



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

RESPUESTAS INMUNOLÓGICAS Y ESTABILIDAD DE LAS MEMBRANAS  
LISOSOMALES EN EL ERIZO VERDI-BLANCO *Lytechinus variegatus*  
(ECHINOIDEA: TOXOPNEUSTIDAE) EXPUESTO A COBRE  
(Modalidad: Tesis de Grado)

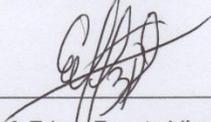
DEINIS DEL VALLE RAPOSO RODRÍGUEZ

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

CUMANÁ, 2017

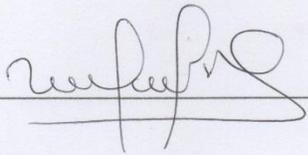
RESPUESTAS INMUNOLÓGICAS Y ESTABILIDAD DE LAS MEMBRANAS  
LISOSOMALES EN EL ERIZO VERDI-BLANCO *Lytechinus variegatus*  
(ECHINOIDEA: TOXOPNEUSTIDAE) EXPUESTO A COBRE

APROBADO POR:

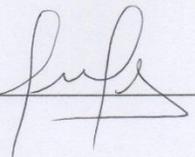


---

Prof. Edgar Zapata Vivenes



---



---

## ÍNDICE

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTO.....	II
LISTA DE TABLAS.....	III
LISTA DE FIGURAS .....	IV
RESUMEN .....	IV
INTRODUCCIÓN .....	1
METODOLOGÍA .....	6
Colecta de organismos .....	6
Mantenimiento en el laboratorio.....	6
Exposición a cobre .....	7
Obtención de celomocitos.....	7
Parámetros celulares.....	8
Viabilidad celular .....	8
Número total de células.....	8
Parámetros inmunológicos .....	8
Fagocitosis.....	8
Actividad de lisozima .....	9
Estabilidad de la membrana lisosomal.....	9
Salud de los erizos .....	10
Tiempo de enderezamiento.....	10
Porcentaje de cobertura .....	10
Análisis estadísticos .....	11
RESULTADOS.....	12

Parámetros celulares .....	12
Parámetros inmunológicos .....	15
Actividad de fagocitosis y lisozimas.....	15
Estabilidad lisosomal .....	17
Salud de los erizos .....	18
DISCUSIÓN .....	21
CONCLUSIONES .....	28
BIBLIOGRAFÍA .....	29
APÉNDICES .....	36
HOJAS DE METADATOS .....	41

## DEDICATORIA

A

Dios, eterno Rey, mi principal proveedor. Por darme sabiduría, entendimiento, paciencia, vida y salud.

Elena, mi madre, una mujer que ha sido mi apoyo en todo. Ella es mi brazo derecho, mi brazo izquierdo, ella lo es todo. Gracias por creer ciegamente en las capacidades de cada uno de tus hijos. Mami ¡te amo!.

Mi padre, Arquímedes, quien nunca ha dejado de velar por nosotros. Eres muy importante en mi vida.

José Gregorio, mi esposo, mi amigo, mi compañero de vida, mi amor. Siempre mi consejero, mi alentador. Te amo.

Mi hija Emma Elizabeth, la personita más especial en mi vida. Ella ocupa gran parte de mi corazón y es quien me motiva a hacer las cosas mejores cada día. Te amo mi amor.

Mis hermanos, Yenifer, Wuillian y Arquímedes. Grandes personas a quienes quiero mucho.

Mis amigas y compañeras de carrera, a quienes hoy en día considero parte de mi familia, ellas son: Ariana Uricare, Ondibert Durán, Georgelina Boada, Lisset Borges, Génesis Aguilera y Zurally Fuentes. Gracias por esta amistad tan hermosa. Las quiero.

Mariangel Bastidas, un gran apoyo en la realización de esta tesis. Gracias por todo.

Mis abuelos (Maita y Paito). Que Dios me los bendiga.

Mi tía Elida y mis primas Eliannys y Fabiola. Parte fundamental de mi familia. Siempre juntas.

A todos mis sobrinos y el resto de mi familia.

## **AGRADECIMIENTO**

A

Mi Profesor Edgar Zapata. Un excelente asesor, encaminado y decidido. Gracias por la maravillosa oportunidad de ser su tesista. Gracias por su apoyo y dedicación.

La Universidad de Oriente por abrirme las puertas a la casa más alta.

Los Profesores de Bioanálisis, por procurar impartir el mejor conocimiento en las distintas áreas de tan hermosa carrera.

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Síntomas en organismos controles y expuestos durante tres días a concentraciones de 1, 5, 10 y 20 µg/l de cobre.....	18
Tabla 2. Síntomas en organismos controles y expuestos durante 5 días a concentraciones de 1, 5, 10 y 20 µg/l de cobre.....	19

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación geográfica del área de colecta de <i>L. variegatus</i> (ensenada de Turpialito). .....	6
Figura 2. Número total de celomocitos (Cel/ml) de <i>L. variegatus</i> controles y expuestos experimentalmente a cobre (1, 5, 10 y 20 µg/l) durante los días tres, cinco e <i>in vitro</i> . .....	12
Figura 3. Porcentaje de viabilidad de los celomocitos de <i>L. variegatus</i> controles y expuestos experimentalmente a cobre (1, 5, 10 y 20 µg/l) durante los días tres, cinco e <i>in vitro</i> . .....	13
Figura 4. Contaje diferencial (expresado en porcentaje %) de los celomocitos de <i>L. variegatus</i> controles y expuestos experimentalmente a cobre (1, 5, 10 y 20 µg/l) durante los días tres, cinco e <i>in vitro</i> . .....	14
Figura 5. Actividad fagocítica de <i>L. variegatus</i> controles y expuestos experimentalmente a cobre (1, 5, 10 y 20 µg/l) durante los días tres, cinco e <i>in vitro</i> . .....	16
Figura 6. Actividad de lisozimas de <i>L. variegatus</i> controles y expuestos experimentalmente a cobre (1, 5, 10 y 20 µg/l) durante los días tres, cinco e <i>in vitro</i> . .....	16
.....	17
Figura 7. Porcentaje de celomocitos con daños en las membranas lisosomales en <i>L. variegatus</i> controles y expuestos experimentalmente a cobre (1, 5, 10 y 20 µg/l) durante los días tres y cinco e <i>in vitro</i> . .....	17
Figura 8. Tiempo de volteo o de enderezamiento de los erizos <i>L. variegatus</i> controles y los expuestos a cobre durante tres y cinco días. ....	20
Figura 9. Índice de cobertura de los organismos controles y los expuestos a cobre durante tres y cinco días. ....	20

## RESUMEN

Con el propósito de conocer la vulnerabilidad del sistema inmunológico del erizo verdi-blanco *Lytechinus variegatus* al cobre, durante tres y cinco días, se procedió bajo condiciones controladas en el laboratorio a determinar parámetros celomocitarios (viabilidad, número total y diferencial de células), capacidad fagocítica, actividad de lisozimas y estabilidad de las membranas lisosomales en los celomocitos de organismos expuestos a concentraciones crecientes de 0, 1, 5, 10 y 20  $\mu\text{g Cu/l}$ . Adicionalmente, se comparó el comportamiento y la capacidad de cobertura de la testa en organismos controles y los contaminados por el metal. Se utilizó como ensayo de toxicidad referencial una incubación *in vitro*, durante cuatro horas, de celomocitos a las mismas concentraciones de cobre. El número total de celomocitos en los organismos experimentales no presentó alteraciones, sin embargo se observó una disminución cercana al 70 % de celomocitos viables durante la exposición al cobre *in vitro*. Se apreciaron cambios en la proporción de los tipos de celomocitos, disminución en la actividad de la lisozima y daño en las membranas de los lisosomas en organismos expuestos a las concentraciones de 10 a 20  $\mu\text{g Cu/l}$  durante el quinto día. En un 20 a 50 % de este mismo grupo de animales experimentales se presentaron síntomas externos tales como pérdidas de espinas, reducidos movimientos en sus tubos alimenticios, respuestas a algunos estímulos externos y capacidad de recubrimiento de su testa. Los resultados demuestran la sensibilidad que presenta el sistema inmunológico en presencia del cobre y su repercusión sobre el comportamiento natural y estrategias miméticas de *Lytechinus variegatus*, lo cual puede tener efectos adversos sobre la sobrevivencia de los organismos en su ambiente natural.

## INTRODUCCIÓN

Los erizos son un grupo de equinodermos que sólo viven en ambientes marinos y que comprenden unas 900 especies, distribuidas desde los polos hasta el Ecuador, y desde la zona intermareal hasta profundidades mayores a 5 000 m y se hallan en la superficie del fondo oceánico, anclados bajo las rocas y hendiduras de las mismas (Neira y Cantera, 2005). Estos organismos son fundamentales para mantener el balance de los arrecifes de coral y de los océanos en general, ya que son grandes consumidores de otros animales, plantas marinas, algas y detritos orgánicos, o pueden ser empleados como recurso alimenticio por diferentes especies de crustáceos y peces (Birkeland, 1989). Adicionalmente, los erizos de mar representan un rubro importante en las pesquerías de diversos países del mundo; siendo sus gónadas consideradas como una exquisitez que se comparan al caviar y es uno de los productos del mar con una elevada demanda y mejor cotizados en mercados internacionales (Keesing y Hall, 1998).

En Venezuela, existen especies de erizos con alto potencial de cultivo, dentro de las cuales se pueden nombrar a *Echinometra lucunter*, *Tripneustes ventricosus* y *Lytechinus variegatus* (Lodeiros y Buitrago, 2011); esta última especie posee un rápido crecimiento y buena adaptación al cautiverio. La coloración externa de *L. variegatus* varía ampliamente, predominando los colores verde y blanco. Habita en las aguas cálidas, especialmente, en pastos de hierbas marinas; aunque son frecuentes sobre rocas o arena entre los 250 m, son más fáciles de encontrar a poca profundidad (Espinoza *et al.*, 2008).

Debido a la abundante producción de gónadas, a *L. variegatus* se le ha considerado un recurso potencial para la acuicultura, con altas expectativas en monocultivos experimentales o asociados a bivalvos (Lodeiros y García, 2004). En el nororiente de Venezuela, principalmente, en las islas de Margarita y Coche, esta especie se pesca y procesa artesanalmente (Gómez, 1999).

Los ecosistemas costeros de la región oriental de Venezuela no están exentos de ser impactados por la influencia de contaminantes de tipo antropogénico, especialmente, por metales pesados. Martínez (2002) reportó ligeros incrementos de metales pesados en sedimentos superficiales del Golfo de Cariaco (estado Sucre), en especial de cobre (Cu). Los niveles de Cu provienen de desechos domésticos, agrícolas e industriales, los cuales tienen efectos peligrosos. Bajo este escenario, los sedimentos funcionan como los principales reservorios del metal (Rubio *et al.*, 1996). Adicionalmente, los niveles de Cu que se resuspenden y solubilizan en el agua de mar suelen ser factores bien significativos en la acumulación de este metal en erizos (Volterra y Conti, 2000). Los erizos son considerados como removedores primarios de sedimentos y detritus en el mar, por lo que se supone que tienen un papel importante en el ciclo de los metales pesados, además han sido usados en la evaluación de la toxicidad de metales y la calidad de las aguas, mediante estudios de laboratorio relacionados con cambios morfológicos y embriológicos, pero muy poco se ha estudiado sobre contaminación metálica *in situ* (Eisler, 1981; Fernández y Beiras, 2001).

El Cu ha sido asociado con inmunosupresión en distintos organismos vertebrados e invertebrados en pequeñas dosis. Vargas *et al.* (2012) demostraron efectos inmunotóxicos de concentraciones subletales de Cu en *Colossoma macropomum* (Pisces, Characiidae), fundamentado en la disminución de la viabilidad celular, respuesta fagocítica y bacteriolítica. En invertebrados, otros autores tales como Salazar (1993), Marcano *et al.* (1997) y Zapata-Vívenes *et al.* (2005) observaron que dosis subletales de Cu inducen cambios en las respuestas inmunológicas en el poliqueto *Eurythoe complanata*.

