DEFENSAS ANTIOXIDANTES Y SUSTRATOS ENERGÉTICOS DURANTE EL DESARROLLO GONADAL DEL ERIZO NEGRO *Echinometra lucunter*

Edgar Zapata-Vívenes[*1,5], Arzola Kristel[1], Reyes-Luján Jeny[2], Dwigth Arrieche [3], Guevara Miguel[4] & Marcano Leida[1]

[1] *Departamento de Biología*, *Escuela de Ciencias*, *Núcleo de Sucre*, *Universidad de Oriente*, *Cumaná*, *Venezuela*
[*]*E-mail*: *ezapatavivenes@gmail.com*

[2] *Laboratorio de Zoología de Invertebrados*, *Facultad Experimental de Ciencias*, *Universidad del Zulia*, *Maracaibo*,*Venezuela*

[3] *Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas*, *Dra*. *Susan Tai*, *Cumaná*,*Universidad de Oriente*, *Venezuela*

[4] *Laboratorio de Acuicultura*. *Instituto Oceanografico de Venezuela*

[5] *Escuela de Acuicultura y Pesca*, *Facultad de Ciencias Veterinarias*, *Universidad Técnica de Manabí*, *Bahía de Caráquez*, *Manabí*, *Ecuador*

RESUMEN: Se determinó el contenido de sustancias antioxidantes (glutatión reducido -GSH, tioles totales -SH, actividad de catalasa), peroxidación lípidica (TBARS) y sustratos energéticos endógenos (proteínas, carbohidratos y lípidos) en el erizo negro *Echinometra lucunter*, en ambos sexos y estadíos de desarrollo gonadal (inmaduro, pre-maduro, maduro, parcialmente desovado y desovado). Los organismos fueron colectados en la Ensenada de Turpialito (golfo de Cariaco, Venezuela). En ambos sexos, incrementaron los contenidos de GSH, -SH, -CAT y TBARS en los estadíos gonadales de mayor producción de gametos, conllevando a una condición de estrés oxidativo. Las reservas energéticas del erizo negro (proteínas, carbohidratos y lípidos) fluctuaron según el desarrollo gonadal con diferencias entre los estadíos reproductivos, con valores máximos en los estadíos pre-maduro y maduro; entre sexos se detectaron diferencias significativas de los lípidos totales sólo en el estadío pre-maduro. El estrés oxidativo evidenciado por el daño en los lípidos durante la producción de gametos es compensado con el incremento de las defensas antioxidantes. *E*. *lucunter* presentó variaciones en los niveles de defensas antioxidantes y en la composición bioquímica a medida que cambian su estatus reproductivo, y en ciertas ocasiones el sexo es influyente.

Palabras claves: catalasa, gónadas, peroxidación lípidos, estrés oxidativo, tioles.

ABSTRACT: The values of antioxidant substances (glutathione reduced -GSH, total thiols -SH, catalase activity -CAT); lipid peroxidation (TBARS); and endogenous energetic substrates (protein, carbohydrate and lipid) increased in the black sea urchins *Echinometra lucunter* during the reproductive stages of high gamete production; bearing to a condition of oxidative stress, in samples collected at Turpialito Bay. The analysis made in both sexes and in different reproductive stages (immature, pre-mature, mature, partially spawned and spawned) showed that the energetic substrates oscillate depending on the gonadal development among the reproductive stages, having high values in pre-mature and mature stages. The total lipids presented statistical differences in the pre-mature stage. The oxidative stress was evidenced by lipid damage during the gamete productions and adjusted with an increment of antioxidant defenses. The variations of antioxidant defense levels and biochemical composition were related to the changes of the reproductive status, and in certain occasion to the gender.

Key words: catalase, gonad, lipid peroxidation, oxidative stress, thiols.

INTRODUCCIÓN

Echinometra lucunter (Linnaeus, 1758) es un erizo frecuentemente encontrado en la costa nororiental de Venezuela (Espinoza *et al*. 2008). Esta especie ha sido considerada un potencial recurso para el consumo y explotación pesquera, ya que tiene la capacidad de alcanzar la madurez de sus gónadas en cortos períodos de tiempo, presentar un rápido crecimiento y factibilidad de mantenimiento en cautiverio (Lodeiros & Buitrago 2011; Lodeiros *et al*. 2013).

Durante el ciclo gametogénico de los erizos, ocurren cambios en la composición celular del epitelio germinal de ambos sexos, observándose numerosas inclusiones almacenadoras de nutrientes tales como gotas de lípidos y glomérulos enriquecidos en proteínas y carbohidratos (Unuma *et al*. 2003; Walker *et al*. 2007; Walker *et al*. 2013). La acumulación y utilización de estos sustratos energéticos están moduladas por factores exógenos tales como la calidad y disponibilidad del alimento, estacionalidad, temperatura, localización geográfica,

y factores endógenos como el crecimiento somático y ciclo reproductivo (Montero-Torreiro & García-Martínez 2003; Soumaya *et al*. 2012).

