

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE UN TRANSCRITO Y  
UNA PROTEÍNA DE SHOCK TÉRMICO DE 70 kDa DE *Stereochinus neumayeri*, EN  
RESPUESTA A ESTRÉS TÉRMICO Y USO POTENCIAL COMO BIOMARCADOR**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

**CAMILA DEL PILAR CALFÍO PAINEMAL**

**PROFESOR GUÍA: DR. JORGE MARCELO GONZÁLEZ ARAVENA**  
**TEMUCO- CHILE**

**2011**

“IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE UN TRANSCRITO Y  
UNA PROTEÍNA DE SHOCK TÉRMICO DE 70 kDa DE *Sterechinus neumayeri* EN  
RESPUESTA A ESTRÉS TÉRMICO Y USO POTENCIAL COMO BIOMARCADOR”

PROFESOR GUIA

: \_\_\_\_\_

Dr. Jorge Marcelo González Aravena  
Investigador del Departamento Científico  
Instituto Antártico Chileno

PROFESORES CONSEJEROS

: \_\_\_\_\_

Dra. Alejandra Sandoval Álvarez  
Facultad de Cs. Agropecuarias y Forestales  
Universidad de La Frontera

CALIFICACION PROMEDIO TESIS

: \_\_\_\_\_

## AGRADECIMIENTOS

Quiero manifestar mis agradecimientos a todas las personas que contribuyeron de forma directa o indirecta en la realización de este trabajo, que con su apoyo, afecto y compañía contribuyeron al término de este.

Agradezco el gran apoyo de mis tutores, Dr. Marcelo González y la Dra. Alejandra Sandoval por brindarme su apoyo en este proceso y por darme la oportunidad de formarme académicamente amparada por su profesionalismo, su entrega a la investigación con la calidad humana que les caracteriza. En particular a mi tutor, Dr. González por su constante dedicación y orientación durante la realización de este trabajo, por su gran apoyo durante mi permanencia en el laboratorio y por darme la confianza de desarrollo profesional en el que hacer científico. A la Dra. Alejandra por sus acertados consejos, cooperación, apoyo y confianza en este trabajo y por haberme mostrado en los inicios de mi preparación las bases de mi formación académica.

A todas las personas con quienes compartí diariamente en el laboratorio de Biorrecursos antárticos: Carla Gimpel, Paris Lavín, Ada González, en especial a Geraldine Asencio por sus sugerencias, comentarios, buena disposición y entusiasmo (“por esa forma de única de ver la vida y transmitir tus experiencias”). A Rocío Urtubia, Carolina Pérez y Jeaninna Rojas, por su apoyo y buenos momentos compartidos durante mi estadía en Punta Arenas.

En especial quiero agradecer a mi familia, que me ha apoyado de manera incondicional durante esta etapa y sufrir más que nadie todos mis momentos de tensión, nervios y bajones, por alegrarse más que yo misma de cada logro. A mi madre, Honorinda, y mi padre, Rafael, que han sido los pilares fundamentales en mi formación personal y profesional. Por su apoyo, esfuerzo, dedicación, por inducirnos a mejorar nuestras expectativas y ser perseverantes en la vida, gracias por confiar en mí en todo momento y darme la oportunidad de seguir mis ideales.

A mis hermanas Bernarda, Ana, Viviana y Claudia por sus consejos, cariño y por la solidaridad que mostraron conmigo en las horas más pesadas de trabajo. Por mostrarme siempre la parte positiva de las cosas y por animarme en cada decisión transmitiéndome tranquilidad. A mis pequeños sobrinos, Rafael y Renato, por la alegría que me han entregado cada día.

Finalmente, agradezco el cariño y preocupación de mis amigos y de todas aquellas personas que me han acompañado a lo largo de todo este proceso. A Fernando por confiar en mí mucho más que yo misma y escuchar mis problemas diariamente a muchos km de distancia. Por sus palabras de aliento, por estar conmigo en todo momento y por contribuir en esas horas, días, semanas...etc, de trabajo

## ÍNDICE

1	<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
2	<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	3
2.1	Antártica y ambientes marinos antárticos	3
2.1.1	Organismos ectotermos antárticos, adaptación y diversidad de especies	4
2.1.2	Fauna bentónica de la Antártica	5
2.2	Erizo de mar antártico: <i>Sterechinus neumayeri</i> , características e importancia	7
2.2.1	Respuesta inmune de los erizos de mar	8
2.2.1.1	Células esféricas rojas	9
2.2.1.2	Células esféricas incoloras	9
2.2.1.3	Células vibrátiles	9
2.2.1.4	Células fagocíticas	9
2.3	Calentamiento global y posibles efectos en organismos marinos antárticos	11
2.4	Respuesta de estrés térmico y proteínas de shock térmico	12
2.4.1	Clasificación y funciones de las Hsps	14
2.4.1.1	Hsp90	14
2.4.1.2	Hsp70	14
2.4.1.3	Hsp60	14
2.4.2	Hsp70: constitutivas e inducibles	15
2.4.3	Características de los genes Hsp70	18
2.5	Modulación transcripcional de la expresión del gen Hsp70	18
2.5.1	Mecanismo que regula la expresión de Hsp70	19
2.6	Control de la traducción después de un estrés térmico	22
2.7	Hsp70 en erizos de mar	22
2.8	Estudios realizados en otras especies marinas antárticas	23
2.9	Concepto de Biomarcador	24
2.9.1	Uso de Hsp70 como Biomarcador	25

3.	<b>JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO</b>	26
3.1	Hipótesis	27
3.2	Objetivo general	27
3.3	Objetivos específicos	27
4	<b>METODOLOGÍA</b>	28
4.1	Obtención de muestras y diseño experimental	28
4.2	Extracción de ARN y Cuantificación de RNA por espectrofotometría	29
4.2.1	Obtención de cDNA	30
4.3	Diseño de partidores a partir de secuencias homólogas de Hsp70	30
4.3.1	Amplificación del gen y secuenciación parcial de Hsp70 en <i>S.neumayeri</i>	31
4.4	Expresión Relativa del gen Hsp70 por PCR semicuantitativa y PCR cuantitativa	33
4.5	Síntesis peptídica y producción del Anticuerpo anti-Hsp70 e identificación en celomocitos.	34
4.6	Análisis de la proteína Hsp70 en la cinética de estrés térmico de celomocitos mediante inmunocitoquímica e inmunofluorescencia	34
4.7	Análisis de la proteína Hsp70 en la cinética de estrés térmico mediante inmunohistoquímica e inmunofluorescencia en tejidos de <i>S.neumayeri</i>	36
4.8	Análisis estadístico	38
5	<b>RESULTADOS</b>	39
5.1	Obtención de la secuencia parcial Sn-Hsp70	39
5.2	Expresión relativa del transcrito Sn-Hsp70 en la cinética de estrés térmico de celomocitos	40
5.3	Expresión relativa del transcrito Sn-Hsp70 en la cinética de estrés térmico de tejido intestinal	41
5.4	Inmunodetección de la proteína Hsp70 por un anticuerpo policlonal Anti-Hsp70	42
5.5	Análisis de la expresión de la proteína Hsp70 en celomocitos de <i>S.neumayeri</i>	43
5.6	Análisis de la expresión de la proteína Hsp70 en tejidos de <i>S.neumayeri</i>	46
6	<b>DISCUSIÓN</b>	50
6.1	Obtención de la secuencia parcial Sn-Hsp70	50