Los erizos no poseen un sistema inmune adaptativo, sino que dependen totalmente de las respuestas de inmunidad innata para la protección frente a agentes extraños (Rendón y Balcázar, 2003). Su fluido celómico posee

características similares a las del agua de mar, además, contiene altas concentraciones de potasio, baja cantidad de lípidos, proteínas, azúcar y celomocitos (células circundantes). De igual manera, desempeña varias funciones incluyendo la excreción, locomoción, protección de las vísceras y la inmunidad humoral (Tarima *et al.*, 2007).

La inmunidad en los erizos de mar está regulada por diversos tipos de celomocitos y sustancias bacteriolíticas contenidas en el fluido celómico, en el cual se han identificado cuatro tipos principales de células: 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 la fagocitosis de patógenos no específicos. Las células esféricas rojas y no coloreadas granulares generan 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 poseen la capacidad de responder a las lesiones, la invasión del hospedero y agentes citotóxicos. 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.*, 2006). En este fluido existen parte de las defensas humorales, se encuentran las lisozimas y otros péptidos con actividad antimicrobiana (Shimada-Borges *et al.*, 2002).

El Cu es un elemento esencial para el mantenimiento celular; sin embargo, la incorporación de niveles excesivos de este metal en los organismos genera toxicidad, auspiciado por un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), que sin un balance adecuado en los mecanismos de defensas antioxidantes se podrían generar daños irreversibles en las membranas biológicas (Fridovich, 1998). Principalmente, los efectos de ERO ocurren tempranamente a nivel celular, particularmente, en organelos microsomales tales como mitocondrias o lisosomas, existiendo diversas vías por la cual la estructura o funciones puedan ser alteradas por ERO (Moore, 1985; Cheung *et al.*, 2004).

Diversos estudios se han abocado a la determinación de la estabilidad de la membrana lisosomal de células afectadas por xenobióticos usando el ensayo de retención de rojo neutro (RRN) como parámetro de daño celular (Lowe *et al.*, 1992). Esta sencilla metodología pone en evidencia que sólo los lisosomas de células sanas pueden tomar y retener el colorante supravital. El colorante es difundido en el citosol en el caso de células dañadas, pudiendo cuantificarse el tiempo de retención como determinante del efecto (Week *et al.*, 1997).

Los parámetros hematológicos, citológicos e inmunológicos sirven para evaluar las condiciones de los individuos para el diagnóstico de enfermedades, estrés ambiental y daño oxidativo (Zapata-Vívenes *et al.*, 2012); sin embargo, en los erizos existen pocos valores de referencia. Los parámetros celulares e inmunológicos más comúnmente empleados en invertebrados marinos son: hemogramas, tiempo de coagulación de la hemolinfa, actividad de las lisozimas y profenoloxidasa, fagocitosis, producción de radicales libres, actividad antimicrobiana, título hemaglutinante del plasma y concentración de proteínas totales de la hemolinfa (Naranjo, 2012).

La condición de salud basal de los erizos puede ser estimada mediante el

tiempo de volteo o de enderezamiento de una posición invertida (boca hacia arriba) hasta alcanzar su posición original. Este detalle determina la velocidad de reacción que poseen los mismos ante el ataque de depredadores. (Taylor *et al.*, 2014). Además, los cambios de coloración, pérdidas de espinas, y otros comportamientos anormales pueden ser usados como señales de estrés en erizos.

Otra estrategia que posee *L. variegatus* es su capacidad de camuflar su color evidente en el ambiente, colocando sobre su testa una variedad de sustratos disponibles en el entorno (rocas, trozos de corales, macroalgas, conchas de moluscos) (Himmelman, 1986). La cobertura de su exoesqueleto es una acción mimética que evita el ataque de depredadores y garantiza su supervivencia en el medio. Se supone que organismos vulnerables y sensibilizados por contaminantes deben poseer una menor capacidad de cubrirse totalmente en menor tiempo. Este parámetro obvio se implementó como un marcador de comportamiento en el ambiente (Millott, 1996).

Por lo antes expuesto, esta investigación tuvo el propósito de conocer las respuestas inmunológicas, capacidad fagocítica, lisozimas y estabilidad de las membranas lisosomales en el erizo verdi-blanco al ser expuesto a concentraciones subletales de cobre. Además, se compararon aspectos externos, el comportamiento y la capacidad de cobertura en organismos sanos y contaminados por el metal.

## METODOLOGÍA

### Colecta de organismos

Los erizos *L. variegatus* fueron colectados durante los meses desde mayo a julio de 2016, de forma manual a profundidades de 1 a 5 m, en la ensenada de Turpialito ( $10^{\circ} 26' 56''$  N,  $64^{\circ} 02' 00''$  O), ubicada en la costa sur del Golfo de Cariaco. La zona litoral oriental de la ensenada de Turpialito está cubierta por un arrecife que se extiende hasta, aproximadamente, unos 14 m de profundidad (Figuroa, 2002). La abundancia de esta especie en la zona de colecta está entre 0,5-1,2 individuos por  $m^2$ . La talla mínima de colecta fue mayor o igual a 5 cm de diámetro.

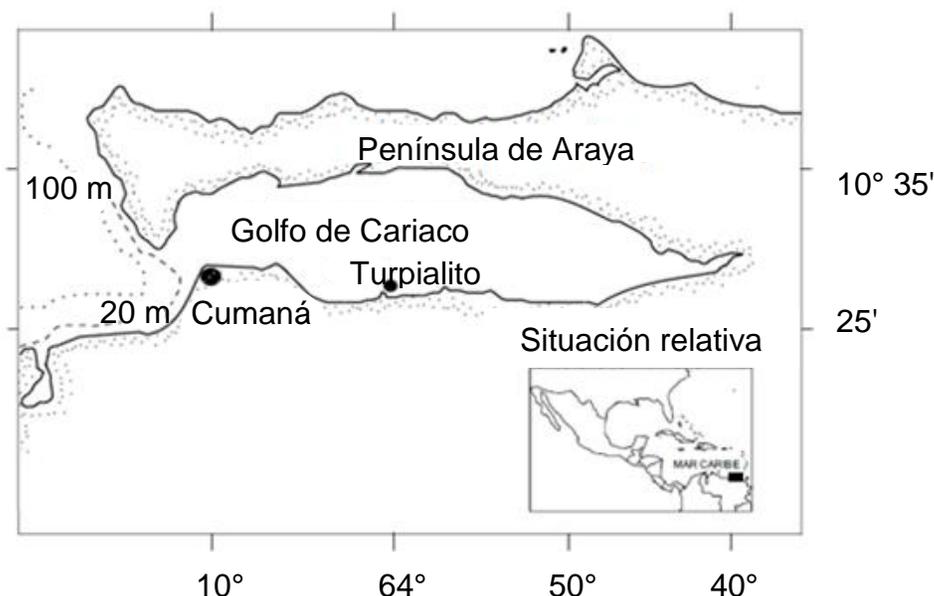


Figura 1. Ubicación geográfica del área de colecta de *L. variegatus* (ensenada de Turpialito).

### Mantenimiento en el laboratorio

Los erizos se transportaron hasta el laboratorio de Bioquímica y Ecotoxicología, ubicado en la Escuela de Ciencias de la Universidad de Oriente, núcleo de Sucre; en envases isotérmicos y se colocaron en acuarios de  $40\text{ cm}^3$ , a razón de un organismo por cada 5 litros de agua de mar filtrada, con suficiente

aireación, temperatura promedio del agua  $26 \pm 2$  °C, pH 7,9-8,1 y salinidad de 36 UPS. Los organismos fueron alimentados *ad libitum* con una mezcla de macroalgas deshidratadas de los géneros *Sargassum*, *Padina* y *Ulva* colectadas en su hábitat natural. El agua y el alimento se cambiaron cada dos días. Estas condiciones se mantuvieron por una semana, sirviendo como periodo de aclimatación antes de iniciar los ensayos de exposición.

### **Exposición a cobre**

Previo al ensayo, se estimó la dosis letal media (LC50), la cual fue de 12,48  $\mu\text{g}$  Cu/l. Los erizos fueron expuestos a concentraciones nominales de cobre (0, 1, 5, 10 y 20  $\mu\text{g/l}$ ), durante tres y cinco días continuos, usando como fuente el sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ). Las condiciones del sistema de acuarios fueron mantenidas tal y como se indicó en el período de aclimatación. Adicionalmente, se realizó un bioensayo referencial *in vitro* agregando a pools de fluidos celómicos aislados de erizos controles las mismas concentraciones nominales de Cu. Se dejó incubar durante cuatro horas a temperatura de 25 °C en cámara oscura (U.S EPA, 1993). Una vez finalizados los ensayos *in vivo* e *in vitro*, se procedió a realizar las determinaciones de los parámetros celomocitarios, inmunológicos y la estabilidad lisosomal. Adicionalmente, se conservó a -20 °C parte del fluido celómico para determinar la actividad de lisozimas.

### **Obtención de celomocitos**

La extracción del fluido celómico fue realizada siguiendo la metodología propuesta Bastidas (2017). Para ello, se realizó la separación de la testa con una tijera de metal, y se tomó ~1 ml del líquido celómico insertando una aguja hipodérmica en la región muscular de la linterna de Aristóteles, previamente llenada de 200  $\mu\text{l}$  de agua de mar estéril y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) a  $4 \times 10^{-3}$  mol/l. De esta forma se evitó la punción y posterior contaminación con líquido digestivo y porciones de las gónadas. El fluido

celómico se trasvasó a un tubo Eppendorf, para luego ser colocado en hielo, al cual se le adicionó 20 µl de una solución contentiva de ácido etilendiaminotetraacético 0,5 mol/l y NaCl 30 mmol/l a pH 7,5 (ISO-EDTA).

### **Parámetros celulares**

#### Viabilidad celular

Esta respuesta fue determinada por tinción diferencial con el colorante azul de tripano al 0,4 % (Nusetti *et al.*, 1998). Se mezclaron 10 µl de la suspensión final de celomocitos con un volumen igual de azul de tripano, se resuspendió y se contaron las células en un hemocímetro por microscopía de luz (400 X). Las células vivas fueron diferenciadas de las muertas porque éstas últimas toman una coloración azul. La viabilidad fue expresada como porcentaje (%) de células vivas.

#### Número total de células

El número total de celomocitos por ml se determinó en los cuatro cuadrantes de la cámara y se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula: Número de células/ml=  $(X/2) 10^4$  (Goven *et al.*, 1996).

#### Contaje diferencial de celomocitos

Se determinó el contaje diferencial relativo de celomocitos ( $n$  de cada tipo celular  $\times 100/n^\circ$  Total 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* (Zymozan). Se mezclaron 100 µl del extracto de Zymozan con 100 µl de suspensión de celomocitos, y luego se incubó por 15 minutos. Posteriormente, se le agregó 100 µl de una solución de NBT (2,00 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  $\mu$ l (20 mg/ml BFS) de la enzima superóxido dismutasa (SOD). Para extraer el formazán (producto de la reducción del NBT) se agregaron 200  $\mu$ l de hexadecyltrimetil amonio bromuro 0,1 % como agente antimicrobiano y 400  $\mu$ l de buffer fosfato 100 mmol/l pH 6,2. Seguido de un período de incubación de tres horas a 37 °C y centrifugación posterior a 2 000 rpm por 15 minutos, el precipitado se disolvió en 1 ml de dimetilsulfoxido (DMSO) y se procedió a medir la absorbancia a 510 nm. Estas lecturas fueron comparadas con una curva patrón realizada 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.

### **Actividad de lisozima**

La actividad de la lisozima (mucopeptidil N-acetilmuromoylhidrolasa; EC 3.2.1.17) en el fluido celómico se determinó por el método de la tasa de turbidez (Shugar, 1952). Las condiciones del ensayo se mantuvieron de la siguiente manera: 25  $\pm$  1 °C, en buffer fosfato de potasio pH 6,24. Se usaron como sustrato 0,015 % (m/v) de una suspensión de *Micrococcus Lysodeikticus* (células liofilizadas). En una cubeta de plástico, cuadrada, con capacidad para 1 ml, se agregaron 600  $\mu$ l del buffer fosfato de potasio, 200  $\mu$ l de la suspensión de *Micrococcus* y finalmente, 200  $\mu$ l de la suspensión de celomocitos, mezclándose y precediendo inmediatamente a medir la extinción de células intactas a lisadas durante 5-10 minutos a 450 nm con paso de haz de luz de 1 cm. Se realizó una curva estándar de actividad enzimática con lisozima comercial de clara de postura de gallina (46 200 U/ml).