La gametogénesis en *E. lucunter* demanda energía para procesos anabólicos, con incremento del catabolismo oxidativo de sustratos energéticos, que puede originar una producción excesiva de especies reactivas del oxígeno (ERO) (Abele & Puntarulo 2004). Estos oxiradicales pueden condicionar daños oxidativos en los lípidos de las membranas biológicas (lipoperoxidación), formando malondialdehido (MDA) como consecuencia del desequilibrio entre las sustancias pro-oxidantes y los mecanismos de las defensas antioxidantes celulares (Halliwell & Gutteridge 1999). El control de los niveles fisiológicos de ERO y peróxidos se encuentra a cargo de sustancias antioxidantes no enzimáticas como el glutatión reducido (GSH) y moléculas ricas en grupos sulfhidrilos (-SH) y enzimáticas (superóxido dismutasa, glutatión reductasa, glutatión peroxidasa y catalasa).

Las variaciones en la producción de ERO y algunas defensas antioxidantes durante el ciclo reproductivo han sido estudiadas en especies de erizos que habitan la región sub-Antártica (Malanga *et al*. 2009; Pérez *et al*. 2011). Sin embargo, aspectos similares no se han revisado en erizos de zonas tropicales, y en especial en el sureste del Mar Caribe. En esta investigación se evalúo la variación en la concentración de sustancias antioxidantes (GSH, –SH totales y actividad de catalasa), lípidos peroxidados y de los sustratos energéticos (lípidos, proteínas y carbohidratos) en los estadíos de madurez gonadal en ambos sexos, de una población del erizo negro *E. lucunter* presente en la región nororiental de Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de ejemplares: doscientos ejemplares con un diámetro de testa de 44,0 ±10,70 mm y altura de 27,0 ±8,0 mm se colectaron por buceo libre entre junio y agosto de 2013, en la zona coralina de la ensenada de Turpialito (10º26'56"N, 64º02'00"W), costa sur del Golfo de Cariaco, Venezuela. Se seleccionaron veinte ejemplares, por sexo y estadío, para realizar análisis histológicos y sus respectivas las determinaciones bioquímicos.

Estadios gonadales: los ejemplares fueron disecados y por examen macroscópico se reconoció el sexo y cualitativamente los estadíos de madurez gonadal: reserva (I), pre-maduro (II), maduro (III), desove parcial (IV) y desove (V) (Montealegre & Gómez 2004). Una porción de las gónadas obtenidas fue fijada para confirmar el sexo y el estadio de madurez sexual por métodos histológicos, usando la coloración de Hematoxilina-Eosina. Otra porción de la gónada fue almacenada a -40 °C para los análisis bioquímicos.

Sustancias antioxidantes: Se homogeneizó 100 mg de gónada en buffer fosfato (BFP; KH_2PO_4/K_2HPO_4) 100 mmol/l (1 ml), pH 7,5 ácido metil-fenil sulfóxido (PMSF) 100 mmol/l (10 µl), se centrifugó a 3000 *g* por 15 min y se recolectó el sobrenadante.

Grupos sulfhidrilos totales: se determinaron por el método de Ellman (1959) con una mezcla de reacción de ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB) (500 µl), agua destilada (250 µl), buffer Tris-HCl 50 mmol/l (200 µl) y 50 µl de la muestra. Se incubó a temperatura ambiente en la oscuridad (10 min) y se midió la absorbancia a 412 nm. Se utilizó glutatión reducido (3 mmol/l) como estándar. *Glutatión reducido (GSH)*: se cuantificó por el método Bioxytech ® GSH-400 (Dolphin *et al*. 1989), basado en las reacciones de formación de productos de sustitución (tioéteres) entre el 4-cloro-1-metil-7-trifluorometil-quinolina metilsulfato y los mercaptanos (-SH); y en la segunda reacción en medio alcalino (NaOH 30%), se transforma el conjugado GSH-tioéter en una tiona cromogénica con absorbancia máxima a 400 nm. *Catalasa*: la gónada se homogenizó en una relación 1:9 m/v con buffer de hidroxymetilamina (Tris-HCl) a 20 mmol/l pH 7,6; el cual contenía a su vez ácido etilendiamino-tetracetato (EDTA) 1 mmol/l, ditiotreitol (DDT) 1 mmol/l, sacarosa 500 mmol/l, cloruro de potasio (KCl) 150 mmol/l y ácido metil-fenil sulfóxido (PMSF) 100 mmol/l, fue centrifugado a 2000 *g* por 10 min (4ºC); el sobrenadante se centrifugó a 10.000 *g* durante 20 min (4ºC). La actividad de catalasa (E.C: 1. 11. 1. 6) fue determinada por el descenso de la concentración de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a 240 nm y 25,0 ± 1ºC (Coef. Ext. 40 $M^{-1}cm^{-1}$, según Aebi 1984).

