las que se encuentran las espinas móviles (Summers *et al.*, 1993).

En Venezuela existen tres especies de erizos con alto potencial de explotación y cultivo, tales como, *Echinometra lucunter*, *Tripneustes ventricosus* y *Lytechinus variegatus*, las mismas poseen rápido crecimiento, buena adaptación al cautiverio y cantidad significativa de gónadas producidas en corto tiempo (Lodeiros y Buitrago, 2011; Reyes-Luján, 2015). De especial interés, el erizo verdi-blanco *L. variegatus*, es una especie relativamente abundante en la costa sur del Golfo de Cariaco (Ochoa, 2016), habitando en zonas de aguas cálidas, donde predominan los pastos de hierbas marinas; aunque son frecuentemente encontrados sobre rocas o arena desde los 0 hasta 250 m. Su coloración puede variar ampliamente, predominando los colores verde y blanco (Voss, 1976; Espinoza *et al.*, 2008). *L. variegatus* es la especie más grande de su género, alcanzando diámetros entre 75 mm a 87 mm (Watts *et al.*, 2007). Este equinoideo se reproduce sexualmente, son todos dioicos (sexos separados) (Calva, 2002). Para evitar depredadores presentan la habilidad mimética de cubrir su testa con sustratos naturales del entorno tales como piedras, trozos de corales y algas (Millott, 1955; Verling, 2004).

Las poblaciones de erizos en los ecosistemas costeros pueden verse afectadas por enfermedades producidas por bacterias, provocando incluso grandes mortandades (Gilles y Pearse, 1986; Carpenter, 1988). Algunas bacterias

oportunistas pueden producirles distintas lesiones en las paredes de la testa, pérdida de la pigmentación del epitelio, desprendimiento de espinas, necrosis de tejidos musculares, crecimiento irregular en las puntas de las espinas, dificultando la alimentación y locomoción (Johnsen y Chapman, 1970; Jangoux, 1987). Los géneros bacterianos que han sido frecuentemente aislados en porciones corporales lesionadas en erizos son los siguientes: *Vibrio*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Clostridium*, *Pseudoalteromonas* y *Pseudomonas*. Tales microorganismos suelen ser comensales pero presentan un alto potencial patógeno (Gilles y Pearse, 1986; Wang *et al.*, 2013).

A pesar de la buena calidad de agua que presentan las costas del estado Sucre, existen zonas puntuales, específicamente en el sur del golfo de Cariaco, donde los desagües de algunos asentamientos poblacionales y desarrollos urbanísticos, han contribuido al incremento de bacterias entéricas en los cuerpos de agua. Existen géneros de patógenos bacterianos asociados a la contaminación fecal que incluyen miembros de la familia *Vibrionaceae*, la cual comprende los géneros *Vibrio*, *Aeromonas* y *Plesiomonas* (Larkin y Hunt, 1982; Shimada *et al.*, 1988).

El género *Vibrio* es miembro autóctono de la flora bacteriana de los mares y estuarios (Bitton *et al.*, 1992). La patogenicidad relativa de este género difiere considerablemente de cada especie, siendo moderada para el caso de *Vibrio parahaemolyticus*, mientras que para *V. cholerae* y *V. vulnificus* es extremadamente elevada (Blake *et al.*, 1980; Yamamoto *et al.*, 1983). Otra especie que ha sido detectada en zonas costeras altamente urbanizadas es la enterobacteria *Escherichia coli*. Aunque su entrada se deba a causas puntuales a los cuerpos de agua salada, *E. coli* puede formar parte del 44,5% de los coliformes totales aislados y constituir entre el 10,0 al 73,0% de los coliformes termo-tolerantes (Serrano *et al.*, 1998, Solo-Gabriele *et al.*, 2000). Igualmente, en los sistemas de siembras acuícolas abiertos, los erizos se encuentran

expuestos a tales patógenos presentes en medios naturales, dependiendo de su sobrevivencia en el cultivo y de la capacidad de sus defensas inmunológicas.

En el ecosistema, los individuos más propensos a enfermar son aquellos que presentan señales de deficiencias inmunológicas asociadas a estrés. Las variaciones en las defensas inmunológicas pueden ser causadas por cambios en la temperatura (Branco *et al.*, 2012), edad (Du *et al.*, 2013), contaminación por metales pesados (Pinsino *et al.*, 2008; Falugi *et al.*, 2012) y aceites (Shimada-Borges *et al.*, 2010), entre otros. Tales deficiencias hacen a los erizos más vulnerables a cambios ambientales haciéndose evidentes algunas sintomatologías externas. Algunas de las alteraciones más comunes identificadas en erizos se encuentran las variaciones en la coloración de la testa que pueden variar entre verdosas, rojas o negras, pérdidas de espinas y cambios en su comportamiento (Gilles y Pearse, 1986; Wang *et al.*, 2013).

El sistema de defensa inmunológico de los erizos está conformado por respuestas inmunes innatas no específicas (Antón y Salazar, 2009). Su inmunidad está regulada por diversos tipos de células denominadas celomocitos, que están presentes en el orden de millones; y un set de sustancias bacteriolíticas contenidas en el fluido celómico, y en los propios celomocitos (Matranga *et al.*, 2005). El principal órgano celomopoyético ha sido señalado al epitelio celómico, aunque recientemente se ha demostrado que órgano axial y el cuerpo de Tiedmann inician proliferación de células madres, que luego se diferenciarían en celomocitos (Holm *et al.*, 2008).

El sistema circulatorio en los erizos es abierto, e incluyen los sistemas celomático perivisceral, vascular acuífero, perihemal y hemal. El sistema celomático perivisceral es el de mayor importancia y puede ser dividido en una región oral cerca de la membrana peristomial y una región aboral próxima a la madreporita. Su fluido celómico posee características similares a las del agua de mar, además contiene altas concentraciones de potasio, baja cantidad de

lípidos, proteínas y carbohidratos. De igual manera, desempeña varias funciones las cuales incluyen excreción, transporte de oxígeno, locomoción, protección de las vísceras e inmunidad humoral (Tarima *et al.*, 2007).

En el fluido celómico de los erizos se han identificado cuatro tipos principales de celomocitos: los fagocitos (actúan como los macrófagos), células esféricas no coloreadas (granulocitos), células esféricas rojas y células vibrátiles (Hibino *et al.*, 2006; Deveci *et al.*, 2015). Los fagocitos son células grandes que juegan un papel importante en la coagulación y en la fagocitosis de patógenos no específicos. Las células esféricas rojas y no coloreadas granulares producen productos químicos con propiedades antibacterianas, se pueden encontrar en diferentes proporciones en función del estado de salud del erizo y bajo qué tipo de presiones inmunes ha estado (Matranga *et al.*, 2000). La función de las células vibrátiles no es muy conocida, pero puede jugar algún papel en la coagulación, la cicatrización de heridas y otras funciones inmunitarias, además, son muy distintivas debido a su rápido movimiento característico en un patrón helicoidal (Hibino *et al.*, 2006; Matranga *et al.*, 2006).

Los celomocitos presentan la capacidad de responder a las lesiones, invasión del hospedero y agentes citotóxicos (Shimada-Borges *et al.*, 2002; Dheilly *et al.*, 2012). Tales células son consideradas efectores inmunes del erizo de mar, de hecho reaccionan a los desafíos con modificaciones en su motilidad, aumento de las actividades fagocíticas, encapsulación y liberación de factores citotóxicos (Matranga *et al.*, 2005). Adicionalmente, existen moléculas generalmente de naturaleza proteica con alta actividad antimicrobiana dentro de las cuales se encuentran: las lisozimas y algunos péptidos (Dheilly *et al.*, 2012). Estas biomoléculas constituyen parte del sistema de defensas humoral.

La lisozima es una enzima que destruye las paredes celulares de ciertas bacterias Gram-positivas, jugando un papel muy importante en el mecanismo

de defensa natural. La función del sistema inmune es reconocer y controlar los microorganismos, basándose en la habilidad de presentar y reconocer productos conservados del metabolismo microbiano que son únicos de los microorganismos. Como ejemplo de estas moléculas asociadas a patógenos encontramos al lipopolisacárido (LPS), secuencias de ADN no metiladas y peptidoglicanos de bacterias Gram-positivas y negativas (Carrillo, 2013). Algunos péptidos antibacterianos son producidos habitualmente por el organismo mientras que otros son sintetizados como respuesta a un ataque microbiano (Li *et al.*, 2014). La rápida disponibilidad de estos péptidos es importante para el sistema inmune innato, ya que su alta efectividad les pone en primera línea de defensa en el organismo. Los péptidos antimicrobianos son capaces de eliminar a un gran rango de células y microbios donde se incluyen bacterias, hongos, protozoos, virus, células tumorales y algunos parásitos (Smith *et al.*, 2006).

Las respuestas inmunes de orden celular están representadas por las células fagocíticas y granulocitos. La fagocitosis forma parte de las respuestas inespecíficas que permiten neutralizar agentes invasores, englobarlos y posteriormente degradarlos en los lisosomas (Goven *et al.*, 1994; Goven y Kennedy, 1996). Algunas inmunopatologías en invertebrados pueden ser determinadas por variaciones en el conteo total y diferencial de inmunocitos, celomocitos o hemocitos y su respectiva viabilidad celular (Sami *et al.*, 1992; Goven *et al.*, 1996; Naranjo, 2012).

Los fagocitos reconocen diferentes patrones moleculares de patógenos asociados con bacterias, hongos, levaduras y virus, así como también percibir cambios ambientales y disponer de estos mecanismos para poder protegerse (Medzhitov y Janeway, 1997; Matranga *et al.*, 2002; Guerrero, 2007). La protección de la integridad de los erizos necesita la puesta en marcha de un cierto número de reacciones de defensa tanto a nivel fisiológico como de comportamiento.

En los estudios de calidad ambiental se ha hecho frecuente el uso de parámetros celulares e inmunológicos como marcadores de salud en los individuos y su entorno (Zapata-Vívenes, 2012). Es común la determinación de hemogramas, tiempo de coagulación, actividad de profenoloxidasa, índice de fagocitosis, producción de especies intermedias de oxígeno reactivo, actividad antimicrobiana mediante tasa de clarificación, títulos hemaglutinantes del plasma y concentración de proteínas totales (Rodríguez y Le Moullac, 2000; Van de Braak *et al.*, 2002; Naranjo, 2012).

Algunas características externas que manifiestan los organismos, respuestas a estímulos mecánicos y alteraciones al comportamiento han sido sugeridas para determinar la condición fisiológica basal. Un ejemplo para estimar la condición de salud basal en los erizos es mediante el cálculo del tiempo de recuperación de una posición invertida (boca hacia arriba) hasta alcanzar su posición original (Sherman, 2015); este detalle determina la velocidad de reacción que poseen los mismos ante el ataque de depredadores.

En tal sentido, esta investigación discierne sobre la capacidad de las respuestas inmunológicas, tanto de índole celular (contenido y tipos de celomocitos) como respuestas humorales (moléculas antibacterianas), en erizos aparentemente sanos y estimulados por inóculos de distintas cepas bacterianas. Adicionalmente, se estimaron alteraciones en los parámetros de condición fisiológica y de comportamiento por causas de infecciones bacterianas. Este documento sirve de preámbulo para estimar la tolerancia de especies de erizos ante invasiones microbianas, usando la eficacia de las respuestas inmunes, con miras a futuros planes de cultivos marinos.

METODOLOGÍA

Organismos

Los erizos *L. variegatus* fueron colectados en la ensenada de Turpialito ($10^{\circ} 26' 56''$ N, $64^{\circ} 02' 00''$ O) durante los meses de septiembre a diciembre del 2015, a profundidades de 1 a 5 m por buceo libre. La abundancia de esta especie en la zona de colecta oscila entre 0,5-1,2 individuos por m^2 . Los animales fueron capturados sin distinguir su sexo ni etapa reproductiva. La talla mínima de colecta fue de 7 cm de diámetro. Se evitó utilizar organismos desovados.

La Ensenada de Turpialito se encuentra situada a 3 km al este de la ciudad de Cumaná en la costa sur del golfo de Cariaco (Fig. 1). La zona litoral oriental de la ensenada está cubierta por un arrecife que se extiende hasta, aproximadamente, unos 14 m de profundidad (Figuroa, 2002).

