



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

EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LAS RESPUESTAS
ANTIOXIDANTES Y CITOCROMO C OXIDASA EN EL ERIZO VERDI-BLANCO
Lytechinus variegatus
(Modalidad: Tesis de Grado)

DAYANA MAXIBEL NAVARRO VÁSQUEZ

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

Cumaná, 2018

EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LAS RESPUESTAS ANTIOXIDANTES
Y CITOCROMO C OXIDASA EN EL ERIZO VERDI-BLANCO *Lytechinus*
variegatus

APROBADO POR:

Prof. Edgar Zapata-Vívenes
Asesor

Prof.
JURADO

Prof.
JURADO

ÍNDICE

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
LISTA DE TABLA	III
LISTA DE FIGURAS.....	IV
RESUMEN	VI
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA.....	7
Organismos.....	7
Sobrevivencia	7
Aclimatación	8
Bioensayos.....	8
Salud de los erizos.....	9
Tioles totales.....	9
Análisis enzimáticos.....	10
Superóxido dismutasa (SOD, E.C: 1. 15. 1. 1).....	10
Catalasa (CAT, E.C: 1.11.1.6).....	11
Citocromo C oxidasa (CCO, E.C: 1.9.3.1).....	11
Peroxidación de lípidos	11
Proteínas totales.....	12
Análisis estadísticos	12
RESULTADOS	13
DISCUSIÓN	20
CONCLUSIONES	29
BIBLIOGRAFÍA	30

DEDICATORIA

Primeramente, gracias a Dios.

A ti madre amada no tengo como devolverte todo el esfuerzo y sacrificio que has hecho por mí, eres mi orgullo y aunque muchas veces te decepcioné, aquí estoy logrando lo que me propuse desde que salí de la comodidad de tu casa. Te amo mamita (Ysabel Vásquez).

Quiero agradecer a mi padre de vida porque, aunque no poseemos el mismo ADN fuiste mi apoyo en todo momento, siempre dispuesto a darme una mano. Te amo papi (Tomás Tenía).

Abuela hermosa de mi corazón no puedo pasar por alto todo el inmenso amor que me has dado y quiero darte las gracias por haber confiado en mí y por tantas palabras de aliento cuando me escuchabas decir que ya no podía seguir. Te amo Petra Sifonte de Vásques.

Mis hermanos Jesús Navarro y Jhailynt Tenía gracias por su apoyo.

Esta tesis está dedicada en especial a los dos motores de mi vida, mis hijos Maximiliano y Jahna Ysabel, gracias mis niños por hacer de mí una mejor mujer y por darme las fuerzas necesarias para culminar esta meta. Infinito amor por ustedes.

A ti Johnniely Alcalá, infinitas gracias por ser esa hermana que la vida me regaló y estar conmigo en los buenos y malos momentos.

Esposo Johan Guzmán gracias por tu apoyo incondicional. Te Amo.

AGRADECIMIENTOS

Eterno agradecimiento con la Universidad de Oriente, la casa más alta que me acogió en sus aulas durante toda esta aventura, donde viví los mejores momentos de mi vida y carrera, donde obtuve todo lo necesario para culminar esta meta.

Profesor, asesor y amigo Edgar Zapata Vívenes por tomarme en cuenta para la realización de esta investigación, su ayuda y apoyo en todo momento, no me puedo quejar de mi súper asesor, mil gracias.

Gracias a esos amigos y compañeros que se hicieron presente durante este bello recorrido durante mi carrera universitaria, brindándome su amistad sincera y apoyo cuando más lo necesité: Profesora Carmen Martins, Johnniely Alcalá, Emirjes Maza, Ricardo Muñoz, Sara Cova, Leomargarit Torcat, Eukaris Pérez y Marcos González.

LISTA DE TABLA

Tabla 1. Velocidad de enderezamiento (s), índice de cobertura (%) y síntomas observados en <i>Lytechinus variegatus</i> sometidos a distintas temperaturas durante 1 y 3 días.	14
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Ubicación geográfica de la ensenada de Turpialito, golfo de Cariaco, Venezuela.....	7
Figura 2. Porcentaje de sobrevivencia (%) de <i>Lytechinus variegatus</i> sometidos a distintas temperaturas. La línea punteada horizontal extrapola valores de Tms..	13
Figura 4. Superóxido dismutasa (SOD) en gónadas de <i>Lytechinus variegatus</i> sometidos a distintas temperaturas durante 1 (barra vacía) y 3 días (barra oscura). Las barras denotan los promedios y las extensiones de sus desviaciones estándares respectivas.....	16
Figura 5. Catalasa (CAT) en gónadas de <i>Lytechinus variegatus</i> sometidos a distintas temperaturas durante 1 (barra vacía) y 3 días (barra gris). Las barras denotan los promedios y las extensiones de sus desviaciones estándares respectivas.	16
Figura 6. Actividad de citocromo c oxidasa (CCO) en gónadas de <i>L. variegatus</i> sometidos a distintas temperaturas durante 1 (barra vacía) y 3 días (barra oscura). Las barras denotan los promedios las extensiones de sus desviaciones estándares respectivas.....	17
Figura 7. Niveles de TBARS relacionada con proteínas en gónadas de <i>Lytechinus variegatus</i> sometidos a distintas temperaturas durante 1 (barra vacía) y 3 días (barra oscura). Las barras denotan los promedios y las extensiones de sus desviaciones estándares respectivas.....	18
Figura 8. Proteínas totales (mg/g de masa húmeda) en gónadas de <i>Lytechinus variegatus</i> sometidos a distintas temperaturas durante 1 (barra vacía) y 3 días (barra gris). Las barras denotan los promedios y las extensiones de sus desviaciones estándares respectivas.	19
Figura 9. Análisis de componentes principales de las variables determinadas: lipoperoxidación (TBARS), superóxido dismutasa (SOD), temperaturas (T), porcentaje de enderezamiento (R), grupos tioles (-SH), catalasa (CAT), índice de cobertura (C), proteínas totales (PT) y citocromo c oxidasa (CCO). El círculo indica las relaciones más estrechas entre las variables.	19

RESUMEN

El erizo verdi-blanco *Lytechinus variegatus* presenta abundancia relativa en costas del golfo de Cariaco (Venezuela), habitando en la zona intermareal de aguas cálidas frecuentemente recubierto con pequeñas rocas, restos de corales, conchas de bivalvos y macroalgas. Los erizos han sido utilizados como especies importantes para estudiar los efectos del cambio climático, por lo tanto en esta investigación, *L. variegatus* sirvió como modelo biológico con el objetivo de estimar la modulación en sus defensas antioxidantes y el daño oxidativo en su tejido reproductivo en ambientes simulados de cambios controlados de temperaturas. Previamente, fue estimado el tiempo medio de sobrevivencia (Tms) de *L. variegatus* a distintas temperaturas. Se procedió a someter grupos entre 10 a 15 de organismos, de manera separada, a ambientes con temperaturas de 20, 25, 28 y 32 °C, durante 1 y 3 días. La capacidad de enderezamiento (CE) desde la posición invertida y el porcentaje de cobertura (PC) de la testa fueron monitoreados como marcadores de salud de los individuos y comportamiento en el ambiente. Las defensas antioxidantes tales como tioles solubles totales (-SH), actividades de las enzimas catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD); la actividad respiratoria mitocondrial estimada mediante la enzima citocromo C oxidasa (CCO); y el daño oxidativo a lípidos (TBARS) ó lipoperoxidación (LPO) fueron valorados en cada período de exposición. La sobrevivencia de los erizos es notablemente reducida en los organismos sometidos a 28 y 32°C, alcanzando su Tms_{28°C} a 12,66 d y Tms_{32°C} a 5,99 d, lo que mostró la vulnerabilidad que presenta el organismo a temperaturas elevadas. La CE solo fue afectada por la temperatura más elevada; al igual que fue reducido el PC en los organismos sometidos a 32°C correspondiente a movimiento casi nulos de los pies ambulacrales, espinas y dientes. Las concentraciones de -SH y la actividad de SOD no presentaron variaciones significativas para ambos factores. Sin embargo, las actividades de CAT y CCO descienden en relación al ascenso de las temperaturas, observándose el efecto inhibitorio a la temperatura de 32°C en el tercer día. A su vez, los niveles de TBARS incrementan en paralelamente al ascenso de las temperaturas, especialmente en los organismos expuestos a 28 y 32°C. El descenso en las actividades de CAT-CCO y el incremento en los niveles de TBARS en los erizos experimentales indican una condición de estrés oxidativo por estrés térmico en las gónadas, iniciándose a temperaturas > 28°C. Se concluye que el incremento atípico de las temperaturas del mar probablemente podría afectar el estatus antioxidante en el tejido germinativo, restringiendo así la reproducción y sobrevivencia de los erizos.

Palabras claves: temperatura, *Lytechinus variegatus*, defensas antioxidantes, daño oxidativo.

INTRODUCCIÓN

Los cambios del clima alrededor del mundo son atribuidos principalmente a los niveles crecientes del dióxido de carbono atmosférico (CO₂) provenientes de la quema de combustibles fósiles. Los niveles de CO₂ han alcanzado más del 70 % en relación a la época pre-industrial, conllevando a un incremento en acidificación de los océanos y de las temperaturas de las aguas superficiales del mar (Collins *et al.*, 2013).

El Panel Internacional del Cambio Climático (PICC) ha pronosticado que para finales del siglo (~año 2 100), los niveles de temperatura del mar a nivel global aumentarán alrededor de 0,6 a 2 °C y el pH del agua de mar bajará a unidades entre 0,06 y 0,32 (Rhein *et al.*, 2013). Los estudios recientes han demostrado que los ascensos de las temperaturas en los océanos pueden provocar un estrés generalizado en la fauna marina, en especial en los invertebrados, lo que puede afectar su desarrollo (Byrne *et al.*, 2009; Chua *et al.*, 2013), crecimiento (Wolfe *et al.*, 2013; Zapata-Vívenes *et al.*, 2017), comportamiento (Brothers y McClintock, 2015) y las preferencias alimentarias (Poore *et al.*, 2013).

Las temperaturas en aguas superficiales del noroeste de la costa venezolana, en especial las del golfo de Cariaco, varían estacionalmente asociadas a los eventos de surgencia costera y estratificación, los cuales vienen acompañados de cambios significativos en la velocidad del viento y disponibilidad de alimento (Rueda-Roa & Muller-Karger, 2013). Los registros de temperaturas en los ecosistemas del golfo pueden oscilar desde 22 a 24°C en los meses desde enero a junio en temporada de surgencia y de 26 a 28°C desde julio a diciembre en la temporada de estratificación (no surgencia) (Penchaszadeh *et al.*, 2000). Incluso en años recientes se han observado valores intra-diarios que pueden alcanzar los 31°C en los meses de septiembre y octubre. Tales ascensos en los niveles de la temperatura pueden inducir cambios fisiológicos importantes en poblaciones marinas, en especial sobre los erizos.

Los erizos de mar juegan un papel relevante en el balance de los océanos y de los arrecifes de coral, ya sea como grandes consumidores de animales, algas, plantas marinas y detritos orgánicos, y a su vez, como recurso alimenticio para especies de

crustáceos y peces (Birkeland, 1989; Calva, 2002). También son parte importante en la economía de algunas sociedades, ya que sus gónadas son apreciadas como alimento, siendo consideradas como exquisiteces. La explotación del recurso y el consumo de sus gónadas en algunos países de Asia y América del Sur está en el orden de 3 000 a 4 000 toneladas anualmente (Hendler *et al.*, 1995).

En Venezuela, existen algunas especies de erizos con alto potencial de explotación y cultivo, las mismas poseen rápido crecimiento, buena adaptación al cautiverio y cantidad de gónadas producidas en muy corto tiempo. Dentro de las especies de mayor abundancia localizadas en las costas nororientales se encuentran *Echinometra lucunter*, *Tripneustes ventricosus* y *Lytechinus variegatus* (Lodeiros y Buitrago, 2011; Reyes, 2015). Esta última es una especie de erizo tropical que habita en aguas tranquilas, claras y poco profundas. La misma se distribuye desde el sureste de los Estados Unidos hasta el Brasil, y ha sido estudiada principalmente en la Florida y algunos países del Caribe (Hendler *et al.*, 1995). *L. variegatus* es abundante en algunas zonas de las costas de los estados Sucre y Nueva Esparta, teniéndose una base de datos preliminar sobre su abundancia y ecología en distintas localidades como en la Isla de Margarita, Bahía de Mochima y golfo de Cariaco (Gómez-Gaspar, A. 2002; Noriega *et al.*, 2002; Cruz-Motta, 2007).