Peroxidación de lípidos: fue estimada por el método de análisis de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) en Viarengo *et al*. 1991. La gónada se homogenizó a una proporción 0,1 g/ml en BFP 100 mmol/l pH 7,5; posteriormente fue centrifugada a 2200 rpm por 15 min. Del sobrenadante se tomaron 250 µl y se colocaron en baño de agua a 37 ºC por 15 min, se adicionaron 250 µl de ácido tricloroacético (TCA; 12,5%) y ácido clorhídrico 1 mol/l en baño de hielo; se añadió 500 µl de ácido tiobarbitúrico (1%).

Se agitaron los tubos constantemente en baño de agua a 90°C por 1 h. Posteriormente fueron centrifugados a 4400 rpm por 10 min. La absorbancia fue medida a 532 nm. La concentración de TBARS se calculó usando 1,1,3,3-tetraetoxipropano como estándar.

Sustratos energéticos: *Proteínas*: se determinaron por el método de Biuret (Robinson & Hogden 1940). Las gónadas fueron homogenizadas 1:9 m/v en NaCl 0,9%, y centrifugadas a 1000 rpm por 10 min. Se tomó el sobrenadante y se realizó una curva patrón usando albumina de suero bovino y se midió la absorbancia a 540 nm. *Carbohidratos*: la extracción de carbohidratos totales se realizó por el método de Van Handel (1965). Se homogenizó la gónada (0,1 g/ml) en NaCl 0,9%, luego fue digerido en KOH (60%), se calentó en baño de agua hirviendo durante 20 min. Se añadió sulfato de sodio y alcohol etílico 95%; se centrifugó durante 15 min a 5000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se disolvió el precipitado en TCA frío al 10%., se centrifugó a 5000 rpm por 15 min, y al sobrenadante se agregó 1 ml de etanol (95%). La muestra se sometió a ebullición para luego centrifugar a 5000 rpm por 15 min; el precipitado se resuspendió en agua destilada. La cuantificación se realizó a través de la reacción de Antrona a una absorbancia a 620 nm. Se usó como patrón de referencia glucosa anhidra (10 mg/ml). *Lípidos*: la extracción se realizó por el método de Bligh & Dyer (1959). Se homogenizaron 100 mg de gónada con 0,3 ml de una mezcla cloroformo:metanol (2:1 v/v), y se dejó reposar por 30 min. Se procedió al lavado de la muestra con 1 ml solución salina 0,05 mol/l y se dejó reposar durante 15 min. Luego, se centrifugó a 3000 rpm por 10 min. Se determinó el contenido de lípidos totales de forma gravimétrica.

Análisis estadísticos: los parámetros bioquímicos fueron analizados utilizando un ANOVA doble factor (sexo y estadíos reproductivos) usando el paquete estadístico Statgraphic Plus versión 5.1 en ambiente Windows. Para el contraste *a posteriori* se utilizó la prueba de Bonferroni con un nivel de significancia de $p < 0,05$ (Sokal & Rohlf 1981).

RESULTADOS

Glutatión (GSH) y grupos sulfhidrilos (-SH): GSH mostró diferencias significativas entre los estadíos reproductivos ($Fs_{estadío}=3,37$; $p<0,05$), sin embargo no existió diferencias entre machos y hembras ($Fs_{sexo}=0,99$ $p>0,05$) ni interacción significativa entre ambos factores ($Fs_{Interacción}=0,22$ $p>0,05$). Los mayores promedios de GSH fueron encontrados en los organismos maduros y parcialmente maduros. Los niveles de -SH hallados son notoriamente mayores en los estadíos donde existe formación de gametos (pre-maduro y maduro) y en organismos parcialmente desovados ($Fs_{estadío}=8,16$ $p<0,05$). No se encontró significancia entre los sexos ni interacción estadística entre factores ($Fs_{sexo}=0,46$ $p>0,05$ y $Fs_{Interacción}=0,16$ $p>0,05$). Los menores promedios de -SH fueron observados en los organismos en estadío de reserva y totalmente desovados (Tabla 1).

