



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**Departamento de Ecología, Genética y Evolución**

**REPRODUCCION, ENERGETICA Y METABOLISMO OXIDATIVO DEL  
ERIZO COMESTIBLE *Loxechinus albus* EN EL CANAL BEAGLE,  
EXTREMO SUR DE SU DISTRIBUCION**

Tesis presentada para optar al título de

Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

**Lic. Analía Fernanda Pérez**

Director de tesis: Dr. Jorge Calvo

Director Asistente: Dra. Elba Morriconi

Consejero de Estudios: Dra. Graciela Esnal

Lugar de trabajo: Centro Austral de Investigaciones Científicas (CADIC - CONICET) -  
Departamento de Ecología, Genética y Evolución, FCEyN, UBA.

Buenos Aires, 2008

## Reproducción, energética y metabolismo oxidativo del erizo comestible *Loxechinus albus* en el Canal Beagle, extremo sur de su distribución.

En el erizo comestible *Loxechinus albus* se estudió el ciclo reproductivo por medio del estudio histológico de las gónadas, la densidad energética de los órganos y el metabolismo oxidativo en relación con los estadios gonadales. Adicionalmente se realizaron experiencias de mejoramiento gonadal.

*L. albus* presentó un ciclo reproductivo anual, alcanzando la madurez gonadal entre julio y agosto, produciéndose la evacuación entre septiembre y noviembre.

La densidad energética de las gónadas fue mínima en los estadios Premaduro II y Maduro y máxima en los estadios Post-evacuado e Inmaduro vinculándose con una mayor proporción de fagocitos nutritivos.

Las gónadas son el principal órgano de almacenamiento energético, seguidas por el intestino. Durante la gametogénesis no disminuye la asignación de recursos energéticos a otros órganos.

Los antioxidantes liposolubles presentaron niveles más elevados al inicio de la gametogénesis y posteriormente disminuyeron, incrementándose en los estadios Post-evacuado e Inmaduro. El índice de estrés  $A^*/AH^-$  fue mínimo durante la madurez gonadal sugiriendo un incremento en las defensas antioxidantes totales al finalizar la gametogénesis.

Diferentes dietas fueron ensayadas para mejorar las características organolépticas de las gónadas, los mejores resultados fueron obtenidos en la experiencia realizada durante el periodo pre-reproductivo utilizando una dieta con 0,045% de  $\beta$  caroteno durante 8 semanas.

Palabras claves: *Loxechinus albus*, reproducción, energética, metabolismo oxidativo, mejoramiento gonadal.

Reproduction, energetics and oxidative metabolism of the edible sea urchin, *Loxechinus albus*, at its southernmost distribution, the Beagle Channel.

The reproductive cycle of the edible sea urchin *Loxechinus albus* was studied by means of the histological analysis of gonads, the energetic density of organs, and the relation between oxidative metabolism and gonadal stages. Additionally, gonadal improvement experiments were performed.

*Loxechinus albus* presented an annual reproductive cycle, reached gonadal maturity between July and August, and evacuated its gametes between September and November.

The energetic density of gonads was minimum for the stages Premature II and Mature, and maximum for the stages Post-evacuated and Inmature, and was associated with a higher proportion of nutritious fagocytes.

Gonads are the principal energetic reserve organ, followed by the intestines. During gametogenesis, the assignment of resources to other organs did not decrease. Levels of liposoluble antioxidants were high at the beginning of gametogenesis and later decreased, increasing again in the stages Post-evacuated and Inmature. The stress index  $A^*/AH^-$  was minimum during gonadal maturity and suggested an increase of total antioxidant defenses by the end of gametogenesis.

Different diets were assayed to improve the organoleptic characteristics of gonads. The best results were obtained in the experiment conducted during the pre-reproductive period using a diet containing 0.045% of  $\beta$  carotene during 8 weeks.

Keywords: *Loxechinus albus*, reproduction, energetics, oxidative metabolism, gonadal improvement.

## **AGRADECIMIENTOS**

El desarrollo de esta tesis fue posible gracias a la colaboración y el apoyo de muchas personas que han participado directa o indirectamente.

A mis directores Jorge y Elba, por haberme recibido en el laboratorio cuando aun era una joven estudiante, por sus valiosos aportes durante todo el proceso de elaboración de esta tesis y por su comprensión durante mis malos momentos.

A Javier, por recibirme con los brazos abiertos en la FCEN y por la corrección del manuscrito.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de ecofisiología del CADIC:

A Gabriela, por haberme ayudado y enseñado mucho sobre metabolismo oxidativo y por su amistad.

A Claudia, por ayudarme con la estadística, la discusión de resultados, las correcciones de los manuscritos en inglés y sobre todo por su paciencia y cariño.

A Fabián, por la discusión de resultados, la planificación de los experimentos y por su compañerismo.

A Daniel A, por haber tenido una paciencia infinita durante las salidas de buceo y por su fiel amistad.

A Sonia, por ayudarme con los muestreos y con el cuidado de los erizos, por los mates y por su sincero cariño.

A Eugenia, por su ayuda con los manuscritos en inglés y por estar siempre dispuesta a colaborar.

A Daniel F, por estar siempre dispuesto a discutir resultados y por ayudarme con los primeros buceos.

A Charango, por el diseño de los acuarios, por sus buenas ideas y por estar siempre dispuesto a dar una mano.

A Santiago y Mariela por su compañerismo.

A Chelo, Marisa y Luciana, por colaborar con el cuidado de los erizos y con los muestreos.

A Pato, por colaborar desinteresadamente en todas las etapas de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y al Global Environmental Fund, por la beca y por financiar los proyectos.

A Marcelo Pérez y a los hermanos Cabdet, por su buena predisposición a la hora de salir a navegar por el Canal.

A los integrantes del laboratorio de biología de crustáceos por estar siempre dispuestos a colaborar, responder mis inquietudes y ser muy buenos “vecinos”.

A Marcelo Hernando, por facilitarme los datos de clorofila, por su compañerismo y “simpatía”.

A todo el personal de CADIC.

A mi consejera de estudios Graciela Esnal, por responder pacientemente mis inquietudes.

A Pedro Francisco Carcamo del IFOP, por sus generosos, desinteresados y valiosos aportes durante el desarrollo de la tesis.

A la Dra. Susana Puntarulo y a todos los integrantes la Cátedra de Fisicoquímica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA), por su amabilidad y por facilitarme las instalaciones de la cátedra.

A los Doctores J Pearse, J Lawrence, C Pearce, J McClintock y J Himmelman por facilitarme bibliografía y realizar valiosos comentarios durante estos años.

A los integrantes del laboratorio de nutrición animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UBA) por la donación de la premezcla de vitaminas y minerales.

A Coomarpes LTDA (Mar del Plata, Argentina), por la donación de varios kilos de harina de pescado.

A Ana y Luís de la oficina de doctorado de la FCEN, por haberme explicado pacientemente los pasos a seguir y simplificarme todo a pesar de la distancia.

A mis nuevos compañeros Jess, Pato, Javier y Daniel. A Sebas, Martín y Emi, por su buena onda.

A las chicas de la casa "A": Pato, Naty, Nel, Marce, Emi y Gui por haberme acompañado durante estos años, ya que sin su amistad hubiese resultado muy muy difícil estar allí.

A Guille, Pato y Emi, por su apoyo incondicional durante tiempos complicados.

A Carlos Luizón, por facilitarme información sobre erizos y por sus manjares.

A mis amigos Fuegoños: Noe, Juan, Pablo, Pato, Naty, Nel, Marce, Emi, Gui, Pancho, Fer, Mummy, Coty, Gaby, Mariano, Angy, Lucy y Beni, por haberme acompañado y brindado su cariño durante todos estos años.

A Guille S y Lidita, por alentarme a seguir, por acompañarme en la distancia, por escucharme durante todos estos años y por recibirme con los brazos abiertos en sus hogares.

A Jess, por su amistad y compañerismo.

A Matías, por resolver problemas informáticos surgidos a último momento.

A Abel, Esther, Guille, Cocho y Duquesa por su cariño incondicional y por hacerme sentir como en casa durante mis viajes a Bs. As.

A mamá, por enseñarme a trabajar dedicadamente y a mi papá, por transmitirme su curiosidad por el mundo que nos rodea. A ambos, por guiarme en la vida y por su apoyo incondicional en cada actividad que he emprendido. A Pabli y a mis abuelos, por estar siempre.

A Coco, por su paciencia y comprensión durante todos estos meses, por sus aportes al desarrollo de esta tesis y sobre todo por su amor.

*¡A todos ellos muchas gracias!*

*A mis seres queridos*

**ÍNDICE GENERAL**

<u>RESUMEN</u>	II
<u>ABSTRACT</u>	IV
<u>AGRADECIMIENTOS</u>	V
<u>DEDICATORIA</u>	VIII
<u>ÍNDICE GENERAL</u>	IX
<b>CAPÍTULO 1. Introducción general</b>	1
<i>Loxechinus albus</i>	1
Distribución y Hábitat	1
Morfología Externa	4
Digestión y Dieta	5
Reproducción	6
Bioenergética	7
Equinoideos del Canal Beagle	7
Importancia del Presente Estudio	8
<b>CAPITULO 2. Metodología general</b>	10
El Área de Estudio	10
Muestreo y Mantenimiento de los Animales	13
Tratamiento General de las Muestras	16
Cálculo de Índices	21
<b>CAPITULO 3. Reproducción</b>	23
<u>INTRODUCCIÓN</u>	23
<u>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u>	26
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	27
Muestreo	27
Parámetros Ambientales	27
Determinaciones Histológicas	27
Determinaciones Calorimétricas	28
Esfuerzo Reproductivo	30
Tratamiento Estadístico de los Datos	30
<u>RESULTADOS</u>	32
Proporción de Sexos	32
Parámetros Ambientales e Índice Gonadal	32

Estructura Macroscópica de las Gónadas	33
Estructura Microscópica de las Gónadas	34
Estadíos Gonadales	36
Estadíos Gonadales Femeninos	36
Ciclo Reproductivo Femenino	40
Estadíos Gonadales Masculinos	42
Ciclo Reproductivo Masculino	45
Índices Gonadales y Estadíos Gonadales	46
Densidad Energética y Estadíos Gonadales	47
Contenido Energético y Estadíos Gonadales	48
Esfuerzo Reproductivo	49
<u>DISCUSION</u>	50
<b>CAPITULO 4. Energética</b>	55
<u>INTRODUCCIÓN</u>	55
<u>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u>	57
<u>MATERIALES Y METODOS</u>	58
Muestreo	58
Determinaciones Calorimétricas	58
Determinación de Materia Orgánica	58
Tratamiento Estadístico de los Datos	58
<u>RESULTADOS</u>	60
Índice Gonadal	61
Índices Somáticos	62
Índice Intestinal	62
Índice de Líquido Celómico	63
Índice de Linterna de Aristóteles y de Caparazón	63
Contenido de Materia Orgánica del Caparazón y de la Linterna de Aristóteles	64
Densidad Energética de las Gónadas	66
Densidad Energética del Intestino	67
Contenido Energético de las Gónadas	68
Contenido Energético del Intestino	69
<u>DISCUSIÓN</u>	70
<b>CAPITULO 5. Metabolismo oxidativo</b>	75
<u>INTRODUCCION</u>	75
Radicales Libres y Especies Reactivas del Oxígeno (ROS)	77

Daño a Macromoléculas	79
Antioxidantes	81
Concepto y Evaluación de Estrés Oxidativo	85
<u>HIPÓTESIS Y OBJETIVO</u>	87
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	88
Muestreo	88
Determinaciones Histológicas	88
Determinación del Índice de Estrés	88
Determinación de la Concentración de Radical Ascorbilo (A <sup>*</sup> )	88
Determinación de la Concentración de Ascorbato (AH <sup>-</sup> )	89
Determinación de Índices de Daño a Lípidos	89
1) Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)	89
2) Determinación de la Concentración de Radicales Lipídicos	89
Determinación de Carotenos Totales	90
Determinación de la Concentración de Antioxidantes no Enzimáticos Liposolubles	91
Simulación de Espectros de EPR	92
Tratamiento Estadístico de los Datos	92
<u>RESULTADOS</u>	93
Índice de Estrés: Relación Ascorbilo/Ascórbico	93
Índice de Daño a Lípidos	95
1) Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)	95
2) Radicales Lipídicos	97
Carotenos Totales	99
Antioxidantes no Enzimáticos Liposolubles	100
β Caroteno	101
Equinenona	102
α Tocoferol	103
Correlaciones entre las Variables Analizadas	105
<u>DISCUSION</u>	106
<b>CAPITULO 6. Mejoramiento gonadal y crecimiento somático</b>	114
<u>INTRODUCCIÓN</u>	114
Influencia de la Alimentación sobre las Gónadas y su Aspecto	114
Eficiencia en la Asimilación de Alimentos	116
<u>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u>	118
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	119
Preparación de las Dietas	119

Diseño Experimental	123
Tasas de Incremento	125
Índices	125
Contenido de Carotenos Totales	126
Determinaciones Calorimétricas	126
Determinación de Materia Orgánica	127
Eficiencia de Asimilación	127
Tratamiento Estadístico de los Datos	128
<u>RESULTADOS</u>	129
Experimento 1. Periodo Post Reproductivo	130
Influencia de las Diferentes Dietas en la Supervivencia y Tasas de Incremento Corporal	131
Influencia de las Diferentes Dietas en Índices Somáticos y Gonadales	132
Influencia de las Diferentes Dietas en la Densidad y Contenido Energético	138
Influencia de las Diferentes Dietas en la Materia Orgánica del Caparazón y la Linterna de Aristóteles	140
Influencia de las Diferentes Dietas en los Carotenos Totales	141
Experimento 2. Periodo Pre Reproductivo	142
Influencia de Diferentes Dietas en la Supervivencia y Tasas de Incremento Corporal	142
Influencia de las Diferentes Dietas en Índices Somáticos y Gonadales	143
Influencia de las Diferentes Dietas en la Densidad y Contenido Energético de las Gónadas	149
Influencia de las Diferentes Dietas en la Materia Orgánica del Caparazón y la Linterna de Aristóteles	151
Influencia de las Diferentes Dietas sobre los Carotenos Totales en la Gónada	152
Influencia de las Diferentes Dietas en la Eficiencia de Asimilación	153
<u>DISCUSION</u>	154
<b>CAPÍTULO 7. Efecto de los carotenoides sobre el metabolismo oxidativo de <i>Loxechinus</i> <i>albus</i></b>	162
<u>INTRODUCCION</u>	162
<u>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u>	164
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	165
Diseño Experimental	165
Tratamiento Estadístico de los Datos	165
<u>RESULTADOS</u>	167
Experimento 1	167
Índice de Daño a Lípidos	167
1) Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)	167

---

2) Radicales Lipídicos	169
Antioxidantes no Enzimáticos Liposolubles	172
β Caroteno	172
Equinenona	174
α Tocoferol	175
Índice de Estrés: Relación Ascorbilo/Ascórbico	177
Experimento 2	181
Índice de Daño a Lípidos	181
1) Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)	181
2) Radicales Lipídicos	183
Antioxidantes no Enzimáticos Liposolubles	185
β Caroteno	185
Equinenona	187
α Tocoferol	188
Índice de Estrés: Relación Ascorbilo/Ascórbico	189
<u>DISCUSION</u>	193
<b>CAPÍTULO 8. Conclusiones</b>	199
<b>CAPÍTULO 9. Referencias</b>	204

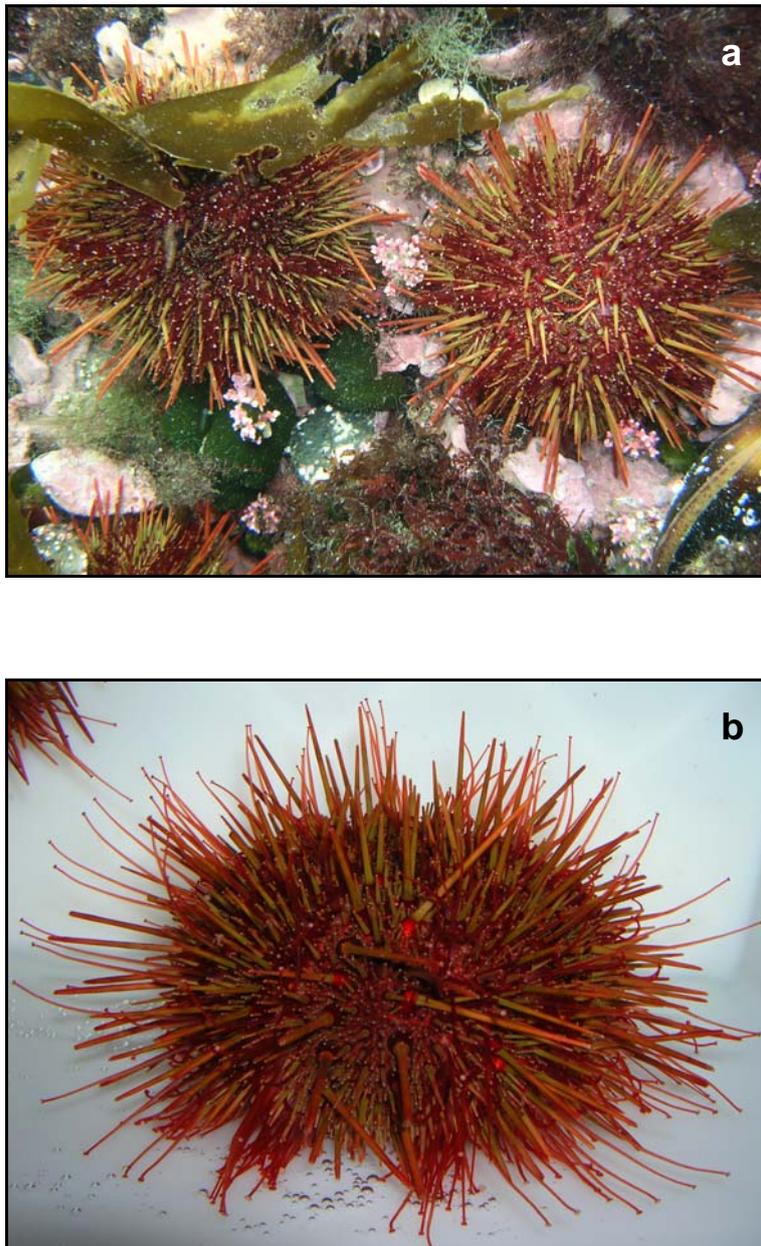
### **Loxechinus albus**

*Loxechinus albus* (Molina 1782) es el único representante sudamericano de la familia Strongylocentrotidae (Bernasconi 1953) perteneciente al orden Camarodonta (Echinoidea).

*L. albus* es una de las especies económicamente más importantes en el sistema béntico litoral del Pacífico de América del Sur (Figura 1.1). Esta especie ha sido usada como un recurso alimenticio por poblaciones costeras de indígenas chilenos desde los tiempos precolombinos (Deppe y Viviani 1977; Jerardino *et al.* 1992; Vásquez *et al.* 1996). El primer reporte sobre desembarcos de *L. albus* se realizó en 1957, mostró una extracción de 4000 Tm, de la línea de costa chilena, desde entonces los desembarcos se han ido incrementando (SERNAP 1957-1999). Esta pesquería se ha expandido y es mantenida principalmente por los desembarcos realizados entre 42° y 56° de latitud Sur. Este erizo comestible ha sido explotado esporádicamente en el Canal Beagle, en las cercanías de Bahía Ushuaia, siendo especialmente destinado al mercado local, al turismo proveniente de Oriente y ocasionalmente exportado a Chile.

### **DISTRIBUCIÓN Y HÁBITAT**

El erizo comestible *L. albus* es una especie típica del litoral Pacífico, extendiéndose desde la Isla Lobos de Afuera, Perú (6° latitud Sur) hasta el extremo sur de América del Sur (Cabo de Hornos, Chile 56° latitud Sur). Se distribuye también a través del Estrecho de Magallanes y del Canal Beagle (54° latitud Sur) (Bernasconi 1947), pero no se lo ha encontrado en la costa atlántica. Su distribución batimétrica se localiza entre la zona intermareal hasta los 340 metros de profundidad (Larrain 1975).



**Figura 1.1.** *Loxechinus albus*. **a)** Foto subacuática de dos individuos adultos. **b)** Individuo con los pies ambulacrales extendidos, de aproximadamente 80 mm. de diámetro máximo. Fotos: D. Aureliano.

*L. albus* está íntimamente asociado con bosques de *Macrocystis pyrifera*, siendo más abundante en latitudes superiores a 40° S, donde los bosques de *Macrocystis* tienen mayor desarrollo. Se desplaza sobre los fondos rocosos utilizando las espinas y los pies ambulacrales (Viviani 1975; Bustos *et al.* 1990).

Los individuos pequeños se encuentran debajo de cantos rodados o en grietas de las rocas. En contraste con lo que ocurre con otros equinoideos, los adultos de *L. albus* no habitan en grampones de *M. pirifera* (Vásquez *et al.* 1984). Es poco usual la presencia de *L. albus* en áreas protegidas del oleaje, mostrando una alta densidad en habitats expuestos a las olas (Vásquez *et al.* 1984, Dayton 1985).

*L. albus*, como la mayoría de los equinoideos, presenta fototropismo negativo, se localizan en grietas entre las rocas, cubriéndose con conchas, trozos de algas, piedras pequeñas, etc, utilizando para ello sus pies ambulacrales (Figura 1.2).



**Figura 1.2.** *Loxechinus albus* con el cuerpo cubierto por rocas, algas coralinas y *Codium* sp.

## MORFOLOGÍA EXTERNA

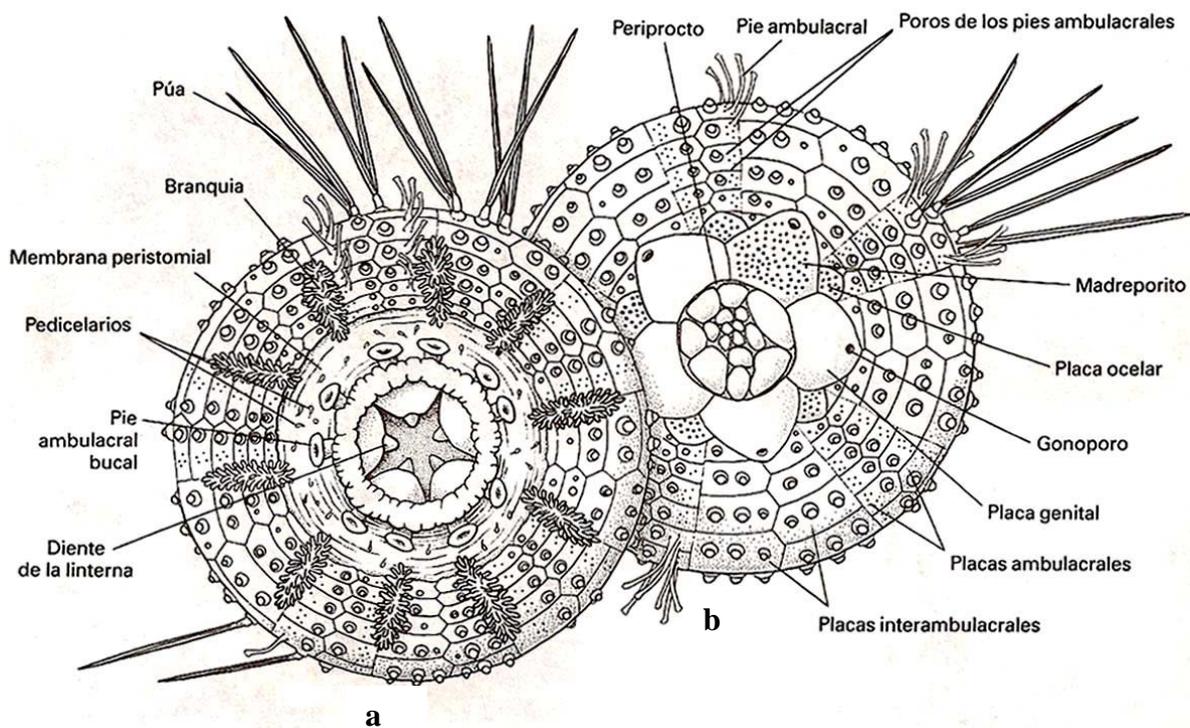
El cuerpo de *L. albus* está recubierto por un caparazón semiesférico, formado por la fusión de osículos calcáreos. Su diámetro máximo es de aproximadamente 11 cm, ubicándose entre los erizos de mayor talla.

El caparazón y las púas son de color verde con un tono rojizo que depende de los pies ambulacrales, ocasionalmente presenta estrías meridianas. Aquellos que viven en profundidades muestran estrías blanquecinas (Vidal Santana 2003). El caparazón tiene simetría pentarradial, y se encuentra recubierto por púas relativamente largas y móviles. El cuerpo puede dividirse en dos hemisferios, uno aboral y otro oral, con diferentes estructuras dispuestas alrededor del eje polar (oral-aboral). La boca se encuentra en el centro de la superficie inferior rodeada por una membrana peristomial, en *L. albus* esta membrana es relativamente pequeña en relación al diámetro del animal (Bernasconi 1953). Sobre ella se encuentran los pies ambulacrales bucales y 5 pares de branquias (Vidal Santana 2003) (Figura 1.3).

En el polo aboral se encuentra el orificio anal rodeado por una membrana periproctal. Alrededor del periprocto hay cinco placas grandes llamadas placas genitales, cada una de ellas se encuentra perforada por un gonoporo, una de estas placas es porosa y funciona como madreporito. Otras cinco placas más pequeñas llamadas placas ocelares se encuentran excluidas del periprocto (Bernasconi 1953; Ruppert y Barnes 1996) (Figura 1.3).

La superficie del cuerpo puede dividirse en 10 secciones radiales que convergen a nivel de los polos oral y aboral. Cinco de estas secciones presentan pies ambulacrales y se denominan áreas ambulacrales; se alternan con las otras cinco en las que no hay pies ambulacrales y a las que se conoce como áreas interambulacrales (Ruppert y Barnes 1996). Tanto las áreas ambulacrales como las interambulacrales están constituidas por dos placas cada una. En las placas ambulacrales hay perforaciones por las que emergen

los pies ambulacrales. Las áreas interambulacrales están constituidas por placas sin perforaciones (Vidal Santana 2003) (Figura 1.3).



**Figura 1.3.** Anatomía externa del erizo de mar regular *Arbacia punctulata*. **a**, vista oral **b**, vista aboral (según Reid, W.M. en Brown, F.A. Selected Invertebrate Types. John Wiley and Sons. New York.). Modificado de Ruppert y Barnes 1996.

## DIGESTIÓN Y DIETA

Los erizos se alimentan cortando trozos de macroalgas por medio de un aparato bucal provisto de cinco dientes de bordes afilados, movidos por una estructura muscular unida a osículos calcáreos que conforma la linterna de Aristóteles. En el interior de la linterna de Aristóteles se encuentra la cavidad bucal y una faringe que se continúa en un esófago. Este último, por fuera de la linterna de Aristóteles se une a un estómago tubular que desemboca en un intestino de paredes delgadas. Dicho intestino asciende luego para

unirse al recto, el que se abre al exterior mediante el ano, ubicado en la región aboral (Vidal Santana 2003).

*L. albus* es uno de los herbívoros bentónicos más importantes en ambientes intermareales y submareales rocosos de la costa chilena (Dayton 1985; Vásquez y Buschmann 1997), por su intensa actividad de ramoneo son considerados “modeladores” de las comunidades de macroalgas (Dayton 1975). Aunque la información disponible sobre contenido intestinal de las poblaciones naturales es muy escasa (Vásquez 2001), la dieta de los individuos de mayor talla está constituida principalmente por algas Clorophytas, Phaeophytas y Rhodophytas. Aunque no existen evidencias directas sobre las estrategias de forrajeo de *L. albus*, algunos estudios indican que no existe preferencia de consumo de ítems alimenticios (Bückle *et al.* 1980; Vásquez *et al.* 1984). Se ha sugerido que los individuos adultos de *L. albus* son generalistas, que consumen las algas más abundantes en cada localidad (Vásquez 2001).

Los individuos pequeños de *L. albus* se alimentan de algas coralinas incrustantes, de la película de diatomeas bentónicas y de porciones de macroalgas a la deriva (Castilla y Moreno 1982; Contreras y Castilla 1987).

## REPRODUCCIÓN

*L. albus* es una especie dioica que no presenta dimorfismo sexual. Posee cinco gónadas suspendidas a lo largo de las zonas interambulacrales, sobre la cara interna del caparazón. De cada gónada parte un gonoducto corto que se extiende aboralmente hasta desembocar en un gonoporo localizado sobre una de las cinco placas genitales. Las células sexuales son expulsadas al agua de mar por los gonoporos (Vidal Santana 2003). Diferentes aspectos de la biología reproductiva de la especie han sido estudiados en varias localidades, a lo largo de la costa pacífica chilena y también en la costa argentina del Canal Beagle, mostrando marcadas variaciones en la época y duración del desove (Bustos *et al.* 1990, 1991; Orlor y Calvo 1991), esto permite suponer que presenta gran

plasticidad reproductiva por lo que resulta particularmente interesante la investigación de sus respuestas a estímulos ambientales.

### **BIOENERGETICA**

Debido a que los erizos no poseen órganos de reserva discretos, las células accesorias llamadas fagocitos nutritivos, ubicadas en el interior de las gónadas acumulan las sustancias de reserva que, en parte al menos, serán utilizadas como fuente de energía durante la gametogénesis (Chia *et al.* 1983). Una función semejante es también cumplida en algunas especies de erizos por el tubo digestivo y en menor medida por el caparazón (Unuma *et al.* 2003).

La asimilación de los alimentos y su transferencia entre los diferentes compartimentos del organismo dependen en buena parte de la calidad y cantidad de alimento ingerido. Esos factores en medio natural o experimental influyen de manera importante tanto en el crecimiento individual (Beddingfield y McClintock 1998) así como en el tamaño y aspecto de las gónadas de los erizos (Lawrence *et al.* 1997; Pearce *et al.* 2002).

### **EQUINOIDEOS DEL CANAL BEAGLE**

En el litoral fueguino se han descripto cuatro especies de equinoideos regulares, *Pseudechinus magellanicus*, *Loxechinus albus*, *Arbacia dufresnei* y *Austrocidaris canaliculata*. Estudios realizados en Puerto Toro, Isla Navarino (55° 50' latitud Sur y 67° 4' longitud Oeste) indican que *L. albus* es la especie más importante en términos de biomasa (89,8%) mientras que *P. magellanicus* presenta la densidad más alta (Castilla y Moreno 1982).

Según Vásquez *et al.* (1984), estas dos especies difieren en cuanto a la preferencia de hábitat. *L. albus* presenta mayor densidad en la zona submareal correspondiente a la sección media del cinturón de *Macrocystis pyrifera*, mientras que *P. magellanicus* es

abundante desde la zona intermareal hasta el borde inferior del cinturón de *M. pyrifera*. Una distribución similar fue descrita por Orler (1992) para el Canal Beagle.

### **IMPORTANCIA DEL PRESENTE ESTUDIO**

Cabe señalar que en territorio argentino esta especie sólo cuenta con poblaciones establecidas en la zona costera del litoral de Tierra del Fuego e Isla de los Estados, toda investigación que aporte al conocimiento de la biología básica, la regulación y mejora de la explotación de esta especie sólo puede originarse en esta zona.

Las poblaciones de *L. albus* que habitan el Canal Beagle se encuentran en el límite Sur de su distribución geográfica, debiendo soportar las condiciones ambientales extremas típicas de los ambientes de altas latitudes: estacionalidad muy marcada en la productividad, gran amplitud del fotoperíodo y muy bajas temperaturas del agua de mar. De esa manera, el conocimiento de aspectos biológicos referidos a su reproducción, asignación de recursos energéticos y metabolismo oxidativo en relación con los cambios ambientales estacionales permitirá avanzar en el establecimiento de patrones de comparación vinculados a la distribución latitudinal de esta especie

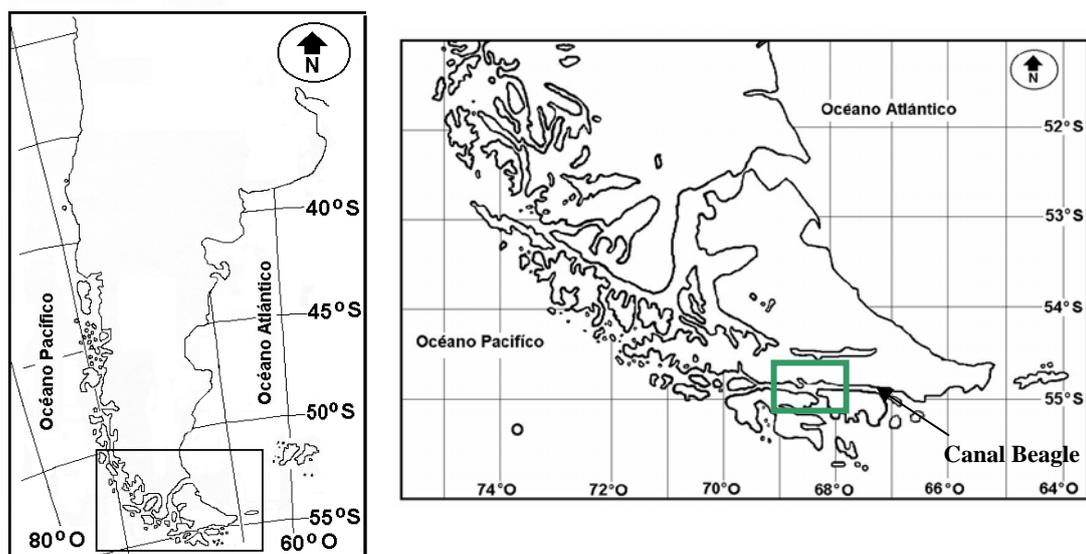
La información existente sobre otras poblaciones de *Loxechinus albus* (Hagen 1996) indica que es una especie de crecimiento lento, con limitaciones en el reclutamiento de sus juveniles, por lo que es importante optimizar el rendimiento de las capturas mejorando su calidad.

En este trabajo de tesis doctoral se realiza el primer aporte al conocimiento del metabolismo oxidativo de los equinoideos durante el ciclo reproductivo. Es de destacar que este tipo de información es escasa o nula para los equinoideos así como para otros grupos de invertebrados marinos. La información biológica generada podrá ser utilizada para el mejoramiento de la sustentabilidad de la explotación de este importante recurso pesquero artesanal, hasta ahora sub-explotado en las costas fueguinas. De esta manera

se podrán proporcionar nuevas y mejores oportunidades de explotación sustentable de una especie autóctona de valor en el mercado internacional. Una de las aplicaciones de los experimentos de mejoramiento de la calidad gonadal con dietas artificiales permitirá la reducción del número de las capturas manteniendo o incrementando el valor económico de las mismas.

## EL ÁREA DE ESTUDIO

El Canal Beagle está situado en el extremo austral de Sudamérica ( $55^{\circ}$  S;  $68^{\circ}$  O) y separa al norte la Isla Grande de Tierra del Fuego, de las islas Navarino y Hoste al sur (Figura 2.1). Su límite oriental está dado por la línea imaginaria que une Punta Final y el extremo oriental de la Isla Nueva. Hacia el oeste, el canal se divide en dos brazos: el Sudoeste, que desemboca en la Bahía Cook; y el Noroeste que lo hace en el seno Darwin, comunicándose a través de estos últimos con el Océano Pacífico (Balestrini *et al.* 1998). Su límite occidental está dado por el Cabo Kekhlao, extremo oeste de la Isla Hoste (Servicio de Hidrografía Naval 1981).



**Figura 2.1.** Ubicación georeferenciada del área de muestreo de *L. albus* en Tierra del Fuego. El recuadro verde delimita la zona de estudio.

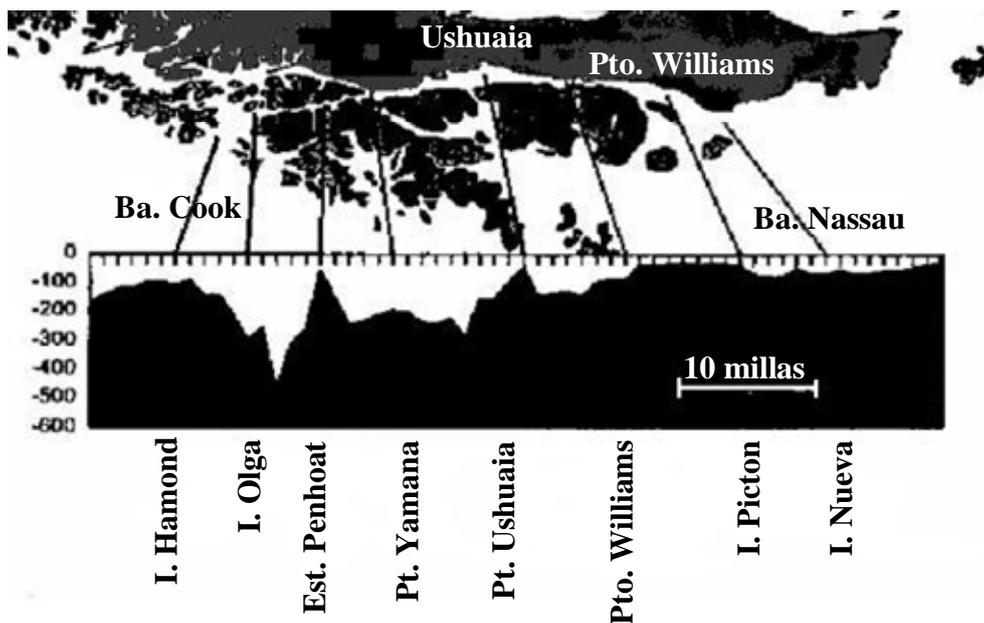
El Canal Beagle es un antiguo valle glacial elongado en sentido este-oeste con una extensión aproximada de 210 km y 4 km de ancho promedio. Es posible que haya estado ocupado por un lago glacial 9400 años antes del presente, que habría sido invadido por el

mar luego de la apertura de un extremo del canal hace aproximadamente 8200 años. El ambiente marino se habría establecido totalmente hace 7900 años (Rabassa *et al.* 1986). Por sus características glaciarias, la profundidad del canal es muy variable, y disminuye de oeste a este (Figura 2.2). El Brazo Noroeste constituye una cuenca que alcanza profundidades de hasta 350-400 m y termina hacia el este en una constricción angosta y poco profunda (de unos 80 m) (Isla del Diablo) que lo separa abruptamente del Canal Beagle. Por otra parte, el sector Brazo Sudoeste del Canal Beagle puede dividirse en 3 partes debido a la existencia de 2 sectores de baja profundidad: uno de 30 m a la mitad del Brazo Sudoeste y otro de 45 m a la altura de la Península Ushuaia, aproximadamente (Figura 2.2). Hacia el este el Canal Beagle es cada vez menos profundo especialmente al este de Puerto Williams (40-60 m). Sobre la base de perfiles de profundidad y otros accidentes topográficos, la profundidad del canal se encuentra restringida en ciertos sectores por la presencia de morenas glaciarias. Las islas Bridges forman un conjunto de islas de diferente tamaño en las cercanías de Bahía Ushuaia.

Antezana (1999) subdividió el sistema Estrecho de Magallanes/Canal Beagle en cinco microcuencas, una de las cuales está compuesta por el Brazo Sudoeste y el Canal Beagle. Balestrini *et al.* (1998) y Antezana (1999) reportan que el sentido de circulación principal del agua es de oeste a este. No obstante, dadas las bajas profundidades de ciertos sectores del Canal Beagle, el intercambio de agua con el Pacífico estaría restringido a la capa superficial. Este intercambio sería menor que el que ocurre entre los canales mismos, constituyendo un sistema semicerrado. Ello implica que los aportes de nutrientes, de material de origen terrígeno o antrópico, así como larvas y otras partículas, una vez localizados en los estratos de aguas profundas, difícilmente sean exportados del sistema por medios no biológicos.

La corriente residual o permanente en aguas abiertas del Canal Beagle alcanza velocidades promedio a los  $7 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$  con sentido Oeste - Este (Balestrini *et al.* 1998). En la zona interior de Bahía Ushuaia las corrientes son débiles y alcanzan un máximo de 2,6

$\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ , mientras que alrededor de las Islas Bridges son más fuertes, fluctuando entre 16 y  $32,5 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ . Dentro de la Bahía Ushuaia las corrientes de deriva generadas por los vientos dominantes giran en sentido antihorario, y se dirigen hacia el oeste bordeando la península y atravesando el área de las Islas Bridges (Balestrini *et al.* 1998).



**Figura 2.2.** Perfil del fondo en la microcuenca Brazo Sudoeste - Canal Beagle. Redibujado de Antezana (1999).

El material de fondo del canal es en general fango - arenoso (Brambati *et al.* 1991). En la boca oriental, el fondo está conformado principalmente por arena fina. Continuando hacia el oeste, aproximadamente a la altura de Bahía Ushuaia, se encuentra un fondo conformado por arena gruesa y conchilla, como así también por material fino y arcillas, que continúa hacia el oeste en fondos de fango y arena. En el tramo occidental del canal el fondo está conformado principalmente por sedimentos aluvionales y limos (Balestrini *et al.* 1998).

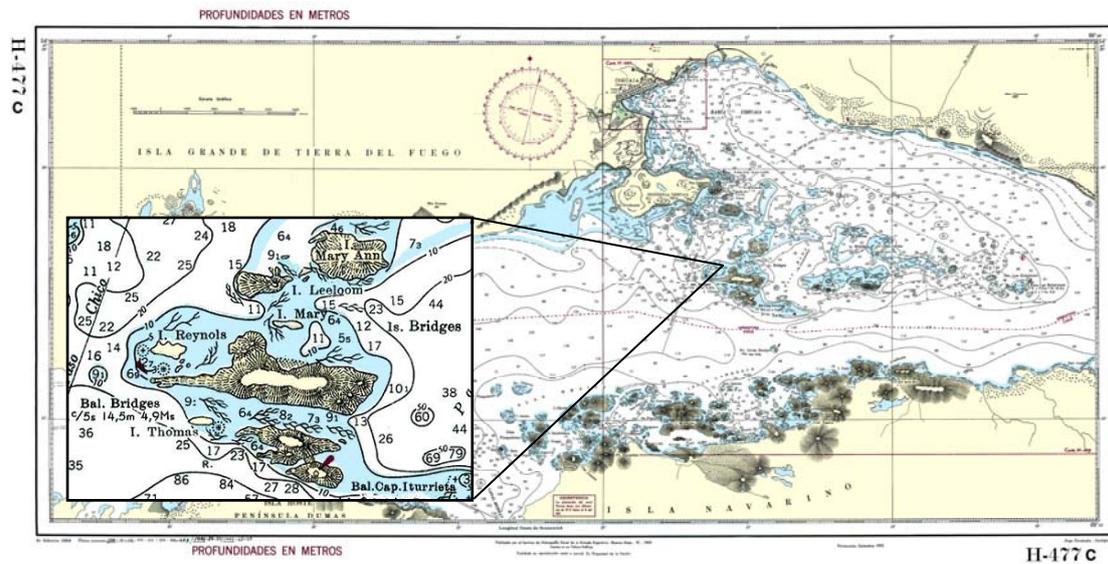
El agua del canal alcanza su temperatura mínima durante julio y agosto y la máxima entre diciembre y marzo. Según los registros de las temperaturas medias mensuales tomadas

en el muelle de combustible de la Bahía Ushuaia, la temperatura media anual varía entre 4 y 10° C (Iturraspe *et al.* 1989). Las aguas del Canal Beagle se caracterizan por su baja salinidad (los valores superficiales no superan los 32 ups), producto de la nutrida red de drenaje que presentan ambas márgenes del mismo. Esta red se compone de pequeños ríos y arroyos que descienden por los valles conduciendo el agua producto del deshielo, y de glaciares hacia el mar. Es por ello, que las salinidades más bajas se registran en los meses de primavera y principios verano (noviembre y diciembre), aumentando hacia los meses invernales (junio, julio y agosto) (Iturraspe *et al.* 1989). Esta característica es extremadamente relevante para los equinodermos ya que son poco tolerantes al agua dulce.

### **MUESTREO Y MANTENIMIENTO DE LOS ANIMALES**

Los muestreos se realizaron en aguas cercanas a las Islas Bridges, Ushuaia, Tierra del Fuego, Argentina (54° 50' S) (Figura 2.3). El fondo marino del área de muestreo está dominado por canto rodado y bloques de rocas alternadas con parches de arena y conchilla. El sustrato rocoso brinda soporte para algas coralinas incrustantes, principalmente, *Pseudolithophyllum sp.*, *Synarthrophyton sp.* (Mendoza y Nizovoy 2000) y grampones de macroalgas pardas (*Macrocystis pyrifera*, *Lessonia sp.*) (Figura 2.4).

Mediante buceo autónomo se recolectaron individuos adultos de *L. albus* tanto para el estudio de la población natural como para los experimentos planteados (Figura 2.5). Se seleccionaron los individuos muestreados con un diámetro del caparazón entre 70 a 80 mm para evitar la dispersión de las medidas debida a la diferencia de tallas (Gonor 1972).



**Figura 2.3.** Carta náutica de Canal Beagle en las cercanías de Ushuaia. Detalle de las Islas Bridges, sitio de muestreo de *L. albus* en el Canal Beagle.



**Figura 2.4.** Vista subacuática del área de muestreo. Grupo de individuos adultos de *L. albus* sobre bloques de rocas y canto rodado. Se observan frondes de macroalgas. Foto: D. Aureliano.



**Figura 2.5.** Buzo realizando la extracción de ejemplares de *L. albus*.

Los erizos fueron transportados al laboratorio de Ecofisiología del CADIC en cajas plásticas con agua de mar, dentro de las dos horas de su recolección. Luego, los individuos fueron colocados en tanques plásticos (50 x 70 x 36 cm) conteniendo agua de mar a 8° C (Figura 2.6) aireada a saturación. La calidad del agua fue mantenida controlando el pH y la concentración de nitratos y nitritos. El cambio de agua se realizó cada tres días, extrayendo, mediante el uso de un sifón, las heces acumuladas en el fondo de los tanques plásticos.

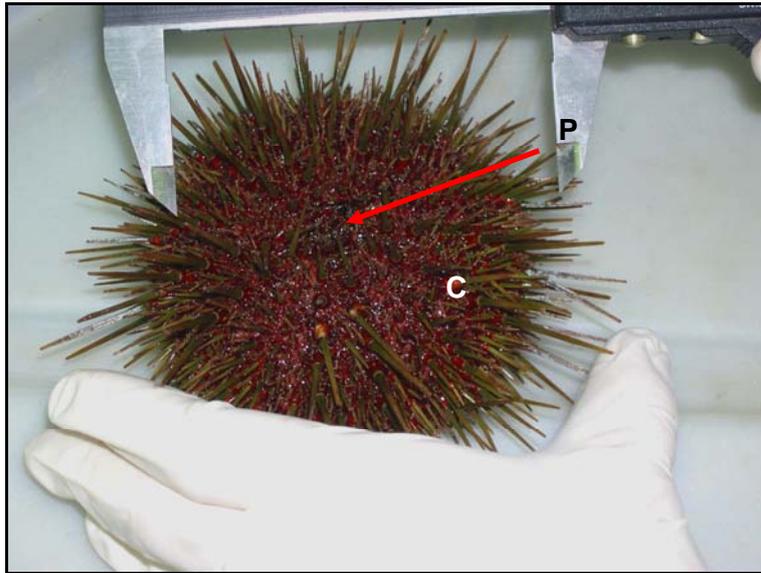
Los tanques conteniendo los erizos se mantuvieron en cámaras climatizadas con temperatura de 8 °C ( $\pm 0,5^{\circ}$  C) y fotoperíodo 12 h luz: 12 h oscuridad.



**Figura 2.6.** Mantenimiento de *L. albus* en tanques plásticos

### **TRATAMIENTO GENERAL DE LAS MUESTRAS**

Tanto para el estudio de la población natural como para los experimentos planteados, las mediciones y disecciones de los individuos se realizaron como se detalla a continuación. Se registraron la altura y el diámetro máximo del caparazón (medido a través de la placa madreporica) sin considerar las espinas, utilizando un calibre electrónico (0,1 mm) (Figura 2.7). Luego cada individuo fue colocado durante 1 minuto sobre papel absorbente para retirar el exceso de agua retenida entre las púas y los pies ambulacrales y posteriormente se registró el peso total mediante la utilización de una balanza electrónica (0,01 g).



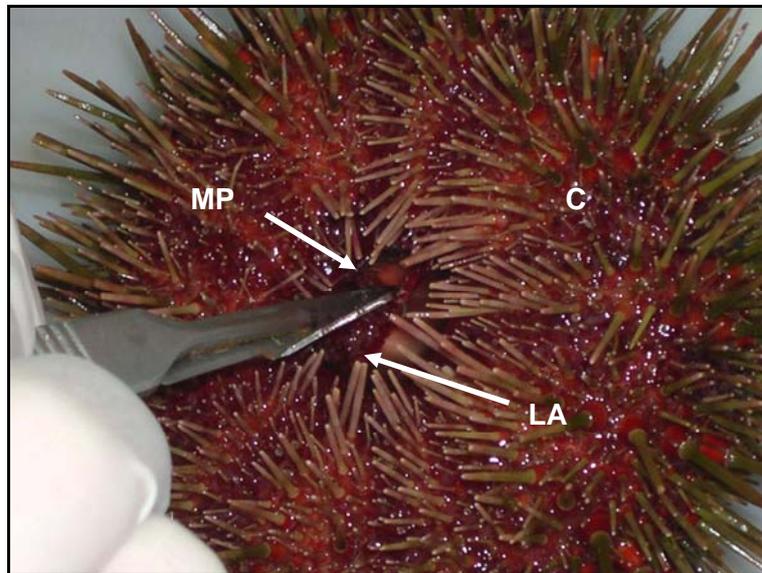
**Figura 2.7.** Vista aboral de *L. albus*. El diámetro máximo se tomó apoyando el calibre sobre el caparazón. C: caparazón y P: periprocto Foto: Dr. Jorge Calvo.

Para iniciar la disección, primeramente, se cortó la membrana peristomial con un bisturí (Figura 2.8), seguidamente se invirtió el erizo sobre un recipiente para facilitar la recolección del líquido celómico (Figura 2.9). Luego se colocó una pinza inversa alrededor de la linterna de Aristóteles, rompiendo de esta manera el caparazón (Figura 2.10). Posteriormente, se procedió a la extracción de la linterna de Aristóteles (Figura 2.11), lo que facilitó la visualización de los órganos internos (Figura 2.12).

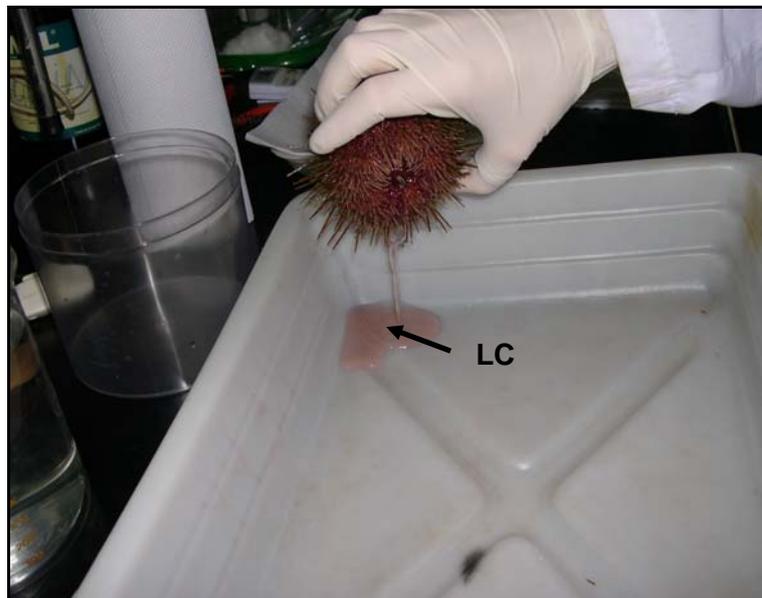
Se extrajo el sistema digestivo descartándose su contenido mediante enjuague con agua de mar. Se escurrió durante 20 segundos con papel absorbente para extraer el exceso de agua de mar del enjuague.

Se extrajeron las gónadas adheridas al caparazón (Figura 2.13) enjuagándolas luego en agua de mar. Finalmente, se procedió al pesaje por separado de cada parte disecada: caparazón + espinas, linterna de Aristóteles, gónadas, sistema digestivo y líquido celómico, con una aproximación de 0,01 g.

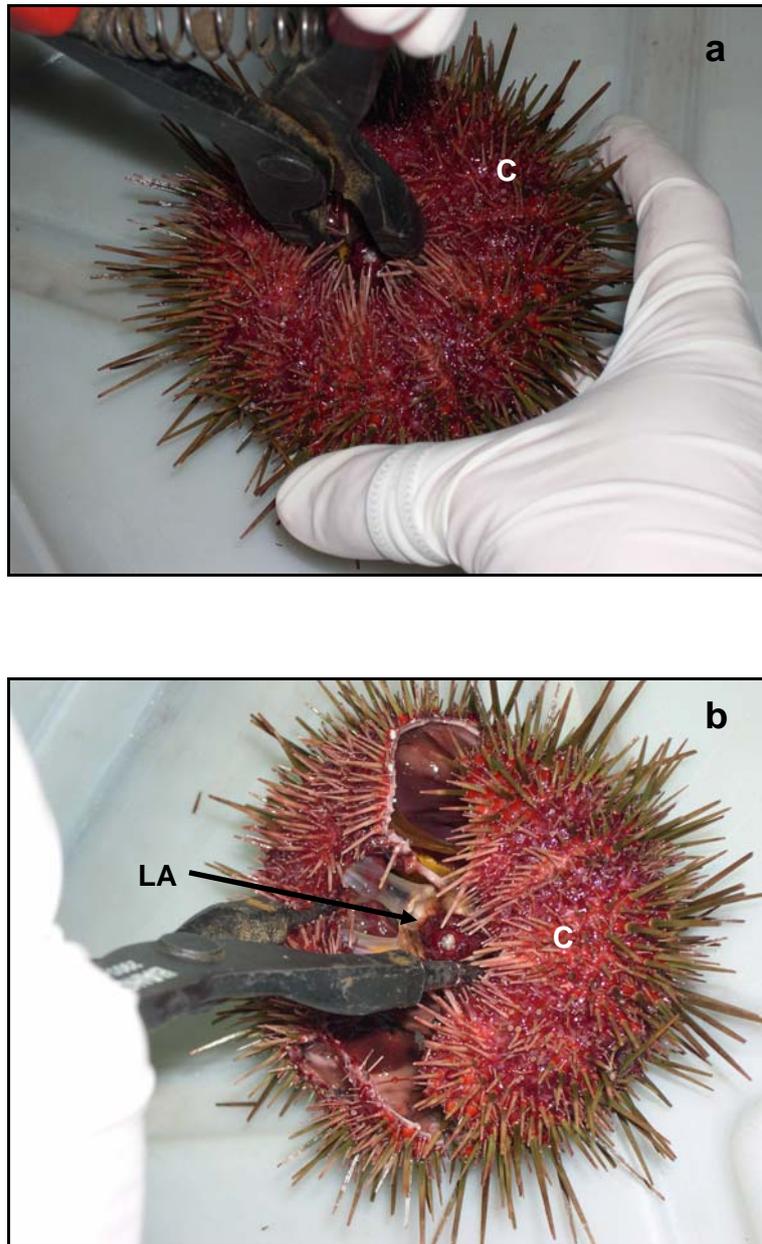
El tratamiento posterior de las muestras extraídas se detallará en los capítulos que correspondan.



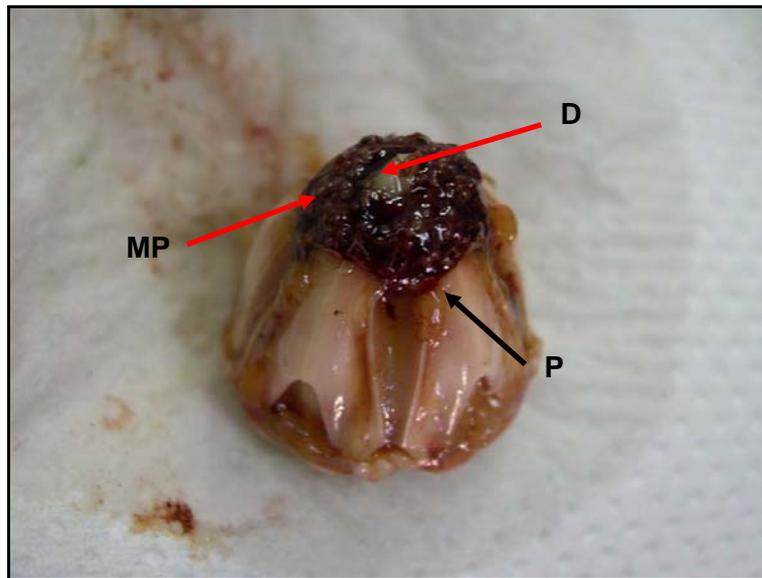
**Figura 2.8.** Vista oral de *L. albus*. Corte de la membrana peristomial. C: caparazón, LA: linterna de Aristóteles y MP: membrana peristomial. Foto: Dr. Jorge Calvo.



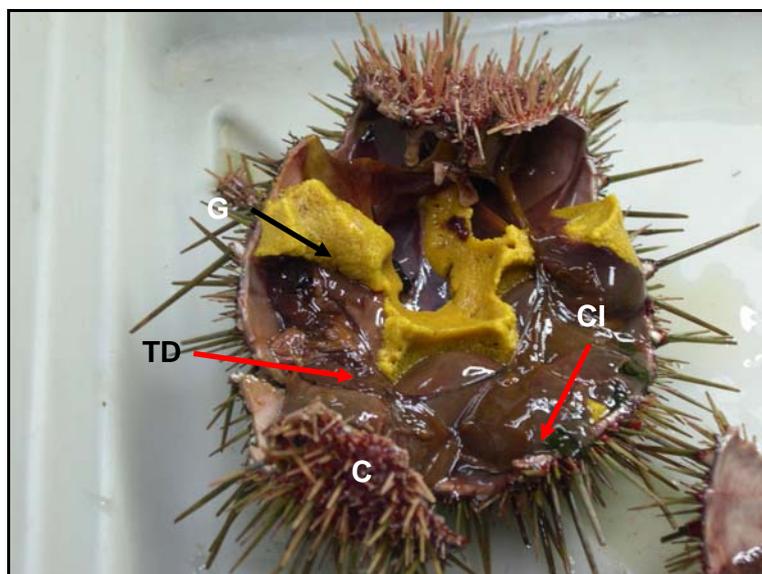
**Figura 2.9.** Extracción del líquido celómico de *L. albus*, a través del corte de la membrana peristomial. LC: líquido celómico. Foto: Dr. Jorge Calvo.



**Figura 2.10.** Vista oral. **a)** Introducción de la pinza inversa alrededor de la linterna de Aristóteles (LA) y **b)** ruptura del caparazón (C) de *L. albus*. Foto: Dr. Jorge Calvo.



**Figura 2.11.** Linterna de Aristóteles de *L. albus*. D: diente, P: pirámide y MP: membrana peristomial. Foto: Dr. Jorge Calvo.



**Figura 2.12.** Anatomía interna de *L. albus*. G: gónadas, C: Caparazón. TD: tubo digestivo; CI: contenido intestinal. Foto: Dr. Jorge Calvo.



**Figura 2.13.** Gónadas de *L. albus* mostrando su simetría pentaradial. Foto: Dr. Jorge Calvo

### CÁLCULO DE ÍNDICES

Los índices gonadal (IG), intestinal (IInt), de linterna de Aristóteles (ILint), de líquido celómico (ILiq) y del caparazón (ICap) fueron calculados para cada individuo, según:

$$IG = PG/PT \times 100$$

$$IInt = PInt/PT \times 100$$

$$ILint = PLint/PT \times 100$$

$$ILiq = PLiq/PT \times 100$$

$$ICap = PCap/PT \times 100$$

donde

PG= peso húmedo de gónadas (g)

PInt= peso húmedo de intestino vacío (g)

PLint= peso húmedo de linterna de Aristóteles (g)

PLiq= peso húmedo de líquido celómico (g)

PCap= peso húmedo del caparazón + espinas (g)

PT= peso húmedo total (g)

Para minimizar las variaciones interindividuales del IG (Gonor 1972) y de los demás índices calculados, se muestrearon individuos con diámetro de caparazón entre 70 y 80 mm.