### **Estabilidad de la membrana lisosomal**

Para evaluar este parámetro se empleó el método de Lowe *et al.* (1992). De cada organismo se extrajo alrededor de 300  $\mu$ l de hemolinfa previamente aislado en agua de mar con EDTA a 4  $\times 10^{-3}$  mol/l. Las suspensiones de

hemolinfa se guardaron en tubos de centrifuga Eppendorf en un refrigerador a 4 °C. Se preparó una solución madre de rojo neutro (RN) con 22,80 mg del colorante (Sigma Chemical, St. Louis) en 1 ml de dimetilsulfóxido (Sigma) (Lowe y Pipe, 1994).

La solución de trabajo se preparó previa al ensayo, usando 10 µl de la solución madre de RN y 5 ml de agua de mar con EDTA; la misma se almacenó en cámara oscura a 10 °C. Se añadieron 10 µl de hemolinfa y 40 µl de la solución de trabajo de RN, procediendo a mezclar e incubar en una cámara húmeda y oscura. Al cabo de 15 minutos, se observaron las láminas en un microscopio óptico a 400 X y se procedió a contar y sacar el porcentaje de células sin daño y células dañadas. La observación se hizo cada 15 minutos la primera hora y luego cada media hora, hasta dos horas; para obtener el porcentaje de células sin daño versus las células dañadas.

### **Salud de los erizos**

#### Tiempo de enderezamiento

Se determinó el tiempo de recuperación de su posición invertida; para ello, 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).

#### Porcentaje de cobertura

El estado de salud de los erizos expuestos a las diferentes concentraciones de cobre durante tres y cinco días, se determinó mediante el porcentaje de cobertura con sustratos naturales proporcionados en el laboratorio, tales como piedras, arena y algas. Los erizos se colocaron en el fondo del acuario y se procedió a estimar el porcentaje de su testa que se encontraba cubierta con estos sustratos naturales que encontraron (Millott, 1996).

#### Síntomas externos

Adicionalmente, a los erizos expuestos se les describieron algunos síntomas entre ellos, cambios de coloración, pérdidas de espinas, comportamiento

anormales.

### **Análisis estadísticos**

Se calcularon los promedios y varianzas de todas las variables para cada uno de los grupos estudiados (organismos expuestos a Cu y ensayo *in vitro*). Los resultados de los tratamientos en los grupos estudiados se compararon con los controles a través de un análisis de varianza de doble vía. Para los análisis estadísticos se empleó el programa estadístico SPSS versión 11 (Sokal y Rohlf, 1981).

## RESULTADOS

### Parámetros celulares

El número total de celomocitos (NTC) en los organismos controles y los expuestos mostraron diferencias no significativas en presencia de las concentraciones subletales de Cu ( $F_{sc}=1,29$ ;  $p>0,05$ ) ni durante los períodos de exposición ( $F_{sd}= 0,70$ ;  $p>0,05$ ). Además, tales factores no mostraron interacción ( $F_{si}=0,38$ ;  $p>0,05$ ). Los promedios de NTC en los organismos controles oscilaron entre 3 245 000– 4 105 000 células/ml (Fig. 2). Este parámetro pareciera ser muy variable intra-grupalmente para cada uno de los períodos de exposición. Los mayores promedios de NTC se reportaron en los organismos expuestos a la concentración de 5  $\mu\text{g/l}$  a los cinco días de exposición.

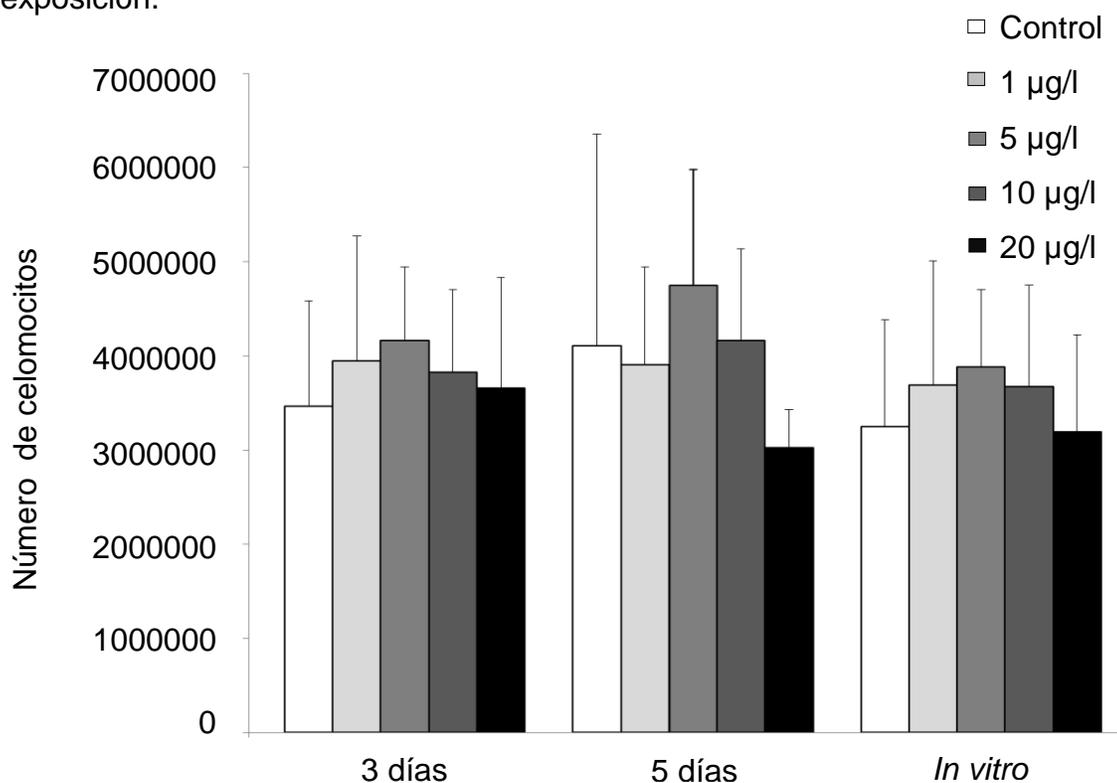


Figura 2. Número total de celomocitos (Cel/ml) de *L. variegatus* controles y expuestos experimentalmente a cobre (1, 5, 10 y 20  $\mu\text{g/l}$ ) durante los días tres, cinco e *in vitro*.

El porcentaje de viabilidad celular (PVC) mostró diferencias altamente significativas tanto para las concentraciones empleadas ( $F_{sc}= 27,12$ ;  $p<0,001$ ) como para los períodos de exposición ( $F_{sd}= 43,81$ ;  $p<0,001$ ). De igual manera, se denotó la interacción altamente significativa entre ambos factores ( $F_{si}= 12,60$ ;  $p<0,001$ ). Los promedios de PVC oscilaron entre 90 a 99 % de células viables; sin embargo, en el ensayo *in vitro* se observó una sustancial disminución (de 80 a 70 %) en celomocitos expuestos a concentraciones de 5, 10 y 20  $\mu\text{g Cu/l}$ , en contraste a los organismos expuestos a 1  $\mu\text{g/l}$  y controles (Fig. 3).

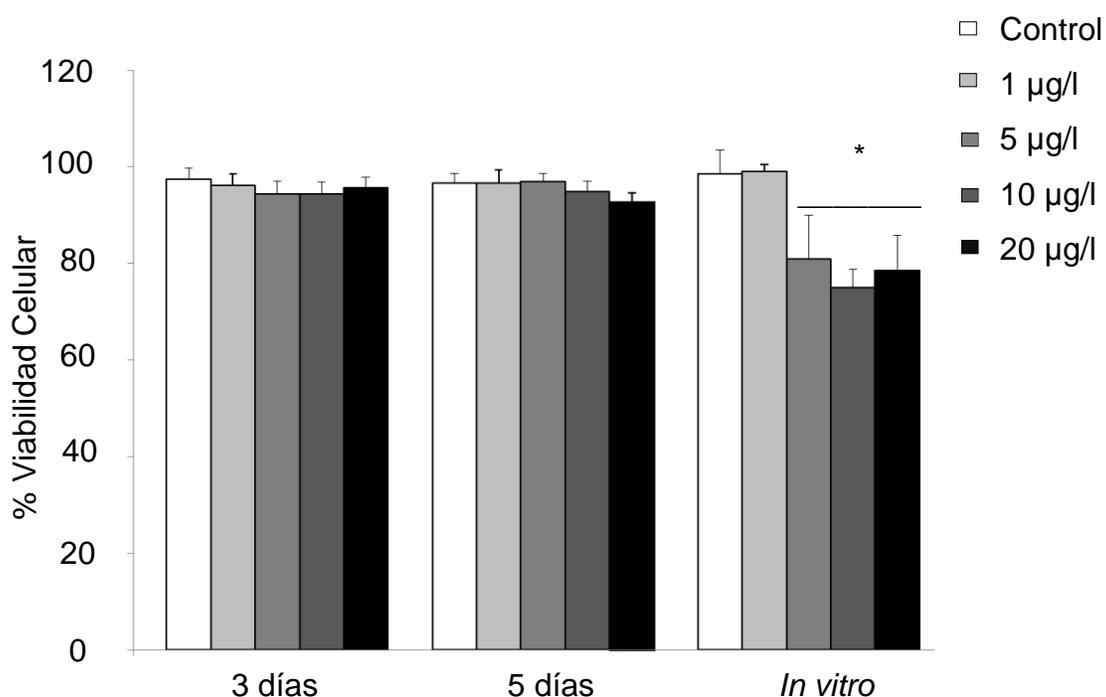


Figura 3. Porcentaje de viabilidad de los celomocitos de *L. variegatus* controles y expuestos experimentalmente a cobre (1, 5, 10 y 20  $\mu\text{g/l}$ ) durante los días tres, cinco e *in vitro*.

El conteo diferencial de celomocitos se basó en distinguir los cuatro tipos de células presentes en el fluido celómico de *L. variegatus*: esférulas incoloras, los fagocitos, las esférulas rojas y las células vibrátiles (Bastidas, 2017). El

porcentaje de esférulas incoloras encontrado no fue significativo, tanto para las concentraciones ( $F_{sc}= 0,65$ ;  $p>0,05$ ) como para los días de tratamiento ( $F_{sd}= 3,13$ ;  $p>0,05$ ). Se puede observar en la figura 4, que el mayor porcentaje de células no coloreadas fue reportado durante el día tres de exposición en la concentración de 1  $\mu\text{g/l}$  y en el ensayo *in vitro* en la concentración de 5  $\mu\text{g/l}$ .

El porcentaje de fagocitos mostró diferencias significativas con respecto a los días de exposición ( $F_{sd}= 3,72$ ;  $p<0,05$ ), no así entre las concentraciones aplicadas ( $F_{sc}= 0,51$ ;  $p>0,05$ ). La interacción de estos dos factores mostró diferencias significativas ( $F_{si}= 2,72$ ;  $p<0,05$ ). En la figura 4, se observa como durante el quinto día de exposición al cobre, el porcentaje de fagocitos es mayor en los organismos expuestos a las concentraciones de 5 y 10  $\mu\text{g/l}$ .