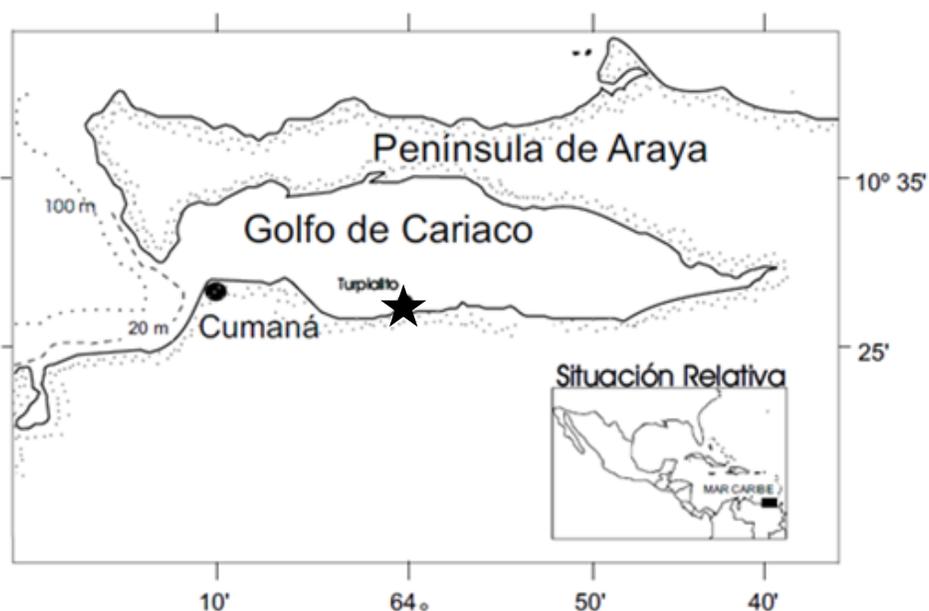


Figura 1. Ubicación geográfica del área de colecta de *Lytechinus variegatus*.

Los organismos fueron transportados en envases isotérmicos hasta el laboratorio de Bioquímica ubicado en el edificio de Ciencias de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre y se colocaron en acuarios de 40 cm^3 , a razón de

un organismo por cada 5 litros de agua de mar filtrada, con suficiente aireación, temperatura promedio del agua $26 \pm 2^\circ\text{C}$; pH 7,9-8,1; salinidad de 35-36 UPS. Los organismos fueron alimentados *ad libitum* con una mezcla de macroalgas deshidratadas de los géneros *Sargassum* y *Padina*. El agua y el alimento fueron cambiados cada dos días. Estas condiciones se mantuvieron por una semana antes de iniciar los ensayos de inoculación.

Inoculación bacteriana

A tres grupos de erizos por separado, constituidos por 20 organismos cada uno, se les inyectaron cuidadosamente dentro de la cavidad peritoneal por la entrada oral, distintos inóculos bacterianos, usando una inyectadora de 1 ml con un calibre de aguja de 1x13. La aguja fue insertada cuidadosamente evitando perforar el tubo digestivo y las gónadas. Al primer grupo, se les inyectó 50 μl de una solución de *Micrococcus lysodeikticus* (ATCC 4698) contentiva de 25 $\mu\text{g/g}$ de células liofilizadas (representó $1,0 \times 10^8$ bacterias). Al segundo, se les inoculó 50 μl de una suspensión de *Escherichia coli* (ATCC 25922), al tercer grupo 50 μl de *Vibrio parahaemolyticus*, correspondiente al 0,5 del patrón Mac Farland, en caldo tripticasa de soya (suministrado por el Laboratorio Bacteriológico del Hospital Universitario Antonio Patricio de Alcalá), respectivamente. Ambas dosis representaron aproximadamente $1,5 \times 10^8$ bacterias por ml.

A un cuarto grupo de 20 organismos, que sirvió como grupo control, se les inyectó el mismo volumen de solución salina (agua de mar micro-filtrada y estéril). Una vez inyectados todos los organismos experimentales fueron devueltos a sus respectivos acuarios. Las recolecciones del fluido celómico se realizaron a las 24 horas post-inyección. Adicionalmente, se evaluaron organismos provenientes del campo y no estresados por punción, como controles basales.

Salud de los erizos

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

Celomocitos

La separación de los celomocitos peri-visceral se realizó siguiendo la propuesta por Matranga *et al.*, (2006). Para ello, se efectuó una punción en la membrana peristomial de cada erizo, se insertó una aguja hipodérmica de 1 ml de capacidad, contentiva de 0,2 ml de agua de mar filtrada con EDTA al 4 mol/l. El volumen obtenido dependió del tamaño del ejemplar analizado. Se extrajo cuidadosamente de 0,4 a 0,5 ml del fluido celómico, el cual se colocó en tubos Eppendorf, mantenidos a una temperatura de aproximadamente 4°C. Las muestras fueron examinadas en un fotomicroscopio Axioskop FL-40 marca Zeiss, con cámara digital incorporada, con la ayuda de un software analizador de imágenes AxioVision (LE Cannon Modul, Carl Zeiss, Alemania).

Parámetros celulares

Viabilidad y número total de celomocitos

La viabilidad celular y el número total de células se determinaron por tinción diferencial con el colorante azul tripano (AT) al 0,4% (Sigma ®). Para contar el número de células viables y total de células por ml, se mezclaron 20 µl de la suspensión de celomocitos con un volumen igual de AT, se resuspendió y se realizó un conteo de 100 células en una cámara de Neubauer por microscopía de luz, con objetivo de 40X. Las células vivas se diferenciaron de las muertas porque éstas últimas tomaron una coloración azul, expresándose la viabilidad como el porcentaje (%) de células vivas contadas. El número total de

celomocitos por ml, se determinó en los cuatro cuadrantes externos de la cámara y se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula: Número de celomocitos $\times 10^4$ /ml. Adicionalmente, se determinó el contaje diferencial de celomocitos tomando en cuenta su forma y tamaño. La clasificación de cada tipo celular fue tomada de Smith *et al.*, (2006).

Parámetros inmunológicos

Fagocitosis

La actividad fagocítica fue determinada mediante la reducción del azul de tetrazolium (NBT), utilizando como antígeno un extracto no viable de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Zymoan). Se mezclaron 100 μ l del extracto de Zymoan con 100 μ l de suspensión de celomocitos, y luego se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se le agregó 100 μ l de una solución de NBT (2 mg/ml) en buffer fosfato salino (BFS), se mezcló y se incubó a 16° C bajo oscuridad por 24 horas.

La especificidad del método se probó agregando 50 μ l (20 mg/ml BFS) de la enzima superóxido dismutasa (SOD). Para extraer el formazán (producto de la reducción del NBT) se agregaron 200 μ l de hexadecyltrimetil amonio bromuro 0,1% como agente antimicrobiano y 400 μ l de buffer fosfato 100 mmol/l pH 6,2. Seguido de un período de incubación de 3 horas a 37° C y centrifugación posterior a 2 000 rpm por 15 minutos, el precipitado se disolvió en 1ml de dimetilsulfoxido (DMSO) y se procedió a medir la absorbancia a 510 nm. Estas lecturas fueron comparadas con una curva patrón realizado con bromuro 3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium (Sigma-Aldrich Cat. M 2128). Como control se cuantificó el formazán en celomocitos incubados con NBT sin antígeno (Cooper *et al.*, 1995). Los resultados se expresaron en mg de formazán/ml.

Lisozima

La actividad de la lisozima (Mucopetidil N-acetilmuromoylhidrolasa; EC 3.2.1.17) se determinó por el método de la tasa de turbidez (Shugar, 1952). Las condiciones del ensayo se mantuvieron de la siguiente manera: 25 ± 1 °C en buffer fosfato de potasio pH 6,24; 540 nm; paso de haz de luz 1 cm. Se usó como sustrato 0,015% (g/v) de una suspensión de *M. lysodeiktius* (células liofilizadas). Se midió la extinción de células intactas a lisadas durante 5-10 minutos. Se tomó como unidad arbitraria la variación de la absorbancia (ΔA) a una longitud de onda de 450 nm. Se realizó una curva estándar de actividad enzimática con lisozima comercial (46 200 U/ml).

Proteínas y ácidos nucleicos totales

Se usaron alícuotas de líquido celómico (40 μ l) almacenado a -20 °C para estimar el contenido de proteínas y ácidos nucleicos totales por método directo según Warburg y Christian (1942). La cuantificación fue realizada mediante la determinación de las absorbancias a 280 y 260 de las muestras, usando la fórmula: [Proteínas (mg/ml)] = $1,55 \times (A_{280}) - 0,575 \times (A_{260})$ y [Ácidos nucleicos (μ g/ml)] = $36,0 \times (A_{260}) - 75,0 (A_{280})$.

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 (ANOVA), usando un paquete estadístico Statgraphyc Plus versión 5.1 en ambiente Windows. Para el contraste "a posteriori" se utilizó una prueba de Duncan (Sokal y Rohlf, 1981).

RESULTADOS

En el líquido celómico fueron identificados cuatro tipos de celomocitos, los cuales variaron en cuanto al tamaño, morfología (ovaladas, discoidales, poligonales) y contenido. Se distinguieron los siguientes tipos de células. Fagocitos o amebocitos, los cuales presentaron una forma irregular con proyecciones de la membrana citoplasmática (pseudópodos), sin gránulos citoplasmáticos aparentes, oscilaron entre 10 a 20 μm de diámetro.

Estas células exhibieron dos formas distintas: *Fagocitos tipo 1* con proyecciones petaloides (Figura 2A), las cuales tienen lamelipodia extendida en todas direcciones desde el cuerpo celular similares a pétalos; y *Fagocitos tipo 2* con proyecciones filopodiales presentaron numerosas y delgadas extensiones citoplasmáticas (Figura 2B). Tales proyecciones las adquiere después de las 2 a 3 horas *in vitro*. Su proporción en fluido celómico varió entre 20,3 al 40,1%.

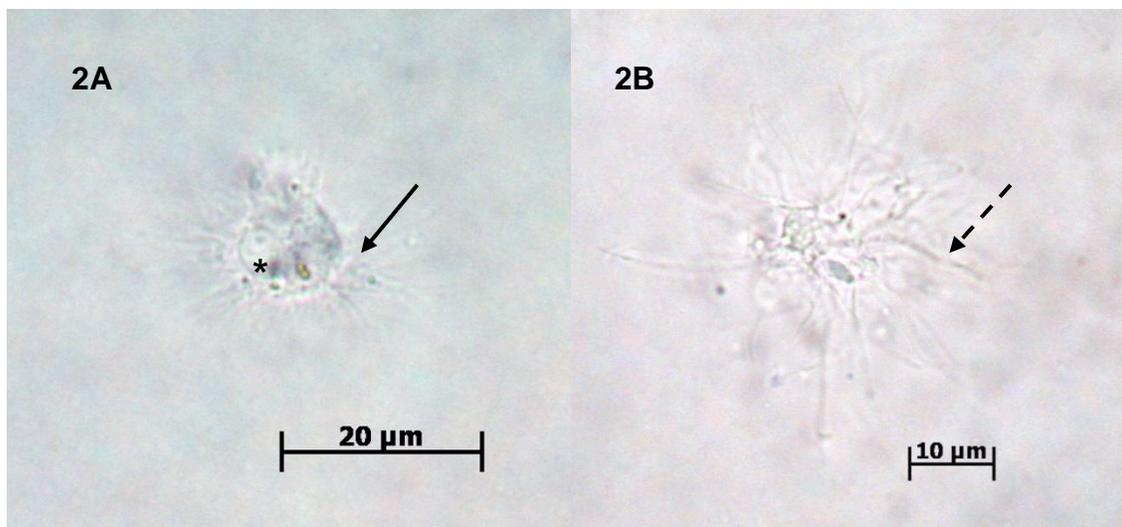


Figura 2. Fagocitos de *Lytechinus variegatus* observados a 100X en microscopio óptico. A. Proyecciones lamelipodiales. Forma irregular con pseudópodos (flecha continua); asterisco muestra el núcleo. B. Proyecciones filopodiales (flecha discontinua)

Esférulas incoloras: presentaron forma redonda, con gránulos no coloreados. Poseen un núcleo grande, redondo u ovalado excéntrico bien definido. (Figura 3)

En las muestras en fresco fueron observadas dos sub-poblaciones separadas por tamaño; una considerada *grandes* (EIG) que oscilaron entre 10-25 μm de diámetro (Figura 3A, 3B, 3C) y otras consideradas *pequeñas* (EIP) que midieron entre 5-10 μm (Figura 3D). Su proporción varió entre 21,7-31,8% para EIG y de 13,9-19,8% para EIP. Ambas sub-poblaciones poseen movimientos ameboides.