## **INTRODUCCIÓN**

La reproducción sexual de los equinodermos implica la asignación cíclica de importantes recursos energéticos a la producción de gametas, de esta manera las gónadas llegan a representar una parte muy importante de la masa corporal. La adquisición de los recursos energéticos, que serán utilizados para sostener la producción gamética, en la mayoría de los casos se produce en un momento del ciclo anual que no coincide con la expulsión de las gametas (Pérez *et al.* 2008). Esta generalmente se sincroniza con condiciones ambientales que favorecerán la supervivencia de las larvas y juveniles (Giese y Pearse 1974; Starr *et al.* 1990). Es decir que para que la reproducción resulte exitosa es necesaria una fina sincronización de procesos muy diferentes. Para el seguimiento y análisis de los mismos es conveniente investigar los eventos que se repiten periódicamente en el organismo adulto e incluyen la proliferación de células germinales (activación de la gametogénesis), la diferenciación y crecimiento de las gametas y los comportamientos reproductivos asociados a la cópula o la liberación de gametas (Sastry 1983).

En el proceso reproductivo pueden identificarse componentes endógenos, inherentes al organismo y exógenos, representados por distintos factores ambientales que funcionan como agentes moduladores de los componentes endógenos. Las características reproductivas particulares de una especie o de una población son el resultado de una interacción particular entre ambos tipos de factores (Ebert 1994). Entre los factores exógenos moduladores más estudiados se encuentra la temperatura (Yamamoto *et al.* 1988; Pearse y Cameron 1991), el fotoperiodo (Pearse *et al.* 1986; Bay-Schmidt y Pearse 1987; Walker y Lesser 1998; Shpigel *et al.* 2004; Dumont *et al.* 2006) y la disponibilidad de alimento (Lawrence 1987a; Lamare *et al.* 2002). Estos factores pueden determinar tanto la periodicidad como la extensión del periodo reproductivo de la especie

(Pearse y Cameron 1991). La modulación del evento reproductivo a través de los factores exógenos trae aparejada la optimización de la supervivencia de la progenie (Giese y Pearse 1974; Starr *et al.* 1990).

El conocimiento de los ciclos reproductivos es un componente básico para cualquier análisis de la dinámica poblacional. Para ello es necesario establecer, usualmente mediante el estudio histológico de las gónadas, la frecuencia y momento de la puesta, así como la edad (o la talla) en la que se produce la primera maduración sexual. El conocimiento de la biología reproductiva de los equinoideos proporciona valiosa información para el manejo de sus pesquerías. Desde el punto de vista ecológico, es también importante la información que aportan el conocimiento de los ciclos de vida, la cuantificación de la energía invertida en reproducción, el estudio de la biología larvaria y la capacidad de dispersión, así como también de los factores que afectan al reclutamiento. La metodología habitualmente utilizada para el estudio de los ciclos reproductivos y para el establecimiento de los periodos de desove y evacuación está basada en analizar las variaciones del índice gonadal, y/o los cambios en los estadios histológicos de las gónadas (Meidel y Scheibling 1998; Lamare *et al.* 2002; Williamson y Steinberg 2002; MacCord y Ventura 2004). La determinación del contenido energético de los diferentes estadios gonadales ofrece una aproximación complementaria a la biología reproductiva de una especie dada.

La proporción de energía que es utilizada por un organismo durante la reproducción fue denominada esfuerzo reproductivo (Hirshfield y Tinkle 1975). El esfuerzo reproductivo generalmente es calculado comparando la proporción de la masa gonadal y somática antes y después de la reproducción (Fletcher 1984; Liu 1994) o la diferencia entre el contenido total de energía de las gónadas antes y después del desove (Lucas 1996).

En las gónadas de los equinoideos existen dos tipos principales de células, las gametogénicas (tanto de la serie femenina como de la masculina), y los fagocitos nutritivos, cuya función es acumular las sustancias de reserva necesarias para el evento

reproductivo, así como fagocitar los gametos sobrantes tras el desove (Byrne 1990; Walker *et al.* 2001). Inicialmente, los fagocitos nutritivos incorporan una amplia variedad de nutrientes en su citoplasma o en vesículas de membrana (Brooks y Wessel 2003; Unuma *et al.* 2003). Posteriormente los nutrientes son movilizados hacia las células germinales adyacentes, éstas aumentan de tamaño durante la vitelogénesis e incrementan su número en ambos sexos (Walker *et al.* 2003).

La secuencia de cambios morfológicos y de número que se producen en las células gametogénicas y en los fagocitos nutritivos constituye el ciclo gametogénico o ciclo reproductivo. Este sigue un modelo básico similar: una vez que se produce la activación del proceso se inicia el crecimiento de las gametas, su aumento en número por divisiones mitóticas y meióticas, su maduración y expulsión que son seguidas por un periodo de reposo o recuperación gonadal. Es de destacar que si bien existe una cierta similitud en los ciclos reproductivos de la mayoría de los equinoideos, se presentan marcadas diferencias en la duración de cada etapa del ciclo reproductivo y en su ocurrencia estacional (Pearse y Cameron 1991).

Las características del ciclo reproductivo del erizo verde *L. albus* se han estudiado en poblaciones de la costa pacífica chilena (Gutiérrez y Otsú 1975; Zamora y Stotz 1992), de la región Magallánica (Bay-Schmidt *et al.* 1981; Oyarzún *et al.* 1999) y del Canal Beagle (Orler 1992).

El conocimiento de la gametogénesis, el ciclo reproductivo y los periodos de desove representan información básica tanto para el establecimiento de regulaciones de las pesquerías como para el mejoramiento de la equinocultura (Walker y Lesser 1998; Shpigel *et al.* 2004; Dumont *et al.* 2006).

### **HIPÓTESIS**

- 1- La disminución de la longitud del día promueve el comienzo de la gametogénesis en *Loxechinus albus*.
- 2- El incremento de la temperatura del agua de mar se asocia con el comienzo de la evacuación de la población estudiada de *L. albus*.
- 3- El esfuerzo reproductivo de las hembras es mayor que el de los machos.

### **OBJETIVOS**

- 1- Establecer relaciones entre el ciclo reproductivo de *L. albus* y parámetros ambientales.
- 2- Caracterizar el ciclo reproductivo del erizo *L. albus* en el extremo sur de su distribución.
- 3- Determinar el esfuerzo reproductivo de machos y hembras de *L. albus*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **MUESTREO**

Mensualmente se extrajeron 30 individuos adultos de *L. albus*, desde mayo de 2004 hasta mayo de 2005 (Ver capítulo 2, “MUESTREO Y MANTENIMIENTO DE LOS ANIMALES”).

Los individuos fueron procesados según se especifica en el capítulo 2, “TRATAMIENTO GENERAL DE LAS MUESTRAS”.

### **PARÁMETROS AMBIENTALES**

Mensualmente se registró la temperatura del agua de mar (0,1° C) y del sitio Web del Servicio de Hidrografía Naval se tomaron los promedios mensuales de la longitud del día (<http://www.hidro.gov.ar/observatorio/sol/asp>). El fotoperiodo fue expresado como horas de luz.

### **DETERMINACIONES HISTOLÓGICAS**

Un total de 189 hembras y 191 machos fueron muestreados durante 2004 y 2005 para realizar el estudio del ciclo reproductivo. Luego del tratamiento descrito en el capítulo 2, “TRATAMIENTO GENERAL DE LAS MUESTRAS”, se separó una gónada de cada individuo, la que fue utilizada para el análisis histológico. Luego de la disección, cada gónada fue fijada en solución de Bouin durante 12 horas, posteriormente enjuagada en agua y transferida a alcohol 70 %. A continuación, la zona media de la gónada fue deshidratada en alcoholes de graduación creciente, aclarada en benceno e incluida en Paraplast (Sigma Chemical Co.) para la elaboración de un bloque. Al confeccionar los bloques, el material fue orientado para obtener cortes transversales de las gónadas. Se realizaron cortes histológicos de 5 y 7 µm de espesor, que se colorearon utilizando:

Hematoxilina de Groat - Eosina (Hx – E) (Gabe 1968) y tricrómico de Masson modificado por DeCarlo (Genovese *com. pers.*).

### **Coloraciones**

Los cortes fueron coloreados con Hematoxilina – Eosina, Tricrómico de Masson (modificado según DeCarlo 1967) y Acido Peryódico de Schiff (PAS). La modificación de DeCarlo, consiste en utilizar hematoxilina de Carazzi en lugar de hematoxilina férrica, logrando así una reducción sensible de tiempos de coloración. Como resultado de esta coloración los núcleos se tiñen de violeta; el citoplasma de rojo y el tejido conectivo de azul.

Los individuos fueron sexados y a cada uno de ellos se le asignó uno de los seis estadios gonadales: a) Inmaduro, b) Crecimiento, c) Premaduro I d) Premaduro II, e) Maduro, o f) Post-evacuado. Los seis estadios gametogénicos fueron establecidos en base al tipo de células presentes y su frecuencia relativa. Para la definición de los estadios se adaptaron los criterios que se han desarrollado para otros equinoideos (Lamare *et al.* 2002; Williamson y Steinberg 2002) como así también para *Loxechinus albus* (Orler 1992; Zamora y Stotz 1992). Las fotomicrografías fueron tomadas con un microscopio Zeiss Image Z1-AX10, mediante cámara fotográfica (Zeiss, AxioCam HRc) y observadas con el analizador de imágenes Axiovision v 4.4.

### **DETERMINACIONES CALORIMÉTRICAS**

Del muestreo mensual anteriormente descrito, se seleccionaron 20 individuos al azar a los que se les separó una gónada para la realización de las determinaciones calorimétricas. Las gónadas fueron secadas en estufa a 70° C hasta alcanzar peso seco constante. El material seco de cada muestra individual fue pulverizado por separado mediante un mortero manual y se fabricaron pellets (0,05 a 0,2 g) mediante una prensa Parr 2812. La densidad energética fue determinada por combustión completa en

una micro bomba calorimétrica Parr 1425 siguiendo la metodología de Beukema y De Bruin (1979) y Lucas (1996), con las modificaciones establecidas en el laboratorio de Ecofisiología (Lomovasky *et al.* 2001; Vanella *et al.* 2005; Pérez *et al.* 2008).

El calorímetro permite medir el calor de combustión liberado por el material combustionado en un recipiente hermético, conteniendo oxígeno puro a 35 atmósferas de presión, sumergido en un baño de agua de volumen conocido. La variación de temperatura producto de la combustión es medida con un termómetro ( $\pm 0,0001^\circ \text{C}$ ) y registrada por un microprocesador. El valor resultante es expresado en calorías por gramo seco de material quemado y luego es corregido por la formación de residuos de ácidos nítrico y sulfúrico, por los restos de fusible que no han sido quemados y por las cenizas que quedan sin combustionar. Los datos fueron transformados a kilojoules (kJ) por gramo de peso seco de material libre de cenizas (densidad energética, DE, kJ/g PSLC), considerando que 1 caloría equivale a 0,004186 kJ (Lucas 1996). Periódicamente se realizaron calibraciones de las microbombas con ácido benzoico.

Se calculó el contenido energético total de gónadas (CE), según:

$$\text{CE} = \text{DE} \times \text{PS}$$

donde

CE= contenido energético total (kJ)

DE= densidad energética (kJ/g)

PS= peso seco de las gónadas (g)

El PS fue estimado a partir del porcentaje de contenido en humedad de la gónada utilizada para la determinación calorimétrica y la masa húmeda del total de las gónadas.

Para el análisis de la densidad energética (DE) y el contenido energético (CE) las gónadas fueron agrupadas según los estadios gonadales diagnosticados histológicamente.

### ESFUERZO REPRODUCTIVO

Se determinó el esfuerzo reproductivo (ER) para machos y hembras por separado mediante dos métodos diferentes. Uno de los métodos consistió en analizar la diferencia entre los IG promedios de los individuos en estadio Maduro respecto de los individuos con gónadas en estadio Post-evacuado [1].

El otro método para calcular el ER se basó en el análisis del contenido energético (CE) de las gónadas en estadio Maduro y su diferencia con el de las gónadas en estadio Post-evacuado [2]. A continuación se detallan los cálculos:

$$ER_{(IG)} = \text{Promedio IG}_{(\text{Maduro})} - \text{Promedio IG}_{(\text{Post-evacuados})} \quad [1]$$

$$ER_{(CE)} = \text{Promedio (CE)}_{(\text{Maduro})} - \text{Promedio (CE)}_{(\text{Post-evacuado})} \quad [2]$$

donde

ER= esfuerzo reproductivo

IG= peso húmedo de gónadas (g)

CE= contenido energético de las gónadas (kJ)

### TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Luego del sexado de los individuos mediante el análisis histológico, se analizó la proporción de sexos mediante la prueba de Chi-cuadrado (Zar 1984).

El efecto del tiempo sobre el índice gonadal fue analizado utilizando una prueba de Kruskal-Wallis seguido de comparaciones múltiples de Dunn, en caso que se observaran

diferencias significativas (Zar 1984, Sokal y Rohlf 1995). El efecto del sexo sobre el IG fue analizado mediante la prueba de diferencia de medias (Zar 1984; Sokal y Rohlf 1995). Para probar la relación entre el IG y los parámetros ambientales (temperatura y fotoperiodo) se calculó el coeficiente de correlación de Pearson.

Para analizar el efecto del factor estadio reproductivo (Inmaduro, Crecimiento, Premaduro I, Premaduro II, Maduro, Post-evacuado) y del factor sexo sobre el índice gonadal, la densidad energética y los contenidos energéticos de las gónadas, se llevaron a cabo ANOVA's de dos factores. En aquellos casos en que se observaron diferencias significativas se realizaron comparaciones de Tukey a posteriori.

En todos los casos, los supuestos de normalidad y homocedacia fueron puestos a prueba mediante pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente (Sokal y Rohlf 1995). En caso que no se cumplieran los supuestos los datos se transformaron.

No resultó necesario relativizar el CE de las gónadas y el ER con el peso total de los individuos, dado que éste no presentó diferencias significativas entre los 13 meses de muestreo analizados (ANOVA  $p= 0,57$ ).

El análisis estadístico de los datos fue realizado mediante la utilización de los programas Statistica 6.0 y GraphPad InStat.

## **RESULTADOS**

### **PROPORCION DE SEXOS**

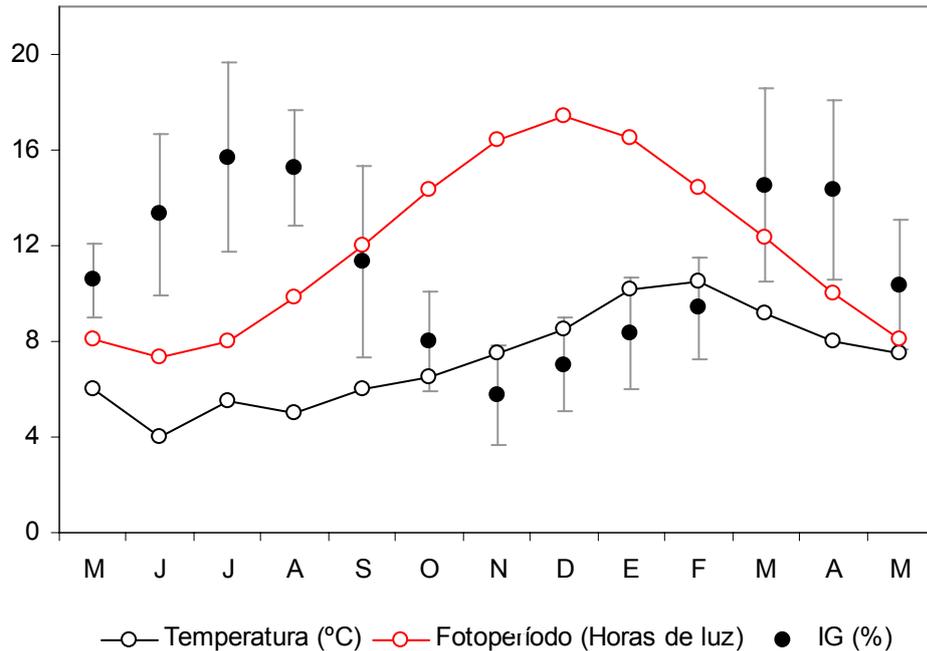
Se analizaron un total de 380 individuos a lo largo de 13 meses de muestreo. La proporción de sexos en la población de *L. albus* estudiada, fue de 50,3 % para machos y 49,7 % para hembras, no difiriendo significativamente de la proporción 1:1 ( $p= 0,97$ ; Chi cuadrado= 0,011).

### **PARÁMETROS AMBIENTALES E ÍNDICE GONADAL**

El promedio mensual de la longitud del día varió entre 7,3 horas de luz en junio y 17,4 horas de luz en diciembre. El incremento del fotoperiodo es seguido de un incremento en la temperatura del agua de mar. La temperatura mínima mensual promedio fue de 4° C en junio y la máxima fue de 10,5° C, registrada durante el mes de febrero (Figura 3.1).

Los valores mensuales de índices gonadales (IG) no variaron entre hembras ( $n= 189$ ) y machos ( $n= 190$ ) ( $p= 0,32$ ). El IG varió significativamente entre meses (K-W  $p< 0,001$ ), los valores mayores fueron registrados en los meses de marzo, abril, julio y agosto y los valores menores en noviembre y marzo ( $p< 0,05$ ) (Figura 3.1).

El análisis estadístico muestra una correlación negativa entre el IG y el fotoperiodo ( $r= 0,748$ ,  $p< 0,05$ ). Mientras que la correlación entre el IG y la temperatura del agua no fue significativa ( $p= 0,15$ ) (Figura 3.1).



**Figura 3.1.** Índices gonadales mensuales (IG) para *L. albus* de las Islas Bridges (Mayo 2004-Mayo 2005). Para cada mes se presentan las medianas y los percentiles 25 y 75 (n: 380). Valores medios mensuales de la temperatura del agua de mar y de la longitud del día en la Islas Bridges (54° 50'S), Canal Beagle.

### ESTRUCTURA MACROSCÓPICA DE LAS GÓNADAS

*L. albus*, al igual que el resto de los equinoideos, presenta cinco gónadas suspendidas por mesenterios desde la cara interna del caparazón.

Durante el comienzo de la gametogénesis o luego de la evacuación las gónadas se encuentran separadas, mientras que cuando la gametogénesis se encuentra más avanzada (Estadios Premaduro II y Maduro), las gónadas se aproximan lateralmente, ocupando gran parte del volumen interno del cuerpo del animal.

Macroscópicamente las gónadas de ambos sexos en individuos adultos de *L. albus* son muy semejantes entre sí, aunque en algunas oportunidades se pueden sexar los individuos que se encuentran en un estadio muy avanzado de maduración debido a que las gametas son liberadas de las gónadas. En ese caso la observación de frotis en fresco

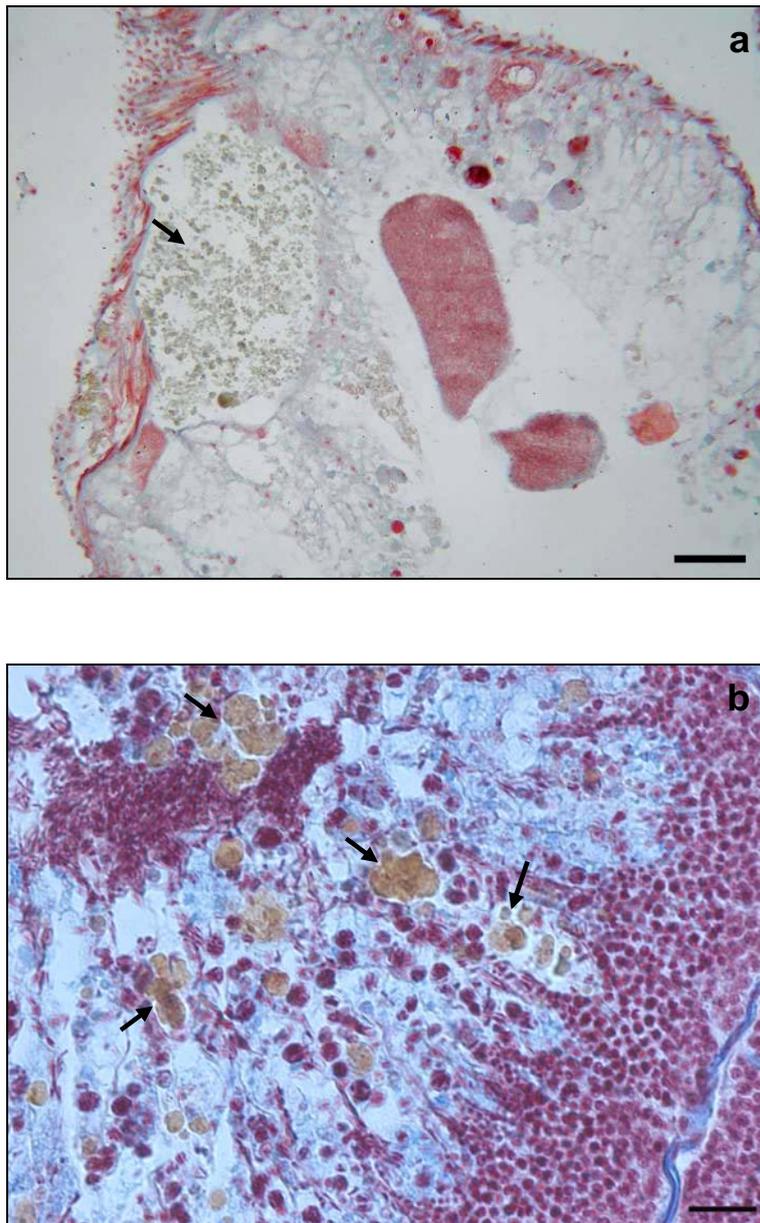
de las secreciones que se encontraron sobre las gónadas permitió comprobar que las amarillentas corresponden a las hembras y las blancuzcas a los machos.

Cada gonoporo se encuentra ubicado en una de las cinco placas genitales situadas en la cara aboral del animal.

### **ESTRUCTURA MICROSCÓPICA DE LAS GÓNADAS**

Las gónadas de ambos sexos están constituidas por un conjunto de acinos ramificados y anastomosados que terminan ciegos en su extremo oral, mientras que hacia su extremo aboral desembocan en un gonoducto que se abre a través de un gonoporo hacia el exterior. La pared de los acinos está compuesta por tres capas: 1) la capa exterior constituida por el peritoneo perivisceral, 2) una capa media de epitelio muscular y 3) la capa interior constituida por células germinales y células accesorias (fagocitos nutritivos).

Se observó en ambos sexos la existencia de acúmulos de lipofucsina localizados tanto en el lumen de los acinos como en el epitelio germinal. La coloración amarilla que presentan no es resultado de las técnicas de tinción empleadas sino que los acúmulos tienen coloración propia (Figura 3.2)



**Figura 3.2.** Presencia de lipofuscinas. **a)** Fotomicrografía de una gónada femenina de *L. albus* en estadio Post-evacuado. Se observa la presencia de lipofuscinas en el interior de los acinos, próximas a la capa germinal. **b)** Fotomicrografía de una gónada masculina de *L. albus* en estadio Premaduro I. Se observan lipofuscinas en el lumen de los acinos y entre las columnas de espermatocitos. (Flecha indica acúmulos de lipofuscinas). Tinción: Tricrómico de Masson (modificado por De Carlo). Barra: 20 µm.

## ESTADIOS GONADALES

La observación histológica de las gónadas permite la estimación de las proporciones relativas de cada uno de los tipos celulares de la serie germinal y la evaluación de la numerosidad y características de las células accesorias en un momento determinado del ciclo gametogénico. Esa información permite asignar a cada individuo alguno de los estadios gonadales (Inmaduro, Crecimiento, Premaduro I, Premaduro II, Maduro, Post-evacuado, Figuras 3.3, 3.4, 3.5 y 3.6).

En la tesis se utilizara el término "*Post-evacuado*" tanto para hembras como para machos.

## ESTADIOS GONADALES FEMENINOS

A continuación se describe la serie germinal femenina para facilitar la comprensión de los estadios gonadales.

- Oocitos previtelogénicos. (Fig. 3.3a) Su talla es inferior a 25  $\mu\text{m}$ . Presentan forma esférica o de domo. El citoplasma es basófilo. El núcleo es esférico y el nucleolo ocupa una posición excéntrica. Son más frecuentes en el estadio Inmaduro.
- Oocitos vitelogénicos pequeños. (Fig. 3.3b) Su talla se encuentra entre 25 - 80  $\mu\text{m}$ . A medida que se incrementa la talla disminuye la basofilia del citoplasma debido al incremento de la síntesis de vitelo. A medida que progresa el crecimiento de los oocitos éstos se separan de la pared acinar. Son muy abundantes en los estadios crecimiento y premadurez.
- Oocitos vitelogénicos grandes. (Fig. 3.3c). Su talla se encuentra entre 80 - 100  $\mu\text{m}$ . El citoplasma es acidófilo. Su núcleo es esférico y de posición central. El nucleolo es esférico y ocupa una posición excéntrica en el núcleo. Progresivamente los oocitos van adquiriendo forma oval, son muy abundantes en los estadios de premadurez.

- Oocitos maduros. (Fig. 3.3d y 3.3e) Las ovas presentan un diámetro promedio de 110  $\mu\text{m}$ . En su citoplasma presentan granulaciones acidófilas y basófilas. En relación al resto de los oocitos sus núcleos son muy pequeños. Estos oocitos son muy abundantes en el estadio maduro.

1. INMADURO (Figura 3.3a). La luz de los acinos se encuentra ocupada por una red de fagocitos nutritivos con citoplasma débilmente coloreado, conteniendo grandes vesículas con afinidad por el PAS. Sobre la pared acinar se encuentran adheridos unos pocos oocitos previtelogénicos con diámetro menor a 25  $\mu\text{m}$  y citoplasma basófilo.

2. CRECIMIENTO (Figura 3.3b). Este estadio se corresponde con el comienzo de la vitelogénesis. Se observan oocitos vitelogénicos pequeños, con diámetros entre 25 a 80  $\mu\text{m}$ , unidos a la pared acinar. El citoplasma de estos oocitos tiene la basofilia disminuida por lo que se colorea púrpura claro. En el centro de la luz acinar se encuentran fagocitos nutritivos con sus citoplasmas conteniendo numerosas vacuolas y vesículas con material nutritivo.

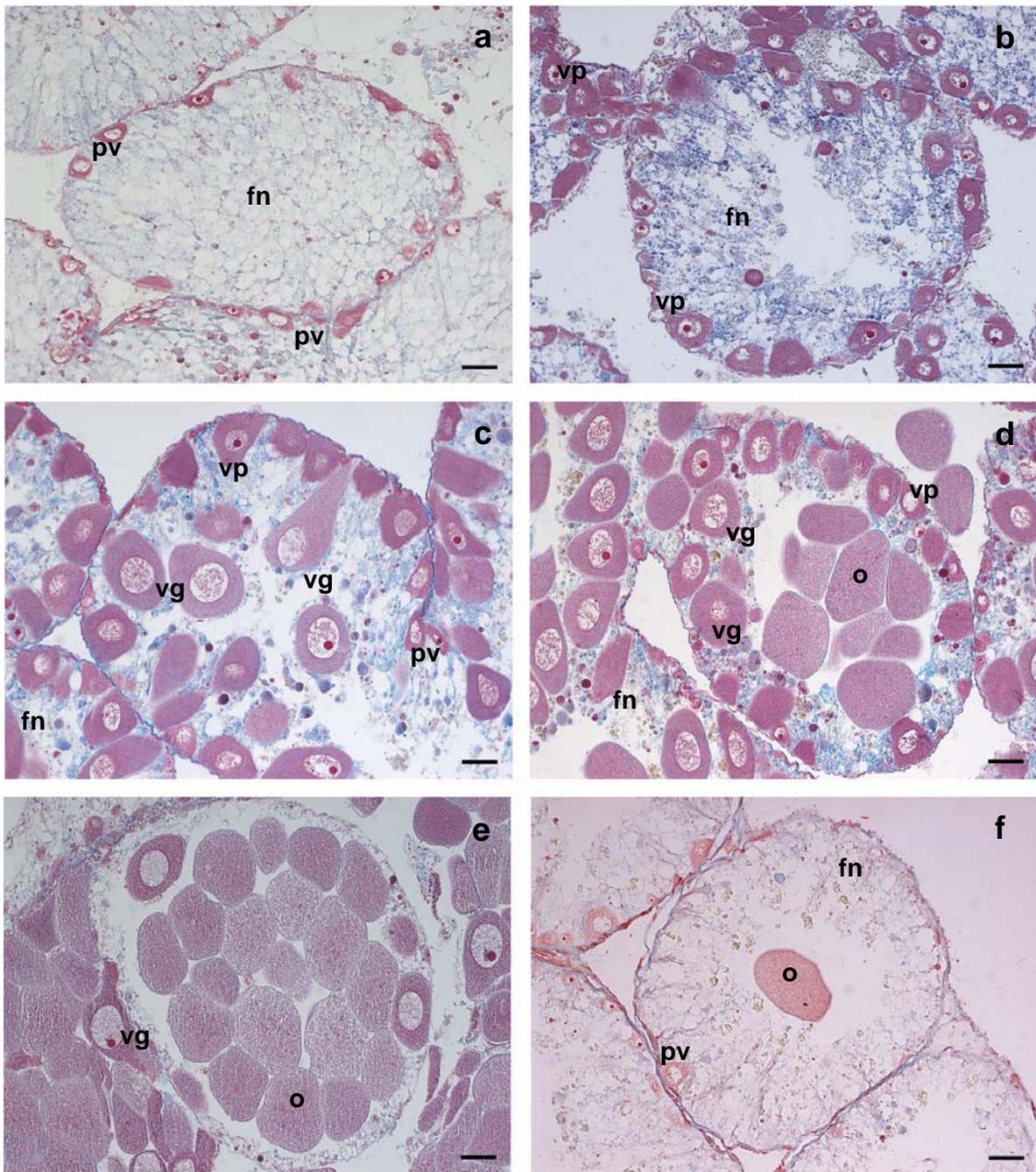
3. PREMADURO I (Figura 3.3c). El número y el tamaño de los oocitos vitelogénicos (>80  $\mu\text{m}$ ) se han incrementado, asociados a una marcada disminución en la abundancia de los fagocitos nutritivos. En los acinos se encuentran oocitos en todos los estadios de desarrollo pero el número de ovas maduras es escaso. El citoplasma de los oocitos vitelogénicos es acidófilo, estos se alargan, proyectándose hacia la luz acinar, presentando un pedúnculo, a través del que se mantienen unidos a la pared de los acinos.

4. PREMADURO II (Figura 3.3d). En este estadio se incrementa el número y tamaño de los oocitos mientras que las características tintoriales de los mismos se conservan. En el centro de los acinos se observan algunas ovas maduras sin núcleo visible. Estas

presentan gránulos finos en el citoplasma. Gradualmente los acinos van incrementando su contenido de oocitos en avanzado estado de madurez, con citoplasma de un diámetro aproximado a 100 micras.

5. MADURO (Figura 3.3e). Los acinos contienen abundantes ovas maduras, densamente empaquetadas en la luz acinar. A lo largo de la pared acinar se observan unos pocos oocitos previtelogénicos y fagocitos nutritivos.

6. POST-EVACUADO (Figura 3.3f). Los acinos ováricos se encuentran aparentemente vacíos, conteniendo solamente un bajo número de ovas residuales. Los fagocitos nutritivos se han incrementado y se encuentran ubicados en la proximidad de las delgadas paredes acinares, junto con unos pocos oocitos primarios.



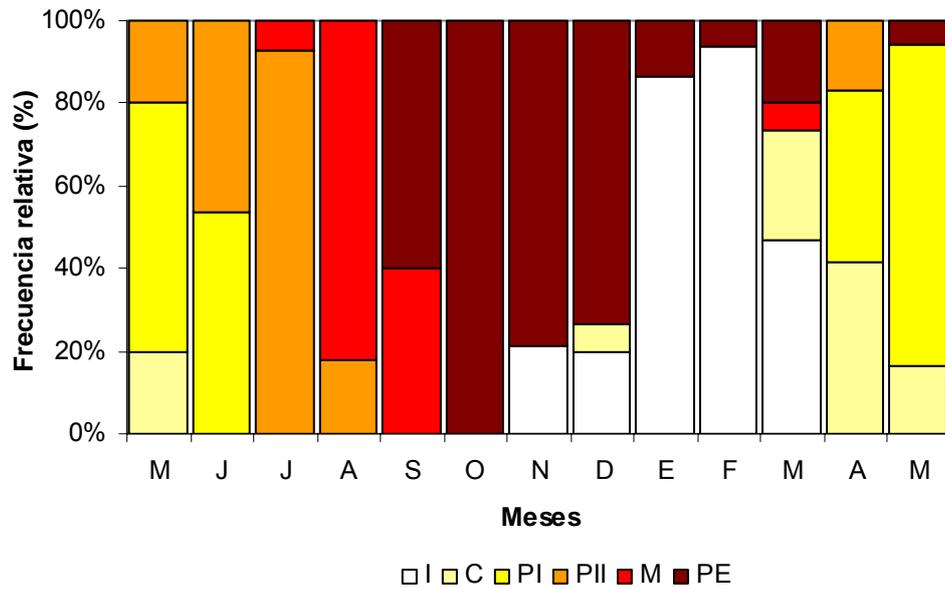
**Figura 3.3.** Fotomicrografía de estadios gonadales de hembras de *L. albus*. **a)** Inmaduro. **b)** Crecimiento. **c)** Premaduro I. **d)** Premaduro II. **e)** Maduro: oocitos libres en la luz acinar. **f)** Post-evacuado: oocitos inmaduros sobre la pared acinar y pocos oocitos residuales en el lumen. Oocitos previtelogénicos: pv, Oocitos vitelogénicos pequeños: vp, Oocitos vitelogénicos grandes: vg, oocitos maduros: o y fagocitos nutritivos: fn: Tinción: Tricrómico de Masson (modificado por De Carlo). Barra: 50  $\mu$ m.

**CICLO REPRODUCTIVO FEMENINO**

La variación mensual del porcentaje de los diferentes estadios gonadales determinados a partir de los cortes histológicos de los ovarios se presenta en la Figura 3.4.

Los cortes histológicos correspondientes a los primeros meses de este estudio (mayo y junio) muestran un elevado porcentaje de individuos en estadio Premaduro I (60 y 54 % respectivamente). Si se consideran en conjunto los estadios Premaduro I y II el porcentaje de individuos en esos meses alcanza a 80 y 100 %. En julio más del 90% de los cortes analizados se encontraban en estadio Premaduro II, comenzando la acumulación de gametas maduras. En agosto el 82 % y en septiembre el 40% de los individuos se encontraron en el estadio Maduro. Entre los meses de septiembre y diciembre se encontró un elevado porcentaje de individuos Post-evacuados. En enero y febrero los individuos en estadio Inmaduro superaron el 85 % mientras que durante marzo ese estadio descendió al 47%. En ese mes casi el 30 % de los individuos correspondían al estadio Crecimiento.

La vitelogénesis se inició durante abril alcanzando los estadios Premaduro I y II una frecuencia del 58 % (Figura 3.4).



**Figura 3.4.** Frecuencias relativas mensuales (%) para los diferentes estadios gonadales de hembras de *L. albus* entre mayo de 2004 y mayo de 2005. I: Inmaduro, C: Crecimiento, P I: Premaduro I, P II: Premaduro II, M: Maduro, PE: Post-evacuado.

## ESTADIOS GONADALES MASCULINOS

1. INMADURO (Figura 3.5a). En este estadio la luz acinar está ocupada por una red de fagocitos nutritivos extremadamente laxa, con numerosos espacios cromófobos. El citoplasma de los fagocitos se tiñe débilmente, en él se visualizan vesículas coloreadas intensamente, que se asume contienen material nutritivo. Sobre las paredes de los acinos se encuentran espermatogonias aisladas o bien dispuestas en estructuras columnares que se proyectan hacia la luz de los acinos.

2. CRECIMIENTO (Figura 3.5b). Espermatogonias y espermatocitos primarios forman una capa continua de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  de espesor sobre la pared acinar. Regularmente se encuentran columnas de espermatocitos que se proyectan hacia el centro de los acinos. Los fagocitos nutritivos son muy abundantes en la luz acinar, presentando numerosas vacuolas con material nutritivo.

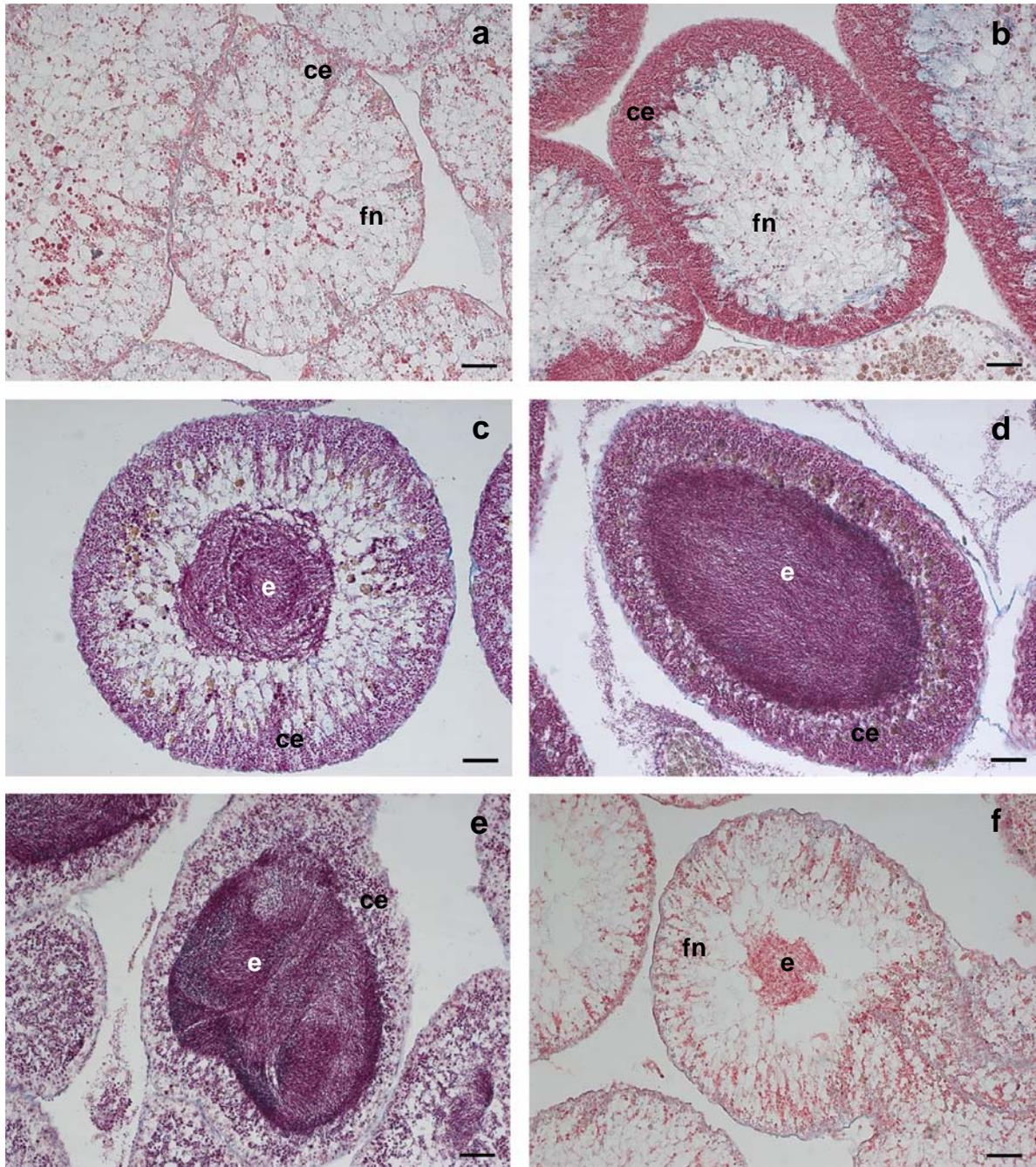
3. PREMADURO I (Figura 3.5c). En este estadio los espermatocitos forman una capa continua (100 - 120  $\mu\text{m}$  de espesor) cubriendo la superficie interna del acino, desde allí se proyectan conspicuas columnas de espermatocitos hacia el centro de la luz acinar. Los espermatozoides comienzan a acumularse en la luz central de los acinos. Los fagocitos nutritivos decrecen en abundancia quedando restringidos a la zona intermedia entre la agregación central de espermatozoides y la capa periférica de espermatocitos y espermatogonias.

4. PREMADURO II (Figura 3.5d). Este estadio presenta una estructura microscópica similar a la del estadio Premaduro I, pero los acinos contienen una cantidad mayor de espermatozoides ubicados en su centro. Los tipos celulares masculinos en diferentes grados de maduración forman una banda ancha (120  $\mu\text{m}$ ) que cubre aproximadamente la

mitad de la superficie de los acinos. Los fagocitos nutritivos son extremadamente reducidos en número. Las columnas de espermatocitos continúan siendo abundantes.

5. MADURO (Figura 3.5e). La luz acinar se encuentra casi completamente ocupada por espermatozoides densamente empaquetados. La banda periférica conteniendo los estadios tempranos de la serie espermática disminuye su espesor a menos de a 70 - 100  $\mu\text{m}$  o se encuentra ausente. Los fagocitos nutritivos se localizan hacia la periferia de los acinos dispersos entre las células germinales.

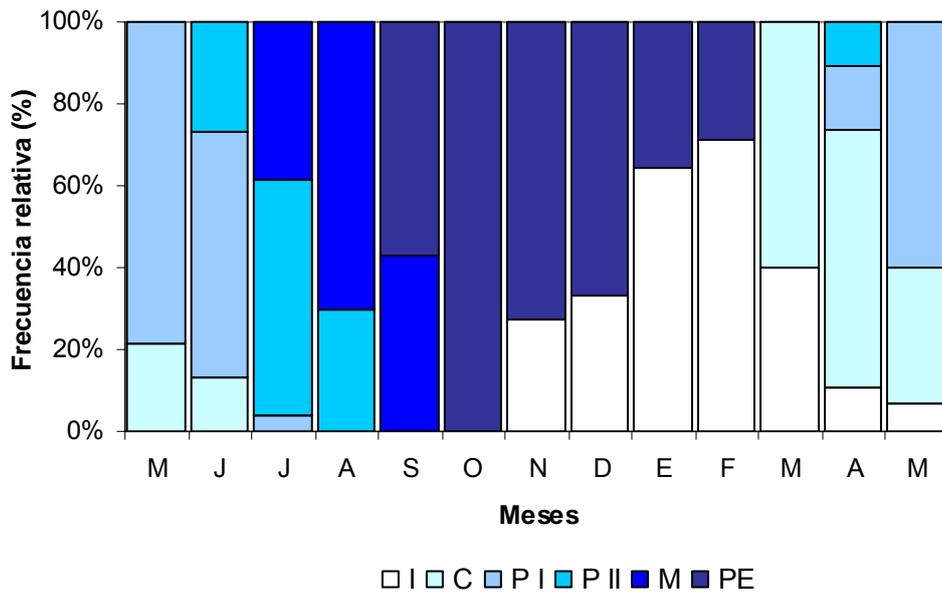
6. POST-EVACUADO (Figura 3.5f). Los acinos tienen contorno irregular y la luz acinar contiene únicamente un muy escaso número de espermatozoides y fagocitos nutritivos. La pared acinar es muy delgada presentando un espesor menor a 25  $\mu\text{m}$ .



**Figura 3.5.** Fotomicrografía de estadios gonadales de machos de *L. albus*. **a)** Inmaduro. **b)** Crecimiento. **c)** Premaduro I. **d)** Premaduro II. **e)** Maduro. **f)** Post-evacuado. Tinción: Tricrómico de Masson (modificado por De Carlo). e: espermatozoides, ce: columna espermatogénica y fn: fagocitos nutritivos. Barra: 50  $\mu$ m.

### CICLO REPRODUCTIVO MASCULINO

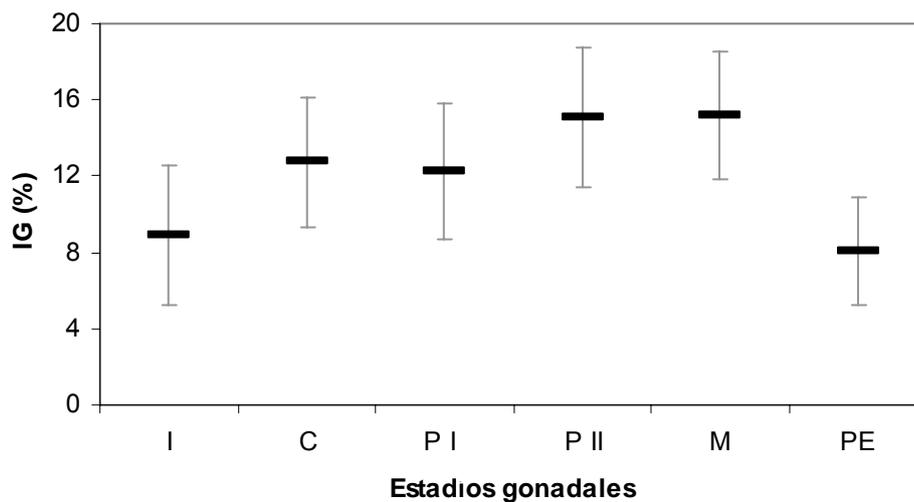
El ciclo reproductivo de los machos presenta una secuencia de desarrollo similar al de las hembras (Figura 3.6). El mayor porcentaje de individuos en el estadio Maduro fue registrado en el mes de agosto (70%). En septiembre se inició la evacuación de gametas, alcanzando el 100% de individuos Post-evacuados en el mes de octubre. Este estadio se mantuvo con porcentajes mayores al 60 % en noviembre y diciembre. Entre los meses de noviembre y marzo se encontró un porcentaje variable (entre 20 y 60 %) de individuos en estadio Inmaduro. El mayor porcentaje de individuos en estadio Crecimiento se observó en el mes de abril (63%). Los estadios Premaduro I y II se encontraron entre los meses de abril y agosto (Figura 3.6).



**Figura 3.6.** Frecuencias relativas mensuales (%) para los diferentes estadios gonadales de machos de *L. albus* entre mayo de 2004 y mayo de 2005. I: Inmaduro, C: Crecimiento, P I: Premaduro I, P II: Premaduro II, M: Maduro, PE: Post-evacuado.

### ÍNDICES GONADALES Y ESTADIOS GONADALES

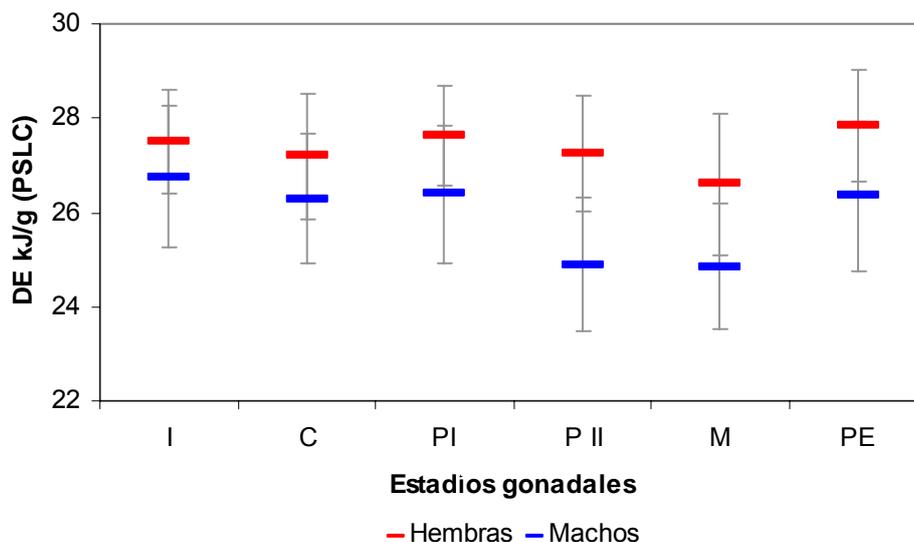
El valor del IG promedio varió significativamente entre estadios gonadales pero no así entre sexos ( $p= 0,98$ ). La interacción entre los estadios gonadales y el sexo, no fue significativa (ANOVA  $p= 0,62$ ). Los valores promedio del IG para cada estadio fueron: Inmaduro: 8,90; Crecimiento: 12,74; Premaduro I: 12,22; Premaduro II: 15,05; Maduro: 15,18 y Post-evacuado: 8,06. Las diferencias en el IG atribuibles a los estadios gonadales fueron altamente significativas ( $p < 0,0001$ ). Los valores máximos de IG se registraron en individuos en el estadio Premaduro II y Maduro que difirieron significativamente de los estadios Post-evacuado e Inmaduro ( $p < 0,05$ ) (Figura 3.7).



**Figura 3.7.** Valores promedio y desvío estándar del IG de *L. albus* para cada estadio gonadal: I: Inmaduro, C: Crecimiento, P I: Premaduro I, P II: Premaduro II, M: Maduro, PE: Post-evacuado.

### DENSIDAD ENERGÉTICA Y ESTADIOS GONADALES

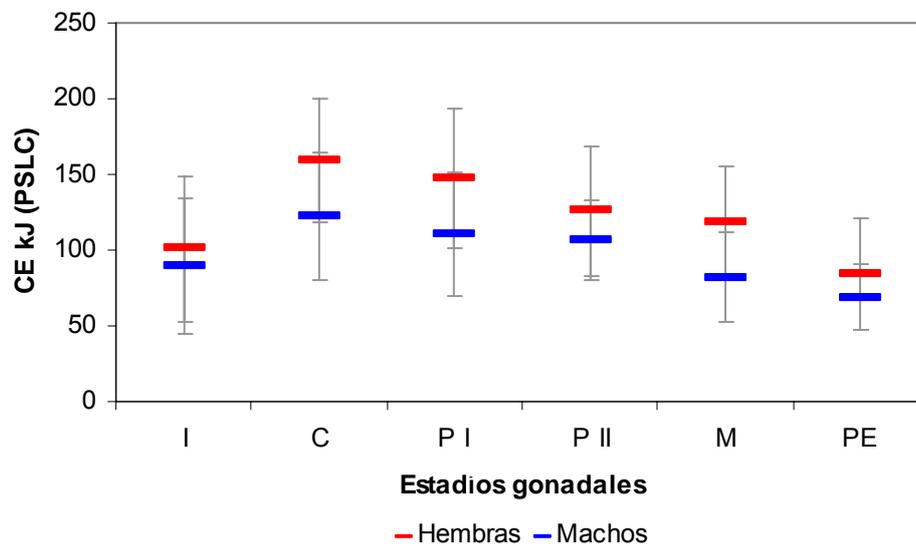
El valor medio de densidad energética (DE) varió significativamente entre los estadios gonadales. La interacción entre los estadios gonadales y el sexo no fue significativa (ANOVA  $p= 0,23$ ). Las diferencias encontradas fueron atribuibles a los estadios gonadales ( $p < 0,0001$ ) y al sexo ( $p < 0,05$ ). Las hembras presentaron valores de DE más elevados que los machos. La DE de las hembras fue significativamente mayor en el estadio Post-evacuado que en el estadio Maduro ( $p < 0,05$ ). Para los machos los valores de IG fueron significativamente mayores en el estadio Inmaduro que en Premaduro II y Maduro ( $p < 0,05$ ). En los estadios Inmaduro y Crecimiento no se encontraron diferencias entre sexos ( $p > 0,05$ ) (Figura 3.8).



**Figura 3.8.** Valores promedio y desvíos estándar de la Densidad Energética (kJ/g PSLC) de las gónadas de hembras ( $n= 128$ ) y machos ( $n= 117$ ) de *L. albus* para cada estadio gonadal: I: Inmaduro C: Crecimiento, PI: Premaduro I, PII: Premaduro II, M: Maduro, PE: Post-evacuado.

### CONTENIDO ENERGÉTICO Y ESTADIOS GONADALES

La media del contenido energético (CE) de cada estadio gonadal varió significativamente entre sexos. La interacción entre los estadios gonadales y el sexo no fue significativa (ANOVA  $p= 0,30$ ). Las diferencias encontradas no fueron atribuibles a los estadios gonadales ( $p= 0,92$ ) pero sí al sexo ( $p< 0,05$ ). Las hembras presentaron valores de CE más elevados que los machos, siendo 119,4 kJ la media de los ovarios y 94,5 kJ la media de los testículos (Figura 3.9).



**Figura 3.9.** Media y desvíos estándar del Contenido Energético (CE kJ PSLC) de las gónadas femeninas ( $n= 128$ ) y masculinas ( $n= 117$ ) de *L. albus* para los diferentes estadios gonadales: I: Inmaduro, C: Crecimiento, P I: Premaduro I, P II: Premaduro II, M: Maduro, PE: Post-evacuado.

**ESFUERZO REPRODUCTIVO**

El esfuerzo reproductivo (ER) fue determinado para ambos sexos como la diferencia entre el IG promedio de individuos con gónadas maduras e individuos con gónadas desovadas o evacuadas. En *L. albus* el ER de las hembras fue 7,28 % y el de los machos 6,15 %. Es decir, que el ER de las hembras fue 1,2 veces más mayor que el de los machos.

Se determinó también el ER a partir del contenido energético de las gónadas. Con este enfoque las diferencias entre sexos son mayores ya que se encuentra que para las hembras el ER fue 29,27 kJ y para los machos 21,52 kJ. Es decir, que el ER de las hembras fue 1,36 veces más mayor que el de los machos.

## **DISCUSION**

La población de *L. albus* estudiada presenta una proporción de sexos de 1:1. Este resultado coincide con los datos obtenidos previamente para esta misma especie por Bückle *et al.* (1978), Zamora Quiroz (1989) y Orlor (1992). Lawrence (1987b) propone que, en general, las especies de equinodermos dioicas presentan igual proporción de hembras que de machos.

El índice gonadal ha sido tradicionalmente utilizado para evaluar la gametogénesis en erizos, pero este índice no describe fielmente el ciclo reproductivo de los equinoideos dado que los cambios mensuales en el IG son producidos por la presencia de cantidades variables de fagocitos nutritivos y gametas en diferente estado de desarrollo (Walker y Lesser 1998). Por ello, para lograr una mejor comprensión de los ciclos reproductivos, es necesario realizar análisis periódicos de la histología gonadal. Mediante esos análisis se pudo determinar que, al igual que lo descrito para otros equinoideos (Brewin *et al.* 2000), la maduración gonadal en *L. albus* ocurre sincrónicamente a lo largo del año en ambos sexos (Figuras 3.4 y 3.6)

En la población de *L. albus* estudiada los valores máximos del IG, correspondientes a la maduración gonadal, fueron observados en julio y agosto, produciéndose un descenso hasta noviembre inclusive. El estadio post-evacuado (periodo de evacuación y desove) representa más de la mitad de las muestras entre septiembre y diciembre produciéndose al mismo tiempo la disminución de los valores del IG desde septiembre (Figuras 3.1, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6 y 3.7).

La presencia de un máximo del IG en otoño (marzo y abril) no indica un segundo periodo de maduración sexual, dado que las gónadas no presentaron gametas maduras (Figuras 3.1, 3.4 y 3.6). Este máximo puede explicarse debido al alto porcentaje de individuos en estadio de crecimiento (Figuras 3.4 y 3.6) que han acumulado una importante cantidad de sustancias de reserva en los fagocitos nutritivos (Figura 3.3b, 3.5b y 3.9). Se interpreta

que esas reservas serán utilizadas durante el transcurso de la gametogénesis (Pérez *et al.* 2008). Guillou *et al.* (2000) encontraron resultados similares en *Sphaerechinus granularis*.

Un periodo de desove y evacuación similar al descrito en esta tesis, fue observado para las poblaciones de *L. albus* que habitan la región de Magallanes (53° - 54° S) (Bay-Schmidt *et al.* 1981; Arana *et al.* 1996; Oyarzún *et al.* 1999). Estos resultados no se ajustan al patrón general de desove propuesto para las poblaciones de *L. albus* que habitan el resto del litoral chileno (Zamora y Stotz 1992).

Zamora y Stotz (1992) señalan que el periodo de evacuación, a lo largo de la costa chilena, ocurre más avanzado en el año, a medida que se incrementa la latitud. Sin embargo en latitudes más bajas, como es señalado en una población de erizos de Antofagasta (Península Mejillones, 23° S), *L. albus* se reproduce en julio y entre octubre y diciembre (Gutiérrez y Otsú 1975). Es importante señalar que Gutiérrez y Otsú (1975) se basaron en una escala macroscópica de madurez gonadal, mientras datos posteriores aportados por Zegers *et al.* (1983) indican que ocurre un desove masivo en julio y descartan el periodo de desove citado entre octubre y diciembre. De esta manera, la población de Antofagasta quedaría integrada al gradiente latitudinal de temporadas de desove propuesto por Zamora y Stotz (1992). Estos autores sugieren que la diferencia en la ubicación temporal del desove de las poblaciones de la región de Magallanes, respecto del resto del litoral chileno, se debería a que no se encuentran bajo la influencia de la corriente de Humboldt. En latitudes mayores a 48° S aumenta la influencia de la corriente del Cabo de Hornos, la que presenta características oceanográficas diferentes a la corriente de Humboldt (Vásquez 2001). La población aquí estudiada presenta periodos de desove similares a los reportados para la región magallánica, pudiéndose explicar esta similitud a partir de características ambientales comunes entre ambas zonas.

Al realizar comparaciones regionales se debe tener presente también la posible existencia de variaciones interanuales ya que, por ejemplo, en una investigación

realizada sobre una población del Canal Beagle entre 1987 y 1989, el periodo reproductivo de *L. albus* fue descrito con dos periodos de evacuación, el mayor entre agosto y septiembre y un segundo evento de menor intensidad en noviembre (Orler 1992).

Esta variabilidad en el periodo de desove podría relacionarse al tipo y disponibilidad de alimento (Oyarzún *et al.* 1999), a pequeñas variaciones en las áreas de muestreo o a cambios interanuales en los factores físicos que regulan la reproducción (Pearse y Cameron 1991). Hay numerosos antecedentes respecto de la influencia de las condiciones ambientales, especialmente temperatura y fotoperiodo, así como disponibilidad de alimento sobre la maduración de las gametas y el desove de los invertebrados marinos (Giese 1959; Pearse y Cameron 1991; Brockington *et al.* 2001). En la población de *L. albus* estudiada, se observó una relación inversa entre los cambios del fotoperiodo y la maduración sexual (Figura 3.1). El comienzo de la gametogénesis (Figuras 3.4 y 3.6) ocurre en marzo, coincidentemente con el acortamiento de la longitud del día, mientras que el máximo desarrollo gonadal (julio - agosto) coincide con el incremento del fotoperiodo. En septiembre, cuando hay más de 12 horas de luz diarias, comienza la liberación de gametas encontrándose más del 50% de los individuos en estadio post-evacuado (Figuras 3.1, 3.4 y 3.6). Cuando la longitud del día es cercana al máximo de horas de luz (Figura 3.1), entre octubre y diciembre, más del 70% de los individuos se encuentra en el estadio post-evacuado. Influencias similares del fotoperiodo sobre la reproducción han sido descritas en *Centrostephanus rodgersii* (Byrne *et al.* 1998) y en varias poblaciones de *Strongylocentrotus purpuratus* (Pearse *et al.* 1986, Bay-Schmidt y Pearse 1987).

Otro importante factor ambiental que regula el desarrollo de la gametogénesis en varias especies de erizos es el cambio estacional en la temperatura del agua de mar (Pearse y Cameron 1991). Sin embargo, no se encontró una correlación significativa entre la maduración gonadal y la temperatura del agua de mar en la población de *L. albus*

proveniente del Canal Beagle (Figura 3.1), así tampoco en las poblaciones del extremo sur de Chile (Zamora y Stotz 1992). Sin embargo, las poblaciones que habitan el resto del litoral chileno muestran una dependencia entre la evacuación y la temperatura del agua de mar (Zamora y Stotz 1992).

La mayoría de las especies de invertebrados marinos que poseen larvas planctotróficas sincronizan sus desoves de tal manera que, cuando las larvas deben alimentarse, la abundancia de fitoplancton (estimado como concentración de clorofila en el agua) es elevada (Himmelman 1981). Una sincronización similar se observa en la población de *L. albus* estudiada pues el desove ocurre simultáneamente con el incremento en la productividad primaria durante la primavera (Hernando 2006). Dado que esta especie posee larvas planctotróficas (Arrau 1958), el incremento de la productividad primaria puede ser otro factor que favorece el inicio de la evacuación en el Canal Beagle.

Las gónadas en los erizos presentan una función dual, por un lado allí se generan las células germinales y por otro actúan como órganos de almacenaje de nutrientes en los fagocitos nutritivos (Giese 1966). Por lo cual resulta de particular interés el estudio de las variaciones energéticas en las gónadas de los equinoideos. El análisis de la relación entre el ciclo reproductivo, el almacenaje de energía y su utilización, permite comprender el proceso de transferencia de energía interna para una especie dada (Lucas 1996). Algunos autores sugieren que la transferencia de nutrientes ocurre desde los fagocitos nutritivos hacia las células germinales durante el proceso de la gametogénesis (Walker y Lesser 1998; Unuma *et al.* 2003; Walker *et al.* 2005). Un proceso similar probablemente ocurra en *Loxechinus albus* del Canal Beagle (Ver detalles en el capítulo 4 y en Pérez *et al.* 2008).