6.2	Expresión relativa del gen Sn-Hsp70 en la cinética de estrés térmico	50
6.3	Expresión de la proteína Hsp70 en celomocitos de <i>S.neumayeri</i>	52
6.4	Expresión de la proteína Hsp70 en tejidos de <i>S.neumayeri</i>	54
7	<b>CONCLUSIONES</b>	56
8	<b>LITERATURA CITADA</b>	57
9	<b>ANEXOS</b>	63

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Tipos de celomocitos en erizos de mar
- Figura 2. Características estructurales de las proteínas Hsp70
- Figura 3. Mecanismo de regulación de la síntesis de Hsp70
- Figura 4. Erizos antárticos en acuarios con aireación constante sometidos a estrés térmico
- Figura 5. Tratamientos utilizados en las distintas cinéticas de estrés térmico
- Figura 6. Estructura de la proteína Hsp70
- Figura 7. Expresión relativa del transcrito Sn-Hsp70 en la cinética de celomocitos de *S.neumayeri* mediante PCR cuantitativa
- Figura 8. Expresión relativa del transcrito Sn-Hsp70 en la cinética de tejido intestinal de *S.neumayeri* mediante PCR cuantitativa
- Figura 9. Inmunodetección de la proteína Hsp70 en *S.neumayeri*
- Figura 10. Inmunocitoquímica (indirecta) de celomocitos de *S.neumayeri*
- Figura 11. Porcentaje de celomocitos positivos que expresarían la proteína Hsp70 en la cinética de estrés térmico
- Figura 12. Reconocimiento de la proteína Hsp70 en celomocitos por Inmunocitoquímica visualizados en un microscopio óptico con un rango de aumento de 100X.
- Figura 13. Reconocimiento de la proteína Hsp70 en celomocitos por Inmunofluorescencia
- Figura 14. Cortes histológicos de tejido intestinal de *S.neumayeri*.
- Figura 15. Cortes histológicos de esófago de *S.neumayeri*
- Figura 16. Identificación de la proteína Hsp70 en tejidos por Inmunofluorescencia indirecta con fluoresceína (FITC)



**ÍNDICE DE TABLAS**

- Tabla 1. Secuencias de los partidores que fueron diseñados para la amplificación del gen Hsp
- Tabla 2. Partidores específicos que fueron diseñados para la secuencia parcial Hsp70 de *S.neumayeri*
- Tabla 3. Resumen de los materiales usados en las distintas técnicas de inmunología
- Tabla 4. Soluciones que se utilizaron para inmunohistoquímica e inmunofluorescencia
- Tabla 5. Homología de secuencias nucleotídicas y de aminoácidos de la secuencia parcial de *S. neumayeri* con otros miembros de la familia Hsp70. La secuencia Sn-Hsp70 presentó fuerte identidad con otros géneros de erizos de mar

## RESUMEN

El *Sterechinus neumayeri* es uno de los erizos de mar más comunes y extensamente distribuidos en los ambientes marinos antárticos, viven a temperaturas que bordean los 0°C y no sufren grandes cambios térmicos. Normalmente la exposición de un organismo a temperaturas elevadas induce una rápida y transitoria expresión de proteínas de estrés térmico, siendo la familia de proteínas de choque térmico de 70 kDa (HSP70s) la más estudiada como respuesta a elevadas temperaturas ambientales.

El presente trabajo presenta los resultados respecto de la identificación y expresión de una proteína de tipo Hsp70 en *S.neumayeri* sometidos a estrés térmico de 5°C y 10°C. Se analizó en celomocitos y tejidos la expresión a nivel de transcrito y proteína, mediante PCR (semicuantitativa como cuantitativa) y técnicas de inmunología. Se obtuvo una secuencia parcial de 650 pb, que presentó una fuerte identidad con otras proteínas de la familia de las Hsp70. Los resultados de PCR cuantitativa demuestran que existe una leve inducción en la expresión del gen de Hsp70 en tejidos y en celomocitos en respuesta al estrés térmico. Por otra parte, se identificó la presencia de la proteína Hsp70 a nivel celular y tisular, existiendo leves aumentos respecto al grupo control en celomocitos. Por medio de Western blot se determinó que el anticuerpo reconoce específicamente una proteína de 70 kDa. Estos resultados evidencian que estos equinodermos antárticos no han perdido la capacidad de expresar e inducir este tipo de chaperonas cuando son sometidos a elevadas temperaturas, presentando cierta capacidad de respuesta fisiológica frente al estrés térmico.

Debido a la directa relación con el estrés térmico, se propone el uso de Hsp70 como un biomarcador que permitirá detectar, cuantificar y/o evaluar de forma indirecta los efectos que podría provocar la elevación de la temperatura en erizos antárticos y en el ecosistema marino de la Antártica frente a un escenario de calentamiento global.

## SUMMARY

*Sterechinus neumayeri* is a sea urchin most common and widely distributed in Antarctic marine environments; live at thermal stable condition, around 0°C. Usually the exposure of an organism at elevated temperatures induces rapid and transient expression of heat shock proteins, being family of heat shock protein of 70 kDa (HSP70s) the most studied in response to elevated temperatures.

This paper presents the results regarding the identification and expression of an Hsp70 type protein transcribed by PCR (semi-quantitative and quantitative) and immunology techniques. We obtained a partial sequence of 650 bp, which presented a strong identity with other proteins of the Hsp70 family. Quantitative PCR results show that there is a slight induction in Hsp70 gene expression in tissues and coelomocytes in response to heat stress. On the other hand, identified the presence of Hsp70 protein and tissue at the cellular level, there are slight increases in the control group of coelomocytes. By Western blot was determined that the antibody specifically recognized a protein of 70 kDa. The results show that these Antarctic echinoderms have not lost the ability to express this type of chaperones when subjected to elevated temperatures, showing some ability physiological response heat stress.

Due to direct relation to thermal stress, it is proposed to use Hsp70 as a biomarker that will identify, quantify and/or indirectly assess the effect that could lead to elevated temperature in the antarctic sea urchins and the Antarctic marine ecosystem in a global warming scenario.

## 1. INTRODUCCIÓN

Se ha aceptado internacionalmente que estamos en un periodo de calentamiento global, donde la temperatura es el principal factor que afecta la supervivencia de especies antárticas que viven en ambientes térmicamente estables. Actualmente se ha reportado una tendencia del calentamiento entre 0,2° y 1°C en la temperatura superficial del mar de la península antártica durante los últimos 50 años. Los modelos predictivos prevén que la temperatura media del mar aumentará alrededor de 2°C para el año 2100, lo que provocaría que organismos marinos antárticos estén expuestos más allá de sus límites de supervivencia y comiencen a perder críticamente sus funciones biológicas.