Catalasa (CAT) y peroxidación de lípidos (TBARS): CAT mostró diferencias significativas entre los estadíos reproductivos ($Fs_{estadío}=8,88$ $p<0,05$) y ambos sexos ($Fs_{sexo}=8,10$ $p<0,05$); no así se halló interacción entre los factores estadío-sexo ($Fs_{Interacción}=2,20$ $p>0,05$). La mayor actividad se obtuvo en los organismos maduros y en machos parcialmente desovados. Las TBARS variaron significativamente entre los estadíos reproductivos ($Fs_{estadío}=50,58$ $p<0,05$), pero no entre los sexos ($Fs_{sexo}=3,89$ $p>0,05$). A su vez no se encontró significancia estadística en la interacción estadío-sexo ($Fs_{Interacción}=1,36$ $p<0,05$). Se observaron incrementos de las TBARS desde los estadíos pre-maduros hasta los organismos parcialmente desovados, con una máxima lipoperoxidación en los organismos maduros (Tabla 1).

Sustratos energéticos: En todos los estadíos reproductivos, las proteínas se presenta con las mayores concentraciones con respecto a carbohidratos y lípidos. Los niveles de proteínas mostraron diferencias significativas en relación los estadíos reproductivos ($Fs_{estadío}=17.16$ $p<0,001$), no así para los sexos e interacción entre factores ($Fs_{sexo}=0,52$ $p>0,05$; $Fs_{Interacción}=0,50$ $p>0,05$). Los mayores promedios de proteínas fueron hallados en los estadíos maduros y parcialmente desovados, seguidos de los organismos pre-maduros (Tabla 2). Al igual que en proteínas, los niveles de carbohidratos estimados mostraron diferencias significativas en relación los estadíos reproductivos ($Fs_{estadío}=7,27$ $p<0,05$); no se encontró diferencias significativas entre los sexos e interacción entre factores ($Fs_{sexo}=0,86$ $p>0,05$; $Fs_{Interacción}=0,07$ $p>0,05$) (Tabla 2). Los mayores promedios de carbohidratos fueron encontrados en los organismos maduros. Los niveles de carbohidratos ascendieron sustancialmente con respecto al contenido de lípidos en el estadío maduro. Los lípidos totales mostraron diferencias entre los estadíos reproductivos ($Fs_{estadío}=6,10$ $p<0,05$), encontrándose

incrementados en los estadíos de reserva, pre-maduros y desovados (Tabla 2). La mayor concentración de lípidos fue encontrada en machos pre-maduros en contraste a las hembras del mismo estadío (Fs_{sexo}=7,22 p<0,05); ambos factores muestran interacción estadísticamente significativa ($Fs_{Interacción}$=6,07 p<0,05).

DISCUSION

En ambos sexos de *E. lucunter* fue evidenciado incrementos en la concentración de GSH, actividad de la catalasa y lipoperoxidación (LPO) en las etapas de total madurez sexual. Los hallazgos sugieren la activación del sistema de defensas antioxidantes como requerimiento fisiológico contra generación de especies reactivas del oxígeno (ERO), que se producen durante los eventos de maduración gonadal. En la maduración del tejido germinal en *E. lucunter* se genera una condición de daño oxidativo en los lípidos, que suscita a la elevación de las defensas antioxidantes como mecanismo de ajuste ante la sobreproducción de ERO, posiblemente inducido por un incremento de la actividad metabólica necesarias para los procesos reproductivos.

Los niveles de glutatión reducido (GSH) tienden a incrementar a medida que se desarrollan las gónadas de *E. lucunter*. En los organismos marinos, GSH es protagonista en la destrucción de intermediarios de ERO, cumpliendo múltiples funciones en el mantenimiento del balance redox (Halliwell & Gutteridge 1999). GSH participa como coenzima para algunas enzimas antioxidantes, interviene en los procesos de desintoxicación de xenobióticos, controla la permeabilidad en el transporte de los aminoácidos y

Tabla 1. Niveles de glutatión reducido (GSH), grupos sulfhidrilos totales (-SH), actividad de catalasa y lípidos peroxidados en gónadas (machos: M y hembras: H) del erizo negro *E. lucunter* durante su desarrollo gonadal. I: Inmaduro; II: Pre-maduración; III: Maduración; IV: Parcialmente desovado; V: desovado. Todas las variables (promedios ± desviación estándar) se relacionan con los gramos de masa húmeda (g).