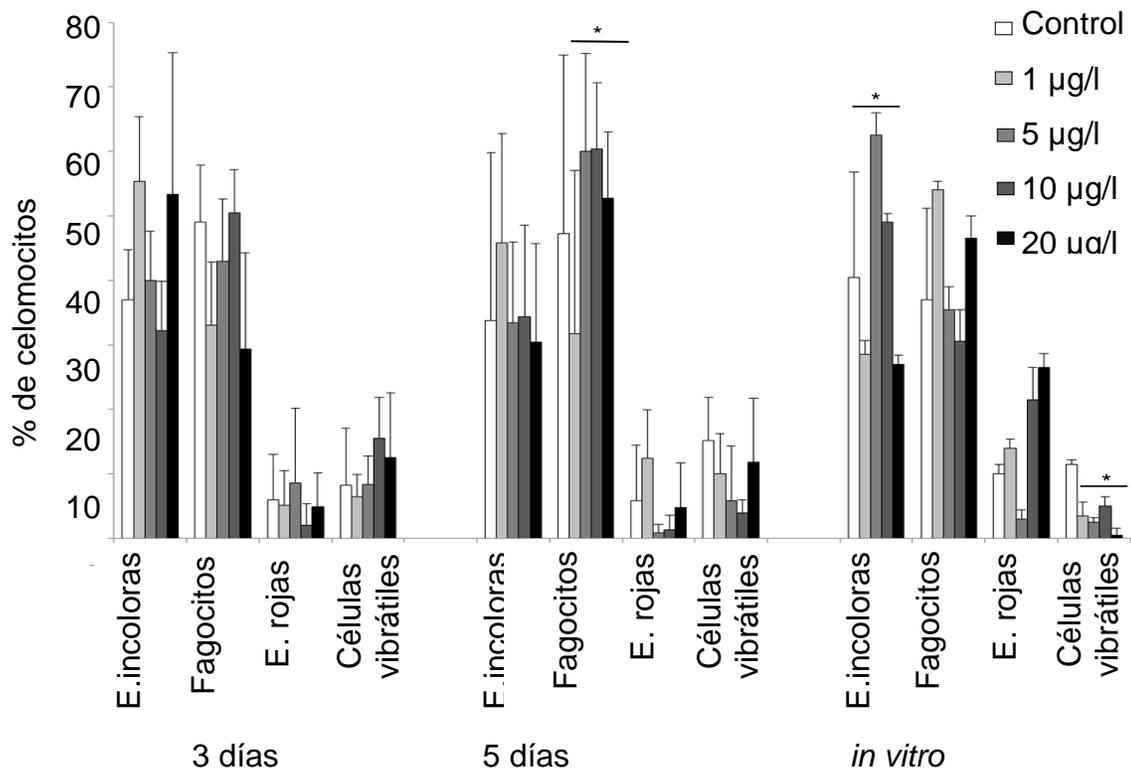


Figura 4. Contaje diferencial (expresado en porcentaje %) de los celomocitos de *L. variegatus* controles y expuestos experimentalmente a cobre (1, 5, 10 y 20  $\mu\text{g/l}$ ) durante los días tres, cinco e *in vitro*.

El porcentaje de esférulas rojas mostró variaciones significativas con relación a las concentraciones empleadas ( $F_{sc}= 2,62$ ;  $p<0,05$ ); y altamente significativos en el caso de los días de exposición ( $F_{sd}= 10,67$ ;  $p<0,001$ ). La interacción entre las concentraciones empleadas y los días de exposición al metal resultó ser muy significativa ( $F_{si}= 3,65$ ;  $p<0,01$ ). Se puede apreciar en la figura 4 el incremento de éste tipo celular sólo durante el ensayo *in vitro* a las concentraciones de 10 y 20  $\mu\text{g/l}$ .

El porcentaje de células vibrátiles tuvo promedios estadísticamente significativos, para el factor día ( $F_{sd}= 3,67$ ;  $p<0,05$ ). No fue así con las concentraciones aplicadas ( $F_{sc}= 1,38$ ;  $p>0,05$ ) ni para la interacción entre estos dos factores ( $F_{si}= 1,41$ ;  $p>0,05$ ). Es notoria la disminución del porcentaje de este tipo de celomocitos, en todas las concentraciones aplicadas en el ensayo *in vitro* (Fig. 4).

### **Parámetros inmunológicos**

#### Actividad de fagocitosis y lisozimas

La actividad fagocítica de *L. variegatus*, estimada por la formación de formazán, presentó promedios muy significativos con relación a los días de exposición al Cu ( $F_{sd}= 22,39$ ;  $p<0,001$ ). Este parámetro exhibe un incremento de la actividad de fagocitosis durante el quinto día de exposición al metal y durante el ensayo *in vitro* con respecto a su control, como se muestra en la figura 5. Esta variable no fue modificada por las concentraciones aplicadas ( $F_{sc}= 0,26$ ;  $p>0,05$ ) y la interacción entre ambos factores no fue significativa ( $F_{si}= 0,52$ ;  $p>0,05$ ).

La actividad de lisozimas reflejó diferencias significativas durante los días de exposición al metal ( $F_{sd}= 4,17$ ;  $p<0,05$ ), no fue así con las concentraciones de cobre empleadas ( $F_{sc}=0,28$ ;  $p>0,05$ ). La interacción de estos factores no fue significativa ( $F_{si}= 0,54$ ;  $p>0,05$ ). Los valores medios de los controles oscilaron desde 0,48 hasta 2,21 U/ml. Existió una disminución en la actividad de esta

enzima bacteriolítica, teniendo un promedio de 1,35 U/ml en los organismos que fueron expuestos con el metal durante más tiempo (cinco días) en la concentración de 20 µg/l y de 0,88 U/ml durante el ensayo *in vitro*, en comparación con los expuestos durante tres días a la misma concentración, en cuyo caso el promedio fue de 2,21 U/ml (Fig. 6).

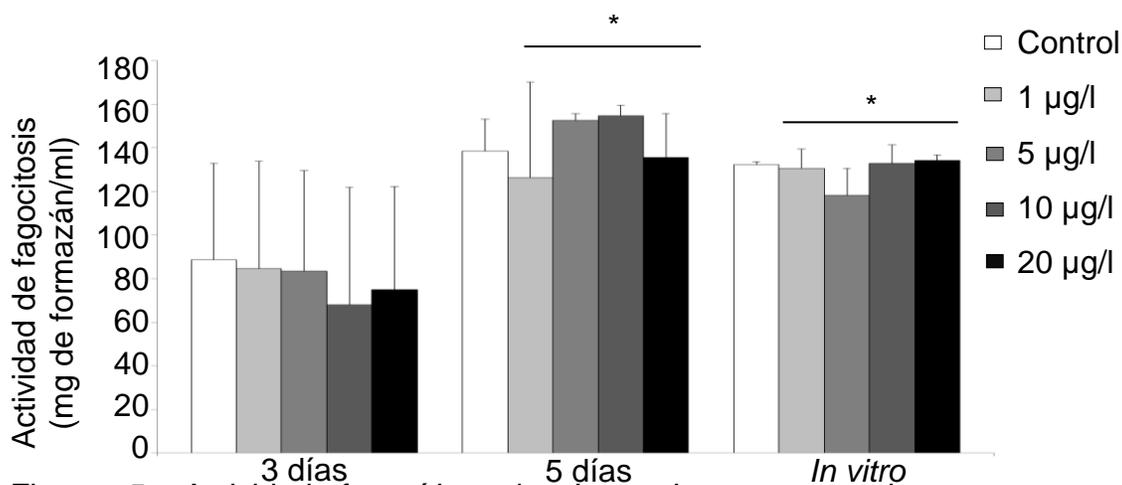


Figura 5. Actividad fagocítica de *L. variegatus* controles y expuestos experimentalmente a cobre (1, 5, 10 y 20 µg/l) durante los días tres, cinco e *in vitro*.

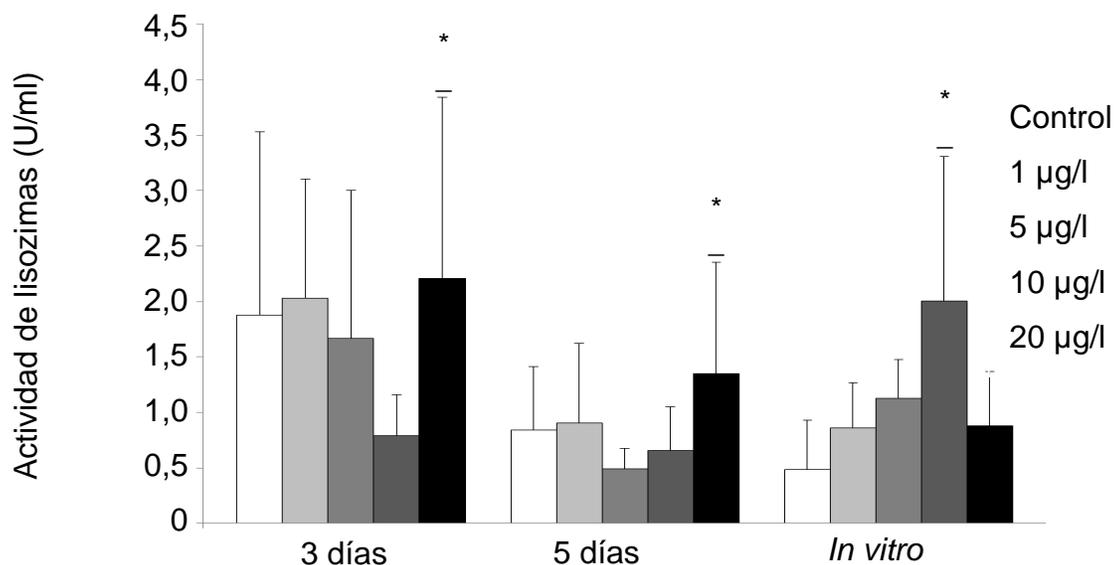


Figura 6. Actividad de lisozimas de *L. variegatus* controles y expuestos experimentalmente a cobre (1, 5, 10 y 20 µg/l) durante los días tres, cinco e *in vitro*.

## Estabilidad lisosomal

Durante 120 minutos se determinó el porcentaje de celomocitos con daños en la membrana de los lisosomas versus el porcentaje de células capaces de retener el colorante rojo neutro sin sufrir alteración en las estructuras ya señaladas. Los datos obtenidos resultaron ser altamente significativos con relación a las concentraciones de cobre aplicadas ( $F_{sc}= 17,33$ ;  $p<0,001$ ) y no significativas en cuanto a los días de exposición al metal ( $F_{sd}= 0,63$ ;  $p>0,05$ ). Sin embargo, la interacción entre los dos factores fue significativa ( $F_{si}= 2,43$ ;  $p<0,05$ ).

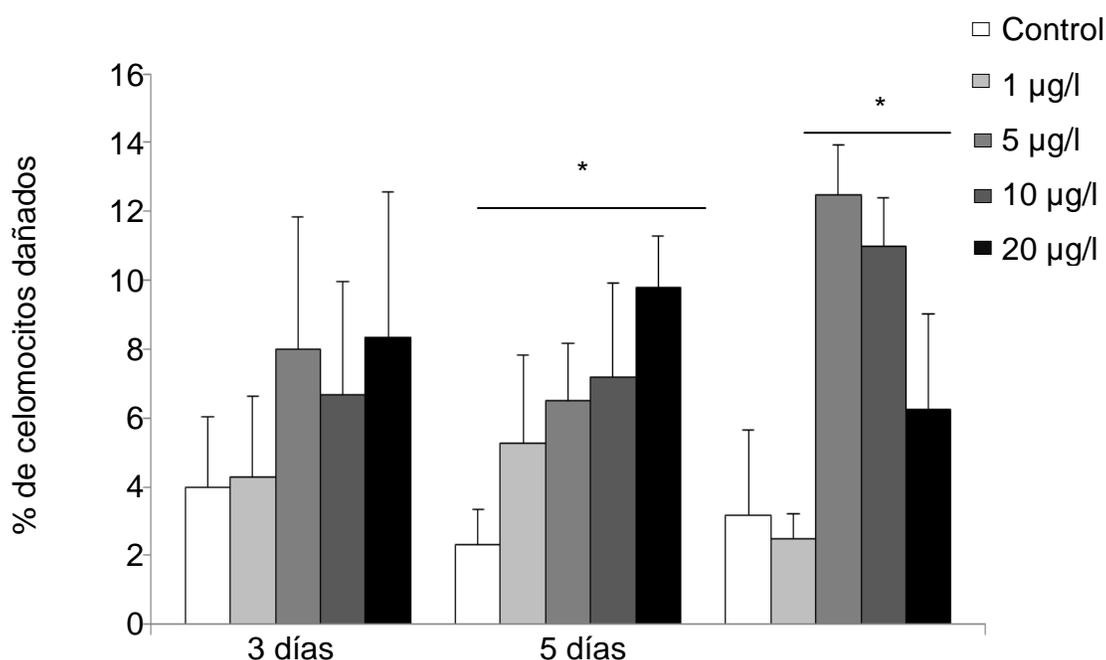


Figura 7. Porcentaje de celomocitos con daños en las membranas lisosomales en *L. variegatus* controles y expuestos experimentalmente a cobre (1, 5, 10 y 20 µg/l) durante los días tres y cinco e *in vitro*.