La DE de las gónadas de *L. albus* muestra una leve diferencia entre estadios gonadales, fluctuando entre 24 y 28 kJ/g PSLC (Figura 3.8). Estos valores resultan cercanos a los valores energéticos establecidos para las proteínas por Ansell (1974) y Lucas (1996). La DE de las gónadas de *L. albus* presentaron un valor mínimo en los estadios Premaduro II

y Maduro cuando los fagocitos nutritivos son escasos y las gametas son abundantes (Figura 3.8). En cambio en los estadios Post-evacuado e Inmaduro (Figura 3.8) se registraron los valores máximos de DE; en esos estadios se encontró una reducción en el número de gametas, en relación a los fagocitos nutritivos (Figuras 3.3 y 3.5). Los fagocitos nutritivos contienen vacuolas con proteínas, mucopolisacáridos neutros y lípidos (Walker *et al.* 2001), explicando entonces el elevado valor de DE encontrado en el estadio Post-evacuado e Inmaduro (Figura 3.8) (Pérez *et al.* 2008).

La DE (kJ/g PSLC) (Figura 3.8) y el contenido energético (CE) (kJ totales PSLC) (Figura 3.9) presentaron valores más elevados en los ovarios que en los testículos. Diferencias similares fueron encontradas en equinodermos antárticos (McClintock y Pearse 1987) y fueron explicadas por el alto contenido de lípidos presentes en los ovarios.

El esfuerzo reproductivo fue mayor en las hembras que en los machos de *L. albus*, indicando que la producción y evacuación de gametas es más costosa para las hembras. Resultados similares fueron encontrados en otros invertebrados (Morriconi 2005). Aunque las hembras invirtieron más energía en la reproducción que los machos, esto no se vio reflejado en una menor densidad energética en los componentes somáticos (Ver capítulo 4).

## **INTRODUCCIÓN**

En los ambientes marinos de altas latitudes existen fuertes variaciones en los factores ambientales tales como la temperatura y el fotoperiodo, consecuentemente se producen amplios cambios estacionales en la disponibilidad de alimento (Clarke 1987). Los organismos que habitan estos ambientes requieren poseer la capacidad de acumular reservas energéticas cuando los alimentos están disponibles y así superar los periodos de disminución o ausencia de los mismos. Cabe señalar que las restricciones en la utilización de los alimentos pueden deberse a limitaciones extrínsecas a los individuos, es decir una oferta reducida de los mismos, o bien intrínsecas a los individuos, dada por limitaciones en la capacidad de obtenerlos e ingerirlos, y de esta manera poder constituir las reservas energéticas.

De ello se desprende la importancia de la investigación de las pautas temporales de asignación y distribución de las reservas energéticas entre diferentes componentes del cuerpo para, de esa manera, comprender los roles funcionales de los diferentes órganos y su importancia relativa para la supervivencia de los organismos (Lawrence 1987a; Lawrence y McClintock 1994; Lucas 1996).

Existe un potencial conflicto en la asignación de recursos energéticos entre el crecimiento somático y las actividades reproductivas (Calow 1984), por lo que existiría una correlación negativa entre ambos procesos. Esta hipótesis se ha probado en numerosos organismos y resulta un paradigma fundamental de las teorías de historia de vida (Stearns 1992).

La limitación en la disponibilidad de energía resulta un impedimento para que los procesos de crecimiento y reproducción se desarrollen simultáneamente a una tasa máxima (Wieser 1998), por lo que se asume que existen presiones selectivas para que estos procesos diferentes se desarrollen a tasas sub-máximas optimizando el

funcionamiento de los organismos. De esta manera la asignación del gasto de energía se co-ajusta al requerimiento de diferentes funciones y órganos (Hammond 1998).

Por otra parte, como ocurre en las especies con larvas planctotróficas como el caso de *L. albus*, la supervivencia de las larvas depende de fuentes externas de alimento, es decir que debe existir una sincronización de los ciclos reproductivos de los adultos con las condiciones ambientales favorables para las larvas (Himmelman 1981).

Debido a la amplia necesidad de requerimientos energéticos planteados y a la variabilidad temporal en la disponibilidad de alimentos, la constitución de reservorios de energía en los individuos adultos resulta ventajosa para optimizar la función reproductiva y mejorar la viabilidad de los descendientes. Para organismos como los erizos de mar, que no poseen órganos de reserva discretos, el manejo y la asignación de recursos energéticos dependen en gran medida de las células accesorias, también denominadas fagocitos nutritivos, que se ubican en los acinos gonadales (Ver capítulo 3; Figuras 3.3 y 3.5). En ellos se acumulan las sustancias de reserva que, en parte al menos, serán utilizadas como fuente de energía durante la gametogénesis (Chia *et al.* 1983). Una función semejante es también desempeñada en varias especies de erizos por el tubo digestivo y en menor medida por el caparazón (Unuma *et al.* 2003).

El análisis del contenido energético de los diferentes órganos, su variación estacional y su relación con el ciclo reproductivo surgen como un objetivo de interés ya que *Loxechinus albus* podría utilizar sus gónadas como órgano de reserva. Dado el elevado valor comercial de la especie, y las posibilidades de implementación de su explotación, resulta necesario investigar el posible conflicto entre crecimiento somático y crecimiento gonadal (reproducción) para sugerir pautas para el manejo de estas poblaciones naturales.

## **HIPÓTESIS**

- 1- Durante los meses de máximo crecimiento gonadal el crecimiento somático se detiene, dado que se asignan recursos energéticos al desarrollo de las gónadas
  
- 2- En *L. albus* el intestino funciona como un órgano de reserva.

## **OBJETIVOS**

- 1- Se determinará la densidad y el contenido energético de diferentes órganos y sus variaciones temporales.
  
- 2- Se determinaran los sitios de almacenamiento de reservas energéticas.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **MUESTREO**

Mensualmente se extrajeron 30 individuos adultos de *L. albus*, desde mayo de 2004 hasta mayo de 2005 (Ver capítulo 2, “MUESTREO Y MANTENIMIENTO DE LOS ANIMALES”).

Los individuos fueron procesados según se especifica en el capítulo 2, “TRATAMIENTO GENERAL DE LAS MUESTRAS”.

### **DETERMINACIONES CALORIMÉTRICAS**

Las determinaciones de densidad energética (DE) y contenido energético (CE) se realizaron, como se especifica en “DETERMINACIONES CALORIMÉTRICAS” del capítulo 3, sobre una gónada y el tubo digestivo de 20 de los 30 individuos disecados mensualmente.

### **DETERMINACION DE MATERIA ORGÁNICA**

Se determinó el porcentaje de materia orgánica del caparazón y de la linterna de Aristóteles de 10 individuos de cada muestreo mensual, por medio de combustión completa en mufla a 450° C. La elección de la temperatura se fundamenta en que a temperaturas menores existe riesgo de que no se destruya toda la materia orgánica y a temperaturas mayores a 460° C se descompone el carbonato de calcio y libera CO<sub>2</sub>, conduciendo a la sobreestimación del contenido de materia orgánica (Lucas, 1996).

### **TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS**

Los efectos del sexo sobre el índice gonadal y el índice de líquido celómico fueron analizados mediante la prueba de *t* (Zar 1984; Sokal y Rohlf 1995). El efecto de los meses del año sobre ambos índices fue analizado utilizando una prueba de Kruskal-

Wallis seguida de comparaciones múltiples de Dunn, en caso de haberse observado diferencias significativas (Zar 1984; Sokal y Rohlf 1995).

Se realizaron pruebas de ANOVA de dos factores para analizar el efecto del factor meses del año y del factor sexo sobre los índices intestinal, de linterna de Aristóteles y de caparazón, el contenido de materia orgánica de la linterna de Aristóteles y del caparazón así como la densidad y el contenido energético de gónadas e intestinos. En aquellos factores en los que se observaron diferencias significativas, se realizaron comparaciones de Tukey a posteriori.

En todos los casos, los supuestos de normalidad y homocedacia fueron puestos a prueba mediante pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente (Sokal y Rohlf 1995). Se transformaron los datos en los casos en que no se cumplieran los supuestos.

El análisis estadístico de los datos fue realizado mediante la utilización de los programas Statistica 6.0 y GraphPad Instat.

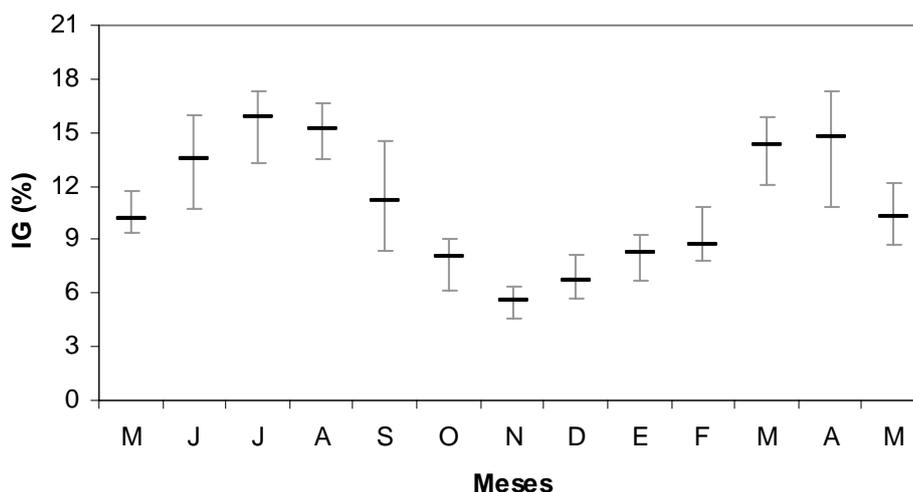
## **RESULTADOS**

Los valores de índice gonadal (IG) se utilizaron para estimar el desarrollo gonadal, mientras que los índices somáticos [índice intestinal (IInt), índice de linterna de Aristóteles (ILint) e índice de caparazón (ICap)] se emplearon como parámetros de crecimiento somático (Russell 1998). Con el fin de establecer los sitios de almacenaje de energía se determinó el contenido de materia orgánica presente en la linterna de Aristóteles y el caparazón, así como también la densidad y el contenido energético (DE y CE, respectivamente) de gónadas e intestino.

Debido al bajo contenido de materia orgánica (MO), resultó imposible determinar la DE del líquido celómico (20 % de MO), la linterna de Aristóteles (10 % de MO) y el caparazón (10 % MO).

## ÍNDICE GONADAL

Los valores mensuales del índice gonadal (IG) no mostraron diferencias entre hembras (n= 190) y machos (n= 190) ( $p= 0,32$ ) y por ello ambos sexos se analizaron conjuntamente. Las diferencias entre los valores mensuales del IG fueron altamente significativas (K-W  $p < 0,001$ ). Los valores más elevados del IG se encontraron en dos periodos diferentes, durante los meses de julio - agosto (2004) y marzo - abril (2005), mientras que los valores menores se registraron en noviembre y mayo ( $p < 0,05$ ) (Figura 4.1).

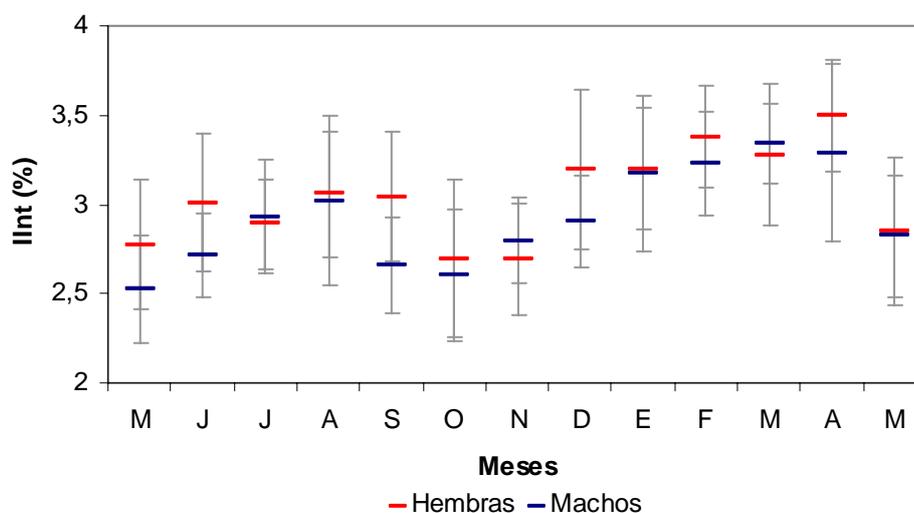


**Figura 4.1.** Índice gonadal (IG, %) de *L. albus* (mayo 2004 - mayo 2005). Para cada mes se presentan las medianas y los percentiles 25 y 75. (n= 380).

## ÍNDICES SOMÁTICOS

### ÍNDICE INTESTINAL

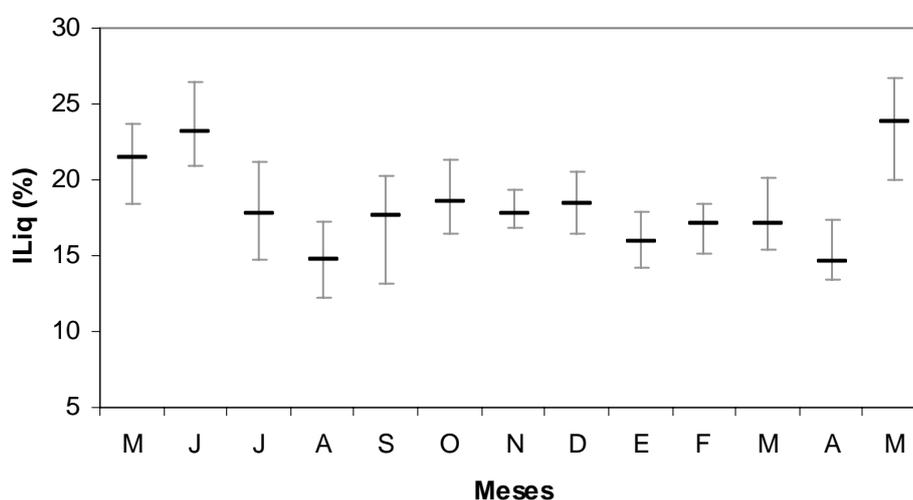
El índice intestinal varió durante el año tanto para hembras como para machos, sin embargo la interacción entre los meses del año y el sexo no fue significativa (ANOVA  $p=0,53$ ). El valor medio del índice intestinal fue levemente mayor para las hembras que para los machos, aunque sin significación estadística, ( $p=0,45$ ), siendo  $3,04 \pm 0,43$  y  $2,92 \pm 0,42$  respectivamente. Los valores más bajos de IInt se registraron en los meses de mayo, octubre y noviembre ( $p < 0,05$ ), mientras que los valores más elevados se registraron en agosto y entre diciembre y abril ( $p < 0,05$ ) (Figura 4.2).



**Figura 4.2.** Índice intestinal (IInt, %) de *L. albus* (mayo 2004 - mayo 2005). Para cada mes se presentan las medias y los desvíos estándar para las hembras ( $n=190$ ) y los machos ( $n=190$ ).

### ÍNDICE DE LÍQUIDO CELÓMICO

Los valores mensuales del índice de líquido celómico (ILiq) no mostraron diferencias entre hembras (n= 190) y machos (n= 190) ( $p= 0,11$ ), por ello ambos sexos se analizaron en conjunto. Las diferencias mensuales de ILiq fueron altamente significativas (K-W  $p < 0,001$ ). Los valores más elevados de ILiq se registraron en los meses de mayo y junio ( $p < 0,05$ ) mientras que los valores más bajos se registraron en agosto y abril ( $p < 0,05$ ) (Figura 4.3).



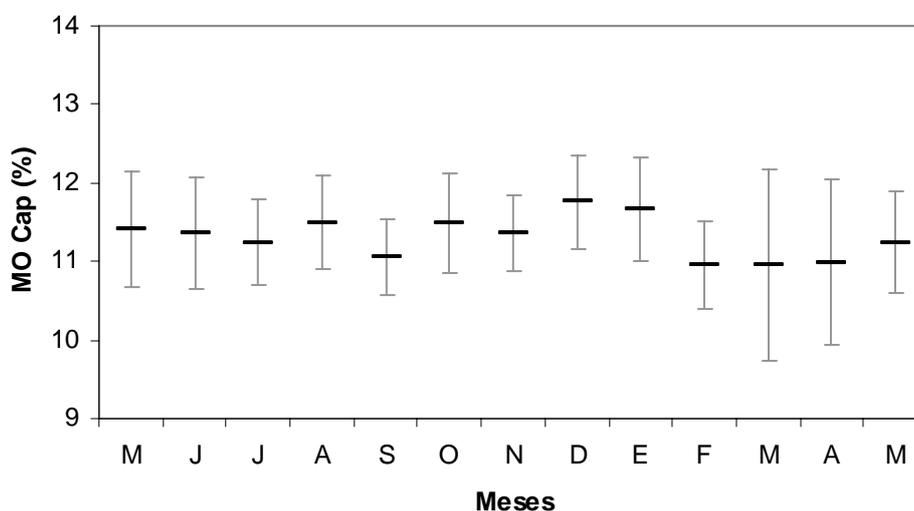
**Figura 4.3.** Índice de líquido celómico (ILiq, %) de *L. albus* (mayo 2004 - mayo 2005). Para cada mes se presentan las medianas y los percentiles 25 y 75. (n= 380).

### ÍNDICE DE LINTERNA DE ARISTÓTELES Y DE CAPARAZÓN

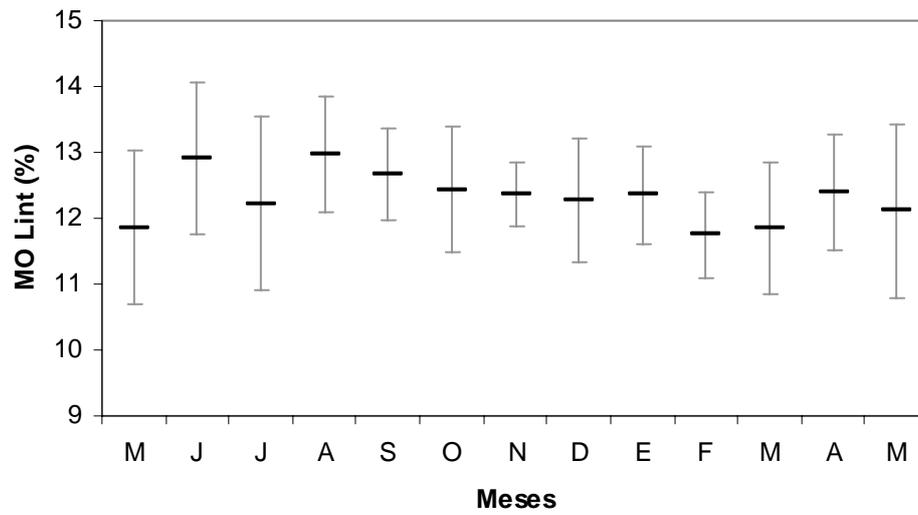
Ambos índices, el de linterna de Aristóteles ( $2,82 \pm 0,37$ , n= 260) y el de caparazón ( $39,46 \pm 2,18$ , n= 260) no variaron significativamente a lo largo del año, así como tampoco entre machos y hembras ( $p > 0,05$ ). La interacción entre los factores no fue significativa para ambos índices ( $p > 0,05$ ).

## CONTENIDO DE MATERIA ORGÁNICA DEL CAPARAZÓN Y DE LA LINTERNA DE ARISTÓTELES

Los contenidos porcentuales de materia orgánica del caparazón ( $12,32 \pm 0,99$ ,  $n= 130$ ) y de la linterna de Aristóteles ( $11,30 \pm 0,71$ ,  $n= 130$ ) no variaron significativamente a lo largo del año, así como tampoco entre sexos ( $p > 0,05$ ). La interacción entre los factores meses y sexo no fue significativa para ambos contenidos de materia orgánica ( $p > 0,05$ ) (Figuras 4.4 y 4.5).



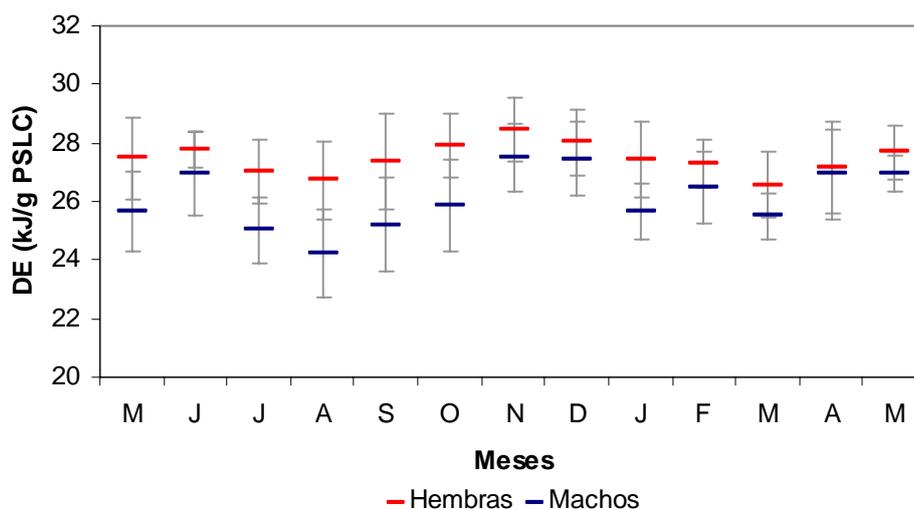
**Figura 4.4.** Contenido de materia orgánica del caparazón (MO Cap., %) de *L. albus* (mayo 2004 - mayo 2005). Para cada mes se presentan las medias y los desvíos estándar ( $n= 130$ ).



**Figura 4.5.** Contenido de materia orgánica de la linterna de Aristóteles (MO Lint., %) de *L. albus* (mayo 2004 - mayo 2005). Para cada mes se presentan las medias y los desvíos estándar (n= 130).

### DENSIDAD ENERGÉTICA DE LAS GÓNADAS

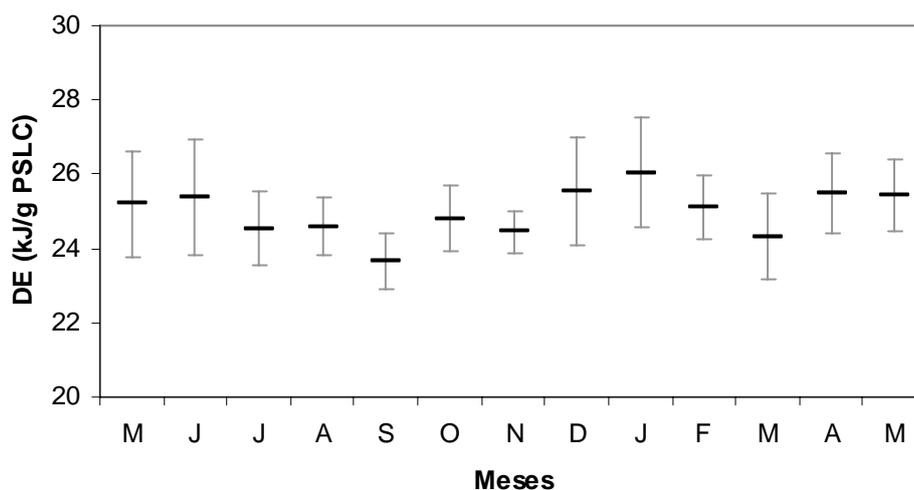
En todas las muestras mensuales el valor medio de la densidad energética de las gónadas (DE) fue mayor en hembras que en machos (Figura 4.6) variando significativamente para ambos sexos en el transcurso del año. La interacción entre los meses y el sexo no fue significativa (ANOVA  $p= 0,07$ ). Se encontraron diferencias significativas atribuibles a los meses del año ( $p< 0,001$ ) y al sexo ( $p< 0,0001$ ). La DE para las hembras fue máxima en noviembre ( $p< 0,05$ ) y mínima en agosto y marzo ( $p< 0,05$ ), mientras que en los machos los mayores valores fueron registrados en noviembre, diciembre, abril y mayo, y los valores más bajos en agosto ( $p< 0,05$ ) (Figura 4.6).



**Figura 4.6.** Densidad energética de las gónadas (DE, kJ/g PSLC) de *L. albus* (mayo 2004 - mayo 2005). Para cada mes se presentan las medias y los desvíos estándar para las hembras ( $n= 128$ ) y los machos ( $n= 117$ ).

### DENSIDAD ENERGÉTICA DEL INTESTINO

La densidad energética (DE) del intestino varió significativamente en el periodo anual muestreado. La interacción entre los meses y el sexo no fue significativa (ANOVA  $p=0,44$ ). El valor medio de DE del intestino no difirió significativamente entre sexos, siendo de  $24,82 \pm 1,14$  kJ/g ( $n=129$ ) para las hembras y de  $25,11 \pm 1,35$  kJ/g ( $n=119$ ) para los machos ( $p=0,07$ ) (Figura 4.7). Las diferencias encontradas fueron atribuibles a los meses del año ( $p < 0,001$ ). Los menores valores de DE fueron encontrados en septiembre, difiriendo de los valores máximos encontrados entre diciembre y febrero y entre abril y junio ( $p < 0,05$ ) (Figura 4.7).

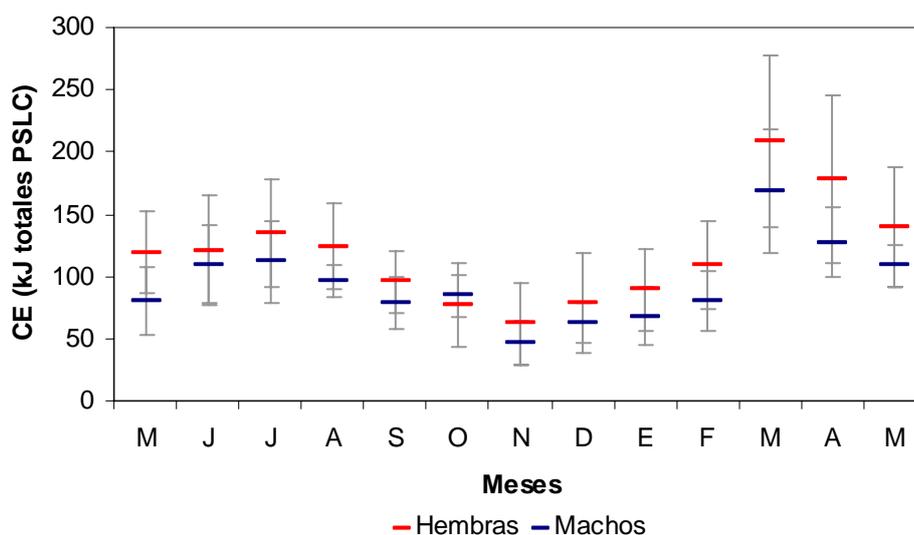


**Figura 4.7.** Densidad energética del intestino (DE, kJ/g PSLC) de *L. albus* (mayo 2004 - mayo 2005). Para cada mes se presentan las medias y los desvíos estándar ( $n=248$ ).

### CONTENIDO ENERGÉTICO DE LAS GONADAS

El contenido energético (CE) de los ovarios fue significativamente superior al de los testículos ( $p < 0,001$ ), siendo los valores medios  $118,54 \pm 59,79$  kJ ( $n = 125$ ) y  $94,45 \pm 38,88$  kJ ( $n = 117$ ), respectivamente (Figura 4.8).

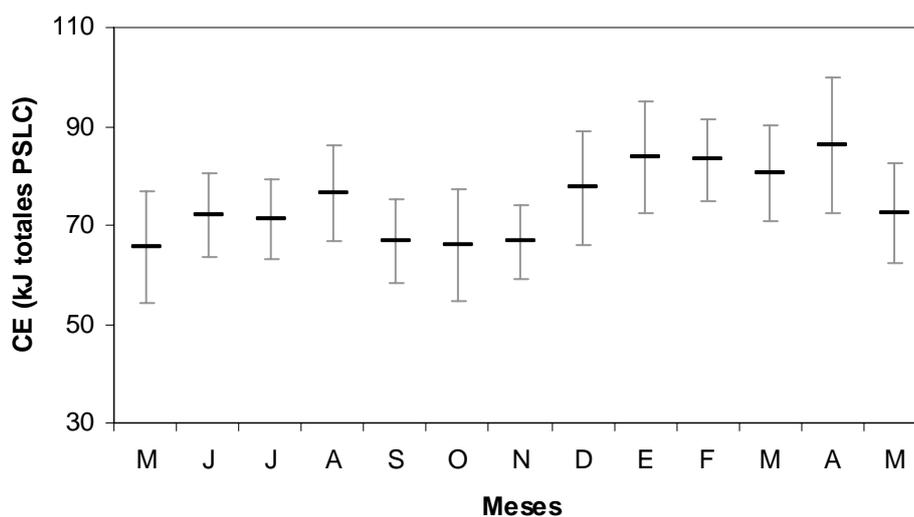
El CE de las gónadas varió significativamente entre los meses del año, encontrándose los valores más bajos en noviembre ( $p < 0,05$ ) y los máximos valores en julio y marzo ( $p < 0,05$ ) (Figura 4.8). La interacción entre los meses y el sexo no fue significativa (ANOVA  $p = 0,74$ ).



**Figura 4.8.** Contenido energético de las gónadas (CE, kJ totales PSLC) de *L. albus* (mayo 2004 - mayo 2005). Para cada mes se presentan las medias y los desvíos estándar para las hembras ( $n = 125$ ) y los machos ( $n = 117$ ).

### CONTENIDO ENERGÉTICO DEL INTESTINO

El contenido energético (CE) del intestino varió significativamente en el periodo anual muestreado, presentando una interacción no significativa entre los meses y el sexo (ANOVA  $p=0,44$ ). El valor medio de CE de las hembras fue  $75,68 \pm 11,80$  kJ ( $n=128$ ), no difiriendo significativamente del de los machos, siendo éste  $73,59 \pm 12,40$  kJ ( $n=119$ ) ( $p=0,10$ ). Las diferencias encontradas fueron atribuibles a los meses del año ( $p < 0,05$ ). El CE presentó valores elevados entre diciembre y abril y valores bajos en los meses de mayo y desde septiembre a noviembre ( $p < 0,05$ ) (Figura 4.9).



**Figura 4.9.** Contenido energético del intestino (CE, kJ totales PSLC) de *L. albus* (mayo 2004 - mayo 2005). Para cada mes se presentan las medias y los desvíos estándar ( $n=247$ ).

## **DISCUSIÓN**

Grandes fluctuaciones estacionales en los parámetros ambientales, tales como la productividad primaria, la temperatura y el fotoperiodo han sido descritas para las aguas Antárticas (Clarke *et al.* 1988; Clarke 1988; Peck 2005) y Subantárticas (Canal Beagle) (Hernando 2006).

El conocimiento de la influencia de las fluctuaciones ambientales sobre los ciclos biológicos de los organismos que habitan altas latitudes puede permitir el análisis y predicción de los efectos del cambio climático.

El análisis de la relación entre el ciclo reproductivo, el almacenamiento de energía y su utilización, permite entender el proceso interno de transferencia de energía para una especie dada (Lucas 1996). Comúnmente, la composición bioquímica proximal (Brockington *et al.* 2001; Galley *et al.* 2005) y el contenido de materia orgánica (Lares y Pomory 1998) son utilizados para determinar los órganos que intervienen en el almacenamiento de energía en equinoideos. En la bibliografía no se registran datos sobre estudios energéticos realizados en equinoideos mediante determinaciones directas utilizando bombas calorimétricas. La presente tesis representa el primer estudio sobre variaciones en la densidad energética y el contenido energético en diferentes órganos de equinoideos.

Las reservas energéticas pueden ser acumuladas en el intestino, gónadas, paredes del cuerpo (caparazón), linterna de Aristóteles y líquido celómico. El intestino y las gónadas son considerados los órganos que presentan el rol más importante en el almacenamiento de reservas energéticas en los erizos (Lawrence *et al.* 1965; Brockington *et al.* 2001). Por lo tanto, una variación en los índices y contenidos energéticos de estos órganos es esperada en el periodo analizado.

La variación temporal del índice gonadal (IG) (Figura.4.1) sugiere que la población de *L. albus* estudiada presenta un ciclo gonadal anual. Este resultado es también documentado por los estudios histológicos realizados en las gónadas de *L. albus* (Ver capítulo 3). De los estudios histológicos se desprende que hay un periodo en el que los oocitos maduros se encuentran ausentes (primavera - verano). Estas observaciones muestran una marcada diferencia con el ciclo gametogénico del erizo antártico *Sterechinus neumayeri*, en el que los oocitos tardan más de dos años para desarrollarse completamente (Pearse y Giese 1966). Esto podría deberse a que en latitudes mayores, donde las condiciones ambientales son aun más extremas que en la región subantártica, la cantidad de energía asimilada no es suficiente para que la maduración gonadal se realice en un periodo anual. Un valor máximo de IG fue observado en julio y agosto, seguido por un descenso que es debido a un desove en primavera (septiembre - noviembre) diagnosticado por los resultados obtenidos del estudio histológico de las gónadas (Ver capítulo 3). Los cambios en los valores de IG no representan únicamente cambios en la cantidad y estado de maduración de las gametas ya que los fagocitos nutritivos, el otro componente celular mayoritario de las gónadas, varían en número prácticamente en sentido inverso al de las gametas. Este hecho compromete la utilización del IG como estimador de la maduración gonadal ya que en el caso de *L. albus* el incremento de IG en otoño podría deberse al incremento de los fagocitos nutritivos. Un aumento similar fue descrito por Walker *et al.* (2001) para otras especies de equinoideos. Probablemente el subsiguiente descenso del IG durante mayo, observado en ambos años de muestreo (Figura 4.1), podría deberse a la utilización de nutrientes depositados en los fagocitos nutritivos durante el comienzo de la gametogénesis, antes de alcanzar la maduración sexual.

Cuando las gónadas alcanzan la madurez sexual presentan su máximo volumen y, dado que el volumen corporal interno de los erizos permanece constante, la cantidad de líquido celómico debe decrecer por lo cual el índice de líquido celómico también disminuye (Figura 4.3). Por lo tanto el ILiq muestra una variación inversa al IG (Figuras 4.1 y 4.3).

Los menores valores de índice intestinal se encuentran en primavera (Figura 4.2), en ese periodo se produce una disminución de la actividad de ingesta alimentaria, observada en erizos bajo condiciones de cautividad (Pérez observación personal; Cárcamo 2004) y durante el periodo de desove (valores mínimos de IG) (Figura 4.1).

Varios autores han reportado que algunas especies de erizos pueden sufrir una disminución en la tasa de alimentación durante el periodo de desove (Lawrence 1975), por ejemplo, un patrón similar fue encontrado en *S. intermedius* bajo condiciones experimentales (Fuji 1962). También se ha demostrado que *S. purpuratus* y *S. franciscanus* presentan una variación estacional en el tamaño relativo del intestino; esta fluctuación podría reflejar la condición nutricional de los erizos (Lawrence *et al.* 1965; Pearse *et al.* 1970).

Después del periodo reproductivo, entre noviembre y abril, *L. albus* exhibe un incremento en el IInt (Figura 4.2). Esto podría indicar que la energía utilizada en la reproducción y el desove es recuperada debido a una alta tasa de ingestión subsiguiente. Una situación similar a la descrita para la población de *L. albus* estudiada en esta tesis fue registrada en poblaciones de la costa chilena (Bückle *et al.* 1980), así como también en estudios realizados en Japón con *Strongylocentrotus intermedius* bajo condiciones de cautividad (Fuji 1962), donde se observó que luego de la temporada reproductiva la tasa de ingestión se incrementa.

En el presente estudio el IInt de *L. albus* muestra una amplia variación en el periodo de muestreo (Figura 4.2). Por lo tanto, estos resultados permiten considerar al intestino como un órgano de almacenaje en coincidencia con los resultados previos obtenidos en otras especies (Lawrence *et al.* 1966; Klinger *et al.* 1988). Cuando la disponibilidad de alimento es baja o durante la inanición provocada experimentalmente, el epitelio intestinal reduce su altura (Lawrence *et al.* 1965), el espesor de la pared intestinal disminuye y la luz intestinal decrece (Bishop y Watts 1992).

El caparazón y la linterna de Aristóteles de *L. albus* no parecen jugar un rol central en el almacenaje de nutrientes dado que sus índices y contenido porcentual de materia orgánica no muestran variaciones significativas durante el periodo estudiado (Figuras 4.4 y 4.5). Aunque el caparazón de los erizos contiene una masa absoluta de materia orgánica mayor que otros componentes del cuerpo, el caparazón muestra bajos niveles de carbohidratos y lípidos y carece de células especializadas en el almacenaje de nutrientes, lo cual sugiere que éste no cumple un rol importante como reservorio energético (Lawrence y Guille 1982). Sin embargo, en otras especies de equinoideos se observó que la linterna de Aristóteles podría incrementar su tamaño relativo en relación con una mayor disponibilidad de alimento (Ebert 1980; Black *et al.* 1982; Levitan 1991).

En este estudio se observa escasa variación mensual en la DE de las gónadas de *L. albus* (entre 24 y 28 kJ/g PSLC) (Figura 4.6) sugiriendo que la composición bioquímica sería principalmente proteica aunque incluiría un bajo porcentaje de lípidos, dado que los valores energéticos de las proteínas son 23,4 y 23,9 kJ/g (Cho *et al.* 1982; Ansell 1974, respectivamente) y los valores de los lípidos son 33 y 39,8 kJ/g (Beninger y Lucas 1984; Ansell 1974, respectivamente). En el erizo antártico *Sterechinus neumayeri* (Brockington *et al.* 2001) han sido reportados valores aun más bajos de DE que los registrados en *L. albus*, presentando un valor máximo de 20 kJ/g. Este valor estaría indicando que en la composición bioquímica abundan los hidratos de carbono que tienen un valor energético de 17,2 kJ/g (Lucas 1996).

La DE en las gónadas de *L. albus* es mínima en agosto, coincidiendo con el máximo porcentaje de individuos en estadio Maduro, y máxima en noviembre donde predominan los individuos en estadio Post-evacuado (Figura 4.6). Estas variaciones en la DE podrían deberse a los cambios en la proporción de fagocitos nutritivos con respecto a las gametas. El número de fagocitos disminuye en las gónadas maduras, incrementándose luego del desove (Ver capítulo 3). Estas células contienen vacuolas con proteínas, mucopolisacáridos neutros y lípidos (Walker *et al.* 2001), explicando de esta manera los

altos valores energéticos (Figuras 4.6 y 4.8) encontrados en las gónadas Post - evacuadas de *L. albus* (Figura 4.1). La DE (kJ/g PSLC) es mayor en los ovarios que en los testículos de *L. albus* (Figura 4.6), este resultado podría deberse a un mayor contenido de lípidos en los ovarios que en los testículos como determinaron McClintock y Pearse (1987) para 14 especies de equinodermos antárticos.

Los valores medios mensuales de DE del intestino (kJ/g PSLC) fueron menores que los de DE de las gónadas (kJ/g PSLC) (Figuras 4.6 y 4.7) probablemente debido a que las gónadas contienen un mayor contenido de lípidos que el intestino. Un patrón similar fue encontrado en los equinoideos *Ctenocidaris perrieri*, *Abatus shackletoni*, *Abatus nimrodi* y en *Sterechinus neumayeri* (McClintock y Pearse 1986, 1987; McClintock 1989; Brockington *et al.* 2001).

Después del desove, entre noviembre y marzo, *L. albus* incrementa su tasa de ingestión, lo que se refleja en el incremento del IInt (Figura 4.2) y de la DE del intestino (kJ/g PSLC) (Figura 4.7) que se mantiene elevada hasta enero, en tanto el contenido energético total del intestino se incrementa hasta abril (Figura 4.9). En coincidencia con estos resultados *Strongylocentrotus intermedius* bajo condiciones de cautividad (Fuji 1962) y *Loxechinus albus* en las costas del Pacífico (Bückle *et al.* 1980; Cárcamo 2004) muestran altos regímenes de ingestión de alimentos después del periodo de desove.

El CE de las gónadas e intestino (Figuras 4.8 y 4.9) muestran que el primero de ellos tiene un promedio de valores mensuales más elevado (50 - 200 KJ totales PSLC) que el segundo (20 - 40 KJ totales PSLC). Estas diferencias indican que las gónadas son el órgano de almacenamiento energético más importante en el erizo *L. albus*, mientras el intestino se encuentra en segundo lugar de importancia.

## **INTRODUCCION**

Durante su evolución los organismos aeróbicos se han adaptado al incremento de oxígeno en el medio, alcanzando metabolismos de alta eficacia energética y desarrollando sistemas que los protegen de los daños inherentes a la utilización del oxígeno (Fridovich 1974). Los mecanismos protectores contra los efectos nocivos del oxígeno consisten en una gran variedad de defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas que facilitan el mantenimiento de las especies reactivas del oxígeno (ROS) endógenas en concentraciones compatibles con la vida, atenuando los daños relacionados con su elevada reactividad (Wilhelm Filho *et al.* 2001). La generación de ROS tales como el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $\bullet OH$ ), ocurre continuamente en las células, principalmente como producto de la respiración celular durante la reducción del oxígeno molecular a agua (Hermes Lima 2004).

Las fluctuaciones temporales en la producción de ROS en los organismos acuáticos han sido adjudicadas a: 1) cambios endógenos tales como: reproducción, tasa de alimentación, crecimiento, actividad de locomoción, envejecimiento, sexo, tasa metabólica y consumo de oxígeno (Viarengo *et al.* 1991, Wilhelm Filho *et al.* 2001; Livingstone 2003, Abele y Puntarulo 2004, Malanga *et al.* 2007) y 2) cambios ambientales o exógenos tales como: hipoxia, hiperoxia, contaminación, intoxicaciones, radiación UV, disponibilidad y calidad de alimento, entre otros (Livingstone *et al.* 1990; Winston y Di Giulio 1991; Abele *et al.* 1998).

El elevado contenido en ácidos grasos insaturados en los lípidos de membrana constituye una particularidad de los organismos marinos y sugiere un especial patrón para el desarrollo de la oxidación de lípidos (Joseph 1982). Los sistemas antioxidantes presentes

en vertebrados, ya sean terrestres o acuáticos (Wilhelm Filho *et al.* 2000), también se encuentran en invertebrados marinos (Gamble *et al.* 1995).

Es abundante la información disponible sobre los cambios estacionales en el metabolismo de los radicales libres y de las ROS en organismos acuáticos (Abele-Oeschger *et al.* 1994; Sole *et al.* 1995; Power y Sheedan 1996; Geracitano *et al.* 2004; Keller *et al.* 2004; Malanga *et al.* 2007). Se pueden señalar los siguientes ejemplos:

- disminución en la actividad de las defensas antioxidantes en invierno, acompañado de un incremento en el marcador de peroxidación de lípidos TBARS en la glándula digestiva de *Mytilus edulis* (Viarengo *et al.* 1991).
- incremento en el consumo de oxígeno, en el contenido de antioxidantes endógenos y en los TBARS en los meses de verano en relación con los valores de invierno en el mejillón marrón *Perna perna* (Wilhelm Filho *et al.* 2001).
- tasas de respiración significativamente más elevadas fueron encontradas durante el verano en el mejillón submareal *Modiolus modiolus* (Lesser y Kruse 2004).
- un incremento de 5 veces en la actividad de SOD y catalasa en el verano con respecto al invierno fue encontrado en el poliqueto *Arenicola marina* (Keller *et al.* 2004).
- tasas de generación de radicales libres de oxígeno así como de nitrógeno fueron más elevadas en verano, cuando la temperatura del agua y la actividad metabólica en el gasterópodo intermareal *Nacella (P.) magellanica* fueron significativamente mayores (Malanga *et al.* 2007).

La información disponible sobre el metabolismo oxidativo de los equinodermos y en particular en erizos es muy escasa. La mayoría de los estudios que incluyen una escala temporal se centran en cambios estacionales, mientras que en este capítulo se considerarán los cambios que se producen en función del ciclo reproductivo de *L. albus*.

A continuación se desarrollaran los conceptos generales del metabolismo oxidativo.

**RADICALES LIBRES Y ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (ROS)**

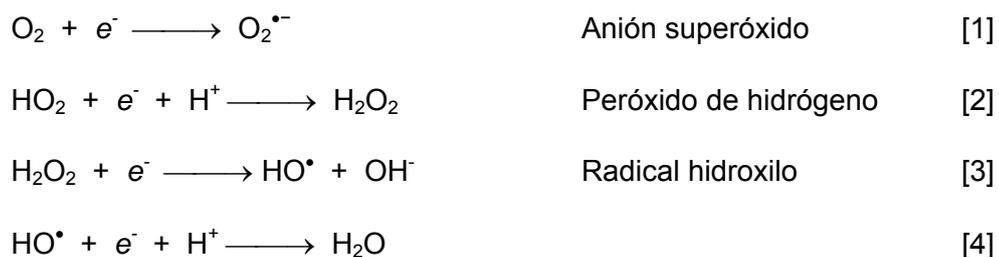
Un radical libre se puede definir como una molécula o un conjunto de átomos de existencia independiente con un electrón desapareado en el orbital externo (Yu 1994).

Existen distintos tipos de radicales libres de interés biológico:

- a) radicales libres del oxígeno (por ejemplo, anión superóxido, radical hidroxilo),
- b) radicales libres centrados en carbono (por ejemplo, radical alquilo),
- c) radicales libres del nitrógeno (por ejemplo, óxido nítrico),
- d) radicales libres donde el electrón desapareado se encuentra deslocalizado sobre varios átomos, como el radical ascorbilo.

El oxígeno molecular es un biradical, es decir que posee 2 electrones desapareados ubicados cada uno en un orbital  $\pi$ . Teniendo el mismo número cuántico de espín, esos 2 electrones se localizan en configuración de espín antiparalelo. Cuando el oxígeno oxida a otra molécula aceptando un par de electrones, ese par de electrones puede ser alineado con espín paralelo. Esta situación inestable fuerza la transferencia de electrones a otras moléculas o átomos para recuperar su espín antiparalelo (Floyd 1993). Esta restricción de espín parece ser ventajosa para los organismos aeróbicos por su bajo contenido de oxígeno reactivo, sin embargo se genera una situación en la cual la transferencia de un electrón puede conducir a la formación de una molécula o un átomo con un electrón desapareado y un radical libre (Fridovich 1978).

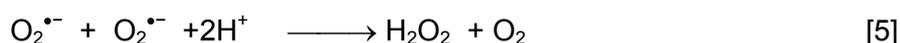
La principal vía para metabolizar el oxígeno molecular involucra la reducción completa a agua por aceptación de cuatro electrones,



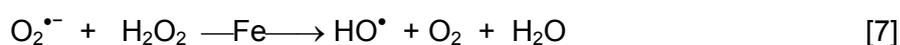
La alta reactividad de los radicales libres del oxígeno se evidencia en los valores de los tiempos de vida media que llegan a los nanosegundos, como en el caso del radical hidroxilo.

El anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) es el primer intermediario de la secuencia de reducción univalente del oxígeno a agua [reacción 1] (Hemes Lima 2004) y puede conducir a la formación de otras especies reactivas tales como: el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (reacción [2]) y el radical hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ) (reacción [3]), ambas con mayor poder oxidante que el anión superóxido (Pryor 1984). También puede reaccionar con el peróxido de hidrógeno para generar oxígeno singulete. Por otro lado, por acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD) puede dismutar para conducir a la formación de  $H_2O_2$ .

El  $H_2O_2$  por definición no es un radical libre (Harris 1992), sin embargo, es una especie altamente reactiva por la presencia de un enlace O-O muy lábil. La principal fuente de generación de  $H_2O_2$  es la dismutación del  $O_2^{\bullet-}$  catalizada por la actividad de la enzima SOD (reacción [5]).



El radical hidroxilo es generado, (a) a partir de la descomposición de  $H_2O_2$  a través de la reacción de Fenton, (reacción 6]) y (b) a partir de la reacción de  $O_2^{\bullet-}$  y  $H_2O_2$  mediante la reacción de Haber-Weiss (reacción [7]), catalizada por hierro. Otros metales de transición en presencia de  $H_2O_2$  pueden catalizar la generación de radical hidroxilo (reacción [8]).



En la tabla 5.1 se resumen las principales características de las especies reactivas del oxígeno. Se incluye el oxígeno singulete que, si bien no es un radical libre, presenta una alta reactividad debido a su condición de especie excitada del oxígeno (Sies 1985).

<b>Especie</b>	<b>Características</b>
anión superóxido	buen reductor
radical hidroxilo	extremadamente reactivo, baja capacidad de difusión
radical perhidroxilo	fuerte oxidante, puede iniciar reacciones de peroxidación de lípidos
radical alcoxilo	bajo poder oxidante, baja capacidad de difusión
radical peróxido	reactividad intermedia entre ROO <sup>•</sup> y HO <sup>•</sup>
peróxido de hidrógeno	alta capacidad de difusión
oxígeno singulete	muy buen oxidante

**Tabla 5.1.** Características de las especies reactivas del oxígeno.

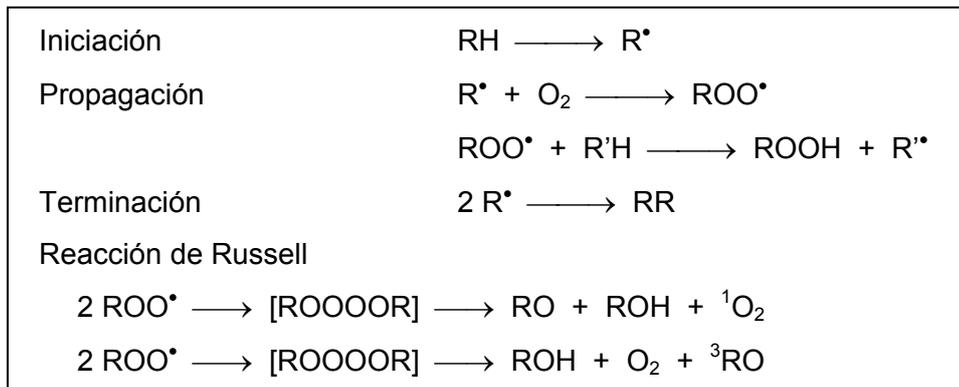
## DAÑO A MACROMOLÉCULAS

El daño a macromoléculas mediado por especies reactivas del oxígeno involucra la reacción de las mismas con proteínas, ácidos nucleicos y lípidos (Halliwell y Gutteridge 1984). Los aminoácidos son blanco para el ataque de radicales libres. El daño oxidativo a aminoácidos produce cambios en la macroestructura de las proteínas, tales como: (a) fragmentación, (b) agregación y (c) susceptibilidad a la digestión proteolítica. Finalmente, este daño puede llevar a cambios conformacionales y en la estructura terciaria de la proteína (Yu 1994). Dentro de las modificaciones oxidativas de aminoácidos en proteínas, la formación de carbonilos es un marcador temprano de oxidación proteica.

El daño al ADN estaría fundamentalmente mediado por HO<sup>•</sup> e incluiría alteración de las bases y ruptura de cadenas (Mitchell 1995). Puede sufrir oxidaciones tanto el ADN nuclear, como el mitocondrial y el cloroplástico. Se han identificado aproximadamente 20 tipos diferentes de alteraciones oxidativas a la molécula de ADN. Uno de los métodos

analíticos más sensibles empleados actualmente utiliza la determinación de 8-hydroxi deoxiguanosina (oxo<sup>8</sup>dG) para detectar ADN oxidado *in vivo* (Shigenaga *et al.* 1994).

La peroxidación de lípidos es una reacción en cadena que consta de tres etapas fundamentales: *iniciación*, *propagación* y *terminación* (Figura 5.1). Se define como iniciación aquella etapa en la que se generan radicales y actualmente se considera que en la iniciación de la cadena que pueden participar compuestos de alta capacidad oxidante derivados del hierro (ferrilo y perferrilo), de allí la importancia del hierro en la catálisis de los procesos de peroxidación de lípidos (Hermes Lima 2004). Las reacciones de propagación son aquellas en la que se mantienen constantes el número de especies activas y las reacciones de terminación son aquellas donde se consumen especies activas. La peroxidación lipídica provoca efectos citotóxicos a nivel molecular, éstos incluyen una alteración estructural de la membrana con alteraciones de su fluidez y permeabilidad, inactivando a las enzimas intrínsecas y transportadoras (Tyler 1975; Hegner 1980).

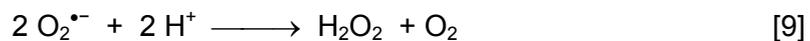


**Figura 5.1:** Oxidación de lípidos. Tomado de Hermes Lima (2004).

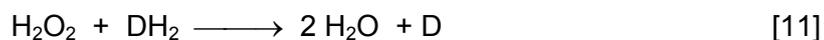
## ANTIOXIDANTES

Para mantener bajas concentraciones de las especies activas del oxígeno en estado estacionario dentro de las células, se requieren sistemas de eliminación. A través de este complejo sistema de defensa antioxidante se mantienen concentraciones en estado estacionario del orden de  $10^{-11}$  M para el anión superóxido,  $10^{-7}$ - $10^{-9}$  M para el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $10^{-18}$  M para el radical hidroxilo. Un antioxidante se define como cualquier sustancia que, a concentraciones muy bajas comparadas con la de un sustrato oxidable, inhibe o retrasa significativamente la oxidación de éste. Comprende compuestos tanto de naturaleza enzimática como no enzimática (Halliwell y Gutteridge 1989).

Los antioxidantes enzimáticos incluyen las enzimas de: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), ascorbato peroxidasa (APx) y enzimas involucradas en la síntesis y regeneración de antioxidantes de bajo peso molecular (Sies 1985). La **SOD** constituye una familia de metaloenzimas que cataliza la dismutación de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (reacción [9]). Se pueden clasificar en distintas clases según el metal que contengan: Cu/Zn-SOD (localizada principalmente en citosol), Mn-SOD (localizada en la matriz mitocondrial) y Fe-SOD (localizada principalmente en cloroplastos y peroxisomas) (Hermes Lima 2004), Fe/Mn SOD (en Cyanophyta).



La **catalasa** y las **peroxidasas** son los principales sistemas enzimáticos que detoxifican  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La enzima catalasa es una hemoproteína que presenta una función doble: (1) descomposición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (actividad catalítica) (reacción [10]) y (2) oxidación de dadores de hidrógeno ( $\text{DH}_2$ ) (reacción [11]), como metanol, etanol, fenoles y ácido fórmico, con el consumo de un mol de peróxido (actividad peroxidasa) (Aebi 1984).



La mayor parte de las peroxidasas son hemoproteínas que catalizan la oxidación por un electrón del dador de electrones ( $\text{XH}_2$ ) formando como producto primario un radical libre (Jones y Czaja 1998) (reacción [12] y reacción [13]). Las peroxidasas se clasifican según su especificidad de sustrato, entre las que se encuentran: ascorbato peroxidasa, guayacol peroxidasa (familia de peroxidasas con poca especificidad por el sustrato, Hermes Lima 2004) y glutatión peroxidasa.



Los antioxidantes no enzimáticos son generalmente moléculas pequeñas, que pueden ser: (a) hidrofílicas, como el glutatión y el ácido ascórbico, (b) lipofílicas, como el  $\alpha$ -tocoferol y el  $\beta$ -caroteno, entre otros carotenoides. Se incluyen también compuestos fenólicos, como flavonoides y moléculas complejas, como ácido fítico, fitoferritina y fitoquelatos (Foyer *et al.* 1994). Los compuestos antioxidantes (TH) presentan 2 mecanismos de acción: (1) a través de la donación de un átomo de hidrógeno, (2) a través de un proceso redox con la donación de un electrón al radical libre ( $\text{RL}^\bullet$ ), para dar un compuesto estable (RLH) y un radical libre derivado del antioxidante ( $\text{T}^\bullet$ ) (Simic 1991) (reacción [14]).



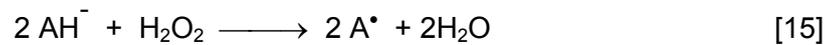
Los antioxidantes efectivos reales deben generar radicales que no sean reactivos frente a moléculas estables (oxígeno molecular, moléculas lipídicas e hidroperóxidos lipídicos), y que limiten su reacción sólo a donación de protones o electrones como acoplamiento radical-radical (Kamal-Eldim y Appelquist 1996). La actividad de los **tocoferoles**, de los cuales el  $\alpha$ -tocoferol es el isómero mejor conocido y el que posee mayor actividad antioxidante (Burton *et al.* 1982), es altamente efectiva en la protección contra peroxidación de lípidos de membrana reaccionando con los radicales peroxilo y alcoxilo. También puede actuar como un apagador de oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ) y reacciona con  $\text{O}_2^{\bullet-}$  para generar radical fenoxilo (Hermes Lima 2004). La actividad antioxidante de los tocoferoles (TOH) se debe principalmente a su capacidad de donar átomos de hidrógeno fenólicos a radicales lipídicos dando lugar a la formación del radical tocoferoxilo ( $\text{TO}^{\bullet}$ ). Los tocoferoles pueden regenerarse a partir del radical cromanoxilo formado, a través de su interacción con ascorbato o ubiquinol (Ernester y Forsmark-Andrée 1993).

La principal función del  **$\beta$  caroteno** es fotorreceptiva. En las últimas décadas se ha informado una acción protectora contra el daño oxidativo). El  $^1\text{O}_2$  es fuertemente apagado por el  $\beta$ -caroteno, con una  $k = 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , cercana al control difusional. Esta constante de velocidad excede la constante de velocidad para la reacción entre el  $^1\text{O}_2$  y los ácidos grasos insaturados de importancia biológica, por lo que concentraciones relativamente bajas de  $\beta$ -caroteno protegerían efectivamente del daño a lípidos de membrana iniciados por  $^1\text{O}_2$  (Hermes Lima 2004).

La **equinenona** es un carotenoide al igual que el  $\beta$  caroteno y es generado a partir de la oxidación del mismo. Este carotenoide también presenta propiedades antioxidantes, aunque es menos efectivo en la protección que el  $\beta$  caroteno (Miller *et al.* 1996; Mortensen *et al.* 1997).

El ascorbato ( $\text{AH}^-$ ) (vitamina C) presenta importantes funciones antioxidantes y metabólicas tanto en plantas como animales (Chatterjee 1970). Participa tanto de

reacciones antioxidantes enzimáticas como no enzimáticas. La reacción de descomposición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se realiza a través de un mecanismo catalizado por la actividad de la enzima APx, que emplea  $\text{AH}^-$  como sustrato específico, generando un producto primario de oxidación, monodehidroascorbato (ó radical ascorbilo,  $\text{A}^\bullet$ ), el cual entra en un ciclo de regeneración de las formas reducidas de ascorbato y glutatión (Burkitt y Gilbert 1990) (reacción [15]).



El  $\text{AH}^-$  también puede dar lugar a reacciones antioxidantes no enzimáticas. La acción del  $\text{AH}^-$  será espontánea con cualquier radical ( $\text{RL}^\bullet$ ) que se genere en un sistema biológico (Buettner y Juerkiewicz 1993) (reacción [16]).



El **glutatión** (GSH, L-γ-glutamil-L-cisteinilglicina) es el principal tiol de bajo peso molecular presente en la mayoría de los distintos tipos celulares (Meister y Anderson 1983). El glutatión etil ester ha sido sintetizado como un precursor capaz de penetrar en las células para ser luego hidrolizado a glutatión (Anderson y Meister 1989). El glutatión puede reaccionar con  $\text{HO}^\bullet$ , radicales orgánicos y peroxilo, dando finalmente GSSG (glutatión oxidado), y es un sustrato adecuado para la oxidación enzimática de hidroperóxidos orgánicos y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , y de dehidroascorbato (DHA) (Biaglow *et al.* 1989). El glutatión puede ser regenerado enzimáticamente a través de la actividad de la enzima glutatión reductasa (Miller *et al.* 1990).

## CONCEPTO Y EVALUACIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO

El desbalance entre las especies oxidantes y antioxidantes a favor de las oxidantes puede causar daño oxidativo denominado *estrés oxidativo*. Esta situación se alcanza a nivel celular ya sea por un aumento en las velocidades de producción de las especies reactivas del oxígeno o por una disminución en la actividad de las defensas antioxidantes. Existen distintos métodos que permiten evaluar estrés oxidativo *in vivo*. Cada una de estas técnicas presenta ventajas y desventajas dependiendo del tipo de estrés y de las especies reactivas involucradas (Floyd 1993). Las metodologías más empleadas actualmente incluyen:

*a) Cuantificación del producto del daño oxidativo a macromoléculas.* Por ejemplo, (i) estimación del malondialdehído formado durante la reacción de peroxidación de lípidos como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), que resulta un método poco sensible e inespecífico pero muy utilizado; (ii) la medida de la formación de grupos carbonilos en proteínas como índice de oxidación de proteínas; (iii) marcadores de ruptura de la doble cadena del ADN o lesiones en las bases específicas, métodos que presentan grandes desventajas ya que requieren múltiples cuidados en el aislamiento del ADN y además resulta indispensable tener en cuenta que los procesos de reparación ocurren muy rápidamente (Flyod *et al.* 1986).