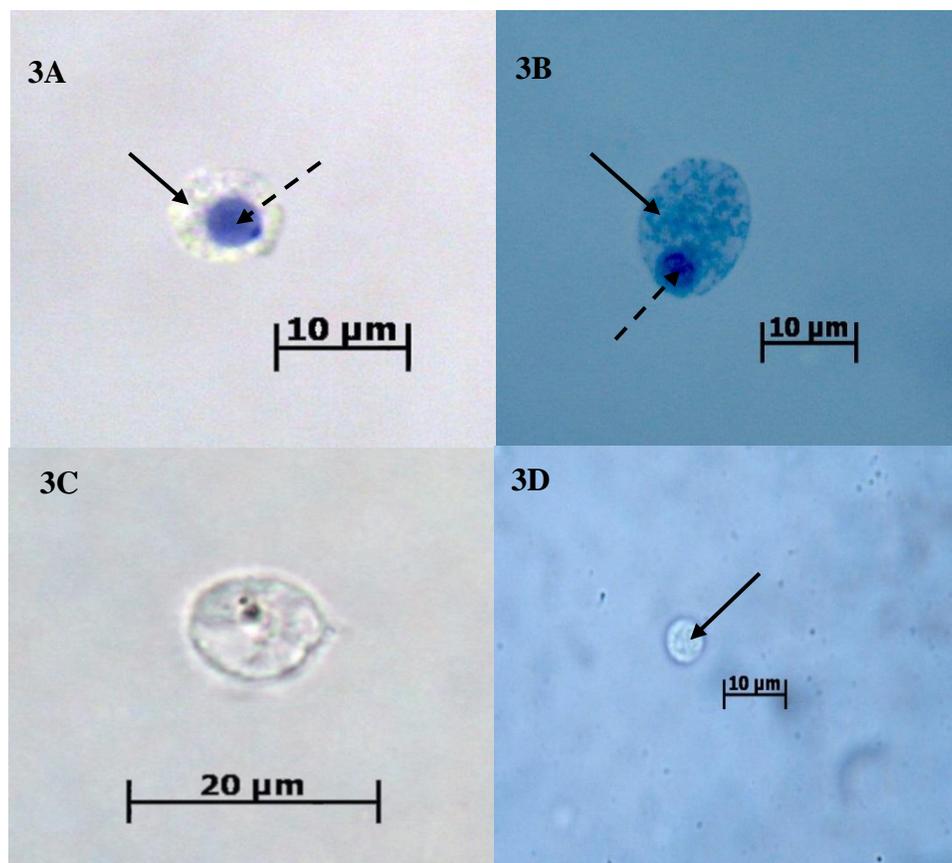


Figura 3. Esférulas incoloras en organismos controles de *Lytechinus variegatus*, observados a 100X en microscopio óptico. Se observan presencia de gránulos citoplasmáticos (flecha continua) (3A), (3B), (3D). Esférula incolora muerta, teñida con azul tripano, observada a 100X en microscopio óptico, con núcleo excéntrico teñido (flecha discontinua) (3B). Esférulas incoloras, grande (3C) y pequeña (3D) frescas.

Esférulas rojas: también denominadas células mórulas, su forma es redondeada, citoplasma casi lleno de vesículas heterogéneas y con gránulos densos de pigmentación de color rojo y núcleo periférico. Su diámetro celular osciló entre 10 a 20 μm . Este tipo de célula presentó características ameboideas. Su proporción en fluido celómico osciló entre 4,1-7,2%. (Figura 4).

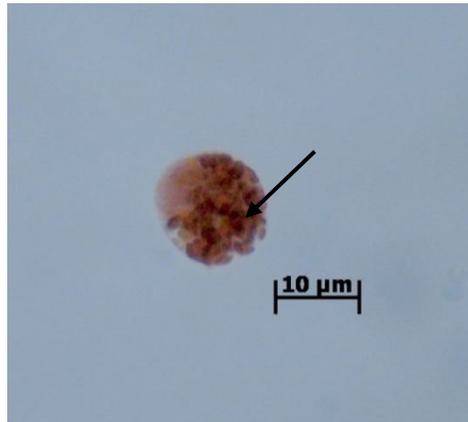


Figura 4. Esférula roja en organismos controles de *Lytechinus variegatus* observados a 100X. Se observa pigmentación roja y gránulos densos (flecha continua).

Células vibrátiles: son células redondas que miden entre 6 a 8 μm de diámetro, con un flagelo simple (4-6 μm) que le permite un movimiento intenso rotativo y unidireccional, aunque no ameboide. Sus movimientos disminuyen después de 2 horas de la colección. Su proporción en fluido celómico puede variar entre 8,5-21,4%. (Figura 5).

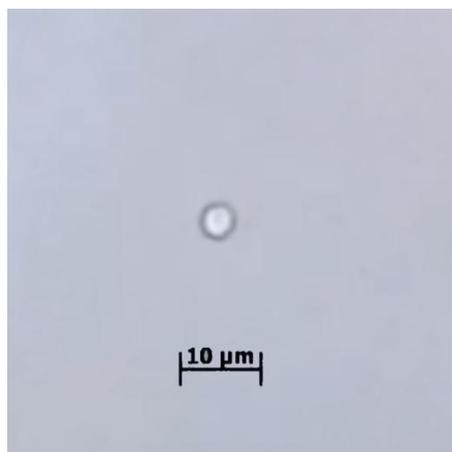


Figura 5. Célula vibrátil en organismos controles de *Lytechinus variegatus*, observado a 100X en microscopio óptico.

La figura 6 muestra diferentes tipos de celomocitos hallados en el fluido celómico de *Lytechinus variegatus*, aparentemente sano.

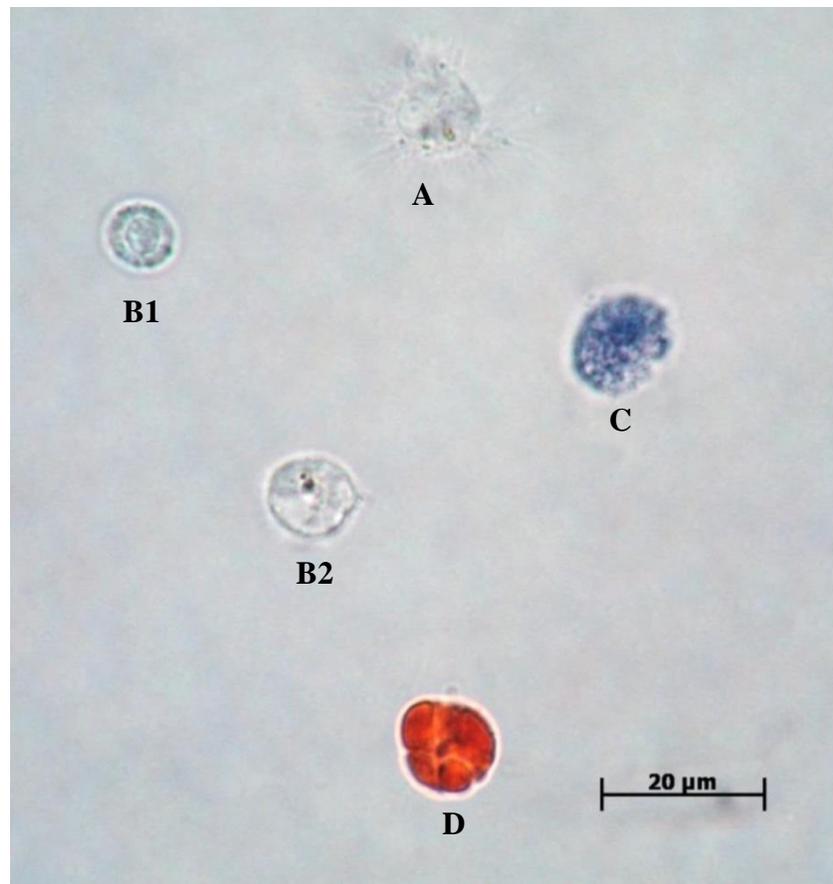


Figura 6. Celomocitos de *Lytechinus variegatus* observados a 100X en microscopio óptico. A. Fagocito tipo 1 con proyecciones petaloides. B1 y B2. Esférulas incoloras vivas. C. Esférula incolora muerta teñida con azul tripano. D. Esférula roja.

El número total de celomocitos (NTC) y porcentaje de viabilidad celular (PVC) en organismos aparentemente sanos e inoculados con las distintas bacterias no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($F_{SNTC}=1,98$; $p<0,05$) y ($F_{SPVC} = 2,18$; $p<0,05$). Los promedios de NTC por ml oscilaron entre $5,02 \times 10^6$ a $7,83 \times 10^6$ (Figura 7). El PVC presentó promedios mayores al 95,0% de celomocitos vivos, variando entre 90,1-100,0% en todos los grupos experimentales (Figura 8).

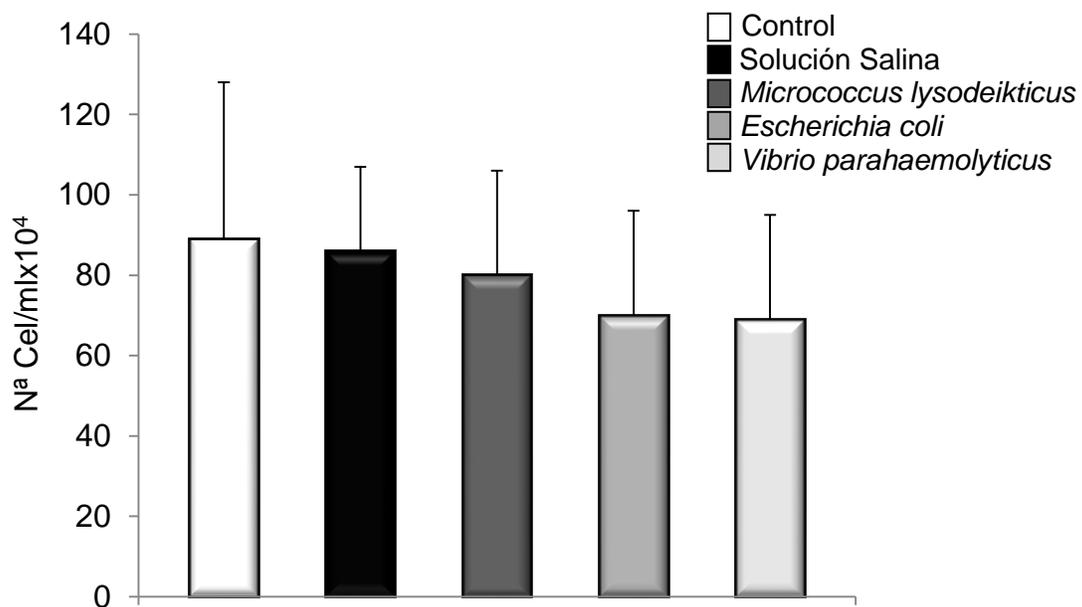


Figura 7. Número total de celomocitos (NTC) en el fluido celómico de *Lytechinus variegatus*, en organismos no inoculados e inoculados con las distintas bacterias (*M. lysodeikticus*, *E.coli* y *V. parahaemolyticus*).

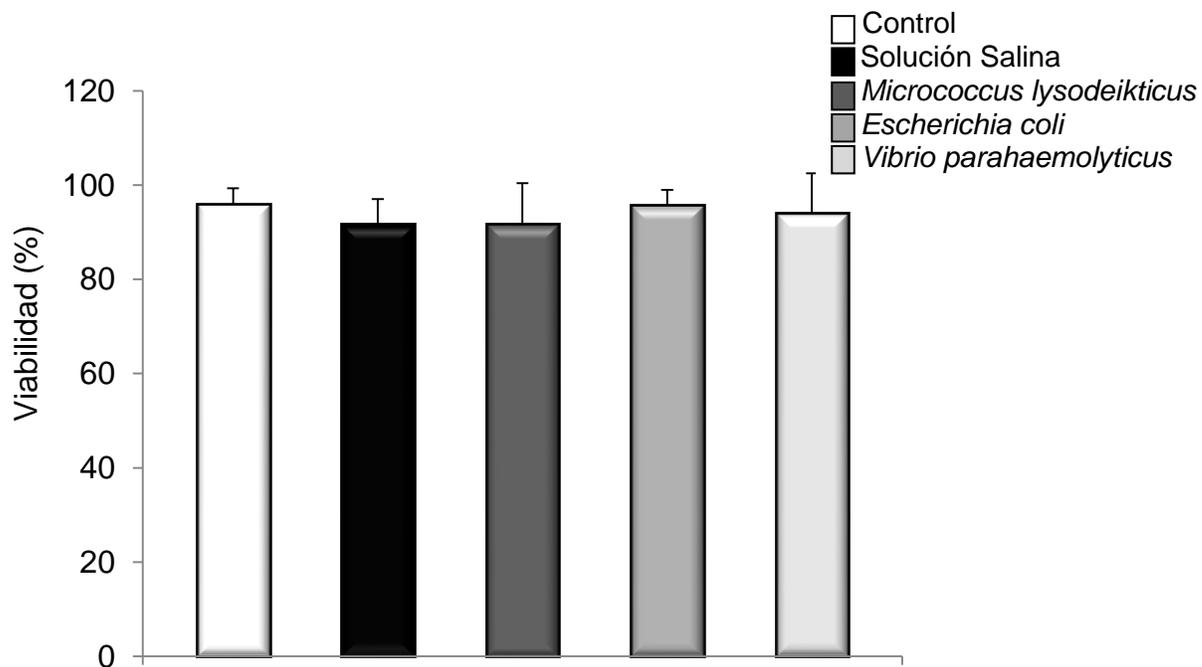


Figura 8. Porcentaje de viabilidad celular de los celomocitos de *Lytechinus variegatus*. Controles e infectados con las diferentes bacterias (*M. lysodeikticus*, *E.coli* y *V. parahaemolyticus*).