L. variegatus es una especie omnívora, que se alimenta principalmente en el lecho marino de fanerógamas como *Thalassia* sp y de macroalgas. También se alimenta de las partículas suspendidas de fitoplancton contentivas en agua recogiendo con sus espinas y pies ambulacrales (Moore, 1963). Posee un órgano masticador denominado Linterna de Aristóteles, formada por dientes muy fuertes que usa para cortar algas, inclusive raspar las que crecen adosadas en las rocas. La linterna de Aristóteles constantemente está en movimiento para alojar agua de mar y sus partículas de comida suspendidas (Watts, 2013).

Los erizos han sido considerados buenos modelos biológicos para estudiar los efectos del cambio climático, ya que estos organismos son altamente vulnerables en diferentes momentos de su ciclo vida (Dupont y Pörtner, 2013; Vasconcelos-Mendes,

2014). En algunas especies de equinoideos se ha demostrado efectos en el crecimiento larvario por incremento de la temperatura, aunado a otros factores estresantes como la acidez oceánica (Roller y Stickle, 1993; Byrne y Przeslawski, 2013). Los adultos crecen y sobreviven a temperaturas elevadas de 31 °C (*Echinometra lucunter*) hasta 36 °C (*Diadema antillanum*); tales condiciones demandan un gasto significativo de energía lo que tienen influencia en el desarrollo de sus gónadas (Uthicke *et al.*, 2014).

Existe una relación directa entre la variación de la temperatura ambiental y los cambios que suscitan en la tasa respiratoria y costo energético de los organismos marinos, vinculada con una intensa actividad de la cadena transportadora de electrones mitocondrial (CTE) (Turrens, 2003; Uthicke *et al.*, 2014). En este transporte electrónico la enzima citocromo C oxidasa (CCO) o también llamada complejo IV cumple un papel primordial. CCO se localiza en la membrana interna de las mitocondrias y está encargada, al igual que otra serie de enzimas de la CTE, de permitir la reducción del oxígeno molecular en agua. Además, cumple funciones de cooperación para la formación del gradiente electroquímico donde se acumula la energía que la enzima ATP sintasa emplea para catalizar la síntesis de adenosín trifosfato (ATP) (Brunori *et al.*, 2005). Esta enzima se presenta en abundancia en el tejido gonadal de los erizos, indicando la eficiencia de la actividad respiratoria mitocondrial y de producción energética (Kutra, 1996; Du *et al.*, 2013).

Se parte del supuesto que el aumento de la tasa respiratoria mitocondrial por consecuencia de las elevadas temperaturas puede conllevar a una sobreproducción de las especies reactivas del oxígeno (ERO) (Lushchak y Bagnyukova, 2006). Esta producción exagerada de ERO puede provocar daño oxidativo en macromoléculas de importancia biológica, cuando las defensas antioxidantes no son eficientes (Di Giulio *et al.*, 2005). Los radicales libres son especies químicas muy reactivas, iones o moléculas, y que poseen uno o más electrones no apareados en sus orbitales externos. En organismos vivos, bajo condiciones normales de metabolismo se forman especies radicalarias a partir de la reducción del oxígeno molecular (Powis & Southorn 1988). La excesiva producción y/o exposición de un organismo a radicales libres (RL) induce en éste alteraciones biológicas potencialmente conducentes a un daño celular, denominado

"estrés oxidativo" (Rodríguez *et al.* 2001). El daño o estrés oxidativo se define como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio que debe existir entre las sustancias o factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas del oxígeno (Hammond y Hofmann, 2010). Entre los índices más frecuentemente utilizados para estimar el daño oxidativo se encuentran la determinación de las actividades basales de compuestos antioxidantes tales como los niveles de tioles totales, las actividades de las enzimas antioxidantes y los daños oxidativos en la estructura de moléculas (Fridovich, 1998). Motivado a la peroxidación lipídica, el daño oxidativo originado por las ERO, los seres vivos han desarrollado una serie de mecanismos de defensa antioxidante, tanto enzimáticos como no enzimáticos (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Los antioxidantes no enzimáticos integran tanto moléculas reductoras de pequeña masa molecular y de naturaleza hidrosoluble (por ejemplo glutatión reducido y ascorbato) así como también, algunas vitaminas liposolubles (α -tocoferol y β -caroteno). Además incluyen, una gama de moléculas de importancia biológica que contienen grupos tioles (-SH) como aminoácidos, péptidos y proteínas que presentan gran afinidad por los radicales libres, formando moléculas estables para controlar el estrés oxidativo. El glutatión reducido (GSH) es el tiol con mayor concentración a nivel celular, tiene numerosas funciones, tales como la de impedir que ciertos tóxicos formen radicales reactivos, uniéndose a ellos covalentemente (Storey, 1996; Hermes-Lima, 2004).

Las enzimas antioxidantes están encargadas de contrarrestar la acción de las ERO. En primer lugar, la enzima superóxido dismutasa (SOD) contribuye a la eliminación del anión superóxido ($\bullet\text{O}_2$). Esta enzima es una metaloproteína que tiene una amplia distribución en el organismo, la cual dismuta el oxígeno para formar peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y su principal función es la protección contra el $\bullet\text{O}_2$ (Halliwell y Gutteridge, 1999). Adicionalmente, la catalasa (H_2O_2 oxidorreductasa, CAT) es una enzima tetramérica asociada principalmente a los peroxisomas al citosol. CAT se encuentra de manera abundante en las células germinales de los erizos, participando en la conversión de H_2O_2 en agua, siendo un componente dominante del sistema enzimático

antioxidante implicado en la protección bioquímica contra el estrés oxidativo (Nusetti *et al.*, 2010). Estas defensas enzimáticas son importantes para la eliminación de ERO en el proceso de formación y diferenciación gametogénica durante los cambios de fase de maduración gonadal (Zapata-Vívenes *et al.*, 2018) y el crecimiento somático en los erizos (Du *et al.*, 2013).

Una condición fisiológica óptima le permite a los erizos un comportamiento eficaz para contribuir a la sobrevivencia ante la presencia de depredadores, competidores y alimentación (Ling y Johnson, 2012). *L. variegatus* presenta comportamientos discretos, entre los cuales se incluyen la cobertura de su testa, refugio y corrección (enderezamiento). En estos procesos es primordial el uso de sus pies ambulacrales y espinas para lograr una posición estable, teniendo gran habilidad para enderezarse desde una posición invertida hasta una posición oral-aboral, en un corto tiempo, y también, coleccionar objetos provenientes del entorno para camuflajearse (Verling *et al.*, 2002; Pawson y Pawson, 2013).

L. variegatus comúnmente cubre su testa con conchas, piedras, restos de corales muertos y fragmentos de algas, lo que lo protege contra altas intensidades de la luz del sol, incluyendo la radiación ultravioleta (Dumont *et al.*, 2007; Pinna *et al.*, 2012) y la turbulencia física del oleaje (Brothers & McClintock, 2015); además este comportamiento distractor permite no ser detectado por los depredadores (Watts *et al.*, 2013). Se supone que organismos vulnerables y sensibilizados por estrés térmico deben poseer una menor capacidad de cubrirse totalmente en menor tiempo (Verling *et al.*, 2004).

Se ha reportado recientemente que los cambios estacionales coligados al fenómeno de surgencia en el golfo de Cariaco pueden modular los niveles de los compuestos y enzimas antioxidantes en poblaciones de erizos negros *E. lucunter* y verdiblancos *L. variegatus* (González, 2015; Vallenilla, 2016). Ambos autores relacionan una multiplicidad de factores ambientales (temperatura, pH, niveles de oxígeno) y endógenos (estadío reproductivo) con posibles daños oxidativos a lípidos y ajustes en el estatus antioxidante en erizos; sugiriendo que la temperatura puede ser un factor fundamental en la condición de estrés oxidativo.

En este sentido, con la finalidad de demostrar el efecto de la temperatura sobre las defensas antioxidantes y daño oxidativo en el tejido reproductivo de *L. variegatus*, se procedió a estimar, bajo condiciones controladas y exposición a distintas temperaturas incluyendo escenarios de futuros valores atípicos, la variación en el estatus antioxidante, la actividad respiratoria y el comportamiento individual del erizo verdi-blanco.

METODOLOGÍA

Organismos

Los especímenes de *L. variegatus* fueron colectados en la Ensenada de Turpialito (10° 26' 56" N, 64° 02' 00" O) ubicada en la costa sur del golfo de Cariaco (Figura 1), durante el mes de enero de 2016. Los promedios de temperatura del agua de mar oscilaron entre 20,02 a 22,36°C. Los animales fueron capturados de manera manual a profundidades de 0 a 5 m, sin distinguir su sexo. La talla de colecta fue entre 6-8 cm de diámetro de la testa.

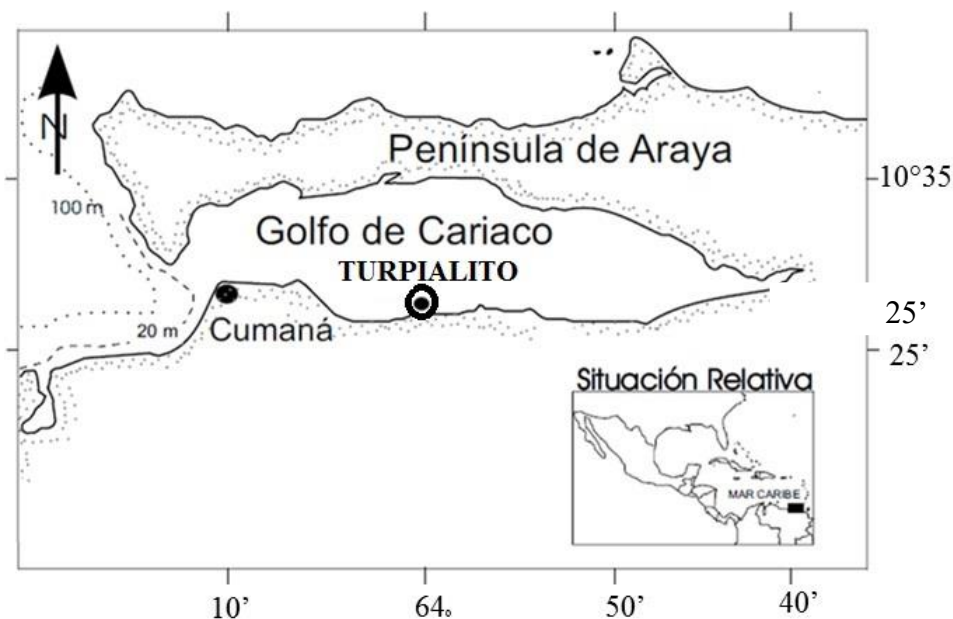


Figura 1.- Ubicación geográfica de la ensenada de Turpialito, golfo de Cariaco, Venezuela.

Sobrevivencia

El porcentaje de sobrevivencia y tiempo medio de tolerancia a la temperatura (T_{m50}) fueron estimados en los organismos durante un período de 12 días (Hamilton *et al.*, 1977). La sobrevivencia fue determinada considerando “organismos muertos” aquellos que no respondían a la estimulación mecánica oral, no presentaban movimiento de espinas y/o tubos digestivos evidente, presentaban doblamiento o pérdidas de espinas mayores al 30%.

Aclimatación

Los erizos fueron colocados en acuarios de 40 l de capacidad, a razón de un organismo por cada 5 l de agua de mar filtrada, con aireación continua, temperatura promedio del agua 20 ± 1 °C, pH 7,9-8,1 y salinidad de 36 UPS. Los organismos fueron alimentados con una mezcla de macroalgas deshidratadas (*Sargassum vulgare* y *Padina boergesenii*) extraídas del sitio de colecta, en una proporción de 5% de alimento en relación a la masa corporal de los organismos. El agua de mar fue cambiada cada dos días. Estas condiciones se mantuvieron por una semana antes de iniciar los ensayos de exposición a las temperaturas.

Bioensayos

De 5 a 6 erizos fueron sometidos a ambientes con temperaturas constantes de 20, 24, 28 y 32 °C, durante 1 y 3 días. Los ensayos fueron realizados por triplicado usando frascos de vidrio de 5 l en proporción de 1 organismo/l. Las condiciones de temperaturas de 20-24 °C fueron mantenidas, en recintos separados, mediante la ambientación con aires acondicionados. Las temperaturas de 28-32 °C fueron alcanzadas utilizando calentadores con termostatos ajustables (UNITRONI 200). Las temperaturas mayores a 20 °C fueron alcanzadas en razón de un 1°C/hora después de la aclimatación previa.

Los rangos de temperaturas seleccionados representan en promedio las temporadas ambientales observadas anualmente en el golfo de Cariaco: surgencia costera (20 °C), transición (24 °C) y estratificación (28 °C) (Rueda-Roa *et al.*, 2018). Los organismos expuestos a 32 °C simulan escenarios de temperaturas futuras a causa del cambio climático. Las temperaturas de exposición fueron seleccionadas de acuerdo a experimentaciones preliminares, las cuales garantizaron un alto porcentaje de sobrevivencia de los individuos (90-100%).