*b) Medida de radicales libres por resonancia paramagnética de espín electrónico (EPR).*

Las técnicas de EPR son el método de elección para medir moléculas paramagnéticas, es decir, con electrones desapareados. Las especies paramagnéticas biológicamente importantes incluyen radicales libres y metales de transición. Esta técnica se basa en la absorción de energía electromagnética por las especies reactivas frente a un campo magnético externo. No es un método práctico para radicales de corto tiempo de vida media (como anión superóxido y el radical hidroxilo). Sin embargo, presenta ventajas sobre otras técnicas para la medida de radicales tales como radical ascorbilo, el cual puede ser medido de forma simple y a temperatura ambiente (Buettner y Juerkiewicz

1993). El empleo de atrapantes endógenos facilita sensiblemente la detección de especies activas mediante EPR. Se trata de una metodología ventajosa ya que el atrapador reacciona con el radical libre dando un producto único, característico y más estable. Los atrapantes de espín más extensamente empleados son del tipo nitronas y compuestos nitrosos (MacCay *et al.* 1980).

*c) Técnicas fluorescentes.* Involucra el uso de compuestos que cuando son oxidados, exhiben una intensa fluorescencia. Los compuestos más empleados son el diacetato de diclorofluoresceína (DCF-DA) y la dihidrorodamina 123 (Kehrer y Paraidathathu 1992).

*d) Medida de la concentración de antioxidantes o atrapantes de radicales libres.* Dado que una situación de estrés oxidativo puede involucrar una disminución significativa de la potencialidad antioxidante celular, la evaluación de la concentración de cada antioxidante de relevancia fisiológica, así como la capacidad antioxidante total resulta un método de uso habitual.

### **HIPÓTESIS**

- 1) Durante la gametogénesis las gónadas de *Loxechinus albus* se encuentran protegidas de los procesos oxidativos por un incremento en los antioxidantes no enzimáticos.
- 2) El índice global de estrés oxidativo ( $A^*/AH^*$ ) se mantiene constante durante la gametogénesis en *L. albus*.

### **OBJETIVO**

Determinar las variaciones en el metabolismo oxidativo de *L. albus* bajo diferentes condiciones reproductivas, analizando el estado oxidativo en medios lipofílicos e hidrofílicos así como también el daño a lípidos.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **MUESTREO**

De los muestreos mensuales de individuos adultos de *L. albus*, realizados desde mayo de 2004 hasta mayo de 2005, se seleccionaron 5 individuos al azar para realizar las mediciones que se detallan a continuación.

Los individuos fueron procesados según se especifica en el capítulo 2, "TRATAMIENTO GENERAL DE LAS MUESTRAS".

### **DETERMINACIONES HISTOLÓGICAS**

Los cortes histológicos fueron realizados y analizados según se especifica en el capítulo 3, "DETERMINACIONES HISTOLÓGICAS"

### **DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE ESTRÉS**

Se utilizó como índice de estrés la relación entre la concentración del radical ascorbilo ( $A^{\bullet}$ ) y ascorbato ( $AH^{\ominus}$ ).

### **DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACION DE RADICAL ASCORBILO ( $A^{\bullet}$ )**

La concentración de  $A^{\bullet}$  se determinó por EPR a temperatura ambiente, usando un Espectrómetro ECS 106. Los homogenatos de las gónadas fueron preparados en DMSO (1:3). En el equipo se establecieron los siguientes parámetros: frecuencia de modulación de 50 kHz, potencia de microondas 20 mW, amplitud de modulación 1 G, constante de tiempo 655 ms, operando a 9.81 GHz, una ganancia de  $1 \cdot 10^5$ , 3 scans y centro de campo 3487 G (Giulivi y Cadenas 1993). Para la cuantificación a partir del espectro característico del  $A^{\bullet}$  se integraron las áreas de las señales obtenidas y se calcularon las concentraciones empleando TEMPO 1 mM como estándar (Kotake *et al.* 1996). El

contenido de radical ascorbilo se obtuvo multiplicando la concentración del mismo por el peso total de las gónadas.

#### **DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE ASCORBATO (AH<sup>-</sup>).**

LA concentración de ascorbato (AH<sup>-</sup>) fue medido de acuerdo a Foyer *et al.* (1983). El extracto ácido fue neutralizado con 1,25 M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, y la cantidad de AH<sup>-</sup> fue determinada por adición de 5 U/ml de ascorbato oxidasa. Se utilizó como estándar una solución de ácido ascórbico 1µg/ml. El contenido de ascorbato se obtuvo multiplicando la concentración del mismo por el peso total de las gónadas.

#### **DETERMINACIÓN DE ÍNDICES DE DAÑO A LÍPIDOS**

##### 1) SUSTANCIAS REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO

La concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) fue determinado según Malanga *et al.* (2004). Se procedió a la preparación de los homogenatos en presencia de ácido tricloroacético 30% (p/v) y una solución buffer (pH 7) 50 mM de fosfato de potasio. Luego de la centrifugación, la concentración de TBARS fue determinado en el sobrenadante mediante la técnica espectrofotométrica. Las soluciones estándares empleadas como referencias fueron preparadas a partir de 1,1,3,3-tetrametoxipropano. El contenido de TBARS se obtuvo multiplicando la concentración del mismo por el peso total de las gónadas.

##### 2) DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACION DE RADICALES LIPÍDICOS

Para la detección de radicales lipídicos en gónadas de *L. albus* se empleó una técnica indirecta de EPR por atrapamiento de espín (spin trapping). Los homogenatos de las gónadas fueron preparados en dimetilsulfoxido (DMSO) conteniendo 40 mM  $\alpha$ -(4-piridil)-N-t-butil nitrona (PBN), empleándose este último como atrapador de espín. Las medidas

se realizaron a temperatura ambiente en un espectrómetro Bruker ECS 106, operando a 9,81 GHz y empleando una frecuencia de modulación de 50 kHz. Los parámetros del EPR para medir el “spin trapping” fueron: potencia de microonda que se mantuvo a 20 mW, amplitud de modulación de 1.194 G, tiempo de barrido de 81.92 ms, 5 scans, centro del campo de 3480 G y una ganancia de  $2 \times 10^4$  (Lai *et al.* 1986). La cuantificación de la señal proveniente del aducto de espín fue realizada empleando una solución acuosa de TEMPO 1 mM, procesada en las mismas condiciones que la muestra. La concentración del aducto fue calculada de acuerdo a Kotake *et al.* (1996). El contenido de radicales lipídicos se obtuvo multiplicando la concentración del mismo por el peso total de las gónadas.

#### **DETERMINACION DE CAROTENOS TOTALES**

Los carotenos totales fueron determinados mediante el método de McBeth (1972). Los carotenoides de cada muestra de gónada fueron extraídos con 1 ml de acetona durante 30 min a 4°C. Posteriormente se adicionaron 1,2 ml de hexano y 3 ml de solución de cloruro de sodio al 5 %, luego se homogenizaron las muestras. Después se centrifugaron a  $600 \times g$  durante 10 min, se tomaron 0,3 ml de la fase de orgánica y se les adicionó 0,3 ml de hexano. El espectro de absorción fue registrado entre los 400 - 600 nm, utilizando un espectrofotómetro Beckmann (DU Serie 7400, diodo). El total de los carotenoides presentes en 100 g de muestra fue calculado utilizando la ecuación [17]:

$$\text{mg de carotenoides/100 g de tejido} = (A \times V \times 10^3) / (\epsilon \times W) \quad [17]$$

donde

A= absorbancia al  $\lambda_{\text{max}}$

V= volumen total de muestra (ml)

$\varepsilon$ = coeficiente de extinción molar

W= peso del tejido (g)

Debido a que los extractos crudos usualmente contienen una variedad de carotenoides, se utilizó, para realizar los cálculos, un coeficiente de extinción molar promedio de 2500.

El contenido de carotenos totales se obtuvo multiplicando la concentración del mismo por el peso total de las gónadas.

#### **DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACION DE ANTIOXIDANTES NO ENZIMATICOS LIPOSOLUBLES ( $\alpha$ TOCOFEROL, EQUINENONA Y $\beta$ CAROTENO)**

La cuantificación de las concentraciones de  $\alpha$ -tocoferol, equinenona y  $\beta$ -caroteno se realizaron mediante el empleo de técnicas de HPLC de fase reversa con detección electroquímica. Se utilizó un detector amperométrico Bioanalytical System LC-4C aplicando un potencial de oxidación de +0'6 v (Desai 1984). Las muestras de gónadas fueron homogeneizadas en 1 ml de acetona. Luego se agregaron 3 ml de NaCl 5 % y 1,2 ml de hexano centrifugándose a 600 g durante 10 minutos. Se tomaron 700  $\mu$ l de la fase orgánica y se desecaron directamente en atmósfera de nitrógeno resuspendiéndose el residuo obtenido en 300  $\mu$ l metanol:etanol (1:1). Luego de un proceso de filtrado a través de membranas de nylon (0,22  $\mu$ m de tamaño de poro) las muestras fueron inyectadas para su análisis. Se emplearon como estándar *d,l*- $\alpha$ -tocoferol (Sigma), equinenona (CaroteNature GmbH) y  $\beta$ -caroteno (Sigma). El contenido de los antioxidantes liposolubles se obtuvo multiplicando la concentración del mismo por el peso total de las gónadas.

### **SIMULACIÓN DE ESPECTROS DE EPR**

Los espectros simulados de EPR fueron realizados empleando el programa EPR Simulation Program VI. 4 (Bruker). Los valores del factor  $g$  y de las constantes de acoplamiento usadas para la simulación fueron obtenidos de Buettner (1987).

### **TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS**

Las gónadas de los individuos fueron agrupadas según el estadio gonadal que presentaban para el posterior tratamiento de los datos.

El efecto del factor estadio gonadal (Inmaduro, Crecimiento, Premaduro I, Premaduro II, Maduro e Post-evacuado) sobre la concentración y el contenido de TBARS y de carotenos totales y el contenido de equinenona y de  $\alpha$ -tocoferol fueron analizados mediante análisis de varianza de un factor. Posteriormente se realizaron comparaciones de Tukey en aquellos factores donde se observaron diferencias significativas.

En todos los casos, los supuestos de normalidad y homocedacia fueron puestos a prueba mediante pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente (Montgomery 1991; Sokal y Rohlf 1995). En los casos en que no se cumplieron los supuestos los datos fueron transformados.

Los efectos del factor estadio gonadal sobre el Índice  $A^{\cdot}/AH^{\cdot}$ , ascorbilo ( $A^{\cdot}$ ), ascorbato ( $AH^{\cdot}$ ), radicales lipídicos,  $\beta$ -caroteno, concentración de equinenona y de  $\alpha$ -tocoferol fueron analizados utilizando una prueba de Kruskal-Wallis, cuando se observaron diferencias significativas se realizaron comparaciones múltiples de Dunn (Zar 1984; Sokal y Rohlf 1995).

Para probar la relación entre las distintas variables en estudio se utilizaron correlaciones de Pearson o de Spearman según correspondiera.

El análisis estadístico de los datos fue realizado mediante la utilización de los programas Statistica 6.0 y GraphPad InStat.

## **RESULTADOS**

### **ÍNDICE DE ESTRÉS: RELACIÓN ASCORBILO/ASCÓRBICO**

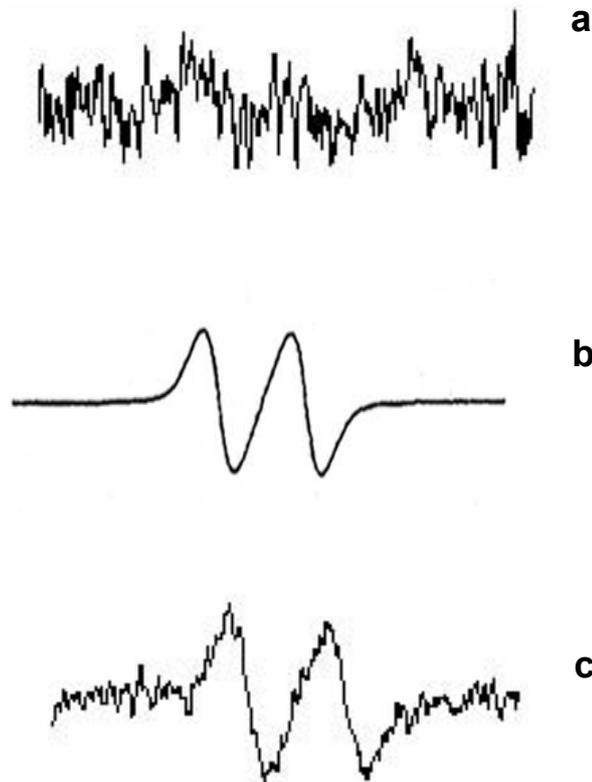
El radical ascorbilo ( $A^\bullet$ ) puede ser usado como índice de estrés oxidativo en condiciones donde la concentración de  $AH^\bullet$  permanezca constante. Sin embargo, si la concentración de  $AH^\bullet$  se modifica es posible usar la relación  $A^\bullet/AH^\bullet$ , como índice global y sensible de estrés oxidativo. En las gónadas de *L. albus* este índice presentó diferencias significativas entre los estadios gonadales, siendo significativamente menor en el estadio Maduro que en los estadios Inmaduro, Crecimiento y Premaduro I (Tabla 5.2) (Ver capítulo 3, estadios gonadales).

El  $A^\bullet$  es un radical libre que puede cuantificarse en forma directa a través de medidas de espectroscopia de resonancia paramagnética de espín (EPR) a temperatura ambiente en soluciones acuosas. La figura 5.2 muestra la señal de EPR característica para el radical ascorbilo para las gónadas de *L. albus*. La concentración de radical ascorbilo no mostró diferencias significativas entre estadios gonadales (K-W  $p= 0,06$ ) (Tabla 5.2), sin embargo, el contenido fue mayor en los estadios Premaduro I y Premaduro II que en los estadios Maduro y Post-evacuado (K-W  $p < 0,05$ ).

Tanto la concentración como el contenido de ascorbato mostraron diferencias significativas entre estadios gonadales (K-W  $p < 0,05$ ) siendo mayores en los estadios Premaduro II y Maduro que en los estadios Post-evacuado e Inmaduro (Tabla 5.2).

	Estadios gonadales					
	I	C	P I	P II	M	PE
<b>A<sup>+</sup>/AH<sup>-</sup></b>						
(10 <sup>-5</sup> )	6,98±0,12 c, **	1,41±0,75 a, *	5,72±4,81 b, **	3,20±4,26	0,33±0,21 a, b, c	1,12±1,17
<b>A<sup>+</sup></b>						
(pmol/mg)	0,18±0,08	0,18±0,09	0,24±0,16	0,31±0,20	0,09±0,05	0,11±0,08
<b>AH<sup>-</sup></b>						
(nmol/mg)	2,70±0,55 c, d	12,27±5,16	8,05±5,05 a *, b	58,84±34,51 a, c **	38,24±33,53 b *, d **	12,70±5,66

**Tabla 5.2.** Índice A<sup>+</sup>/AH<sup>-</sup>, concentración de A<sup>+</sup> (pmol/mg de gónada) y de AH<sup>-</sup> (nmol/mg de gónada) en gónadas de *L. albus* en diferentes estadios del ciclo reproductivo. Las letras iguales indican diferencias significativas entre ambos estadios gonadales. (\*) p < 0,05 (\*\*) p < 0,01.

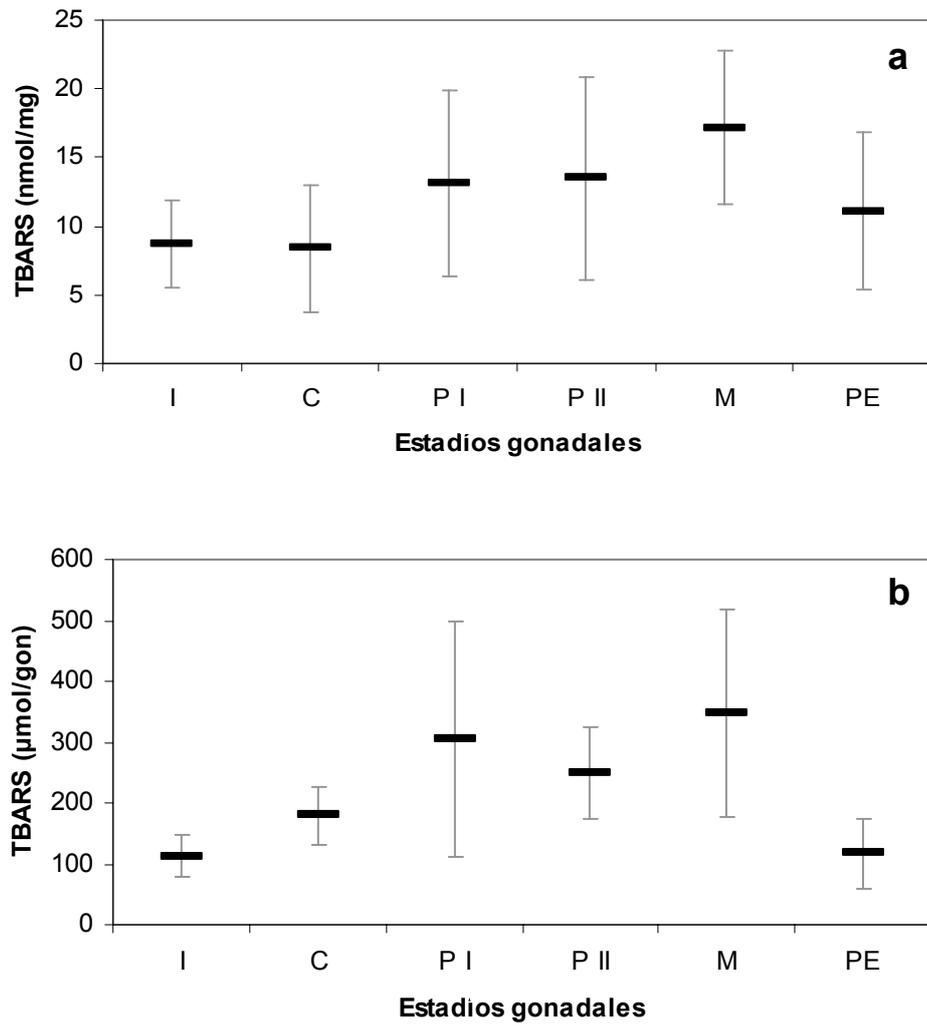


**Figura 5.2.** Detección por EPR del radical ascorbilo ( $A^{\bullet}$ ) en gónadas de *Loxechinus albus*. **a)** Espectro de DMSO en ausencia de muestra. **b)** Espectro simulado empleando los parámetros espectrales:  $g = 2.005$  y  $a_H = 1.8$  G, correspondientes al radical ascorbilo (Jurkiewicz y Buettner 1994). **c)** Espectro típico de las gónadas de *L. albus*.

## ÍNDICE DE DAÑO A LÍPIDOS

### 1) SUSTANCIAS REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

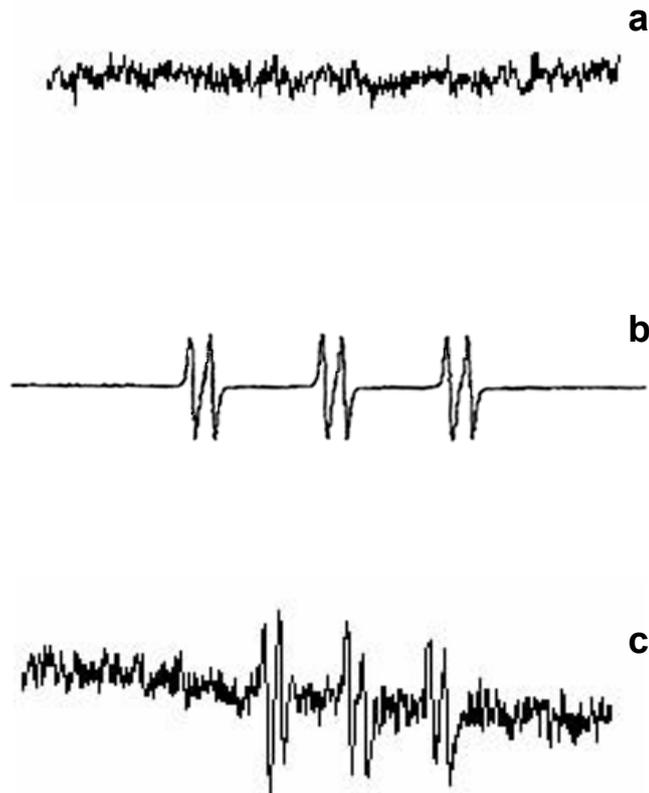
La concentración de TBARS (nmol/mg de gónada) varió significativamente entre estadios gonadales (ANOVA  $p < 0,05$ ), siendo mayor el valor registrado para las gónadas maduras que para las inmaduras (Figura 5.3a). Se encontró una variación altamente significativa en el contenido de TBARS (ANOVA  $p < 0,05$ ) para la gónada entera ( $\mu\text{mol/gónadas}$ ) entre los diferentes estadios gonadales. Los valores de los estadios Premaduro I y II y Maduro fueron significativamente mayores que los valores de los estadios Post-evacuado e Inmaduro (Figura 5.3b).



**Figura 5.3.** a) Concentración (nmol/mg de gónada) y b) contenido (µmol/gónadas) de TBARS en las gónadas de *L. albus* en diferentes estadios gonadales.

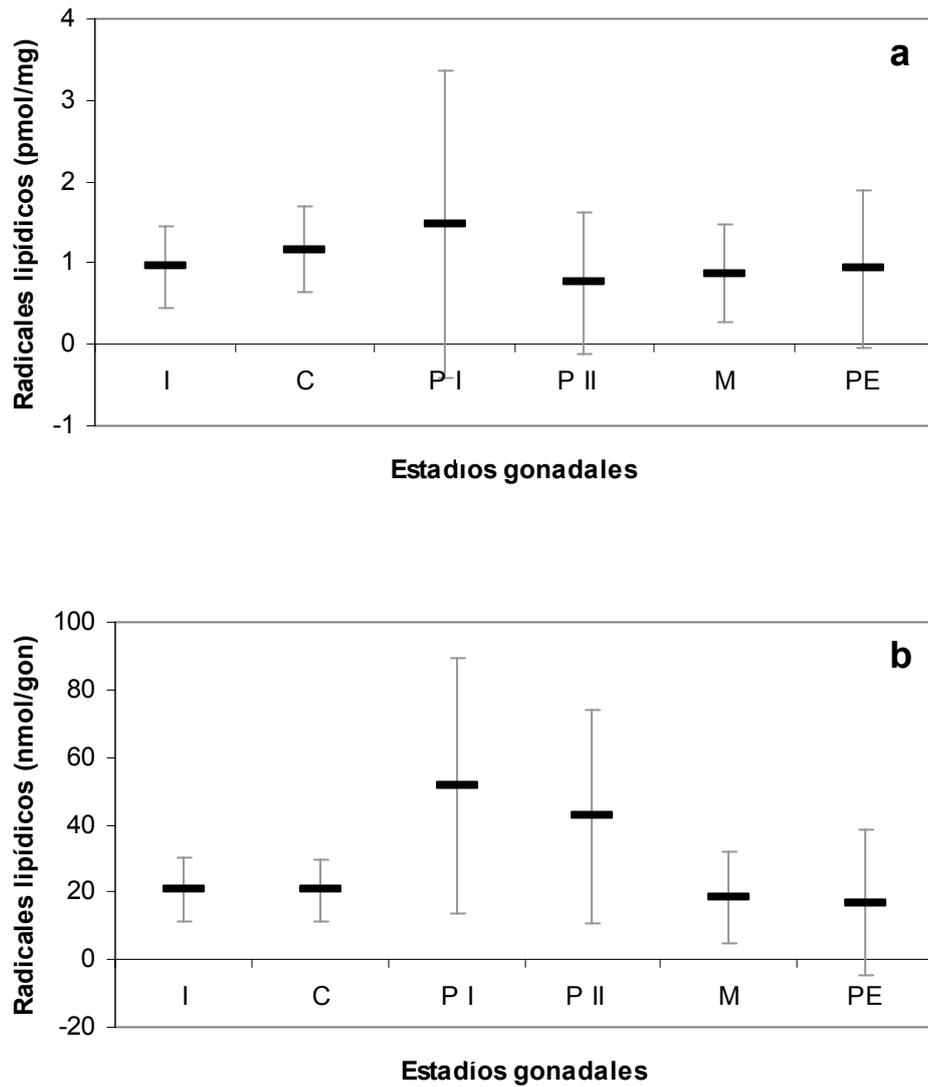
## 2) RADICALES LIPÍDICOS

Los espectros obtenidos de los radicales lipídicos presentaron las características típicas del aducto PBN-radicales lipídicos (Figura 5.4).



**Figura 5.4.** Detección por EPR del aducto PBN-radicales lipídicos ( $R^{\cdot}$ ) en gónadas de *L. albus*. **a)** Espectro obtenido en presencia de 40 mM PBN en ausencia de muestra. **b)** Espectro simulado para el aducto PBN-radicales lipídicos empleando los parámetros espectrales:  $a_N = 15.56$  G y  $a_H = 2.79$  G (North *et al.* 1992). **c)** Espectro en presencia de homogenato de gónadas de *L. albus*.

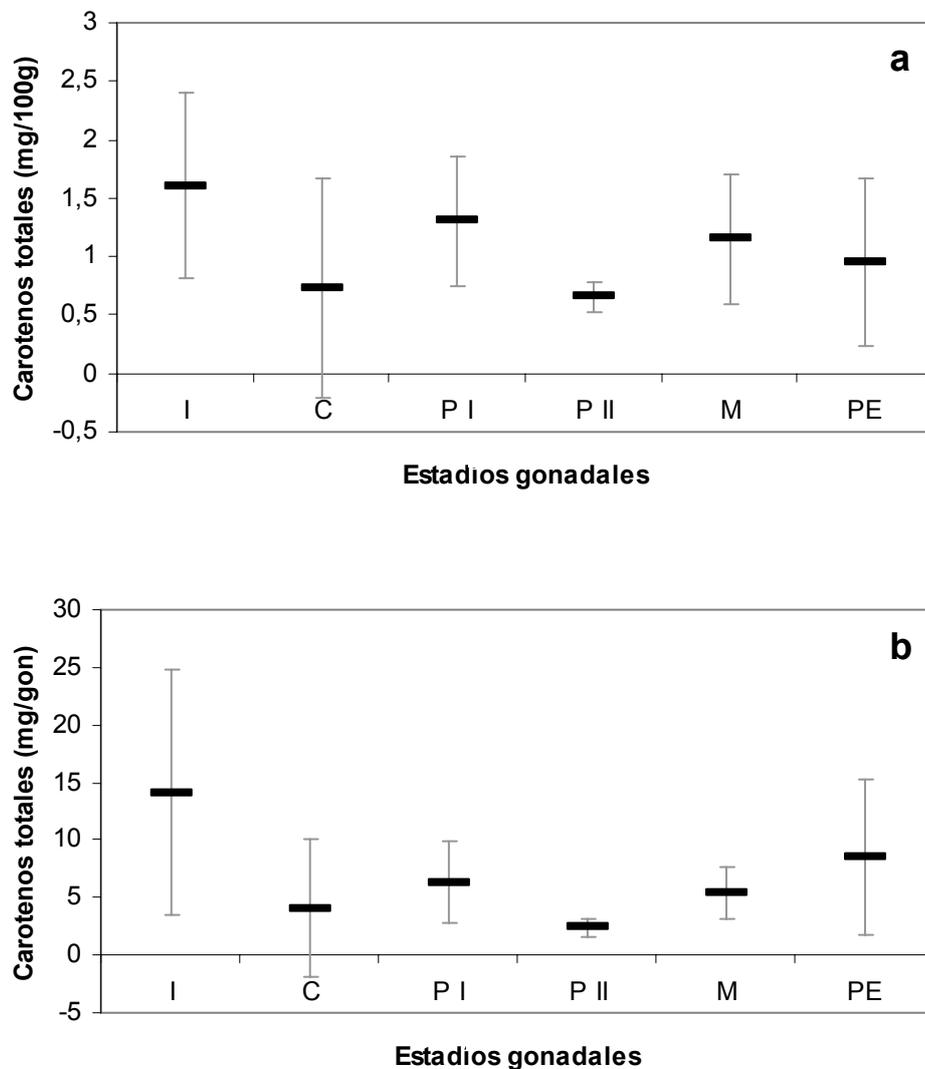
Tanto la concentración de radicales lipídicos (pmol/mg de gónada) como su contenido (nmol/gónada) no variaron significativamente entre estadios gonadales (K-W  $p=0,87$  y K-W  $p=0,23$ , respectivamente) (Figuras 5.5a y 5.5b).



**Figura 5.5.** a) Concentración (pmol/mg de gónada) y b) Contenido (nmol/gónadas) de radicales lipídicos en las gónadas de *L. albus* en diferentes estadios gonadales.

**CAROTENOS TOTALES**

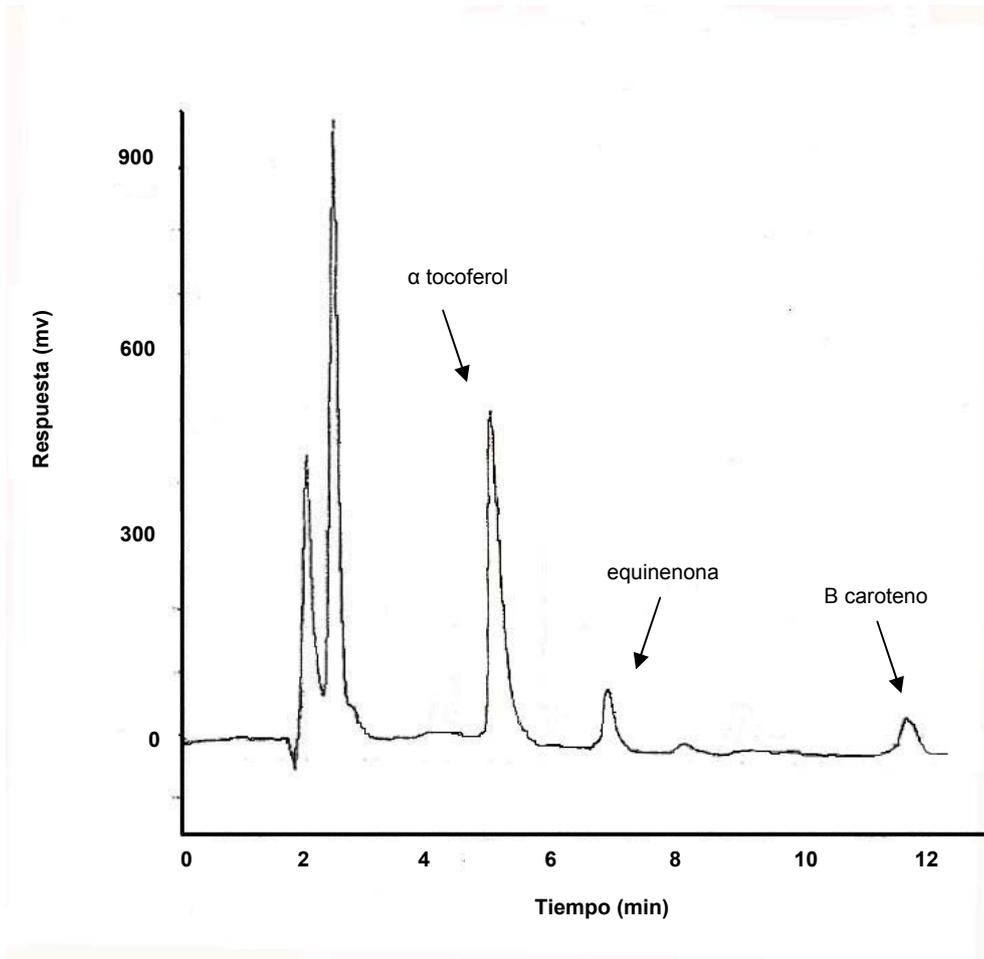
La concentración de carotenos totales (mg/100 g de gónada) varió significativamente entre los estadios gonadales (ANOVA  $p < 0,01$ ). La concentración en los estadios Crecimiento y Maduro fue significativamente menor que la del estadio Inmaduro ( $p < 0,01$  y  $p < 0,05$ , respectivamente) (Figura 5.6a). El contenido de carotenos totales (mg/gónada) no presentó diferencias significativas entre estadios gonadales (ANOVA  $p = 0,09$ ) (Figura 5.6b).



**Figura 5.6.** a) Concentración (mg/100g de gónada) y b) Contenido (mg/gónada) de carotenos totales en las gónadas de *L. albus* en diferentes estadios gonadales.

**ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS LIPOSOLUBLES**

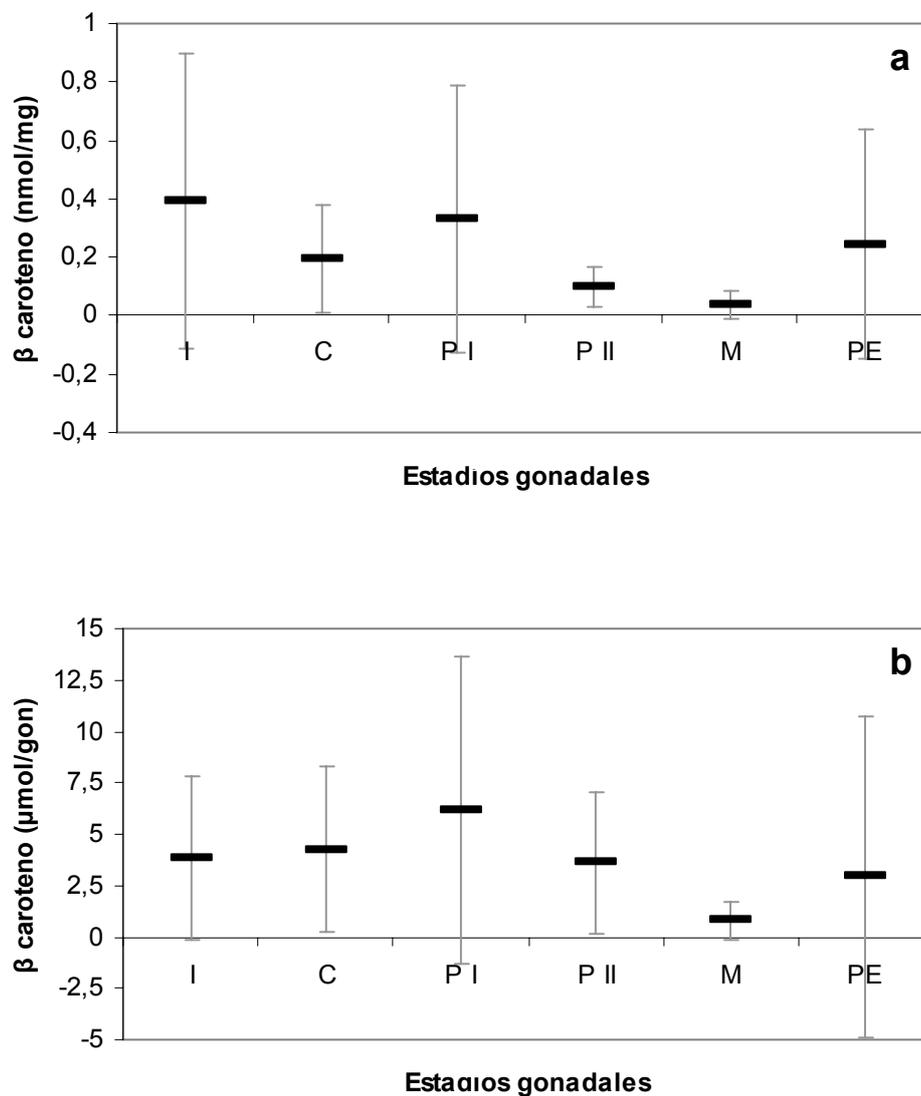
La figura 5.7 muestra un espectro típico para la determinación por HPLC de antioxidantes liposolubles.



**Figura 5.7.** Espectro típico de HPLC de antioxidantes liposolubles para gónadas de *L. albus*. Tiempos de retención:  $\alpha$  tocoferol: 5,5 min., equinenona: 7 min. y  $\beta$  caroteno: 12 min.

$\beta$  CAROTENO

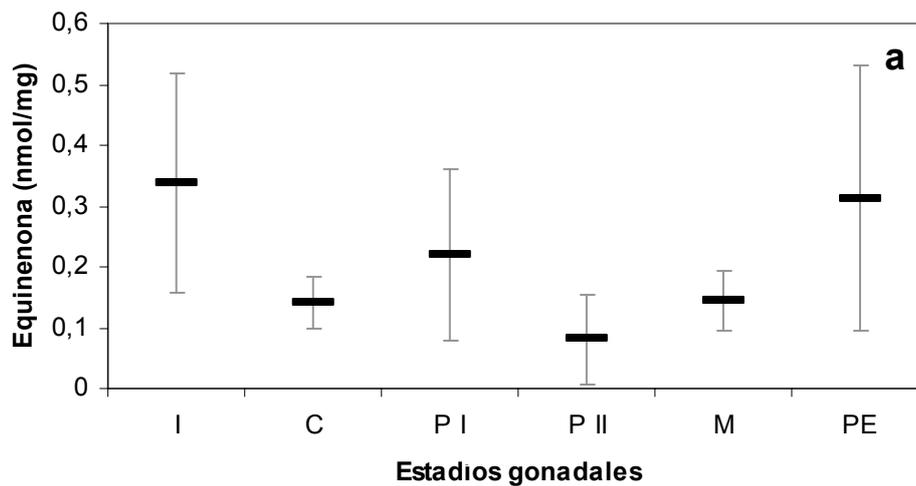
Tanto la concentración de  $\beta$  caroteno (nmol/mg de gónada) como el contenido de  $\beta$  carotenos ( $\mu\text{mol/gónadas}$ ) presentes en gónadas en diferentes estadios gonadales no mostraron diferencias significativas (K-W  $p=0,57$  y K-W  $p=0,54$ , respectivamente) (Figura 5.8).

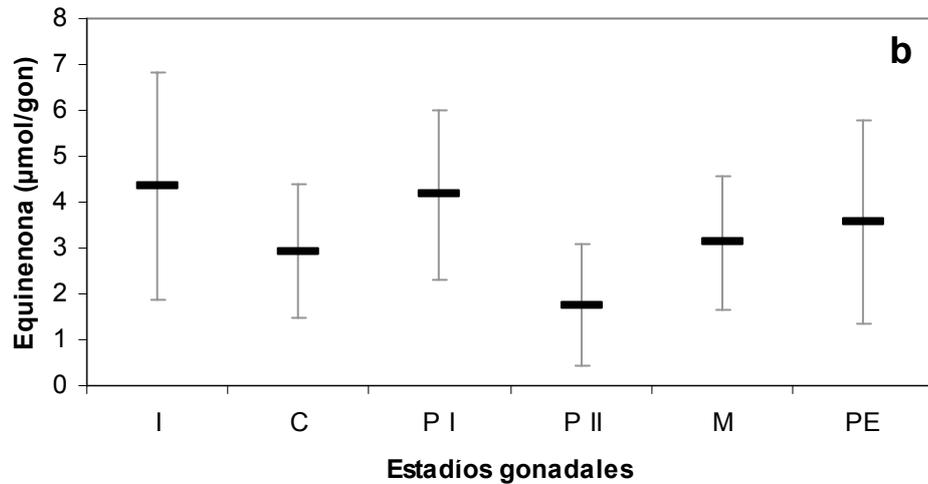


**Figura 5.8.** **a)** Concentración (nmol/mg de gónada) y **b)** Contenido ( $\mu\text{mol/gónadas}$ ) de  $\beta$  carotenos en las gónadas de *L. albus* en diferentes estadios gonadales.

### EQUINENONA

La concentración de equinenona (nmol/mg de gónada) varió significativamente en gónadas en diferentes estadios gonadales (K-W  $p < 0,05$ ). La concentración en el estadio Premaduro II fue significativamente menor que en los estadios Post-evacuado e Inmaduro, mientras que la concentración en el estadio Inmaduro fue significativamente mayor que en los estadios Crecimiento y Maduro. El contenido de equinenona ( $\mu\text{mol/gónada}$ ) en las gónadas de *L. albus*, no varió entre estadios gonadales (ANOVA  $p = 0,31$ ) (Figura 5.9).

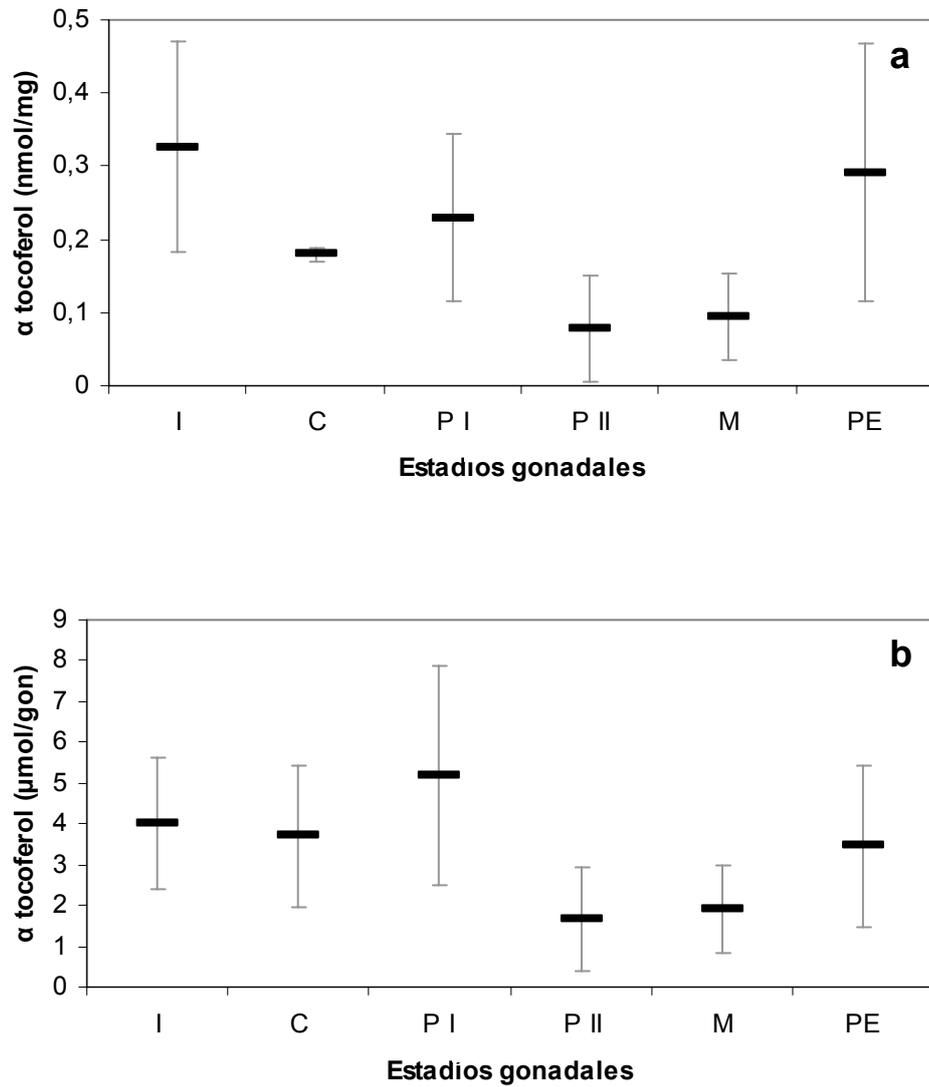




**Figura 5.9.** a) Concentración (nmol/mg de gónada) y b) Contenido (µmol/gónadas) de equinenona en las gónadas de *L. albus* en diferentes estadios gonadales.

#### α TOCOFEROL

La concentración de α tocoferol (nmol/mg de gónada) varió significativamente en las gónadas correspondientes a diferentes estadios gonadales (K-W  $p < 0,01$ ). La concentración en el estadio Inmaduro fue significativamente mayor que en el estadio Premaduro II. En el estadio Maduro fue menor que en los estadios Post-evacuado e Inmaduro. El contenido de α tocoferol varió significativamente entre gónadas (ANOVA  $p < 0,01$ ) en diferentes estadios gonadales, siendo mayor en el estadio Premaduro I que en los estadios Premaduro II y Maduro (Figura 5.10).



**Figura 5.10.** a) Concentración (nmol/mg de gónada) y b) Contenido ( $\mu$ mol/gónadas) de  $\alpha$  tocoferol en las gónadas de *L. albus* en diferentes estadios gonadales.

**CORRELACIONES ENTRE LAS VARIABLES ANALIZADAS**

En la siguiente tabla se muestran las correlaciones entre las variables analizadas.

	A*/AH <sup>-</sup>	A*	AH <sup>-</sup>	R*	TBARS	Carotenos totales	β caroteno	Equinenona	α tocoferol
A*/AH <sup>-</sup>	1								
A*	r=0,752 p<0,001 S	1							r=0,510 p>0,05 P
AH <sup>-</sup>	r=-0,752 p<0,01 S	r=-0,234 p>0,05 S	1						r=-0,289 p>0,05 P
R*	r=0,601 p<0,0001 S	r=0,637 p<0,0001 S	r=-0,322 p>0,05 S	1					r=-0,877 p<0,05 P
TBARS	r=-0,672 p>0,05 P	r=-0,889 p>0,05 P	r=-0,644 p>0,05 P	r=-0,190 p>0,05 P	1				r=0,319 p>0,05 P
Carotenos totales	r=-0,524 p>0,05 P	r=-0,374 p>0,05 P	r=-0,685 p>0,05 P	r=0,020 p>0,05 P	r=-0,253 p>0,05 S	1			r=-0,569 p<0,05 S
β caroteno	r=0,817 p>0,05 P	r=0,78 p>0,05 P	r=-0,836 p<0,05 P	r=0,538 p>0,05 P	r=-0,605 p<0,01 S	r=-0,243 p>0,05 S	1		r=0,356 p<0,01 P
Equinenona	r=-0,4388 p>0,05 P	r=-0,782 p>0,05 P	r=-0,160 p>0,05 P	r=-0,514 p<0,05 S	r=0,521 p<0,001 P	r=0,162 p>0,05 S	r=0,3029 p<0,05 S	1	r=0,826 p<0,001 P
α tocoferol									1

**Tabla 5.3.** En la tabla se muestran las correlaciones entre las variables A\*/AH<sup>-</sup>, ascorbilo (A\*), ascorbato (AH<sup>-</sup>), radicales lipídicos (R\*), TBARS, carotenos totales, β caroteno, equinenona y α tocoferol.

## **DISCUSION**

El radical ascorbilo ( $A^*$ ) puede ser considerado como un producto final de transformaciones de radicales en sistemas biológicos de defensa antioxidantes y puede emplearse como un indicador temprano y global del estrés oxidativo (Valencia y Marín 2003). Además, en variadas condiciones experimentales incluyendo estudios en tejido nervioso (Torbati *et al.* 1990), la relación  $A^*/AH^-$  ha sido empleada como un índice temprano, simple y global de estrés oxidativo (Galleano *et al.* 2002). Dada la alta sensibilidad de los métodos de espectrometría EPR se ha sugerido que esta técnica puede ser eficiente para cuantificar radicales libres (Galleano *et al.* 2002; Malanga *et al.* 2007).

Durante el desarrollo de la gametogénesis en *L. albus* se observó una variación no significativa en la concentración de  $A^*$  y una variación significativa en la relación  $A^*/AH^-$ , presentando un valor mínimo en el estadio Maduro (tabla 5.2), lo que sugiere que la maduración de gametas estaría asociada a una disminución global del estrés oxidativo en las gónadas, probablemente debido a un incremento en la capacidad de defensa antioxidante celular total durante el periodo final de la gametogénesis.

## **DAÑO A LÍPIDOS**

El grado de peroxidación de lípidos en los animales depende en cierta medida del nivel de antioxidantes y de la composición de los ácidos grasos. También influyen los aspectos inherentes a la reproducción, el desarrollo, el sexo, el estado nutricional, el crecimiento y la edad de los individuos (Viarengo *et al.* 1991; Correia *et al.* 2002, 2003).

En esta tesis se evaluó la peroxidación de lípidos (daño a lípidos) en los estadios del ciclo reproductivo mediante dos técnicas diferentes, cuantificándose: 1- los productos de la oxidación, TBARS y 2- los aductos de PBN con radicales lípidos. El contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) es extensamente empleado como un

indicador empírico de la potencial ocurrencia de daño peroxidativo a lípidos (Janero 1990). La técnica indirecta de EPR por atrapamiento de espín resulta más costosa pero es considerablemente más sensible que la determinación de TBARS. Dado que existe una correlación directa entre la intensidad de la señal EPR de los aductos PBN-radicales derivados de lípidos y la extensión de la peroxidación lipídica, la cuantificación de esta señal EPR se ha propuesto como un índice de alta sensibilidad para caracterizar la peroxidación de lípidos (Morel *et al.* 1995). El aducto identificado en las gónadas de *L. albus* presenta las mismas características espectrales que los aductos detectados en extractos lipídicos suplementados con PBN provenientes de diferentes fuentes animales que fueron sometidos a condiciones de estrés oxidativo, o bien a procesos de peroxidación *in vitro* (Ghio *et al.* 1998; Stolze *et al.* 2000; Bailey *et al.* 2003).

La peroxidación de lípidos en diferentes estadios del ciclo reproductivo ha sido poco estudiada aunque se sabe que las ROS juegan un rol importante en la diferenciación celular (Lukyanova y Khotimchenko 1995). En las gónadas de *L. albus*, el empleo de ambas técnicas para evaluar la peroxidación lipídica condujo a resultados diferentes. Mientras que no se encontraron variaciones significativas en el contenido de radicales lipídicos mediante la utilización de la técnica EPR por atrapamiento de espín, la concentración de TBARS indicó que la oxidación de lípidos es mayor durante la maduración de las gametas que en los estadios Post-evacuado e Inmaduro. Por otro lado se ha determinado que entre los meses de marzo y agosto, cuando transcurre la gametogénesis y la maduración gonadal en *L. albus*, la concentración de lípidos mantiene valores bajos, en relación con los meses de verano (Pérez, datos no publicados). Es decir que el incremento en la peroxidación de lípidos registrado mediante la medición de TBARS no se debe a un incremento en el contenido relativo de lípidos. El aumento en los TBARS puede explicarse de varias maneras: 1) por el incremento de los procesos oxidativos, 2) por la disminución en las defensas antioxidantes liposolubles, 3) por

cambios en la proporción de lípidos fácilmente oxidables como los ácidos grasos poliinsaturados o 4) debido a determinaciones inespecíficas de TBARS.

Los ácidos grasos poliinsaturados son muy abundantes en las membranas celulares de los invertebrados marinos (Joseph 1982), pudiendo funcionar como un posible sitio primario de daño durante el desarrollo de estrés oxidativo (Halliwell y Gutteridge 1984) sugiriendo un patrón particular de peroxidación de lípidos. Se conoce además que los cambios en la saturación de los lípidos de membrana son dependientes de la temperatura y muchos autores los consideran una respuesta adaptativa para mantener la fluidez de las mismas. En los invertebrados marinos la cantidad de ácidos grasos insaturados se incrementa generalmente en invierno y primavera (Naumenko y Kostetsky 1987). Esta situación podría explicar el incremento en los niveles de oxidación de lípidos durante los meses en los que la temperatura del agua de mar presenta los valores medios más bajos (Ver capítulo 3; Figura 3.1).

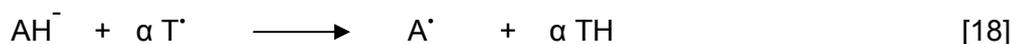
Si consideramos que el índice de estrés oxidativo fue mínimo durante la maduración de las gametas (Tabla 5.2) y que el daño a lípidos (TBARS) en esta etapa fue máximo (Figura 5.3), estaríamos frente a una situación de desarrollo de un eficiente sistema antioxidante, que garantizaría “protección” durante la gametogénesis. Este resultado condujo a evaluar específicamente los sistemas antioxidantes en las gónadas de *L. albus*, teniendo en cuenta que la susceptibilidad al daño oxidativo a lípidos es un balance entre factores pro-oxidantes y antioxidantes.

## **ANTIOXIDANTES**

La reacción de las especies reactivas del oxígeno con constituyentes celulares, llevaría a un daño oxidativo de no ser adecuadamente controlada por el sistema antioxidante. Varios autores han descrito (Gamble *et al.* 1995; Wilhelm Filho *et al.* 2000) que los invertebrados marinos, al igual que los vertebrados presentan una amplia gama de mecanismos antioxidantes, incluyendo enzimas y antioxidantes no enzimáticos como:

tocoferoles, carotenoides, AH<sup>-</sup> (ascorbato) y GSH (glutati3n) como agentes capaces de prevenir el da1o generado por especies reactivas del ox3geno.

El AH<sup>-</sup> tiene un rol central en el metabolismo dado que puede actuar tanto como antioxidante o bien como prooxidante, y su oxidaci3n conduce a la generaci3n de A<sup>•</sup> (Sadrzadeh y Eaton 1988). La actividad prooxidante de AH<sup>-</sup> es el resultado de su habilidad para reducir metales de transici3n (espec3ficamente el Fe) haciendo que 3stos interact3en con el ox3geno iniciando las reacciones con los radicales lip3dicos (Wills 1966). La actividad antioxidante de AH<sup>-</sup> se basa en la capacidad de reducir varios tipos de radicales, incluyendo los radicales peroxilo que propagan la peroxidaci3n de l3pidos o regenerar el antioxidante  $\alpha$  tocoferol ( $\alpha$  TH) desde la forma oxidada (Doba *et al.* 1985; Hermes Lima 2004). La reacci3n del AH<sup>-</sup> con el radical  $\alpha$  tocoferil ( $\alpha$  T<sup>•</sup>) da como resultado el reciclaje de las mol3culas a  $\alpha$  TH (Buettner 1993), demostrando una estrecha relaci3n entre los antioxidantes liposolubles e hidrosolubles [18].



En las g3nadas de *L. albus* la concentraci3n de ascorbato fue significativamente mayor en el estadio Premaduro II y Maduro que en los estadios Premaduro I, Post-evacuado e Inmaduro (tabla 5.2). Es decir, que se incrementan las defensas antioxidantes hidrosolubles hacia el final de la gametog3nesis. Resultados similares fueron encontrados por Regoli (2002) durante la maduraci3n gonadal de la vieira *Adamussium colbecki*, en esta especie se incrementaron sustancialmente las defensas antioxidantes durante el desarrollo gonadal.

Los carotenos son pigmentos ampliamente distribuidos en la naturaleza, algunos de los cuales est3n presentes en invertebrados marinos y son responsables de su coloraci3n (Goodwin 1984). El alto contenido de carotenoides en las g3nadas de muchas especies

animales confirma la importancia de los mismos para el normal desarrollo del ciclo reproductivo (Goodwin 1984). También ha sido establecida su influencia sobre el crecimiento y la supervivencia de los organismos (Tsushima y Matsuno 1990; George *et al.* 2001). Debido a que los carotenoides no pueden ser sintetizados endógenamente la mayoría de los animales los obtienen a través de la dieta modificándolos luego (Buchecker 1982).

Las gónadas de los erizos contienen fagocitos nutritivos (Ver capítulo 3) una de cuyas funciones es almacenar nutrientes que serán utilizados durante la gametogénesis (Walker *et al.* 2001). Probablemente los carotenoides primero son almacenados en los fagocitos nutritivos y luego transferidos a las oocitos en desarrollo (Plank *et al.* 2002).

En *Strongylocentrotus intermedius* y *S. nudus*, Borisovets *et al.* (2002) han observado que el contenido de carotenoides decrece abruptamente luego del desove concluyendo que esta disminución se debe a la pérdida de pigmentos a través de las gametas. Los huevos de ambas especies son pigmentados, sin embargo no se consigue explicar el motivo de la disminución del contenido en carotenoides en machos que no acumulan pigmentos en sus gametas. En contraposición Lamare y Hoffman (2004) encontraron que cuatro especies del género *Strongylocentrotus*, incrementan la concentración gonadal de carotenoides luego del desove. Estos autores argumentan que los carotenoides permanecen retenidos en los fagocitos nutritivos y es por eso que su concentración se incrementa luego de la liberación de las gametas. En el desarrollo de este trabajo de tesis, se ha observado que los carotenoides acumulados en las gónadas de *L. albus* disminuyen durante la gametogénesis y se incrementan luego del desove (Figura 5.6a). Este patrón puede explicarse en función de la utilización y agotamiento de los pigmentos durante la gametogénesis y una posterior acumulación de los mismos luego del desove. Es importante destacar que luego del desove se incrementa la tasa de ingestión y posiblemente esto trae aparejado un incremento en la incorporación, asimilación y acumulación de carotenoides.

Sin bien no se registraron diferencias significativas en la concentración de  $\beta$  caroteno entre los estadios gonadales, la tendencia de los cambios descritos es similar a la observada en la equinenona y el  $\alpha$  tocoferol. Como se ha explicado anteriormente, los carotenoides son fundamentales para la reproducción de los erizos y si bien la concentración de  $\beta$  caroteno en las gónadas no presentó variaciones significativas entre estadios reproductivos, pueden ser otros los carotenoides que desempeñan este rol en la reproducción de *L. albus*, dado que las cantidades relativas de cada clase de carotenoides varía entre especies (Matsuno y Tsushima 2001).

También se presentan variaciones en el tipo de carotenoide predominante en las gónadas de diferentes grupos animales. Por ejemplo la astaxantina es el carotenoide dominante en los ovarios maduros de muchos crustáceos, en los que cumpliría diferentes funciones: (1) brinda protección contra la radiación, (2) cumple un rol metabólico en ovarios y huevos (ej. Antioxidantes y provitamina A) y (3) es causa de la pigmentación de la cutícula del huevo (Dall 1995; Liñian-Cabello *et al.* 2002). En cambio, muchos autores postulan que la equinenona es el carotenoide terminal y el más importante en las gónadas de la mayoría de los equinoideos regulares e irregulares (Tsushima y Matsuno 1990; Tsushima *et al.* 1993, 1995, 1997; Kawakami *et al.* 1998; Matsuno y Tsushima, 2001). Los altos niveles de equinenona en las gónadas de la mayoría de los erizos indican su importante rol en la maduración de las gametas y su influencia sobre el desarrollo de huevos y embriones (Plank *et al.* 2002), adicionalmente se conoce que presenta funciones antioxidantes (Miller *et al.* 1996; Mortensen *et al.* 1997). Sin embargo la concentración de equinenona en *L. albus* presentó un patrón similar a la de  $\beta$  caroteno (Figura 5.9a).

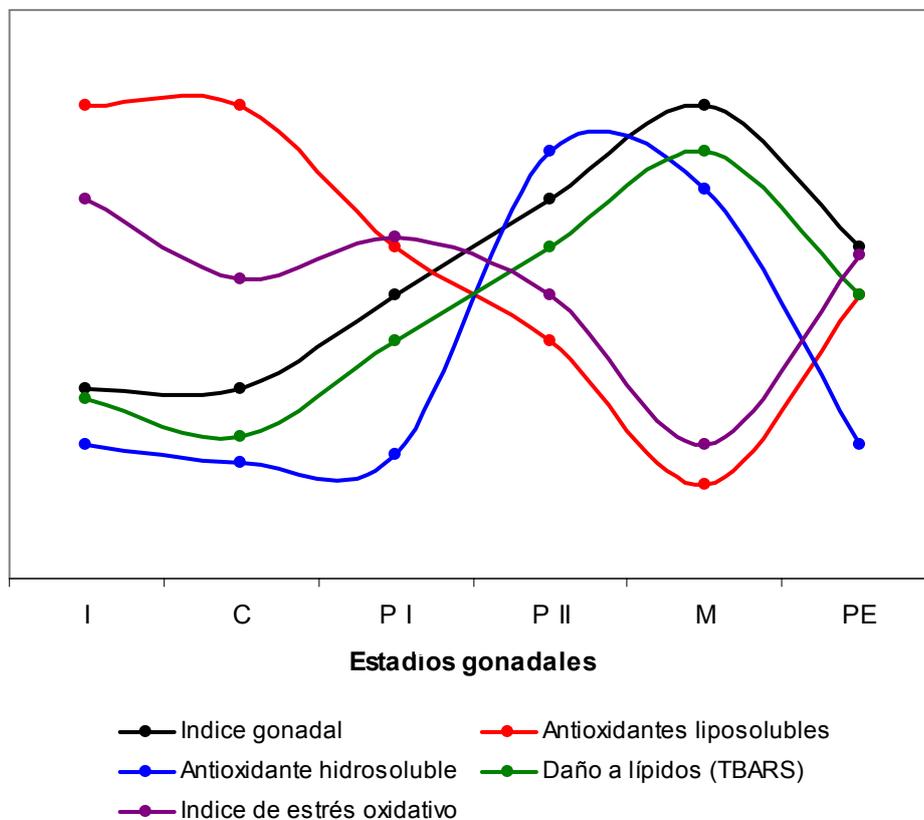
En *L. albus* las mayores concentraciones de  $\alpha$  tocoferol fueron encontradas luego del desove (Figura 5.10). En cambio en *Strongylocentrotus intermedius* la concentración de esta sustancia decrece abruptamente en las gónadas maduras, antes de la evacuación de gametas (Lukyanova y Khotimchenko 1995). También una alta concentración de  $\alpha$

tocoferol fue observada en gónadas del erizo *Hemicentrotus pulcherinus* (Shimada *et al.* 1990).