Es de esperar que si la temperatura en las aguas antárticas se incrementa por encima de los niveles normales se produzca un estrés celular en las especies afectando en su capacidad de responder fisiológicamente a estos cambios. A nivel molecular la elevación de la temperatura provoca la desnaturalización de proteínas desencadenando una respuesta de estrés térmico mediada por genes y proteínas de estrés (Hsps). Las Hsps son proteínas que actúan en procesos intracelulares en calidad de chaperonas, se agrupan en 5 familias en base a su tamaño molecular en kDa (Hsp110, Hsp90, Hsp70, Hsp60, y Hsp de bajo peso). Siendo la familia de proteínas de estrés térmico (HSP70s) de 70 kDa la más estudiada, comprenden las isoformas Hsc70 constitutivas que actúan como housekeeping en la restauración de la homeostasis celular y la forma Hsp70 inducible sintetizada bajo estrés y que cumple un rol fundamental en la adaptación térmica.

La acción de Hsp70 ha sido descrita en respuesta a una amplia variedad de estrés, siendo la clásica activación en respuesta a elevadas temperaturas. Al parecer todos los estudios que se han realizado en respuesta al estrés térmico parecen contribuir a la sobreexpresión de Hsp70s, excepto en aquellas especies marinas antárticas que producto de la estabilidad térmica de las aguas antárticas han perdido la capacidad de inducción o presentan una baja expresión del gen Hsp70. La incapacidad de inducir esta molécula se debe a la pérdida de la vía de regulación en la expresión génica de Hsp durante la historia evolutiva. Sin embargo, ni la tasa de transcripción de Hsp70 ni la concentración de Hsp70 se ve reforzada por el incremento de la temperatura en aquellas especies en que el gen Hsp70 se ha mantenido, la respuesta de por

qué ocurre esta situación implicaría un fenómeno de desnaturalización al frío constituyendo un cambio adaptativo en estas especies.

*Sterechinus neumayeri* es uno de los erizos de mar más comunes y extensamente distribuidos en las costas antárticas, no sufren grandes cambios térmicos y son sensibles a pequeños incrementos de temperatura. Debido a que esta especie cumple un rol fundamental en la red trófica bentónica y se considera como un organismo estructurador de comunidades marinas, es decir, si se ve afectado fisiológicamente por el aumento de temperatura ante el posible escenario del calentamiento global en la Antártica, también se pueden ver afectados algas u otros animales, con lo cual podría representar un importante bioindicador. En el contexto de la elevación de la temperatura en la Antártica y debido a la directa relación de las Hsp70s inducibles con el estrés térmico y el uso de su expresión como un biomarcador, Hsp70 se convierte en un interesante candidato para determinar si los erizos antárticos poseen la capacidad de inducir Hsp70 después de que son sometidos a estrés térmico. De esta forma se podrá comprobar si los erizos antárticos son capaces de responder a incrementos de temperaturas considerando que han vivido permanentemente en ambientes fríos y térmicamente estables.

En este contexto surge la pregunta si los erizos antárticos ¿Serán capaces de responder a elevadas temperaturas, si siempre han vivido en ambientes fríos? ¿Podrán inducir la expresión de proteínas de estrés térmico de 70 kDa como un mecanismo de respuesta a elevadas temperaturas?

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Antártica y ambientes marinos antárticos.

La Antártica es el continente más frío, más seco y más ventoso de la Tierra. Sus aguas también son las más frías y tienen el fotoperiodo estacional más extremo que ningún otro océano, constituyendo uno de los principales reguladores térmicos del planeta y se ve afectada por los mismos procesos globales que afectan a la Tierra.

El continente antártico cubre el 9,2% de la superficie terrestre, almacena más del 80% del agua dulce en forma de hielo y está rodeado por un océano productivo que representa el 9,6% del total oceánico. El océano Antártico tiene un área total de 34,8 millones de km<sup>2</sup>, está cubierto por una capa de hielo que alcanza unos 21 millones de km<sup>2</sup> durante el invierno y sólo unos 7 millones de km<sup>2</sup> durante el verano (Teixidó, 2004).

Los ambientes marinos antárticos se caracterizan por temperaturas bajas pero altamente estables, con periodos de verano muy cortos e inviernos muy largos, estas temperaturas alcanzan puntos de congelación que usualmente bordean entre -1,8°C en invierno y breves aumentos de temperatura en el verano alrededor de 1°C (Peck, 2005; Barnes *et al.*, 2006).

Aunque las fluctuaciones anuales en la temperatura del mar de la península antártica raramente exceden los 3°C, estas temperaturas han sido bajas y estables por un largo periodo de evolución (Peck, 2005).

Las grandes diferencias climáticas y geográficas que existen entre la zona continental antártica y la zona con influencia marítima, se reflejan también en su flora y fauna. De este modo, mientras la zona continental antártica se caracteriza por una gran pobreza en especies vegetales y animales, los mares y zonas litorales son particularmente ricos en formas biológicas, estas formas se caracterizan en especies marinas antárticas consideradas altamente estenotérmicas (Peck, 2005; Portner *et al.*, 2007). No obstante, debido a las rigurosas condiciones climáticas, los exponentes de la vida antártica han tenido que desarrollar distintos mecanismos adaptativos, que incluyen desde hábitos de comportamiento, hasta complejas adaptaciones fisiológicas, que son interesantes de estudiar.

### **2.1.1 Organismos ectotermos antárticos, adaptación y diversidad de especies.**

La mayor parte de los organismos antárticos son considerados ectotermos, es decir organismos que regulan su temperatura corporal por intercambio de calor con el ambiente presentando un bajo metabolismo (Barriga, 2006). A la vez estos organismos se caracterizan por vivir a un estrecho rango de temperaturas (climas muy estables) y soportar pequeñas variaciones, por lo que se consideran estenotermos.

Los organismos antárticos son altamente especializados a reducidos rangos de temperatura, han desarrollado una serie de estrategias de tolerancia y adaptación al frío, que les permite compensar el efecto de las bajas temperaturas (Gerday *et al.*, 2000; Portner *et al.*, 2007). Entre las estrategias de adaptación al frío, estos organismos han desarrollado una vasta disposición de ajuste, que dependiendo del organismo, van desde un nivel molecular (modificaciones enzimáticas, la síntesis de moléculas especializadas de protección como proteínas de estrés al frío o proteínas anticongelantes), nivel celular y subcelular (regulación de la fluidez de la membrana celular, la regulación de los canales iónicos, la modificación de las cinéticas de polimerización/despolimerización de los microtúbulos, el aumento del contenido celular de mitocondrias, etc.), hasta un nivel fisiológico (modificaciones en las vías bioquímicas, dormancia estacional, bajas tasas de crecimiento, desarrollo, metabolismo y bajos niveles de actividad, con pequeñas o nula evidencia de compensación de la temperatura) (Barriga, 2006).

En general las tasas de crecimiento de las especies antárticas son entre 2 a 5 veces más bajas comparadas con especies tropicales (Peck, 2005; Portner *et al.*, 2007). No obstante a medida que aumenta la temperatura, la capacidad de los organismos para realizar alguna actividad esencial disminuye rápidamente antes de alcanzar los límites letales, por ejemplo los ostiones son incapaces de nadar a 2°C y el 50% de las poblaciones de almejas y lapas no pueden realizar sus actividades esenciales entre 2 y 3 °C (Peck, 2005).