Las condiciones de alimentación, oxigenación, pH y salinidad se mantuvieron similares según las especificaciones anteriores. Los promedios de las temperaturas en los ensayos oscilaron diariamente entre $\pm 0,5$ °C, los cuales son menores a los registrados anualmente en el sitio de captura. Según estimaciones la variación inter-diaria de la ensenada de Turpialito es de ± 2 °C entre el día y la noche.

Al finalizar el bioensayo, a los organismos se les retiró su testa y posteriormente fueron disecadas sus gónadas, las mismas se conservaron a -20 °C, durante un periodo no mayor a una semana, para su posterior análisis bioquímico.

Salud de los erizos

El estado de salud de los erizos se determinó mediante el tiempo de recuperación desde una posición invertida. Los erizos fueron colocados en posición invertida (boca hacia arriba) en fondo del acuario. Se estimó el tiempo (en segundos) que tardó el organismo en voltearse para alcanzar su posición original (Taylor *et al.*, 2014). Adicionalmente, se estimó el porcentaje de cobertura de la testa con sustratos naturales contentivos en los acuarios, tales como piedras, conchas de bivalvos, trozos de corales muertos (de tamaño aproximado 1-2 cm). Tales sustratos fueron provenientes de la zona de captura de los ejemplares.

Los erizos se colocaron de manera equidistante en el fondo del acuario (10 cm de separación) y se procedió a estimar el área cubierta, expresada en porcentaje (%), de la testa del erizo (Millott, 1956), durante 4 horas. Se fotografiaron y se procedió a estimar de manera visual el área de cobertura parcial o total. También se describieron algunos síntomas externos tales como cambios de coloración, pérdidas de espinas y comportamiento anormales en ambos periodos de exposición.

Tioles totales

La concentración de grupos sulfhidrilos totales o tioles (-SH) fue determinada por el método de Ellman (1958). Para ello 0,2 g de las gónadas fueron homogenizadas en 2 ml de buffer fosfato de potasio 100 mmol/l a pH 7,5 y luego centrifugados a 3 000 *g* por 15 minutos. Del sobrenadante se tomó 50 µl de las muestras como fuente de grupos -SH libres y asociados a proteínas. Los reactivos que se utilizaron fueron los siguientes: solución de ácido 5,5'-dithio-bis 2-nitrobenzoico (DTNB stock) constituido de 50 mmol/l de acetato de sodio, 2 mmol/l de DTNB en 100 ml de agua destilada y buffer Tris 100 mmol/l. En la cubeta experimental se añadió 500 µl de DTNB, 250 µl de agua destilada, 200 µl de buffer Tris y 50 µl de la muestra e incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se midió la absorbancia a 412 nm en contra de un blanco constituido por todos los reactivos, a excepción del extracto. Se utilizó glutatión

reducido (GSH) a 3 mmol/l como estándar, expresándose los resultados en mmoles de -SH/g.

Análisis enzimáticos

Para la determinación de las actividades enzimáticas se usó el protocolo propuesto por Nusetti *et al.* (2010). Los tejidos se homogenizaron a 13 500 rpm empleando un homogenizador IKA T25 Basic a 4 °C. La homogenización se realizó en una relación 1:9 m/v del buffer de extracción. El buffer de extracción consistió en Tris-HCl (hidroximetilmetilamina) 20 mmol/l pH 7,6 conteniendo ácido etilendiaminotetracetato (EDTA) 1 mmol/l, ditioneitol (DTT) 4 mmol/l, sacarosa 500 mmol/l, KCl 150 mmol/l y ácido fenil metilsulfonilfluorido (PMSF) en alcohol isopropílico 1 mmol/l. El extracto resultante se centrifugó inicialmente a 1 000 *g* por 10 minutos a 4 °C en una centrifuga Eppendorf 5702 R refrigerada. El sobrenadante se centrifugó nuevamente a 12 000 *g* durante 30 minutos a 4 °C. El volumen final colectado se usó como fuente de enzimas.

Las actividades máximas de las enzimas antioxidantes se determinaron en un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/VIS Lambda 2S, bajo condiciones de temperatura controlada a 25 ± 1 °C. Los ensayos enzimáticos se realizaron por duplicado en un volumen final de la mezcla de 1 ml. Los resultados se expresaron en actividad específica (U/g), donde U es la cantidad de enzima necesaria para catalizar 1 micromol de sustrato en un minuto por gramo de masa húmeda.

Superóxido dismutasa (SOD, E.C: 1. 15. 1. 1)

La actividad de SOD se cuantificó a 500 nm midiendo el cambio de absorbancia debido al efecto inhibitorio de SOD sobre la reducción de citocromo C por el anión superóxido. La cubeta experimental estuvo compuesta por 800 µl de buffer fosfato 43 mmol/l, 25 µl de citocromo C 0,4 mmol/l, 50 µl de KCN 0,4 mmol/l, 10 µl de xantina oxidasa (0,57 U/ml) y 50 µl de extracto enzimático. Se mezcló por inversión de la cubeta y se registró la absorbancia durante 1 minuto para registrar la actividad endógena. Se retiró la cubeta para dar inicio a la reacción por adición de 100 µl de hipoxantina 0,5 mmol/l y se registró nuevamente la absorbancia durante 1 minuto aproximadamente

(Storey, 1996).

Catalasa (CAT, E.C: 1.11.1.6)

La actividad fue determinada por el descenso de la concentración de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a una longitud de onda de 240 nm (coeficiente de extinción 40 mol/l/cm) (Aebi, 1984). La mezcla de incubación estuvo constituida por buffer fosfato $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mmol/l a pH 7,5 y H_2O_2 500 mmol/l. A la cubeta experimental (de cuarzo) se le agregó 970 μl de buffer fosfato y 20 μl del extracto enzimático, se mezclaron rápidamente y se midió la absorbancia por 90 segundos para establecer una línea base. Para dar inicio a la reacción se le añadió 10 μl de H_2O_2 .

Citocromo C oxidasa (CCO, E.C: 1.9.3.1)

La actividad fue determinada por la oxidación del citocromo C reducido a 550 nm. La mezcla de reacción consistió en buffer fosfato de potasio 100 mmol/l pH 7,0 y 0,065 % (m/v) de citocromo c reducido y 0,93 mol/l de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. La reacción inició con la adición de una alícuota del extracto enzimático (Nusetti *et al.*, 2010).

Peroxidación de lípidos

La peroxidación de lípidos fue estimada por el método de análisis de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS), el cual se fundamenta en la cuantificación colorimétrica de uno de los principales productos de la peroxidación de lípidos, el malondialdehído (MDA), siguiendo el protocolo estandarizado para bivalvos propuesto por Livingstone *et al.* (1990).

Para ello 0,2 g de la gónada fue homogenizada en 2 ml de buffer fosfato de potasio 100 mmol/l pH 7,5 y fue centrifugado a 2 200 *g* por 15 minutos. Del sobrenadante resultante se tomaron 250 μl y se colocaron en baño de agua a 37 °C por 15 minutos, al terminar el tiempo los mismos fueron retirados del baño de agua y colocados en baño de hielo, adicionando a cada tubo 250 μl de solución cromógena contentiva de ácido tricloroacético 12,5 %, ácido clorhídrico 1 mol/l para detener la reacción, luego a cada tubo se le añadió 500 μl ácido tiobarbitúrico al 1 %, se agitaron los tubos y se colocaron en baño de agua a 90 °C con agitación constante por 30

minutos. Posteriormente fueron retirados del baño de agua y colocados nuevamente en baño de hielo para ser enfriados y luego se centrifugaron a 1 500 *g* por 10 minutos a 4 °C.

El sobrenadante final se transfirió a la celda del espectrofotómetro para su medición a 532 nm, con un blanco constituido por todos los reactivos a excepción del extracto. La concentración de MDA se calculó usando un coeficiente de extinción de $1,56 \times 10^{-5}$ mmol/l/cm. Los resultados fueron expresados en nmol de TBARS por mg de proteínas.

Proteínas totales

La concentración de proteínas se determinó por el método de Biuret. Para ello 0,1 g de gónada se homogenizó en 9 ml de solución salina (NaCl 0,9 %) y se centrifugó a 3 000 *g* por 10 minutos. Para las muestras se agregaron 0,2 ml (sobrenadante) en 3 ml de Biuret, se agitaron suavemente los tubos y se dejaron reposar los tubos por 20 minutos luego se midió la absorbancia a 540 nm (Robinson y Hogden, 1940). Se realizó una curva patrón con albúmina de suero de bovino BSA (1 mg/ml). Los resultados son expresados en miligramo de proteínas por gramo de tejido fresco.

Análisis estadísticos

Se calcularon los promedios y desviación estandar de todas las variables para cada uno de los grupos estudiados. Los resultados de los tratamientos en los grupos estudiados se compararon con organismos referenciales expuestos a 20 °C a través de un análisis de varianza doble (períodos de exposición y temperaturas) con réplicas, cumpliéndose los supuestos estadísticos. La prueba de Duncan fue usada como prueba “a posteriori” (Sokal y Rohlf, 2012). Se realizó un análisis de componentes principales (ACP) para reconocer las asociaciones entre las variables. Para los análisis estadísticos fue empleado el programa estadístico SPSS versión 11.

RESULTADOS

El porcentaje de sobrevivencia de *L. variegatus* sometidos a 20 y 24 °C durante los días de experimentación se mantuvo entre 95 al 100%. Sin embargo, se observaron promedios disminuidos en tiempo medio de tolerancia a la temperatura (Tms) de 12,66 y 5,99 días en los organismos sometidos a 28 y 32 °C, respectivamente (Figura 2). Estos valores de Tms muestran la sensibilidad de *L. variegatus* a temperaturas elevadas en el medio.

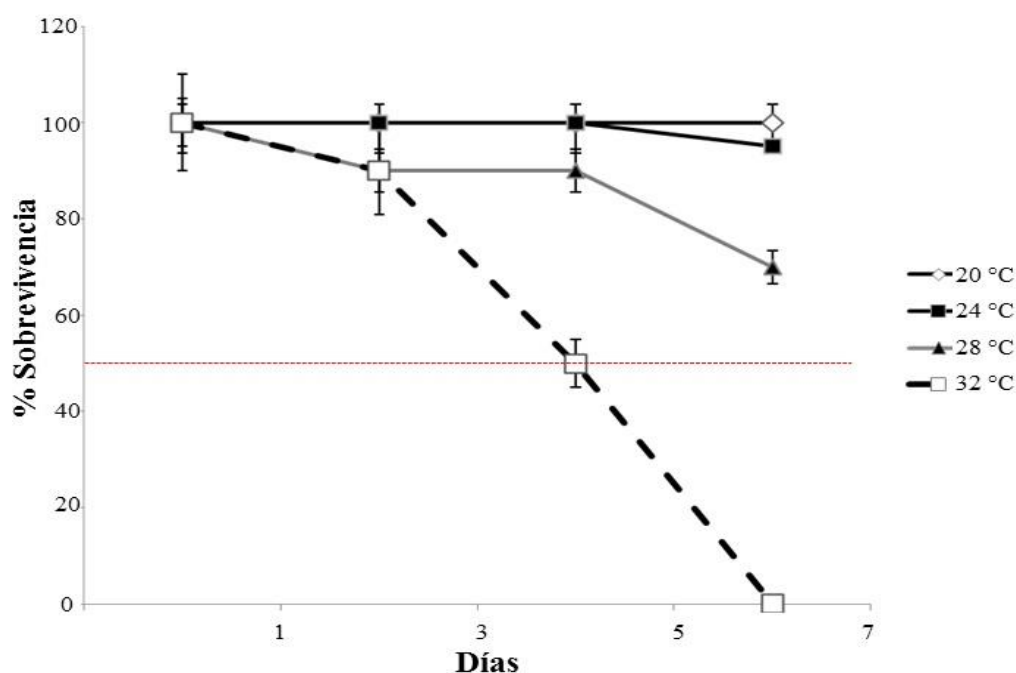


Figura 2. Porcentaje de sobrevivencia (%) de *Lytechinus variegatus* sometidos a distintas temperaturas. La línea punteada horizontal extrapola valores de Tms.

La velocidad de enderezamiento desde la posición invertida en todos los grupos experimentales mostró cambios estadísticamente significativos a las distintas temperaturas ($F_s=3,42$; $p<0,05$) pero no así para los períodos de exposición ($F_s= 2,21$; $p>0,05$), presentándose los promedios más elevados a la más alta temperatura (32 °C) (Tabla 1). Adicionalmente, no se encontraron interacción entre los factores evaluados ($F_s=1,27$; $p>0,05$). No obstante, el índice de cobertura en *L. variegatus* sometidos a distintas temperaturas mostró una capacidad disminuida en los grupos sometidos a 28 y 32 °C (Tabla 1), encontrándose diferencias significativas entre las temperaturas

($F_s=26,17$; $p<0,05$) pero no con respecto a los períodos de exposición ($F_s=1,22$; $p>0,05$).