Tanto la concentración como el contenido de los antioxidantes liposolubles ( $\beta$  caroteno, equinenona y  $\alpha$  tocoferol) mostraron un perfil similar a lo largo del ciclo reproductivo de *L. albus*, presentando niveles más elevados en el comienzo de la gametogénesis y disminuyendo a medida que esta avanza, para aumentar nuevamente en los estadios Post-evacuado e Inmaduro (Figuras 5.8, 5.9 y 5.10). Estos antioxidantes muestran correlaciones positivas entre si (Figura 5.11) (Tabla 5.3) y el perfil que describen es opuesto al que proponen Borisovets *et al.* (2002) y Lukyanova y Khotimchenko (1995) y similar al descrito por Lamare y Hoffman (2004). El antioxidante hidrosoluble ascorbato incrementa su nivel durante el transcurso de la gametogénesis, presentando correlación negativa con los niveles de antioxidantes liposolubles (Tabla 5.3).

Los individuos de la población de *L. albus* estudiada comienzan el periodo de desove a principios de la primavera y si bien la disponibilidad de macroalgas es elevada en esa época (Mendoza y Nizovoy 2000), la tasa de ingestión de los erizos es muy baja (Cárcamo 2004). Finalizado el desove, en el mes de diciembre, los erizos comienzan a alimentarse acumulando pigmentos carotenoides ( $\beta$  caroteno y equinenona) y  $\alpha$  tocoferol que incorporan a partir de la dieta. Cuando se inicia la gametogénesis (abril), *L. albus* comenzaría a utilizar los antioxidantes que han sido almacenados desde diciembre hasta marzo, por lo que se alcanza la madurez gonadal con un bajo nivel de antioxidantes. Esto explica el incremento de daño a lípidos con el transcurso de la gametogénesis ya que los antioxidantes encargados de su protección (antioxidantes liposolubles) se han utilizado, disminuyendo tanto su concentración como contenido (Figura 5.8, 5.9 y 5.10). Los elevados niveles de ascorbato durante la gametogénesis pueden mantener un contenido mínimo de  $\alpha$  tocoferol a través del reciclado del mismo (ver ecuación 18) (Buettner 1993; May *et al.* 1998) y de esta manera se evitaría que el daño a lípidos sea aun mayor. Si bien durante la gametogénesis el daño a lípidos se incrementa, y el contenido de

antioxidantes liposolubles disminuye, el índice de estrés oxidativo ( $A^*/AH^*$ ) en las gónadas maduras es mínimo (Tabla 5.2). El hecho de no estar bajo una condición de estrés oxidativo puede deberse al incremento de antioxidantes hidrosolubles, como el ascorbato, o bien a otros antioxidantes no estudiados en esta tesis como por ejemplo los antioxidantes enzimáticos (ver Figura 5.11).



**Figura 5.11.** Representación esquemática de las variables analizadas en relación con los diferentes estadios del ciclo reproductivo de *L. albus*. Antioxidante hidrosoluble: ascorbato. Antioxidante liposoluble:  $\beta$  caroteno, equinenona y  $\alpha$  tocoferol. Índice de estrés oxidativo: relación  $A^*/AH^*$

## **INTRODUCCIÓN**

### **INFLUENCIA DE LA ALIMENTACIÓN SOBRE LAS GÓNADAS Y SU ASPECTO**

Es conocida la capacidad que presentan los equinoideos regulares para compensar los cambios ambientales con variadas respuestas fenotípicas. Entre ellas se destacan la capacidad de alterar el tamaño y la proporción de sus componentes corporales en respuesta a las variaciones ambientales (Russell 1998). Numerosos estudios de campo y de laboratorio realizados con equinodermos han concluido que variaciones cualitativas y cuantitativas en el alimento influyen en la asignación de recursos para la reproducción y el crecimiento somático de los individuos (Lawrence y Lane 1982; Beddingfield y McClintock 1998; Pérez *et al.* 2008). Varios estudios sugieren que algunas especies de erizos reducen su tamaño corporal reabsorbiendo material del caparazón en respuesta a la limitación en la disponibilidad de recursos alimentarios (Ebert 1967; Dix 1972; Levitan 1989, 1991). También se observó la disminución del tamaño relativo de la linterna de Aristóteles cuando se redujo la disponibilidad de alimento (Ebert 1980; Black *et al.* 1982, 1984; Edwards y Ebert 1991).

El tamaño relativo de las gónadas de diversas especies de erizos varía con las diferentes dietas suministradas (Swan 1961; Raymond y Scheibling 1987; Briscoe y Sebens 1988; Nestler y Harris 1994; Lawrence *et al.* 1997; Russell 1998; Pearce *et al.* 2004). Se ha observado que la gametogénesis se ve afectada e incluso detenida, en condiciones de escasa disponibilidad de alimento (Russell 1998). También se han registrado variaciones en el tamaño de los oocitos y en la abundancia de fagocitos nutritivos luego de la administración de diferentes dietas (Meidel y Scheibling 1999).

Como ya se ha expuesto en el capítulo 4, *Loxechinus albus*, asigna diferencialmente los recursos energéticos disponibles según el momento del ciclo reproductivo en el que se encuentre.

En este capítulo se describen las características que presentan las gónadas en particular y otros componentes corporales luego de la alimentación de los erizos con distintas dietas naturales y artificiales, en diferentes momentos del ciclo reproductivo.

La importancia del mercado gastronómico centrado en el consumo de las gónadas de *L. albus* en el litoral chileno, particularmente entre las regiones X y XII (Stotz 2003) aumenta la relevancia del conocimiento de los ciclos reproductivos y la posible manipulación de las características organolépticas de las gónadas (tamaño, color, firmeza, textura, etc.).

Con el objetivo de reducir la presión pesquera sobre las poblaciones naturales de los equinoideos utilizados para consumo, se han utilizado fundamentalmente dos metodologías:

(1) Desarrollo completo del ciclo de vida: Se induce el desove en cautiverio, realizándose la crianza de los erizos hasta las tallas comerciales (Cellario y Fenaux 1990; Grosjean *et al.* 1996, 1998).

(2) Mejoramiento gonadal: consiste en capturar ejemplares adultos de las poblaciones naturales y mantenerlos en cautiverio con alimentación natural abundante o suplementada con alimentos balanceados (Lawrence *et al.* 1992, 1997; de Jong-Westman *et al.* 1995; Klinger *et al.* 1997; McBride *et al.* 1997, 1999; Walker y Lesser 1998; Barker *et al.* 1998; Cook *et al.* 1998; Kelly *et al.* 1998; Vadas *et al.* 2000). De esa manera se mejoran las características organolépticas de las gónadas ya que éstas resultan muy influenciadas por la calidad y cantidad del alimento disponible (Vadas *et al.* 2000).

Son pocas las especies de equinoideos regulares comestibles, esto puede atribuirse a la accesibilidad, a la palatabilidad y a tradiciones histórico-culturales (Lawrence 2001). En las culturas que tienen integrado su consumo, este tipo de oferta es sumamente apreciada, especialmente en el caso de las especies de erizos que presentan gónadas color amarillo, con apariencia de caviar y con un sabor dulce-amargo (Robbins y McKeever 1990). En *Strongylocentrotus franciscanus*, las gónadas de color amarillo

brillante presentan sabor agrio y las ligeramente verdosas sabor amargo (McBride *et al.* 2004). Por lo tanto el color de las gónadas se puede considerar asociado a la palatabilidad y al valor comercial de las mismas.

Una importante fuente de merma en el rendimiento de las capturas sobre las poblaciones naturales se debe al elevado porcentaje de animales que deben descartarse después de su extracción y faenamiento por no reunir sus gónadas las características de tamaño, color, sabor, textura, etc. requeridos por el mercado. Este es un importante problema en la explotación de *L. albus*, en particular en las poblaciones del sur de Chile (región XII) debido al alto porcentaje de individuos con gónadas café (nombre vulgar que se le da a las gónadas de coloración oscura de bajo valor en el mercado gastronómico) (Vidal Santana 2003)

Dado que el color es una de las características organolépticas más importantes de las gónadas (McBride *et al.* 2004), se han desarrollado diversos ensayos buscando mejorarlo. Con ese objetivo usualmente se adicionan  $\beta$  carotenos o sus derivados a los alimentos balanceados (Plank *et al.* 2002) o se pulverizan las frondes de macroalgas con un spray que contiene a la microalga, *Dunaliella salina*, como fuente de pigmentos (Pearce *et al.* 2004).

### **EFICIENCIA EN LA ASIMILACION DE ALIMENTOS**

La eficiencia de asimilación (EA), conocida también como eficiencia de digestión o digestibilidad de los nutrientes es una medida para establecer la proporción del contenido energético del alimento que resulta asimilado por el animal (Lucas 1996).

La EA puede ser determinada en forma directa, conociendo la cantidad de alimento ingerido por el animal y colectando todas sus heces; o en forma indirecta, utilizando marcadores en el alimento suministrado en una relación conocida y calculando la proporción de marcador en las heces. La proporción de nutrientes del alimento que se

pierde en las heces está influenciada por una gran cantidad de factores, pero el tipo y composición del alimento son particularmente importantes.

En ese contexto un mejor conocimiento de los requerimientos nutricionales y de las tasas de producción de desechos redundan en la optimización de las condiciones de cultivo permitiendo, por ejemplo, reducir la alimentación y la pérdida de nutrientes. Otro aspecto de importancia es la comprensión del flujo de nutrientes bajo condiciones variables de confinamiento en estanques de cultivo (Kaushik 1998).

## **HIPÓTESIS**

- 1) Una oferta alimentaria más abundante y suplementada con carotenos incrementará el tamaño, las reservas energéticas y mejorará el color de las gónadas de *Loxechinus albus*.
- 2) Mediante la administración de dietas suplementadas con carotenos se prolongará el periodo de cosecha evitando la evacuación o bien, se logrará una rápida recuperación gonadal, en caso que la evacuación ocurriese.
- 3) Al recibir una dieta balanceada suplementada con carotenos *L. albus* alcanzará la madurez sexual con un cierto grado de mejoramiento en las características organolépticas de las gónadas.

## **OBJETIVOS**

- 1) Mejorar la comprensión sobre la utilización de nutrientes y su asignación a los distintos compartimentos del cuerpo, en diferentes momentos del ciclo reproductivo de *L. albus*.
- 2) Prolongar el periodo de cosecha e incrementar el rendimiento gonadal, en particular tamaño y color de las gónadas, mediante la utilización de dietas naturales y artificiales.
- 3) Incrementar el crecimiento somático mediante la utilización de una alimentación más abundante y de mayor calidad nutricional.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se efectuaron dos experimentos, el experimento 1 se llevó a cabo en el periodo en que ocurre la evacuación de las gametas en la población natural, y el experimento 2 en el periodo en que se desarrolla la gametogénesis hasta alcanzar la madurez sexual (Ver capítulo 3).

Para la realización de cada experimento se recolectaron en el banco natural 70 individuos adultos de *L. albus*. Las fechas de muestreo fueron: 27 de julio de 2005 y 7 de abril de 2006, para el experimento 1 y 2, respectivamente.

Con el objetivo de estandarizar la condición nutricional entre individuos los erizos no fueron alimentados durante los 20 días previos al comienzo del experimento. La supervivencia en este periodo fue del 100%.

## **PREPARACIÓN DE LAS DIETAS**

En los experimentos se utilizaron tres dietas diferentes. La Dieta A consistió en algas frescas (*Macrocystis pyrifera*) que fueron recolectadas una vez por semana. La recolección de algas se realizó en el mismo sitio donde se muestrearon los erizos. Las algas fueron transportadas en bolsas plásticas al laboratorio, donde se les removieron los epibiontes y se las mantuvo con aireación en agua de mar.

Las dietas B y C consistieron en alimentos balanceados formulados y preparados en nuestro laboratorio, tomando como orientación los alimentos desarrollados por el Instituto de Fomento Pesquero (IFOP, Chile) (Cárcamo 2004). El listado de los ingredientes usados y las proporciones para las dietas B y C son detallados en la tabla 6.1.

Componentes	Dieta B (bajo contenido de carotenos)	Dieta C (alto contenido de carotenos)
Harina de algas ( <i>Macrocystis pyrifera</i> )	14,00	14,00
Harina de soja	13,00	13,00
Almidón de maíz	24,53	24,50
Trigo molido	23,00	23,00
Harina de pescado	12,00	12,00
β-caroteno	0,02	0,045
Lecitina de soja	2,00	2,00
Aceite de maíz	2,00	2,00
Fosfato dicalcico	1,80	1,80
Etoxiquina	0,20	0,20
Vitamina C	0,10	0,10
Premezcla de vitaminas y minerales	0,10	0,10
Oxido de magnesio	0,25	0,25
Gelatina	5,00	5,00

**Tabla 6.1.** En la tabla se muestra el porcentaje de los ingredientes (expresado en % peso seco) de las dietas B y C.

La premezcla de vitaminas y minerales contenía (expresado en mg o UI/kg de alimento)= acetato de tocoferol= 70,8 UI, ácido ascórbico= 283 mg, tiamina= 7,1 mg, riboflavina= 7,6 mg, piridoxina= 9,4 mg, cianoalanina: 0,014 mg, biotina= 0,47 mg, ácido fólico= 1,89 mg, Pantotenato de Calcio= 23,6 mg, vitamina A= 710 UI, vitamina D= 700 UI, niacina= 14,6 mg, CaCO<sub>3</sub>= 2,1 mg, CuSO<sub>4</sub>= 9,4 mg, FeSO<sub>4</sub>= 4,7 mg, MgCO<sub>3</sub>= 174 mg, MnSO<sub>4</sub>= 18,9 mg, CaHPO<sub>4</sub>= 75,5 mg, ZnSO<sub>4</sub>= 7,7 mg.

La harina de algas (*Macrocystis pyrifera*) fue elaborada en nuestro laboratorio. Se cosecharon frondes de *Macrocystis pyrifera*, que se suspendieron de cuerdas en una habitación cálida y seca, luego de una semana se procedió a moler los frondes en un mortero manual. Se utilizaron óxido de magnesio, fosfato dicálcico, vitamina C, etoxiquina y β-caroteno con un grado de pureza de aproximadamente 95%. El resto de los ingredientes fueron de calidad comercial para consumo humano. La premezcla de vitaminas y minerales fue preparada por el laboratorio de nutrición animal (Facultad de

Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Argentina). La harina de pescado fue producida por Coomarpes LTDA (Mar del Plata, Argentina).

Una vez obtenida una mezcla homogénea con los ingredientes secos se incorporó la gelatina disuelta en agua caliente lográndose una masa consistente (Figura 6.1a). El alimento fue extrusado manualmente mediante la utilización de una máquina “picadora de carne” de uso doméstico, obteniendo *pellets* de 0,5 mm de diámetro por 15 mm de longitud (Figura 6.1b). Luego de su elaboración, los *pellets* se airearon y secaron sobre una superficie plana (Figura 6.1c). El alimento fue conservado a temperatura ambiente en bolsas plásticas herméticamente cerradas.

Siguiendo la metodología descrita en “Determinaciones calorimétricas” (Capítulo 4) se determinó la densidad energética (DE) de las tres dietas utilizadas. La DE de la dieta A (*M. pyrifera*) fue 16,52 kJ/g y la de las dietas B y C (alimento balanceado) fue 20,41 kJ/g.



**Figura 6.1.** Preparación del alimento balanceado. **a)** Mezclado de ingredientes y formación de la masa. **b)** Elaboración de *pellets* mediante la utilización de una picadora de carne de uso doméstico. **c)** Corte y disposición de los *pellets* para el secado. Fotos: Dr. Jorge Calvo.

## DISEÑO EXPERIMENTAL

Los experimentos se llevaron a cabo durante 16 semanas (Exp 1 = 18 de agosto al 18 de diciembre de 2005 y Exp 2 = 27 abril al 24 de agosto de 2006). En los experimentos se utilizaron tres dietas diferentes, Dieta A (*Macrocystis pyrifera*), Dieta B (alimento balanceado con 0,02% de  $\beta$  caroteno) y Dieta C (alimento balanceado con 0,045 % de  $\beta$  caroteno).

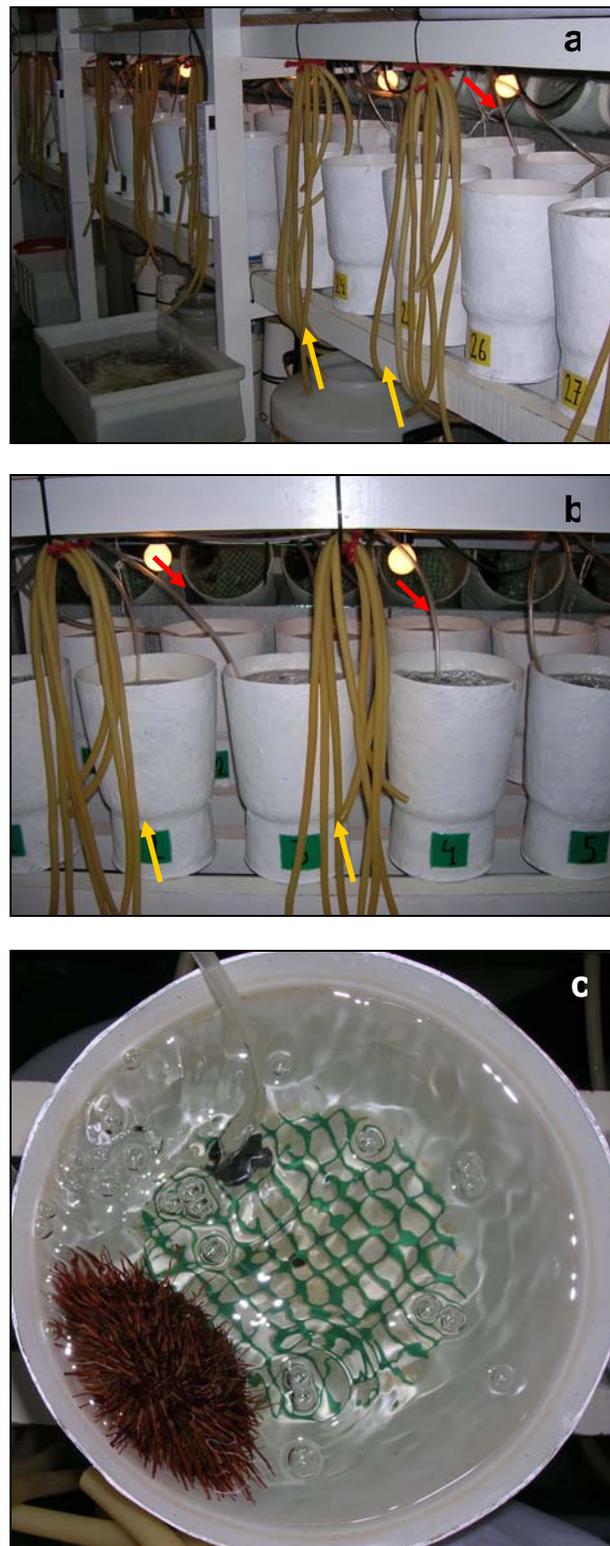
Con el objetivo de establecer las condiciones iniciales diez ejemplares capturados en el mismo muestreo fueron sacrificados el día de inicio de cada experimento, procesándose estos de igual manera que los individuos tratados.

Luego, los sesenta individuos restantes fueron distribuidos en uno de los tres grupos experimentales (cada grupo  $n= 20$ ). Posteriormente, a cada grupo se le asignó al azar una de las dietas (A, B o C). Dentro de cada tratamiento, se establecieron 20 réplicas con un individuo cada una. Cada uno de los individuos fue colocado en un acuario con suministro de agua y sistema de aireación independiente.

Los acuarios utilizados fueron diseñados y construidos por el técnico Marcelo Gutiérrez (laboratorio de Ecofisiología, CADIC). Se realizaron en fibra de vidrio con resina poliéster y fueron impermeabilizados con “gel coat” antes de ser utilizados, exponiéndolos a la luz solar con el objetivo de lograr la volatilización de posibles sustancias nocivas.

Los acuarios consistieron en cilindros de 30 cm de alto y 19 cm de diámetro, con el tercio inferior de forma cónica terminado en una manguera de látex (Figuras 6.2a y 6.2b). Una malla plástica horizontal dispuesta al comienzo de la sección cónica (Figura 6.2c) impidió el paso del alimento y permitió la concentración de las heces para su recolección utilizando una manguera.

Al cumplirse las 8 y 16 semanas de desarrollo de cada experimento se sacrificaron diez individuos de cada tratamiento. En las mismas fechas se recolectaron 10 individuos de la zona de muestreo con el objetivo de determinar las condiciones organolépticas de las gónadas de la población natural.



**Figura 6.2.** Acuarios experimentales utilizados. **a)** y **b)** Disposición de los acuarios en la cámara fría con suministro de aire (flechas rojas) y manguera de desagote (flechas amarillas). **c)** Detalle del acuario con red que permite el paso de las heces. Fotos: Daniel Aureliano.

Los individuos se alimentaron tres veces por semana, colocando un *pellet* o trozo de macroalga sobre su caparazón. Los cambios de agua se realizaron tres veces a la semana antes de alimentarlos.

Las condiciones generales de la cámara fría se mantuvieron según se detalla en el punto “Muestreo y mantenimiento de los animales”, del capítulo 2.

### **TASAS DE INCREMENTO**

Las tasas de incremento del peso total, diámetro y altura del caparazón se calcularon como la diferencia entre dichas variables, a las 8 y 16 semanas de experimentación respectivamente, con respecto a los valores registrados para cada individuo al comienzo de los experimentos.

### **INDICES**

Se calcularon los índices (IG, lint, llint, lLiq e lCap) según “Cálculo de Índices” (Ver capítulo 2) para cada tiempo (8 y 16 semanas de experimentación) y para cada tratamiento utilizado (Dieta A, B, C y la población natural).

El índice de color de las gónadas fue determinado utilizando una cartilla de colores diseñada por la Universidad de Maine (USA) (Figura 6.3).

Los colores de la cartilla fueron agrupados en cuatro categorías (Pearce *et al.* 2004; Pearce com. pers.). La categoría 1 representa los colores de gónadas más apreciados en el mercado y la categoría 4 los menos apreciados. La determinación del color se realizó bajo condiciones estándar de iluminación.

Categorías de colores:

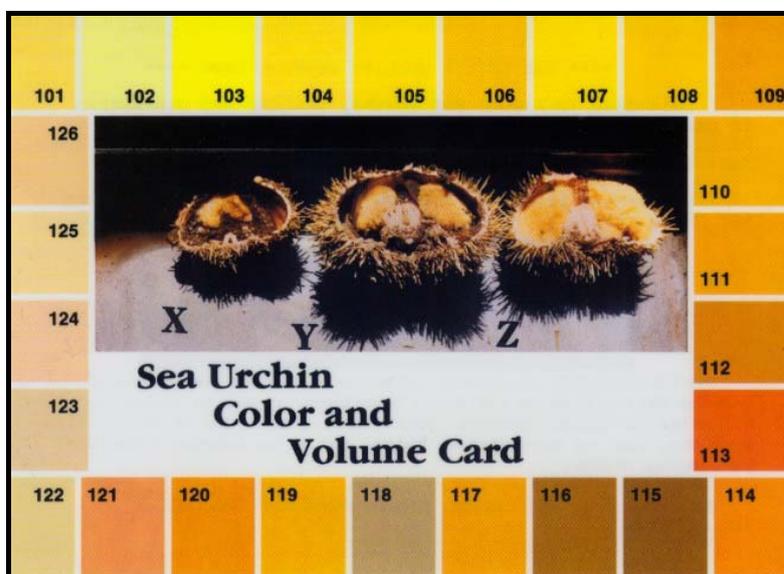
En cada categoría se especifican entre paréntesis los números que caracterizan a los colores en la cartilla

1 = amarillo brillante o naranja (104, 105, 107).

2 = amarillo pálido, naranja o mostaza (106, 108 al 111, 113, 114)

3 = amarillo-marrón, naranja-marrón, rojo-marrón, crema (112)

4 = otros colores (p ej. Marrón oscuro, gris) (115, 116).



**Figura 6.3.** Cartilla de colores de gónadas de erizos desarrollada por la Universidad de Maine (USA). Gentileza del Dr. J Lawrence.

### CONTENIDO DE CAROTENOS TOTALES

Se determinaron los carotenos totales en las gónadas de cada individuo experimental. Las muestras se trataron según la metodología descrita en “Contenido de carotenos totales” del capítulo 5.

### DETERMINACIONES CALORIMÉTRICAS

Se tomaron muestras de gónadas de cada uno de los individuos disecados en los dos experimentos. Las muestras se trataron según la metodología descrita en “Determinaciones calorimétricas” del capítulo 4.

## DETERMINACION DE MATERIA ORGÁNICA

Se determinó el porcentaje de materia orgánica del caparazón y la linterna de Aristóteles de cada erizo experimental. Las muestras se trataron según la metodología descrita en “determinación de materia orgánica” del capítulo 4.

## EFICIENCIA DE ASIMILACION

Para estudiar la energética de la asimilación se recolectaron separadamente las heces y el alimento sobrante durante 10 días, mientras se desarrollaba el experimento 2. Se suministraron tres dietas: dieta A (*Macrocystis pyrifera*), dieta B (alimento balanceado con bajo contenido de caroteno: 0,02 %) y dieta C (alimento balanceado con alto contenido de caroteno: 0,45 %). Se utilizaron 10 réplicas para cada dieta analizada.

La alimentación fue suministrada *ad libitum* tres veces por semana.

Se registró la cantidad de alimento ingerido (g), calculado como la diferencia entre el alimento suministrado y el excedente encontrado al día siguiente de la alimentación, así como la cantidad de excremento producido por acuario (g, recolectado diariamente).

Se determinó la densidad energética (kJ/g) de los ítems alimentarios suministrados y de los excrementos recolectados por acuario (Ver la metodología descrita en “Determinaciones calorimétricas” del capítulo 4) y se calculó la eficiencia de asimilación por acuario, según la fórmula:

$$EA = \frac{ET_{in} - ET_{he}}{ET_{in}} \times 100$$

donde

EA = eficiencia de asimilación (%)

ET<sub>in</sub> = contenido energético total del alimento ingerido (kJ)

ET<sub>he</sub> = contenido energético total de las heces (kJ)

## TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS DATOS

En ambos experimentos, se realizaron ANOVAs de dos factores para analizar el efecto del factor tiempo de experimentación (8 y 16 semanas), y del factor dieta (Dieta A, B, C y control de la población natural) sobre las tasas de incremento corporal (peso total, diámetro y altura del caparazón), los índices (IG, IInt, ILiq, ICap), la densidad energética y el contenido energético de las gónadas, el porcentaje de materia orgánica del caparazón y la linterna de Aristóteles y el contenido de carotenos totales. En el experimento 1 el IInt y el ILiq y en el experimento 2 el IG y la Eficiencia de Asimilación fueron analizados mediante análisis de varianza de un factor. Posteriormente se realizaron comparaciones de Tukey en aquellos factores en los que se observaron diferencias significativas.

En todos los casos, los supuestos de normalidad y homocedacia fueron puestos a prueba mediante pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente (Sokal y Rohlf 1995). Se transformaron los datos en los casos en los que no se cumplieron los supuestos.

El efecto de las dietas sobre el índice de color fue analizado utilizando una prueba de Kruskal-Wallis seguido de comparaciones múltiples de Dunn, en los casos en que se hayan observado diferencias significativas (Zar 1984; Sokal y Rohlf 1995).

El análisis estadístico de los datos fue realizado mediante la utilización de los programas Statistica 6.0 y GraphPad Instat.

## **RESULTADOS**

Los individuos utilizados en ambos experimentos aceptaron el alimento balanceado, como se puede apreciar en la figura 6.4.

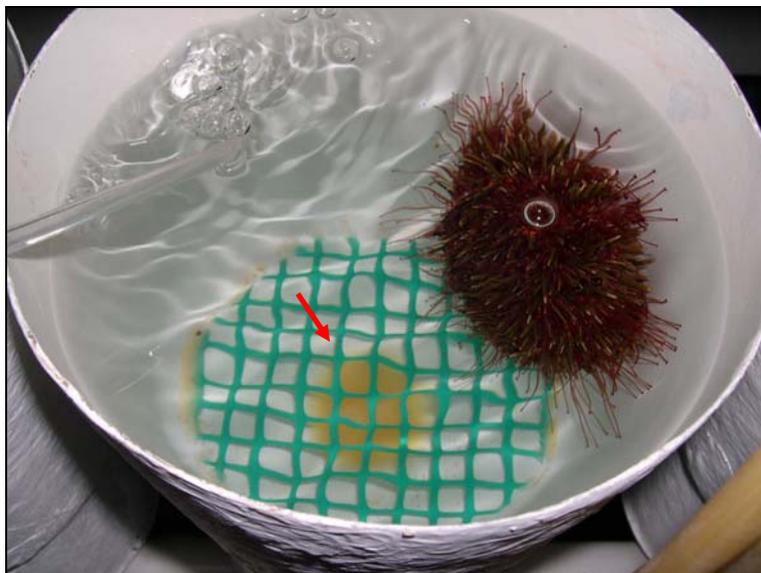
Sin embargo, durante el transcurso del experimento 1, los individuos rechazaron frecuentemente el alimento balanceado (Dietas B y C), dejándolo caer de la superficie del caparazón hacia la base del acuario. En estos casos se volvió a colocar el alimento sobre los individuos hasta que fuese aceptado (Figura 6.4). En el experimento 2 la aceptación del alimento balanceado fue mayor que en el experimento 1.



**Figura 6.4.** Individuo adulto de *L. albus*, ingiriendo alimento balanceado. Observar el pellet sobre la boca (Flecha roja). Foto: Daniel Aureliano.

## EXPERIMENTO 1. PERIODO POST REPRODUCTIVO

Durante el desarrollo del experimento, se observó en la parte inferior de todos los acuarios (60 replicas) secreciones amarillentas o blancuzcas, indicando que el desove o la evacuación habían ocurrido pese a la manipulación de las condiciones experimentales (oferta alimentaría abundante) (Figura 6.5).



**Figura 6.5.** Individuo adulto de *L. albus*, evacuando en el acuario. Puede observarse el desove en la parte inferior del acuario (Flecha roja). Foto: Daniel Aureliano.

## INFLUENCIA DE LAS DIFERENTES DIETAS EN LA SUPERVIVENCIA Y TASAS DE INCREMENTO CORPORAL

La supervivencia fue del 100 % para los individuos alimentados con las dietas A y B y del 95% para los alimentados con la dieta C.

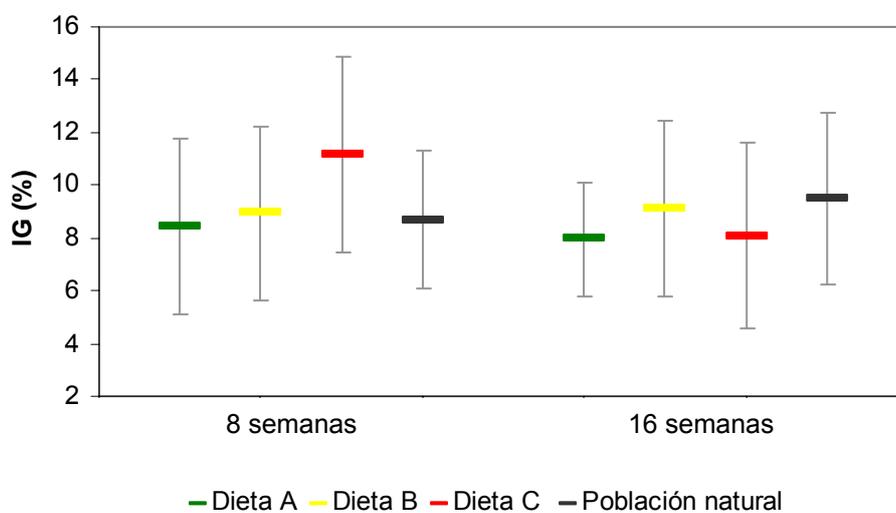
Las tasas de incremento de peso total, diámetro y altura del caparazón presentaron interacciones no significativas entre los factores dieta y tiempo (ANOVAs  $p= 0,22$ ;  $p= 0,40$  y  $p= 0,32$ ; respectivamente). No se encontraron diferencias significativas en las tasas de incremento entre dietas (ANOVAs  $p= 0,19$ ;  $p= 0,92$  y  $p= 0,69$ ; respectivamente) así como tampoco entre tiempos (ANOVAs  $p= 0,62$ ;  $p= 0,28$  y  $p= 0,9$ ; respectivamente) (ver tabla 6.2).

	T. inc. peso	T. inc. diámetro	T. inc. altura
<b>8 semanas</b>			
Dieta A	$-8,85 \pm 3,02$ (10)	$-0,33 \pm 3,51$ (10)	$-0,76 \pm 1,64$ (10)
Dieta B	$-6,94 \pm 2,29$ (10)	$0,42 \pm 1,25$ (10)	$-0,97 \pm 1,34$ (10)
Dieta C	$-7,33 \pm 4,05$ (10)	$-0,77 \pm 1,15$ (10)	$-0,53 \pm 1,19$ (10)
<b>16 semanas</b>			
Dieta A	$-8,07 \pm 4,43$ (10)	$-1,10 \pm 2,83$ (10)	$-1,20 \pm 1,84$ (10)
Dieta B	$-6,49 \pm 3,66$ (10)	$0,29 \pm 1,54$ (10)	$-0,16 \pm 0,90$ (10)
Dieta C	$-9,83 \pm 5,47$ (9)	$0,28 \pm 1,03$ (9)	$-1,05 \pm 2,06$ (9)

**Tabla 6.2** Tasas de incremento de peso total, diámetro y altura del caparazón a las 8 y 16 semanas de experimentación utilizando diferentes dietas. Media  $\pm$  desvío estándar (n).

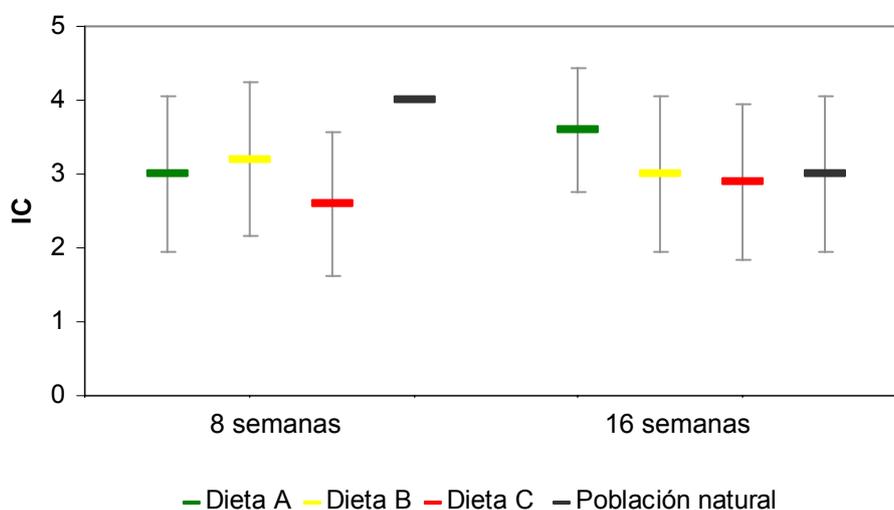
## INFLUENCIA DE LAS DIFERENTES DIETAS EN ÍNDICES SOMÁTICOS Y GONADALES

El IG no presentó interacciones significativas entre los factores dieta y tiempo (ANOVA  $p=0,25$ ), así como tampoco entre dietas (ANOVA  $p=0,57$ ) y entre tiempos (ANOVA  $p=0,36$ ) (Figura 6.6).



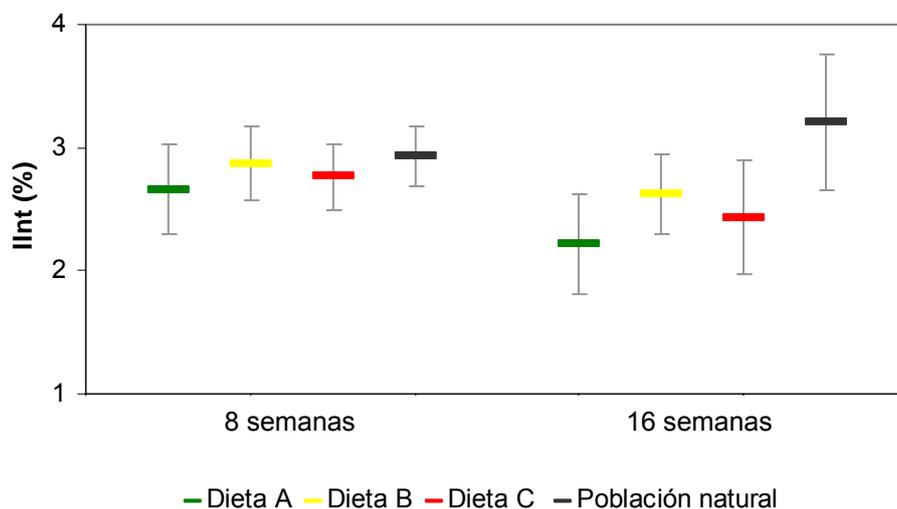
**Figura 6.6.** Índice gonadal (IG) de los individuos experimentales de *L. albus* al cabo de 8 y 16 semanas de alimentación con diferentes dietas. Medias y desvíos estándar para cada dieta.

Se encontraron diferencias significativas en el IC luego de 8 semanas de experimentación (K-W  $p < 0,05$ ). Los valores de IC de los individuos alimentados con la dieta C fueron menores que los de la población natural ( $p < 0,05$ ), es decir que los individuos alimentados con la dieta C presentaron en sus gónadas un color más adecuado según lo requerido por el mercado. Luego de 16 semanas de experimentación no se encontraron diferencias significativas entre dietas en el IC (K-W  $p = 0,39$ ) (Figura 6.7).



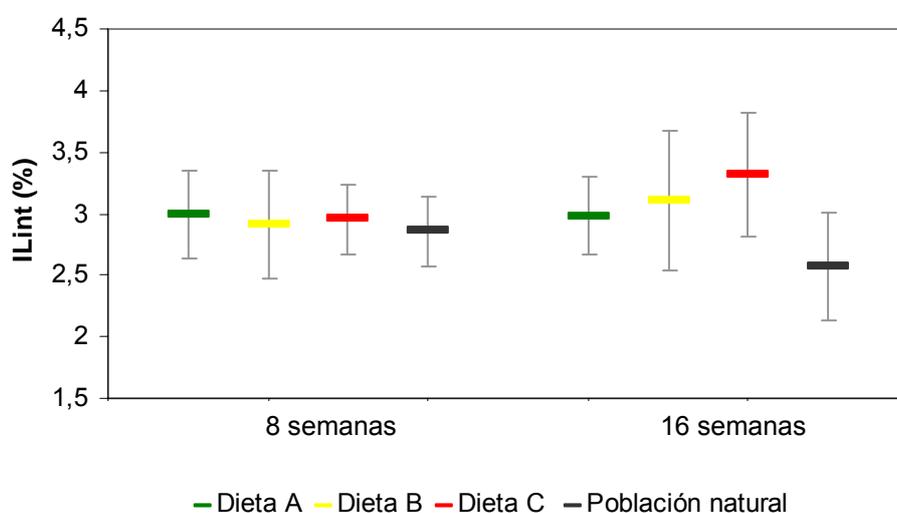
**Figura 6.7.** Índice de Color (IC) de los individuos experimentales de *L. albus* al cabo de 8 y 16 semanas de alimentación con diferentes dietas. Se representan las medianas y percentiles 25 y 75 para cada dieta.

En el análisis del índice intestinal (IInt) se encontró que la interacción entre factores tiempo y dieta no fue significativa (ANOVA  $p= 0,053$ ). Mientras que el factor tiempo presentó diferencias significativas (ANOVA  $p< 0,05$ ), siendo menores los valores de IInt luego de las 16 semanas de experimentación ( $p< 0,05$ ). El factor dietas también presentó diferencias significativas (ANOVA  $p< 0,001$ ), los individuos provenientes de la población natural presentaron mayores valores de IInt que aquellos alimentados con la dieta A y C ( $p< 0,05$ ) (Figura 6.8).



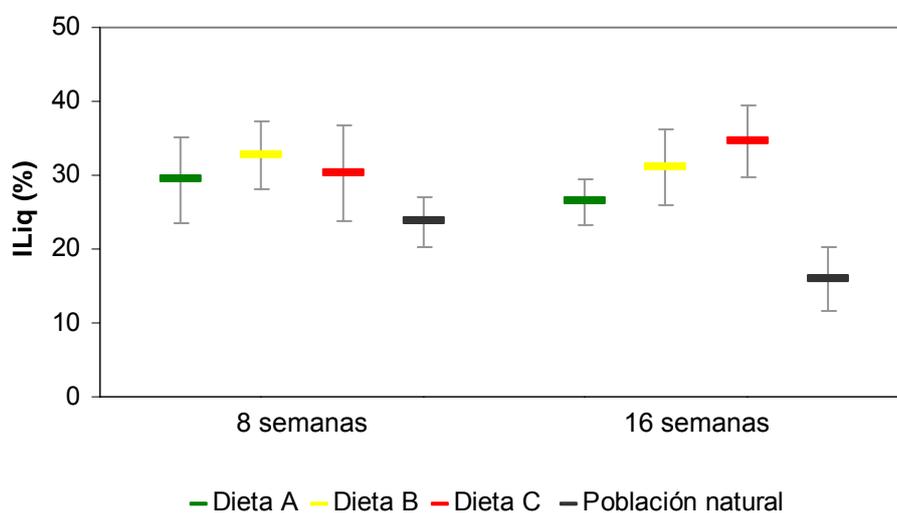
**Figura 6.8.** Índice de Intestino (IInt) de los individuos experimentales de *L. albus* al cabo de 8 y 16 semanas de alimentación con diferentes dietas. Medias y desvíos estándar para cada dieta.

El ILint no presentó interacción significativa entre los factores dieta y tiempo (ANOVA  $p=0,087$ ), ni entre los diferentes tiempos (ANOVA  $p=0,47$ ). Se encontraron diferencias significativas del ILint entre dietas (ANOVA  $p<0,05$ ), siendo mayor el valor del índice en los individuos alimentados con la dieta C que en los de la población natural ( $p<0,05$ ) (Figura 6.9).



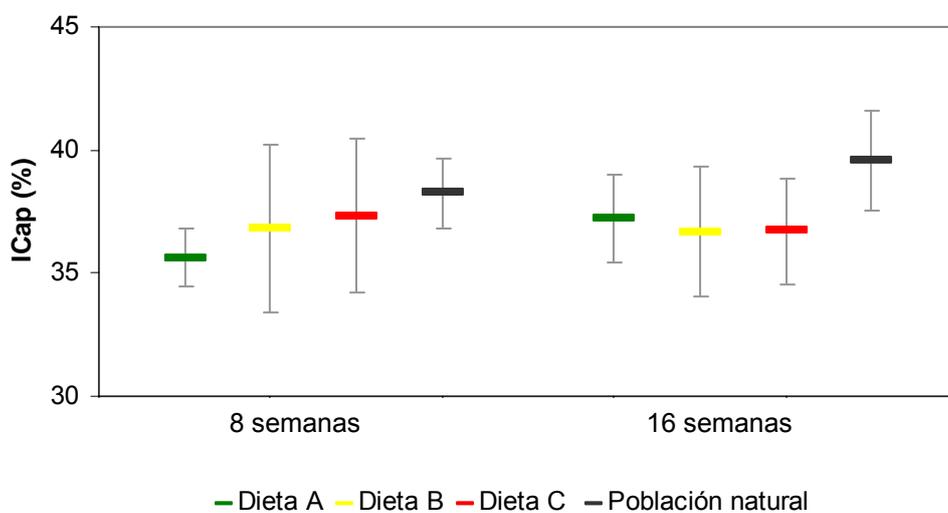
**Figura 6.9.** Índice de linterna de Aristóteles (ILint) de los individuos experimentales de *L. albus* al cabo de 8 y 16 semanas de alimentación con diferentes dietas. Medias y desvíos estándar para cada dieta.

Se encontraron diferencias significativas en el ILiq luego de 8 semanas de experimentación para las diferentes dietas ensayadas (ANOVA  $p < 0,05$ ). Los valores de ILiq de los individuos alimentados con las dietas A y B fueron mayores que los de la población natural ( $p < 0,05$ ). Luego de 16 semanas de experimentación, también se encontraron diferencias significativas en el ILiq (ANOVA  $p < 0,001$ ), donde el índice fue mayor en los individuos que se mantuvieron bajo condiciones de laboratorio que en los de la población natural ( $p < 0,05$ ) (Figura 6.10).



**Figura 6.10.** Índice de líquido celómico (ILiq) de los individuos experimentales de *L. albus* al cabo de 8 y 16 semanas de alimentación con diferentes dietas. Medias y desvíos estándar para cada dieta.

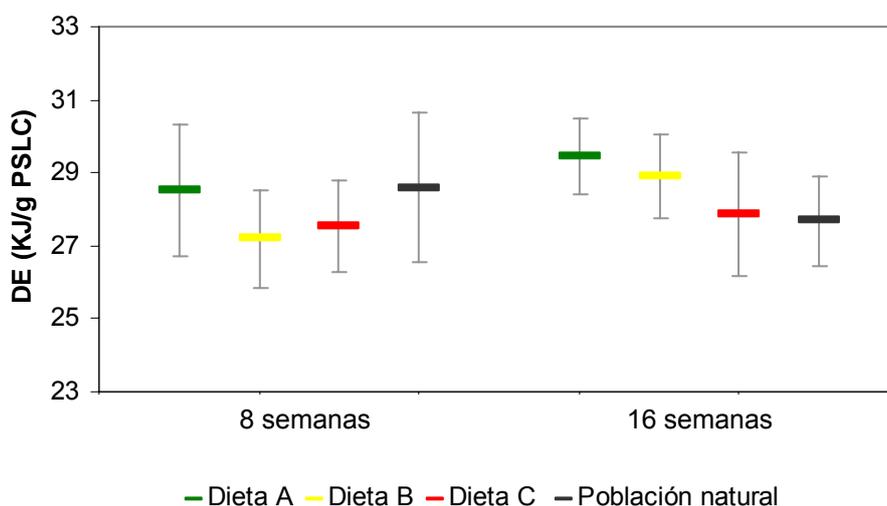
El ICap no presentó interacción significativa entre los factores dieta y tiempo (ANOVA  $p=0,38$ ), ni entre los diferentes tiempos (ANOVA  $p=0,30$ ). Se encontraron diferencias significativas en el ICap entre las diferentes dietas (ANOVA  $p<0,05$ ), siendo menor el valor del índice en los individuos alimentados con las dietas A y B que el valor en los individuos provenientes de la población natural ( $p<0,05$ ) (Figura 6.11).



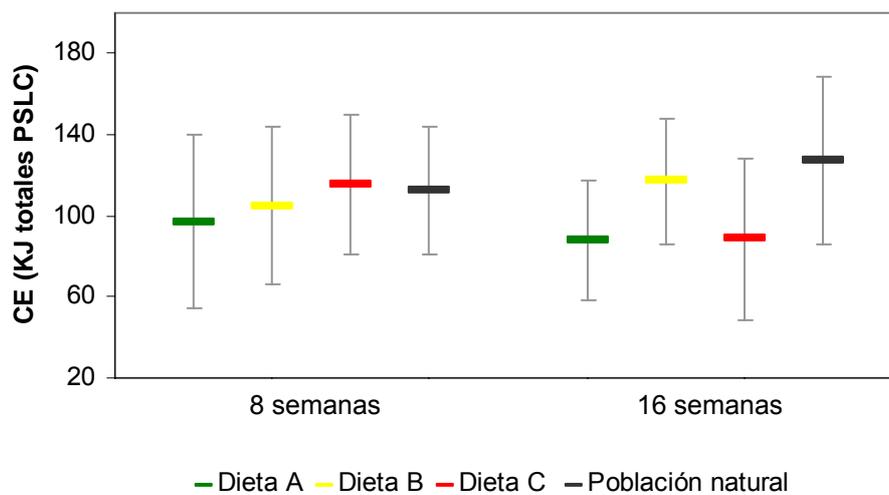
**Figura 6.11.** Índice de caparazón (ICap) de los individuos experimentales de *L. albus* al cabo de 8 y 16 semanas de alimentación con diferentes dietas. Medias y desvíos estándar para cada dieta.

## INFLUENCIA DE LAS DIFERENTES DIETAS EN LA DENSIDAD Y CONTENIDO ENERGÉTICO

La DE y el CE de las gónadas no presentaron interacciones significativas entre los factores tiempo y dieta (ANOVAs  $p=0,063$  y  $p=0,26$ ; respectivamente). La DE y el CE no presentaron diferencias significativas, tanto con la utilización de diferentes dietas (ANOVAs  $p=0,15$  y  $p=0,13$ ; respectivamente) como en diferentes tiempos de experimentación (ANOVAs  $p=0,068$  y  $p=0,07$ ; respectivamente) (Figuras 6.12 y 6.13; respectivamente).



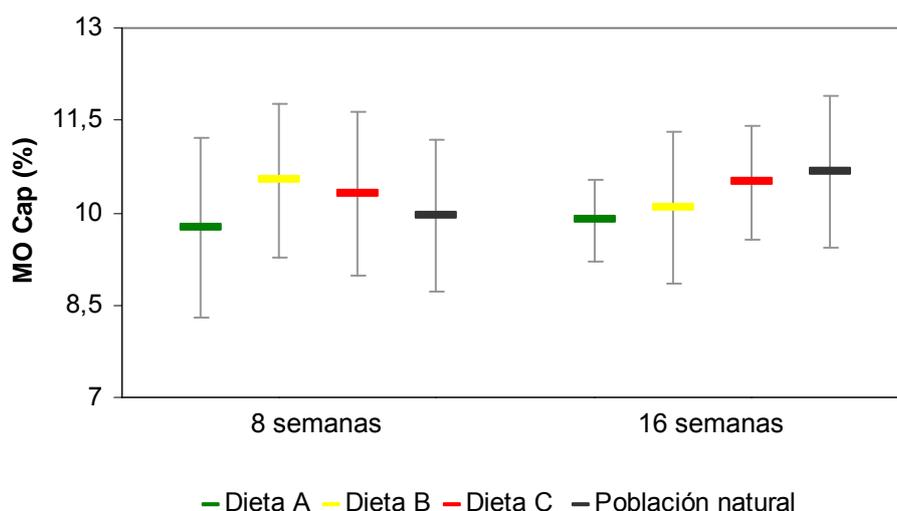
**Figura 6.12.** Densidad energética (DE) (kJ/g PSLC) de gónadas de *L. albus* al cabo de 8 y 16 semanas de alimentación con diferentes dietas. Promedios y desvíos estándar para cada dieta.



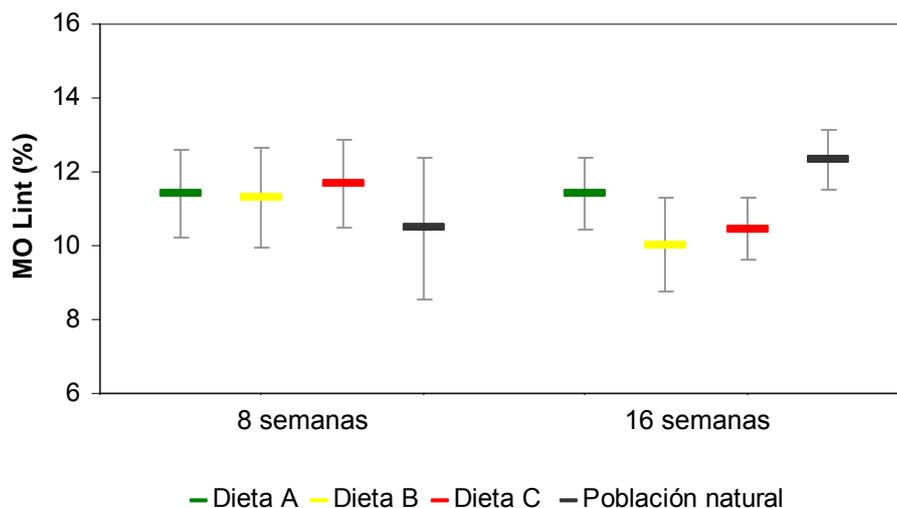
**Figura 6.13.** Contenido energético (CE) (kJ totales PSLC) de gónadas de *L. albus* al cabo de 8 y 16 semanas de alimentación con diferentes dietas. Promedios y desvíos estándar para cada dieta.

### INFLUENCIA DE LAS DIFERENTES DIETAS EN LA MATERIA ORGÁNICA DEL CAPARAZON Y LA LINTERNA DE ARISTÓTELES.

No se presentaron diferencias significativas en los porcentajes de materia orgánica contenida tanto en el caparazón como en la linterna de Aristóteles luego de la utilización de diferentes dietas (ANOVAs  $p= 0,77$  y  $p= 0,086$ ; respectivamente). Tampoco se registraron diferencias entre los diferentes tiempos de experimentación (ANOVAs  $p= 0,87$  y  $p= 0,34$ ; respectivamente). Las interacciones de los factores tiempo y dieta, para ambas variables fueron no significativas (ANOVAs  $p= 0,31$  y  $p= 0,80$ ) (Figuras 6.14 y 6.15; respectivamente).



**Figura 6.14.** Porcentaje de materia orgánica del caparazón de *L. albus* al cabo de 8 y 16 semanas de alimentación con diferentes dietas. Promedios y desvíos estándar para cada dieta.



**Figura 6.15.** Porcentaje de materia orgánica de la linterna de Aristóteles de *L. albus* al cabo de 8 y 16 semanas de alimentación con diferentes dietas. Medias y desvíos estándar para cada dieta.

### INFLUENCIA DE LAS DIFERENTES DIETAS EN LOS CAROTENOS TOTALES

El valor medio del contenido de carotenos totales es  $2,00 \pm 2,47$  (mg de carotenos totales/100g de gónada) ( $n= 38$ ). El contenido de carotenos totales no presentó interacción significativa entre los factores tiempo y dieta (ANOVA  $p= 0,38$ ), así como tampoco se registraron diferencias significativas para cada factor (ANOVAs  $p= 0,68$  y  $p= 0,21$ ; respectivamente)

**EXPERIMENTO 2. PERIODO PRE REPRODUCTIVO****INFLUENCIA DE DIFERENTES DIETAS EN LA SUPERVIVENCIA Y TASAS DE INCREMENTO CORPORAL**

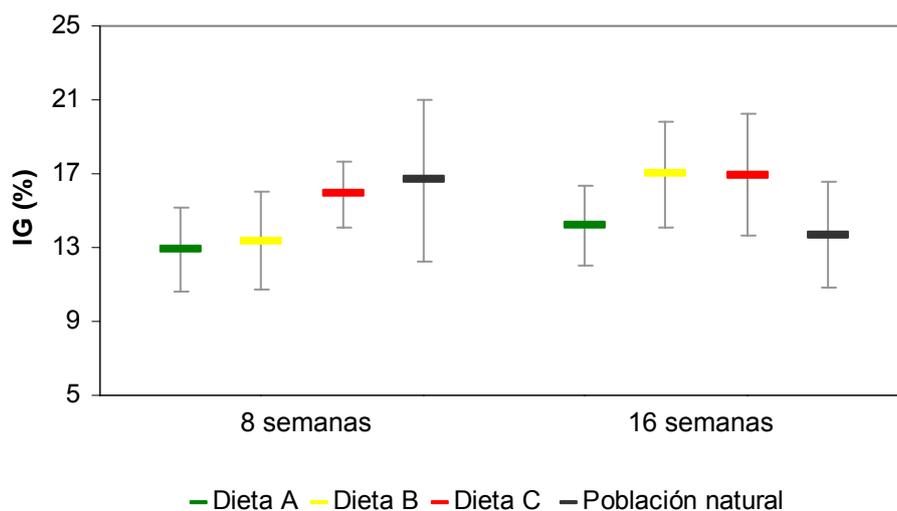
La supervivencia fue del 100 % para los individuos alimentados con las dietas A, B y C. Las tasas de incremento de peso total, diámetro y altura del caparazón no presentaron interacciones significativas entre los factores dieta y tiempo (ANOVAs  $p= 0,44$ ;  $p= 0,80$ ; y  $p= 0,23$ ; respectivamente). No se encontraron diferencias significativas en las tasas de incremento entre dietas (ANOVAs  $p= 0,56$ ;  $p= 0,065$  y  $p= 0,64$ ; respectivamente) y tampoco entre tiempos para las tasas de incremento de diámetro y altura (ANOVAs  $p= 0,48$ ; y  $p=0,68$ ; respectivamente). La tasa de incremento del peso total varió significativamente entre tiempos (ANOVA  $p< 0,01$ ), siendo mayor durante las primeras 8 semanas ( $1,67 \pm 1,85$ ) que al finalizar el experimento ( $0,27 \pm 2,15$ ) (Tabla 6.3).

	<b>T. inc. peso</b>	<b>T. inc. diámetro</b>	<b>T. inc. altura</b>
<b>8 semanas</b>			
Dieta A	$1,35 \pm 1,66$ (10)	$-0,44 \pm 1,29$ (10)	$0,12 \pm 1,07$ (10)
Dieta B	$1,18 \pm 1,62$ (10)	$0,14 \pm 1,18$ (10)	$-0,07 \pm 0,99$ (10)
Dieta C	$2,49 \pm 2,13$ (10)	$-0,82 \pm 1,25$ (10)	$-0,25 \pm 0,97$ (10)
<b>16 semanas</b>			
Dieta A	$0,04 \pm 1,20$ (10)	$-0,14 \pm 1,05$ (10)	$0,92 \pm 1,79$ (10)
Dieta B	$0,55 \pm 2,87$ (10)	$-0,35 \pm 0,79$ (10)	$-0,61 \pm 1,64$ (10)
Dieta C	$0,22 \pm 2,24$ (10)	$-0,87 \pm 1,22$ (10)	$0,34 \pm 2,07$ (10)

**Tabla 6.3** Tasas de incremento de peso total, diámetro y altura del caparazón a las 8 y 16 semanas de experimentación utilizando diferentes dietas. Media  $\pm$  desvío estándar (n).

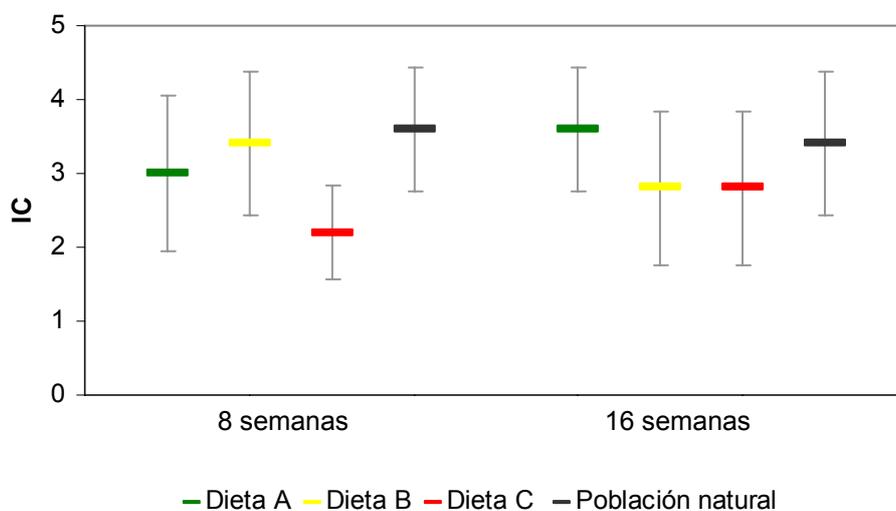
## INFLUENCIA DE LAS DIFERENTES DIETAS EN ÍNDICES SOMÁTICOS Y GONADALES

Luego de 8 semanas de experimentación se encontraron diferencias significativas en el IG entre las diferentes dietas ensayadas (ANOVA  $p < 0,05$ ). Los valores de IG de los individuos alimentados con las dietas A y B fueron menores que en aquellos provenientes de la población natural o alimentados con la dieta C ( $p < 0,05$ ). Luego de 16 semanas de experimentación, también se encontraron diferencias significativas en el IG (ANOVA  $p < 0,05$ ). El índice fue mayor en los individuos alimentados con las dietas B y C que en los alimentados con la dieta A o los de la población natural ( $p < 0,05$ ) (Figura 6.16).