Durante el día cinco de exposición, se observó un aumento en el número de células que resultaron dañadas por efecto de las concentraciones aplicadas. Durante el ensayo de exposición *in vitro* en las concentraciones de 5 y 10 µg/l fueron observados los mayores promedios de células dañadas (Figura 7).

## Salud de los erizos

En la tabla 1 se aprecian los síntomas y respuestas a estímulos externos en los organismos controles y expuestos durante tres días al cobre. Se puede observar que no tuvieron síntomas físicos de daño aparente, pues, prácticamente no se les evidenció pérdidas de sus espinas y el movimiento de éstas fue positivo o característico. Además, sus testas no presentaron cambios en su coloración. El movimiento de su tubo digestivo, así como la estimulación oral (apertura y cierre de sus dientes) y el consumo de macroalgas fueron positivos.

Tabla 1. Síntomas en organismos controles y expuestos durante tres días a concentraciones de 1, 5, 10 y 20 µg/l de cobre.

	Controles	1 µg/l	5 µg/l	10 µg/l	20 µg/l
% Pérdida de espinas	-	-	-	-	-
Coloración de la testa	Sin cambios aparentes				
Movimiento de espinas	+	+	+	+	+
Estimulación oral	+	+	+	+	+
Movimiento de tubos alimenticios	+	+	+	+	+
Desoves en el agua	-	-	-	-	-
Consumo de macroalgas	+	+	+	+	+
Color del fluido celómico	Característico	Característico	Característico	Característico	Característico

En cambio, los síntomas externos de los organismos controles y los expuestos durante cinco días al cobre muestran algunos cambios en presencia del cobre (Tabla 2). Los organismos expuestos a las concentraciones más altas presentaron pérdidas de un 20 % hasta el 50 % de sus espinas y un movimiento

de las mismas fue retardado, incluso casi nulo (organismos casi moribundos). La respuesta ante la estimulación oral, movimiento del tubo digestivo y el consumo de macroalgas también se observaron disminuido en contraste a los organismos controles.

Tabla 2. Síntomas en organismos controles y expuestos durante 5 días a concentraciones de 1, 5, 10 y 20 µg/l de cobre.

	Controles	1 µg/l	5 µg/l	10 µg/l	20 µg/l
% Pérdida de espinas	-	-	20%	40%	50%
Coloración de la testa	Sin cambios aparentes				
Movimiento de espinas	+	+	+/-	+/-	-
Estimulación oral	+	+	+/-	-	-
Movimiento de tubos alimenticios	+	+	-	-	-
Desoves en el agua	-	-	-	-	-
Consumo de macroalgas	+	+	-	-	-
Color del fluido celómico	Característico	Característico	Característico	Característico	Característico

En cuanto al tiempo de enderezamiento (volver desde la posición aboral a la oral), los controles tardaron en promedio 32 segundos en voltearse. Por su parte, los organismos expuestos durante tres y cinco días tardaron entre 70,20 y 142,60 segundos en promedio. Los resultados fueron muy significativos para las concentraciones ( $F_{sc} = 11,38$ ;  $p < 0,01$ ) y los días de exposición al cobre ( $F_{sd} = 11,87$ ;  $p < 0,01$ ). Los promedios del índice de cobertura con los sustratos naturales fueron muy significativos en cuanto a las concentraciones aplicadas ( $F_{sc} = 4,03$  y  $p < 0,01$ ). En los organismos controles, los valores medios van

desde 91 % de cobertura de la testa durante el día tres y de 89 % en el día cinco. Estos porcentajes de cobertura disminuyeron con las distintas concentraciones aplicadas, sobre todo durante el día cinco.

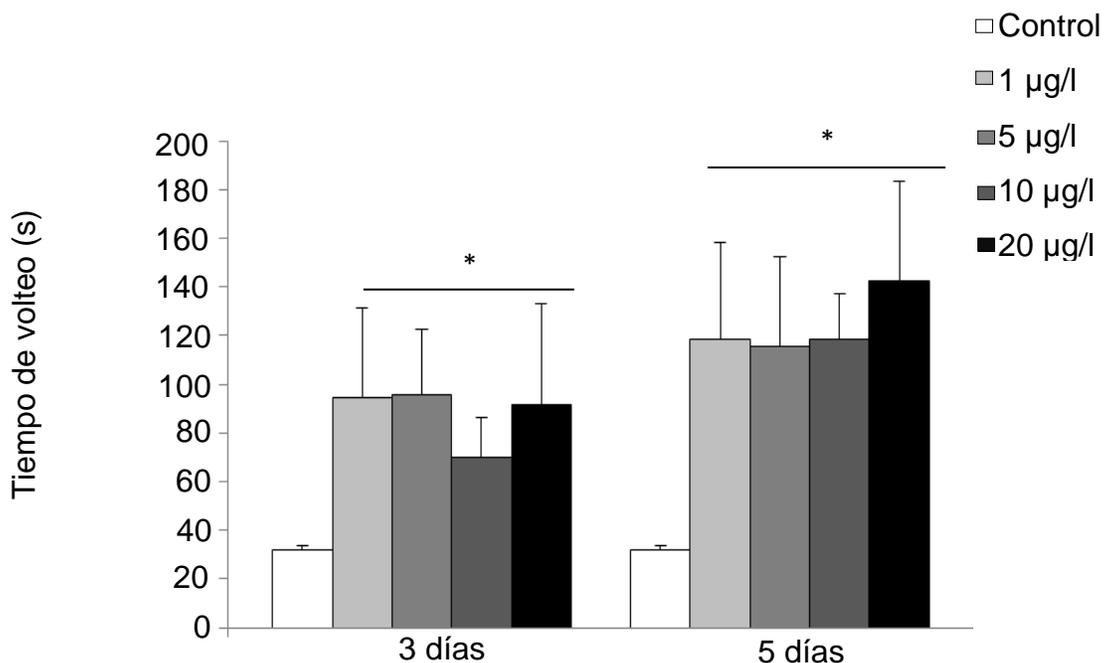


Figura 8. Tiempo de volteo o de enderezamiento de los erizos *L. variegatus* controles y los expuestos a cobre durante tres y cinco días.

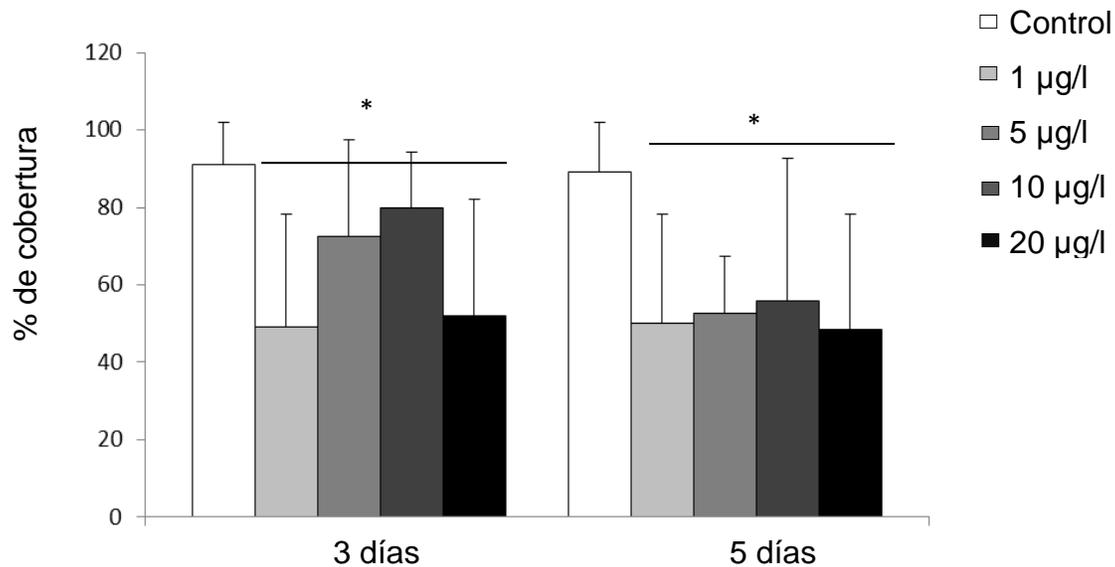


Figura 9. Índice de cobertura de los organismos controles y los expuestos a cobre durante tres y cinco días.

## DISCUSIÓN

*Lytechinus variegatus* expuesto a las concentraciones de Cu mostraron ligeros cambios en algunos parámetros celomocitarios, tales como el porcentaje diferencial, actividad fagocitaria *in vitro*, y un incremento en el daño de las membranas de los lisosomas. En cuanto las defensas moleculares, se observó que la actividad bacteriolítica de la lisozima fue inhibida en los organismos expuestos a Cu durante cinco días e *in vitro*. Además, se hizo evidente el efecto del Cu sobre la fisiología y comportamiento de los organismos durante la exposición al quinto día, manifestado en la reducción del número y movimiento de las espinas, lo cual influye en la capacidad de recuperación de la posición invertida y cobertura de la testa. La merma en la capacidad de las respuestas de defensas y de su normal comportamiento, tales como la locomoción, camuflaje, viraje e incluso la alimentación, proyecta la vulnerabilidad de los erizos a variables ecológicas (depredación) en hábitats contaminados con dosis bajas de cobre (concentraciones mayores de 20 ug Cu /l).

El Cu en los erizos, al igual que en muchos organismos, es un micronutriente de importancia en los requerimientos metabólicos tales como crecimiento y reproducción (Powell *et al.*, 2010). Sin embargo, diversos estudios sugieren que niveles elevados de Cu perjudican la capacidad reproductiva y al sistema inmune en erizos. Al parecer, el Cu puede alterar las vías de desarrollo críticas mediante la inhibición de la síntesis de proteínas; tales efectos sobre la expresión génica pueden dar lugar a manifestaciones que incluyen anomalías del desarrollo y mayor sensibilidad a factores ambientales extremos (Sanders y Martin, 1994).

Para algunas especies de erizos se ha considerado al Cu como uno de los metales más tóxicos, cuando se contrasta con Cd y Zn (King y Riddle, 2001). En este trabajo su toxicidad es evidenciada mediante la dosis letal media (LC<sub>50</sub>) estimada (12,48 µg Cu/l) durante cuatro días. Similarmente, se demostró que

concentraciones entre 10 a 20  $\mu\text{g/l}$  pueden ser suficientes para provocar letalidad al menos al 20,00 % de la población de *L. variegatus* ensayada (Apéndice 3).

Los erizos suelen ser sensibles a Cu durante los distintos estadios de su ciclo de vida. En el erizo *Sterechinus naumayeri* se han estimado  $\text{LC}_{50}$  de 11,40  $\mu\text{g/l}$  para embriones desarrollados expuestos de seis a ocho días y para larvas de 1,40  $\mu\text{g/l}$  para un período de 20 a 23 días, respectivamente (King y Riddle, 2001). Powell *et al.* (2010) reportaron que dietas enriquecidas con 12; 36 y 114,00 mg Cu/kg administradas a *L. variegatus* durante 12 semanas pueden ser perjudiciales para la fisiología del organismo. En otras especies de erizos, tal como *Arbacia punctulata*, se han registrado mortalidades elevadas al sulfato de cobre a concentraciones de 150-200  $\mu\text{g/l}$  durante 14 días (Gore *et al.*, 2003). Aunque la información de efectos de niveles de Cu sobre los organismos adultos es muy escasa.

Las concentraciones seleccionadas de Cu para realizar los bioensayos son consideradas superiores (10 a 20  $\mu\text{g/l}$ ) en contraste con los niveles presentes en el sitio de colecta. Los niveles ambientales de Cu reportados para el golfo de Cariaco oscilan entre 0,63 a 67,01 mg/Kg de sedimento (Martínez, 2002); por lo tanto, el ensayo de exposición representa una posible representación de un escenario de contaminación antropogénica ambiental. Para verificar esta hipótesis se recomienda realizar un estudio de análisis de cobre en organismos en la zona de colecta.