Dentro de los síntomas observados durante la experimentación tenemos que el día 3 de los organismos expuestos a 28 °C, se encontraron de 5-10 % de los organismos con doblez y pérdidas de espinas, y en ambos periodos de exposición de los organismos expuestos a 32 °C, mostraron pérdidas de espinas, algunos desoves parciales y los movimientos de pies ambulacrales y espinas eran casi nulos en especial al 3er día.

Tabla 1. Velocidad de enderezamiento (s), índice de cobertura (%) y síntomas observados en *Lytechinus variegatus* sometidos a distintas temperaturas durante 1 y 3 días.

Comportamiento	Períodos	20	24	28	32
Tiempo de enderezamiento (s)	1	41,00±13,14	48,66±13,20	53,00± 11,79	116,33±422,78
	3	62,33±32,22	71,20±35,40	57,20±36,02	340,83±38,70
Porcentaje de cobertura (%)	1	58,30±27,10	36,70±32,3	5,83±4,92	3,33±5,16
	3	46,70± 25,00	30,84±16,3	4,00±5,48	1,67±4,08
Síntomas	1	Sin cambios	Sin cambios	Sin cambios	✓ Pérdidas de espinas ✓ Bajo movimiento de pies ambulacrales, espinas y dientes
	3	Sin cambios	Sin cambios	5-10 % de organismos con doblez y pérdidas de espinas	✓ > 20% de pérdidas de espinas ✓ Algunos desoves parciales ✓ Los movimiento de pies ambulacrales, espinas y dientes son casi nulo

En la figura 3 se muestran los promedios de grupos tioles (-SH) obtenidos en gónadas de individuos sometidos a diferentes temperaturas. Los resultados no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los organismos experimentales ($F_{temperatura}=0,14$ y $F_{períodos}=1,68$; $p>0,05$ para ambos factores). Los promedios oscilaron entre 4,19 a 8,07 mmoles de -SH/g, observando en el primer día de

experimentación los mayores promedios en los organismos expuestos a 32 °C.

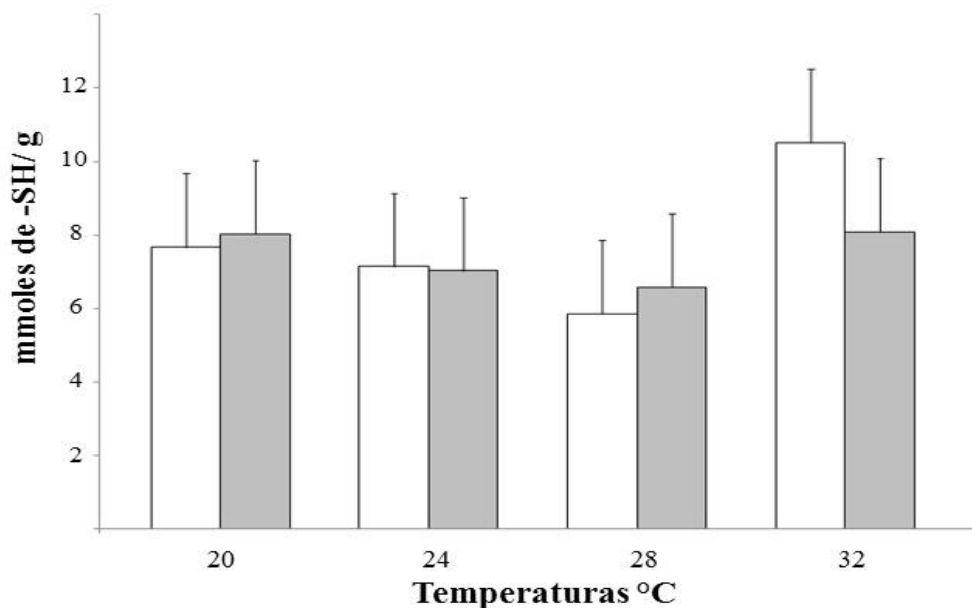


Figura 3. Niveles de grupos sulfhidrilos (-SH) en gónadas de *Lytechinus variegatus* sometidos a distintas temperaturas durante 1 (barra vacía) y 3 días (barra gris). Las barras denotan los promedios y las extensiones de sus desviaciones estándares respectivas.

En la figura 4 se muestran las actividades de la enzima SOD en los individuos sometidos a las distintas temperaturas. Este parámetro enzimático no mostró cambios significativos en relación a las temperaturas ($F_s=0,18$; $p>0,05$) y los períodos de exposición ($F_s=0,23$; $p>0,05$). Tampoco se encontró significancia en la interacción entre los factores ($F_s=0,21$; $p>0,05$). Sin embargo, la actividad de CAT mostró un descenso significativo en individuos sometidos a 32 °C ($F_{\text{temperatura}}=16,36$; $p<0,05$), presentando un comportamiento similar en ambos periodos de exposición ($F_{\text{periodo}}=0,10$; $p>0,05$). Los promedios de actividad enzimáticas descendieron en el orden de 75,20 % con respecto a los organismos referenciales sometidos a 20 °C.

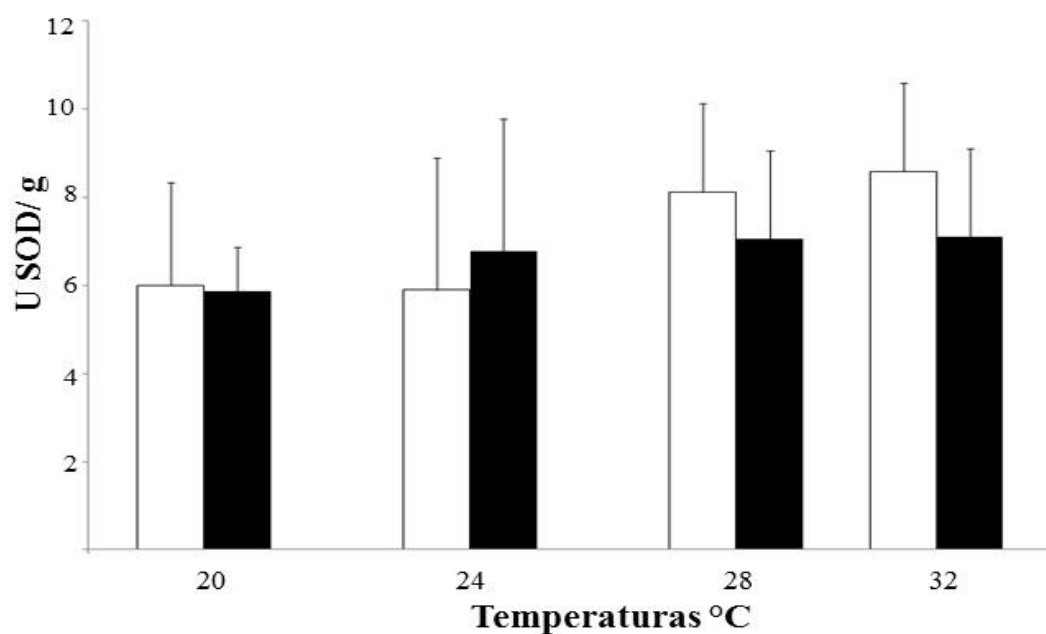


Figura 4. Superóxido dismutasa (SOD) en gónadas de *Lytechinus variegatus* sometidos a distintas temperaturas durante 1 (barra vacía) y 3 días (barra oscura). Las barras denotan los promedios y las extensiones de sus desviaciones estándares respectivas.

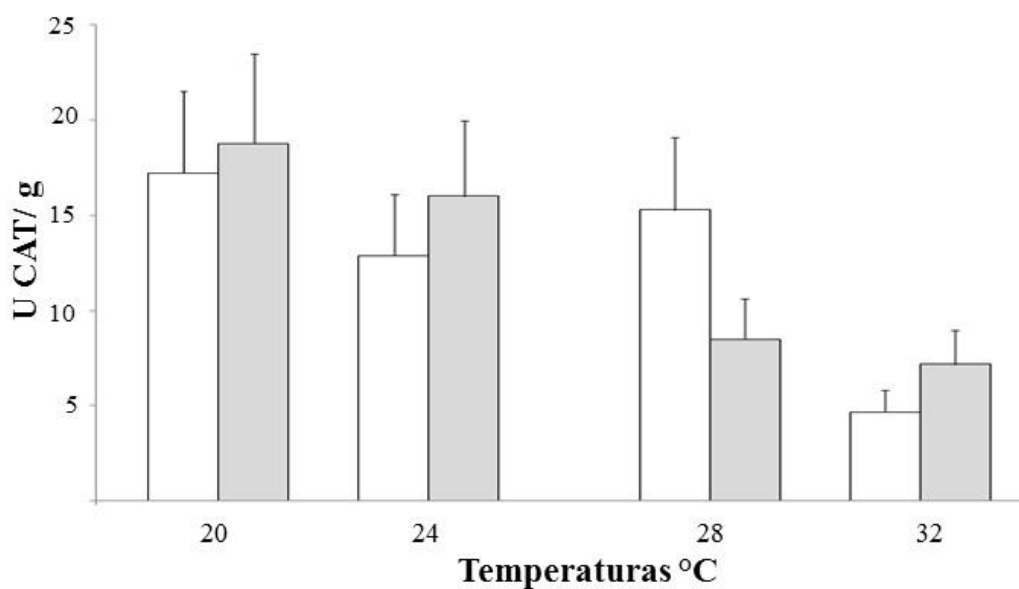


Figura 5. Catalasa (CAT) en gónadas de *Lytechinus variegatus* sometidos a distintas temperaturas durante 1 (barra vacía) y 3 días (barra gris). Las barras denotan los promedios y las extensiones de sus desviaciones estándares respectivas.

La actividad de la enzima citocromo C oxidasa (CCO) sólo mostró un descenso significativo hasta 0,09-011 U CCO/g en los organismos sometidos a la más alta temperatura (32 °C) ($F_{\text{temperatura}}=13,14$; $p<0,05$). Los organismos expuestos a 20 hasta 28 °C no presentaron diferencias estadísticas promediando sus actividades de CCO entre 0,51 y 1,15 U ($F_{\text{período}}=2,19$; $p<0,05$). Se demostró interacción entre los factores temperatura-período ($F_{\text{Interacción}}=5,45$; $p<0,05$).

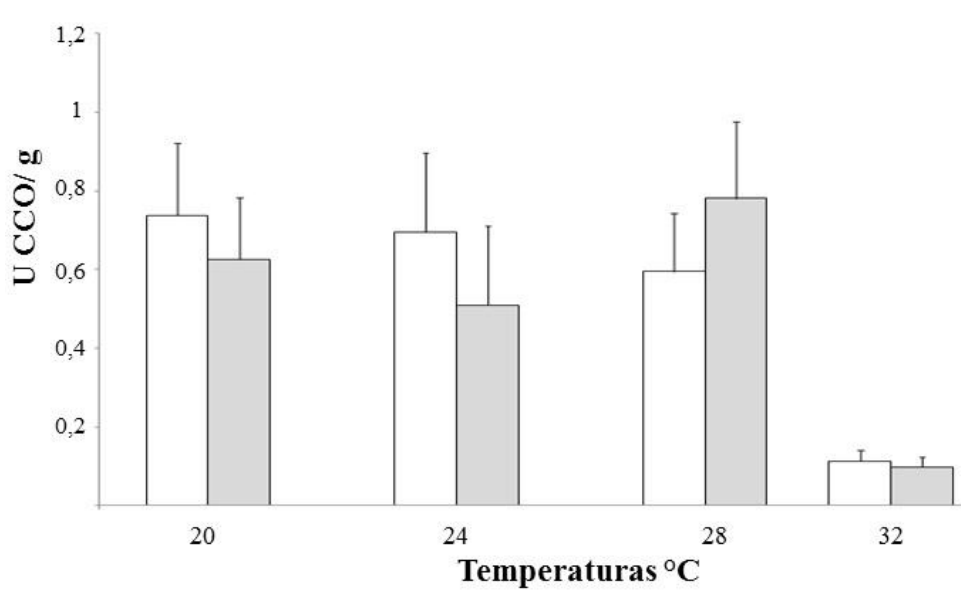


Figura 6. Actividad de citocromo c oxidasa (CCO) en gónadas de *L. variegatus* sometidos a distintas temperaturas durante 1 (barra vacía) y 3 días (barra oscura). Las barras denotan los promedios y las extensiones de sus desviaciones estándares respectivas

Las sustancias que reaccionan al ácido tiobarbitúrico (TBARS) mostraron diferencias significativas tanto en los períodos de exposición ($F_{\text{Período}}=14,78$; $p<0,001$) como en las distintas temperaturas ($F_{\text{Temperatura}}=5,74$; $p<0,001$). También se obtuvo significancia entre los factores evaluados (Temperatura-Período; $F_{\text{Interacción}}=3,91$, $p<0,05$). Los mayores niveles de lipoperoxidación se observaron en los organismos sometidos a las temperaturas de 28 °C durante el tercer día y en los organismos expuestos a 32 °C el primer día de bioensayo (Figura 7).