La supervivencia de los organismos ectotérmicos, así como la distribución de las especies está relacionada estrechamente con el régimen de temperatura, estos organismos toleran fluctuaciones de temperatura dentro de ciertos límites (van Dijk *et al.*, 1999). Estas especies marinas viven en un continente cuya costa cubre menos grados de latitud, sus condiciones

fisiológicas son sencillas y tienen largos periodos generacionales, si se compara con otros continentes estas condiciones serian más desfavorables (Peck, 2005).

### **2.1.2 Fauna bentónica de la Antártica.**

Las comunidades bentónicas son un conjunto de seres vivos que habitan en el fondo marino, se caracterizan por un bajo crecimiento, largos periodos generacionales (las generaciones tienen un rango de 10-20 años), bajas tasas metabólicas y bajos niveles de actividad (Peck, 2005). Los largos ciclos de vida y los lentos ritmos de reproducción y crecimiento de estos invertebrados antárticos les han permitido crear comunidades altamente estructuradas y maduras, de forma que la fauna actual es el resultado de una larga y compleja historia evolutiva (Teixidó, 2004).

Las comunidades bentónicas dependen de la producción primaria que se genera en la superficie iluminada de la columna de agua, puesto que el flujo de materia que se exporta desde esta zona alimenta a los organismos del fondo marino, influyendo en su abundancia. Griffiths (2010) señala que uno de los factores principales que controlan la producción primaria es el hierro, siendo la disponibilidad de este mineral muy limitada.

El ambiente de las comunidades bentónicas antárticas se caracteriza; por temperaturas bajas y constantes (entre -2 y -1,3 °C, a 300 m de profundidad), una moderada salinidad, un importe mínimo de sedimentos terrestres y por una marcada estacionalidad de luz durante el corto periodo de primavera-verano (Teixidó, 2004).

Los patrones de distribución y abundancia, que inciden en las comunidades bentónicas de la antártica se encuentran influenciadas por factores bióticos (producción primaria, capacidad de dispersión, predación, competición y el tipo de comunidad) y abióticos (estacionalidad, profundidad, sedimentación, disponibilidad de alimentos, perturbaciones causadas por el hielo, entre otros). Sin embargo el principal factor que influye en la distribución del bentos antártico es el hielo, ya sea de forma directa (erosión y destrucción de los organismos bentónicos), como indirecta (temperatura del agua, nivel de luminosidad, corrientes y salinidad) (Teixidó, 2004; Griffiths, 2010). Por ejemplo las comunidades bentónicas



presentan una disminución en biomasa de menor a mayor profundidad con diferencias notables en las áreas de perturbación debido al hielo.

En la actualidad el Registro de Especies Marinas Antárticas (RAMS) recopila y administra una lista taxonómica de especies presentes en el medio ambiente marino antártico, el registro cuenta con más de 8.200 especies conocidas. La diversidad marina de la Antártica (pelágica y bentónica) es relativamente alta a nivel de filum y clase, registrándose más de 4100 especies de invertebrados bentónicos (Clarke y Johnston, 2003; Clarke, 2008; Griffith, 2010).

Los estudios han demostrado que el bentos antártico posee un alto nivel de endemismo y es más rico en término de especies, abundancia y biomasa. Aunque la riqueza de especies difiere entre los grupos principales, los taxones que poseen alta riqueza de especies son los briozoos, esponjas y anfípodos, en comparación a gasterópodos, bivalvos e isópodos que muestran una menor riqueza (Clarke, 2008; Griffiths, 2010).

No obstante el componente más importante de las comunidades bentónicas antárticas son los organismos suspensívoros, grupo de organismos sésiles del que forman parte esponjas, cnidarios, briozoos, equinodermos, procordados entre otros, que se alimentan de las partículas suspendidas en el agua y arrastradas por las corrientes, por lo que es considerada la estrategia trófica más exitosa en los océanos (Teixidó, 2004). En comparación con regiones tropicales y templadas, Clarke y Johnston (2003) indican que picnogónidos, equinodermos y muchos grupos de suspensívoros de la Antártica son más ricos y diversos.

De los grupos que son principalmente bentónicos los moluscos y equinodermos se encuentran entre los organismos más abundantes y mejor representados en los conjuntos de datos existentes, ambos poseen un alto número de registros georeferenciados representando aproximadamente 93 y 79% de las especies conocidas. Según los datos taxonómicos del Registro de Especies Marinas Antárticas se han descrito 565 especies en equinodermos (Griffiths, 2010).

Es importante destacar que casi todas las especies del bentos antártico que se conocen, se han descrito usando técnicas morfológicas tradicionales y solo hace unos pocos años la

comunidad científica ha adoptado técnicas moleculares aplicadas al estudio de la diversidad marina Antártica, revelando la existencias de numerosas especies crípticas en la región y aumentando nuestra percepción de la biodiversidad (Clarke, 2008; Griffiths, 2010).

## **2.2. Erizo de mar antártico: *Sterechinus neumayeri*, características e importancia.**

Los erizos de mar se clasifican dentro de los equinodermos (Orden Echinoidea familia *Echinidae*), son una diversa clase de invertebrados bentónicos que están presentes en una abundancia relativamente alta en la mayoría de los biomas marinos (Lister *et al.*, 2010). Dentro de los equinodermos que habitan la Antártica y regiones sub-antárticas, se encuentran las especies del género *Sterechinus*, tales como *S.agassizii*, *S.antarticus*, *S.diadema*, *S.dentifer*, *S.neumayeri* y *S.bernasconiae*.

El erizo antártico *Sterechinus neumayeri*, es uno los erizos de mar más comunes y extensamente distribuidos en las costas antárticas (Brockington y Clarke, 2001; King y Riddle *et al.*, 2001). Es el más abundante y juega un importante rol en la red trófica bentónica (Lee *et al.*, 2004), se considera un organismo ectotérmico y estenotérmico. Vive a temperaturas que bordean los 0°C, no sufren grandes cambios térmicos y son sensibles a pequeñas variaciones de temperatura.

Debido a su abundancia, distribución geográfica y fácil disponibilidad, estos organismos han sido estudiados en muchos campos de la biología antártica, como biología reproductiva, embriología, ecología, fisiología y toxicología.

Trabajos realizados por Lee *et al.* (2004), revelan que *S.neumayeri* es un grupo hermano al linaje de *L.albus* y *P.lividus*, separado de la estirpe 24-35 millones de años, donde la divergencia entre *S.neumayeri* y *L.albus* coincide con la separación de la Antártica de América del Sur.

Con respecto al desarrollo de esta especie, la madurez reproductiva ocurre a partir del invierno hasta principios del verano, mientras que el desove se produce entre mayo y diciembre (King y Riddle *et al.*, 2001). Debido a las bajas temperaturas de las aguas antárticas en las que ocurre el desarrollo de esta especie, su tasa de desarrollo es baja (King y Riddle *et*

*al.*, 2001; Pace y Manahan, 2007). En cuanto a los embriones y larvas de *S.neumayeri* comparadas con otros equinodermos tienen tasas metabólicas relativamente bajas y requieren de 20 días de desarrollo embrionario antes de ser capaces de alimentarse, periodo en que depende de las reservas depositadas en lo que es un huevo relativamente pequeño (Lister *et al.*, 2010).