La figura 9 muestra el contejo diferencial de los celomocitos de *L. variegatus* obtenidos de organismos sanos e infectados con cepas bacterianas, observándose una variación en la proporción de los diferentes tipos de celomocitos. Se hizo notorio un descenso estadísticamente significativo en las células denominadas fagocitos ($F_s=8,79$; $p<0,001$) y un aumento proporcional en las esférulas incoloras en los erizos estimulados con bacterias con respecto a los controles ($F_s=8,68$; $p<0,001$), incluso los organismos inyectados con solución salina. En relación a las células de pigmentación roja ($F_s=0,53$; $p>0,05$) y células vibrátiles ($F_s=2,01$; $p>0,05$) no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los erizos controles y los erizos estimulados.

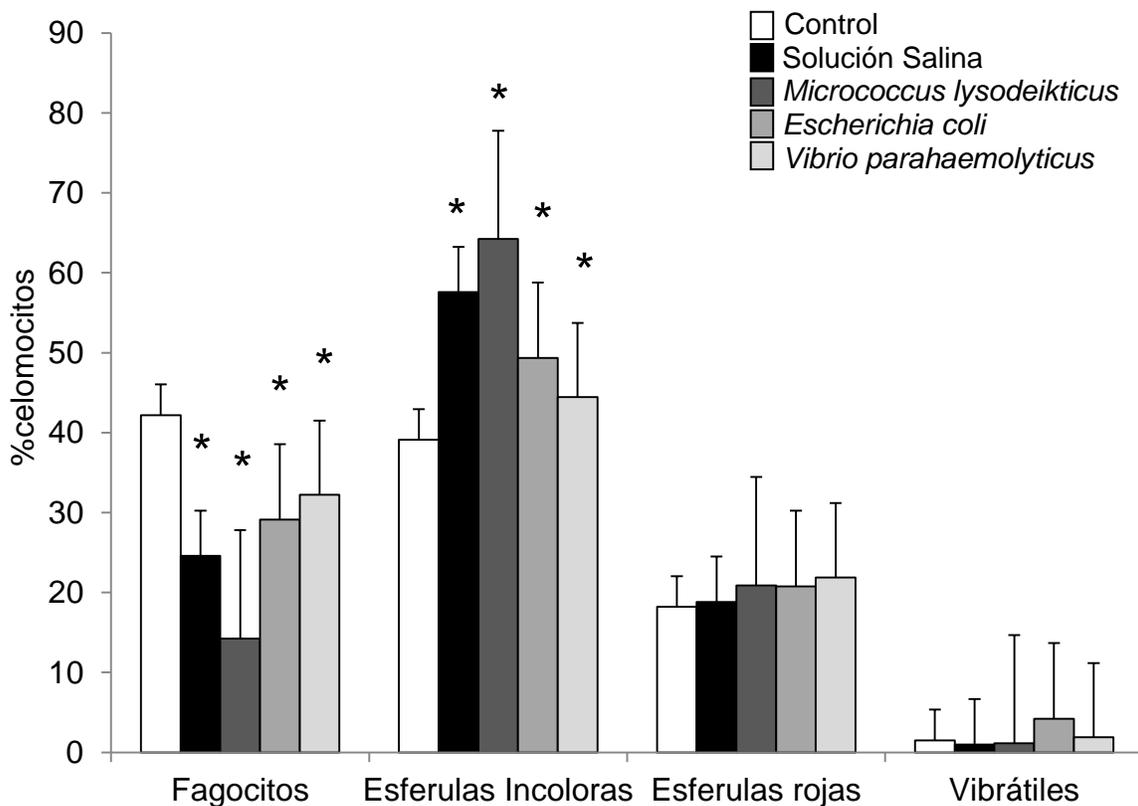


Figura 9. Contaje diferencial de celomocitos de *Lytechinus variegatus*. Controles e infectados con las diferentes bacterias (*M. lysodeikticus*, *E. coli* y *V. parahaemolyticus*). (*) El asterisco muestra diferencias significativas $p<0,05$.

La actividad fagocítica, estimada por la formación de formazán, fue incrementada significativamente en los erizos estimulados con las distintas cepas bacterianas: *M. lysodeikticus*, *E. coli* y *V. parahemolyticus* ($F_s=7,52$; $p<0,001$), en contraste con el grupo control y los inyectados con solución salina (Figura 10). El incremento de la actividad fagocítica fue estimada en 6,2; 5,3 y 5,7 veces con respecto al control. Los organismos inyectados con solución salina presentaron promedios similares al control no inyectado.

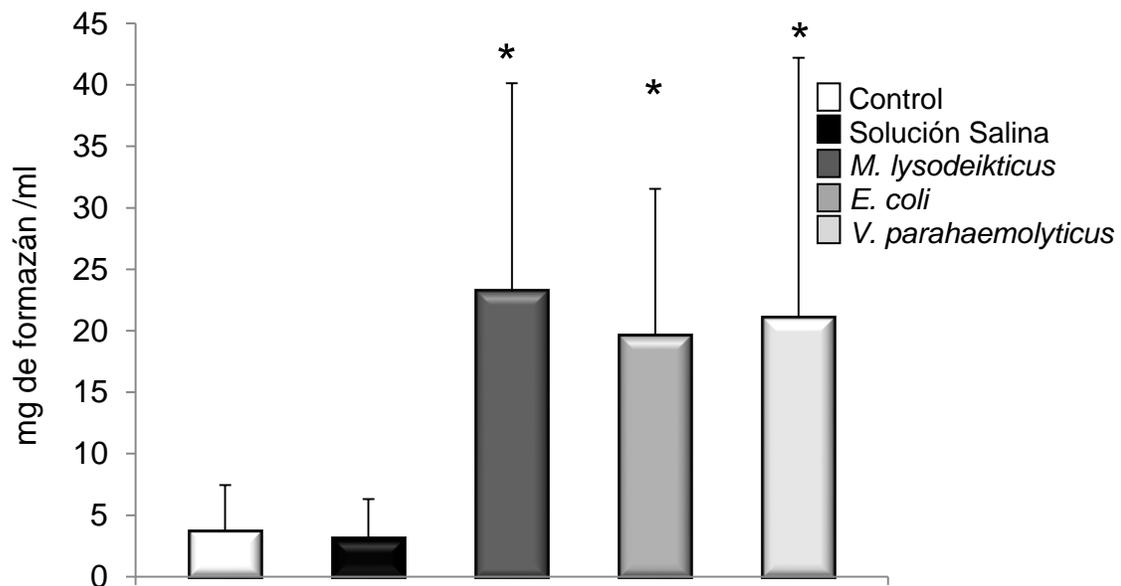


Figura 10. Actividad fagocítica en el fluido celómico de *Lytechinus variegatus* controles e infectados con las diferentes bacterias (*M. lysodeikticus*, *E. coli* y *V. parahaemolyticus*). (*) El asterisco muestra diferencias significativas $p<0,05$.

La actividad de lisozima en el fluido celómico mostró un mayor promedio en los erizos estimulados con *M. lysodeikticus* ($24,99 \pm 19,01$ U/ml) con respecto a los erizos controles ($F_s=7,52$; $p<0,001$), a pesar de la variabilidad de los datos intragrupal. De igual manera, hubo un aumento de esta enzima en los erizos estimulados con *V. parahemolyticus* ($9,29 \pm 5,92$ U/ml), no así en los erizos infectados con *E. coli*. La actividad de esta enzima incrementó 13,0 veces en los organismos inyectados con *M. lysodeikticus* y 4,8 veces para *V. parahemolyticus* con respecto al control (Figura 11).

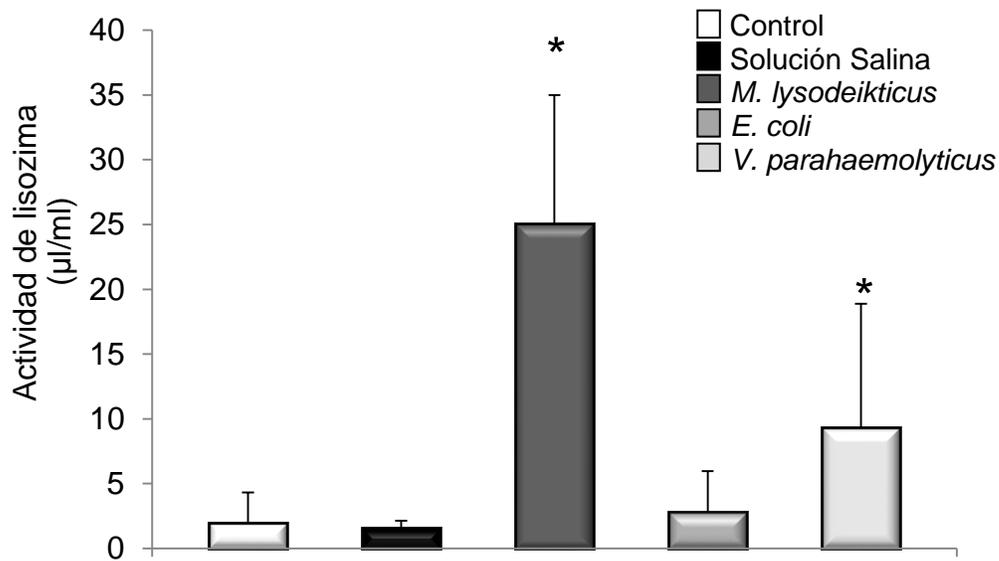


Figura 11. Actividad de lisozima en el fluido celómico de *L. variegatus* controles e infectados con las diferentes bacterias (*M. lysodeikticus*, *E. coli* y *V. parahaemolyticus*). (*) El asterisco muestra diferencias significativas $p < 0,05$.

La figura 12 muestra los niveles de proteínas totales en el fluido celómico de erizos estimulados con bacterias y erizos controles. Los resultados indican diferencias estadísticamente significativas, en especial en los organismos inyectados *E. coli* ($F_s=3,45$; $p < 0,01$), los cuales obtuvieron los mayores promedios ($125,8 \mu\text{g/ml}$) seguido por *M. lysodeikticus* ($121,9 \mu\text{g/ml}$).

Los organismos inoculados con *V. parahemolyticus* ($80,9 \mu\text{g/ml}$) presentaron promedios similares al grupo control ($72,2 \mu\text{g/ml}$) y al grupo inyectado con solución salina ($84,7 \mu\text{g/ml}$).

En la figura 13 se muestran los niveles de ácidos nucleicos totales en el fluido celómico de erizos estimulados con bacterias y erizos controles. Los resultados indican que no hubo una diferencia estadísticamente significativa ($F_s=1,15$; $p > 0,05$), sin embargo se observó un leve aumento de esta variable en los erizos estimulados con *M. lysodeikticus*. Estos resultados comprueban la no variación en el NTC.

El tiempo de recuperación de posición invertida no fue alterado en los erizos estimulados con bacterias con respecto a los erizos controles ($F_{sc} = 1,78$; $p = 0,364$), lo que demuestra buena salud en la mayoría de los organismos experimentales (Figura 14).

Los organismos infectados no mostraron síntomas externos, con respecto a los organismos controles. En la tabla 1 se muestran algunos síntomas externos y los porcentajes de los individuos sanos frente a los individuos que presentaron síntomas (enfermos).