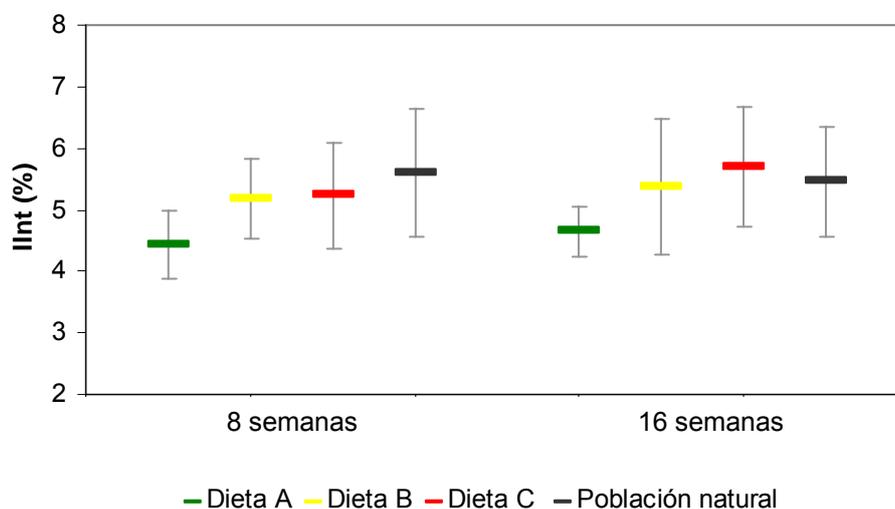
**Figura 6.16.** Índice gonadal (IG) de los individuos experimentales de *L. albus* al cabo de 8 y 16 semanas de alimentación con diferentes dietas. Medias y desvíos estándar para cada dieta.

Se encontraron diferencias significativas en el IC luego de 8 semanas de experimentación (K-W  $p < 0,01$ ). Los valores de IC de los individuos alimentados con la dieta C fueron menores que los de la población natural ( $p < 0,05$ ). Luego de 16 semanas de experimentación no se encontraron diferencias significativas en el IC entre los diferentes grupos (K-W  $p = 0,17$ ) (Figura 6.17).



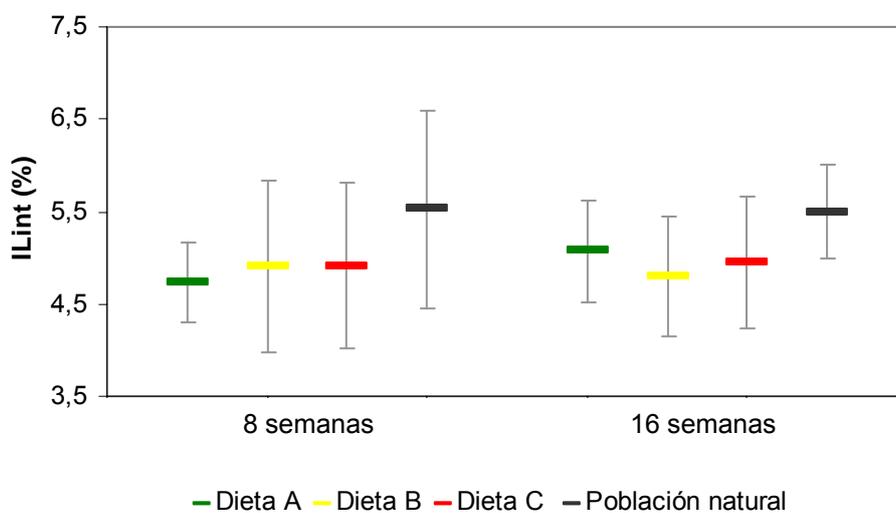
**Figura 6.17.** Índice de color (IC) de los individuos experimentales de *L. albus* al cabo de 8 y 16 semanas de alimentación con diferentes dietas. Se representan las medianas y percentiles 25 y 75 para cada dieta.

El IInt no presentó interacción significativa entre los factores dieta y tiempo (ANOVA  $p=0,68$ ), ni entre los diferentes tiempos (ANOVA  $p=0,34$ ). Se encontraron diferencias significativas en el IInt entre las diferentes dietas (ANOVA  $p<0,01$ ). El IInt de los individuos alimentados con la dieta A fue menor que los índices de los individuos alimentados con las dietas B, C y los procedentes de la población natural ( $p<0,05$ ). Estos tres últimos grupos no mostraron diferencias entre sí (Figura 6.18).



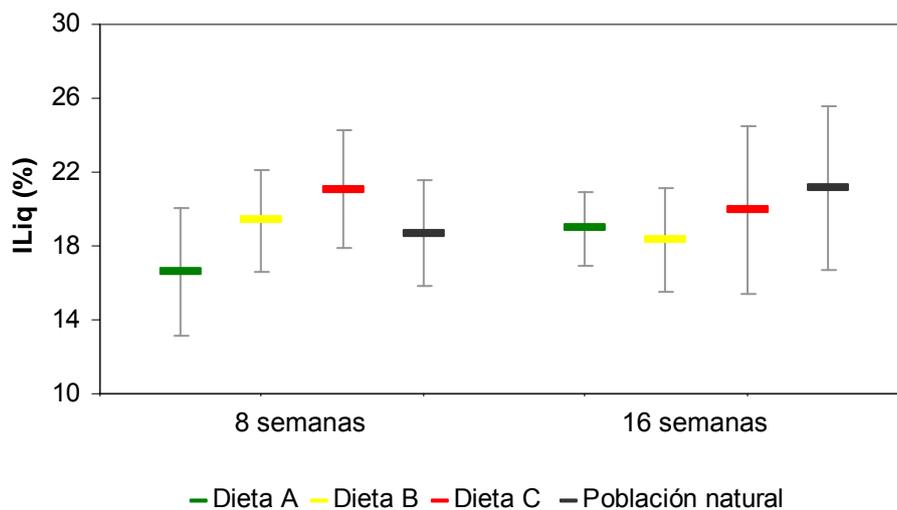
**Figura 6.18.** Índice de intestino (IInt) de los individuos experimentales de *L. albus* al cabo de 8 y 16 semanas de alimentación con diferentes dietas. Medias y desvíos estándar para cada dieta.

El ILint no presentó interacción significativa entre los factores dieta y tiempo (ANOVA  $p=0,80$ ), ni entre los diferentes tiempos (ANOVA  $p=0,73$ ). Se encontraron diferencias significativas del ILint entre las diferentes dietas (ANOVA  $p=0,023$ ), siendo menor el valor en los individuos alimentados con la dieta B que en los provenientes de la población natural ( $p < 0,05$ ) (Figura 6.19).



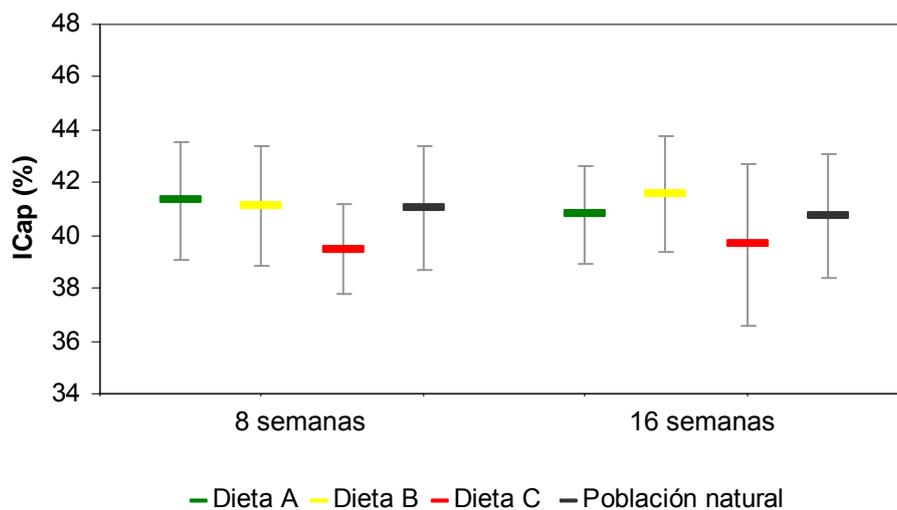
**Figura 6.19.** Índice de linterna de Aristóteles (ILint) de los individuos experimentales de *L. albus* al cabo de 8 y 16 semanas de alimentación con diferentes dietas. Medias y desvíos estándar para cada dieta.

El ILiq no presentó interacción significativa entre los factores tiempo y dieta (ANOVA  $p=0,16$ ), así como tampoco entre tiempos (ANOVA  $p=0,39$ ) o entre dietas (ANOVA  $p=0,06$ ) (Figura 6.20).



**Figura 6.20.** Índice de líquido celómico (ILiq) de los individuos experimentales de *L. albus* al cabo de 8 y 16 semanas de alimentación con diferentes dietas. Medias y desvíos estándar para cada dieta.

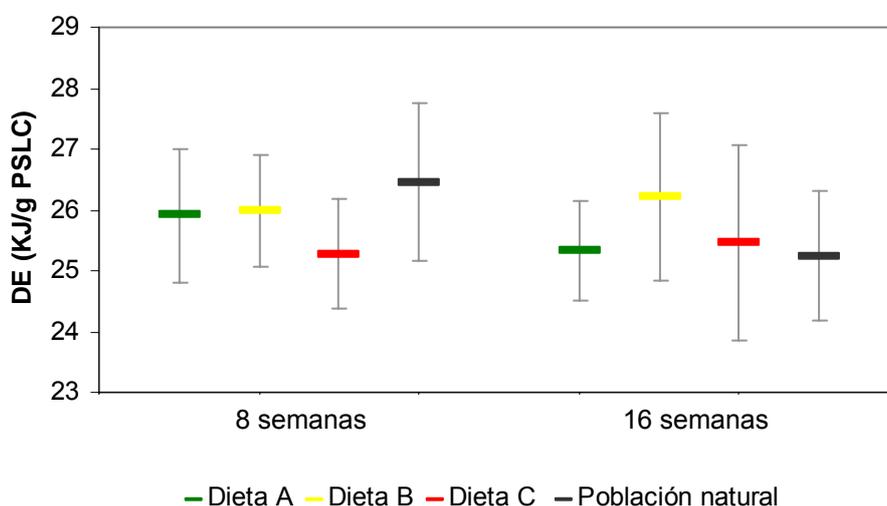
El ICap no presentó diferencias significativas entre tiempos (ANOVA  $p= 0,93$ ), ni entre dietas (ANOVA  $p= 0,074$ ), así como tampoco resultó significativa la interacción de estos factores (ANOVA  $p= 0,90$ ) (Figura 6.21).



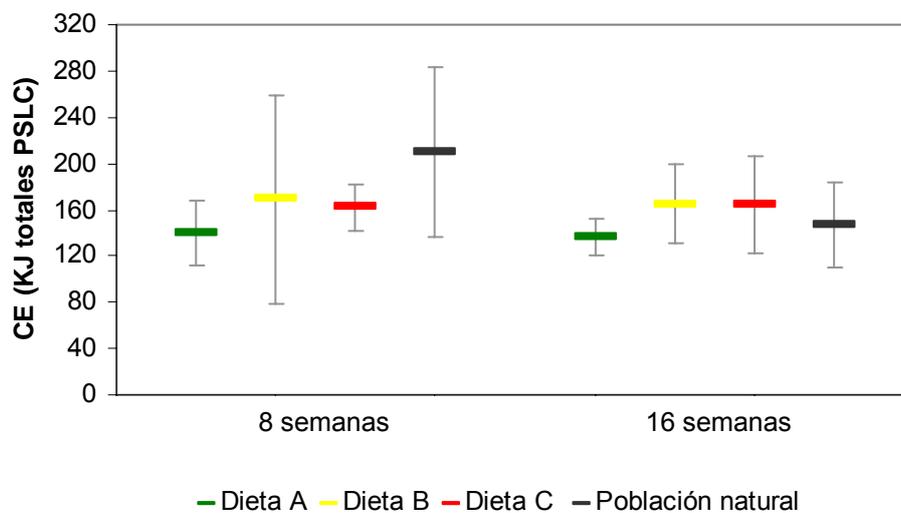
**Figura 6.21.** Índice de caparazón (ICap) de los individuos experimentales de *L. albus* al cabo de 8 y 16 semanas de alimentación con diferentes dietas. Medias y desvíos estándar para cada dieta.

### INFLUENCIA DE LAS DIFERENTES DIETAS EN LA DENSIDAD Y CONTENIDO ENERGÉTICO DE LAS GONADAS

La DE y el CE de las gónadas no presentaron diferencias significativas entre los diferentes grupos alimentados con las diferentes dietas (ANOVAs  $p= 0,22$  y  $p= 0,056$ ; respectivamente) a las 8 y 16 semanas de experimentación (ANOVAs  $p= 0,19$  y  $p= 0,17$ ; respectivamente), tampoco se encontraron interacciones significativas entre los factores tiempo y dieta (ANOVAs  $p= 0,16$ , Figura 6.22; y  $p= 0,078$ , Figura 6.23).



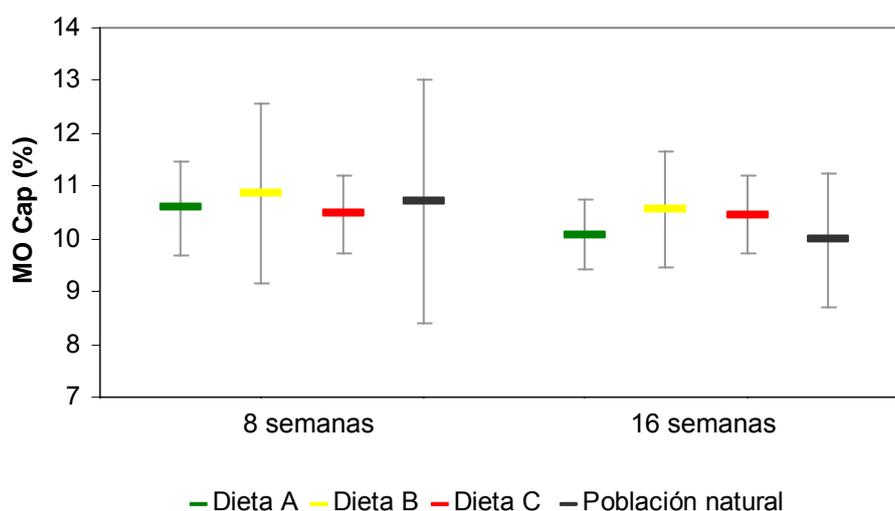
**Figura 6.22.** Densidad energética (DE) (kJ/g PSLC) de gónadas de *L. albus* al cabo de 8 y 16 semanas de alimentación con diferentes dietas. Medias y desvíos estándar para cada dieta.



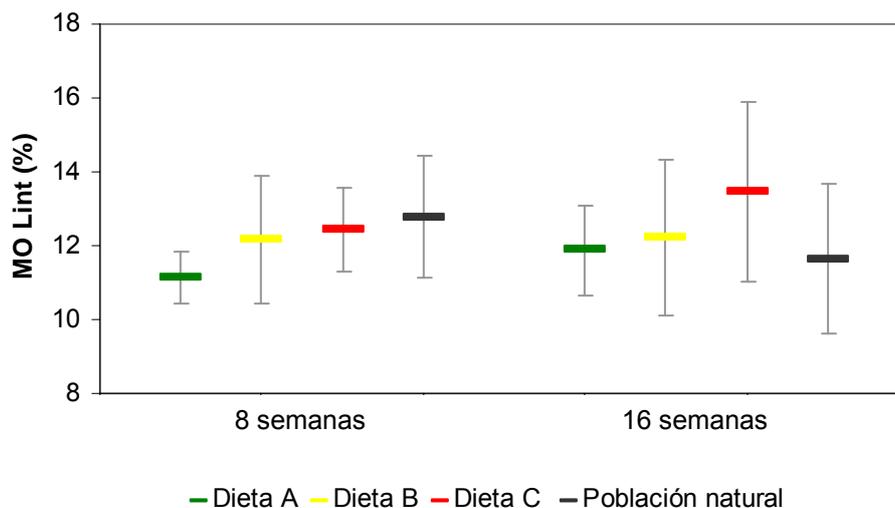
**Figura 6.23.** Contenido energético (CE) (kJ totales PSLC) de gónadas de *L. albus* al cabo de 8 y 16 semanas de alimentación con diferentes dietas. Medias y desvíos estándar para cada dieta.

### INFLUENCIA DE LAS DIFERENTES DIETAS EN LA MATERIA ORGÁNICA DEL CAPARAZÓN Y LA LINTERNA DE ARISTÓTELES.

Tanto el caparazón como la linterna de Aristóteles no presentaron diferencias significativas en el porcentaje de materia orgánica luego de la utilización de diferentes dietas (ANOVAs  $p= 0,17$  y  $p= 0,094$ ; respectivamente), como así tampoco luego de los diferentes tiempos de experimentación (ANOVAs  $p= 0,47$  y  $p= 0,66$ ; respectivamente). Las interacciones de factores para ambas variables no fueron significativas (ANOVAs  $p= 0,62$  y  $p= 0,21$ ; respectivamente) (Figuras 6.24 y 6.25; respectivamente).



**Figura 6.24.** Porcentaje de materia orgánica del caparazón de *L. albus* al cabo de 8 y 16 semanas de alimentación con diferentes dietas. Medias y desvíos estándar para cada dieta.



**Figura 6.25.** Porcentaje de materia orgánica de la linterna de Aristóteles de *L. albus* al cabo de 8 y 16 semanas de alimentación con diferentes dietas. Medias y desvíos estándar para cada dieta.

### INFLUENCIA DE LAS DIFERENTES DIETAS SOBRE LOS CAROTENOS TOTALES EN LA GONADA.

El valor medio del contenido de carotenos totales en la gónada fue  $6,08 \pm 3,64$  (mg de carotenos totales/100 g de gónada) ( $n= 38$ ). El contenido de carotenos totales no presentó interacción significativa entre los factores tiempo y dieta (ANOVA  $p= 0,31$ ), como así tampoco el factor tiempo y dietas separadamente (ANOVAs  $p= 0,06$  y  $p= 0,54$ ; respectivamente)

**INFLUENCIA DE LAS DIFERENTES DIETAS EN LA EFICIENCIA DE ASIMILACIÓN**

La eficiencia de asimilación para cada una de las dietas utilizadas se presenta en la Tabla

6.4

	<b>Eficiencia de asimilación</b>		
	(%)	DE	n
Dieta A	78,24	2,35	10
Dieta B	67,67	14,71	7
Dieta C	68,34	16,57	9

**Tabla 6.4.** Eficiencia de asimilación (%) media de los grupos experimentales alimentados con cada dieta. DE: desviación estándar, n: cantidad de acuarios experimentales.

La eficiencia de asimilación no mostró diferencias significativas entre las dietas experimentales (ANOVA  $p= 0,57$ ).

## **DISCUSION**

*Loxechinus albus* es una especie adecuada para ser mantenida en condiciones de cautividad, ya que su mortalidad es muy baja, facilitando la realización de experiencias de mejoramiento gonadal a largo plazo. También presenta una ventaja adicional al momento de realizar otro tipo de estudios experimentales dado que, por su tamaño, se puede disponer de gran cantidad de material ya sea para estudios biológicos y/o bioquímicos.

La supervivencia de *L. albus* registrada en ambos experimentos, presentó valores entre 95% y 100%, mientras que Lawrence *et al.* (1997) obtuvieron valores promedio menores para esta misma especie (aproximadamente 85%). También Meidel y Scheibling (1999) y Kennedy *et al.* (2005) han obtenido elevados valores de supervivencia en experiencias realizadas con *Strongylocentrotus droebachiensis*.

## **EXPERIMENTO 1**

La dinámica de los mercados comerciales no suele estar sincronizada con los ciclos de vida de los erizos, o bien los periodos de cosecha son demasiado breves (Vadas *et al.* 2000). Un método conocido para superar esta discordancia entre los ciclos de vida y la demanda de los mercados es mejorar artificialmente las gónadas. El mejoramiento gonadal puede ser realizado bajo condiciones de laboratorio o en el campo, ya sea utilizando dietas naturales o artificiales (Tegner 1989). Algunos trabajos sugieren que las gónadas que se encuentran recientemente evacuadas, o en la etapa previa al comienzo del crecimiento gonadal, pueden ser mejoradas artificialmente bajo condiciones de laboratorio (Klinger *et al.* 1997; Guillou *et al.* 2000; Vadas *et al.* 2000). Existe gran cantidad de información disponible acerca de experiencias donde se ha logrado mejoramiento gonadal, pudiéndose citar entre otros a Lawrence *et al.* (1997), Vadas *et al.* (2000), McBride *et al.* (2004), etc. En esta tesis se investigó la posibilidad de mejorar las gónadas de *L. albus*, trabajando con individuos que se estimó se hallaban

aproximadamente a 15 días del inicio de la evacuación (Ver capítulo 3, Fig. 3.4). Este periodo de experimentación, previo al inicio de la evacuación gamética, se planeó con el objetivo de prolongar el tiempo de cosecha, evitando la evacuación o bien, lograr una rápida recuperación gonadal, en caso que la evacuación ocurriese. No se encontraron registros bibliográficos de experiencias realizadas durante la temporada de evacuación gamética o en periodos previos a ésta.

El frecuente rechazo del alimento balanceado (Dietas B y C) durante el periodo de maduración y evacuación gamética también fue reportado para *L. albus* por Cárcamo (2004) y para *Strongylocentrotus franciscanus* por McBride *et al.* (2004), entre otros autores.

Las tasas de incremento corporal obtenidas luego de la utilización de las tres dietas (dietas A, B y C) no presentaron diferencias significativas en el experimento 1 (Tabla 6.2), resultados similares fueron reportados por otros autores para la misma especie (Lawrence *et al.* 1997; Cárcamo 2004). Además, las tasas de incremento de peso presentaron elevados valores negativos para las tres dietas ensayadas en ambos tiempos. Este resultado puede deberse a la pérdida de espinas durante el desarrollo del experimento. Si bien la mortalidad fue muy baja la pérdida de espinas podría reflejar el “desmejoramiento” de los individuos. Esto a su vez puede relacionarse con la baja tasa de ingestión de alimento registrada durante la madurez gonadal avanzada y el periodo de evacuación (Fuji 1967; Cárcamo 2004; McBride *et al.* 2004).

Como indican los resultados, ninguna de las dietas utilizadas influye sobre el crecimiento gonadal estimado mediante el incremento del IG durante el periodo analizado (Figura 6.6). Las dietas enriquecidas con  $\beta$  caroteno (Dietas B y C) generaron resultados coincidentes con las observaciones de Plank *et al.* (2002) y Shpigel *et al.* (2006), quienes sostienen que la presencia de carotenoides en la dieta no es esencial para la producción gonadal (medida por el incremento del IG) en los erizos *Lytechinus variegatus* y *Paracentrotus lividus*.

El color de las gónadas mejoró (menor valor de IC) luego de 8 semanas de experimentación en los individuos alimentados con la dieta C, en relación a aquellos alimentados con las dietas A y B o los provenientes de la población natural. Sin embargo, luego de 16 semanas de experimentación no se encontró mejoría en el color. Este resultado puede interpretarse de varias maneras:

- puede deberse a que el consumo de carotenos durante más de 8 semanas se traduce en efectos negativos sobre la coloración gonadal, ocasionando la pérdida del color deseado (Ver capítulo 7)
- alternativamente, dada la baja tasa de ingestión, propia del periodo de evacuación y desove, disminuye el consumo de alimento y por consiguiente se incorpora menor cantidad de  $\beta$  caroteno en las gónadas (Figura 6.7).

Dado que no se registraron diferencias significativas en la concentración de carotenos totales, resulta necesario discriminar el contenido de los principales carotenoides separadamente (Ver capítulo 7).

El  $II_{nt}$  (Figura 6.8) disminuye a las 8 semanas de experimentación, momento en el que los individuos presentaron marcados signos de deterioro (pérdida de espinas). Estudios realizados en *Strongylocentrotus purpuratus* y *Strongylocentrotus franciscanus* muestran que el tamaño relativo del intestino varió estacionalmente y posiblemente refleje la “condición nutricional” de los animales (Lawrence *et al.* 1965; Pearse *et al.* 1970).

El  $II_{liq}$  (Figura 6.10) fue menor en los individuos provenientes de la población natural en cambio el  $II_{nt}$  (Fig. 6.8) presentó valores levemente mayores que los grupos experimentales (posiblemente debido a una mejor condición nutricional que los individuos que se encontraban en cautividad). Esto explica la disminución del  $II_{liq}$ , dado que el volumen interno de los erizos regulares es constante (Ver capítulo 4). La situación inversa se presenta en los individuos que se encontraban en cautividad (Figuras 6.8 y 6.10). Estos datos permitirían sostener que el aumento del  $II_{liq}$  se correlaciona con una disminución del volumen de los órganos internos (Ver capítulo 4).

La pérdida de espinas durante el transcurso del experimento 1 explica la disminución del ICap (Figura 6.11) bajo condiciones de cautividad (Ver capítulo 2, “Cálculo de Índices”).

Si bien, los individuos presentaron cierto grado de deterioro debido a las condiciones de cautividad, debe considerarse también el efecto negativo que se observa durante la temporada reproductiva sobre la condición nutricional de *L. albus* (Ver capítulo 4).

La densidad energética y el contenido energético de las gónadas no presentaron diferencias significativas, tanto entre dietas como entre tiempos (Figuras 6.12 y 6.13), como así tampoco el porcentaje de materia orgánica presente en el caparazón y la linterna de Aristóteles (Figuras 6.14 y 6.15). Esto podría estar indicando que pese a los signos aparentes de deterioro (pérdida de espinas), los individuos que se mantuvieron en cautividad durante 16 semanas, asignaron igual cantidad de recursos energéticos a los distintos componentes corporales que los individuos provenientes de la población natural. Si bien no se logró prolongar la temporada de cosecha o una rápida recuperación gonadal, el experimento 1 permitió profundizar el conocimiento acerca de la asignación de recursos energéticos estudiada en el capítulo 4.

Una alternativa interesante a ensayar es la manipulación del fotoperiodo durante el periodo reproductivo con el objetivo de estimular la acumulación de nutrientes en las gónadas y detener la gametogénesis (Walker *et al.* 2001), logrando de esta forma prolongar el periodo de cosecha.

## **EXPERIMENTO 2**

En este experimento a diferencia de lo observado en el experimento 1, los individuos no rechazaron el alimento. Esta situación se ve reflejada en la tasa de incremento del peso, acrecentándose más durante las primeras 8 semanas de experimentación que durante las últimas 8 semanas (Tabla 6.3). Las tasas de incremento de diámetro y altura del caparazón no presentaron diferencias significativas con ninguna de las dietas utilizadas (Tabla 6.3). Este resultado puede explicarse si se considera que los individuos utilizados

presentaban diámetros entre 70 - 80 mm, los cuales exhiben una baja velocidad de crecimiento debido a la elevada talla (Gage *et al.* 1986) que puede asociarse a la edad avanzada (Gebauer y Moreno 1995). Si bien la talla de los individuos de *L. albus* utilizados dificulta la detección del crecimiento corporal, varios autores postulan que la utilización de alimentos balanceados con alto contenido proteico durante el periodo pre reproductivo, no influye en el crecimiento corporal (Klinger *et al.* 1997; Walker y Lesser 1998). De todas maneras es necesario tener presente que las respuestas son propias de cada especie (Guillou *et al.* 2000).

Luego de 8 semanas de experimentación los individuos alimentados con la dieta C presentaron valores más elevados de IG respecto de los que se alimentaron con las dietas A y B, sin embargo este incremento no fue significativamente mayor al IG registrado en la población natural. A las 16 semanas de experimentación se logró incrementar el valor medio de IG en los individuos alimentados con alimento balanceado (Dietas B y C; Figura 6.16). Lawrence *et al.* (1997) encontraron en la misma especie, utilizando alimento balanceado, valores de IG similares a los obtenidos en esta tesis (aproximadamente 20), mientras que los valores obtenidos en los individuos alimentados con *Macrocystis* sp. fueron más bajos (IG: 7) que los presentados en esta tesis (valores de IG entre 13 y 14) (Figura 6.16).

Durante el transcurso del experimento 2, las dietas B y C promovieron el incremento gonadal, la gametogénesis y finalmente la evacuación, registrándose antes de la liberación de gametas los mayores valores de IG en relación a los individuos que provenían de la población natural, es decir que efectivamente se logró incrementar la producción gonadal (Figura 6.16). Resultados similares fueron reportados para varias especies de erizos (Lawrence *et al.* 1997; Pearce *et al.* 2002; McBride *et al.* 2004; Shpigel *et al.* 2005). Dado que el mercado gastronómico requiere que las gónadas se encuentren en estadios premaduros, esto se puede lograr realizando la faena antes de alcanzar la maduración gonadal o bien se puede modificar algún parámetro ambiental que altere la

gametogénesis (Walter y Lesser 1998; Spirlet *et al.* 2000). Una alternativa ensayada por Walker y Lesser (1998) consistió en alimentar con alimento balanceado al erizo *Strongylocentrotus droebachiensis* manteniéndolos con fotoperiodo constante de verano, logrando que no se inicie la gametogénesis e igualmente produciendo gónadas grandes y firmes. La manipulación de la temperatura también puede modificar los valores de IG, Spirlet *et al.* (2000), han observado que al incrementar la temperatura se incrementa la producción gonadal.

Luego de 8 semanas de experimentación, los individuos que recibieron la dieta C presentaron un menor valor medio de IC con relación a los provenientes del campo. Si bien, luego de las 16 semanas no se encontraron cambios significativos en el IC, los individuos alimentados con las dietas B y C tendieron a presentar los valores más bajos de IC. Es decir, en la experiencia 2, se logró mejorar la coloración de las gónadas (Figura 6.17). Resultados similares fueron obtenidos para otras especies (McBride *et al.* 2004; Shpigel *et al.* 2006; entre otros). El mejoramiento del IC no se relaciona únicamente con el contenido de carotenos totales (Robinson *et al.* 2002), resulta necesario explorar qué carotenoides en particular intervienen en el mejoramiento del color de las gónadas de *L. albus* (Ver capítulo 7)

En algunas ocasiones la escasez de alimento puede verse reflejada en un incremento relativo del tamaño de la linterna de Aristóteles (Ebert 1996). En líneas generales, los resultados señalan que la población natural presentó mayores valores de ILint que los individuos experimentales (Figura 6.19). Esta situación puede ser el resultado de la baja disponibilidad de alimento presente en el Canal Beagle durante los meses de invierno.

En *L. albus*, al igual que en *Sphaerechinus granularis* (Guillou *et al.* 2000), durante el periodo pre-reproductivo el ICap no presenta variaciones (Figura 6.21). Este resultado podría estar indicando que se invierte energía para evitar la reabsorción del caparazón durante la gametogénesis (Levitan 1991).

Pese al incremento del tamaño gonadal mediante la utilización de las dietas B y C (dietas con elevado contenido energético) esto no se tradujo en un incremento de la DE y el CE de las gónadas. Es decir que la asignación de recursos energéticos en las gónadas de *L. albus* es independiente de la calidad del alimento ingerido (Figuras 6.22 y 6.23). Los porcentajes de MO del caparazón y la linterna de Aristóteles no se vieron modificados con las distintas dietas, así como tampoco en la población natural durante el periodo pre reproductivo (Figura 6.24 y 6.25) (Ver capítulo 4).

Los resultados anteriormente expuestos indican que durante el desarrollo del experimento 2, los individuos incrementaron el tamaño gonadal sin pérdida de energía en los componentes corporales analizados.

Considerando que, durante el desarrollo del experimento 2, los individuos se alimentaron satisfactoriamente e incrementaron el tamaño gonadal sin pérdida de energía se decidió estudiar la eficiencia de asimilación (EA) de las diferentes dietas.

La cantidad y calidad de energía disponible para el crecimiento somático y gonadal varía con la EA de la dieta (Beddingfield y McClintock 1998), reflejándose las diferencias en la composición bioquímica de los alimentos en diferencias en la EA ya que la digestibilidad puede ser diferente (Lowe 1975). Ha sido demostrado que la EA puede variar entre estadios reproductivos en el erizo *Paracentrotus lividus* (Schlosser *et al.* 2005), por lo que se plantea realizar, en el futuro, mediciones durante el ciclo reproductivo de *L. albus*.

Si bien en *L. albus* no se registraron diferencias significativas en la EA, los valores obtenidos con la dieta A (Tabla 6.4) tendieron a ser mayores que con el alimento balanceado, estos resultados pueden deberse a que *Macrocystis pyrifera* es un ítem alimentario natural de *L. albus* (Bücker *et al.* 1980) y por lo tanto su asimilación es mayor.

Si se pretende mejorar un stock de erizos se deben considerar: 1) la condición reproductiva inicial de los individuos (McBride *et al.* 2004; James *et al.* 2007), 2) el control de los parámetros ambientales (McBride *et al.* 1997; Walker y Lesser 1998; James *et al.*

2007) y 3) la calidad y cantidad de alimento suministrado (McBride *et al.* 2004; Daggett *et al.* 2005).

Finalmente se puede concluir que *L. albus*, bajo condiciones de cautividad y sujeto a dietas experimentales, mantiene las características organolépticas de las gónadas dentro de los parámetros registrados en la población natural. Esto podría indicar una estrategia conservadora de esta especie, que no modificaría la asignación de los recursos energéticos cuando se cambian experimentalmente las condiciones de alimentación suministrando diferentes dietas.

## **INTRODUCCION**

Cualquier producto que potencialmente pueda ser utilizado como alimento puede sufrir alteraciones que se traducen, generalmente, en cambios en las propiedades organolépticas. Estos cambios suelen ir acompañados de pérdidas de su valor nutritivo y en su calidad higiénico-sanitaria.

Las gónadas de los equinoideos presentan un alto contenido de lípidos, principalmente de ácidos grasos poliinsaturados (Joseph 1982). Resulta de particular importancia el conocimiento de los factores que modifican el proceso de oxidación de estos lípidos (Cheftel y Cheftel 1980) dado que pueden oxidarse fácilmente, resultando una causa importante de deterioro de las características organolépticas. El proceso de oxidación (o rancidez oxidativa) lleva a la formación de compuestos volátiles de olor desagradable que pueden alterar las gónadas. Esto último está asociado con la posibilidad de reacción de radicales libres de ácidos grasos oxidados con proteínas para formar radicales libres proteicos. De esa manera se pueden producir abundantes uniones (cross-linking) entre lípidos y proteínas y de proteínas entre sí. En cualquier caso la oxidación de lípidos produce la pérdida de ácidos grasos esenciales y los subsiguientes cambios organolépticos que motivan una disminución del valor comercial. Para prevenir la oxidación en aquellos alimentos conservados por deshidratación, por congelación o que tienen un período de conservación prolongado, es necesario recurrir a métodos antioxidantes que permitan retardar la oxidación de lípidos y proteínas, permitiendo así aumentar la calidad y vida útil de los alimentos (Buettner 1993; Decker 1998).

Como se ha discutido en el capítulo 5, los carotenoides intervienen en el crecimiento, la supervivencia y la reproducción de los equinoideos, y también poseen importantes efectos antioxidantes (Matsuno y Tsushima 2001; Borisovets *et al.* 2002). En el capítulo 6 se exponen los resultados del efecto de la adición de pigmentos carotenoides en las dietas de los erizos sobre el color y tamaño de las gónadas discutiéndose su influencia en

el posible cultivo y el mejoramiento gonadal (Plank *et al.* 2002; Pearce *et al.* 2004). En este capítulo se analizará la ventaja adicional que representan las propiedades antioxidantes del  $\beta$  caroteno incorporado a la dieta de los erizos. De esta manera se busca, no sólo modificar el color de las gónadas sino también prevenir los procesos oxidativos que ocurren en ellas.

Está probado que la capacidad antioxidante de los carotenoides aumenta la estabilidad de los tejidos u órganos que los contienen (Halliwell y Gutteridge 1989). En el caso particular de las gónadas de erizo el incremento en el contenido de carotenoides de la dieta mejoraría su color, la textura y el período de conservación, es decir mejoraría el valor comercial del producto.

No se conocen exactamente los mecanismos por los cuales los carotenoides ejercen sus efectos antioxidantes, pero posiblemente parte de esa capacidad se debe a la inactivación del oxígeno singulete, evitando así la oxidación de lípidos (McNulty *et al.* 2007).

En la mayoría de los equinodermos la equinenona es el producto más abundante de la oxidación del  $\beta$  caroteno (Tsushima y Matsuno 1990; Matsuno y Tsushima 2001) y su acumulación en las gónadas produce el color amarillo brillante (Tsushima *et al.* 1997) que es el más requerido en el mercado gastronómico.

Actualmente existe una controversia respecto al sitio de bioconversión del  $\beta$  caroteno a equinenona. Griffiths y Perrott (1976) postularon que en *Paracentrotus lividus* este proceso ocurre exclusivamente en las gónadas. Tsushima y Matsuno (1990), Tsushima *et al.* (1995), Plank *et al.* (2002) y Shpigel *et al.* (2005) propusieron que la oxidación del  $\beta$  caroteno toma lugar en el intestino. Sin embargo, Plank *et al.* (2002), observaron que existen varios caminos para metabolizar los carotenoides dietarios en *Lytechinus variegatus*, incluyendo los fagocitos nutritivos de las gónadas.

## **HIPÓTESIS**

- 1) Una oferta alimentaria suplementada con carotenos incrementará el contenido de antioxidantes y disminuirá los niveles de lipoperoxidación en las gónadas de *Loxechinus albus* en comparación con las poblaciones naturales.
- 2) El índice global de estrés oxidativo ( $A^*/AH^*$ ) se mantiene constante durante el periodo experimental en individuos alimentados con dietas ricas en carotenos.
- 3) En *L. albus*, la coloración amarilla de las gónadas se debe a la acumulación de equinenona.
- 4) En *L. albus* la bioconversión de  $\beta$  caroteno a equinenona ocurre en el intestino.

## **OBJETIVOS**

- 1) Incrementar el contenido de antioxidantes y disminuir los niveles de lipoperoxidación en las gónadas de *L. albus*, mediante la utilización de dietas artificiales suplementadas con  $\beta$ -caroteno.
- 2) Evaluar el índice de estrés oxidativo ( $A^*/AH^*$ ) en gónada e intestino.
- 3) Determinar el sitio de bioconversión del  $\beta$  caroteno a equinenona.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **DISEÑO EXPERIMENTAL**

Se efectuaron dos experimentos, el experimento 1 se realizó durante el periodo post-reproductivo y el experimento 2 durante el periodo pre-reproductivo (ver capítulo 6).

Luego de 8 y 16 semanas de alimentación con cada una de las dietas (Dieta A, B y C, ver capítulo 6) se extrajeron 5 muestras de gónadas e intestinos de los individuos sometidos a cada dieta, así como un control procedente de la población natural.

Las siguientes determinaciones se realizaron según se detalla en “MATERIALES Y METODOS” del capítulo 5:

- Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
- Determinación del contenido de radicales lipídicos
- Determinación del contenido de antioxidantes no enzimáticos liposolubles ( $\alpha$  tocoferol, equinenona y  $\beta$  caroteno)
- Determinación del índice de estrés ( $A^*/AH^-$ )
- Determinación del contenido de radical ascorbilo ( $A^*$ )
- Determinación del contenido de ascorbato ( $AH^-$ ).
- Simulación de espectros de EPR.

### **TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS**

En ambos experimentos, se realizaron ANOVAs de dos factores en la mayoría de los casos para analizar el efecto del factor tiempo de experimentación (8 y 16 semanas), y del factor dieta (Dieta A, B, C y control de la población natural) en gónadas e intestinos (ver tabla 7.1). En algunos casos se analizaron los datos mediante análisis de varianza de un factor (ver tabla 7.1). Posteriormente se realizaron comparaciones de Tukey en

aquellos factores donde se observaron diferencias significativas. Cuando las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene demostraron que no se cumplían los supuestos de normalidad y homocedacia (Sokal y Rohlf, 1995) los datos fueron transformados.

En un menor número de casos se realizaron pruebas de Kruskal-Wallis, seguido de comparaciones múltiples de Dunn cuando se observaron diferencias significativas (ver tabla 7.1) (Zar 1984; Sokal y Rohlf 1995).

El análisis estadístico de los datos fue realizado mediante la utilización de los programas Statistica 6.0 y GraphPad Instat.

			ANOVA 2 FACTORES	ANOVA 1 FACTOR	KRUSKAL- WALLIS
<b>Experimento 1</b>	<b>Gónada</b>	TBARS	X		
		Radical lipídico	X		
		β caroteno	X		
		equinenona	X		
		α tocoferol	X		
		Índice de estrés (A*/AH')	X		
		Radical ascorbilo			X
		Ascorbato	X		
	<b>Intestino</b>	TBARS	X		
		Radical lipídico	X		
		β caroteno		X	X
		equinenona		X	
		α tocoferol	X		
		Índice de estrés (A*/AH')		X	
Radical ascorbilo			X	X	
Ascorbato		X			
<b>Experimento 2</b>	<b>Gónada</b>	TBARS		X	
		Radical lipídico	X		
		β caroteno	X		
		equinenona		X	
		α tocoferol	X		
		Índice de estrés (A*/AH')	X		
		Radical ascorbilo	X		
		Ascorbato	X		
	<b>Intestino</b>	TBARS	X		
		Radical lipídico		X	
		β caroteno		X	
		equinenona		X	
		α tocoferol	X		
		Índice de estrés (A*/AH')		X	X
Radical ascorbilo			X		
Ascorbato		X			

## **RESULTADOS**

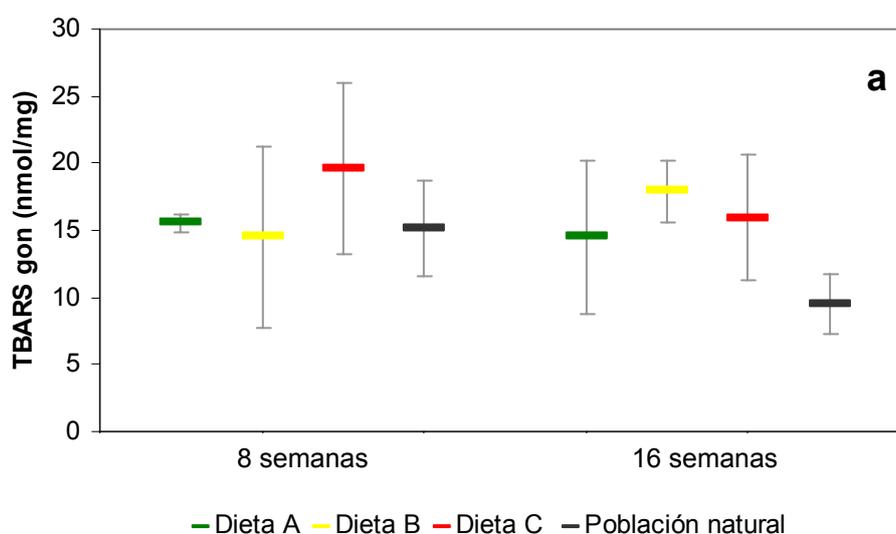
### **EXPERIMENTO 1**

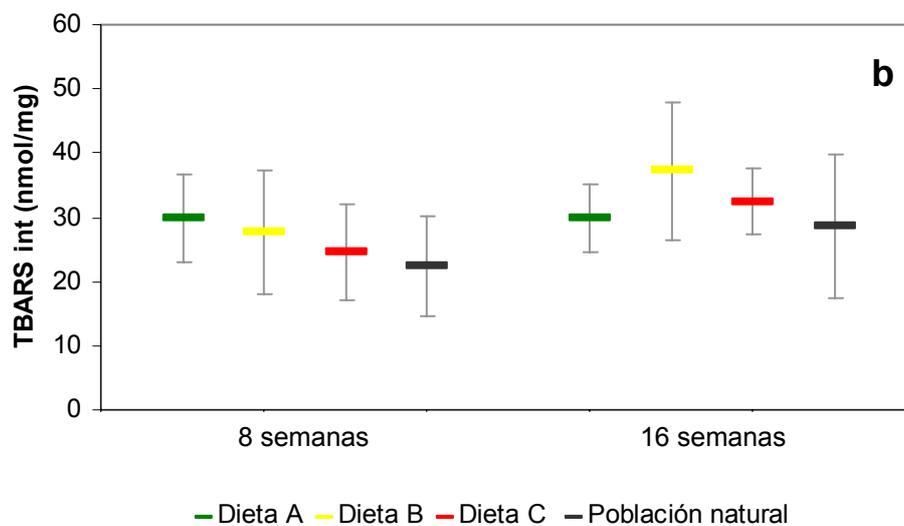
#### **INDICE DE DAÑO A LÍPIDOS**

##### **1) SUSTANCIAS REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)**

El daño oxidativo a lípidos en gónadas e intestino se estudió mediante la determinación del contenido en TBARS (nmol/mg). No se observó interacción significativa en gónadas entre los factores tiempo y dieta (ANOVA  $p= 0,95$ ), tampoco se registraron diferencias significativas dentro de cada factor (Figura 7.1a).

La concentración de TBARS (nmol/mg) en intestino no presentó interacción significativa entre factores (ANOVA  $p= 0,64$ ), sin embargo fue significativamente mayor luego de 16 semanas de experimentación (ANOVA  $p < 0,05$ ). El factor dietas no presentó diferencias significativas (ANOVA  $p= 0,33$ ) (Figura 7.1b).

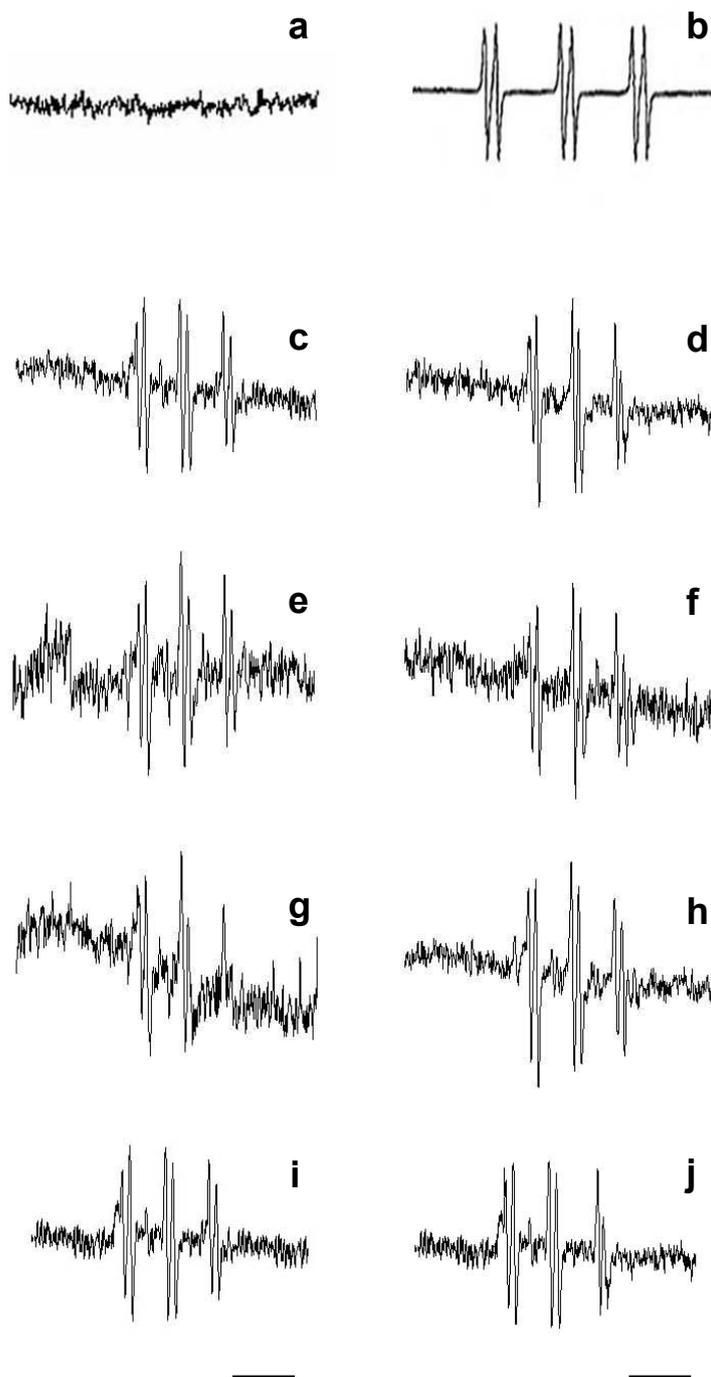


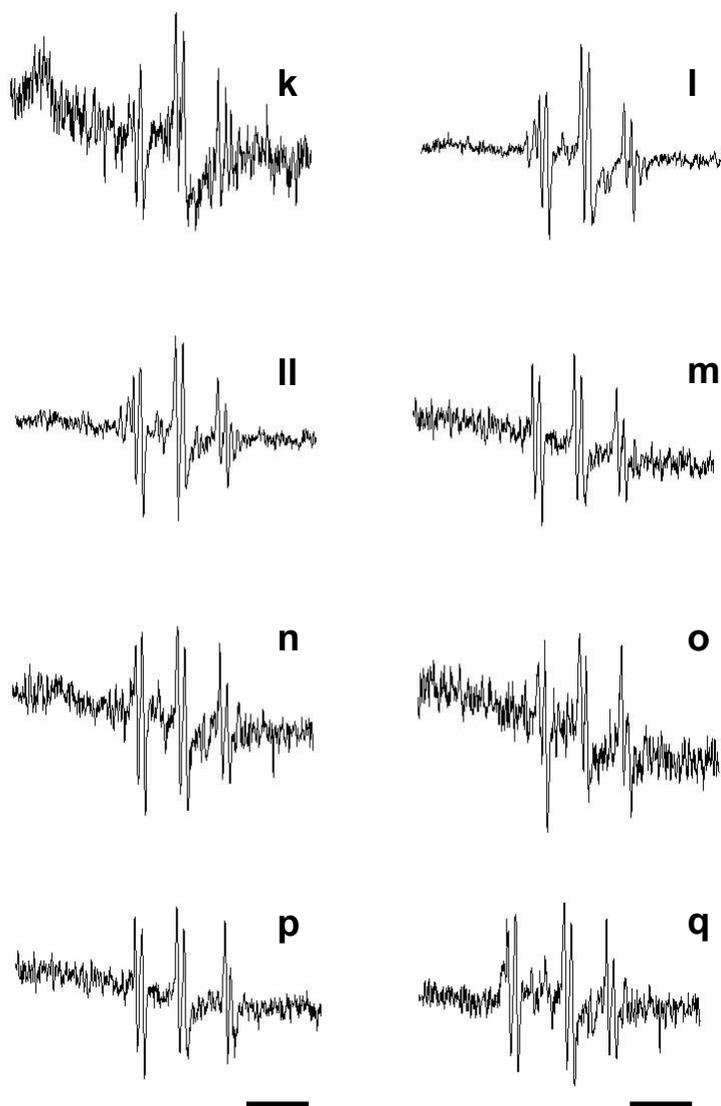


**Figura 7.1.** Concentración de TBARS (nmol/mg) en gónada (a) e intestino (b) de los individuos experimentales de *L. albus* al cabo de 8 y 16 semanas de alimentación con diferentes dietas. Medias y desvíos estándar para cada dieta.

## 2) RADICALES LIPÍDICOS

Los espectros obtenidos de los radicales lipídicos de gónadas e intestinos, presentaron las características típicas del aducto PBN-radicales lipídicos (Figura 7.2).

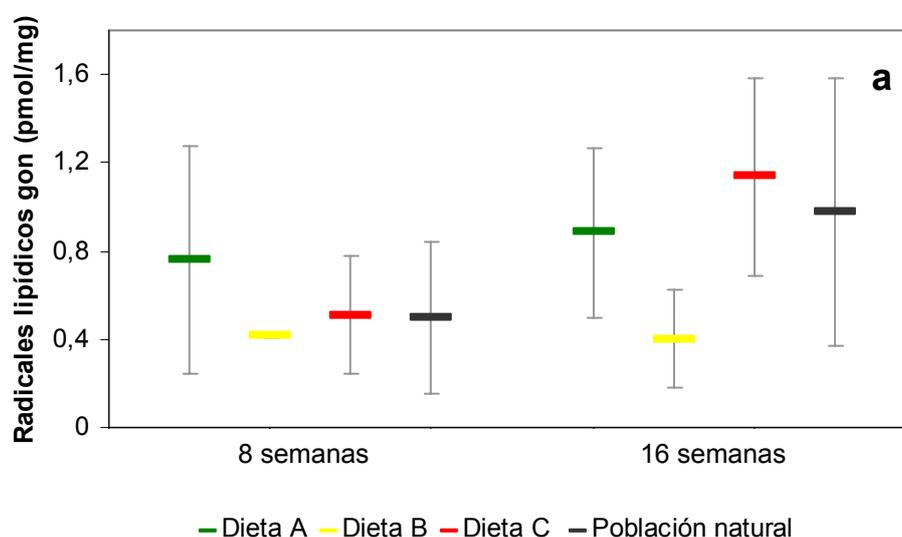


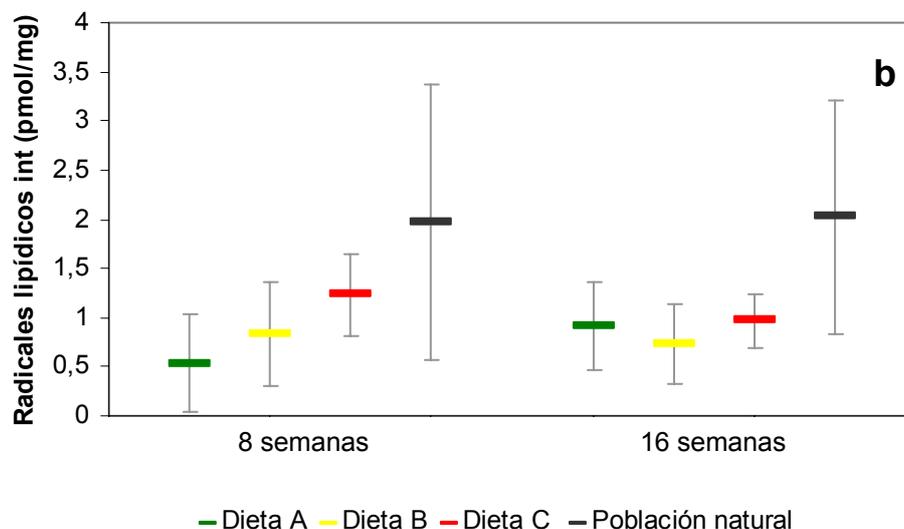


**Figura 7.2.** Detección por EPR del aducto PBN-radicales lipídicos ( $R'$ ) en gónadas e intestinos de *Loxechinus albus*. **a)** Espectro obtenido en presencia de 40 mM PBN en ausencia de muestra. **b)** Espectro simulado para el aducto PBN-radicales lipídicos empleando los parámetros espectrales:  $a_N = 15.56$  G y  $a_H = 2.79$  G (North *et al.* 1992). Espectro en presencia de homogenizado de gónadas de individuos alimentados con: **c)** dieta A durante 8 semanas, **d)** dieta A durante 16 semanas, **e)** dieta B durante 8 semanas, **f)** dieta B durante 8 semanas, **g)** dieta C durante 8 semanas, **h)** dieta C durante 16 semanas, **i)** población natural 8 semanas, **j)** población natural 16 semanas. Espectro en presencia de homogenizado de intestino de individuos alimentados con: **k)** dieta A durante 8 semanas, **l)** dieta A durante 16 semanas, **ll)** dieta B durante 8 semanas, **m)** dieta B durante 8 semanas, **n)** dieta C durante 8 semanas, **o)** dieta C durante 16 semanas, **p)** población natural 8 semanas, **q)** población natural 16 semanas. Barra:30 G.

La concentración de radicales lipídicos (pmol/mg) en las gónadas presentó una interacción no significativa entre factores tiempo y dieta (ANOVA  $p= 0,38$ ). Mientras que el factor tiempo presentó diferencias significativas, siendo mayores los niveles de radicales lipídicos luego de 16 semanas de experimentación ( $p < 0,05$ ). El factor dietas no presentó diferencias significativas ( $p= 0,19$ ) (Figura 7.3a).

La concentración de radicales lipídicos (pmol/mg) en intestino no presentó resultados significativos en la interacción de los factores dieta y tiempo (ANOVA  $p= 0,34$ ), ni entre los diferentes tiempos de experimentación ( $p= 0,42$ ). Se encontraron diferencias significativas en los niveles de radicales lipídicos entre las diferentes dietas ( $p < 0,05$ ), siendo menor el valor en los individuos alimentados con la dieta A que en los provenientes de la población natural ( $p < 0,05$ ) (Figura 7.3b).





**Figura 7.3.** Concentración de radicales lipídicos (pmol/mg) en gónadas (a) e intestinos (b) de los individuos experimentales de *L. albus* al cabo de 8 y 16 semanas de alimentación con diferentes dietas. Medias y desvíos estándar para cada dieta.

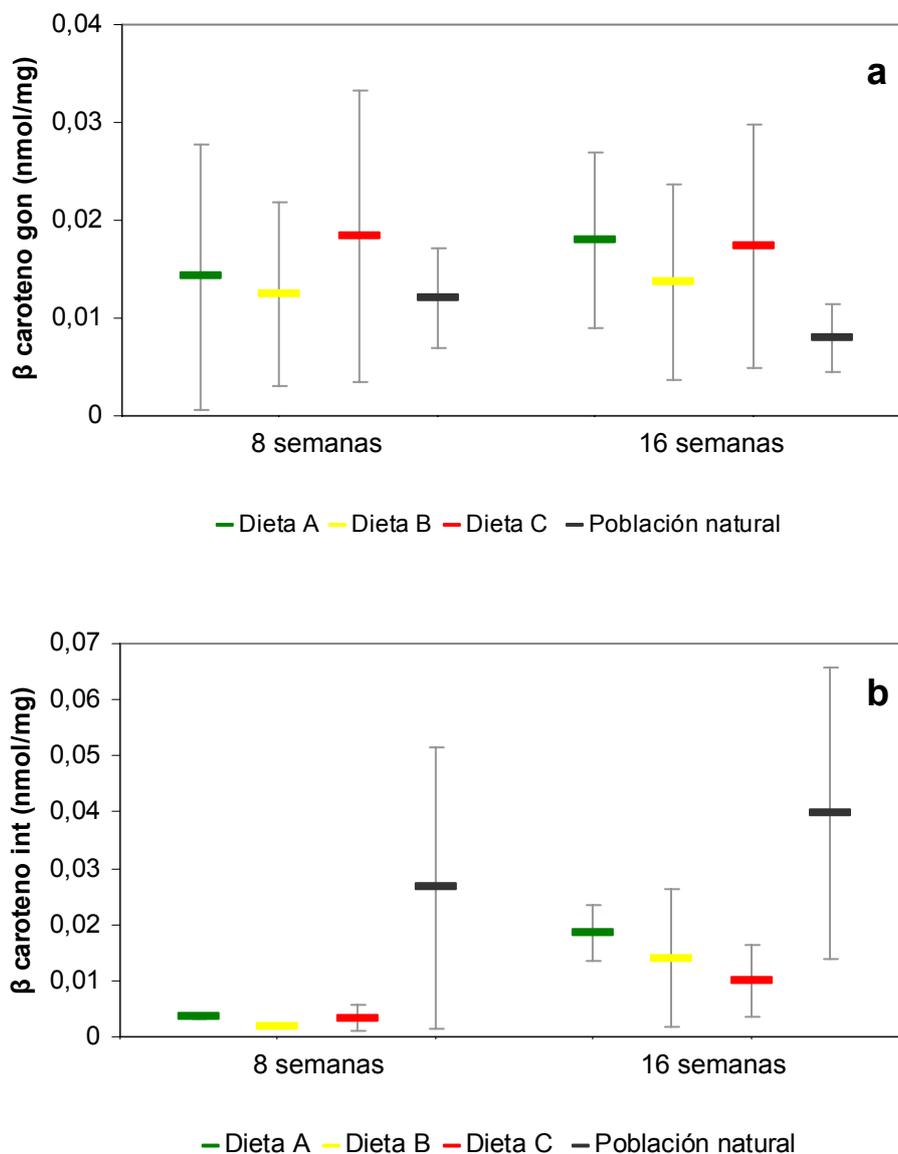
### ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS LIPOSOLUBLES

Las determinaciones, mediante HPLC, de los antioxidantes liposolubles presentes en las gónadas e intestinos mostraron un espectro típico (Ver figura 5.7, Capítulo 5).