Se considera a *Sterechinus neumayeri* como un organismo estructurador de comunidades marinas y tiene un rol fundamental como eslabón, es decir que si es afectado, también lo son otros externos asociados, como algas u otros animales, además es ecológicamente importante, ya que si es afectado directamente también lo será todo el ecosistema, por lo tanto podría ser un importante indicador del cambio climático, ya que la estabilidad térmica a la cual han estado adaptados los erizos antárticos se ha prolongado por miles de años, por lo tanto, si aumenta la temperatura por el calentamiento global se pueden afectar sus respuestas fisiológicas.

### **2.2.1 Respuesta inmune de los erizos de mar.**

Tanto invertebrados como vertebrados, presentan un sistema inmunitario de defensa. En el caso de los invertebrados, éstos poseen únicamente un Sistema Inmune Innato, donde participan células con capacidad fagocítica que se conocen como “celomocitos o hemocitos”, dependiendo de si el invertebrado posee o no cavidad celómica.

Varias investigaciones identificaron un sistema circulatorio abierto en equinodermos adultos, que presenta en su cavidad celómica un tipo de célula inmunitaria denominada como celomocitos, células que actúan como efectoras de las respuestas de defensa a través de la fagocitosis, encapsulación, citotoxicidad, producción de agentes antimicrobianos (Shimada *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2006), formación de coágulos celulares y como mediadores principales de rechazo de aloinjertos (Smith *et al.*, 2006). El comportamiento de estas células es similar a la fagocitosis de los macrófagos de los vertebrados.

Uno de los erizos de mar más estudiados en relación con las capacidades de defensa inmunológica corresponde al *Strongylocentrotus* (Smith *et al.*, 2006), que presenta varios tipos de celomocitos que se diferencian en sus atributos estructurales y se clasifican en

cuatro categorías (los fagocitos, las células esféricas rojas, las células esféricas incoloras y las células vibrátiles). Las proporciones de cada tipo de celomocitos en el líquido celómico varían considerablemente en el erizo de mar tanto a nivel inter e intra individual, esta variabilidad se puede reflejar en el estado nutricional, inmunológico y homeostático (Smith *et al.*, 2006).

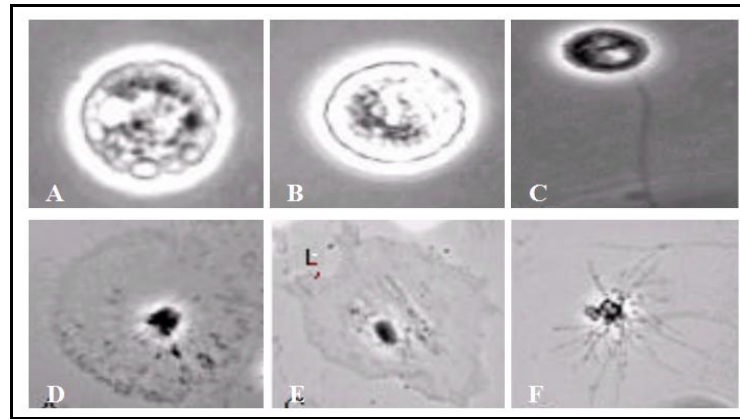
Según el criterio que se desee emplear existen varias maneras de clasificar a las células celómicas. Smith *et al.* (2006) clasifica las células celómicas en:

**2.2.1.1 Células esféricas rojas:** Se encuentran entre 7-10% del líquido celómico, son células ameboides con inclusiones esféricas rojas (Fig.1A). Poseen actividad antibacteriana debido a que contiene echinocroma A, una naftoquinona que da a las células su color rojo característico. En presencia de bacterias echinocroma A es degranulado y tiene propiedades antimicrobianas contra bacterias Gram positivas y Gram negativas.

**2.2.1.2 Células esféricas incoloras:** corresponde entre 3,7-25% del líquido celómico, son células ameboides e incoloras con inclusiones esféricas y se desconoce su función (Fig.1B).

**2.2.1.3 Células vibrátiles:** corresponde entre 11-20 % del líquido celómico, son células redondas e incoloras con un solo flagelo, que puede impulsarse a través del líquido celómico (Fig.1C). Su función es otorgar movimiento o agitación al fluido celómico y está asociado con la coagulación.

**2.2.1.4 Células fagocíticas:** constituyen la mayor parte del líquido celómico (40-80%). Se pueden encontrar 3 tipos. Tipo1: fagocitos discoidales que presentan un núcleo denso y citoplasma claro (Fig.1D), cumplen funciones de encapsulación, opsonización, quimiotaxis y fagocitosis. Tipo2: fagocitos poligonales que tienen un núcleo granular (nucléolo evidente), forma larga delgada e irregular (Fig.1E), participa en quimiotaxis, opsonización, fagocitosis y posee actividad antibacteriana debido a la lisozima. Tipo3: fagocitos pequeños, son los más pequeños con un citoplasma reducido (Fig.1F) y se desconoce su función.



**Figura 1.**Tipos de celomocitos en erizos de mar. (A) Células esféricas rojas, (B) Células esféricas incoloras. (C) Células vibrátiles. (D) Fagocito discoidal. (E) Fagocito poligonal. (F) Fagocitos pequeños. Imagen tomada de Smith *et al* (2006).

En erizos adultos los celomocitos están presentes en altas concentraciones en el líquido celómico, sobre todos los tejidos y órganos del animal (Smith *et al.*, 2006). Por otra parte, en el líquido celómico se puede encontrar una variedad de factores humorales, como lectinas, aglutininas y lisinas que son importantes para la defensa contra huéspedes patógenos y otras sustancias extrañas (Shimada *et al.*, 2002). Estas características se pueden encontrar en la mayoría de los erizos de mar.

El sistema inmune de los equinodermos es uno de los más complejos en los invertebrados, sobre todo en lo relacionado con el reconocimiento de patógenos. La secuenciación del genoma de *Strongylocentrotus purpuratus* demostró que codifica aproximadamente 23.300 genes, el estudio reveló características de genes comunes a todas las especies, así como varios genes específicos para los deuterostomados (Sea Urchin Genome Sequencing Consortium, 2006; Stumpp *et al.*, 2011). Del mismo modo este hallazgo permitió identificar una gran cantidad y diversidad de genes de inmunidad innata, que estarían involucrados en procesos inmunológicos, como el reconocimiento de patógenos, sistema del complemento, hematopoyesis, etc. También se han identificado genes para los receptores de inmunidad, como por ejemplo, los receptores Toll o Toll- like (TLRs) cuya función es el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). En cuanto a la inmunidad innata, el erizo no solo es células inmunes, sino que también presenta genes y moléculas implicadas, (desde el complemento hasta péptidos antimicrobianos).