En este estudio, los erizos expuestos al metal no reflejaron variación en el número total de celomocitos, ni en su viabilidad celular, lo que demuestra la tolerancia del sistema celomocitario a dosis bajas de Cu. No obstante, fue notoria algunas variaciones en ambos parámetros en la exposición *in vitro* al Cu. El incremento en el número de las esférulas incoloras y rojas durante la exposición a cobre puede deberse a cambios en el porcentuales de células

celomocitarias en presencia de un estrés químico. Particularmente, ambas esférulas poseen gránulos y movimiento ameboide lo que hace suponer que estas células ejercen funciones de defensa ante el ataque de agentes extraños y cicatrización de heridas. Además, las esférulas rojas contienen en sus gránulos un pigmento conocido como equinocromo A, el cual posee acción bactericida, sobretodo en condiciones de estrés (Smith *et al.*, 2006).

En *Sterechinus neumayeri* se ha evidenciado el incremento del equinocromo A, y al mismo tiempo de células rojas, en el fluido celómico de individuos que han sido estimulados con CdCl<sub>2</sub> (Figueroa, 2009). En otros estudios, Wang *et al.* (2013) y Pagliara y Stabili (2012) reportan un incremento en el número de las esférulas rojas en *Paracentrotus lividus* expuestos a 2,50 mg/l de cloruro de Zinc por 24 h. Adicionalmente, los cambios en las células vibrátiles ameritan ser explicados más por un efecto de exposición al aire, el cual estimula los procesos de coagulación, que por la acción del mismo Cu. Durante la exposición *in vitro* al cobre este tipo celular prácticamente no fueron observados, posiblemente el papel que desempeñan en la coagulación, la misma es estimulada por las defensas naturales del ensayo *in vitro*.

Las pruebas *in vitro* con *L. variegatus* brindan mayor sensibilidad en presencia del metal, pudiéndose proponer como células modelos en ensayos ecotoxicológicos. Recientemente se ha propuesto a tales células como sensores de contaminación (Matranga *et al.*, 2000; Pinsino y Matranga, 2015). Los marcadores de estrés y evaluaciones de respuestas funcionales en erizos han demostrado tener cierta efectividad en los estudios de toxicidad de metales pesados (Matranga *et al.*, 2002).

Los ajustes en el porcentaje de celomocitos en organismos estresados parece ser una respuesta común en erizos, tanto para estimulantes del sistema inmune (Bastidas, 2017) como en presencia de compuestos químicos (Fernández, 2001). Aunque, se ha demostrado que algunos tipos de celomocitos pueden ser

activados por variaciones en la temperatura, exposición a metales pesados o a la radiación UV (Matranga *et al.* 2000; 2002; 2005; 2006).

La fagocitosis y la actividad de las lisozimas forman parte de las respuestas inmunológicas inespecíficas que permiten neutralizar y destruir agentes invasores, englobarlos y posteriormente degradarlos en los lisosomas, o producir la lisis de las paredes bacterianas a nivel de peptidoglicanos (Goven *et al.*, 1994; Goven y Kennedy, 1996).

La actividad de lisozimas se denotó reducida tanto en los organismos expuestos a cobre durante el quinto día de exposición como en el ensayo *in vitro*. En distintas publicaciones se ha demostrado que los mecanismos de defensa moleculares inmunes pueden ser generalmente suprimidos por un amplio espectro de xenobióticos (Sauvé *et al.*, 2002; Zapata-Vivenes *et al.*, 2017).

El efecto inhibitor del cobre sobre la actividad de la lisozima ha sido demostrado en otras especies de invertebrados (Zapata-Vivenes *et al.*, 2005). La lisozima representa la mejor enzima caracterizada involucrada en la autodefensa de bacterias; esta disuelve las paredes celulares de ciertas bacterias, causando el estallido debido a la alta presión osmótica dentro de la célula (Jolles y Jolles, 1984). Pagliara y Stabili (2012) reportaron que la presencia de Zn afecta a los componentes celulares y no celulares (lisozima) del sistema inmune del erizo de mar *P. lividus*.

La disminución en la actividad de la lisozima puede deberse a una acción directa del Cu sobre la estructura de la proteína, formando complejos Cu-proteínas lo que altera así su estructura secundaria, o tener cambios en su centro activo. Jing *et al.* (2016) reportaron que la actividad de lisozima disminuyó al 19,28 % de su actividad basal a una la concentración de Cu de  $1 \times 10^{-3}$  mol/l, asociado a la respectiva formación del complejo cobre-lisozima. Este complejo resulta en el cambio conformacional de la proteína específicamente en

los residuos catalizadores (Glu<sub>35</sub> y Asp<sub>52</sub>) localizados en el sitio de unión. Este detalle fundamenta la reducción en la actividad de dicha enzima tanto en el ensayo de exposición como *in vitro*.

La actividad de las lisozimas ha sido usada como biomarcador en inmunoensayos de biotoxicidad de xenobióticos (Nuseti *et al.*, 2004). Su acción bacteriolítica ha sido ampliamente examinada en invertebrados expuestos a concentraciones subletales de diversos compuestos xenobióticos, incluyendo metales pesados. Pipe *et al.* (1999) han encontrado efectos tóxicos agudos de distintos metales (Cu, Zn, Hg) sobre la actividad de la enzima en mejillones.

En general existió un porcentaje significativo de celomocitos que sufrieron daño en la membrana de sus lisosomas en los organismos expuestos a Cu en el período más extenso evaluado; resultados similares fueron hallados durante la exposición *in vitro* al cobre. Se presume que el Cu puede ingresar disuelto en el agua hasta el espacio celómico y quedar disponible a los celomocitos. El Cu puede ser transferido a través de la membrana plasmática de los celomocitos por difusión facilitada mediante un sistema dependiente de ATP, realizado presumiblemente por proteínas inter-membranas específicas, ionoforos o receptores mediados por endocitosis. Una vez que los metales se localizan en el interior del celomocito, se unen a una variedad de ligandos existentes que regulan sus concentraciones, lo cual permite su flujo, manteniendo un gradiente electroquímico que permite iniciar manifestaciones tóxicas relacionadas con la inactivación de ciertas enzimas y componentes bioquímicos (Nott y Moore, 1987).

Se sabe que los lisosomas son los organelos con mayor capacidad de acumulación y homeostasis de xenobióticos, incluyendo hidrocarburos (Pruell y Quinn, 1988) y metales pesados (Nicholson, 2003). El Cu puede unirse a metaloproteínas y mantenerse acumulados en estas vesículas. Este metal, una vez acumulado, puede producir radicales libres por reacción Fenton los cuales

pueden oxidar a los fosfolípidos de los sistemas de membranas. Sin embargo, diferentes metales pesados pueden alterar la fisiología básica de los lisosomas. Falugi *et al.*, (2012) demostraron la toxicidad potencial de nanopartículas de dióxido de estaño ( $\text{SnO}_2$ ), dióxido de cerio ( $\text{CeO}_2$ ) y óxido de hierro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) en el erizo de mar *Paracentrotus lividus*, como modelo *in vivo*, y encontró que a los cinco días de exposición los celomocitos mostraron alteraciones morfológicas en los lisosomas. Recientemente se ha demostrado que *L. variegatus* presenta declives en las respuestas celulares-inmunes, daño al ADN y desestabilización en las membranas lisosomales en presencia de lubricantes usados de motores fuera de borda (Velázquez, 2017).

Tanto en laboratorio como en monitoreos en el campo, las estimaciones de daño celular por retención de rojo neutro han tenido gran validación. En la estrella de mar *Parvalustra exigua* se asoció el daño lisosomal y la capacidad de retener rojo neutro en organismos de zonas contaminadas por metales pesados en las costas surafricanas. En numerosas investigaciones, se ha estimado que el tiempo de retención de rojo neutro (TRRN) en células sanguíneas en invertebrados marinos contaminados oscila entre 60 a 120 minutos para alcanzar el 50 % de células dañadas por el colorante (Nascimento *et al.*, 2006). Por ejemplo, en el poliqueto *E. complanata* se han reportado incrementos en el daño lisosomal, presencia de micronúcleos con alteraciones en sus respuestas inmunológicas basales en ejemplares contaminados con aceites lubricantes de vehículos automotores (Zapata-Vívenes *et al.*, 2017).

En otros invertebrados como en el camarón *Litopenaeus vannamei* se ha reportado que el TRRN puede reducirse por efectos de las concentraciones relativamente bajas de Cd, manifestando una relación dosis-respuesta (Chang *et al.* 2009; Naranjo, 2012). Este parámetro también puede ser afectado en presencia de distintos metales pesados en el mejillón *P. viridis* (Nicholson 2003; Nicholson y Lam 2005, Zapata-Vívenes *et al.*, 2012) y en diversos organismos cultivables (Zhao *et al.*, 2011).

La salud basal de *L. variegatus* en presencia del cobre se denotó alterada, fundamentada en la reducción de la capacidad de enderezamiento de una posición invertida. La capacidad de voltearse está mediada por movimientos en conjuntos de los tubos alimenticios y las espinas. La pérdida de estas estructuras alrededor del 20 al 50 % en los organismos expuestos a las concentraciones más elevadas ejercen efectos negativos sobre su estado físico, lo cual los hace vulnerables al ataque de depredadores, cuando se encuentran en su hábitat natural. De igual manera, Bielmyer *et al.* (2005) encontraron que cuando el erizo *Diadema antillarum* fue expuesto a cobre causó pérdidas de espinas y cambios en el pH del fluido celómico.

La estrategia de camuflaje que posee *L. variegatus* fue limitada en organismos expuestos a cobre. Al igual que el enderezamiento del organismo, la capacidad de cobertura es llevada a cabo por movimientos de los tubos alimenticios y las espinas. Se sugiere que el reducido movimiento de los tubos alimenticios y espinas en organismos expuestos a cobre puede ser originado por una acción directa del Cu sobre el desempeño normal del sistema nervioso, lo que vincula la poca extensión y sensibilidad de los tubos alimenticios, dificultando la colecta de los sustratos del medio. En larvas plateus de *Arbacia lixula* se ha encontrado alteraciones en los niveles de neurotransmisores y defectos en la esqueletogénesis provenientes de embriones previamente expuestos a nanopartículas de óxido de Cu (Capello *et al.*, 2017).

La reducción del índice de cobertura (~10 a 30 %) hacen a estos organismos más vulnerables al ataque de depredadores, ya que en el ambiente, esta especie puede pasar desapercibido colocando sobre su testa una variedad de sustratos disponibles en el entorno (rocas, trozos de corales, macroalgas, conchas de moluscos) (Himmelman, 1986). Se ha demostrado que ambas estrategias de defensa de *L. variegatus* pueden ser alteradas por incrementos en las temperaturas del agua de mar (Brothers y McClintock, 2015).

## CONCLUSIONES

El número total de celomocitos y la viabilidad celular no mostraron variación en organismos expuestos a las concentraciones de cobre.

Las pruebas *in vitro* muestran la sensibilidad que poseen los celomocitos al efecto directo del metal.

La actividad de la lisozima descendió durante el quinto día de exposición y durante el ensayo *in vitro*, haciendo evidente el efecto negativo del cobre sobre su actividad bacteriolítica.

Las membranas de los lisosomas pueden ser desestabilizadas en presencia a las dosis subletales de cobre.