#### β CAROTENO

La concentración de β caroteno (nmol/mg) en las gónadas no presentó interacción significativa entre los factores dieta y tiempo (ANOVA  $p= 0,61$ ), tampoco entre dietas ( $p= 0,47$ ) ni entre tiempos ( $p= 0,91$ ) (Figura 7.4a).

En el intestino no se encontraron diferencias significativas en la concentración de β caroteno (nmol/mg), tanto a las 8 como a las 16 semanas de experimentación (ANOVA  $p= 0,09$  y K-W  $p= 0,14$ ; respectivamente) (Figura 7.4b).

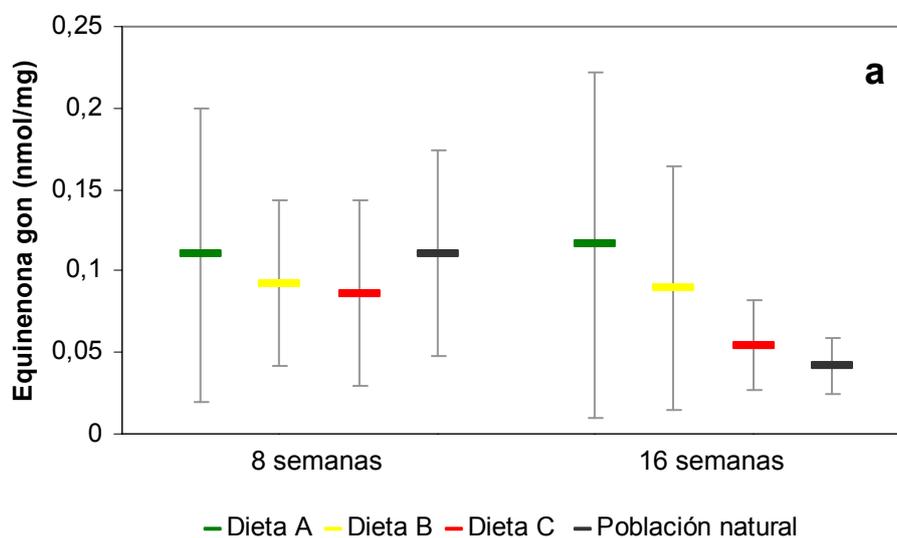


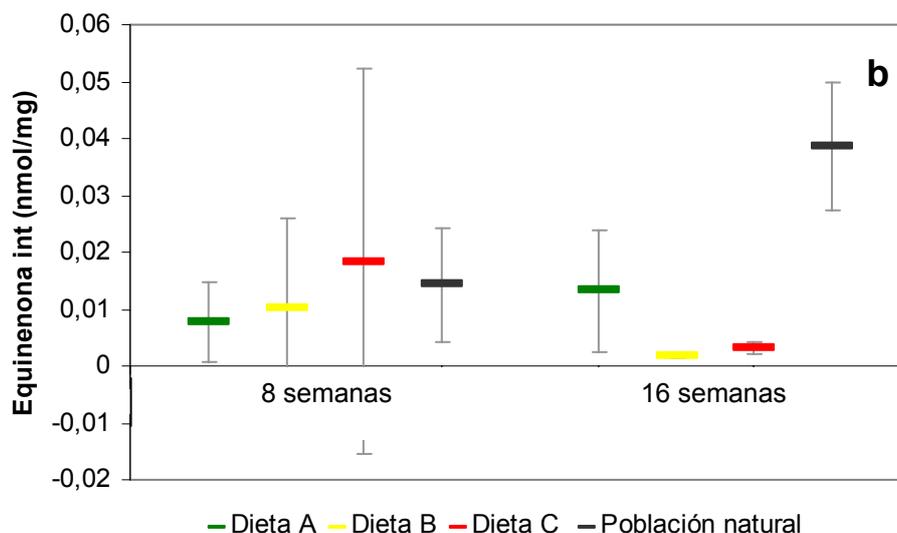
**Figura 7.4.** Concentración de  $\beta$  carotenos (nmol/mg) en gónadas **(a)** e intestinos **(b)** de los individuos experimentales de *L. albus* al cabo de 8 y 16 semanas de alimentación con diferentes dietas. Medias y desvíos estándar para cada dieta.

## EQUINENONA

La concentración de equinenona (nmol/mg) en las gónadas no presentó interacción significativa entre los factores dieta y tiempo (ANOVA  $p= 0,60$ ), tampoco entre dietas ( $p= 0,92$ ) y entre tiempos ( $p= 0,08$ ) (Figura 7.5a).

La concentración de equinenona (nmol/mg) en el intestino no varió significativamente luego de 8 semanas de experimentación (ANOVA  $p= 0,93$ ). Al finalizar el experimento se registraron diferencias significativas entre dietas (ANOVA  $p< 0,001$ ), siendo mayor el contenido de equinenona en los individuos alimentados con la dieta A o en los provenientes de la población natural ( $p< 0,05$ ). La concentración de equinenona de los individuos provenientes de la población natural presentó valores significativamente mayores al finalizar el experimento que a las 8 semanas de experimentación ( $p< 0,05$ ) (Figura 7. 5b).



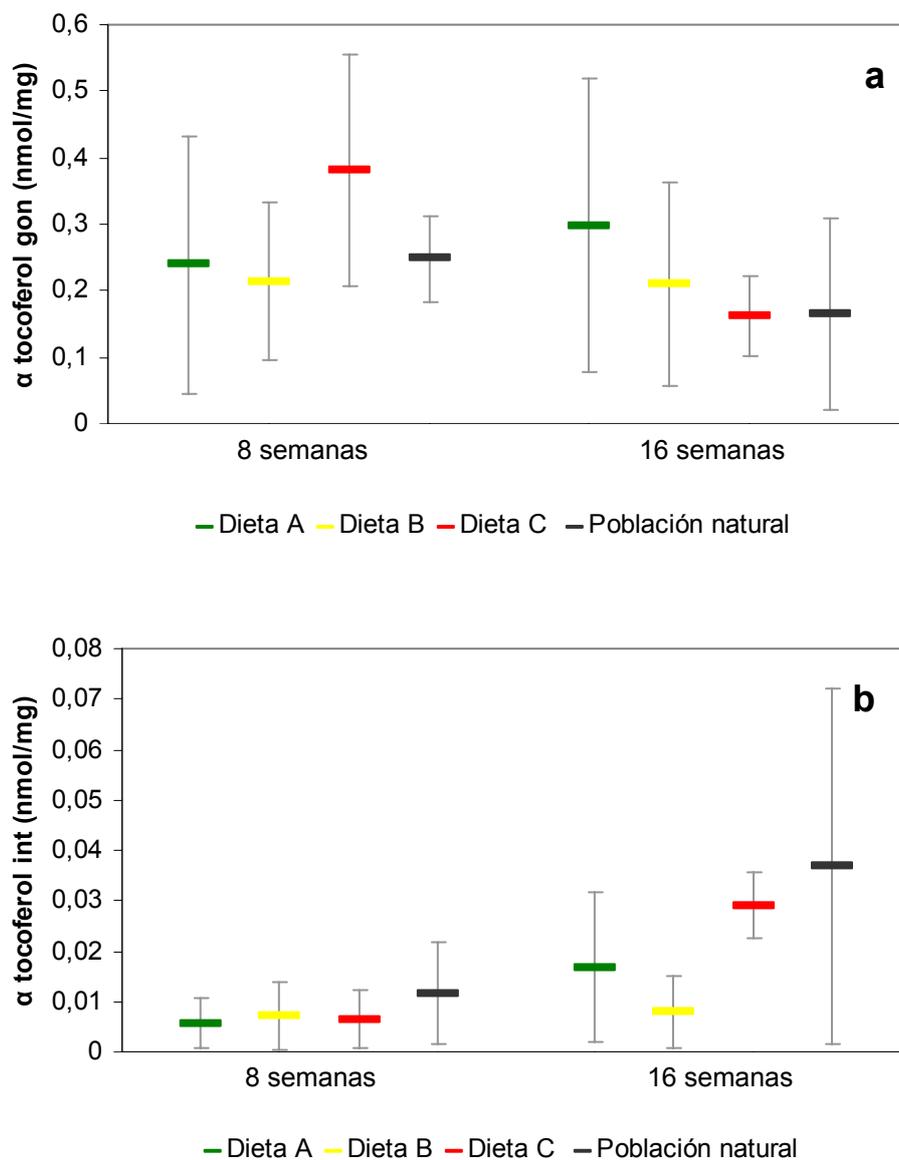


**Figura 7.5.** Concentración de equinenona (nmol/mg) en gónadas (a) e intestinos (b) de los individuos experimentales de *L. albus* al cabo de 8 y 16 semanas de alimentación con diferentes dietas. Medias y desvíos estándar para cada dieta.

### $\alpha$ TOCOFEROL

La concentración de  $\alpha$  tocoferol (nmol/mg) en las gónadas no presentó interacción significativa entre los factores dieta y tiempo (ANOVA  $p= 0,50$ ), ni tampoco dentro de cada factor ( $p > 0,05$ ) (Figura 7.6a).

La concentración de  $\alpha$  tocoferol (nmol/mg) en intestino no presentó interacción significativa entre los factores dieta y tiempo (ANOVA  $p= 0,89$ ), tampoco se registraron diferencias significativas en el factor dieta ( $p= 0,08$ ). En cambio se encontraron diferencias significativas en el factor tiempo, siendo mayor la concentración de  $\alpha$  tocoferol a las 16 semanas que a las 8 semanas ( $p < 0,05$ ) (Figura 7.6b).



**Figura 7.6.** Concentración de  $\alpha$  tocoferol (nmol/mg) en gónadas (**a**) e intestinos (**b**) de los individuos experimentales de *L. albus* al cabo de 8 y 16 semanas de alimentación con diferentes dietas. Medias y desvíos estándar para cada dieta.

**ÍNDICE DE ESTRÉS: RELACIÓN ASCORBILO/ASCÓRBICO**

En las gónadas de *L. albus* este índice no presentó diferencias significativas en los factores tiempo y dieta, ni tampoco en la interacción de ambos (ANOVA  $p= 0,82$ ) (Tabla 7.2).

La figura 7.7 muestra la señal de EPR característica para el radical ascorbilo, en gónadas de *L. albus*. La concentración de radical ascorbilo ( $\mu\text{mol/mg}$ ) no mostró diferencias significativas entre dietas, tanto a las 8 como a las 16 semanas de experimentación (K-W  $p= 0,36$  y  $p= 0,32$ ; respectivamente) (Tabla 7.2).

La concentración de ascorbato ( $\text{nmol/mg}$ ) no mostró diferencias significativas entre tiempos ni entre dietas, ni tampoco en la interacción de ambos factores (ANOVA  $p= 0,62$ ) (Tabla 7.2).

	$A^{\cdot}/AH^{\cdot}$ ( $10^{-5}$ )	$A^{\cdot}$ ( $\mu\text{mol/mg}$ )	$AH^{\cdot}$ ( $\text{nmol/mg}$ )
<b>8 semanas</b>			
<b>Dieta A</b>	0,28±0,17	0,11±0,02	48,25±22,72
<b>Dieta B</b>	1,14±1,08	0,35±0,31	38,98±30,88
<b>Dieta C</b>	0,54±0,74	0,09±0,08	31,05±34,00
<b>Población natural</b>	0,10±1,23	0,11±0,08	16,50±6,38
<b>16 semanas</b>			
<b>Dieta A</b>	0,74±0,62	0,11±0,08	25,74±22,75
<b>Dieta B</b>	3,37±6,33	0,40±0,37	18,86±13,05
<b>Dieta C</b>	0,93±1,06	0,16±0,04	29,06±16,52
<b>Población natural</b>	0,65±0,42	0,10±0,05	16,59±6,29

**Tabla 7.2.** Índice  $A^{\cdot}/AH^{\cdot}$ , concentración de  $A^{\cdot}$  ( $\mu\text{mol/mg}$  de gónada) y de  $AH^{\cdot}$  ( $\text{nmol/mg}$  de gónada) en gónadas de individuos experimentales de *L. albus* al cabo de 8 y 16 semanas de alimentación con diferentes dietas. Medias y desvíos estándar para cada dieta.

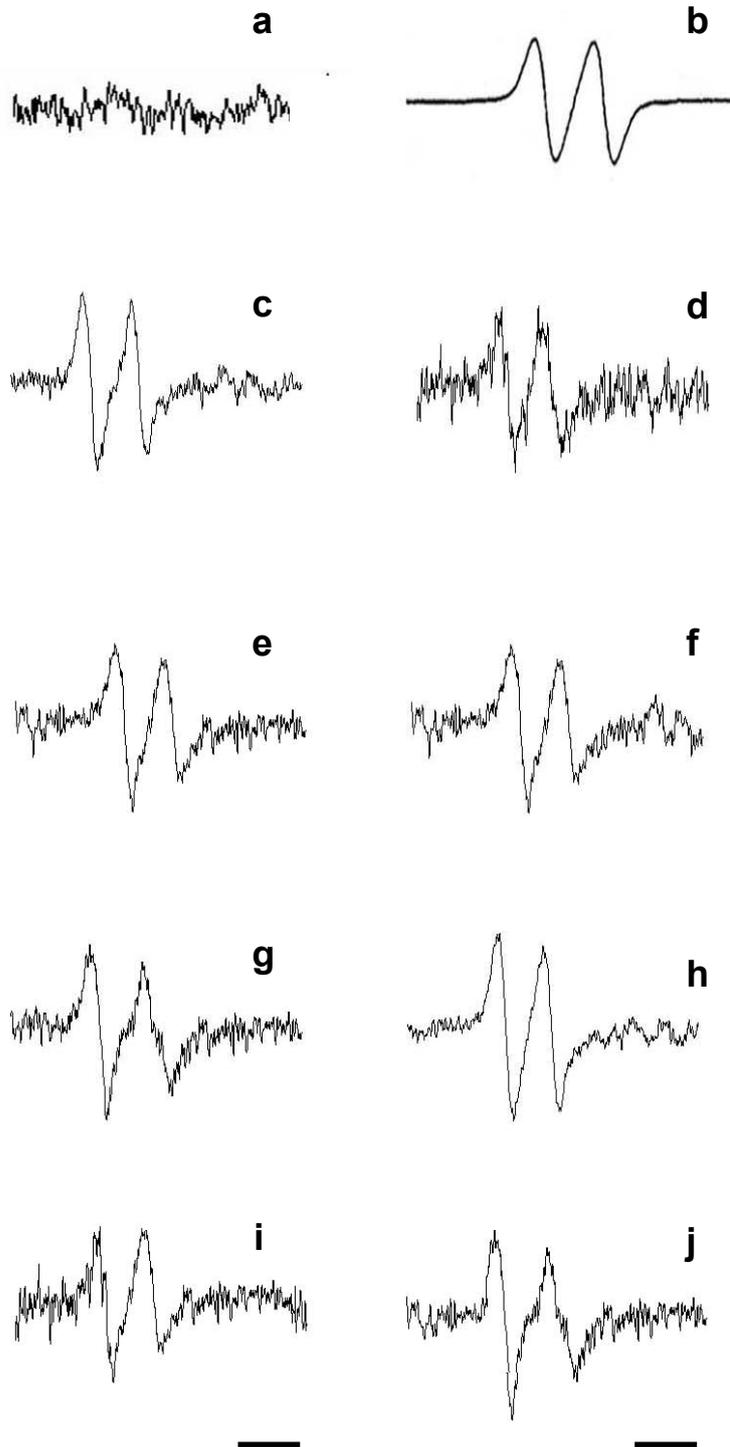
En el intestino de *L. albus* este índice no presentó diferencias significativas en los factores tiempo y dieta, ni tampoco en la interacción de ambos (ANOVA  $p= 0,63$ ) (Tabla 7.3).

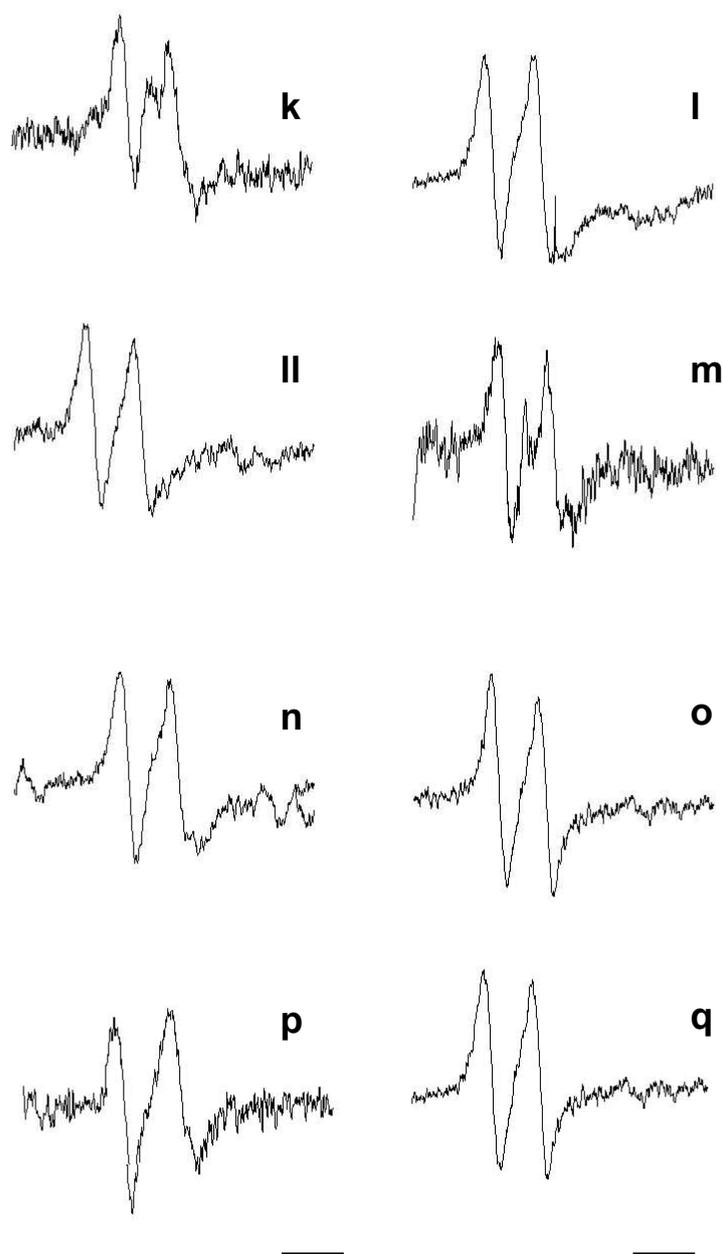
La figura 7.7 muestra la señal de EPR característica para el radical ascorbilo, para los intestinos de *L. albus*. La concentración de radical ascorbilo (pmol/mg) en el intestino no mostró diferencias significativas entre dietas, tanto a las 8 (ANOVA  $p= 0,14$ ) como a las 16 semanas de experimentación (K-W  $p= 0,17$ ) (Tabla 7.3).

La concentración de ascorbato (nmol/mg) en el intestino no mostró diferencias significativas entre tiempo y entre dietas, ni tampoco en la interacción de ambos factores (ANOVA  $p= 0,20$ ) (Tabla 7.3).

	$A^{\bullet}/AH^{\bullet}$ ( $10^{-5}$ )	$A^{\bullet}$ (pmol/mg)	$AH^{\bullet}$ (nmol/mg)
<b>8 semanas</b>			
<b>Dieta A</b>	0,91±0,92	0,23±0,13	24,85±13,00
<b>Dieta B</b>	1,37±1,06	0,25±0,02	26,28±13,75
<b>Dieta C</b>	0,88±0,40	0,20±0,09	27,72±18,40
<b>Población natural</b>	1,47±1,18	0,36±0,11	42,82±38,63
<b>16 semanas</b>			
<b>Dieta A</b>	1,98±2,41	0,40±0,14	36,97±20,15
<b>Dieta B</b>	1,06±0,21	0,15±0,12	40,10±21,82
<b>Dieta C</b>	1,39±1,00	0,79±0,53	14,08±4,61
<b>Población natural</b>	2,66±0,88	0,41±0,07	16,45±6,47

**Tabla 7.3.** Índice  $A^{\bullet}/AH^{\bullet}$ , concentración de  $A^{\bullet}$  (pmol/mg de intestino) y de  $AH^{\bullet}$  (nmol/mg de intestino) en intestino de individuos experimentales de *L. albus* al cabo de 8 y 16 semanas de alimentación con diferentes dietas. Medias y desvíos estándar para cada dieta.





**Figura 7.7.** Detección por EPR del radical ascorbilo ( $A^{\bullet}$ ) en gónadas e intestinos de *Loxechinus albus*. a) Espectro de DMSO en ausencia de muestra. b) Espectro simulado empleando los parámetros espectrales:  $g = 2.005$  y  $a_H = 1.8$  G, correspondientes al radical ascorbilo (Jurkiewicz y Buettner 1994). Espectro en presencia de homogenizado de gónadas de individuos alimentados con: **c)** dieta A durante 8 semanas, **d)** dieta A durante 16 semanas, **e)** dieta B durante 8 semanas, **f)** dieta B durante 8 semanas, **g)** dieta C durante 8 semanas, **h)** dieta C durante 16 semanas, **i)** población natural 8 semanas, **j)** población natural 16 semanas. Espectro en presencia de homogenizado de intestino de individuos alimentados con: **k)** dieta A durante 8 semanas, **l)** dieta A durante 16 semanas, **ll)** dieta B durante 8 semanas, **m)** dieta B durante 8 semanas, **n)** dieta C durante 8 semanas, **o)** dieta C durante 16 semanas, **p)** población natural 8 semanas, **q)** población natural 16 semanas. Barra: 3 G.

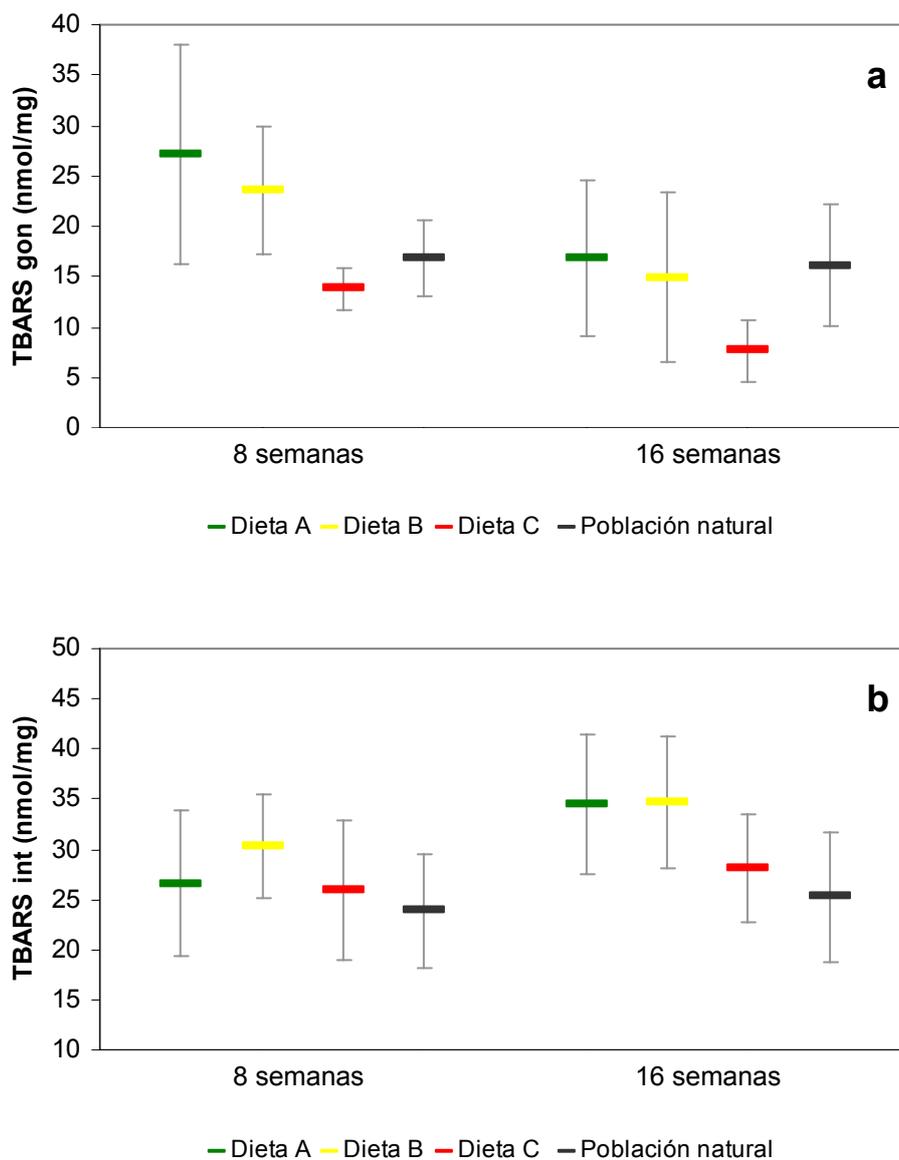
## **EXPERIMENTO 2**

### **INDICE DE DAÑO A LÍPIDOS**

#### **1) SUSTANCIAS REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)**

La concentración de TBARS (nmol/mg) en las gónadas no varió significativamente entre dietas luego de 8 semanas de experimentación (ANOVA  $p= 0,14$ ) mientras que se registraron diferencias significativas entre dietas (ANOVA  $p< 0,05$ ) luego de 16 semanas. Los individuos alimentados con la dieta C presentaron menor concentración de TBARS que aquellos alimentados con la dieta A o los provenientes de la población natural. La concentración de TBARS en los individuos alimentados con las dietas A, B y C fue significativamente menor luego de 16 semanas de experimentación que al cabo de 8 semanas (Figura 7. 8a).

La concentración de TBARS (nmol/mg) en intestino, no presentó interacción significativa entre los factores dieta y tiempo (ANOVA  $p= 0,37$ ). Se encontraron diferencias significativas en la concentración de TBARS entre los individuos alimentados con las dietas A y B (ANOVA  $p< 0,01$ ) que presentan valores más elevados que aquellos alimentados con la dieta C o los provenientes de la población natural ( $p< 0,05$ ). La concentración de TBARS fue significativamente mayor al cabo de las 16 semanas de experimentación que luego de las 8 primeras (ANOVA  $p< 0,001$ ) (Figura 7.8 b).



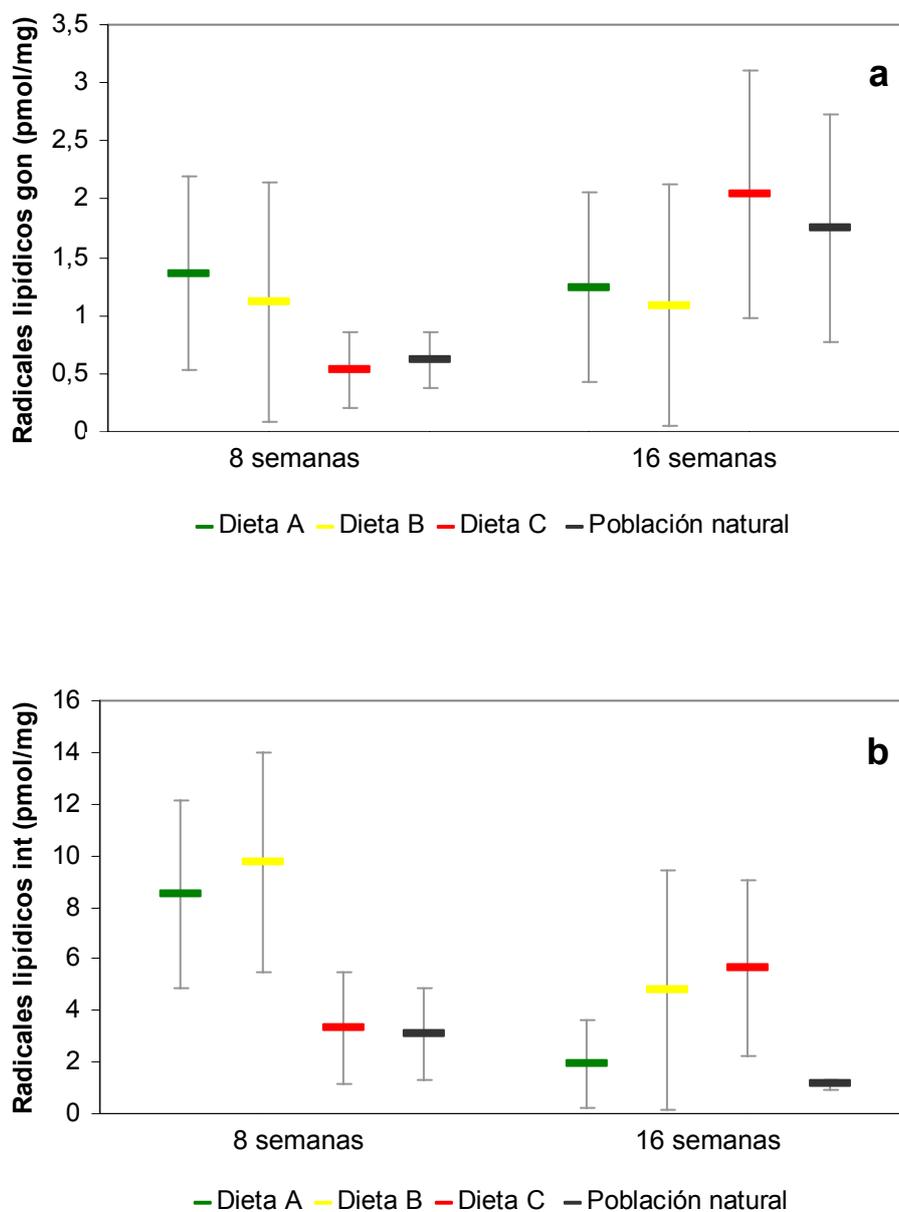
**Figura 7.8.** Concentración de TBARS (nmol/mg) en gónadas **(a)** e intestinos **(b)** de los individuos experimentales de *L. albus* al cabo de 8 y 16 semanas de alimentación con diferentes dietas. Medias y desvíos estándar para cada dieta.

## 2) RADICALES LIPÍDICOS

Los radicales lipídicos de las gónadas e intestinos presentaron espectros con características típicas del aducto PBN-radicales lipídicos y fueron similares a los observados en la figura 7.2.

La concentración de radicales lipídicos (pmol/mg) en las gónadas presentó una interacción no significativa entre los factores tiempo y dieta (ANOVA  $p= 0,46$ ), así como también en cada factor las diferencias fueron no significativas (Figura 7.9a).

Luego de 8 semanas de experimentación se encontraron diferencias significativas en la concentración de radicales lipídicos (pmol/mg) en intestino (ANOVA  $p< 0,05$ ). Los individuos alimentados con la dieta B presentaron niveles más altos que los alimentados con la dieta C y que los individuos de la población natural ( $p< 0,05$ ). Luego de 16 semanas de experimentación se encontraron diferencias significativas en los niveles de radicales lipídicos entre los individuos alimentados con la dieta C y los provenientes de la población natural, presentando estos últimos menor concentración de radicales lipídicos (ANOVA  $p< 0,05$ ). Los niveles de radicales lipídicos en los individuos alimentados con la dieta A fueron significativamente menores al finalizar el experimento que a las 8 semanas de experimentación ( $p< 0,05$ ) (Figura 7.9b).



**Figura 7.9.** Concentración de radical alquilo (pmol/mg) en gónadas **(a)** e intestinos **(b)** de los individuos experimentales de *L. albus* al cabo de 8 y 16 semanas de alimentación con diferentes dietas. Medias y desvíos estándar para cada dieta.

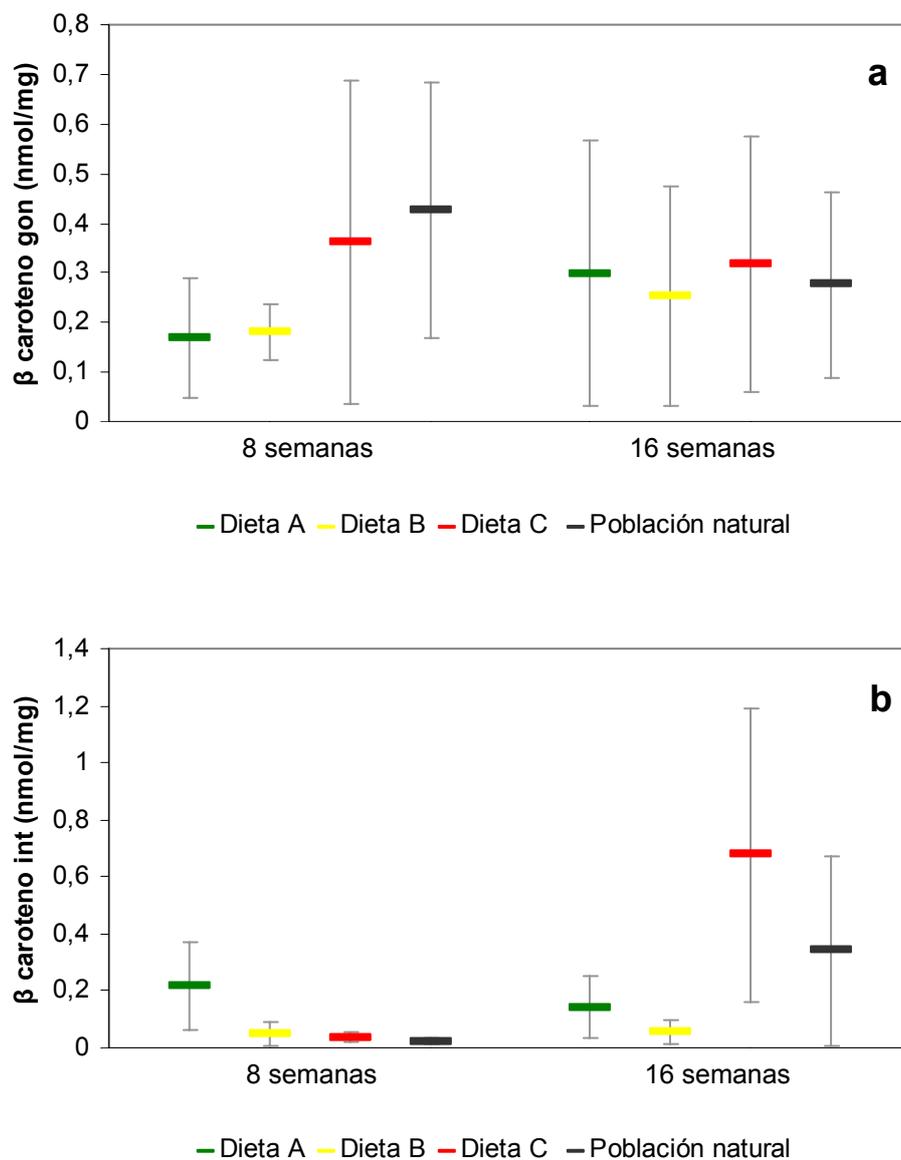
## **ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS LIPOSOLUBLES**

La figura 5.7 (capítulo 5) muestra un espectro típico de la determinación por HPLC de antioxidantes liposolubles presentes en gónadas e intestinos.

### β CAROTENO

La concentración de β caroteno (nmol/mg) en las gónadas no presentó interacción significativa entre los factores dieta y tiempo (ANOVA  $p= 0,65$ ), tampoco se registraron diferencias significativas entre dietas ( $p= 0,56$ ) ni entre tiempos ( $p= 0,98$ ) (Figura 7.10a).

En intestino se encontraron diferencias significativas en la concentración de β caroteno (nmol/mg) luego de 8 semanas de experimentación (ANOVA  $p< 0,001$ ), presentando mayor nivel de β caroteno los individuos alimentados con la dieta A. Al finalizar el experimento, se registraron diferencias significativas entre dietas (ANOVA  $p< 0,05$ ), siendo mayor la concentración de β caroteno en los individuos alimentados con la dieta C que en aquellos alimentados con la dieta B ( $p< 0,05$ ). Los β carotenos en los individuos alimentados con la dieta C y en aquellos provenientes de la población natural presentaron valores significativamente mayores a las 16 semanas que a las 8 semanas de experimentación ( $p< 0,05$ ) (Figura 7.10a).

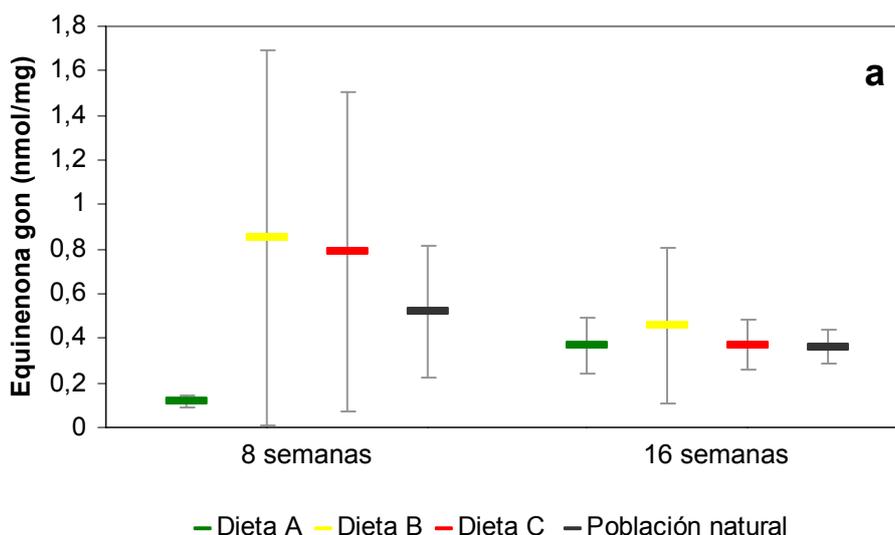


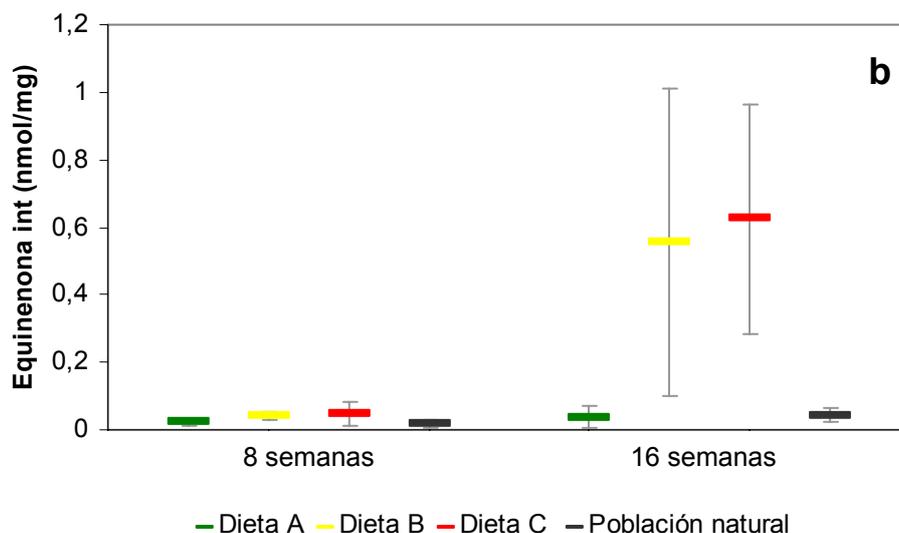
**Figura 7.10.** Concentración de β carotenos (nmol/mg) en gónadas **(a)** e intestinos **(b)** de los individuos experimentales de *L. albus* al cabo de 8 y 16 semanas de alimentación con diferentes dietas. Medias y desvíos estándar para cada dieta.

### EQUINENONA

La concentración de equinenona (nmol/mg) en gónadas no mostró diferencias entre los grupos sometidos a diferentes dietas luego de 8 y 16 semanas de experimentación (ANOVAs  $p= 0,20$  y  $p= 0,90$ ). En cambio los individuos alimentados con la dieta A durante 16 semanas presentaron mayor concentración de equinenona que luego de 8 semanas de experimentación ( $p < 0,05$ ) (Figura 7.11a).

La concentración de equinenona (nmol/mg) en intestino varió significativamente entre dietas a las 8 semanas de experimentación (ANOVA  $p < 0,05$ ), siendo mayor la concentración en los individuos alimentados con las dietas B ( $0,56 \pm 0,45$  nmol/mg) y C ( $0,62 \pm 0,34$  nmol/mg) en relación con los provenientes de la población natural ( $0,04 \pm 0,02$  nmol/mg) ( $p < 0,05$ ). Luego de 16 semanas de experimentación se registraron diferencias significativas (ANOVA  $p < 0,001$ ) entre dietas, presentando mayores niveles de equinenona los individuos alimentados con las dietas B y C que aquellos alimentados con la dieta A o los provenientes del campo (Figura 7.11b).



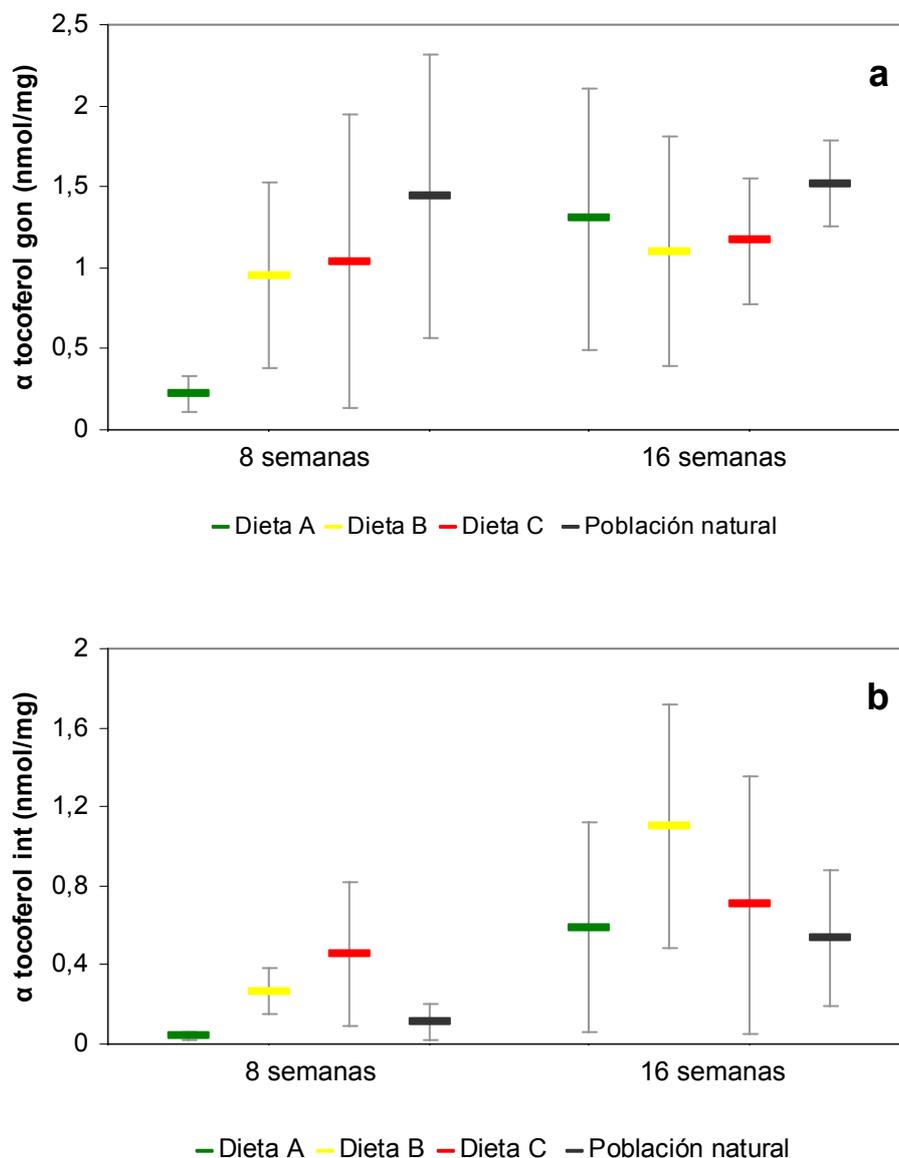


**Figura 7.11.** Concentración de equinenona (nmol/mg) en gónadas (a) e intestinos (b) de los individuos experimentales de *L. albus* al cabo de 8 y 16 semanas de alimentación con diferentes dietas. Medias y desvíos estándar para cada dieta.

### $\alpha$ TOCOFEROL

La concentración de  $\alpha$  tocoferol (nmol/mg) en las gónadas no presentó interacción significativa entre los factores dieta y tiempo (ANOVA  $p=0,38$ ), tampoco se registraron diferencias significativas dentro de los factores tiempo y dieta ( $p=0,15$  y  $p=0,23$ ; respectivamente) (Figura 7.12a).

La concentración de  $\alpha$  tocoferol (nmol/mg) en intestino no presentó interacción significativa entre los factores dieta y tiempo (ANOVA  $p=0,27$ ). Para cada una de las dietas, luego de 16 semanas de experimentación, se registraron valores más elevados de  $\alpha$  tocoferol que a las 8 semanas ( $p<0,001$ ). Se registraron diferencias significativas entre dietas, siendo mayores los niveles en los individuos alimentados con las dietas B y C que en aquellos alimentados con la dieta A ( $p<0,01$ ) (Figura 7.12b).



**Figura 7.12.** Concentración de  $\alpha$  tocoferol (nmol/mg) en gónadas (a) e intestinos (b) de los individuos experimentales de *L. albus* al cabo de 8 y 16 semanas de alimentación con diferentes dietas. Medias y desvíos estándar para cada dieta.

### ÍNDICE DE ESTRÉS: RELACIÓN ASCORBILO/ASCÓRBICO

En las gónadas de *L. albus* el índice de estrés  $A^{\cdot}/AH^{\cdot}$  no presentó diferencias significativas entre las dietas utilizadas ( $p=0,42$ ) ni en la interacción entre los factores dieta y tiempo (ANOVA  $p=0,26$ ). Los valores del índice son mayores una vez concluido el experimento que a las 8 semanas de experimentación ( $p < 0,05$ ) (Tabla 7.4).

Las señales de EPR del radical ascorbilo para las gónadas de *L. albus* fueron muy similares a las observadas en el experimento 1 (Figura 7.7). La concentración de radical ascorbilo (pmol/mg) en las gónadas no presentó diferencias significativas en la interacción de los factores dieta y tiempo (ANOVA  $p= 0,27$ ). Se encontraron diferencias significativas en el factor tiempo ( $p < 0,01$ ), siendo más elevada la concentración de radical ascorbilo al finalizar el experimento. No se registraron diferencias significativas entre los individuos alimentados con las diferentes dietas ( $p= 0,07$ ) (Tabla 7.4)

La concentración de ascorbato (nmol/mg) en las gónadas no presentó interacción significativa entre los factores dieta y tiempo (ANOVA  $p= 0,85$ ), tampoco se registraron diferencias significativas en los factores tiempo ( $p= 0,65$ ) y dietas ( $p= 0,21$ ) (Tabla 7.4).

	$A^{\bullet}/AH^{\bullet}$ ( $10^{-5}$ )	$A^{\bullet}$ (pmol/mg)	$AH^{\bullet}$ (nmol/mg)
<b>8 semanas</b>			
<b>Dieta A</b>	3,23±3,37	0,26±0,17	13,57±12,54
<b>Dieta B</b>	11,50±16,31	0,56±0,54	9,45±7,00
<b>Dieta C</b>	0,81±0,36	0,06±0,03	11,52±6,46
<b>Población natural</b>	2,48±2,47	0,17±0,08	8,45±4,75
<b>16 semanas</b>			
<b>Dieta A</b>	9,00±14,00	0,83±1,40	16,03±10,38
<b>Dieta B</b>	4,32±1,41	1,38±1,85	5,76±0,97
<b>Dieta C</b>	8,85±9,07	0,49±0,43	9,00±4,65
<b>Población natural</b>	17,70±14,00	1,27±1,50	7,36±3,94

**Tabla 7.4.** Índice  $A^{\bullet}/AH^{\bullet}$ , concentración de  $A^{\bullet}$  (pmol/mg de gónada) y de  $AH^{\bullet}$  (nmol/mg de gónada) en gónadas de individuos experimentales de *L. albus* al cabo de 8 y 16 semanas de alimentación con diferentes dietas. Medias y desvíos estándar para cada dieta.

Los valores del índice de estrés en intestino, registraron diferencias significativas entre dietas (ANOVA  $p < 0,05$ ) luego de 8 semanas de experimentación, presentando valores más elevados los individuos alimentados con la dieta B que los alimentados con la dieta C. A las 16 semanas de experimentación, también se registraron diferencias en los valores del índice de estrés entre dietas, siendo más elevado en los individuos que fueron alimentados con las dietas B y C en relación a los alimentados con la dieta A o los provenientes de la población natural (K-W  $p < 0,05$ ) (Tabla 7.5).

Las señales de EPR del radical ascorbilo, para los intestinos de *L. albus* fueron muy similares a las representadas en la figura 7.7. La concentración de radical ascorbilo en intestino mostró diferencias significativas entre dietas luego de 8 semanas de experimento (ANOVA  $p < 0,05$ ), siendo más elevada la concentración en los individuos alimentados con la dieta B que en los alimentados con C o los provenientes de la población natural. Luego de 16 semanas de experimentación no se registraron diferencias significativas en los niveles de radical ascorbilo (ANOVA  $p = 0,23$ ) (Tabla 7.5).

La concentración de ascorbato en intestino no mostró interacción significativa entre los factores dieta y tiempo (ANOVA  $p = 0,22$ ), tampoco se encontraron diferencias significativas en cada factor (Tabla 7.5).

	<b>A<sup>•</sup>/AH<sup>-</sup></b> (10 <sup>-3</sup> )	<b>A<sup>•</sup></b> (pmol/mg)	<b>AH<sup>-</sup></b> (nmol/mg)
<b>8 semanas</b>			
<b>Dieta A</b>	1,34±0,85	8,50±3,65	7,41±2,50
<b>Dieta B</b>	2,05±0,90	9,75±4,24	5,01±2,62
<b>Dieta C</b>	0,36±0,36	3,33±2,18	14,11±5,26
<b>Población natural</b>	0,84±0,88	3,06±1,78	6,70±3,21
<b>16 semanas</b>			
<b>Dieta A</b>	0,17±0,12	1,93±1,73	8,58±5,11
<b>Dieta B</b>	0,50±0,62	6,37±4,47	9,36±6,07
<b>Dieta C</b>	0,73±0,42	5,62±3,38	7,16±1,89
<b>Población natural</b>	0,14±0,03	1,12±0,19	5,75±3,64

**Tabla 7.5** Índice A<sup>•</sup>/AH<sup>-</sup>, concentración de A<sup>•</sup> (pmol/mg de intestino) y de AH<sup>-</sup> (nmol/mg de intestino) en intestinos de individuos experimentales de *L. albus* al cabo de 8 y 16 semanas de alimentación con diferentes dietas. Medias y desvíos estándar para cada dieta.

## **DISCUSION**

La suplementación de las dietas de los erizos con carotenoides les confiere varias ventajas, además del mejoramiento del color mencionado en el capítulo 6. Los carotenoides son potentes antioxidantes, estabilizando proteínas y lípidos, constituyentes principales de las gónadas y embriones (Bjerkeng *et al.* 1993).

Suplementar las dietas con  $\beta$ -carotenos permite obtener un mejor rendimiento de las gónadas sin pérdida de la calidad y protegiendo a los constituyentes lipídicos de la oxidación (Liyana-Pathirana *et al.* 2002).

## **EXPERIMENTO 1**

El experimento 1 fue realizado entre los meses de agosto y diciembre, durante la temporada reproductiva.

Las variables analizadas (TBARS, antioxidantes liposolubles e índice de estrés) en las gónadas de *Loxechinus albus* no presentaron diferencias significativas entre las dietas utilizadas durante el periodo experimental, excepto en la concentración de los radicales lipídicos (Figura 7.3a). El incremento de la concentración de radicales lipídicos hacia el final del experimento, independientemente de la dieta utilizada (Figura 7.3a) puede relacionarse con el deterioro experimentado por los individuos (Ver capítulo 6) y la consecuente oxidación de lípidos.

Las escasas variaciones cuantificadas en las gónadas de *L. albus* durante el periodo estudiado coinciden con lo observado en los capítulos 5 y 6. Estos resultados podrían deberse a la baja tasa de ingestión que presenta *L. albus* durante la época reproductiva (Cárcamo 2004). Adicionalmente, la incorporación de carotenoides a las gónadas también es baja, como resultado de la baja ingestión de alimentos (McBride *et al.* 2004).

Si bien no se ha observado efecto diferencial de las dietas sobre las gónadas, tampoco se registró deterioro de las mismas debido al cautiverio, por lo menos en lo que refiere al

metabolismo oxidativo, ya que el índice de estrés resulto invariable en el tiempo (Tabla 7.2).

En el intestino se registró un incremento en el daño oxidativo a lípidos al cabo de las 16 semanas de experimentación (Figura 7.1b). Si bien los niveles de  $\alpha$  tocoferol se incrementaron en dicho periodo, posiblemente hayan resultado insuficientes para evitar el daño a lípidos.

De manera similar a lo observado en las gónadas (tabla 7.2) el índice global de estrés no varió significativamente en el intestino (tabla 7.3) entre dietas durante el transcurso del experimento.

La concentración de  $\beta$ -caroteno fue similar en gónadas e intestinos (Figura 7.4). La proporción de las medias de la concentración de  $\beta$  caroteno/equinenona en intestino fue aproximadamente 1:1, mientras que en las gónadas la misma la proporción resulto ser de aproximadamente 1:7, sugiriendo que el  $\beta$  caroteno es convertido a equinenona en el intestino. Este resultado coincide con observaciones previas realizadas en otras especies de erizos (Tsushima y Matsuno 1990; Tsushima *et al.* 1995; Plank *et al.* 2002 y Shpigel *et al.* 2005). Como se ha mencionado anteriormente, la equinenona presenta importantes funciones biológicas en las gónadas de los erizos de mar (ver capítulo 5).

## **EXPERIMENTO 2**

Los tejidos de los invertebrados marinos son ricos en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) los cuales son fácilmente oxidables (Joseph 1982), cambiando las propiedades organolépticas y disminuyendo su valor comercial. La actividad antioxidante de los carotenoides puede presentar ventajas que hagan recomendable su incorporación en las dietas de los equinoideos con el objetivo de mejorar el valor comercial de las gónadas.

El experimento 2 fue realizado durante el periodo pre-reproductivo entre los meses de abril y agosto. Al finalizar el experimento se observó que la concentración de TBARS en las gónadas presentó diferencias significativas (Figura 7.8), siendo menor el daño a

lípidos en los individuos alimentados con la dieta C, la cual contenía la dosis más elevada de  $\beta$  caroteno (0,045 %). Este resultado pone de manifiesto el efecto antioxidante que posee el  $\beta$  caroteno (Liyana-Pathirana *et al.* 2002) en la gónadas de *L. albus*. Sin embargo, cuando se evaluó el daño a lípidos a partir de los radicales lipídicos (este método resulta más sensible que el de TBARS), no se observaron diferencias significativas (Figura 7.9). Esta discordancia entre los resultados puede explicarse por la sensibilidad de uno y otro método y debido a que la determinación de TBARS suele sobrestimar el daño a lípidos

Si bien no se han encontrado diferencias significativas en la concentración de los antioxidantes liposolubles de las gónadas (Figuras 7.10, 7.11 y 7.12), los individuos alimentados con la dieta C presentaron menor nivel de daño en los lípidos (TBARS). La disminución del daño a lípidos sin un incremento en los antioxidantes liposolubles puede ser explicada si se considera que la dosis de carotenoides utilizada actúa sinérgicamente con otra sustancia (por ejemplo glutatión, ascórbico,  $\alpha$  tocoferol, enzimas antioxidantes, etc.) incrementando la respuesta antioxidante (Hermes Lima 2004) o simplemente que sean otros los compuestos responsables de mantener el equilibrio redox.

El índice de estrés y la concentración de radical ascorbilo en las gónadas (Tabla 7.4) fueron mayores a las 16 semanas (mes de agosto) que a las 8 semanas (mes de junio) tanto para los individuos alimentados con las dietas A, B y C como para los provenientes de la población natural. Estos resultados son opuestos a los encontrados en los capítulos 3 y 5 dado que en agosto la mayoría de los individuos se encontraron maduros sexualmente (Ver figuras 3.4 y 3.6), presentando un valor mínimo en el índice de estrés en relación a los estadios premaduros (Ver tabla 5.2). Sin embargo, luego de realizar observaciones histológicas preliminares de las gónadas de los individuos experimentales, se observó que la mayoría de los individuos se encontraban en estadios premaduros en el mes de agosto, es decir que, la condición reproductiva que presentaron los individuos

permite comprender el elevado valor del índice de estrés y la elevada concentración del radical ascorbilo (Ver capítulo 5)

La evaluación del daño a lípidos en intestino generó diferentes resultados de acuerdo al método utilizado para cuantificarlos. La concentración de TBARS fue mayor al finalizar el experimento y los individuos alimentados con las dietas A y B presentaron mayor daño que los alimentados con la dieta C o los provenientes de la población natural (Figura 7.8b). En este caso, la dosis de  $\beta$  caroteno presente en la dieta C muestra efectos antioxidantes, disminuyendo el daño oxidativo a lípidos, al igual que lo observado en las gónadas (Figura 7.8a). En cambio, la concentración del radical alquilo luego de 16 semanas de experimentación fue mayor en aquellos individuos alimentados con la dieta C que en los provenientes de la población natural (Figura 7.9b). Dada la alta sensibilidad del método de cuantificación de los radicales lipídicos, se podría concluir entonces que la dosis de  $\beta$  caroteno que contiene la dieta C (0,045 %), presenta efecto prooxidante en el intestino luego de administrarla durante 16 semanas. Durante mucho tiempo se ha considerado al  $\beta$  caroteno como una sustancia con efectos antioxidantes, sin embargo, varios estudios clínicos de laboratorio proveen evidencia sugiriendo que su administración en suplementos alimentarios puede resultar inefectiva e incluso tener efectos adversos. Estos son atribuidos a la capacidad del  $\beta$  caroteno para actuar como prooxidante bajo ciertas condiciones (Zhang y Omaye 2000). Burton e Ingold (1984) encontraron que tanto la presión de oxígeno como la concentración de  $\beta$  caroteno pueden influir sobre el efecto que presentará el mismo. Los efectos prooxidantes del  $\beta$  caroteno pueden inducir estrés oxidativo, incrementando la producción de especies reactivas del oxígeno o destruyendo los antioxidantes presentes (Palozza 1998). Una discusión más amplia del tema puede encontrarse en el capítulo 5.

La concentración de antioxidantes liposolubles en el intestino, luego de 16 semanas de experimentación, fue más elevada en los individuos alimentados con las dietas B y C (Figuras 7.10b, 7.11b y 7.12b) que en los alimentados con la dieta A o el control de la

población natural. Estos resultados indican que antioxidantes liposolubles se están acumulando en el intestino. La posibilidad que los antioxidantes acumulados en el intestino de los individuos alimentados con las dietas B Y C funcionen como prooxidantes explica el incremento del índice de estrés al finalizar el experimento (Tabla 7.5).

La comparación de los resultados correspondientes a las gónadas y a los intestinos de ambos experimentos, muestra que la concentración de antioxidantes liposolubles es mayor en las gónadas que en intestinos (Figuras 7.4, 7.5, 7.6 7.10, 7.11 y 7.12). En cambio el daño a lípidos presenta un patrón opuesto (Figuras 7.1, 7.3, 7.8 y 7.9). Es decir que las gónadas se encuentran más protegidas que los intestinos. De esta manera se garantiza el correcto desarrollo de sus funciones reproductivas (ver capítulo 5) y esta protección puede deberse a sistemas antioxidantes de naturaleza tanto enzimática como no enzimática (Malanga et al. 2007).

Varios autores (Shina *et al.* 1978; Goodwin 1984; Matsuno y Tsushima 2001) han relacionado la coloración amarilla brillante de las gónadas con un alto contenido de equinenona. Por el contrario no se encontró esta relación en *L. albus* (Figuras 6.7, 6.10, 7.5a y 7.11a). Para lograr un resultado más concluyente será necesario incrementar el número de determinaciones de equinenona en las gónadas de *L. albus*, como así también investigar qué otros pigmentos podrían estar interviniendo en su coloración.