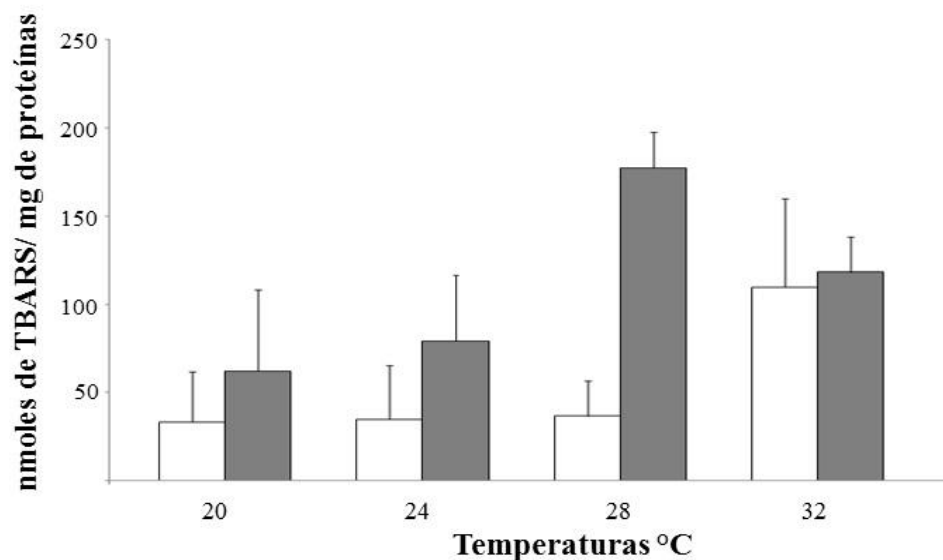


Figura 7. Niveles de TBARS relacionada con proteínas en gónadas de *Lytechinus variegatus* sometidos a distintas temperaturas durante 1 (barra vacía) y 3 días (barra oscura). Las barras denotan los promedios y las extensiones de sus desviaciones estándares respectivas.

Los niveles de proteínas se presentan en la figura 8, donde se observan diferencias significativas entre las temperaturas evaluadas ($F_{\text{Temperatura}}=36,20$; $p<0,001$) evidenciando los menores promedios en los organismos sometidos a 32 °C (284,58-287,42 mg de PT/g). los niveles de proteínas se muestran similares en ambos periodos ($F_{\text{Período}}=2,86$; $p>0,05$). No se presenta interacción entre factores ($F_{\text{interacción}}=2,14$, $p>0,05$).

El análisis de componentes principales mostró asociaciones ligeras entre los niveles de CCO, CAT, índice de cobertura y proteínas totales, los mismos explican el 67,90% de la variabilidad en los datos originales (Figura 9). Al mismo tiempo se muestra una asociación negativa entre las actividades de CAT e índice de cobertura (C) con los niveles de TBARS, SOD y la capacidad de recuperarse de la posición invertida. Los niveles de proteínas y actividad de CCO presentaron una asociación fuerte.

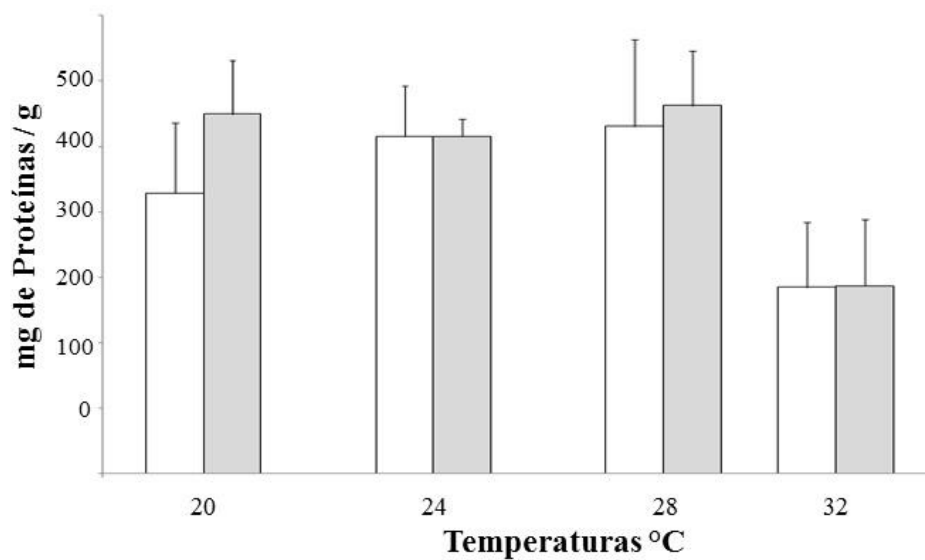


Figura 8. Proteínas totales (mg/g de masa húmeda) en gónadas de *Lytechinus variegatus* sometidos a distintas temperaturas durante 1 (barra vacía) y 3 días (barra gris). Las barras denotan los promedios y las extensiones de sus desviaciones estándares respectivas.

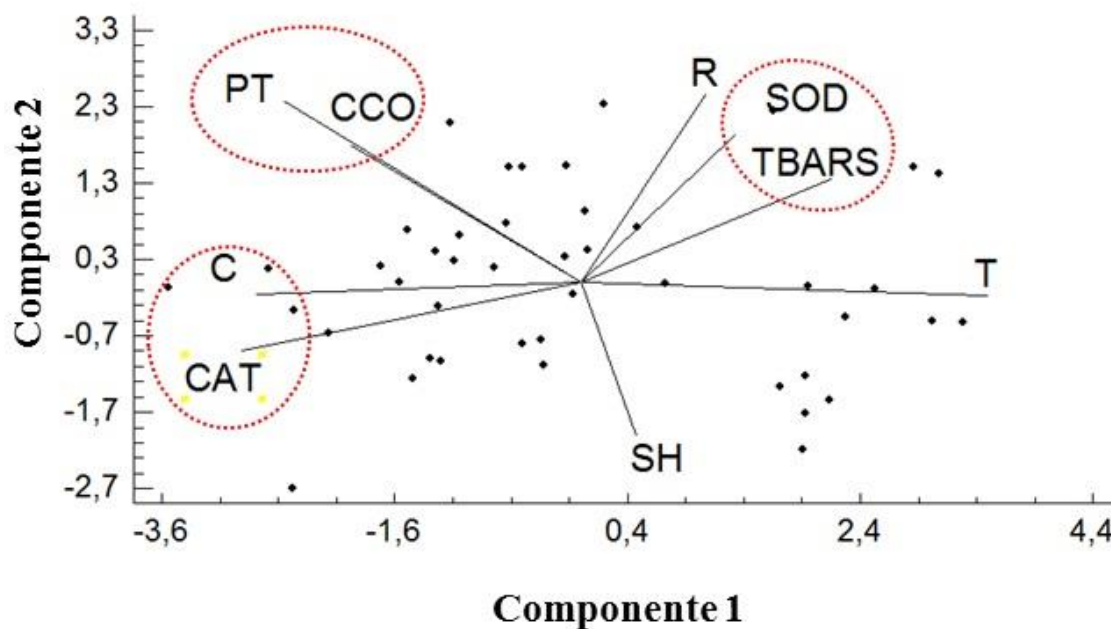


Figura 9. Análisis de componentes principales de las variables determinadas: lipoperoxidación (TBARS), superóxido dismutasa (SOD), temperaturas (T), porcentaje de enderezamiento (R), grupos tioles (-SH), catalasa (CAT), índice de cobertura (C), proteínas totales (PT) y citocromo c oxidasa (CCO). El círculo indica las relaciones más estrechas entre las variables.

DISCUSIÓN

L. variegatus muestra un bajo límite de tolerancia a temperaturas elevadas (~32 °C) en cortos períodos de tiempo. Se sugiere que la poca plasticidad de adaptación de esta especie de erizo a cambios térmicos probablemente podría conllevar a mortalidades de gran escala en futuros escenarios de incrementos en la temperatura del mar. En adición, algunos autores reconocen que además de la temperatura, existen otros estresores ambientales, tales como la acidificación, enfermedades infecciosas y contaminantes que podrían tener efectos sinérgicos deletéreos en organismos ectodérmicos (Prezlawki *et al.*, 2008).

La vulnerabilidad de *L. variegatus* a temperaturas elevadas está fundamentada en el cambio de su comportamiento y en algunos parámetros bioquímicos-enzimáticos de sus gónadas. Se conoce que los erizos presentan un buen sentido de la orientación o corrección corporal, siendo un comportamiento característico su capacidad a enderezarse (CE) una vez volteado. Se denota que temperaturas de 32 °C reducen los reflejos del sistema neuromuscular en los erizos, evitando así una rápida respuesta a cambios drásticos de orientación. Esta reacción mermada por la temperatura puede tener aspectos ecológicos importantes, ya que limita la sobrevivencia del individuo, por ejemplo una vez volteado a causa de un depredador o el fuerte oleaje.

En relación a lo antes planteado, el movimiento casi nulo de espinas y pies ambulacrales en organismos sensibilizados por el calor es una clara señal, que las elevadas temperaturas de exposición afectaron la función neuromotora de *L. variegatus*. Este detalle tiene incidencia a su vez en su baja tasa de alimentación, ya que se evidenció la disminución en la habilidad de movimientos de los dientes de la linterna de Aristóteles. Este tipo de respuesta anatómica ha sido comúnmente usada como marcador de salud en erizos expuestos a sustancias contaminantes (Raposo, 2017), genotóxicos (Canty *et al.*, 2009) e infecciones bacterianas (Bastidas, 2017).

Se ha considerado que la CE, proceso de inversión desde la posición oral a la aboral, depende también de la temporada de la colecta de los organismos. Se ha reportado en otras especies de erizos, por ejemplo que *E. lucunter* pueden tolerar

promedios entre 30-33 °C y *Diadema antillanum* colectado en las Islas Caimán en la temporada de verano hasta 35 °C. Al parecer, la tolerancia térmica puede ser aumentada en un margen de 3 a 6 °C en organismos que se colectan en las temporadas calientes (Sherman, 2015). Presumiblemente, la temporada de colecta de *L. variegatus* podría tener un efecto relevante de climatización de los animales. Aunque, *L. variegatus* presentó velocidades de volteo de entre 30 y 60 s, a 20-24 °C, estas son similares a especies de erizos que poseen por naturaleza tallas superiores o espinas de mayor tamaños, como por ejemplo *E. lucunter* (Aparicio, 2018) y *D. antillanum* (Sherman, 2015).

El índice de cobertura tiende a reducir en un 10 a 30 % en *L. variegatus* cuando son sensibilizados por altas temperaturas. Este detalle podría hacer más vulnerables a los organismos al ataque de depredadores en su hábitat natural, 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). Resultados similares han sido encontrados en la misma especie colectada en el golfo de México, siendo la cobertura alterado por incrementos en las temperaturas del agua de mar (Brothers y McClintock, 2015). Estos autores demostraron que temperaturas de 28 y 32 °C, a corto (1 día) y mediano plazo (10 días), pueden reducir las estrategias de defensas, comportamiento y capacidad de alimentación.

En esta investigación se evidenció una asociación importante entre los incrementos de la temperatura del agua y los niveles de daños oxidativo a nivel de lípidos, aunado una caída en las actividades de las enzimas antioxidantes, especialmente CAT, a temperaturas de 32 °C. En las gónadas de *L. variegatus* expuestos a temperaturas mayores de 28 °C se denota que las defensas antioxidantes son sobrepasadas por la acción de las especies reactivas del oxígeno (ERO), teniendo como consecuencia directa el daño a los lípidos de membrana (lipoperoxidación).

Las elevadas temperaturas simuladas en los bioensayos experimentales representan los abates de las temperaturas en los ecosistemas marino-costeros. Las mismas arrecian en largas temporadas, e incluso, en ciertas horas del día. Existen

algunas especies de erizos que pueden ser capaces de aclimatarse y ajustar fisiológicamente sus límites de tolerancia termales. Estas poseen la capacidad de modificaciones adaptativas a nivel molecular, tales como alterar la saturación de las membranas celulares, cambios en la cinética enzimática, y las densidades y funciones mitocondriales (Pörtner, 2002; Pörtner y Langenbuch, 2005). Sin embargo, al parecer *L. variegatus*, no posee los ajustes bioquímicos-antioxidantes necesarios para tolerar ambientes de temperaturas calientes. Aunque, se presume que la cobertura total de la testa sea una estrategia conductual importante para evitar el incremento exagerado de su temperatura corporal en aguas poco profundas y las incidencias solares.