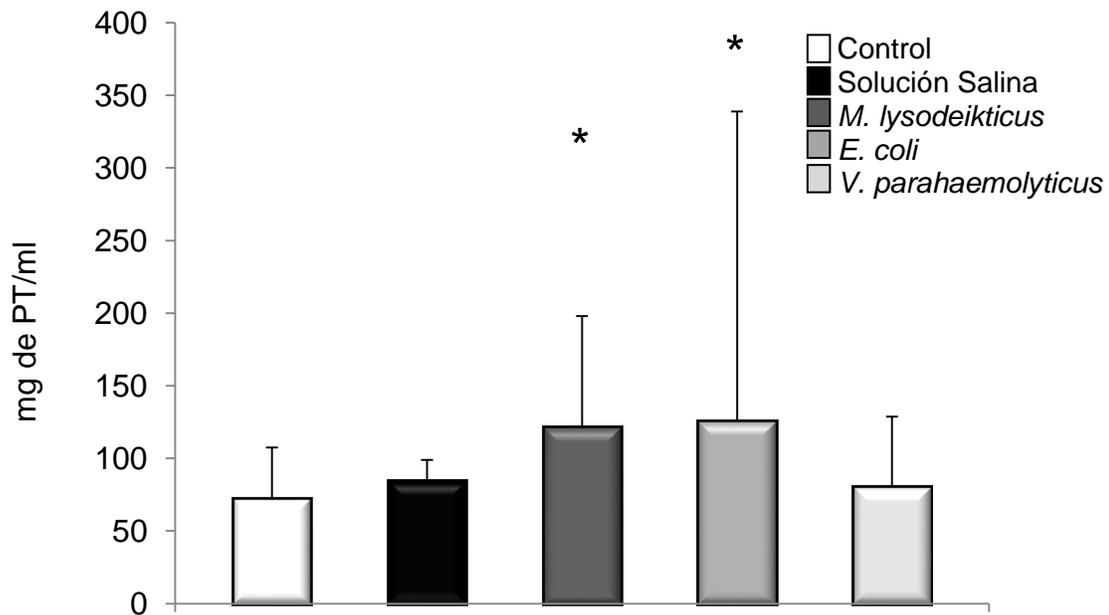


Figura 12. Proteínas totales (mg/ml) en el fluido celómico de *Lytechinus variegatus*. Controles e infectados con las diferentes bacterias (*M. lysodeikticus*, *E. coli* y *V. parahaemolyticus*). (*) El asterisco muestra diferencias significativas $p < 0,05$.

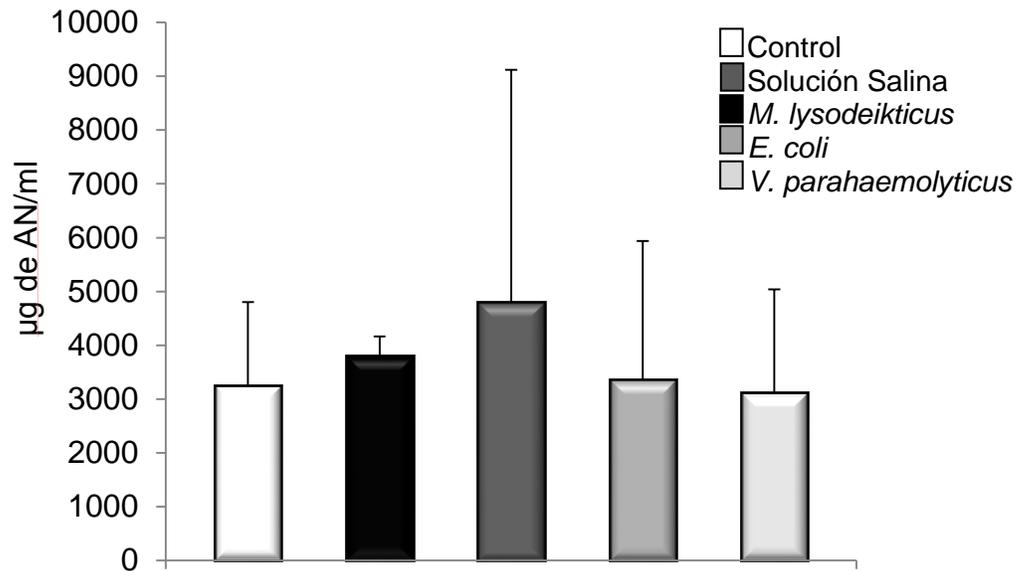


Figura 13. Contenido de ácido nucleícos ($\mu\text{g/ml}$) en el fluido celómico de *Lytechinus variegatus*. Controles e infectados con las diferentes bacterias (*M. lysodeikticus*, *E. coli* y *V. parahaemolyticus*).

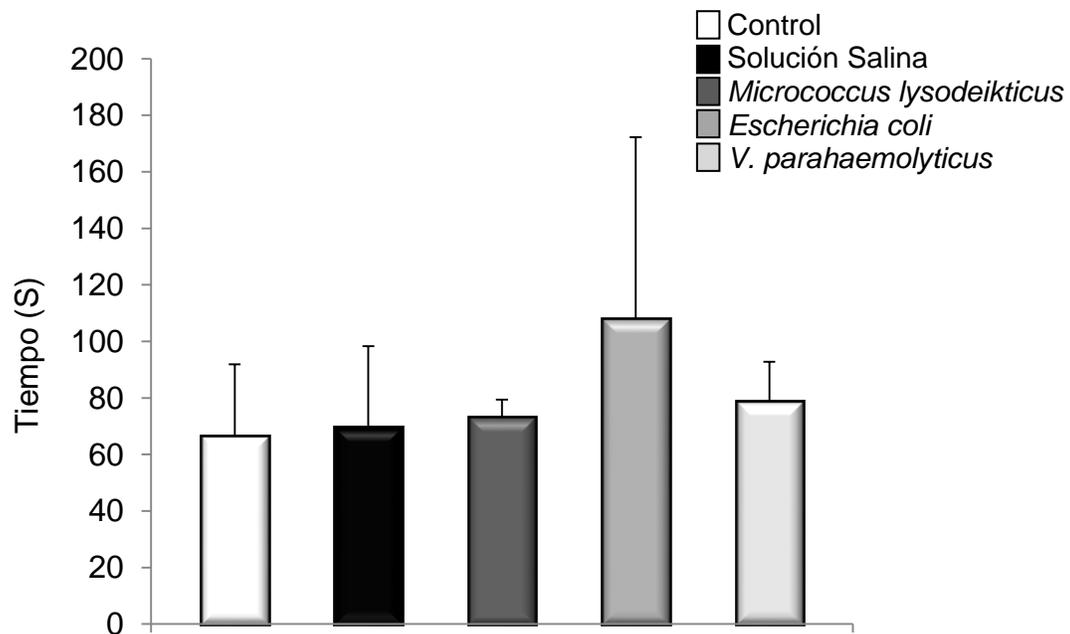


Figura 14. Tiempo de recuperación (en segundos) de la posición invertida de los erizos controles e infectados con las diferentes bacterias (*M. lysodeikticus*, *E. coli* y *V. parahaemolyticus*).

Tabla 1. Síntomas en organismos controles e inyectados con solución salina, *Micrococcus lysodeikticus*, *Escherichia coli* y *Vibrio parahaemolyticus*.

	C	SS	M.L	E.C	V.P
Pérdida de espinas	Sin pérdidas				
Coloración de la testa	Sin cambios aparentes				
Movimiento de espinas	+	+	+	+	+
Estimulación oral	100%	100%	90 %	20%	100%
Movimiento de tubos alimenticios	+	+	+	+	+
Desoves en el agua	-	-	-	-	-
Consumo de macroalgas	+	+	+	+	+
Coloración de FC	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

*Control (C), Solución Salina (SS), *Micrococcus lysodeikticus* (M.L), *Escherichia coli* (E.C), *Vibrio parahaemolyticus* (V.P). Respuesta positiva (+), intermedia (+/-) y negativa (-). Porcentaje (%). Fluido Celómico (FC).

DISCUSIÓN

Las defensas inmunológicas innatas en *L. variegatus*, tanto celular como humoral, son eficientes frente a una situación de invasión bacteriana inducida. Aunque el NTC no fue modificado por la estimulación experimental con cepas de *M. lysodeikticus*, *E. coli* y *V. parahaemolyticus*, se denotó cambios en el porcentaje de celomocitos y un alto potencial para activar la actividad fagocítica y de la lisosima.

En el fluido celómico de *L. variegatus* fueron encontrados principalmente cuatro (4) tipos de celomocitos (fagocitos o amebocitos, esférulas incoloras, esférulas rojas y células vibrátiles), los cuales coinciden con los datos reportados por Smith *et al.*, (2006) y McCaughey y Bodnar (2012). Estos últimos autores separaron, mediante citometría de flujo, poblaciones de celomocitos basados en el tamaño celular.

La población 1, era el grupo más uniforme conformada por células redondas granulares, mayormente amorfas con diámetros 10-20 μm ; La población 2 contenía numerosas células redondas muy granulares; población 3 de células más pequeñas, redondas y ovaladas que van alrededor de 4-10 μm ; y por último la población 4 la cual contenía numerosas células granulares de color rojo, así como algunas células claras, de tamaño, forma y granularidad similar a las células rojas.

Así como en *L. variegatus*, estos celomocitos han sido consistentemente descrito al menos en seis especies de erizos que habitan en distintas latitudes: *Strongylocentrotus purpuratus* del Océano Pacífico (Hillier y Vacquier, 2003), *Strongylocentrotus droebachiensis* (Bertheussen y Seljelid, 1978), *Paracentrotus lividus* del mar mediterráneo (Matranga y Bonaventura, 2002; Smith *et al.* 2010), *Echinometra lucunter* del Atlántico Sur (Tucunduva-Faria y Machado, 2008), *Sterechinus neumayeri* (Ovando, 2009) y *Heliocidaris*

erythrogramma (Dheilly, 2010). En *L. variegatus*, Branco *et al.*, (2013) han caracterizado los mismos tipos de células, basado en la microscopía de luz, histoquímica, preparaciones frescas y microscopía de electrones de transmisión. Se ha sugerido que existen sub-poblaciones que pueden ser referidas a ciertas etapas del ciclo de vida de un mismo tipo celular (Eliseikina y Magarlamov, 2002), tal es el caso de la transformación de los fagocitos de formas de pétalos a la forma filopodial durante una elevada tasa de eliminación bacteriana (Plytycz y Seljelid, 1993; Dheilly, 2010).

La cantidad de celomocitos totales no exhibió variación en los erizos estimulados con bacterias, aunque sus promedios se encuentran en orden de 4 a 6×10^6 cel/ml. No obstante, se encontraron cambios en el porcentaje de esférulas incoloras; representando el tipo morfológico más abundante frente a la estimulación. La eficiencia del sistema inmune innato de *L. variegatus* es demostrada por la activación en los procesos de proliferación de celomocitos específicos.

Los fagocitos han sido señalados como los celomocitos más abundantes en el líquido celómico de los erizos, correspondiendo al 40,0 al 80,0% del total de células (Krupinski, 2014). Su función principal es la fagocitosis, sin embargo se ha demostrado un importante desempeño en la quimiostaxia, rechazo a tejidos injertados, producción de especies reactivas del oxígeno, aglutinación y reacciones de coagulación (Matranga *et al.*, 2006; García-Arrarás y Ramírez-Gómez, 2010).

Recientemente se ha demostrado la responsabilidad de los fagocitos petaloides en fagocitar partículas extrañas, sin embargo los de forma filopodiales participan adicionalmente en la cicatrización y formación de coágulos en heridas (Dheilly, 2010). Arizza *et al.*, (2007) demostró la capacidad citotóxica y función coordinada entre los fagocitos filopodiales y las esférulas no coloreadas contra eritrocitos de conejos y células tumorales K562. Estos tipos de celomocitos

parecen expresar genes inmunológicos, los cuales incluyen homólogos del complemento y NFκB, y un tipo C de lectina (Hibino *et al.*, 2006; García-Arrarás y Ramírez-Gómez, 2010)

El incremento significativo en las células esférulas incoloras pudieran ser señales indicativas del efectivo desempeño de esta subpoblación de celomocitos granulares en organismos infectados. Esta población de celomocitos tiene funciones de localizar y fagocitar cuerpos extraños, presentando gran capacidad de desplazamiento y pseudopodia para tal fin. Distintamente, un estudio realizado por Ovando (2009) reflejó que tras una estimulación con bacterias en el erizo antártico *Sterechinus neumayeri* se observó un aumento significativo de las células esférulas rojas.

Se conoce que las células rojas contienen Equinocromo A, un pigmento naftoquinónico que posee propiedades antimicrobianas contra las bacterias Gram positivas y Gram negativas (Service y Wardlaw, 1984; Gerardi *et al.*, 1990; Haug *et al.*, 2002). Al parecer, el Equinocromo A juega un papel importante en la respuesta inmunitaria en los erizos adultos. Krupinski (2014) demostró que la adición de Equinocromo A aislado es capaz de activar la fagocitosis en celomocitos ameboideos de *L. variegatus*.

Las respuestas inmunológicas celulares en el fluido celómico de los erizos involucran alteraciones asociadas con la morfología y plasticidad de las poblaciones de celomocitos. Al parecer, la proliferación de celomocitos específicos, tales como las esférulas incoloras, puede encontrarse asociada al reconocimiento de patrones moleculares bacterianos. Aunque, el cambio del porcentaje celular en los organismos inyectados con solución salina mostró similares resultados.