### **2.3 Calentamiento global y posibles efectos en organismos marinos antárticos.**

Se ha aceptado internacionalmente que estamos en un periodo de cambio global, donde el calentamiento global es uno de los principales factores que afecta la supervivencia de especies antárticas que viven en ambientes térmicamente estables (Park *et al.*, 2007), el incremento de la temperatura afectaría el crecimiento y sobrevivencia de los organismos antárticos.

La península antártica es la región de la Tierra que ha sufrido los cambios climáticos más rápidos: la temperatura superficial del agua de mar a lo largo de la península antártica occidental ha aumentado en más de 1°C durante los últimos 50 años y la cubierta de hielo se ha reducido drásticamente en 15 años (Meredith y King, 2005; Peck, 2005; Clark *et al.*, 2008). No obstante otros reportes han documentado una tendencia del calentamiento en 0.17°C a 100-700 metros de profundidad entre 1950 y 1980, del mismo modo, el continuo calentamiento durante los últimos 20-30 años a elevado en promedio las temperaturas del océano alrededor de 0,2°C (Portner *et al.*, 2007).

Actualmente los modelos predictivos prevén que la temperatura media del mar aumentará alrededor de 2°C para el año 2100, lo que provocaría que los organismos marinos antárticos estén expuestos más allá de sus límites de supervivencia (Peck, 2005). Para enfrentar estos cambios los organismos pueden optar ya sea a la utilización de la flexibilidad fisiológica, desarrollo de nuevas adaptaciones o bien migrar a nuevos o mejores sitios.

A pesar de que los invertebrados antárticos tienen la capacidad de sobrevivir a temperaturas entre 5 y 12°C por encima de la temperatura mínima del mar de -2°C, ellos comienzan a perder críticamente sus funciones biológicas a temperaturas de 2-3°C (Clark *et al.*, 2008). Del mismo modo Peck (2005) y Portner *et al.* (2007) sostienen que cuando se somete a algunas especies marinas antárticas a experimentos térmicos, estas mueren a temperaturas entre 5 y 10°C sugiriendo que los límites superiores de temperatura están definidos por la pérdida aeróbica y el fracaso de los mecanismos de suministro de oxígeno.

Los efectos inducidos por el clima en organismos marinos se atribuyen mayoritariamente a cambios en el régimen de temperatura. Estos efectos pueden ser directos, efectos de la temperatura por si misma o indirectos cambios inducidos térmicamente en la composición de

la cadena trófica, así como fluctuaciones en la disponibilidad del fitoplancton, cambios en la corriente oceánica y estratificación o variaciones en los niveles nutricionales (Portner *et al.*, 2007).

La fauna marina antártica se caracteriza por una sensibilidad térmica especie-específica que hace que sean más vulnerables a variaciones de temperatura, de este modo, la tendencia del calentamiento climático afectaría de forma distinta a las especies antárticas (Portner *et al.*, 2007). Por ejemplo braquiópodos, bivalvos, y ostiones, se ven afectadas por la elevación de la temperatura en tan solo 1 o 2°C, sin embargo otras especies como la estrella de mar (*Odontaster validus*), el pez antártico (*Pachycara brachycephalum*) y la lapa antártica (*Nacella concinna*) pueden tolerar temperaturas entre 4-5°C, mientras que el nemertino carroñero (*Parborlasia corrugatus*) puede tolerar hasta 10°C (Portner *et al.*, 2007). De esta manera, mientras los peces antárticos pueden aclimatarse térmicamente, en invertebrados marinos no ocurre lo mismo ya que son más sensibles térmicamente que los peces (Portner *et al.*, 2007). Entonces la pregunta es ¿cómo los organismos antárticos responderán al cambio climático que afecta los océanos antárticos? y ¿serán capaces de aclimatarse a estas condiciones? De ahí la importancia de estudiar a los organismos por separado (especie-específica) ya que no todos responden de la misma manera a elevadas temperaturas (se han adaptado evolutivamente estableciendo sus óptimos térmicos al cual puede funcionar) (Podrabsky y Somero, 2004), estos efectos térmicos podrían tener consecuencias tan importantes que alterarían tanto la función celular como la función fisiológica o bien el fenotipo de un organismo.

#### **2.4 Respuesta de estrés térmico y proteínas de shock térmico.**

El éxito de cualquier organismo no solo depende de la adaptación a su nicho ecológico, sino también a la capacidad de sobrevivir perturbaciones ambientales en relación a su homeostasis, una situación genéricamente descrita como estrés (Clark *et al.*, 2008).

Diller (2006) define el estrés térmico, como la intensidad de la temperatura y la duración de exposición impuesta a un organismo, tejido o célula. La respuesta de estrés térmico es un mecanismo que ha sido altamente conservada a través de la evolución (Parsell y Lindquist, 1993; Park *et al.*, 2007; Clark *et al.*, 2008), no sólo como un fenómeno fisiológico, sino que

también a nivel de proteínas individuales (Parsell y Lindquist, 1993). El efecto de la temperatura se manifiesta en todos los niveles de organización biológica así como a nivel molecular. Los cambios en temperatura afectan a la fluidez de las membranas lipídicas, conformación de las proteínas y la estabilidad de la estructura de doble hélice del ADN (Hochachka y Somero, 2002; Podrabsky y Somero, 2004). La respuesta de estrés térmico es un evento de activación de genes a nivel molecular en respuesta a un estrés fisiológico tal como altas temperaturas (Hammond y Hofmann, 2010).

Young (1990) define a las proteínas de estrés, como aquellas proteínas cuyos niveles aumentan durante estímulos estresantes. Las proteínas de estrés son una familia ubicua, producto de genes que son expresados en altas concentraciones en presencia de un estrés (Diller, 2006), la principal clase de estas proteínas son las proteínas de shock térmico (Hsp). La producción de Hsps es la clásica respuesta celular de los organismos a cambios ambientales (Clark *et al.*, 2008), protegen a las células de agresiones, tales como isquemia, privación de ATP, radicales libres, hipoxia, desecación, calor o frío (Parsell y Lindquist, 1993; Diller 2006; Kohno *et al.*, 2010).

Las proteínas de shock térmico juegan un rol fundamental como reguladores de la función celular normal, tienen la propiedad de plegar, ensamblar y transportar proteínas recién formadas a organelos específicos (Diller 2006; Ueda y Boettcher, 2009). No obstante, cuando los organismos son expuestos a algún estrés (abiótico o biótico), cumplen funciones como defensa celular, estabilizando, replegando y removiendo proteínas denaturadas, incrementando la expresión y facilitando la síntesis de nuevas proteínas, manteniendo la integridad y función de la célula hasta que mejoren las condiciones (Young, 1990; Diller 2006; Clark *et al.*, 2008; Ueda y Boettcher, 2009).

Actualmente las Hsps han recibido la mayor atención en organismos ya que la expresión es altamente variable en presencia o ausencia de estímulos (Tutar *et al.*, 2006).

Diller (2006) sostiene que el aumento en la concentración de Hsp en células afectadas por un estrés, se presenta con un curso de tiempo predecible que consiste en un incremento progresivo hasta un valor máximo, seguido por un periodo temporal de la elevación y posteriormente un descenso a niveles normales, por lo tanto, la sobreexpresión de Hsp es un fenómeno transitorio con una constante que suele ser de unos días. Por ejemplo, un aumento



repentino de la temperatura u otro tipo de estrés, inducen la síntesis de proteínas de estrés térmico (Hsps).