La temperatura es uno de los factores ambientales que se conocen por ser inductores de estrés oxidativo en hidrobiontes. El incremento de la temperatura puede estimular los procesos metabólicos en concordancia a los principios termodinámicos conocidos (Lushchak, 2011). A su vez, un incremento en las temperaturas puede ocasionar un decrecimiento en el índice gonadosomático en *L. variegatus* (Gibbs *et al.*, 2007) y alteraciones en los sustratos energéticos gonadales en *E. lucunter* (Reyes, 2015).

Según Vallenilla (2016), el estado antioxidante en las gónadas del erizo verdiblanco puede ser modificado por el ambiente. Este autor reportó daños oxidativos en los lípidos a nivel gonadal en *L. variegatus* colectados en el en el golfo de Cariaco durante la temporada de estratificación (26-28 °C). Se consideró que los registros de CAT y TBARS se encuentran asociados a los cambios de estadíos reproductivos de la especie, especialmente cuando se encuentran en etapas de su maduración gonadal y/o desoves parciales; fases gonadales típicas de la temporada ambiental más caliente. Adicionalmente, recientes publicaciones han reportado que la temperatura tiene un efecto inductor significativo de estrés oxidativo en otras especies de invertebrados, pudiéndose citar algunos ejemplos en los mejillones *Perna viridis* (Verlecar *et al.*, 2007), *Tapes philippinarum* y *Mytilus galloprovincialis* (Bocchetti *et al.*, 2008), en el poliqueto *Eurythoe complanata* (Zapata-Vívenes *et al.*, 2017) y en algunos peces (Lushchak y Bagnyukova, 2006).

Las temperaturas entre 28 a 32 °C desarrollaron una condición de estrés oxidativo en *L. variegatus*, fundamentado en un descenso en la actividad de CAT y los incrementos de lipoperoxidación (LPO) gonadal. En nuestro caso la disminución CAT sugiere un efecto directo de la elevación en las temperaturas sobre la estructura nativa de las proteínas ocasionando un desajuste cinético. Estos detalles pueden conllevar a evitar el control eficiente de los niveles fisiológicos de las especies reactivas del oxígeno (EROs), especialmente H₂O₂. Según González (2015) evaluando las defensas antioxidantes del erizo negro *E. lucunter* colectados en el golfo de Cariaco durante los meses de junio (27,82 °C) y octubre (29,93 °C) reportó niveles elevados de CAT y TBARS. Estas respuestas parecieran ser características de organismos influenciados térmicamente de manera natural (Zapata-Vívenes *et al.*, 2017). Estos últimos autores evidenciaron una respuesta fisiológica similar al estrés térmico en poliquetos aclimatados a 28 °C bajo condiciones controladas.

En *L. variegatus* se observó que los niveles de LPO incrementaron paralelamente al descenso de las actividades de CAT cuando ascienden las temperaturas, lo que sugiere que las defensas antioxidantes han sido sobrepasadas por la formación de radicales libres. Cuando ocurre un aumento en la producción de radicales libres se genera una serie de daños moleculares característicos del estado de estrés oxidativo, el cual demanda respuestas compensatorias antioxidantes para proteger la viabilidad funcional de las células y por ende de los tejidos (Abele *et al.*, 2011; Lushchak, 2011). Estos ajustes metabólicos son particularmente importantes en la capacidad de la desintoxicación contra EROs y otras especies moleculares reactivas, inducida por factores endógenos o exógenos.

Zapata-Vívenes *et al.* (2018) han sugerido que las defensas antioxidantes en los erizos son de suma importancia para la reproducción. Estos autores sugieren ajustes bioquímicos de las defensas antioxidantes en pos a la maduración gonadal. En *E. lucunter* se encontró que la actividad CAT puede incrementar en estadios de maduración máxima. Así pues, se sugiere que un incremento de la temperatura evitaría tales mecanismos de compensación molecular, conllevando a condiciones oxidantes agudas.

Se sabe que el H_2O_2 se puede formar en la respiración mitocondrial y atravesar fácilmente las membranas celulares, lo que conduciría a la destrucción de la membrana mitocondrial. Un radical puede extraer un hidrógeno de los ácidos grasos poliinsaturados en la membrana celular y generar dienos conjugados, el cual después de un rearreglo, fácilmente se combinaría con el oxígeno para dar un radical peroxil-lipídico (iniciación); este en una segunda vuelta puede extraer un hidrógeno a partir de otro ácido graso poliinsaturado (propagación) para dar un hidroperóxido lipídico y un nuevo radical lipídico que luego repite la cadena de eventos. Si no termina esta cadena de reacciones se llegaría a la destrucción de las membranas celulares, ruptura de compartimientos y liberación de enzimas lisosomales, apoptosis y autólisis (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Los grupos funcionales -SH son de importancia en el control del estrés oxidativo independiente de la fuente que lo provoque. 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. Zapata-Vívenes *et al.* (2018) muestran que los niveles de -SH varían con los estadios reproductivos en el erizo *E. lucunter*, disminuyendo durante el desove y las fases de recuperación o reserva, confirmando que los organismos en los estadios más maduros tienen a fortalecer su estatus antioxidante. Uno de los componentes antioxidante de mayor abundancia en gónadas, que contiene -SH, es el glutatión reducido (GSH) (Van-Laer *et al.*, 2013).

GSH es la principal protagonista en la destrucción de intermediarios de ERO, cumpliendo una serie de funciones como mantener el balance redox en las células, protegiéndola del estrés oxidativo (Lawrence y Balzhin, 1998). Este tiol de baja masa molecular actúa como antioxidante endógeno y amortiguador redox, siendo importante en la homeostasis celular. Otra molécula contentiva de grupo -SH es el ovotiol (π -metil-5-tiohistidina), se encontra presente en ovarios, huevos y fluidos biológicos de erizos. Esta molécula sirve como un barredor de radicales y peróxidos, siendo transformados 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 las 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 (Zapata-Vívenes y Nusetti, 2007).

La SOD es un removedor primario de $\bullet\text{O}_2$ generado durante la condición de estrés oxidativo. La inducción de esta enzima durante el estrés calórico puede indicar que ayuda a inhibir la acumulación de radical de oxígeno. Esto se logra mediante una mayor dismutación de $\bullet\text{O}_2$ a H_2O_2 , reduciendo así el daño oxidativo en las células. Estos detalles han sido demostrados en las branquias y en la glándula digestiva del bagre *Heteropneustes fossilis* (Parihar *et al.*, 1997). Adicionalmente, Keller *et al.*, (2004) demostraron un concomitante ascenso en las actividades de SOD, CAT y citrato oxidasa con el metabolismo energético usando mitocondrias aisladas en el oligoqueto *A. marina* durante el verano.

La disminución de la actividad de CCO en los organismos expuestos a 32 °C puede estar relacionada con la sensibilidad al choque térmico que puedan tener las mitocondrias en el tejido gonadal. Se presume que el incremento de la temperatura pudiera elevar la tasa metabólica y respiración celular en *L. variegatus* (Schindt-Nielsen, 1997); sin embargo, existe muy poca tolerancia de la especie al estrés térmico, lo que produce un efecto inhibitorio en las actividades de CCO a nivel de las membranas mitocondriales. Pörtner (2012) sugiere que los organismos con bajo límite de tolerancia térmica presentan tasas metabólicas reducidas, debido a la desestabilización de las membranas mitocondriales, ocasionando un desbalance en el bombeo de protones lo cual reduce la producción de ATP.

La respiración celular acoplada a la fosforilación oxidativa resulta en la reducción tetravalente del oxígeno molecular para formar agua, catalizada por citocromo C oxidasa del complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial (Cadenas *et al.*, 2000). En el curso de la conversión de O_2 a H_2O se forman secuencialmente el anión radical superóxido ($\bullet\text{O}_2$), el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) (Abele y Puntarulo, 2004). Estas especies moleculares reactivas oxigenadas son potencialmente

tóxicas a los sistemas biológicos, especialmente $\cdot\text{OH}$ que es un oxidante potente capaz de reaccionar indiscriminadamente con las biomoléculas de importancia, causando daños estructurales (Hermes-Lima, 2004). Casos similares ocurren en organismos colectados en temporadas de invierno y verano, en las cuales existen diferencias bien marcadas en las actividades de las enzimas y otros compuestos antioxidantes, que habitan en áreas marino-costeras de zonas templadas. En verano, las elevadas temperaturas conllevan a incrementar la actividad de las enzimas SOD, CAT y GPx (Wiston y Di Güilio, 1991).

La mitocondria regula los niveles de ATP celular, controla los picos de calcio citoplasmático, mantiene el balance redox de la célula, así como otros procesos metabólicos; es el común denominador de muchos de los procesos de muerte celular tanto apoptótica como necrótica (Turrens, 2003). Los resultados observados sobre las actividades de CCO de la cadena respiratoria sugieren una reducción en la velocidad de consumo de oxígeno posiblemente por presencia de mitocondrias fragmentadas por estrés térmico. Se evidencia que la temperatura puede afectar el normal funcionamiento de la cadena respiratoria, desacoplando la fosforilación oxidativa, lo que se refleja en la velocidad de consumo de oxígeno y en la actividad de la ATPasa (Bozinovic y Pörtner, 2015).

Los niveles de proteínas totales en *L. variegatus* presentan sus menores promedios en los organismos expuestos a temperaturas extremas bajo condiciones de laboratorio. Estos descensos en las concentraciones de proteínas están justificados por desoves parciales observados durante el experimento, especialmente al tercer día de exposición. Se conoce que los niveles de proteínas en las gónadas pueden verse afectado por la disposición de alimentos en el medio y sus necesidades fisiológicas de crecimiento y reproducción (Reyes, 2015; Vallenilla, 2016), siendo usado como un marcador nutricional y reproductivo. Algunos autores reportan que temperaturas cercanas a los 20 °C incrementan los niveles de algunas biomoléculas, generalmente como acción de almacenamiento. En otros erizos como *E. lucunter*, los niveles de

proteínas en el tejido gonadal incrementan sus reservas durante las temporadas donde las temperaturas oscilan entre 24 a 26 °C (González, 2015).

Es bien conocido que las proteínas son los componentes bioquímicos que se encuentra en mayor proporción, oscilando su contenido con el aumento de tamaño de las gónadas (Ochoa, 2016). El contenido de proteínas está relacionado con la acumulación de combustibles energéticos, paralelamente a los estadios reproductivos de dicho organismo (Zapata-Vívenes *et al.*, 2018). En un estudio similar en golfo de Cariaco, Reyes (2015) mostró concentraciones de proteínas elevadas en las gónadas de *E. lucunter*, en los meses de noviembre hasta mayo, temporada asociada al fenómeno de surgencia.

En erizos, al igual que en muchos organismos, existen un tipo de proteínas especializadas inducidas bajo condiciones de estrés térmico, denominadas “proteínas de choque térmico” (HSP); las mismas pertenecen a la familia 70 (HSP70) y 90 (HSP90). Tales biomoléculas cumplen funciones de protección y reparación celular, actuando como chaperonas estabilizadoras de las conformaciones espaciales que sufren las proteínas a causa del estrés celular (Sørensen *et al.*, 2003). Particularmente, la expresión de las HSP ha sido detectada en especies de erizos, tales como *Strongylocentrotus purpuratus* y *Paracentrotus lividus* (Hammond y Hofmann, 2010; Runcie *et al.*, 2012). Estos autores proponen los aumentos en la expresión de genes HSP como parte de la estrategia fisiológica de los organismos inter-mareales para ocupar nichos ecológicos cerca de sus límites térmicos.

Los invertebrados marinos que habitan en aguas poco profundas de los ecosistemas marinos, como las ensenadas o bahías costeras, son generalmente más vulnerables a los cambios de temperatura que las especies de mares abiertos, ya que en los cuerpos poco profundos el agua se calienta más rápidamente y logran las temperaturas máximas más altas (Philippart *et al.*, 2011). *L. variegatus* presentó promedios de tolerancia a las temperaturas relativamente bajos en contraste a otras especies de erizos, pudiendo resistir fluctuaciones de temperaturas cálidas y apacibles en períodos cortos de tiempo; sin embargo las temperaturas elevadas pueden ser fatales. De

igual manera, se ha demostrado en los primeros estadíos de vida, larvas de los erizos puedan llegar a experimentar temperaturas extremas en la zona intermareal, las cuales pueden llegar a superar su máximo de tolerancia termal y, consecuentemente, comprometer el inicio de la metamorfosis.