Estadío	Sexo	GSH (µmoles/g)	-SH (µmoles/g)	CATALASA (U/g)	TBARS(nmoles/g)
I	M	1,24 ± 0,09	8,04 ±1,89	0,38 ± 0,20	16,87 ± 5,43
	H	1,22 ± 0,41	4,27 ± 2,79	0,36 ± 0,15	10,92 ± 4,12
II	M	2,05 ± 0,36	56,81 ±15,72	0,16 ± 0,22	65,94 ± 9,33
	H	1,99 ± 0,28	61,04 ± 28,06	0,15 ± 0,24	54,35 ± 16,29
III	M	7,09 ± 0,29	38,61 ± 18,58	0,98 ± 0,37	116,52 ± 22,76
	H	9,45 ± 0,84	42,60 ± 19,93	0,79 ± 047	117,24 ± 19,43
IV	M	4,50 ± 3,29	56,83 ± 21,50	1,59 ± 1,20	87,77 ± 16,66
	H	2,96 ± 1,52	51,60 ± 15,43	0,60 ± 0,68	75,60 ± 11,51
V	M	1,01 ± 0,75	30,73 ± 5,69	0,47 ± 0,30	16,63 ± 5,90
	H	0,24 ± 0,08	35,67 ± 8,62	0,18 ± 0,10	22,09 ± 13,32

Tabla 2. Niveles de sustratos energéticos (proteínas, carbohidratos y lípidos) en machos (M) y hembras (H) del erizo negro *E. lucunter* durante su desarrollo gonadal: I: Inmaduro; II: Pre-maduración; III: Maduración; IV: Parcialmente desovado; V: Desovado. Los resultados (promedios ± desviación estándar) fueron expresados en miligramos por gramos de masa húmeda (mg/g).

Estadío	Sexo	Proteínas (mg/g)	Carbohidratos(mg/g)	Lípidos (mg/g)
I	M	16,80 ± 7,26	5,05 ±1,60	18,18 ± 4,40
	H	21,98 ± 6,12	5,00 ± 2,17	15,54 ± 3,13
II	M	93,37 ± 20,59	32,05 ±10,29	36,94 ± 27,10
	H	89,03 ± 18,48	20,69 ± 9,92	10,93 ± 4,70
III	M	85,05 ± 28,40	61,30 ± 27,53	11,31 ± 3,26
	H	113,34 ± 71,59	56,23 ± 26,34	10,90 ± 4,15
IV	M	133,44 ± 51,87	30,54 ± 23,57	9,67 ± 3,17
	H	134,39 ± 55,19	23,94 ± 18,23	1019 ± 2,29
V	M	54,24 ± 24,67	16,68 ± 4,78	15,59 ± 3,30
	H	56,16 ± 23,41	7,24 ± 3,46	13,69 ± 3,73

participa en el proceso de síntesis de macromoléculas tales como proteínas, ADN y ARN (Pompella *et al*. 2003). Los promedios de GSH en las hembras en el estadío maduro fueron superiores a los alcanzados de machos. La capacidad del tripéptido GSH de actuar como un potente antioxidante para proteger al ADN en la producción de gametos es conocida, particularmente en la formación de óvulos (Agarwal *et al*. 2005; Wu & Chu 2010) y su posterior desempeño en el desarrollo embrionario (Beaumont 2010).

Los grupos funcionales -SH muestran su disponibilidad en los estadíos de formación de gametos. Los grupos –SH contentivos en diversas proteínas y algunos tioles de baja masa molecular actúan como antioxidantes endógenos y amortiguadores redox, siendo importantes en la homeostasis celular. Uno de esta moléculas es el ovotiol (π-metil-5-tiohistidina), el cual se ha demostrado que incrementa sus niveles en la gametogénesis de los erizos (Palumbo *et al*. 1984). El ovotiol está presentes en ovarios, huevos y fluidos biológicos de erizos, y sirve como un barredor de radicales y peróxido siendo trasformado de la forma reducida a oxidada por el peróxido de hidrógeno (H_2O_2); el mismo es producido durante el cambio oxidativo de la fertilización (Castellano *et al*. 2016). Por otra parte, los -SH presentes en proteínas, por ejemplo en la metalotioneínas, son de gran importancia en las desarrollo de las células germinales, ya que estas biomoléculas almacenan metales esenciales que cumplen roles claves en los procesos enzimáticos u otras demandas metabólicas. Además, las MT pueden participar como secuestradoras de ERO bajo una condición de estrés oxidativo inducida, gracias al elevado contenido de –SH (Zapata-Vívenes & Nusetti 2007).