Aparentemente, las heridas realizadas por la punción experimental, de igual manera pueden permitir el ingreso de bacterias comensales presentes en el medio de mantenimiento (no experimental).

En los organismos infectados con *M. lysodeikticus*, *V. parahaemolyticus* y *E. coli* no existió una diferencia marcada por el tipo de estimulación bacteriana.

Todas las inoculaciones inducen el incremento diferencial de esférulas, sin magnitud o sensibilidad frente a una especie bacteriana determinada. Esta inespecificidad está ligada a que estos organismos están frecuentemente en interacción con estas bacterias del medio o como fauna asociada. Según Lawrence *et al.* (2010) sugiere que *L. variegatus* posee un limitado número de géneros bacterianos representativos. Comúnmente se han identificado *Pseudomonas*, *Vibrio*, varias especies de epsilon y gamma *proteobacterium*. Muchos de estos microorganismos se alojan en su sistema digestivo y han sido señalados como colaboradores en el proceso de digestión.

Al igual que en *L. variegatus*, Dheilly (2010) demostró en *P. lividus* 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 lipopolisacáridos (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). 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).

El incremento significativo en la actividad fagocítica mostrado en el fluido celómico de *L. variegatus* estimulado con bacterias demuestra la efectividad de esta defensa inmunológica. Se ha considerado que al producirse la fagocitosis por los celomocitos hacia los patógenos, se producen intracelularmente una serie de sustancias tóxicas que llevan a la muerte de los elementos que están

produciendo un desequilibrio en el sistema del organismo (Majeske *et al.*, 2013). La fagocitosis muestra ser la línea de defensa más efectiva contra la invasión de microorganismos. Durante este proceso, el agente extraño o invasor es englobado, internalizado y destruido intracelularmente, a través de mecanismos microbicidas conocidos (Smith, 2012).

La fagocitosis representa un sistema de defensa poderoso contra los microorganismos que amenazan la integridad funcional del hospedador (Splettstoesser y Schuff-Werner, 2002). Es así como en condiciones metabólicas normales, existe un balance entre los eventos oxidativos, tales como, la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y los sistemas de defensa (antioxidantes y/o atrapadores de radicales libres) que permite el manteniendo de la homeostasis celular (Calderón, 2005).

La actividad de la lisozima fue más elevada en los organismos estimulados con *M. lysodeikticus* seguida de *V. parahaemolyticus*. *M. lysodeikticus* es una bacteria Gram positiva cuya pared celular está compuesta de péptidoglicanos, las cuales tienen una pared celular compuesta de lipopolisacáridos endotóxicos. La lisozima posee la propiedad de hidrolizar estos peptidoglicanos, de allí que se considera a tal enzima como neuraminidasa o muramidasa (Ibrahim *et al.*, 2002).

También es importante destacar que los peptidoglicanos en las bacterias Gram-positivas representan alrededor del 90,0% de la pared celular, mientras que en las Gram-negativas, como es el caso de *V. parahaemolyticus* y *E. coli*, apenas abarca el 10,0% (Salazar y Asenjo, 2007; Carrillo, 2013). La lisozima es de la clase de enzimas que destruye las paredes celulares de ciertas bacterias Gram-positivas por ruptura del enlace $\beta(1-4)$ entre el ácido N-acetilmurámico (NAM) y N-acetilglucosamina del peptidoglicano (NAG), debilitando así la pared celular.

El resultado es la penetración de agua en la célula que se hincha y acaba por lisarse.

El aumento observado de la actividad de lisozima en el fluido celómico de *L. variegatus* estimulado con bacterias, permite incrementar las defensas bioquímicas frente a antígenos externos. El estímulo bacteriano generó una respuesta inmunitaria, mas no así la punción o herida, tanto para las bacterias Gram positivas y Gram negativas usadas. Al parecer, la lisozima es casi inactiva frente a microorganismos Gram-negativos por la dificultad de acceder a los peptidoglicanos que se encuentran protegidos por la membrana externa. Aunque, se ha observado la acción lítica de la lisozima en bacterias pre-tratadas con detergente (Triton X-100) o un agente quelante (como el EDTA) (Salazar y Asenjo, 2007). En algunos de los trabajos se le atribuyen actividades biológicas a formas diméricas de la lisozima frente a bacterias Gram-negativas y positivas, virus y hongos (Carrillo, 2013).

La lisozima es una enzima antimicrobiana, la cual hace que funcione como un componente innato controlador de la flora simbiótica natural y patógena. Se almacena en el interior de los lisosomas de los celomocitos y su liberación al medio extracelular, es estimulada por los procesos de fagocitosis (McHenery *et al.*, 1979; Goven *et al.*, 1994). Su función de protección humoral ha sido considerada exitosa, especialmente cuando algunos parámetros inmunocelulares se encuentran suprimidos. La efectividad de su función ha sido demostrada en algunos invertebrados marinos inmunosuprimidos por la exposición a metales pesados, tal es el caso del poliqueto *Eurythoe complanata* (Marcano *et al.*, 1997; Zapata-Vívenes *et al.*, 2005), el bivalvo *Lima scabra* (Sánchez, 2008) y el camarón *L. vannamei* (Naranjo, 2012).

El aumento significativo en los niveles de proteínas totales frente a la estimulación de los erizos con *E. coli* y *M. lysodeikticus* forma parte de las respuestas inmunomodulatorias en presencia de invasiones bacterianas. Las proteínas y algunos péptidos en el fluido celómico son de relativa abundancia

cuando los erizos son invadidos por microbios. Dheilly (2010) observó en *Strongylocentrotus purpuratus* inyectado con LPS, niveles significativos de proteínas de estrés y desintoxicadoras, tales como la transferrina, melanotransferrina, ferritina, ceruloplasmina, actina, proteína yolk mayor y del citoesqueleto (tipos CyIIb y CyIIIb), profilina, fascina, colágeno, amasinina, histona H4, proteínas similares al receptor rico en cisteínas, y homólogos de los componentes del complemento C3.

A pesar que los invertebrados no poseen elementos específicos como los anticuerpos que sintetizan los animales vertebrados, existen ciertos componentes humorales producidos en la mayoría por los celomocitos como son, las opsoninas que son proteínas con función opsonizante, aglutininas que actúan como sustancias con capacidad aglutinante (como las lectinas), sustancias con actividad lítica directa como proteínas formadoras de poros y factores similares a las citocinas (Abbas y Litchman, 2000). Según hallazgos se ha logrado identificar el componente del complemento C3 (SpC3; Sp064) (Smith *et al.*, 1998) y el factor del complemento B (Al-Sharif *et al.*, 1998); expresados específicamente por celomocitos-fagocitos.

Esta perspectiva sugiere que el sistema inmune en los erizos es más complejo de lo que se presume. Los experimentos clásicos de inmunización han confirmado que algunos invertebrados pueden desarrollar respuestas específicas a patógenos (Little *et al.*, 2005; Lemaitre *et al.*, 1997). Esta discriminación específica de patógenos es algunas veces de fina escala, apuntando a la existencia de procesos inmune provistos de especificidad y memoria.

Una de las proteínas más abundantes dentro de los celomocitos es la actina del citoesqueleto (Brockton *et al.*, 2008). Esta proteína 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. También se ha señalado que la vitelogenina en celomocitos puede incrementarse, tanto en machos como hembras, exhibiendo actividad celomoglutinante 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).

En el erizo *P. purpuratus* se determinaron por espectrometría de masa 307 proteínas en el fluido celómico con posible función inmune. La relativa abundancia de oxidasa dual 1, ceruloplasmina, ferritina y transferrina sugieren la producción de ERO en celomocitos y secuestro de hierro (Dheilly *et al.*, 2013). Según estos últimos autores las proteínas contenidas en el fluido celómico se pueden agrupar en distintas categorías funcionales basadas en la secuencia genómica planteada por Sodergren *et al.*, (2006): estructura celular, movimiento y desplazamiento, adhesión celular, respuesta inmune, lisosomas, proteasas y peptidasas; transporte intracelular, intercambiadores y ATPasas; señalización celular, respuesta a estrés y desintoxicación; metabolismo energético; metabolismo ácidos nucleicos y proteínas; proliferación, reproducción y desarrollo celular.

En los niveles de ácidos nucleicos totales en el fluido celómico de *L. variegatus* no hubo una variación significativa ante la estimulación bacteriana; lo que pudiera coincidir con invariabilidad en el promedio de NTC. Existe un gran interés en ciertos genes del erizo de mar, que están involucrados en el reconocimiento de bacterias y patógenos, debido a que, la inmunidad innata en este caso, se refiere a un conjunto de proteínas que detectan aspectos únicos de una bacteria e informan a las células del organismo la presencia de agentes extraños, además los erizos también tienen una enorme capacidad para enfrentar amenazas químicas en su ambiente mediante un conjunto de genes que pueden captar y eliminar esas amenazas (Pearson, 2006).

En *Sterechinus neumayeri* se analizó la expresión de algunos genes como la actina, factor inflamatorio allogénico tipo 1 (AIF-1) y la metalotioneína (MT) posiblemente implicados en la respuesta inmune en el erizo antártico, frente a la estimulación con bacterias y levaduras, concluyendo que la respuesta molecular representada por estos tres genes se ve reflejada en la respuesta celular que genera el organismo frente a un estímulo, ya sea, con bacterias o levaduras, independiente de la función que cumpla cada uno de ellos (Ovando, 2009)

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 de trauma por la inyección. Esto garantiza su defensa contra los depredadores en organismos infectados, puesto que esta habilidad constituye una estrategia para su sobrevivencia. Asimismo, pocos síntomas de infección fueron hallados en organismos estimulados por bacterias. Aunque solo el 1,0% 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.

Según Watts *et al.* (2007) las mortalidades de erizos producidas por bacterias son poco frecuentes en ecosistemas costeros, pero han ocurrido. 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 gram negativas del género *Pseudoalteromonas*, el cual produce tetradoxina. Estos autores indujeron experimentalmente tal infección en *L. variegatus* con una de las bacterias aisladas resultando en síntomas similares. Aunque se ha hecho habitual en *L. variegatus* el hallazgo de mortandades debido a factores físicos como los cambios de temperaturas. Watts *et al.* (2007) documentó que temperaturas cercanas a 39,5°C regulan más a las poblaciones de erizos que las invasiones por microorganismos.

Hasta los momentos, en la costa sur del golfo de Cariaco no se ha reseñado mortandades de especie de erizos por enfermedades de algún factor perturbador externo. Aunque, se infiere que algunas de las enfermedades en erizos son de origen entérico, asociados a la polución por alto contenido fecal en las aguas costeras. La presencia de coliformes totales y fecales, en especial de *E. coli*, son relativamente bajos en las aguas del golfo de Cariaco, aunque existen zonas puntuales donde sus valores incrementan en temporadas del año (Rivas *et al.*, 2009), creando focos potenciales de contaminación bacteriana para los organismos.

Esta investigación demuestra la efectividad del sistema inmunológico en *L. variegatus*, tanto celular como humoral, para responder en presencia de enterobacterias (*Escherichia coli* y *Vibrio parahaemolyticus*). Al parecer, los organismos fueron capaces de modular una de sus líneas de defensa innata frente a una situación de estrés por bacterias, especialmente las variaciones proporcionales de células granulares. *L. variegatus* presentó un alto potencial para activar las respuestas inmunológicas tales como la fagocitosis, producción de lisozimas y cambios en el porcentaje de celomocitos en presencia de cepas bacterianas. Esta capacidad de tolerancias y mecanismos de resistencia frente a microorganismos, lo convierte en un fuerte candidato para potenciar zonas de acuicultura de la especie en el golfo de Cariaco.

CONCLUSIONES

Se diferenciaron morfológicamente cuatro (4) tipos de celomocitos en el fluido celómico de *Lytechinus variegatus*: fagocitos o amebocitos, esférulas incoloras, esférulas rojas y células vibrátiles.

El aumento del tipo morfológico esférulas incoloras, indica respuestas inespecíficas efectivas, más que un aumento en el número total de celomocitos.

L. variegatus muestra la capacidad de modular sus respuestas inmune celular y humoral por estimulación con bacterias, activando la fagocitosis y la acción de la lisozima.

BIBLIOGRAFÍA

Abbas, A. y Lichtman, A. 2000. *General properties of immune responses. Cellular and molecular immunology*. Interamericana McGraw Hill. Madrid.

Arizza, V.; Giaramita, F.; Parrinello, D.; Cammarata, M. y Parrinello, N. 2007. Cell cooperation in coelomocyte cytotoxic activity of *Paracentrotus lividus* coelomocytes. *Comparative Biochemistry Physiology*, 147: 389–394.