La pérdida de espinas y reducción en los movimientos de tubos alimenticios en erizos expuestos a cobre limita las respuestas de defensas vinculadas con el escape, camuflaje y alimentación.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bastidas, M. 2017. *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 por el título de Licenciado en Bioanálisis.
- Bielmyer, G.; Brix, K.; Capo, T. y Grosell, M. 2005. The effects of metals on embryo-larval and adult life stages of the sea urchin, *Diadema antillarum*. *Aquatic toxicology*, 74(3): 254-263.
- Birkeland, C. 1989. The influence of echinoderms on coral reef communities. En: *Echinoderm Studies*. Jangoux, M. y Lawrence, J.M. (Eds.). Balkema, Rotterdam, Brookfield, United State of American. Págs.1-79.
- Brothers, C. y McClintock, J. 2015. The effects of climate-induced elevated seawater temperature on the covering behavior, righting response, and Aristotle's lantern reflex of the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 467: 33-38.
- Cappello T.; Vitale, V.; Oliva, S.; Villari, V.; Mauceri, A.; Fasulo, S. y Maisano, M. 2017. Alteration of neurotransmission and skeletogenesis in sea urchin *Arbacia lixula* embryos exposed to copper oxide nanoparticles. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* (en prensa).
- Chang, M.; Wang, W.; Wang, A.; Tian, T.; Wang, P.; Zheng, Y. y Liu, Y. 2009. Effects of cadmium of respiratory burst, intracellular  $Ca^{+2}$  and DNA damage in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 149: 581-586.
- Cheung, C.; Siu, W.; Richardson, B.; De Luca-Abbott, S. y Lam, P. 2004. Antioxidant responses to benzo[a]pyrene and Aroclor 1254 exposure in the green lipped mussel *Perna viridis*. *Environmental Pollution*, 128: 393-403.
- Cooper, E.; Raptos, D. y Zhang, Z. 1995. Purification characterization 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. e Izzetoglu, S. 2015. Morphological and ultrastructural characterization of sea urchin immune cells. *Journal of Morphology*. 2-4.
- Eisler, R. 1981. *Trace metal concentrations in marine organism*. Pergamon Press. New York.

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. y Matranga, V. 2012. Toxicity of metal oxide nanoparticles in immune cells of the sea urchin. *Marine Environmental Research*, 76: 114-121.

Fernández, N. y Beiras, R. 2001. Combined toxicity of dissolved mercury with copper, lead and cadmium on embryogenesis and early larval growth of the *Paracentrotus lividus* sea-urchin. *Ecotoxicology*, 10(5): 263-271.

Figuroa, D. 2002. *Zooplankton de formaciones coralinas: composición y distribución espacial de los ambientes neríticos*. Trabajo de Grado. Universidad de Oriente. Cumaná.

Figuroa, T. 2009. *Caracterización molecular de la expresión del gen de la metalotioneína en el Erizo Antártico (Sterechinus neumayeri)*. Tesis entregada como un requerimiento para obtener el título de Biólogo Marino en la Facultad de Ciencias, Universidad de Magallanes, Punta Arenas, Chile.

Fridovich, I. 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. *Journal of Experimental Biology*, 201: 1203- 1209.

Gómez, A. 1999. *Los recursos marinos renovables del Estado Nueva Esparta, Venezuela*. Biología y pesca de las especies comerciales. Invertebrados y algas. Organización Gráficas Capriles, Caracas.

Gore, S.; Lewbart, G.; Larry, C.; Law, J; Britt, K. 2003. The effects of copper sulfate on the purple sea urchin, *Arbacia punctulata*. En: *International Association for Aquatic Animal Medicine*, 34: 111-112.

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 Venables, B. 1994. Chemical toxicity and host defense in earthworms. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 712(1): 280-300.

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.

Himmelman, J. 1986. Population biology of green sea urchin on rocky barrens.

*Marine Ecology Progress Series*, 3: 295-306.

Jing, M.; Song, W. y Liu, R. 2016. Binding of copper to lysozyme: Spectroscopic, isothermal titration calorimetry and molecular docking studies. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 164, 103-109.

Jolles, P., y Jolles, J. 1984. What's new in lysozyme research?. *Molecular and cellular biochemistry*, 63(2): 165-189.

Keesing, J. y Hall, K. 1998. Review of harvests and status of word sea urchin fisheries points to opportunities for aquaculture. *Journal Shellfish Research*, 17(5): 1597-1604.

King, C. y Riddle, M. 2001. Effects of metal contaminants on the development of the common Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri* and comparisons of sensitivity with tropical and temperate echinoids. *Marine Ecology Progress Series*, 215: 143-154.

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

Lodeiros, C. y García, N. 2004. The use of sea urchins to control "fouling" during suspended culture of bivalves. *Aquaculture*, 231: 293-298.

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

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

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. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 59: 22-28.

Martínez, G. 2002. Metales pesados en sedimentos superficiales del Golfo de Cariaco, Venezuela. *Boletín del Instituto Oceanográfico*. Universidad de Oriente. Venezuela, 41(1-2): 83-96.

Matranga, V.; Bonaventura, R. y Di Bella, G. 2002. Hsp70 as a stress marker of sea urchin coelomocytes in short term cultures. *Cellular and Molecular Biology*.

48:345–59.

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.

Matranga, V.; Pinsino, A.; Celi, M.; Natoli, A.; Bonaventura, R. y Schröder, H. 2005. En: *Echinodermata*. Monitoring chemical and physical stress using sea urchin immune cells. Matranga V. (ed). Berlin, Heidelberg: Springer. Págs. 85-110.

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.

Millott, N. 1996. The recovering reaction of sea-urchins. *Journal of Experimental Biology*, 33(3),508-523.

Moore, M. 1985. Cellular responses to pollutants. *Marine Pollution Bulletin*, 16: 134-139.

Naranjo, C. 2012. *Efectos del cadmio sobre las respuestas 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 en Biología Aplicada. Universidad de Oriente.

Nascimento, E. 2006. En: *Ecotoxicología acuática: Princípios e aplicações*. Mecanismos bioquímicos dos agentes químicos: biotransformação. Zagatto, P, y Bertolotti, E. (eds). Rima Editora, Sao Pablo, Brasil.

Neira, R. y Cantera, J. 2005. Composición taxonómica y distribución de las asociaciones de equinodermos en los ecosistemas litorales del Pacífico Colombiano. *Revista de Biología Tropical*, 53(3): 195-206.

Nicholson, S. 2003. Lisosomal membrane, phagocytosis and tolerance to emersion in the mussel *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae) following exposure to acute, sublethal, copper. *Chemosphere*, 52: 1147-1151.

Nicholson, S. y Lam, P. 2005. Pollution monitoring in Southeast Asia using biomarkers in the mytilid mussel *Perna viridis* (Mytilidae: Bivalvia). *Environment International*, 31(1), 121-132.

Nott, J. y Moore, M. 1987. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on molluscan lysosomes and endoplasmic reticulum. *The Histochemical Journal*, 19(6-7): 357-368.

Nusetti, O. 2004. Respuestas inmunológicas y de enzimas antioxidantes en la ostra perla *Pinctada imbricata* (Mollusca: *Pteridae*) expuesta a niveles subletales de fuel oil n<sup>o</sup> 6. *Interciencia*, 29(6): 324-328.

Nusetti, O.; Salazar-Lugo, R.; Rodríguez-Grau, J. Y Vilas J. 1998. Immune and biochemical responses of the polychaete *Eurythoe complanata* exposed to sublethal concentrations of copper. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 119C: 177-183.

Pagliara, P. y Stabili, L. 2012. Zinc effect on the sea urchin *Paracentrotus lividus* immunological competence. *Chemosphere*, 89(5): 563-568.

Pinsino, A. y Matranga, V. 2015. Sea urchin immune cells as sentinels of environmental stress. *Developmental and Comparative Immunology*, 49(1), 198-205.

Pipe, R.; Coles, F. y Ramanathan, K. 1999. Copper induced immunomodulation in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology*, 46: 43-54.

Powell, M.; Jones, W.; Gibbs, V.; Hammer, H., Lawrence, J.; Fox, J.; Lawrence A. y Watts, S. 2010. Dietary Copper Affects Survival, Growth, and Reproduction in the Sea Urchin *Lytechinus variegatus*. *Journal of Shellfish Research*, 29 (4): 1043-1049.

Pruell, R. y Quinn, J. 1988. Accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in crankcase oil. *Environmental pollution*, 49(2): 89-97.

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

Rubio, B.; Gago, L.; Vilas, F.; Nombela, M.; García-Gil, S.; Alejo, I. y Pazos, O. 1996. Interpretación de tendencias históricas de contaminación por metales pesados en testigos de sedimentos de la Ría de Pontevedra. *Thalassas*, 12: 137-152.

Salazar, R. 1993. *Efectos de dosis subletales de cobre sobre el sistema inmunitario, metabolismo y crecimiento de poliqueto Eurythoe complanata (Annelida: Amphinomidae)*. Tesis M.Sc. Ciencias Marinas. Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.

Sanders, B., y Martin, L. 1994. Copper inhibits the induction of stress protein synthesis by elevated temperatures in embryos of the sea urchin *Strongylocentrus purpuratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 109(3): 295-307.

- Sauvé, S.; Brousseau, P.; Pellerin, J.; Morin, Y.; Senécal, L.; Goudreau, P. y Fournier, M. 2002. Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: *in vitro* exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). *Aquatic toxicology*, 58(3): 189-200.
- 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.
- Shugar, D. 1952. Measurement of lysozyme activity and ultraviolet in activation of lysosyme. *Biochimica et Biophysica Acta*, 8: 302-309.
- 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.
- Sokal, R. y Rohlf, J. 1981 .*Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Reasearch*. Segunda edición. WH Freeman. New York.
- Tarima, K.; Machado, 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(5): 1413–1423.
- United State Environmental Protection Agency (USEPA). 1993. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. Fourth edition. Weber, C. (ed). Environmental Monitoring Systems Laboratory, Cincinnati, OH, Office of Research and Development. Pág. 293.
- Vargas, A.; Blanco, Y. y Salazar-Lugo, R. 2012. Efecto del cobre y del cadmio sobre la respuesta inmune innata del pez *Colossoma macropomum*. *Review Toxicology*, 29(1): 10-14.
- Velazquez, T. 2017. *Respuestas citotóxicas y genotóxicas del erizo de mar Lytechinus variegatus utilizando la fracción acuosa de aceites usados de motores de botes*. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología. Universidad de Oriente.
- Volterra, L. y Conti, M. 2000. Algae as biomarkers, bioaccumulators and toxin producers. *International Journal Environment and Pollution*, 13:92-125.
- 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.

Week, J.; Sharp, V. y Williams, T. 1997. Contaminant-induced lysosomal membrane damage in blood cells of green mussel *Perna viridis* (Mytilidae): a field transplant study. Technical Report WC/97/64.DFID-TDR Project R6191. Land-derived contaminant influx to Jakarta Bay, *Indonesia*, 2: 1-30.

Zapata-Vívenes , E., Marcano, L y Acosta, V. 2017. Respuestas inmunológicas, estabilidad lisosomal y frecuencia de micronúcleos en *Eurythoe complanata* (Polychaeta: Amphinomidae) expuestos a una fracción acuosa de lubricantes usados de motores de automóviles. *Revista Internacional de Contaminación ambiental*, 33 (3): 1-12.

Zapata-Vívenes, E.; Nusetti, O.; Marcano, L.; Esclapés, M. y Arredondo, L. 2005. Immunological responses and wound healing in the polychaete *Eurythoe* (Annelida: Amphinomidae) exposed to copper. *Ciencias Marinas*, 31: 1-9.

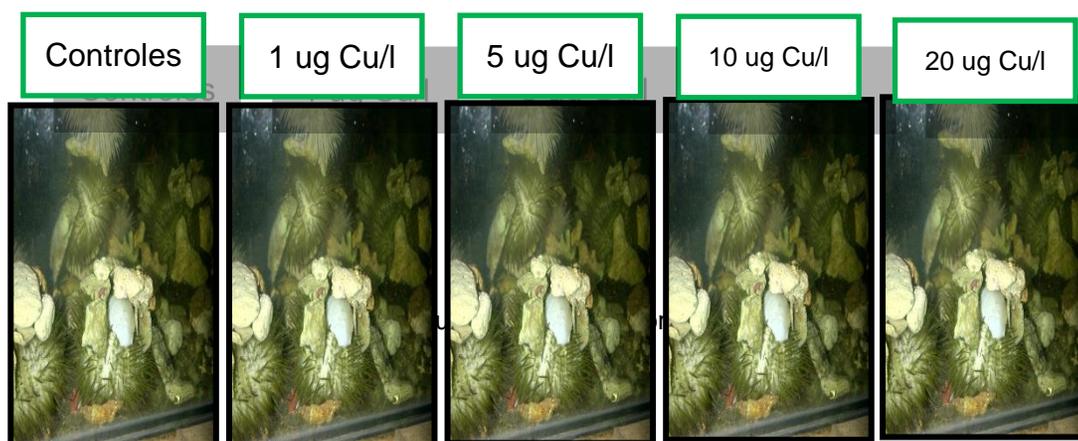
Zapata-Vívenes, E.; Rojas, L.; Sánchez, G. y Barreto, M. 2012. Heavy metals and related biomarkers in *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae) collected on the coast of Sucre State, Venezuela. *Ciencias Marinas*, 38(3): 517–528.