El incremento de CAT es una señal de la activación del sistema antioxidante en presencia de H_2O_2, especialmente cuando las gónadas han tomado su mayor grado de madurez. La elevada actividad de esta enzima puede estar vinculada con un aumento en la tasa respiratoria mitocondrial como evento obligatorio en la producción de gametos. En adición, las actividades de CAT más elevadas en machos maduros puedan explicarse por la posible sobreproducción de H_2O_2 conllevada por la motilidad espermática. Kazama & Hino (2012) demostraron que los espermatozoides inmovilizados no producen ERO; sin embargo, el H_2O_2 (sustrato de CAT) es generado por los espermatozoides después de la motilidad. Los acinos de los organismos maduros y parcialmente desovados es un compartimiento que mantiene a las agrupaciones espermáticas en constante movimiento, previo a su liberación. Las mitocondrias que motorizan el movimiento del flagelo de espermatozoides pueden originar la formación de ERO (Kazama *et al*. 2006).

No solo en *E. lucunter* se ha demostrado que las defensas antioxidantes pueden variar en relación al sexo del animal. En otros organismos se han reportado una mayor actividad de las enzimas CAT y superóxido dismutasa (SOD) en machos y un elevado contenido de lípidos peroxidados en hembras en el poliplacóforo *Chiton granosus* (Hidalgo *et al*. 2006). La actividad de la enzima GSH peroxidasa (GPx) es más elevada en machos, en contraste a las hembras, en el anfipódo marino *Gammarus locusta* (Correia *et al*. 2003). Beaumont (2010) observó mayores promedios de lipoperoxidación y daños oxidativos a proteínas en hembras del erizo *Evechinus chloroticus*, asociados a un incremento de la producción de H_2O_2. De igual manera, estos autores informan que las defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas son ligeramente mayores en hembras que en machos. Además de esto, existen otros factores que en los erizos puede cambiar su estatus antioxidantes tales como la estacionalidad (Malanga *et al*. 2009), fases reproductivas (Pérez *et al*. 2011) y longevidad de la especie (Du *et al*. 2013), pudiendo generar daños oxidativos significativos en los lípidos de membranas.

En ambos sexos, las proteínas presentaron las mayores concentraciones a lo largo de todo el desarrollo gonadal con respecto a los otros sustratos energéticos, seguido de una alternabilidad entre carbohidratos y lípidos entre los distintos estadíos. La variabilidad en el contenido de todas estas biomoléculas sugiere la necesidad de formación de tejido y la disponibilidad de sustratos energéticos durante la gametogénesis. El desarrollo gametogénico en *E. lucunter* requiere una inversión relativamente alta de sustratos energéticos como los carbohidratos, lípidos y proteínas, en procesos relacionados con la multiplicación y diferenciación de células precursoras de gametos, acumulación y maduración de gametos, desoves y posterior reabsorción de los gametos remanentes (Walker *et al*. 2007). Las proteínas suplen de aminoácidos destinados a la formación de nuevas proteínas o sustancias que posean compuestos nitrogenados como los ácidos nucleicos. Según Unuma *et al*. (2003) la proteína Yolk Mayor (PYM) es abundante en el estadío inmaduro, siendo trasferida desde los fagocitos nutritivos (FN) a las células germinales

diferenciadas, tendiendo a reducir su concentración a medida que el erizo desarrolla sus gónadas.

En *E. lucunter*, el período pre-gametogénico es caracterizado por la recuperación de los fagocitos nutritivos (FN) post-desove y el inicio de la acumulación de sustratos energéticos (Reyes-Lujan *et al*. 2015). En los estadíos pre-maduro y maduro es notorio el incremento de talla gonadal y niveles de proteínas, tanto para hembras como machos. En tales estadíos se hace presente la trasformación de los FN, la formación de gametos, y la utilización de las reservas energéticas. Finalmente, es evidente un decrecimiento gonadal y un agotamiento de los niveles de sustratos energéticos en los organismos totalmente desovados. Al parecer, en erizos no existe un órgano específico de almacenamiento extra-gonadal que se encuentre vinculado con la trasferencia de sustratos energéticos a las células germinales. Se ha considerado al intestino como un sitio de reserva inmediata para el exceso de nutrientes (Walker *et al*. 2007), aunque pareciera que en *E. lucunter*, el centro de almacenamiento por excelencia de los sustratos energéticos vinculados al ciclo reproductivo se encuentra en sus propias gónadas.

Los carbohidratos totales denotan incrementos de sus niveles en los estadíos de mayor madurez gonadal. Estas moléculas son el principal sustrato energético para actividad gametogénica (Torreiro *et al*. 1998; Pérez *et al*. 2011). Los carbohidratos son almacenados en forma de glucógeno, existiendo concentraciones sustanciales con respecto a los lípidos. Adicionalmente, los niveles de lípidos presentaron variaciones en las distintas etapas de desarrollo de *E. lucunter*, siendo mayormente acumulado en el estadío de reserva; a partir de las etapas de formación de gametos sus concentraciones disminuyen con respecto a las otras biomoléculas. En los machos pre-maduros fueron encontrados los mayores promedios de lípidos con respeto a las hembras. La variación de los lípidos gonadales puede deberse a la utilización de tales moléculas para la generación de energía necesaria para la diferenciación en ovocitos y espermatocitos (Walker *et al*. 2007; Marsh *et al*. 2013).