De acuerdo a los resultados obtenidos la condición óptima para el mejoramiento gonadal es mantener los erizos durante 8 semanas utilizando la dieta C, durante el periodo pre reproductivo. En estas condiciones las gónadas presentaron menor daño a lípidos, mayor concentración de antioxidantes liposolubles, menor concentración de radical ascorbilo y menor índice global de estrés. Adicionalmente, si se consideran los resultados generados en el capítulo 6, el menor índice de color, es decir, la mejor coloración gonadal, se logra también con la dieta C a las 8 semanas de experimentación.

Dado que no existen antecedentes en la utilización de dietas suplementadas con  $\beta$  caroteno con el fin de disminuir el daño oxidativo en erizos, los resultados expuestos en

este capítulo resultan una interesante área a ser explorada con el fin de lograr el mejoramiento de la calidad de las gónadas de equinoideos como producto comercial.

Si se considera que la mezcla de carotenoides o la asociación con otros antioxidantes (por ejemplo el  $\alpha$  tocoferol) puede incrementar la protección contra la lipoperoxidación, resulta necesario explorar sus efectos conjuntos sobre el mejoramiento gonadal. Además del sinergismo que se puede alcanzar utilizando una mezcla de  $\beta$  caroteno, ácido ascórbico y  $\alpha$  tocoferol, sus reactividades están relacionadas con la presión de oxígeno y la concentración de los mismos (Zhang y Omaye 2000; Yeum *et al.* 2003), por lo tanto se plantea un interrogante interesante al trabajar bajo condiciones de cultivo y mejoramiento masivo (Siikavuopio *et al.* 2007).

## **CONCLUSIONES**

La población estudiada presentó una proporción de sexos de 1:1. El ciclo reproductivo anual de ambos sexos mostró sincronización. La madurez gonadal se alcanzó entre julio y agosto mientras la época de evacuación y desove se extendió entre septiembre y noviembre. La ubicación temporal de la maduración y expulsión de gametas fue similar a la descrita por otros autores en áreas geográficas cercanas.

El inicio de la gametogénesis coincidió con el acortamiento de la longitud del día, mientras que la evacuación y el desove coincidieron con el incremento de las horas de luz. La condición reproductiva no estuvo asociada a variaciones en la temperatura del agua de mar.

La DE (densidad energética) de las gónadas presentó un valor mínimo en los estadios Premaduro II y Maduro (invierno). Esto se relacionó a la escasez de fagocitos nutritivos y a la abundancia de gametas. En los estadios Post-evacuado e Inmaduro (primavera - verano) se registraron los valores máximos de DE en coincidencia con la reducción del número de gametas y la mayor abundancia de los fagocitos nutritivos.

El esfuerzo reproductivo, tanto en términos de masa corporal como en términos energéticos, fue mayor para las hembras que para los machos.

La mayor proporción de las reservas energéticas se almacena en la gónada, mientras el intestino se encuentra en segundo lugar de importancia. Durante el periodo de máximo crecimiento gonadal no se registró una disminución en la asignación de recursos energéticos hacia otros órganos o estructuras.

Los índices y contenidos porcentuales de materia orgánica del caparazón y la linterna de *Aristóteles* no presentaron variaciones significativas a lo largo del año, por lo que se les asigna una reducida importancia en el almacenamiento de nutrientes.

Los antioxidantes liposolubles ( $\beta$  caroteno, equinenona y  $\alpha$  tocoferol) mostraron un perfil similar a lo largo del ciclo reproductivo de *L. albus*, presentando niveles más elevados en el comienzo de la gametogénesis y disminuyendo a medida que ésta avanza, para aumentar nuevamente en los estadios Post-evacuado e Inmaduro. El antioxidante hidrosoluble ascorbato incrementa su nivel durante el transcurso de la gametogénesis, presentando una correlación negativa con los niveles de antioxidantes liposolubles. Los antioxidantes que han sido almacenados desde diciembre hasta marzo serían utilizados cuando se inicia la gametogénesis, por lo que *L. albus* alcanzaría la madurez gonadal con un bajo nivel de antioxidantes.

El daño oxidativo a lípidos solamente fue registrado mediante la determinación de TBARS, siendo máximo durante la maduración gonadal.

La relación  $A^*/AH^-$  varió a lo largo del ciclo reproductivo de *L. albus*, presentando un valor mínimo en el estadio Maduro. Esto sugiere que la maduración de gametas estaría asociada a una disminución global del estrés oxidativo en las gónadas, probablemente debido a un incremento en la capacidad de defensa antioxidante celular total durante el periodo final de la gametogénesis.

*L. albus* es una especie muy adecuada para la realización de experiencias de laboratorio, dado que la mortalidad en cautividad es muy baja, y su gran tamaño permite realizar determinaciones que requieran gran cantidad de material biológico.

Para estudiar el efecto de la dieta sobre el crecimiento corporal resulta necesario plantear experimentos con individuos de tallas menores a las utilizadas en esta tesis.

Si bien a partir de la experiencia realizada durante el periodo post-reproductivo (experimento 1) no se logró prolongar la temporada de cosecha ni una rápida recuperación gonadal, se profundizó el conocimiento acerca de la asignación de recursos energéticos en los equinoideos.

Al finalizar el experimento 1 (periodo post - reproductivo) se encontró que los individuos presentaban un grado de deterioro adicional al propio del periodo de evacuación dado que los índices intestinal, de linterna de Aristóteles y de caparazón disminuyeron con respecto a los de la población natural.

La experiencia realizada durante el periodo pre-reproductivo (experimento 2) permitió incrementar el tamaño de las gónadas y mejorar el color de las mismas.

La DE y el CE de las gónadas fueron independientes de la calidad del alimento ingerido y del periodo en el cual se realizaron los experimentos.

La eficiencia de asimilación de los erizos alimentados con las diferentes dietas suministradas fue similar.

Bajo las condiciones de cautividad utilizadas y sujeto a las dietas experimentales suministradas, *L. albus* mantiene las características organolépticas de las gónadas dentro de los parámetros registrados en la población natural.

Las escasas variaciones registradas en los antioxidantes liposolubles e índice de estrés de las gónadas e intestinos procedentes del experimento 1 (periodo post reproductivo), podrían deberse a la baja tasa de ingestión que presenta esta especie durante el periodo de evacuación y desove.

El incremento de la concentración de radicales lipídicos registrado en las gónadas hacia el final del experimento 1, puede relacionarse con el deterioro experimentado por los individuos y la consecuente oxidación de lípidos. Pese al incremento en la oxidación de lípidos, no se registró aumento en los valores de índice de estrés  $A^*/AH$ .

La bioconversión del  $\beta$  caroteno a equinenona ocurre en el intestino.

La discordancia en los niveles de daño a lípidos determinados mediante TBARS y radicales lipídicos se debe a la diferente sensibilidad de ambos métodos y a que el TBA es producto de varias vías metabólicas.

La concentración de equinenona presente en las gónadas no parece estar asociada a una disminución del índice de color de las mismas.

La administración de dietas suplementadas con  $\beta$  caroteno, en diferentes periodos reproductivos, no incrementó el contenido de  $\beta$  caroteno y equinenona en las gónadas.

El incremento del índice de estrés  $A^*/AH$  y de la concentración de ascorbilo registrado en las gónadas al finalizar el experimento 2 estaría relacionado con la condición reproductiva que presentaron los individuos, dado que la mayoría de ellos se encontraban en estadios premaduros.

La acumulación de antioxidantes liposolubles en el intestino podría presentar efectos prooxidantes.

Tanto en el periodo pre como en el post reproductivo, las gónadas presentaron mayor concentración de antioxidantes liposolubles que los intestinos y consecuentemente el nivel de daño oxidativo a lípidos fue menor, concluyéndose que las gónadas se encuentran más protegidas ante los procesos oxidativos que el intestino.

Las condiciones óptimas para la realización de experiencias de mejoramiento gonadal en *L. albus* son 8 semanas utilizando la dieta C (alta dosis de carotenos), preferentemente durante el periodo pre - reproductivo.

**REFERENCIAS**

Abele D, Burlando B, Viarengo A, Pörtner H O. (1998). Exposure to elevated temperatures and hydrogen peroxide elicits oxidative stress and antioxidant response in the Antarctic intertidal limpet *Nacella concinna*. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 120: 425 - 435.

Abele D, Puntarulo S. (2004). Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 138: 405 - 415.

Abele-Oeschger D, Oeschger R, Theede H. (1994). Biochemical adaptations of *Nereis diversicolor* (Polychaeta) to temporarily increased hydrogen peroxide levels in intertidal sandflats. *Marine Ecology Progress Series* 106: 101 - 110.

Aebi H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105: 121 - 126.

Anderson M E, Meister A. (1989). *Analytical Biochemistry* 183: 16 - 20.

Ansell A D. (1974). Seasonal Changes in Biochemical Composition of the Bivalve *Abra alba* from the Clyde Sea Area. *Marine Biology* 25: 13-20.

Antezana T. (1999). Hydrographic features of Magellan and Fuegian inland passages and adjacent Subantarctic waters. En: *Magellan Antarctic: Ecosystems that drifted apart*. Arntz W E, Ríos C (eds). *Scientia Marina* 63 (Suppl.1): 23 - 34.

Arana P, Palma S, Bay-Schmith E, Monardes M A, Gálvez M. (1996). Aspectos biológicos y pesqueros del erizo (*Loxechinus albus*) en la región de Magallanes. *Estudios Docentes*. Universidad Católica Valparaíso, Valparaíso 23: 83 - 140.

Arrau L. (1958). Desarrollo del erizo comestible de Chile *Loxechinus albus* Molina. *Revista de Biología Marina (Valparaíso)* 7: 39 - 62.

Bailey D M, Davies B, Young I S, Jackson M J, Davison J W, Isaacson R, Richardson R S. (2003). EPR spectroscopic detection of free radical outflow from an isolated muscle bed in exercising humans. *Journal of Applied Physiology* 94: 1714 - 1718.

Balestrini C, Manzella G, Lovrich G A. (1998). Simulación de corrientes en el Canal Beagle y Bahía Ushuaia, mediante un modelo bidimensional. Servicio de Hidrografía Naval. Departamento de Oceanografía. Informe Técnico 98: pp 58.

Barker M, Keogh J, Lawrence J, Lawrence A. (1998). Feeding rate, absorption efficiencies, growth, and enhancement of gonad production in the New Zealand sea urchins *Evechinus chloroticus* valenciennes fed prepared and natural diets. *Journal of Shellfish Research* 17 (5): 1583 - 1590.

Bay-Schmith E, Pearse J S. (1987). Effect of fixed daylengths on photoperiodic regulation of gametogenesis in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development (Amsterdam)* 11: 287 - 294.

Bay-Schmith E, Werlinger C, Silva J. (1981). Ciclo anual de reproducción del recurso erizo *Loxechinus albus* entre la X y XII Región. Proyecto de investigación, Subsecretaría de Pesca, Universidad de Concepción. Informe final pp 1 - 66.

Beddingfield S D, McClintock J B. (1998). Differential survivorship, reproduction, growth and nutrient allocation in the regular echinoid *Lytechinus variegatus* (Lamarck) fed natural diets. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 226: 195 - 215.

Beninger P, Lucas A. (1984). Seasonal variations in condition, reproductive activity, and gross biochemical composition of two species of adult clam reared in a common habitat: *Tapes decussatus* L. (Jeffreys) and *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve) *Journal of experimental Marine Biology and Ecology* 79: 19 - 37.

Bernasconi I. (1947). Distribución geográfica de los equinoideos argentinos. *Anales de la Sociedad Argentina de Estudios Geográficos* 6: 97 – 114.

Bernasconi I. (1953). Monografía de los Equinoideos argentinos. *Anales del Museo Historia Natural* 2ª Serie 6 (2): 23 – 25.

Beukema J J, De Bruin W. (1979). Calorific values of the spot part of the tellinid bivalve *Macoma balthica* (L.) as determined by two methods. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 37: 19 - 30.

Biaglow J E, Varnes M E, Epp E R, Clark E P, Tuttle S, Held K D. (1989). Cellular protection against damage by hydroperoxides: role of glutathione. En: *Oxygen Radicals in Biology and Medicine*. Simic M G, Taylor K A, Ward J F, Von Sonntag C (eds). pp: 567 - 573.

Bishop C D, Watts S A. (1992). Biochemical and morphometric study of growth in the stomach and intestine of the echinoid *Lytechinus variegatus* (Echinodermata). *Marine Biology* 114: 459 - 467.

Bjerkeng B, Hertzberg S, Liaaen-Jensen S. (1993). Carotenoids in food chain studies - V. Carotenoids of the bivalves *Modiolus modiolus* and *Pecten maximus* - structural, metabolic and food chain aspects. *Comparative Biochemistry and Physiology* 106: 243 - 250.

Black R, Codd C, Hebbert D, Vink S, Burt J. (1984). The functional significance of the relative size of Aristotle's Lantern in the sea urchin, *Echinometra mathaei* (de Blainville). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 77: 81 - 97.

Black R, Johnson M S, Trendall J T. (1982). Relative size of Aristotle's Lantern in *Echinometra mathaei* occurring at different densities. *Marine Biology* 71: 101 - 106.

Borisovets E E, Zadorozhny P A, Kalinini M V, Lepskaya N V, Yakush E V. (2002). Change of major carotenoids in gonads of sea urchins (*Strongylocentrotus intermedius* and *S. nudus*) at maturation. *Comparative Biochemistry and Physiology* B 132: 779 - 790.

Brambati A, Fontolan G, Simeón U. (1991). Recent sediments and sedimentological processes in the Strait of Magellan. *Bolletino di Oceanologia Teorica ed Applicata* 9: 217-259.

Brewin P E, Lamare M D, Keogh J A, Mladenov P V. (2000). Reproductive variability over a four period in the sea urchin *Evechinus chloroticus* (Echinoidea: Echinodermata) from differing habitats in New Zeland. *Marine Biology* 137: 543 - 557.

Briscoe C S, Sebens K P. (1988). Omnivory in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Müller) (Echinodermata: Echinoidea): predation on subtidal mussels. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 115: 1 - 24.

Brockington S, Clarke A, Chapman A L G. (2001). Seasonality of feeding and nutritional status during the austral winter in the Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri*. *Marine Biology* 139: 127 - 138.

Brooks J M, Wessel G M. (2003). Selective transport and packaging of the major yolk protein in the sea urchin. *Developmental Biology* 261: 353 - 370.

Buchecker R. (1982). A chemist's view of animal carotenoids. En: *Carotenoid chemistry and biochemistry*. Britton G, Goodwin T W (eds). Pergamon Press. Oxford, pp: 175 - 193.

Bückle F, Alveal K, Tarifeño E, Guisado Ch, Córdoba L, Serrano C, Valenzuela J. (1980). Biological studies in the Chilean sea urchin *Loxechinus albus* (Molina) (Echinodermata: Echinoidea): Food analysis and seasonal feeding rate. *Anales del Centro de Ciencias del Mar y Limnología*. Universidad Autónoma de México 7 (1): 149 - 158.

Bückle F, Guisado Ch, Tarifeño E, Zuleta A, Córdoba L, Serrano C. (1978). Biological studies in the Chilean sea urchin *Loxechinus albus* (Molina) (Echinodermata: Echinoidea) IV. Maturity cycle and seasonal biochemical changes in the gonad. *Ciencias Marinas*, México 5 (1): 1 - 18.

Buettner G R, Juerkiewicz B A. (1993). Ascorbate free radical as a maker of oxidative processes in living systems. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 18: 29 - 36.

Buettner G R. (1987). Spin Trapping: ESR parameters of spin adducts. *Free Radical Biology & Medicine* 3: 259 - 303.

- Buettner G R. (1993). The pecking order of free radicals and antioxidants: Lipid peroxidation,  $\alpha$ -tocopherol and ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 300: 535 - 543.
- Burkitt M J, Gilbert B C. (1990). Model studies of the iron-catalyzed Haber-Weiss cycle and the ascorbate-driven Fenton reaction. *Free Radical Research* 10: 265 - 280.
- Burton G W, Ingold K U. (1984).  $\beta$ -Carotene: An unusual type of lipid antioxidant. *Science* 224: 569 - 573.
- Burton G W; Joyce A, Ingold K U. (1982). First proof that vitamin E is the major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma. *Lancet* 2: 327 - 328.
- Bustos E, Olave M S, Troncoso T R. (1990). Estudio redoblamiento de recursos bentónicos área piloto IV Región. III. Investigaciones en erizo *Loxechinus albus* (Molina, 1782). CORFO-IFOP, Chile, AP 90/1c: pp 186.
- Bustos R E, Godoy A C, Olave M S, Troncoso T R. (1991). Desarrollo de técnicas de producción de semillas y repoblación de recursos bentónicos. Instituto de Fomento Pesquero, Santiago, Chile. Informe Técnico.
- Byrne M, Andrew N L, Worthington D G, Brett P A. (1998). Reproduction in the diadematoid sea urchin *Centrostephanus rogersii* in contrasting habitats along the coast of New South Wales, Australia. *Marine Biology* 132: 305 - 318.
- Byrne M. (1990). Annual reproductive cycles of the comercial sea urchin *Paracentrotus lividus* from an exposed intertidal and a sheltered subtidal habitat on the best coast of Ireland. *Marine Biology* 104: 275 - 289.
- Calow P. (1984). Economics of ontogeny - adaptational aspects. En: *Evolutionary Ecology*. Shorrocks B (ed). Blackwell Scientific Publications. Oxford, pp 81 - 104.
- Cárcamo P F. (2004). Effect of diet on gonadal and somatic production of the sea urchin *Loxechinus albus* under sea based cultivation conditions. En: *Sea Urchins: Fisheries and*

Ecology. Lawrence J M, Guzmán O (eds). Destech Publications Inc. Lancaster, pp 222 – 229.

Castilla J C, Moreno C A. (1982). Sea urchins and *Macrocystis pirifera*: an experimental test of their ecological relations in southern Chile. En: Echinoderms: Proceedings of the International Echinoderm Conference. Lawrence J M (ed). Balkema Rotterdam. Tampa Bay, pp 257 - 263.

Cellario C, Fenaux L. (1990). *Paracentrotus lividus* (Lamarck) in culture (larval and benthic phases): Parameters of growth observed during two years following metamorphosis. Aquaculture 84: 173 - 188.

Chatterjee I B. (1970). Biosynthesis of L-ascorbate in animal. Methods in Enzymology 18A: 28 - 34.

Cheftel J C, Cheftel I H. (1980). Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. Vol. 1. Acribia, Zaragoza.

Chia F S, Bickell L R. (1983). Echinodermata. En Reproductive Biology of Invertebrates, Vol. II: Spermatogenesis and Sperm Function. Adiyodi R G y K G (eds). Wiley and Sons, Ltd. pp 545 - 619.

Cho C Y, Slinger S J, Bayley H S. (1982). Bioenergetics of salmonid fishes: Energy intake, expenditure and productivity. Comparative Biochemistry and Physiology B 73 (1): 25 - 41.

Clarke A, Holmes L J, White M G. (1988). The annual cycle of temperature, chlorophyll and major nutrients at Signy Island, South Orkney Islands, 1969-82. British Antarctic Survey Bulletin 80: 65 - 86.

Clarke A. (1987). Temperature, latitude and reproductive effort. Marine Ecology Progress Series 38: 89 - 99.

Clarke A. (1988). Seasonality in the Antarctic marine environment. Comparative Biochemistry and Physiology 90:461 - 473.

- Contreras S, Castilla J C. (1987). Feeding behavior and morphological adaptations in two sympatric sea urchins species in central Chile. *Marine Ecology Progress Series* 38: 217 - 224.
- Cook E J, Kelly M S, McKenzie J D. (1998). Somatic and gonadal growth of the sea urchin *Psammechinus miliaris* (Gmelin) fed artificial salmon feed compared with a macroalgal diet. *Journal of Shellfish Research* 17: 1549 - 1555.
- Correia A D, Costa M H, Luis O J, Livingstone D R. (2003). Age-related changes in antioxidant enzyme activities, fatty acid composition and lipid peroxidation in whole body *Gammarus locusta* (Crustacea: Amphipoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 289: 83 - 101.
- Correia A D, Lima G, Costa M H, Livingstone D R. (2002). Studies on biomarkers of copper exposure and toxicity in the marine amphipod *Gammarus locusta* (Crustacea) I: induction of metallothionein and lipid peroxidation. *Biomarkers* 7: 422 - 437.
- Daggett T, Pearce C M, Tingley M, Robinson S M C, Chopin T. (2005). Effect of prepared and macroalgal diets and seed stock source on somatic growth of juvenile green sea urchins (*Strongylocentrotus droebachiensis*) *Aquaculture* 244: 263 - 281.
- Dall W. (1995). Carotenoids versus retinoids (Vitamin A) as essential growth factors in Penaeid prawns (*Penaeus semisulcatus*). *Marine Biology* 124: 209 - 213.
- Dayton P K. (1975). Experimental evaluation of ecological dominance in a rocky intertidal algal community. *Ecological Monographs* 45: 137 - 159.
- Dayton P K. (1985). The structure and regulation of some South American kelp communities. *Ecological Monographs* 55 (4): 447 - 468.
- de Jong-Westman M, March B E, Carefoot T H. (1995). The effect of different nutrient formulations in artificial diets on gonad growth in the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Canadian Journal of Zoology* 73: 1495 - 1502.

Decker E A. (1998). Strategies for manipulating the prooxidative/ antioxidative balance of foods to maximize oxidative stability. *Trends in Food Science and Technology* 9: 241 - 248.

Deppe R, Viviani C A. (1977). La pesquería artesanal del erizo comestible *Loxechinus albus* (Molina) (Echinodermata, Echinoidea, Rchinidae) en la Región de Iquique. *Biología Pesquera* (Chile) 9: 23 - 41.

Desai I (1984). Vitamin E analysis methods for animal tissues. *Methods in Enzymology* 105: 138 - 146.

Dix T G. (1972). Biology of *Evechinus chloroticus* (Echinoidea: Echinometridae) from different localities. Age, growth and size. *New Zealand Journal of Marine Freshwater Research*. 6: 48 - 68.

Doba T, Burton G W, Ingold K U. (1985). Antioxidant and co-antioxidant activity of vitamin C. The effect of vitamin C, either alone or in the presence of vitamin E or a water-soluble vitamin E analogue, upon the peroxidation of aqueous multilamellar phospholipid liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta* 835: 298 - 303.

Dumont C, Pearce C E, Stazicker C, An Y X, Keddy L. (2006). Can photoperiod manipulation affect gonad development of a boreo-arctic echinoid (*Strongylocentrotus droebachiensis*) following exposure in the wild after the autumnal equinox?. *Marine Biology* 149: 365 - 378.

Ebert D. (1994). A maturation size threshold and phenotypic plasticity of age and size maturity in *Daphnia magna*. *Oikos* 69: 309 - 317.

Ebert T A. (1967). Negative growth and longevity in the purple sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* (Stimpson). *Science* 157: 557 - 558.

Ebert T A. (1980). Relative growth of sea urchin jaws: An example of plastic resource allocation. *Bulletin of Marine Science* 30: 467 - 474.

Ebert T A. (1996). Adaptive aspects of phenotypic plasticity in echinoderms. *Oceanologica Acta* 19: 347 - 355.

Edwards P B, Ebert T A. (1991). Plastic responses to limited food availability and spine damage in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* (Stimpson). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 145: 205 - 220.

Ernester L, Forsmark-Andrée P. (1993). Ubiquinol: an endogenous antioxidant in aerobic organisms. *Clinical Investigative* 71: 60 - 65.

Fletcher W J. (1984). Variability in the reproductive effort of the limpet, *Cellana tramoserica*. *Oecologia* 61: 259 - 264.

Floyd RA (1993) Basic free radical biochemistry. En *Free Radicals in aging*. Yu B P (ed). CRC. Boca Raton Florida, pp 39 - 55.

Flyod R A, Watson J J, Harris M, West M, Wong P K. (1986). Formation of 8-hydroxy deoxyguanosine, hydroxyl free radical adduct of DNA in granulocytes exposed to the tumor promotor, tetradecanoyl phorbolacetate. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 137: 841 - 846.

Foyer C H, Lelandais M, Kunert K J. (1994). Photooxidative stress in plants. *Physiology Plant* 92: 696 - 717.

Foyer C, Rowell J, Walker D. (1983). Measurement of the ascorbate content of spinach leaf protoplasts and chloroplasts during illumination. *Planta* 157: 239 - 244.

Fridovich I (1978). The biology of oxygen radicals. *Science* 201: 875 - 880.

Fridovich I. (1974). Superoxide and evolution. *Horizont Biochemistry Biophysics* 1: 1 - 37.

Fuji A. (1962). Studies on the biology of the sea urchin V. Food consumption of *Strongylocentrotus intermedius*. *Japan Journal of Ecology* 12: 181 - 186.

- Fuji A. (1967). Ecological studies on the growth and food consumption of Japanese common littoral sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* (Agassiz). *Memoirs of the Faculty of Fisheries, Hokkaido University* 15: 83 - 160.
- Gabe M. (1968). *Techniques Histologiques*. Masson et Cie, Paris.
- Gage J D, Tyler P A, Nichols D. (1986). Reproduction and growth of *Echinus acutus* & Koren and *E. Elegans* Duben & Koren on the continental slope off Scotland. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 101: 61 – 83.
- Galleano M, Aimo L, Puntarulo S. (2002). Ascorbyl radical/ascorbate ratio in plasma from iron overloaded rats as oxidative stress indicator. *Toxicology Letters* 133: 193 - 201.
- Galley E A, Tyler P A, Clarke A, Smith C R. (2005). Reproductive biology and biochemical composition of the brooding echinoid *Amphipneustes lorioli* on the Antarctic continental shelf. *Marine Biology* 148: 59 - 71.
- Gamble S C, Goldfarb P S, Porte C, Livingstone D R. (1995). Glutathione peroxidase and other antioxidant enzyme function in marine invertebrates *Mytilus edulis*, *Pecten maximus*, *Carcinus maenas* and *Asterias rubens*. *Marine Environment Research* 39: 191 - 195.
- Gebauer P, Moreno C A. (1995). Experimental validation of the growth rings of *Loxechinus albus* (Molina, 1782) in southern Chile (Echinodermata: Echinoidea). *Fisheries Research* 21: 423 - 435.
- George S B, Lawrence J M, Lawrence A L, Smiley J, Plank L. (2001). Carotenoids in the adult diet enhance egg and juvenile production in the sea urchin *Lytechinus Variegatus*. *Aquaculture* 199: 353 - 369.
- Geracitano L A, Monserrat J M, Bianchini A. (2004). Oxidative stress in *Laeonereis acuta* (Polychaeta Nereididae): environmental and seasonal effects. *Marine Environment Research* 58: 625 - 630.
- Ghio A J, Kadiiska M B, Xiang Q H, Mason R P. (1998). In vivo evidence of free radical formation after asbestos instillation: an ESR spin trapping investigation. *Free Radical Biology & Medicine* 24: 11 - 17.

Giese A C, Pearse J S. (1974). Introduction: General Principles. En: *Reproduction of Marine Invertebrates*. Giese A C, Pearse J S (eds). Academic Press: New York. Pp1 - 49.

Giese A C. (1959). Comparative physiology: annual reproductive cycles of marine invertebrates. *Annual Review of Physiology* 21: 547 - 576.

Giese A C. (1966). On the Biochemical Constitution of some echinoderms. En: *Physiology of Echinodermata*. Boolootian R A (ed). Wiley and Sons. New York, pp 757 - 796.

Giulivi C, Cadenas E. (1993). The reaction of ascorbic acid with different heme iron redox states of myoglobin. *FEBS Letters* 332: 287 - 290.

Gonor J J. (1972). Gonad growth in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* (Stimpson) (Echinodermata: Echinoidea) and the assumptions of gonad index methods. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 19: 89 - 103.

Goodwin T W. (1984). *The Biochemistry of the Carotenoids, Vol. I, Plants*. Chapman and Hall, London.

Griffiths M, Perrott P. (1976). Seasonal changes in the carotenoids of the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 55: 435 - 441.

Grosjean P, Spirlet C, Gosselin D, Vaitilingon D, Jangoux A. (1998). Land-based, closed-cycle echiniculture of *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (Echinoidea:Echinodermata): a long-term experiment at pilot scale. *Journal of Shellfish Research* 17: 1523 - 1531.

Grosjean P, Spirlet C, Jangoux M. (1996). Experimental study of growth in the echinoid *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) (Echinodermata). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 2: 173 - 184.

Guillou M, Lumingas L J L, Michel C. (2000). The effect of feeding or starvation on resource allocation to body components during the reproductive cycle of the sea urchin *Sphaerechinus granularis* (Lamarck). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 245: 183 - 196

- Gutiérrez J, Otsú I. (1975). Periodicidad en las variaciones biométricas de *Loxechinus albus* Molina. Revista de Biología Marina (Valparaíso) 15: 179 - 199.
- Hagen N T. (1996). Echinoculture: from fishery enhancement to closed cycle cultivation. World Aquaculture 27 (4): 6 - 19.
- Halliwell B, Gutteridge J M C. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochemical Journal. 219: 1 - 14.
- Halliwell B, Gutteridge J M C. (1989). Free Radicals in Biology and Medicine, 2nd Ed. Clarendon Press, Oxford.
- Hammond K A. (1998). The match between load and capacity during lactation: where is the limit to energy expenditure. En: Principles of animal design. Weibel E R, Taylor C R, Bolis L (eds). Cambridge University Press. pp 205 - 211.
- Harris E D. (1992). Regulation of antioxidant enzymes. FASEB Journal 6: 2675 - 2683.
- Hegner D. (1980). Age-dependence of molecular and functional changes in biological membrane properties. Mechanism of Ageing and Development 14: 101 - 118.
- Hermes Lima M. (2004). Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of free radical. En: Funcional Metabolism: Regulation and Adaptation. Storey K B (ed). pp 319 - 368.
- Hernando M P. (2006). Efectos de la radiación solar sobre el fitoplancton de aguas Antárticas y sub-Antárticas. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Buenos Aires, Argentina.
- Himmelman J H. (1981). Synchronization of spawning in marine invertebrates by phytoplankton. En: Advances in Invertebrate Reproduction. Clark W H, Adams T S (eds). Elsevier. North-Holland, pp 3 - 19.
- Hirshfield M F, Tinkle D W. (1975). Natural selection and the evolution of reproductive effort. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 72: 2227 - 2231.

Iturraspe R, Sottini R, Schroeder C, Escobar J. (1989). Hidrología y variables climáticas del Territorio de Tierra del Fuego. Información básica. Contribución científica N° 7 CADIC, pp 196.

James P J, Heath P, Unwin M J. (2007) The effects of season, temperature and initial gonad condition on roe enhancement of the sea urchin *Evechinus chloroticus*. Aquaculture 270: 115 – 131.

Janero D R. (1990). Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. Free Radical Biology & Medicin 9: 515 - 540.

Jerardino A, Castilla J C, Ramírez J M, Hermosilla N. (1992). Early coastal subsistence patterns in central Chile. A systematic study of the marine-invertebrate fauna from the site of Curaumilla-I. Latinamerican Antiquity 3: 43 - 62.

Jones B E, Czaja M J. (1998). Mechanism of Hepatic Toxicity. III. Intracellular signaling in response to toxic liver injury. American Journal of Physiology 275: 874 - 878.

Joseph J D. (1982). Lipid composition of marine and estuarine invertebrates. Part II. Mollusca. Progress in Lipid Research 21: 109 - 153.

Jurkiewicz B A, Buettner G R. (1994). Ultraviolet light-induced free radical formation in skin: an electrón paramagnetic resonance study. Photochemistry Photobiology 64: 918 - 922

Kamal-Eldim A, Appelquist L A. (1996). The chemistry antioxidant properties of tocopherol and tocotrienols. Lipids 31: 671 - 701.

Kaushik S J. (1998). Nutritional bioenergetics and estimation of waste production in non-salmonids. Aquatic Living Resources 11 (4): 211 - 217.

Kawakami T, Tsushima M, Katabami Y, Mine M, Ishida A, Matsuno T. (1998). Effect of b,b-carotene, b-echinenone, astaxanthin, fucoxanthin, vitamin A and E on the biological

defense of the sea urchin in *Pseudocentrotus depressus*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 226: 165 - 174.

Kehrer J P, Paraidathathu T. (1992). The use of fluorescent probes to assess oxidative processes in isolated-perfused rat heart tissue. Free Radical Research Communications 16: 217 - 225.

Keller M, Sommer A, Pörtner H O, Abele D. (2004). Seasonality of energetic functioning and reactive oxygen species production by mitochondria of the lugworm *Arenicola marina*, exposed to acute temperature changes. Journal of Experimental Biology 207: 2529 - 2538.

Kelly M S, Brodie C C, McKenzie J D. (1998). Somatic and gonadal growth of the sea urchin *Psammechinus miliaris* maintained in polyculture with the Atlantic salmon. Journal of Shellfish Research 17: 1557- 1562.

Kennedy E D, Shawmn D, Robinson C, Parsons G J, Castell J D. (2005). Effect of protein source and concentration on somatic growth of juvenile green sea urchins *Strongylocentrotus droebachiensis*. Journal of the World Aquaculture Society 36 (3): 320 - 336.

Klinger T S, Lawrence J M, Lawrence A L. (1997). Gonad and somatic production of *Strongylocentrotus droebanchiensis* fed manufactured feeds. Bulletin of Aquacult Association Canadian 97: 35 - 37.

Klinger T S, Watts S A, Forcucci D. (1988). Effect of short-term feeding and starvation on storage and synthetic capacities of gut tissue of *Lytechinus variegatus* (Lamarck) (Echinodermata:asteroidea). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 117: 187 - 195.

Kotake Y, Tanigawa T, Tanigawa M, Ueno I, Allen D R. (1996). Continuous monitoring of cellular nitric oxide generation by spin trapping with an iron-dithiocarbamate complex. Biochimica et Biophysica Acta 1289: 362 - 368.

Lai E K, Crossley C, Sridhar R, Misra H P, Janzen E G, McCay P B. (1986). In vivo spin trapping of free radicals generated in brain, spleen, and liver during  $\gamma$  radiation of mice Archives of Biochemistry and Biophysics 244: 156 - 160.

Lamare M D, Brewin P E, Barker M F, Wing S R. (2002). Reproduction of the sea urchin *Evechinus chloroticus* (Echinodermata: Echinoidea) in a New Zealand fiord. New Zealand Journal of Marine Freshwater Research 36: 719 - 732.

Lamare M D, Hoffman J. (2004). Natural variation of carotenoids in the eggs and gonads of the echinoid genus, *Strongylocentrotus*: implications for their role in ultraviolet radiation photoprotection. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 312: 215 - 233.

Lares M T, Pomory C M. (1998). Use of body components during starvation in *Lytechinus variegatus* (Lamarck) (Echinodermata: Echinoidea). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 225: 99 - 106.

Larraín A. (1975). Los equinoideos regulares fósiles y recientes de Chile. Gayana Zoologia 35: pp 189.

Lawrence J M, Fenaux L, Corre M C, Lawrence A. (1992). The effect of quantity and quality of prepared diets on production in *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea). En: Echinoderm Research. Scalera-Liaci L, Canicatti C (eds). Balkema. Rotterdam, pp 107 - 110.

Lawrence J M, Guille A. (1982). Organic composition of tropical, polar and temperate-water echinoderms. Comparative Biochemistry and Physiology B 72 (2): 283 - 287.

Lawrence J M, Lane P. (1982). The utilization of the resources by post-metamorphic echinoderms. En: Echinoderm Nutrition. Jangoux M, Lawrence J M (eds).A.A. Balkema Publishers. Rotterdam, pp 331 - 371.

Lawrence J M, Lawrence A L, Giese A C. (1966). Role of the gut as a nutrient-storage organ in the purple sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*). Physiological Zoology 39: 281 - 290.

Lawrence J M, Lawrence A L, Holland N D. (1965). Annual cycle in the size of the gut of the purple sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* (Stimpson). *Nature* 205: 1238 - 1239.

Lawrence J M, McClintock J B. (1994). Energetic acquisition and allocation by echinoderms (Echinodermata) in polar seas: adaptations for success?. En: *Echinoderms Through Time (Echinoderms Dijon)*. David B, Guille A, Feral J P, Roux M (eds). Balkema Press. Rotterdam, pp 39 - 52.

Lawrence J M, Olave M S, Otaiza R, Lawrence A L, Bustos E. (1997). Enhancement of gonad production in the sea urchin *Loxechinus albus* in Chile fed extruded feeds. *Journal of the World Aquaculture Society* 28: 91 - 96.

Lawrence J M. (1975). On the relationship between marine plants and sea urchins. *Oceanography and Marine Biology Annual Review* 13: 213 - 286.

Lawrence J M. (1987b). *A functional biology of echinoderms*. Croom Helm, London.

Lawrence J M. (2001). The edible sea urchins Edible En: *Sea Urchins: Biology and Ecology*. Lawrence J M (ed). Elsevier. Amsterdam, pp 1 - 4.

Lawrence J M.(1987a). Bioenergetics of echinoderms. En: *Echinodermata*. Keegan B F, O'Connor D S (eds). Balkema Press. Rotterdam, pp 47 - 67.

Lesser M, Kruse V A (2004). Seasonal temperature compensation in the horse mussel, *Modiolus modiolus*: metabolic enzymes, oxidative stress and heat shock proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 137: 495 - 504.

Levitan D R. (1989). Density-dependent size regulation in *Diadema antillarum*: Effects on fecundity and survivorship. *Ecology* 70: 1414 - 1424.

Levitan D R. (1991). Skeletal changes in the test and jaws of the sea urchin *Diadema antillarum* in response to food limitation. *Marine Biology* 111: 431 - 435.

Liñan-Cabello M A, Paniagua-Michel J, Hopkins P M. (2002). Bioactive roles of carotenoids and retinoids in crustaceans. *Aquaculture Nutrition* 8: 299 - 309.

- Liu J H. (1994). The ecology of the Hong-Kong Limpets *Cellana grata* (Gould 1859) and *Patelloida pygmaea* (Dunker 1860), Reproductive biology. *Journal of Mollusca Studies* 2 (60): 97 - 111.
- Livingstone D R, Garcia Martinez P, Michel X, Narbonne J F, O'Hara S, Ribera D, Winston G W. (1990). Oxyradical production as a pollutionmediated mechanism of toxicity in the common mussel, *Mytilus edulis* L., and other molluscs. *Functional Ecology* 4 (3): 415 - 424.
- Livingstone D R. (2003). Oxidative stress in aquatic organisms in relation topollution and aquaculture. *Revue de Médecine Vétérinaire* 154 (6): 427 - 430.
- Liyana-Pathirana C, Shahidi F, Whittick A. (2002). The effect of an artificial diet on the biochemical composition of the gonads of the sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Food Chemistry*. 79: 461 - 472.
- Lomovasky B J, Morriconi E, Calvo J. (2001). Energetics variation of the striped clam *Eurhomalea exalbida* (Chemnitz, 1795) in Ushuaia Bay, Beagle Channel (54° 50'S). *Journal of Shellfish Research* 20 (3): 1089 - 1094.
- Lowe E F. (1975). Absorption efficiencies, feeding rates, food preferences of *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea) for selected marine plants. M.Sc. Thesis, University of South Florida.
- Lucas A. (1996). Energetics of aquatic animals. Taylor and Francis Press, London.
- Lukyanova O, Khotimchenko J S. (1995). Lipid peroxidation in organs of the scallop *Mizuhopecten yessoensis* and sea-urchin *Strongylocentrotus intermedius* during the reproductive cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology* 2: 371 – 377.
- MacCay P B, Noguchi C, Fong K L, Lai D E, Poyer J L. (1980). Production of radicals from enzyme system and the use of spin traps. En: *Free Radicals in Biology* vol. 4. Academic Press, Inc. pp: 155 - 184.

MacCord F S, Ventura C R R. (2004). Reproductive cycle of the endemic cassiduloid *Cassidulus mitis* (Echinoidea: Cassiduloidea) on the Brazilian coast. *Marine Biology* 145: 603 - 612.

Malanga G, Estevez M S, Calvo J, Abele D, Puntarulo S. (2007). The effect of seasonality on oxidative metabolism in *Nacella (Patinigera) magellanica*. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 146: 551 - 558.

Malanga G, Estevez M S, Calvo J, Puntarulo S. (2004). Oxidative stress in limpets exposed to different environmental conditions in the Beagle Channel. *Aquatic Toxicology* 69: 299 - 309.

Matsuno T, Tsushima. (2001). Carotenoids in sea urchins. En: *Edible sea urchins: biology and ecology*. Lawrence J M (ed). Elsevier Science. Amsterdam, The Netherlands, pp 115 - 138.

May J M, Qu Z, Mendiratta S. (1998). Protection and Recycling of  $\alpha$ -Tocopherol in Human Erythrocytes by Intracellular Ascorbic Acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 349: 281 - 289.

McBeth J W. (1972). Carotenoids from nudibranchs. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 41: 55 - 68.

McBride S C, Lawrence J M, Lawrence A L, Mulligan T M. (1999). Ingestion, absorption, and gonad production of adult *Strongylocentrotus franciscanus* fed different rations of prepared diet. *Journal of the World Aquaculture Society* 30 (3): 364 - 370.

McBride S C, Pinnix W D, Lawrence J M, Lawrence A L, Mulligan T M. (1997). The effect of temperature on production of gonads by the sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus* fed natural and prepared diets. *Journal of the World Aquaculture Society* 28: 357 - 365.

McBride S C, Price R J, Tom P D, Lawrence J M, Lawrence A L. (2004). Comparison of gonad quality factors: color, hardness and resilience, of *Strongylocentrotus franciscanus* between sea urchins fed artificial diet or algal diets and sea urchins harvested from the Northern California fishery. *Aquaculture* 233: 405 - 422.

McClintock J B, Pearse J S. (1986). Organic and energetic content of eggs and juveniles of antarctic echinoids and asterids with lecithotrophic development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 85: 341 - 345.

McClintock J B, Pearse J S. (1987). Biochemical composition of antarctic echinoderms. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 86: 683 - 687.

McClintock J B. (1989). Energetic composition, reproductive output, and resource allocation of Antarctic asteroids. *Polar Biology* 9: 147 - 153.

McNulty H P, Byun J, Lockwood S F, Jacob R F, Mason R P. (2007). Differential effects of carotenoids on lipid peroxidation due to membrane interactions: X-ray diffraction analysis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1768: 167 - 174.

Meidel S K, Scheibling R E. (1998). Annual reproductive cycle of the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*, in differing habitats in Nova Scotia, Canada. *Marine Biology* 131: 461 - 478.

Meidel S K, Scheibling R E. (1999). Effects of food type and ration on reproductive maturation and growth of the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Marine Biology* 134: 155 - 166.

Meister A, Anderson M E. (1983). Glutathione. *Annual Review of Biochemistry* 52: 711 - 760.

Mendoza M L, Nizovoy A. (2000). Géneros de macroalgas marinas de la Argentina, fundamentalmente de Tierra del Fuego. Poder Legislativo de la Provincia de Tierra del Fuego, Antártida e Islas del Atlántico Sur, República Argentina. pp 142.

Miller D M, Buettner G R, Aust S D. (1990). Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radical Biology & Medicine* 8: 95 - 108.

Miller N J, Sampson J, Candeias L P, Bramley P M, Rice-Evans C A. (1996). Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters* 384: 240 - 242.

Mitchell D L. (1995). Ultraviolet radiation damage to DNA. En: Molecular Biology and Biotechnology: A comprehensive Desk Reference. Meyers R A (ed). VCH Publishers. New York, pp 939 - 943.

Montgomery D C. (1991). Diseño y Análisis de Experimentos. Grupo Editorial Iberoamérica.

Morel I, Sargent O, Cogrel P, Lescoat G, Padeloup N, Brissot P, Cillard P, Cillard J. (1995). EPR study of antioxidant activity of iron chelators pyoverdine and hydroxyurea in iron-loaded hepatocyte culture: comparison with that of desferrioxamine. Free Radical Biology & Medicine 18: 303 - 310.

Morriconi E. (2005). Ecología reproductiva de moluscos gasterópodos del canal de Beagle. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, La Plata, Buenos Aires, Argentina pp 169.

Mortensen A, Skibsted L H, Sampson J, Rice-Evans C, Everett S A. (1997). Comparative mechanisms and rates of free radical scavenging by carotenoid antioxidants. FEBS Letters 418: 91 - 97.

Naumenko N V, Kostetsky E Y. (1987). Fatty acid composition of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine from muscle tissue of marine invertebrates in various seasons of the year. Journal Evol. Biochim. Physiology 23: 16 - 25.

Nestler E C, Harris L G. (1994). The importance of omnivory in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Müller) in the Gulf of Maine. En: Echinoderms through time. Proceedings of the Eighth International Echinoderm Conference. David B, Feral A G, Feral J P, Roux M (eds). A.A. Balkema. Rotterdam, pp 813 - 818.

North J A, Specto A A, Buettner G R. (1992). Detection of lipid radicals by electron paramagnetic resonance spin trapping using intact cells enriched with polyunsaturated fatty acids Journal Biology Chemistry 267: 5743 - 5746

Orler P M. (1992). Biología reproductiva comparada de *Pseudechinus magellanicus* y *Loxechinus albus*, equinoideos del Canal Beagle. Tesis Doctoral, Universidad Nacional

de La Plata, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, La Plata, Buenos Aires, Argentina pp 177.

Orler P, Calvo J. (1991). Ciclo reproductivo de una población de *Loxechinus albus* (Molina, 1782) (Echinodermata: Echinoidea) del Canal Beagle. Jornadas Nacionales Ciencias del Mar. Puerto Madryn.

Oyarzún S T, Marín S L, Valladares C, Iriarte J L. (1999). Reproductive cycle of *Loxechinus albus* (Echinodermata: Echinoidea) in two areas of the Magellan region (53°S, 70-72°W), Chile. *Scientia Marina* 63: 439 - 449.

Palozza P. (1998). Prooxidant actions of carotenoids in biologic systems. *Nutrition-reviews (USA)* 56 (9): 257 - 265.

Pearce C M, Daggett T L, Robinson S M C. (2004). Effect of urchin size and diet on gonad yield and quality in the green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Aquaculture* 233: 337 – 367.

Pearce C M, Daggett T L, Robinson S M. (2002). Effect of binder type and concentration on prepared feed stability and gonad yield and quality of the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Aquaculture* 205: 301 - 323.

Pearse J S, Cameron R A. (1991). Echinodermata: Echinoidea. En: *Reproduction of marine invertebrates*. Giese A C, Pearse J S, Pearse V B (eds.). The Boxwood Press. California, pp 513 - 662.

Pearse J S, Clark M E, Leighton D L, Mitchell C T, North W J. (1970). Marine waste disposal and sea urchin ecology. En: *Kelp Habitat Improvement Project, Annual Report*, Pasadena, California, pp 87.

Pearse J S, Giese A C. (1966). Food, reproduction, and organic constitution of the common antarctic echinoid *Sterechinus neumayeri*. *Biological Bulletin* 130: 387 – 401.

Pearse J S, Pearse V B, Davis K K. (1986). Photoperiod regulation of gametogenesis and growth in the sea urchin *Strongylocentrus purpuratus*. *Journal of Experimental Zoology* 237: 107 - 118.

Peck L S. (2005). Prospects for surviving climate change in Antarctic aquatic species. *Fronteries of Zoology* DOI:10.1186/1742-9994-2-9.

Pérez AF, Morriconi E, Boy C, Calvo J. (2008). Energetic variation of the sea urchin *Loxechinus albus* at the southernmost limit of their distribution range (Beagle Channel, Tierra del Fuego). *Polar Biol* 31: 443 - 449.

Plank L R, Lawrence J M, Lawrence A L, Montoya Olvera R. (2002). The effect of dietary carotenoids on gonad production and carotenoid profiles in the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *Journal of the World Aquaculture Society* 33: 127 - 137.

Power A, Sheehan D. (1996). Seasonal variations in the antioxidant defense systems of gill and digestive gland of the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 114: 99 - 103.

Pryor W A. (1984). Free Radicals in autoxidation and in aging. En: Free radicals in molecular biology, Aging, and Disease. Armstrong D, Sohal R S, Cutler R G, Slateer T F (eds). New York Raven. pp 13 - 42.

Rabassa J, Heusser C, Stuckenrath R. (1986) New data on Holocene sea transgression in the Beagle Channel: Tierra del Fuego, Argentina. *Quaternary of South America and Antarctic Peninsula* 4: 291-310.

Raymond B G, Scheibling R E. (1987). Recruitment and growth of the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* (Muüller) following mass mortalities off Nova Scotia, Canada. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 108: 31 - 54.

Regoli F, Nigro M, Chiantore M, Winston G M. (2002). Seasonal variations of susceptibility to oxidative stress in *Adamussium colbecki*, a key bioindicator species for the Antarctic marine environment. *Science of the Total Environment* 289: 205 - 11.

Robbins N J, McKeever T J. (1990). Developing a Newfoundland sea urchin fishery. St. John's. NF: Trinity-Placentia Development Association. Canada/ Newfoundland Inshore Fisheries Development Agreement.

Robinson S M C, Castell J D, Kennedy E J. (2002). Developing suitable color in the gonads of cultured sea urchins (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Aquaculture* 206: 289 - 303.

Ruppert E E, Barnes R D. (1996). Zoología de los invertebrados. McGraw-Hill Interamericana.

Russell M P. (1998). Resource allocation plasticity in sea urchins: rapid, diet induced, phenotypic changes in the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* (Müller). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 220: 1 - 14.

Sadrzadeh S M H, Eaton J W. (1988). Hemoglobin-mediated oxidant damage to the central nervous system requires endogenous ascorbate. *Journal of Clinical Investigation* 82: 1510 - 1515.

Sastry A N. (1983). Ecological aspects of reproduction. En: *The biology of Crustacea*. Bliss D (ed). Academic Press. New York, 179 - 269.

Schlosser S C, Lupatsch I, Lawrence J M, Lawrence A L, Shpigel M. (2005). Protein and energy digestibility and gonad development of the European sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck) fed algal and prepared diets during spring and fall. *Aquaculture Research* 36: 972 - 982.

SERNAP 1957-1999. Servicio nacional de Pesca. Anuario Estadístico de Pesca. Ministerio de Economía de Fomento y Reconstrucción. República de Chile.

Shigenaga M K, Aboujaoude E N, Chen Q, Ames B N. (1994). Oxidative damage to DNA and DNA repair. *Methods in Enzymology* 234: 16 - 32.

Shimada K., Takeda M, Uemura T. (1990). Antioxygenic properties of lipids of sea urchin gonads. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 37: 709 - 714.

Shina A, Gross J, Lifshitz A. (1978). Carotenids of the invertebrates of the Red sea (Eilat shore) - II. Carotenoid pigments in the gonads of the sea urchin *Tripneustes gratila* (echinodermata). *Comparative Biochemistry and Physiology B* 61: 123 - 128.

Shpigel M, McBride S C, Marciano S, Lupatsch I. (2004). The effect of photoperiod and temperature on the reproduction of European sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Aquaculture* 232: 343 - 355.

Shpigel M, McBride S C, Marciano S, Ron S, Ben-Amotz A. (2005). Improving gonad color and somatic index in the European sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Aquaculture* 245: 101 - 109.

Shpigel M, Schlosser S C, Ben-Amotz A, Lawrence A L, Lawrence J M. (2006). Effects of dietary carotenoid on the gut and the gonad of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Aquaculture* 261: 1269 - 1280.

Sies H. (1985). Oxidative stress: introductory remarks. En: *Oxidative stress*. (Sies H ed). Academic Press. London, pp 1 - 8.

Siikavuopio S I, Dale T, Mortensen A, Foss A. (2007). Effects of hypoxia on feed intake and gonad growth in the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Aquaculture* 266: 112 - 116.

Simic M G. (1991). Antioxidant compounds an overview. En: *Oxidative damage and repair*. Davies K J A (ed). Pergamon Press. Oxford, pp 47 - 56.

Sokal R R, Rohlf F J. (1995). *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. WH Freeman and Company, New York.

Sole M, Porte C, Albaiges J. (1995). Seasonal variation in the mixed function oxygenase system and antioxidant enzymes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14: 157 - 164.

Spirlet C, Grosjean P, Jangoux M. (2000). Optimization of gonad growth by manipulation of temperature and photoperiod in cultivated sea urchins, *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (Echinodermata). *Aquaculture* 185 (1 - 2): 85 - 99.

Starr M, Himmelman J H, Therriault J C. (1990). Direct Coupling of Marine Invertebrate spawning with phytoplankton blooms. *Science* 247: 1071 - 1074.

Stearns S C. (1992). *The evolution of life histories*. Oxford University Press. Oxford, UK.

Stolze K, Udilova N, Nohl H. (2000). Lipid radicals: Properties and detection by spin trapping. *Acta Biochimica Polonica* 47: 923 - 930.

Stotz W B (2003). Sea-Urchin Fisheries: A Chilean Perspective. En: *Sea Urchins: Fisheries and Ecology*. Lawrence J M, Guzmán O (eds). Destech Publications Inc. Lancaster, pp 3 - 17.

Swan E F. (1961). Some observations of the growth rate of sea urchins in the genus *Strongylocentrotus*. *Biological Bulletin* 120: 420 - 427.

Tegner M J. (1989). The feasibility of enhancing red sea urchin, *Strongylocentrotus franciscanus*, stocks in California: an analysis of the options. *Marine Fisheries Reviews* 51: 1 - 22.

Torbati D, Church D F, Pryor W A, Carey M E. (1990). Ascorbyl radical and oxidative stress in the central nervous system (CNS) trauma. *Free Radical Biology & Medicine* 9: 1 - 43.

Tsushima M, Byrne M, Amemiya S, Matsuno T. (1995). Comparative biochemical studies of carotenoids in sea urchins- III. Relationship between developmental mode and carotenoids in the Australian echinoids *Heliocidaris erythrogramma* and *H. tuberculata* and a comparison with Japanese species. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 110: 719 - 723.

Tsushima M, Kawakami T, Matsuno T. (1993). Metabolism of carotenoids in sea urchin *Pseudocentrotus depressus*. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 106 (3): 737 - 741.

Tsushima M, Kawakami T, Mine M, Matsuno T. (1997). The role of carotenoids in the development of the sea urchin *Pseudocentrotus depressus*. *Invertebrate Reproduction and Development* 32:149 - 153.

Tsushima M, Matsuno T. (1990). Comparative biochemical studies of carotenoids in sea urchins-I. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 96: 801 - 810.

Tyler D D. (1975). Role of superoxide radicals in the lipid peroxidation of intracellular membranes. *FEBS Letters* 51: 180 - 183.

Unuma T, Yamamoto T, Akiyama T, Shiraishi M, Ohta H. (2003). Quantitative changes in yolk protein and other components in the ovary and testis of the sea urchin *Pseudocentrotus depressus*. *Journal of Experimental Biology* 206: 365 - 372.

Vadas R L , Beal B , Dowling T, Fegley J C. (2000). Experimental field tests of natural algal diets on gonad index and quality in the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*: a case for rapid summer production in post-spawned animals. *Aquaculture* 182: 115 -135.

Valencia E, Marín A. (2003). Balance Redox oxidantes/antioxidantes en pacientes críticamente enfermos. *Revista Colombiana de Anestesiología* 31: 265 – 276.

Vanella F A, Calvo J, Morriconi E R, Aureliano D R. (2005). Somatic energy content and histological analysis of the gonads in Antarctic fish from the Scotia Arc. *Scientia Marina* 69: 305 - 316.

Vásquez J A, Buschmann A H. (1997). Herbivore-kelp interactions in Chilean subtidal communities: a review. *Revista Chilena de Historia Natural* 70: 41 - 52.

Vásquez J A, Castilla J C, Santelices B. (1984). Distributional patterns and diets of four species of sea urchins in giant kelp forest (*Macrocystis pyrifera*) of Puerto Toro, Navarino Island, Chile. *Marine Ecology Progress Series* 19: 55 - 63.

Vásquez J A, Véliz D, Weisner R. (1996). Análisis malocológico de un yacimiento de la cultura Huentelauquen IV Región, Chile. *Gayana Oceanología* 4: 109 - 116.

Vásquez J A. (2001). Ecology of *Loxechinus albus*. En: Edible Sea Urchins: Biology and Ecology. Lawrence JM (ed). Elsevier. Amsterdam, pp 161 - 175.

Viarengo A, Canesi L, Livingstone D R. (1991). Seasonal variations in the antioxidant defence enzymes and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. Comparative Biochemistry and Physiology C 100: 187 - 190.

Vidal Santana G B. (2003). Desarrollo de una Dieta Artificial para optimizar la Calidad Comercial de Gónadas Café de Erizos (*Loxechinus albus*) de la XII Región. Proyecto FONDEF DOO1149 Universidad de Santiago, Instituto de Fomento Pesquero.

Viviani C A. (1975). Las comunidades marinas litorales en el norte grande de Chile. Publicacion Ocasional. Laboratorio de Ecología Marina, Universidad del Norte, Iquique.

Walker C W, Harrington I M, Lesser M P, Fagerberg W R. (2003). Nutritive phagocyte incubation chambers provide a structural and nutritive microenvironment for germ cells of *Strongylocentrotus droebachiensis*, the green sea urchin. Biological Bulletin 209: 31 - 48.

Walker C W, Harrington L M, Lesser M P, Fagerberg W R. (2005). Nutritive phagocyte incubation chambers provide a structural and nutritive microenvironment for germ cells of *Strongylocentrotus droebachiensis*, the green sea urchin. Biological Bulletin 209 (1): 31 - 48.

Walker C W, Lesser M P. (1998). Manipulation of food and photoperiod promotes out-of-season gametogenesis in the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*: implications for aquaculture. Marine Biology 132: 663 - 676.

Walker C W, Unuma T, McGinn N A, Harrington L M, Lesser M P. (2001). Reproduction of sea urchins. En: Edible sea urchins: biology and ecology. Lawrence J M (ed). Elsevier Science. Amsterdam, The Netherlands, pp 5 - 26.

Wieser W. (1998). Optimality in complex dynamic systems: constraints, trade-offs, priorities. En: Principles of animal design. Weibel E R, Taylor C R, Bolis L (eds). Cambridge University Press. Cambridge, pp 230 - 238.

Wilhelm Filho D, Torres M A, Marcon J L, Fraga C G, Boveris A. (2000). Antioxidant defenses in vertebrates - emphasis on fish and mammals. *Trends Comparative Biochemistry and Physiology* 7: 37 - 45.

Wilhelm Filho D, Tribess T B, Gáspari C, Claudio F D, Torres M A, Magalhaes A R M. (2001). Seasonal a changes in antioxidant defenses of the digestive gland of the brown mussel (*Perna perna*). *Aquaculture* 203: 149 - 158.

Williamson J E, Steinberg P D. (2002). Reproductive cycle of the sea urchin *Holopneustes purpurascens* (Temnopleuridae: Echinodermata). *Marine Biology* 140: 519 - 532.

Wills E D. (1966). Mechanisms of lipid peroxide formation in animal tissue. *Biochemical Journal* 99: 667 - 676.

Winston G W, Di Giulio R T. (1991). Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology* 19: 137 - 161.

Yamamoto M, Ishine M, Yoshida M. (1988). Gonadal maturation independent of photic conditions in laboratory-reared sea urchins, *Pseudocentrotus depressus* and *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Zoological Science (Tokyo)* 5: 979 - 988.

Yeum K J, Aldini G, Chung H Y, Krinsky N I, Russell R M. (2003). The activities of antioxidant nutrients in human plasma depend on the localization of attacking radical species. *Journal of Nutrition* 133: 2688 - 2691.

Yu B P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews* 74: 139 - 155.

Zamora Quiroz S A. (1989). Comparaciones inter e intraespecíficas en los ciclos reproductivos de *Loxechinus albus* (Molina, 1782) y *Tetrapygnus niger* (Molina, 1782) (Echinodermata: Echinoidea) en dos localidades de la IV Región, Coquimbo, Chile. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad del Norte, Sede Coquimbo, pp 102.

Zamora S, Stotz W. (1992). Ciclo reproductivo de *Loxechinus albus* (Molina 1782) (Echinodermata: Echinoidea) en Punta Lagunillas, IV Región, Coquimbo, Chile. Revista chilena de Historia Natural 65: 121 - 133.

Zar J H. (1984). Bioestatistical analysis. Prentice-Hall, New York.

Zegers J M, Oliva C, Hidalgo C, Rodríguez L. (1983). Crecimiento de *Loxechinus albus* (Molina, 1982) (Echinodermata: Echinoidea) en sistemas de jaulas suspendidas a media agua. Memorias de la Asociación Latinoamericana de Acuicultura 5: 369 - 378.

Zhang P, Omaye S T. (2000).  $\beta$ -Carotene: interactions with  $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid in microsomal lipid peroxidation. Journal of Nutritional Biochemistry 12: 38 - 45.