#### **2.4.1 Clasificación y funciones de las Hsps.**

La interrupción del proceso celular normal puede causar un rápido incremento en la síntesis de Hsps, estas proteínas son diversas en tamaño y composición oligomérica, se pueden encontrar en el núcleo y/o citoplasma, algunas expresadas constitutivamente, otras inducidas por calor o frío (Parsell y Lindquist, 1993).

En eucariotas, muchas familias comprenden varios miembros que difieren en el tipo de inducción, localización intracelular y función (Feder y Hofmann, 1999).

Existen varios trabajos que han clasificado a las Hsps en distintas familias según su tamaño molecular en kilodaltons (kDa), sin embargo, Lo *et al.* (2004) y Park *et al.* (2007) las clasifican en: Hsp110, Hsp90 (85-90 kDa), Hsp70 (68-73 kDa), Hsp60, Hsp47 y las Hsps de bajo peso molecular (16-24 kDa).

**2.4.1.1 Hsp90:** se une a varias proteínas celulares, incluyendo receptores esteroides (Farcy *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2007) y proteínas quinasas, se asocia con proteínas del citoesqueleto tales como actina y tubulina (Farcy *et al.*, 2006) y junto a otras chaperonas asisten en el plegamiento de polipéptidos nacientes (Freeman *et al.*, 1999). Se ubica en el núcleo y citoplasma (Barragán-Veloz, 2007).

**2.4.1.2 Hsp70:** necesarias para el plegamiento de proteínas de novo, degradación de proteínas mal plegadas (Lo *et al.*, 2004), asociación y disociación multimérica, translocación de proteínas a través de membranas (Lo *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2007; Kohno *et al.*, 2010) y regulación de la respuesta de estrés (Freeman *et al.*, 1999). Se localizan en el núcleo y el citoplasma (Barragán-Veloz, 2007)

**2.4.1.3 Hsp60:** mediadores de la estabilidad y plegamiento de proteínas (Park *et al.*, 2007; Kohno *et al.*, 2010), se unen a proteínas desplegadas, previenen la agregación y se localizan en las mitocondrias (Barragán-Veloz, 2007).

Podrabsky y Somero (2004) señalan que las Hsps de bajo peso molecular parecen jugar un importante rol en respuesta a una menor variación de temperaturas mientras que Hsp70 y Hsp90 aumentan su expresión a elevadas temperaturas. De estas proteínas, las Hsp70s están entre las proteínas altamente conservadas (Park *et al.*, 2007).

Al igual que otros organismos los erizos de mar presentan distintos tipos de Hsps. Roccheri *et al.* (2004) encontraron que la continua exposición de concentraciones de cadmio en embriones de *P.lividus* induce la síntesis de diferentes proteínas de estrés (90,72-70, 56, 28 y 25 kDa), con un notable incremento en la síntesis de Hsp (72-70, 56 y 25 kDa). Hsp60 también es sintetizada por erizos de mar, pero sus niveles de expresión no se ven afectados por estrés de acuerdo a lo demostrado por Bonaventura *et al.* (2011) en la investigación de proteínas de estrés provocadas en respuesta a la radiación con rayos-X.

Sumado a lo anterior la chaperonina mitocondrial Hsp56 es otro tipo de Hsp posible de encontrar en erizos de mar, Liegro y Rinaldi (2007) demostraron que esta chaperonina en *P.lividus* se expresa de forma constitutiva durante el desarrollo de embriones, incrementando su expresión después de un estrés térmico y tratamiento con cadmio. En cuanto al mensajero este se expresa en todas las etapas del desarrollo aumentando su cantidad en embriones bajo estrés.

#### **2.4.2 Hsp70: constitutivas e inducibles.**

Hsp70 es una familia genética que codifica proteínas de shock térmico de 70 kDa, chaperonas moleculares altamente conservadas, involucradas en el plegamiento y estabilidad de proteínas (Noonan *et al.*, 2007), replegamiento y translocación de proteínas denaturadas (Hammond y Hofmann, 2010), presentan alta afinidad por péptidos hidrofóbicos y su diversa función depende las uniones reguladas por ATP (Tutar *et al.*, 2006).

Esta familia puede ser inducida por varios factores de estrés que incluyen; radiación, metales pesados, isquemia, estrés térmico y otros estímulos, activando los factores de transcripción de shock térmico que a su vez inducen a la síntesis de Hsp70 (Noonan *et al.*, 2007). Bajo condiciones de estrés las Hsp70s protegen a las células de la exposición de uniones

hidrofóbicas, previniendo las interacciones con agregados de proteínas y ayudando al repliegado de las proteínas denaturadas (Tutar *et al.*, 2006).

Los miembros de la familia Hsp70 (isoformas de Hsp70) se han localizado en diversos compartimentos celulares tales como, citosol, mitocondrias y retículo endoplasmático (Chen *et al.*, 2006; Tutar *et al.*, 2006). Las isoformas citológicas incluyen; las que son expresadas de forma constitutiva Hsc70 y las que se expresan cuando las células son expuestas a estrés Hsp70-inducible (Franzellitti y Fabri, 2005; Chen *et al.*, 2006; Tutar *et al.*, 2006; Ueda y Boettcher, 2009).

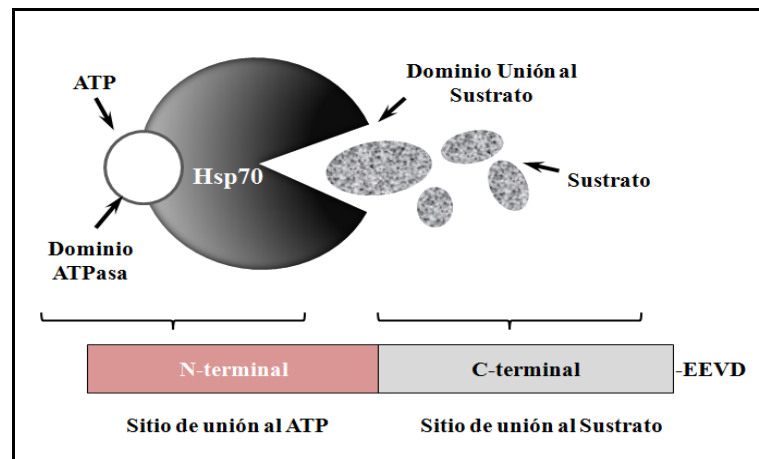
En el caso de los erizos de mar, específicamente en embriones de *P.lividus* las formas inducibles de Hsp70 (Hsp 70 y 72 kDa) son diferentes en peso molecular de la expresada constitutivamente Hsc (75 kDa), y no están presentes en condiciones normales (Geraci *et al.*, 2004).