CONCLUSIONES

Los cambios relacionados con la gametogénesis van acompañados de incrementos de las defensas antioxidantes y en los sustratos energéticos. La maduración de gametos lleva consigo una situación de estrés oxidativo y la activación de las defensas antioxidantes. Al parecer, *E. lucunter* presenta variaciones en sus defensas antioxidantes potenciadas a medida que varían sus necesidades reproductivas.

AGRADECIMIENTOS

A la subvención de los proyectos: (1) "*Estatus antioxidante en gónadas y su relación con el ciclo reproductivo en los erizos Echinometra lucunter y Lytechinus variegatus*" No CI 02-030601-1901-14 del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente, Venezuela y (2) "*Evaluación poblacional del erizo Echinometra lucunter y su factibilidad de cultivo en las costas del estado Sucre*, *Venezuela*" PEII, No. 3893 (2012-2014).

REFERENCIAS

Abele, D. & S. Puntarulo. 2004. Formation of reactive species and induction of antioxidant defense systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comp. Biochem. Physiol*. 138: 405-415.

Aebi, H. 1984. Catalase *in vitro*. Methods in enzymology 105: 121-126.

Agarwal, A., S. Gupta & R. Sharma. 2005. Role of oxidative stress in female reproduction. *Rep. Biol. Endocrinol*. 3: 1-21.

Beaumont, T. 2010. The free radical theory of ageing: does it apply to Antarctic and temperate sea urchin? A thesis submitted in fulfilment of the degree of Master of Science- Marine Science. University of Atago. New Zealand.

Bligh, E. & W. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol*. 37: 911–917.

Castellano, I., O. Migliaccio, S. D'Aniello, A. Merlino, A. Napolitano & A. Palumbo 2016. Shedding light on ovothiol biosynthesis in marine metazoans. *Sci. Rep*. 6: 21506.

Correia, A., M. Costa, O. Luis & D. Livingstone 2003. Age-related changes in the antioxidant enzyme activities, fatty acid composition and lipid peroxidation in whole body *Gammarus locusta* (Crustacea: Amphipoda). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol*. 289: 83-101.

Dolphin, D., R. Poulson, & O. Avramovic. 1989. Glutathione: chemical, biochemical and medical aspects. Vol A y B.J. Wiley and sons.

Du, C., A. Anderson, M. Lortie, R. Parsons & A. Bodnar. 2013. Oxidative damage and cellular defense mechanism in sea urchin models of aging. *Free Rad*. *Biol*. *Med*. 63: 254-263.

Ellman, G. 1959. Quantitative determination of peptides by sulfhydryl (-SH) groups. Arch. Biochem. Biophys. 82: 70-77.

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

Halliwell, B. & J. Gutteridge. 1999. Free radicals in biology and medicine. 3th edition. University Press. Oxford.

Hidalgo, M., E. Fernández, A. Cabello, C. Rivas, F. Fontecilla, A. Morales, A. Aguirre & E. Cabrera. 2006. Evaluación de la respuesta antioxidante en *Chiton granosus* Frembly, 1928 (Mollusca: Polyplacophora) a contaminantes oxidativos. *Rev*. *Biol*. *Mar*. *Ocean*. 41: 155-165.

Kalachev, A.V. & O.V. Yurchenko. 2016. Microautophagy in nutritive phagocytes of sea urchins. *Protoplasma* DOI 10.1007/s00709-016-0963-1.

Kazama, M., K. Asami & A. Hino. 2006. Fertilization induced changes in the sea urchin sperm: Mitochondrial deformation and phosphatidylserine exposure. *Mol*. *Reprod*. *Dev*. 73: 1303-1311.

Kazama, M. & A. Hino. 2012. Sea urchin spermatozoa generate at least two reactive oxygen species; the type of reactive oxygen species changes under different condition. *Mol*. *Reprod*. *Develop*. 79: 283-295.

Lodeiros, C. & E. Buitrago E. 2011. Avances en el cultivo de erizos en Venezuela. *Fo*. *Rec*. *Mar*. *Ac*. *Rias Gal*. 13: 173-179.

Lodeiros, C., A. Martín, V. Francisco, N. Noriega, Y. Díaz, J. Reyes, O. Aguilera & J. Alió. 2013. Echinoderms from Venezuela: Scientific Recount, Diversity and Distribution. En: Echinoderm Research and Diversity in Latin America. Alvarado J. y Solís-Marín F. A. (Eds). Springer Heidelberg New York Dordrecht London.