Por todo lo antes mencionado, y en relación a los hallazgos de esta investigación, se presume que según las predicciones del Panel Internacional del Cambio Climático (IPCC. 2014), los aumentos más grandes en temperaturas del agua de mar serán en el trópico (Rhein *et al.*, 2013), especulándose que las poblaciones de *L. variegatus* serán una de las primeras en alejarse de las zonas intermareales a zonas más profundas cercanas al limite inferior de sus zona de distribución natural, donde la temperatura serían mas estables, o los cambios de temperaturas menos bruscos. Por consiguiente, en un futuro no muy lejano las temperaturas pueden provocar la reducción total de esta especie, produciendo un impacto ecológico importante en las costas del estado Sucre.

CONCLUSIONES

La CE es afectada en los organismos sometidos a 32 °C y de manera inversa el PC fue reducido, demostrando la vulnerabilidad que posee *Lytechinus variegatus* a escenarios de elevadas temperaturas.

Las concentraciones de –SH y la actividad de SOD no presentaron variaciones significativas para ambos factores. Sin embargo, las actividades de CAT y CCO descienden en relación al ascenso de las temperaturas, observándose el efecto inhibitorio a la temperatura de 32 °C en el tercer día.

Los niveles de lipoperoxidación incrementan paralelamente al ascenso de las temperaturas, especialmente en los organismos expuestos a 28 y 32 °C, lo que podría traer consecuencias en la capacidad reproductiva de los organismos.

El descenso en las actividades de CAT, COO y el aumento de los niveles de TBARS en los erizos experimentales reflejan una condición de estrés oxidativo en las gónadas de *L. variegatus* a temperaturas superiores a los 28 °C.

BIBLIOGRAFÍA

- Abele, D. y Puntarulo, S. 2004. Formation of reactive species and induction antioxidant defense systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 138: 405-415.
- Abele, D.; Vazquez-Medina, J. y Zenteno-Savin, T. 2011. *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems*. Wiley-Blackwell. Pág. 548.
- Aebi, H. 1984. Catalase *in vitro*. *Methods. Enzimol.*, 105: 121-126.
- Aparicio, G. 2018. Defensas antioxidantes en el fluido celómico del erizo negro *Echinometra lucunter* (linnaeus, 1758) estimulado con inóculos bacterianos. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Bioanálisis. Universidad de Oriente. Núcleo Sucre.
- 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 al título de Licenciado en Bioanálisis. Universidad de Oriente. Núcleo Sucre.
- Birkeland, C. 1989. The influence of echinoderms on coral reef communities. En: Jangoux M. y Lawrence, J. M. (eds.). *Echinoderm Studies*. Balkema, Rotterdam, Brookfield, Estados Unidos de América. Págs. 1-79.
- Bocchetti, R.; Lamberti, C.; Pisanelli, B.; Razzetti, E.; Maggi, C.; Catalano, B.; Sesta, G.; Martuccio, G.; Gabellini, M. y Regoli, F. 2008. Seasonal variations of exposure biomarkers, oxidative stress responses and cell damage in the clams *Tapes philippinarum*, and mussels, *Mytilus galloprovincialis*, from Adriatic sea. *Mar. Environ. Res.*, 66: 24-26.
- Bozinovic, F. y Pörtner, H. 2015. Physiological ecology meets climate change. *Ecol. Evol.*, 5: 1025–1030
- 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*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 467: 33-38.
- Brunori, M.; Giuffrè, A. y Sarti, P. 2005. Cytochrome c oxidase, ligands and electrons. *J. Inorg. Biochem.*, 99: 324-336.
- Byrne, M.; Ho, M.; Selvakumaraswamy, P.; Nguyen, H.; Dworjanyn, S. y Davis, A. 2009. Temperature, but not pH compromises sea urchin fertilization and early development under near-future climate change scenarios. *Proceedings of the Royal Society, Biol. Sci.*, 276: 1883–1888.
- Byrne, M. 2011. Impact of ocean warming and ocean acidification on marine invertebrate life history stages. *Rev. Biol. Mar. Ocean.*, 49: 1-42.
- Byrne, M. y Przeslawski, R. 2013. Multistressor impacts of warming and acidification of the ocean on marine invertebrates' life histories. *Integr. Comp. Biol.*, 53:582–596

- Calva, 2002. Hábitos Alimenticios de Algunos Equinodermos. Parte 2. Erizos de mar y Pepinos de mar. Laboratorio de Ecosistemas Costeros, Depto. Hidrobiología. D.C.B.S. UAM-I. 2002.
- Cadenas, E.; Kelving, J. y Davies, A. 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Rad. Biol. Med.*, 29: 222-230.
- Castellano, I.; Migliaccio, O.; D'Aniello, S.; Merlino, A.; Napolitano, A. y Palumbo, A. 2016. Shedding light on ovothiol biosynthesis in marine metazoans. *Sci. Rep.* 6: 1-11.
- Canty, M.; Hutchinson, T.; Brown, R.; Jones, M. y Jha, A. 2009. Linking genotoxic responses with cytotoxic and behavioral or physiological consequences: differential sensitivity of echinoderms (*Asterias rubens*) and marine molluscs (*Mytilus edulis*). *Aquat. Toxicol.*, 94: 68–76.
- Chua, C.; Leggat, W.; Moya, A. y Baird, A. 2013. Temperature affects the early life history stages of corals more than near future ocean acidification. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 475: 85–92.
- Collins, M.; Knutti, R.; Arblaster, J.; Dufresne, J-L.; Fichet, T.; Friedlingstein, P.; Gao, X.; Gutowski, W.; Johns, T.; Krinner, G.; Shongwe, M.; Tebaldi, C.; Weaver, A. y Wehner, M. 2013. Long-term Climate Change: Projections, Commitments and Irreversibility. En: Stocker, T.F.; Qin, D.; Plattner, G-K.; Tignor, M.; Allen, S.K.; Boschung, J.; Nauels, A.; Xia, Y.; Bex, V. y Midgley, P.M. (eds) Climate Change 2013: The Physical Science Basis Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, USA
- Cruz-Motta, J. 2007. Análisis espacial de las comunidades tropicales intermareales asociadas a los litorales rocosos de Venezuela. *Cienc. Mar*, 33: 133-148.
- Di Giulio, R.; Benson, W.; Sander, B. y Vanveld, P. 1995. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation and toxicity. En: Fundamentals of Aquatic Toxicology. Rand, G.M. (Ed). Segunda Edición. Francis y Taylor London. Págs. 523-561.
- Du *et al.*, 2013 Free Radical Biology and Medicine Oxidative damage and cellular defense mechanisms in sea urchin models of aging. *Elsevier*, 63: 254–263.
- Dumont, C.; Drolet, D.; Himmelman, I. y Deschênes, J. 2007. Multiple factors explain the covering behaviour in the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Anim Behav.*, 73:979–986.
- Dupont, S. y Pörtner, H. 2013. Marine science: get ready for ocean acidification. *Nat*, 498: 429-429
- Ellman, G. 1958. Quantitative determination of peptides by sulfhydryl (-SH) groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, 82: 70-77.
- Fridovich, I. 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J. Exp. Biol.*, 201: 1203-1209.

- Gibbs, V.; Watts, S. y Lawrence, A. 2007. Effect of Temperature on Gamete Production and biochemical composition of gonads in the sea urchin *Lytechinus variegatus* Gulf of Mexico. *Mar. Biol.*, 2: 119–130.
- González, C. 2015. Marcadores de estrés oxidativo en el erizo negro *Echinometra lucunter* (Echinoidea: Echinometridae) de la ensenada de Turpialito, golfo de Cariaco. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de licenciado en Bioanálisis. Universidad de Oriente.
- Gómez-Gaspar, A. 2002. Abundancia de erizo *Lytechinus variegatus* (Lamarck) en la costa norte, este y oeste de la isla de margarita (Venezuela). *Acta Cient. Venez.*, 53: 1-7
- Halliwell, B. y Gutteridge, J. 1999. Free radicals in biology and medicine. 3th edition. University Press. Oxford.
- Hammond, L. y Hofmann, G. 2010. Thermal tolerance of *Strongylocentrotus purpuratus* early life history stages: mortality, stress-induced gene expression and biogeographic patterns. *Mar. Biol.*, 157: 2677-2687.
- Hamilton, M.; Russo, C. y Thurston, R. 1977. Trimmed Sperman-Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol. Libr.*, 11: 714-719.
- Hammer, H.; Powell, M. y Watts, S. 2013. Species Profile: Sea Urchins of the Southern Region, <http://fisheries.tamu.edu/files/2013/09/SRAC-Publication-No.-7211-Species-Profile-Sea-Urchins-of-the-Southern-Region>, downloaded 9 March 2016.
- Hendler, G., Miller J.E., Pewson D.L. y Kier P.M.. 1995. Sea star, Sea urchin and Allies: Echinoderms of Florida and the Caribbean. Smith. Inst. Washington. Pág 390
- Hermes-Lima, M. 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. En: Storey KB (ed). Functional metabolism: regulation and adaptation,. John Wiley & Sons, New York. Págs. 319-368
- Himmelman, J. 1986. Population biology of green sea urchin on rocky barrens. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 3: 295-306.
- Keller, M.; Sommer, A.; Portner, H. y Abele, D. 2004. Seasonality of energetic functioning and production of reactive oxygen species by lugworm (*Arenicola marina*) mitochondria exposed to acute temperature changes. *J. Exp. Biol.*, 207: 2529-2538.
- Kutra, T.; Timoneri, M.; Oliva, A. y Rinaldi, A. 1996. Isolation of cytochrome oxidase from sea urchin mitochondrial inner membranes. *Cell. Biol. Int.*, 20: 561-565.
- IPCC. 2014. Climate change 2014: synthesis report. In: Core Writing Team, Pachauri RK, Meyer LA, eds. *Contribution of working groups I, II, and III to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change*. Geneva: IPCC. Pág.151.
- Lawrence, J. y Balzhin, A. 1998. Life-history strategies and the potential of sea urchins

- for aquaculture. *J. Shell. Res.*, 17: 1515-1522.
- Ling, S. y Johnson, C. 2012. Marine reserves reduce risk of climate-driven phase shift by reinstating size-and habitat-specific trophic interactions. *Ecol. Appl.*, 22:1232–1245.
- Livingstone, D.; García-Martínez, P.; Michel, J.; Narbonne, J.; O'Hara, S.; Ribera, D. y Wiston, G. 1990. Oxiradicals production as a pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel. *Mytilusedulis* L. and other molluscs. *Fun. Ecol.*, 4: 415-424.
- Lodeiros, C. y Buitrago, E. 2011. Avances en el cultivo de erizos en Venezuela. XIII *Foro Recursos Marinos Acuicultura Rias Galegas.*, 13: 173-179.
- Lushchak, V. y Bagnyukova, T. 2006. Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 144: 283-289.
- Lushchak, V. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Rev. Aquatic. Toxicol.*, 101: 13-30.
- Millott, N. 1956. The covering reaction of sea urchins. A preliminary account of covering in the tropical echinoid *Lytechinus variegatus* (Lamarck), and its relation to light. *J. Exp. Biol.*, 33: 508-515.
- Moore, H.; Jutare, T.; Bauer, J. y Jones, J. 1963. The biology of *Lytechinus variegatus*. *Mar. Sci.*, 13:23-53.
- Noriega, N.; Cróquer, A. y Pauls, S. 2002. Población de *Lytechinus variegatus* (Echinoidea: Toxopneustidae) y características estructurales de las praderas de *Thalassia testudinum* en la Bahía de Mochima, Venezuela. *Biol. Trop.*, 50: 49-56.
- Nusetti, O.; Tovar, M. y Zapata-Vívenes, E. 2010. Pyruvate kinase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, cytochrome c oxidase and catalase activities in cadmium exposed *Perna viridis* subjected to anoxic and aerobic conditions. *J. Shellfish. Res.*, 29: 203-208.
- Ochoa, S. 2016. Índices de crecimiento del erizo verdi-blanco *Lytechinus variegatus* (Echinoidea: Toxopneustidae) en la ensenada de Turpialito (golfo de Cariaco), estado Sucre, Venezuela. Trabajo de grado. Universidad de Oriente. Cumaná.
- Parihar, M.; Javeri, T.; Hemnani, T.; Dubey, A. y Prakash, P. 1997. Response of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and reduce glutathione antioxidant defense in gills of freshwater catfish (*Heteropneustes fossilis*) to short term elevated temperature. *J. Therm. Biol.*, 22:151-156.
- Pawson, D. y Pawson, D. 2013. Bathyal sea urchins of the Bahamas, with notes on covering behavior in deep sea echinoids (Echinodermata: Echinoidea). Deep Sea Research Part II: *Top. Stud. Ocean.*, 92:207–213.
- Penchaszadeh, P.; León, C.; Alvarez, H.; Bone, D.; Castellano, P.; Castillo, M.; Diaz, T.; Garcia-Guardilla, M.; Lemus, M.; Losada, F.; Martin, A.; Miloslavich, P.; Paredes, C.; Perez, D.; Sebastiani, M.; Steconni, D.; Roa, V. y Villamizar, A. 2000.