Antón, Y. y Salazar, R. 2009. El sistema inmune de los invertebrados. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 10: 1-13.

Al-Sharif, W.; Sunyer, J.; Lambris, J. y Smith, L. 1998. Sea urchin coelomocytes specifically express a homologue of the complement component C3. *Journal Immunology*, 160: 2983-2997.

Bertheussen, K. y Seljelid, R. 1978. Echinoid phagocytes *in vitro*. *Experimental Cell Research*, 111: 401-412.

Beutler, B. y Rietschel, E. 2003. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nature Review Immunology*, 3: 169-176.

Bitton, G. y Harvey, R. 1992. Transport of pathogens through soils and aquifers En: *Environmental Microbiology*. Mitchell, R. (ed). New York. Págs.103- 124.

Blake, P.; Weaver, R. y Hollis, D. 1980. Disease of humans (other than cholera) caused by vibrios. *Annual Review Microbiology*, 34: 341-367.

Branco, P.; Pressinotti, L.; Borges, J.; Lunes, R.; Kfoury-Jr, J.; Silva, M.; González, M.; Santos, M.; Peck, L.; Cooper, E. y Silva, J. 2012. Cellular biomarkers to elucidate global warming effects on Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri*. *Polar Biology*, 35: 221-229.

Branco, P.; Borges, J.; Santos, M. y Silva, J. 2013. The impact of rising sea temperature on innate immune parameters in the tropical subtidal sea urchin *Lytechinus variegatus* and the intertidal sea urchin *Echinometra lucunter*. *Marine Environmental Research*, 92: 95-101.

Brockton, V.; Henson, J.; Raftos, D.; Majeske, A.; Kim, Y. y Smith, L. 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

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

Calva, L. 2002. Hábitos alimenticios de algunos equinodermos. Parte 2. Erizos de mar y pepinos de mar. *Control Science*, 47: 54-63.

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.

Carrillo, W. 2013. Lysozyme: Antibacterial activity and allergenicity. *Actualización en Nutrición*, 14: 1-13.

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

Cooper, E.; Raptos, D. y Zhang, Z. 1995. Purification characterisation of tunicate opsonins and cytokine like proteins. En: *Techniques in fish immunology: immunological and pathological techniques of aquatic invertebrates*. Stolen, J.S. (ed). SOS Publications. Págs. 43-54.

Deveci, R.; Sener, E. y Izzetoglu, S. 2015. Morphological and ultrastructural characterization of sea urchin immune cells. *Journal of morphology*, 2-4.

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, *Heliocidaris erythrogramma*. *Developmental and Comparative Immunology*, 37: 243–256.

Dheilly, N.; Raftos, D.; Haynes, P.; Smith, C. y Nair, S. 2013. Shotgun proteomics of coelomic fluid from the purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *Developmental and Comparative Immunology*, 40: 35-50.

Du, C.; Anderson, A.; Lortie, M.; Parsons, R. y Bodnar, A. 2013. Oxidative damage and cellular defense mechanism in sea urchin models of aging. *Radical Review Biology Medicine*, 63: 254-263.

Eliseikina, M. y Magarlamov, T. 2002. Coelomocyte morphology in the *Holothurians Apostichopus japonicus* (Aspidochirota: Stichopodidae) and

Cucumaria japonica (Dendrochirota: Cucumariidae). *Marine Biology*, 28: 197–202.

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

Falugi, C.; Aluigi, M.; Chiantore, M.; Privitera, D.; Ramoino, P.; Gatti, M.; Fabrizi, A.; Pinsino, A. y Matranga, V. 2012. Toxicity of metal oxide nanoparticles in immune cells of the sea urchin. *Marine Environmental Research*, 76: 114-121.

Figueroa, D. 2002. *Zooplankton de formaciones coralinas: composición y distribución espacial de los ambientes neríticos*. Trabajo de pregrado. Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Cumaná.

García-Arrarás, J. y Ramírez-Gómez, F. 2010. Echinodem immunity. *Invertebrate Survival Journal*, 7: 211-220.

Gerardi, P.; Lassegues, M. y Canicatti, C. 1990. Cellular-distribution of sea urchin antibacterial activity. *Biology Cell*, 70: 153-157.

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

Goven, A.; Chen, S.; Fitzpatrick, L. y Venables, B. 1994. Lysozyme activity in earthworm (*Lumbricus terrestris*) celomic fluid and immunotoxicity of xenobiotics. *Environmental Toxicology Physiology*, 13: 607-613.

Goven, A. y Kennedy, J. 1996. Environmental pollution and toxicity in invertebrates: An earthworm model for immunotoxicology. *Advances Comparative Environmental Physiology*, 24: 170-211.

Goven, A.; Fitzpatrick, L. y Venable, B. 1996. Chemical toxicity and host defence in earthworm. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 712: 280-299.

Guerrero, J. 2007. VII Curso de Ciencias Básicas: Introducción a la inmunología general. *Gastroenterology Latinoamerican*, 18(2): 113-116.

Haug, T.; Kjuul, A.; Styrvold, O.; Sandsdalen, E.; Olsen, O. y Stensvag, K. 2002. Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea), and *Asterias rubens* (Asteroidea). *Invertebrate Pathology*, 81: 94-102.

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

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

Holm, K.; Dupont, S.; Skold, H.; Stenius, A.; Thorndyke, M. y Hernroth, B. 2008. Induced cell proliferation in putative haematopoietic tissues of the sea star, *Asterias rubens* (L.). *The Journal of Experimental Biology*, 211: 2551-2558.

Ibrahim, H.; Higashiguchi, S.; Koketsu, M.; Juneja, F.; Kim, M.; Yamamoto, T.; Sugimoto, Y. y Aoki, T. 1996. Partially unfolded lysozyme at neutral pH agglutinates and kills gram-negative and gram-positive bacteria through membrane damage mechanism. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 44: 3799-3806.

Ibrahim, H.; Aoki, T. y Pellegrini, A. 2002. Strategies for new antimicrobial proteins and peptides: lysozyme and aprotinin as model molecules. *Current Pharmaceutical Design*, 8: 671-93.

Jangoux, M. 1987. Diseases of Echinodermata. I. Agents microorganisms and protistans. *Disease of Aquatic Organisms*, 2: 147-162.

Johnsen, P. y Chapman, F. 1970. Infection with diatoms and other microorganisms in sea urchin spines (*Strongylocentrotus franciscanus*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 16: 268-276.

Krupinski, E. 2014. *Extração, purificação e avaliação da atividade do aquinocromo em ouriços-do-mar Lytechinus variegatus (Lamarck, 1816)*. Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação. Biologia Celular, Universidade de São Pablo, Brasil.

Larkin, E. y Hunt, D. 1982. Bivalve mollusks: control of microbiological contaminants. *Bioscience*, 32: 193-197.

Lawrence, N.; Blair, B.; Murdock, C.; Meade, M.; Watts, S. y Lawrence, A. 2010. Molecular analysis of gut microflora in captive-raised sea urchins (*Lytechinus variegatus*). *Journal World Aquaculture Society*, 41: 807-815

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.

Li, C.; Blencke, H.; Haug, T.; Jørgensen, Ø. y Stensvåg, K. 2014. Expression of antimicrobial peptides in coelomocytes and embryos of the green sea urchin

(*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Developmental Comparative Immunology*, 43: 106–113.

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

Lodeiros, C. y Buitrago, E. 2011. Avances en el cultivo de erizos en Venezuela. *Foro de Recursos Marinos y de la Acuicultura de las Rías Gallegas*, 13: 173-179.

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.

Marcano, L.; Nusetti, O.; Rodríguez-Grau, J.; Briceño, J. y Vilas, J. 1997. Coelomic fluid lysozyme activity induction in the polychaete *Eurythoe complanata* as a biomarker of heavy metal toxicity. *Bulleting Environmental Contamination Toxicology*, 59: 22-28.

Matranga, V.; Toia, G.; Bonaventura, R. y Muller, W. 2000. Cellular and biochemical responses to environmental and experimentally induced stress in sea urchin coelomocytes. *Cell Stress Chaperones*, 5: 158-165.

Matranga, V. y Bonaventura, R. 2002. Sea urchin coelomocytes, the progenitors of vertebrate immune effectors, as bio-indicators of stress and pollution. En: *The sea urchin: from basic biology to aquaculture*. Yokota, Y.; Matranga, V. y Smolenicka, Z. (eds). Swets and Zeitlinger, Lisse, The Netherlands. Págs. 161-176.

Matranga, V.; Pinsino, A.; Celi, M., Natoli, A.; Bonaventura, R.; Schröder, H. y Müller, W. 2005. Monitoring chemical and physical stress using sea urchin immune cells. En: *Progress in Molecular and Subcellular Biology Subseries Marine Molecular Biotechnology*. Matranga, V. (ed.). Echinodermata © Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. Págs. 85-110.

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. *Marine Biology*, 149: 25-34.

McCaughey, C. y Bodnar, A. 2012. Investigating the sea urchin immune system: Implications for disease resistance and aging. *Journal of Young Investigators*, 23: 27-29.

McHenery, J.; Birbeck, T. y Allen, J. 1979. The occurrence of lysozyme in marine bivalves. *Comparative Biochemistry Physiology*, 63: 25–28.

Medzhitov, R. y Janeway, J. 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Current Opinion in Immunology*, 9: 4-9.

Millott, N. 1955. The covering reaction in a tropical sea urchin. *Nature*, 175: 561.

Naranjo, C. 2012. *Efectos del cadmio sobre las respuestas hematológicas, inmunológicas y estabilidad lisosomal en Litopenaeus vannamei (Malacostraca: Penaeidae) y posterior estimulación con bacterias*. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Magister Scientiarum. Biología aplicada, Universidad de Oriente, Núcleo Sucre.

Ochoa, S. 2016. *Índices de crecimiento del erizo verdi-blanco Lytechinus variegatus (Echinoidea: Toxopneustidae) en la ensenada de Turpialito (Golfo de Cariaco), estado Sucre, Venezuela*. Trabajo de pregrado. Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Cumaná.

Ovando, P. 2009. *Caracterización celular y molecular de la respuesta inmune en el erizo antártico Sterechinus neumayeri*. Trabajo de pregrado. Departamento de Ciencias y Recursos Naturales, Universidad de Magallanes, Punta Arenas. Chile.

Pearson, H. 2006. "The sushi genome project. Sea urchin genes reveal surprising similarities with humans". "Nature News, online". <<http://www.nature.com/news/2006/061109/full/news061106-15.html>> (07/12/2016).

Pinsino, A.; Della Torre, C.; Sammarini, V.; Bonaventura, R.; Amato, E. y Matranga, V. 2008. Sea urchin coelomocytes as a novel cellular biosensor of environmental stress: a field study in the Tremiti Island Marine Protected Area, Italy. *Cell Biology Toxicology*, 24: 541-552.

Plytycz, B. y Seljelid, R. 1993. Bacteria clearance by the sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Developmental and Comparative Immunology*, 17: 283-289.

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.

Rivas, K.; La Barbera, A.; Carpio, M.; Villarroel, E.; Vásquez, E. y Graziani, C. 2009. Caracterización de la calidad del agua en áreas potenciales para

acuicultura en la Costa Sur del Golfo de Cariaco, Estado Sucre, Venezuela. *Gulf and Caribbean Fisheries Institute*, 62: 482-484.

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

Ruppert, E. y Barnes, R. 1996. *Zoología de los invertebrados*. Sexta edición. McGraw-Hill Interamericana. México.

Salazar, O. y Asenjo, J. 2007. Enzymatic lysis of microbial cells. *Biotechnology Letters*, 29(7): 985-994.

Sami, S.; Faisal, M. y Huggett, R. 1992. Alterations in cytometric characteristics of hemocytes from the American oyster *Crassostrea virginica* exposed to a polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated environment. *Marine Biology*, 113: 247-252.

Sánchez, G. 2008. *Biomarcadores de estrés oxidativo e inmunotoxicidad en el pecten Lima scabra (Born, 1178) sometido a fracciones acuosas de lubricantes usados de motores de vehículos*. Trabajo de pregrado. Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Cumaná.

Serrano, E.; Marcano, B.; Solaun, M.; Aurrekoetxea, J. y Ibarluzea, J. 1998. The influence of environmental factors on microbiological indicators of coastal water pollution. *Water Science and Technology*, 38: 195-198.

Service, M. y Wardlaw, A. 1984. Echinochrome-a as a bactericidal substance in the coelomic fluid of *Echinus esculentus* (L). *Comparative Biochemistry Physiology*, 79: 161-165.

Shao, Y.; Li, C.; Che, Z.; Zhang, P.; Zhang, W., Duan, X. y Li, Y. 2015. Cloning and characterization of two lipopolysaccharide-binding protein/bactericidal permeability-increasing protein (LBP/BPI) genes from the sea cucumber *Apostichopus japonicus* with diversified function in modulating ROS production. *Developmental and Comparative Immunology*, 52: 88-97.