Malanga, G., A. Pérez, J. Calvo & S. Puntarulo. 2009. The effect of seasonality on oxidative metabolism in the sea urchin *Loxechinus albus*. *Mar*. *Biol*. 156: 763-770.

Marsh, A., M. Powell & S. Watts. 2013. Biochemical and energy requirements of gonad development. Sea urchins: biology and ecology (Lawrence J.M, Ed) Elsevier B.V.

Montealegre, S. & A. Gómez. 2004. Ciclo reproductivo de *Lytechinus variegatus* (Echinoidea: Toxopneustidae) en el sur de la Isla de Margarita, Venezuela. *Rev*. *Biol*. *Trop*. 53: 305-312.

Montero-Torreiro, M. & P. García-Martínez. 2003. Seasonal changes in the biochemical composition of body components of the sea urchin, *Paracentrotus lividus*, in Lorbé (Galicia, north-western Spain). *J*. *Mar*. *Biol*. *Assoc*. *UK*. 83: 575-581.

Palumbo A, Misuraca G, d' Ischia M, Donaudy F, Prota G. 1984. Isolation and distribution of 1-methyl-5-thiol-L-histidine disulphide and a related metabolite in eggs from echinoderms. *Comp*. *Biochem*. *Physiol*. 78: 81–83.

Pérez A, Malanga G, Puntarulo S. 2011. Reproductive conditions associated to changes in the lipid-soluble antioxidant capacity and damage to lipids in the sea urchins *Loxechinus albus* (Echinodermata: Echinoidea). *Rev*. *Mar*. *Cost*. 3:183-194.

Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, Casin A. 2003. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem*. *Pharmacol*. 66: 1499-1503.

Reyes-Luján, J., D. Arrieche, C. Lodeiros-Seijo, E. Zapata-Vívenes, J. Barrios & W. Salgado. 2015. Ciclo gametogénico de *Echinometra lucunter* (Linnaeus 1758) (Echinometra: Echinoidea) en el Nororiente de Venezuela. *Rev*. *Biol*. *Trop*. 63: 273-283.

Robinson, H. & C. Hogden. 1940. The biuret reaction in the determination of serum protein. *J*. *Biol*. *Chem*. 135: 707.

Sokal, R. & J. Rohlf. 1981. Biometría: Los principios y la práctica de la estadística en la investigación biológica. Segunda edición. WH Freeman and Company. San Francisco.

Soumaya, A., C. Moncef & S. Saloua & E. Amor. 2012. The influence of season on the gonad index

and biochemical composition of the sea urchin *Paracentrotus lividus* from the Golf of Tunis. *Sci*. *World*. *J*. X: 1-8.

Torreiro, M., P. García-Martínez, J. Catoira & G. Mosquera. 1998. *Seasonal variation in biochemical composition in gonads of the sea urchin Paracentrotus lividus Lmk*. In: *Proceedings of the 9th international echinoderm meeting*. Mooi R, Telford M. (eds). A. A. Balkema. Rotterdam, the Netherlands. pp. 753-758.

Unuma, T., T. Yamamoto, T. Akiyama, M. Shuraishi & H. Ohta. 2003. Quantitative changes in yolk protein and other components in the ovary and testis of the sea urchin *Pseudocentrotus depressus*. *J*. *Exp*. *Biol*. 206: 356-372.

Van Handel, E. 1965. Estimation of glycogen is small amounts of tissue. *Anal*. *Biochem*. 1: 256-265.

Viarengo, A., L. Canesi & D.R. Livingstone. 1991. Seasonal variations in the antioxidant defence enzymes and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. *Comp*. *Biochem*. *Physiol*. 100:187–190.

Walker, C., T. Unuma & P. Lesser. 2007. Gametogenesis and reproduction of sea urchins. *Dev*. *Aquacult*. *Fish*. *Sci*. 37:11–33.

Walker, C., P. Lesser & T. Unuma. 2013 Sea urchin gametogenesis-structural, functional and molecular/ genomic biology. *Dev*. *Aquacult*. *Fish Sci*. 38:25–43.

Wu, L. & K. Chu. 2010. Characterization of an ovary-specific glutathione peroxidase from the shrimp *Metapenaeus ensis* and its role in crustacean reproduction. *Comp*. *Biochem*. *Physiol*. 155: 26-33.

Zapata-Vívenes, E. & O. Nusetti. 2007. Protection of glycolytic enzymes by metallothioneins from oxidative damage in the digestive gland of green lipped mussel *Perna viridis*. *J*. *Shellfish Res*. 26:1–10.

Recibido: Junio 2018
Aceptado: Julio 2018