Venezuela. En: *Seas at the millennium: an environmental evaluation*. Sheppard, C. (ed). Oxford Editor. Págs. 290-370.

- Philippart, C.; Anadon, R.; Danovaro, R.; Dippner, J.; Drinkwater, K.; Hawkins, S.; Oguz, T.; O'Sullivan, G. y Reid, P. 2011. Impacts of climate change on European marine ecosystems: observations, expectations and indicators. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 400: 52–69.
- Pinna, S.; Pais, A.; Campus, P.; Sechi, N. y Ceccherelli G. 2012. Habitat preferences of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 445 :173–180.
- Poore, A.; Graba-Landry, A.; Favret, M.; Brennand, H.; Byrne, M. y Dworjanyn, S. 2013. Direct and indirect effects of ocean acidification and warming on a marine plant–herbivore interaction. *Oecol.*, 173: 1113- 1124.
- Pörtner, H. y Langenbuch, M. 2005. Synergistic effects of temperature extremes, hypoxia, and increases in CO₂ on marine animals: from Earth history to global change. *J. Geophys. Res.*, 110: 101-112.
- Pörtner, H. 2012. Integrating climate-related stressor effects on marine organisms: unifying principles linking molecule to ecosystem-level changes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 470:273–290.
- Powis, G y Southorn, P. 1988. Free radicals in medicine I: chemical nature and biological reactions. *Mayo Clinic Proceedings.*, 63: 381-389.
- Przeslawski. R.; Ah Yong, S.; Byrne, M.; Worheides, G. y Hutchings, P. 2008. Beyond corals and fish: the effects of climate change on noncoral benthic invertebrates of tropical reefs. *Global Change Biol.*, 14:2773–2795.
- Raposo, D. 2017. Respuestas inmunológicas y estabilidad de las membranas lisosomales en el erizo verde-blanco *Lytechinus variegatus* (Echinoidea: Toxopneustidae) expuesto a cobre. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Bioanálisis. Universidad de Oriente. Núcleo Sucre.
- Reyes, J. 2015. Influencia de los factores ambientales sobre el ciclo reproductivo y la gametogénesis de *Echinometra lucunter* (Echinodermata: Echinoidea) en el nor-oriente de Venezuela, estado Sucre. Tesis de Doctorado. Universidad de Oriente. Cumaná.
- Rhein, M.; Rintoul, S.; Aoki, S.; Campos, E.; Chambers, D.; Feely, R.A.; Gulev, S.; Johnson, G.; Josey, S.; Kostianoy, A.; Mauritzen, C.; Roemmich, D.; Talley, L. y Wang, F. 2013. Observations: ocean. En: Stocker, T.F.; Qin, D.; Plattner, G.K.; Tignor, M.; Allen, S.K.; Boschung, J.; Nauels, A.; Xia, Y.; Bex, V. y Midgley, P.M. (Eds.) *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. University Press, Cambridge.

- Robinson, H. y Hogden, C. 1940. The biuret reaction in the determination of serum protein. *J. Biol. Chem.*, 135: 707.
- Roller, R. y Stickle, W. 1993. Effects of temperature and salinity acclimation of adults on larval survival, physiology, and early development of *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea). *Mar Biol.*, 116: 583-591.
- Rueda-Roa, D. y Muller-Karger, F. 2013. The southern Caribbean upwelling system: Sea surface temperature, wind forcing and chlorophyll concentration patterns. *Deep-Sea Res I.*, 78: 102-114.
- Rueda-Roa, D.; Ezer T. y Muller-Karger, F. 2018. Description and mechanisms of the mid-year upwelling in the southern caribbean sea from remote sensing and local data. *J. Mar. Sci. Eng.*, 6: 1-19.
- Runcie, D.; Garfield, D.; Babbitt, C.; Wygoda, J.; Mukherjee, S. y Wray, G. 2012. Genetics of gene expression responses to temperature stress in a sea urchin gene network. *Mol. Ecol.*, 21: 4547-4562.
- Schmidt-Nielsen, K. 1997. Animal Physiology: Adaptation and Environment. Cambridge University Press, Cambridge.
- Sherman, E. 2015. Can sea urchins beat the heat? Sea urchins, thermal tolerance and climate change. *Peer J.*, 3: 2-15.
- Sokal, R. y Rohlf, J. 2012. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. Fourth edition. WH Freeman and Company. San Francisco.
- Sørensen, J.; Kristensen, T. y Loeschcke, V. 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecol. Letters.*, 6: 1025-1037.
- Storey, K. 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 29:1715-1733.
- 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*. *Biogeosc.*, 11: 1413-1423.
- Turens, J. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.*, 522:335-344.
- Uthicke, S.; Liddy, M.; Nguyen, H. y Byrne, M. 2014. Interactive effects of near-future temperature increase and ocean acidification on physiology and gonad development in adult Pacific sea urchin, *Echinometra* sp. A. *Coral Reefs.*, 33:831-845.
- Vallenilla, A. 2016. Influencia de las variaciones ambientales sobre los niveles de lípidos peroxidados, actividad de catalasa y tioles totales en el erizo *Lytechinus variegatus* (Echinoidea:Toxopneustidae) en la ensenada de Turpialito, golfo de Cariaco, estado Sucre. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de licenciado en Bioanálisis. Universidad de Oriente.

- Van-Laer, K.; Hamilton, C. y Messens, J. 2013. Low-Molecular-Weight Thiols in Thiol-Disulfide Exchange. *Antiox. Red. Signal.*, 18: 1642-1653.
- Vasconcelos-Mendes, R. 2104. Efeito de estressores físicos em células do sistema imune, gametas e células embrionárias de ouriços-do-mar *Echinometra lucunter*. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas), Universidade Federal da Paraíba, Brasil.
- Verlecar, X.; Jena, K. y Chainy, G. 2007. Biochemical markers of oxidative stress in *Perna viridis* exposed to mercury and temperature. *Chem. Biol. Interact.*, 167: 219-226.
- Verling, E.; Crook, A. y Barnes, D. 2002. Covering behaviour in *Paracentrotus lividus*: is light important? *Mar. Biol.*, 140: 391–396.
- Verling, E.; Crook, A. y Barnes, D. 2004. The dynamics of covering behaviour in dominant Echinoid populations from American and European West coasts. *Mar. Ecol.*, 25: 191-206.
- Watts, S.; McClintock, J. y Lawrence, J. 2013. *Lytechinus*. Sea Urchins: Biology and Ecology. Developments in aquaculture and fisheries science. Lawrence J.M. (Ed). Tercera Edición. Elsevier B.V. Págs. 432.
- Wiston, G. y Di Giulio, R. 1991. Proxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.*, 19:137–161.
- Wolfe, K.; Dworjany, S. y Byrne, M. 2013. Effects of ocean warming and acidification on survival, growth and skeletal development in the early benthic juvenile sea urchin (*Heliocidaris erythrogramma*). *Glob. Chang. Biol.*, 19: 2698–2707.
- Zapata-Vívenes, E. y Nusetti, O. 2007. Protection of glycolytic enzymes by metallothioneins from oxidative damage in the digestive gland of green lipped mussel *Perna viridis*. *J. Shell. Res.*, 26: 1-10.
- Zapata-Vívenes, E.; Nusetti, O. y Marcano, L. 2017. Variaciones temporales de las defensas antioxidantes e índices proteína:ADN y ARN:ADN en el poliqueto *Eurythoe complanata*. *Rev. Biol. Mar. Ocean.*, 52: 529-538.
- Zapata-Vívenes E.; Kristel, A.; Reyes-Luján J.; Arrieche, D.; Guevara M. y Marcano L. 2018. Defensas antioxidantes, lipoperoxidación y sustratos energéticos durante el desarrollo gonadal del erizo negro *Echinometra lucunter*. *Bol. Inst. Ocean. Ven.*, 59 (1):1-10

HOJAS DE METADATOS

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

Título	EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LAS RESPUESTAS ANTIOXIDANTES Y CITOCROMO C OXIDASA EN EL ERIZO VERDI-BLANCO <i>Lytechinus variegatus</i>
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Dayana Navarro	CVLAC	17.779.761
	e-mail	sufixs@hotmail.com
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Biomarcadores
Glutation reducido
Tioles
Catalasa
Citocromo C oxidasa

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

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Biología	Ecotoxicología

Resumen (abstract):

Resumen

El erizo verdi-blanco *Lytechinus variegatus* presenta abundancia relativa en costas del golfo de Cariaco (Venezuela), habitando en la zona intermareal de aguas cálidas frecuentemente recubierto con pequeñas rocas, restos de corales, conchas de bivalvos y macroalgas. Los erizos han sido utilizados como especies importantes para estudiar los efectos del cambio climático, por lo tanto en esta investigación, *L. variegatus* sirvió como modelo biológico con el objetivo de estimar la modulación en sus defensas antioxidantes y el daño oxidativo en su tejido reproductivo en ambientes simulados de cambios controlados de temperaturas. Previamente, fue estimado el tiempo medio de sobrevivencia (Tms) de *L. variegatus* a distintas temperaturas. Se procedió a someter grupos entre 10 a 15 de organismos, de manera separada, a ambientes con temperaturas de 20, 25, 28 y 32 °C, durante 1 y 3 días. La capacidad de enderezamiento (CE) desde la posición invertida y el porcentaje de cobertura (PC) de la testa fueron monitoreados como marcadores de salud de los individuos y comportamiento en el ambiente. Las defensas antioxidantes tales como tioles solubles totales (-SH), actividades de las enzimas catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD); la actividad respiratoria mitocondrial estimada mediante la enzima citocromo C oxidasa (CCO); y el daño oxidativo a lípidos (TBARS) ó lipoperoxidación (LPO) fueron valorados en cada período de exposición. La sobrevivencia de los erizos es notablemente reducida en los organismos sometidos a 28 y 32°C, alcanzando su Tms_{28°C} a 12,66 d y Tms_{32°C} a 5,99 d, lo que mostró la vulnerabilidad que presenta el organismo a temperaturas elevadas. La CE solo fue afectada por la temperatura más elevada; al igual que fue reducido el PC en los organismos sometidos a 32°C correspondiente a movimiento casi nulos de los pies ambulacrales, espinas y dientes. Las concentraciones de -SH y la actividad de SOD no presentaron variaciones significativas para ambos factores. Sin embargo, las actividades de CAT y CCO descienden en relación al ascenso de las temperaturas, observándose el efecto inhibitorio a la temperatura de 32°C en el tercer día. A su vez, los niveles de TBARS incrementan en paralelamente al ascenso de las temperaturas, especialmente en los organismos expuestos a 28 y 32°C. El descenso en las actividades de CAT-CCO y el incremento en los niveles de TBARS en los erizos experimentales indican una condición de estrés oxidativo por estrés térmico en las gónadas, iniciándose a temperaturas > 28°C. Se concluye que el incremento atípico de las temperaturas del mar probablemente podría afectar el estatus antioxidante en el tejido germinativo, restringiendo así la reproducción y sobrevivencia de los erizos.

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

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Edgar Zapata	ROL	CA ☐ A ☐ T ☐ J ☐ S ☐ U ☐ U ☐
	CVLAC	12.269.219
	e-mail	ezapata@udo.edy.ve
	e-mail	
	ROL	CA ☐ A ☐ T ☐ J ☐ S ☐ U ☐ U ☐
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	ROL	CA ☐ A ☐ T ☐ J ☐ S ☐ U ☐ U ☐ x
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2018	07	27

Lenguaje: SPA

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

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
DayanaNAvarro.doc	Aplication/word

Alcance:

Espacial: UNIVERSAL

Temporal: INTEMPORAL

Título o Grado asociado con el trabajo:

Nivel Asociado con el Trabajo:

Área de Estudio:

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

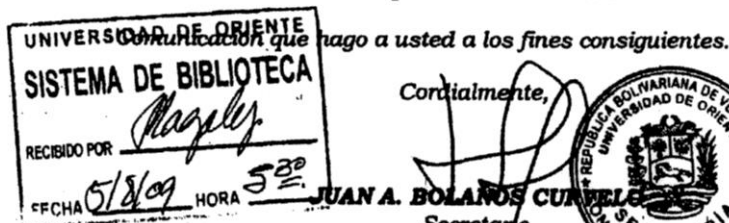
Cumaná, 04 AGO 2009

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.



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/marija

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

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

Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009): “Los trabajos de grados son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y solo podrá ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Concejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Concejo Universitario, para su autorización”.

Dayana Navarro
AUTOR