Zhao, T.; Zhang, Z.; Rong, Z. y Xu, Y. 2011. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature*, 474(7350), 212-215.

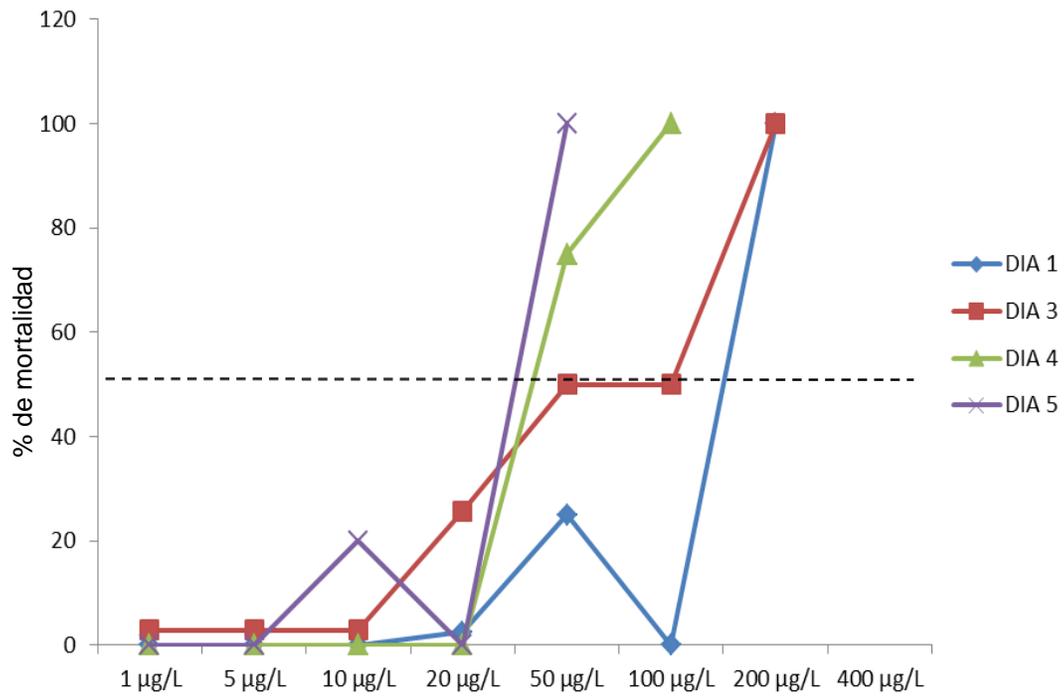
## APÉNDICES



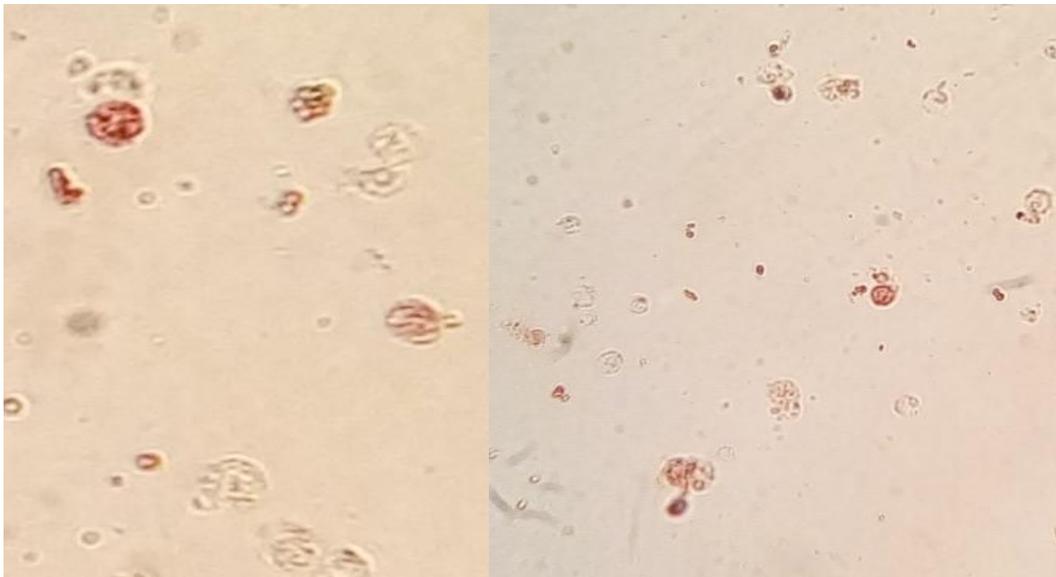
Apéndice 1. Fotografía de la Ensenada de Turpialito. Lugar donde se colectaron los ejemplares de *L. variegatus*.



Apéndice 2. Esquema representativo de los acuarios utilizados en el laboratorio para la exposición *in vivo* al cobre de los erizos.



Apéndice 3. Gráfica de la mortalidad de los erizos expuestos a cobre.



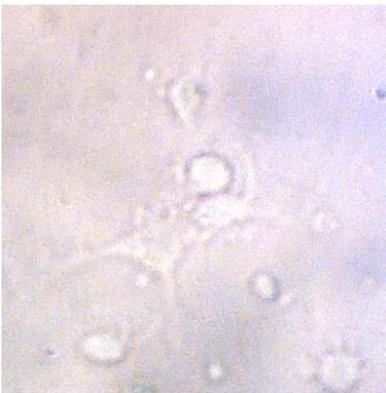
Apéndice 4. Celomocitos teñidos con rojo neutro (*in vitro*).



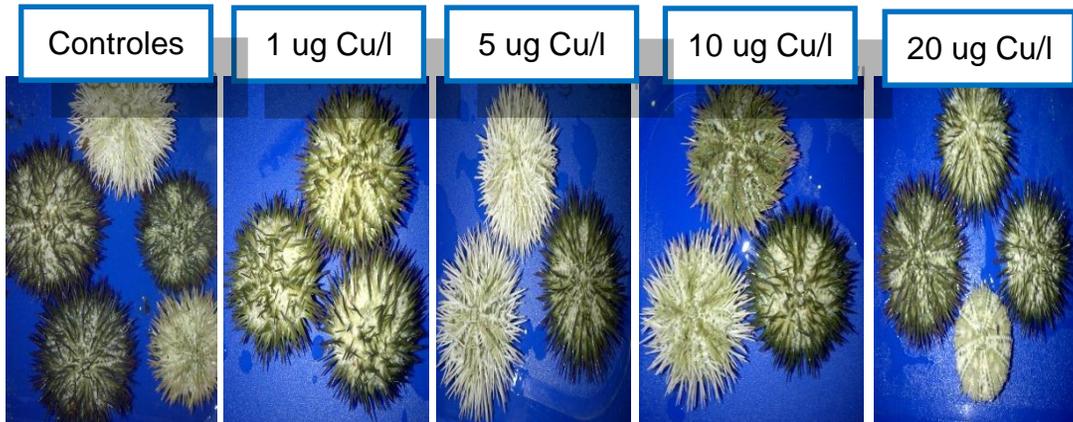
Apéndice 5. Esférulas incoloras vistas al microscopio óptico, 400X.



Apéndice 6. Esférula roja o coloreada vista al microscopio óptico, 400X



Apéndice 7. Célula fagocítica observada en microscopio óptico con objetivo de 400 X.



Apéndice 8. Cambios físicos apreciables en organismos expuestos a cobre durante tres días. De izquierda a derecha se observan: organismos controles, organismos expuestos a 1 ug/l, a 5 ug/l, a 10 ug/l y los expuestos a 20 ug/l, respectivamente.



Apéndice 9. Pérdida parcial y total de las espinas de organismos expuestos a 20 ug Cu/l, durante cinco días.



Apéndice 10. Posición inicial para determinar el tiempo de volteo o enderezamiento.



Apéndice 11. *L. variegatus* cubiertos con sustratos proporcionados en acuario dentro del laboratorio, para determinar el índice o porcentaje de cobertura.

## HOJAS DE METADATOS

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

<b>Título</b>	"RESPUESTAS INMUNOLÓGICAS Y ESTABILIDAD DE LAS MEMBRANAS LISOSOMALES EN EL ERIZO VERDI-BLANCO <i>Lytechinus variegatus</i> (ECHINOIDEA: TOXOPNEUSTIDAE) EXPUESTO A COBRE"
<b>Subtítulo</b>	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Raposo R, Deinis del V.	CVL AC	19 980 358
	e- mail	deinisraposo@gmail.com
	e- mail	
	CVL AC	
	e- mail	
	e- mail	

Palabras o frases claves:

Cobre, erizos de mar, celomocitos, fagocitosis, lisozimas, daño lisosomal
---

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

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Bioanálisis

Resumen (abstract):

### Resumen

Con el propósito de conocer la vulnerabilidad del sistema inmunológico del erizo verdi-blanco *Lytechinus variegatus* al cobre, durante tres y cinco días, se procedió bajo condiciones controladas en el laboratorio a determinar parámetros celomocitarios (viabilidad, número total y diferencial de células), capacidad fagocítica, actividad de lisozimas y estabilidad de las membranas lisosomales en los celomocitos de organismos expuestos a concentraciones crecientes de 0, 1, 5, 10 y 20  $\mu\text{g Cu/l}$ . Adicionalmente, se comparó el comportamiento y la capacidad de cobertura de la testa en organismos controles y los contaminados por el metal. Se utilizó como ensayo de toxicidad referencial una incubación *in vitro*, durante cuatro horas, de celomocitos a las mismas concentraciones de cobre. El número total de celomocitos en los organismos experimentales no presentó alteraciones, sin embargo se observó una disminución cercana al 70 % de celomocitos viables durante la exposición al cobre *in vitro*. Se apreciaron cambios en la proporción de los tipos de celomocitos, disminución en la actividad de la lisozima y daño en las membranas de los lisosomas en organismos expuestos a las concentraciones de 10 a 20  $\mu\text{g Cu/l}$  durante el quinto día. En un 20 a 50 % de este mismo grupo de animales experimentales se presentaron síntomas externos tales como pérdidas de espinas, reducidos movimientos en sus tubos alimenticios, respuestas a algunos estímulos externos y capacidad de recubrimiento de su testa. Los resultados demuestran la sensibilidad que presenta el sistema inmunológico en presencia del cobre y su repercusión sobre el comportamiento natural y estrategias miméticas de *Lytechinus variegatus*, lo cual puede tener efectos adversos sobre la sobrevivencia de los organismos en su ambiente natural.

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

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Zapata, Edgar	ROL	CA <input type="checkbox"/> A <input checked="" type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	12269219
	e-mail	ezapatavivenes@gmail.com
	e-mail	
Acosta, Vanessa	ROL	CA <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	11376304
	e-mail	
	e-mail	
Guevara, Miguel	ROL	CA <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	9284641
	e-mail	
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2017	10	26

Lenguaje: SPA

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

Archivo(s):

<b>Nombre de archivo</b>	<b>Tipo MIME</b>
Tesis_RAPOSOD.doc	Application/word

Alcance:

**Espacial:** NACIONAL

**Temporal:** TEMPORAL

**Título o Grado asociado con el trabajo:** Licenciada en Bioanálisis

---

**Nivel Asociado con el Trabajo:** Licenciada

---

**Área de Estudio:** Ciencias

---

**Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:** Universidad de Oriente

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



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
CONSEJO UNIVERSITARIO  
RECTORADO

CUN°0975

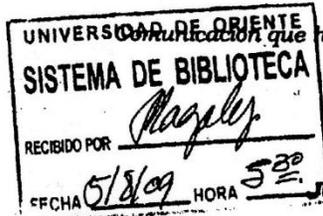
Cumaná, 04 AGO 2009

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

Estimado Profesor Martínez:

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

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



Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

**JUAN A. BOLANOS CUNDELE**  
Secretario



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

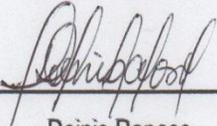
JABC/YGC/manuja

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

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso- 6/6

### 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".



---

Deinis Raposo

**Autor**



---

Edgar Zapata

**Asesor**