Sherman. 2015. Can sea urchins beat the heat. Sea urchins, thermal tolerance and climate change. *Peer Journal*, 3: 1-15.

Shimada, T.; Sakazaki, R.; Oue, M. 1988. A bioserogroup of marine vibrios possessing somatic antigen factors in common with *Vibrio cholerae* 01. *Applied Bacteriology*, 62: 452 - 456.

Shimada-Borges, J.; Ribeiro, R.; Baptista, M.; Mangiaterra, C.; Jensch, B. y Machado Cunha da Silva, J. 2002. Phagocytosis *in vitro* and *in vivo* in the Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri* at 0°C. *Polar Biology*, 10: 1007.

Shimada-Borges, J.; Branco, P.; Nogueira-Pressinotti, L.; Severino, D. y Machado Cunha da Silva, J. 2010. Intranuclear crystalloids of antarctic sea urchins as a biomarker for oil contamination. *Polar Biology*, 33: 843–849.

Shugar, D. 1952. Measurement of lysozyme activity and ultraviolet inactivation of lysosyme. *Biochimica et Biophysica Acta*, 8: 302-309.

Smith, L.; Shih, C. y Dachenhausen, S. 1998. Coelomocytes express SpBf, a homologue of factor B, the second component in the sea urchin complement system. *Journal Immunology*, 161: 6784-6793.

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

Smith, L.; Ghosh, J.; Buckley, K.; Clow, L.; Dheilly, N.; Haug, T.; Henson, J.; Li, C.; Lun, C.; Majeske, A.; Matranga, V.; Nair, S.; Rast, J.; Raftos, D.; Roth, M.; Sacchi, S.; Schrankel, S. y Stensvag, K. 2010. Echinoderm immunity. *Advances Experimental Medicine Biology*, 708: 260–301.

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

Sodergren, E.; Weinstock, G.; Davidson, E.; Cameron, R.; Gibbs, R.; Angerer, R.; Angerer, L.; Arnone, M.; Burgess, D.; Burke, R.; Coffman, J.; Dean, M.; Elphick, M.; Etensohn, C.; Foltz, K.; Hamdoun, A.; Hynes, R.; Klein, W.; Marzluff, W.; McClay, D.; Morris, R.; Mushegian, A.; Rast, J.; Smith, L.; Thorndyke, M.; Vacquier, V.; Wessel, G.; Wray, G.; Zhang, L.; Elsik, C.; Ermolaeva, O.; Hlavina, W.; Hofmann, G.; Kitts, P.; Landrum, M.; Mackey, A.; Maglott, D.; Panopoulou, G.; Poustka, A.; Pruitt, K.; Sapojnikov, V.; Song, X.; Souvorov, A.; Solovyev, V.; Wei, Z.; Whittaker, C.; Worley, K.; Durbin, K.; Shen, Y.; Fedrigo, O.; Garfield, D.; Haygood, R.; Primus, A.; Satija, R.; Severson, T.; Gonzalez-Garay, M.; Jackson, A.; Milosavljevic, A.; Tong, M.; Killian, C.; Livingston, B.; Wilt, F.; Adams, N.; Belle, R.; Carbonneau, S.; Cheung, R.; Cormier, P.; Cosson, B.; Croce, J.; Fernandez-Guerra, A.; Geneviere, A.; Goel, M.; Kelkar, H.; Morales, J.; Mulner-Lorillon, O.; Robertson, A.; Goldstone, J.; Cole, B.; Epel, D.; Gold, B.; Hahn, M.; Howard-Ashby, M.; Scally, M.; Stegeman, J.; Allgood, E.; Cool, J.; Judkins, K.; Mccafferty, S.; Musante, A.; Obar, R.; Rawson, A.; Rossetti, B.; Gibbons, I.; Hoffman, M.; Leone, A.; Istrail, S.; Materna, S.; Samanta, M.; Stolc, V.; Tongprasit, W.; Tu, Q.; Bergeron, K.; Brandhorst, B.; Whittle, J.; Berney, K.; Bottjer, D.; Calestani, C.; Peterson, K.; Chow, E.; Yuan, Q.; Elhaik, E.; Graur, D.; Reese, J.; Bosdet, I.; Heesun, S.;

Marra, M.; Schein, J.; Anderson, M.; Brockton, V.; Buckley, K.; Cohen, A.; Fugmann, S.; Hibino, T.; Loza-Coll, M.; Majeske, A.; Messier, C.; Nair, S.; Pancer, Z.; Terwilliger, D.; Agca, C.; Arboleda, E.; Chen, N.; Churcher, A.; Hallbook, F.; Humphrey, G.; Idris, M.; Kiyama, T.; Liang, S.; Mellott, D.; Mu, X.; Murray, G.; Olinski, R.; Raible, F.; Rowe, M.; Taylor, J.; Tessmar-Raible, K.; Wang, D.; Wilson, K.; Yaguchi, S.; Gaasterland, T.; Galindo, B.; Gunaratne, H.; Juliano, C.; Kinukawa, M.; Moy, G.; Neill, A.; Nomura, M.; Raisch, M.; Reade, A.; Roux, M.; Song, J.; Su, Y.; Townley, I.; Voronina, E.; Wong, J.; Amore, G.; Branno, M.; Brown, E.; Cavalieri, V.; Duboc, V.; Duloquin, L.; Flytzanis, C.; Gache, C.; Lapraz, F.; Lepage, T.; Locascio, A.; Martinez, P.; Matassi, G.; Matranga, V.; Range, R.; Rizzo, F.; Rottinger, E.; Beane, W.; Bradham, C.; Byrum, C.; Glenn, T.; Hussain, S.; Manning, G.; Miranda, E.; Thomason, R.; Walton, K.; Wikramanayake, A.; Wu, S.; Xu, R.; Brown, C.; Chen, L.; Gray, R.; Lee, P.; Nam, J.; Oliveri, P.; Smith, J.; Muzny, D.; Bell, S.; Chacko, J.; Cree, A.; Curry, S.; Davis, C.; Dinh, H.; Dugan-Rocha, S.; Fowler, J.; Gill, R.; Hamilton, C.; Hernandez, J.; Hines, S.; Hume, J.; Jackson, L.; Jolivet, A.; Kovar, C.; Lee, S.; Lewis, L.; Miner, G.; Morgan, M.; Nazareth, L.; Okwuonu, G.; Parker, D.; Pu, L.; Thorn, R. y Wright, R. 2006. The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science*, 314: 941–952.

Sokal, R. y Rohlf, J. 1981. *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. Segunda edición. WH Freeman. New York.

Solo-Gabriele, M.; Wolfert, M.; Desmarais, V. y Palmer, C. 2000. Sources of *Escherichia coli* in a coastal subtropical environment. *Applied Environment Microbiology*, 66: 230-237.

Splettstoesser, W. y Schuff-Werner, P. 2002. Oxidative stress in phagocytes - "The enemy within". *Microscopy Research and Technique*, 57: 441-455.

Summers, R.; Morrill, B.; Leith, A.; Marko, M.; Piston, D. y Stonebraker, A. 1993. A stereometric analysis of karyogenesis, cytokinesis, and cell arrangements during and following fourth cleavage period in the sea urchin, *Lytechinus variegatus*. *Development Growth Difference*, 35: 41-58.

Tarima, K.; Machado Cunha da Silva, J. y Lawrence, J. 2007. *Edible sea urchins: Biology and Ecology*. Segunda edición. Elsevier Science and Technology. New York.

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.

Tucunduva de Faria, M. y Machado Cunha da Silva, J. 2008. Innate immune response in the sea urchin *Echinometra lucunter* (Echinodermata). *Journal Invertebrate Pathology*, 98: 58–62.

Van de Braak, C.; Botterblom, M.; Huisman, E.; Rombout, J. y Van der Knaap, W. 2002. Preliminary study on haemocyte response to white spot syndrome virus infection in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 51: 149-155.

Verling, E.; Crook, A. y Barnes, D. 2004. The dynamics of covering behaviour in dominant Echinoid populations from American and European West coasts. *Marine Ecology*, 25: 191-206.

Voss, G. 1976. *Seashore life of Florida and the Caribbean*. E.A. Seemann, Miami. Pág. 170.

Wang, Y.; Chang, Y. y Lawrence J. 2013. Disease in sea urchins. En: *Sea Urchins: Biology and Ecology*. Lawrence, J. (ed). Elsevier B.V. All rights reserved. Págs. 550.

Warburg, O. y Christian, W. 1942. Isolation and crystallization of enolase. *Biochemistry*, 310: 384-421.

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.

Yamamoto, K.; Takeda, Y.; Miwatani, T. y Craig, J. 1983. Evidence that a non - 01 *Vibrio cholerae* produce enterotoxin that is similar but not identical to cholera enterotoxin. *Infection and Immunology*, 41: 896 - 901.

Zapata-Vívenes, E.; Nusetti, O.; Marcano, L.; Escalpés, M. y Arredondo, L. 2005. Respuestas inmunológicas y cicatrización en el poliqueto *Eurythoe complanata* (Annelida: Amphinomidae) expuesto a cobre. *Ciencias Marinas*, 31: 1-9.

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

HOJA DE METADATOS

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

Título	RESPUESTAS INMUNOLÓGICAS INNATAS EN EL ERIZO VERDI-BLANCO <i>Lytechinus variegatus</i> (ECHINOIDEA: TOXOPNEUSTIDAE) INFECTADO EXPERIMENTALMENTE CON BACTERIAS
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Bastidas Moreno Mariángel José	CVLAC	19190685
	e-mail	mariangelbasm@gmail.com
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

<i>Lytechinus variegatus</i>, inmunidad innata, celomocitos, lisozima.

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

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Bioanálisis

Resumen (abstract):

Las poblaciones de los erizos pueden verse afectadas por enfermedades causadas por bacterias tanto en su hábitat como en maricultivos, inclusive pueden conllevar a mortandades. Las infecciones bacterianas en los erizos son evitadas por acción de un sistema inespecífico de defensas inmunológicas constituido por células circundantes (celomocitos) y una serie de péptidos y proteínas de actividad microbicida. En este sentido, se evaluaron las respuestas inmunológicas innatas tales como: número y tipos de celomocitos, actividad fagocítica, lisozimas y proteínas totales, en el erizo verdi-blanco *Lytechinus variegatus* estimulado experimentalmente por distintos inóculos bacterianos. Los organismos fueron inyectados por separado con una suspensión de cepas bacterianas: *Micrococcus lysodeikticus*, *Escherichia coli* y *Vibrio parahaemolyticus*, en la musculatura de la linterna de Aristóteles a través de orificio bucal. Se usaron como organismos controles un grupo de erizos inyectados sólo con solución salina y otro grupo no inyectado. Adicionalmente, el tiempo de recuperación desde una posición invertida y aspectos externos de los organismos fueron determinados como índices de salud. El fluido celómico (FC) fue colectado a las 24 horas post-estimulación para determinar los parámetros celulares y bioquímicos. En el FC se detectó la presencia de cuatro tipos de celomocitos: fagocitos o amebocitos, esférulas incoloras, esférulas rojas y células vibrátiles. El número total de celomocitos (NTC) y porcentaje de viabilidad no mostraron diferencias significativas en los erizos estimulados, sin embargo, se evidenció un aumento en el porcentaje de células esférulas incoloras. En adición, la actividad fagocítica incrementó en los organismos estimulados con las distintas cepas bacterianas. Un incremento en la actividad de lisozima fue observado mayormente en los organismos inoculados con *M. lysodeikticus*. El sistema inmunitario de *L. variegatus* responde positivamente al estímulo experimental con bacterias, demostrando la eficiencia del sistema inmune.

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

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Prof. Edgar Zapata	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	12269219
	e-mail	ezapatavivenes@gmail.com
	e-mail	
Profa. Yanet Antón	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	8439227
	e-mail	yanton@udo.edu.ve
	e-mail	
Profa. Raquel Salazar	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	5855836
	e-mail	raquellugove@yahoo.com
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2017	06	06

Lenguaje: SPA

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

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis-mb.doc	Aplication/word

Alcance:

Espacial: UNIVERSALTemporal: INTEMPORALTítulo o Grado asociado con el trabajo: Licenciado en BioanálisisNivel Asociado con el Trabajo: LicenciadoÁrea de Estudio: BioanálisisInstitución(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

CU Nº 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 Nº 696/2009"**.

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

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

hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

Juan A. Bolaños Currela
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

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 Grado son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y sólo podrán ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Consejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario para su autorización”.



Mariángel Bastidas Moreno

Autor



Prof. Edgar Zapata

Asesor