Las Hsc70, son proteínas que se expresan de manera constitutiva en condiciones normales y juegan un papel esencial en el metabolismo de las proteínas. En cuanto a los genes de estas proteínas contienen intrones (Lo *et al.*, 2004), los niveles basales de expresión son altos y muestran relativamente pequeños cambios (Kohno *et al.*, 2010) o se inducen levemente (Lo *et al.*, 2004) en respuesta a un estrés. Fisiológicamente Hsc70 funciona como una proteína housekeeping, participa en muchos procesos fisiológicos celulares, como el plegamiento de polipéptidos recién sintetizados, translocación, formación y desmontaje de complejos de proteínas, degradación de proteínas mal plegadas y presentan una gran afinidad por ATP, pero la actividad intrínseca ATPasa es relativamente débil (la hidrólisis del ATP puede ser estimulada por otros péptidos) (Lo *et al.*, 2004).

Las proteínas Hsp70 inducible se expresan débilmente en condiciones normales, pero luego de un estrés son estimuladas permitiendo a las células enfrentar estímulos adversos. Respecto a los genes inducibles, son expresados débilmente en condiciones normales, pero su expresión aumenta rápidamente en respuesta a un estrés (Lo *et al.*, 2004; Kohno *et al.*, 2010). Se ha considerado que las Hsp70 inducibles, son los primeros genes en activarse durante la respuesta de estrés térmico, por lo que han sido extensamente estudiadas para medir este tipo de respuestas (Hammond y Hofmann, 2010).

Aunque los patrones de expresión de estos genes son bastante diferentes, sus proteínas comparten características estructurales. Respecto a esta situación Parsell y Lindquist (1993) considera que todas las proteínas Hsp70 se dividen en dos dominios, el dominio N-terminal que es el más conservado y que tiene alta afinidad por los sitios de unión al ATP, el dominio C-terminal responsable de la unión sustrato proteína-polipéptido y que es poco conservado. No obstante Lo *et al.* (2004) propone que la familia Hsp70 se compone de tres dominios; el dominio N-terminal ATPasa (adenosina trifosfatasa) de 44kDa que se une e hidroliza ATP, el dominio péptido-unión de 18 kDa que interactúa con polipéptidos, y el dominio C-terminal altamente conservado, que lleva consigo la secuencia terminal EEVD presente en todas las familias Hsp70 eucariotas. En contraste a estos dos postulados Chen *et al.* (2006) sostiene que estas proteínas se componen de dos dominios: dominio N-terminal de unión al ATP de 44 kDa y el dominio C-terminal sitio de unión al sustrato de 30 kDa, que lleva consigo la secuencia terminal EEVD altamente conservada. Freeman *et al.* (1995) aclara que la delección o mutación de EEVD afecta la actividad ATPasa, la capacidad de interactuar con sustratos, sugiriendo que el motivo EEVD está implicado en la regulación intramolecular de la función Hsp70, actuando como motivo regulador en eucariotas.

Si bien cada uno de estos postulados difiere en que dominio es el más conservado y cuantos lo conforman, aun así concuerdan que el dominio N-terminal es el sitio de unión al ATP y que el dominio C-terminal es el sitio de unión al sustrato, que lleva consigo la secuencia terminal EEVD (Fig.2).



**Figura 2.** Características estructurales de las proteínas Hsp70. Dominio N-terminal corresponde al sitio de unión al ATP y el dominio C-terminal es el sitio de unión al sustrato, el extremo C-terminal presenta la secuencia EEVD altamente conservada en los eucariotas. Modificado de Bioscience Horizons <http://biohorizons.oxfordjournals.org/content/1/1/9/F3.expansion>

### 2.4.3 Características de los genes Hsp70.

Todas las especies tienen genes Hsp pero estos varían en los patrones de expresión (Feder y Hofmann, 1999). A través de la evolución de vertebrados e invertebrados, se ha producido una conservación sustancial de los patrones de expresión génica de Hsp70 y Hsc70 (Piano *et al.*, 2005), sin embargo, existen algunas características que hacen que un gen inducible sea distinto de un gen constitutivo.

Respecto los genes Hsc70 contienen intrones en su secuencia, son ligeramente inducibles y no presentan elementos de shock térmico (HSEs) (Lo *et al.*, 2004; Kourtidis *et al.*, 2006). A través de alineamiento múltiple de secuencias Hsc70, Kourtidis *et al.* (2006) sostiene que todos los genes constitutivos de Ostreidae poseen un tetrapéptido NQSQ adicional en el dominio ATPasa siendo una característica única de estas proteínas.

En el caso de a los genes Hsp70 inducibles, la ausencia de intrones, la presencia de elementos HSE y GAGA en su secuencia genómica y el incremento de la expresión en respuesta a un estrés son indicativos de genes inducibles. En varias especies eucariotas, los genes Hsp70 inducibles existen en al menos dos copias, que usualmente se agrupan en la misma región genómica como pares de genes con orientaciones de la transcripción invertida y en muchos casos estos genes tienen secuencias de nucleótidos idénticas o similares (Kourtidis *et al.*, 2006; Kohno *et al.*, 2010). Por otra parte Kourtidis *et al.* (2006) demostró que las secuencias de genes Hsp70 inducibles poseen un residuo de serina extra, altamente conservada en el dominio ATPasa y que este residuo está presente en todas las Hsp70s inducibles de los invertebrados estudiados. Con respecto a las cajas TATA y CAAT se detectan río arriba de la región 5' en ambos genes Hsp70 y Hsc70. (Kohno *et al.*, 2010)

### 2.5 Modulación transcripcional de la expresión del gen Hsp70.

El rol de las Hsps tanto en células normales y estresadas requiere la existencia de procesos regulatorios complejos para asegurar el correcto patrón de expresión, no obstante, el mecanismo que regula la expresión debe ser sensible y rápido (Diller, 2006; Stephanou y Latchman, 2011).

En general la inducción e incremento en la síntesis de Hsps en respuesta estrés se logra mediante la activación de miembros específicos de una familia de factores de transcripción, los factores de shock térmico (HSFs) que se unen específicamente a elementos de shock térmico (HSE) que se distribuyen en los promotores de los genes que codifican Hsps (Sconzo *et al.*, 1997; Diller, 2006; Stephanou y Latchman, 2011), esto conlleva a la transcripción de Hsp ya que todos los genes de shock térmico se activan por HSF (Sconzo *et al.*, 1995).

En cuanto a HSE se define como secuencias de 5 pb, NGAAN y su palíndromo NTTCN, esta secuencia especial corta se encuentra a unos 20 nucleótidos en la región 5' río arriba de la caja TATA, aunque la inducción parece ser más eficiente cuando los HSE están más cerca de la caja TATA (Burdon, 1986; Sconzo *et al.*, 1997). Por otra parte no todas las HSEs tienen repeticiones invertidas perfectas, no obstante para obtener un alto grado de HSF unido al DNA al menos dos secuencias NGAAN han demostrado ser perfectas (Sconzo *et al.*, 1997).

Se han descrito varios trabajos de la estructura y regulación de HSF en diferentes especies. Sin embargo, gracias a los trabajos de Sconzo *et al.* (1997) y Giudice *et al.* (1999) relacionados con los mecanismos de activación de genes Hsps en embriones de erizos de mar (*P.lividus*), se sabe que al igual que otros organismos en estos invertebrados también existen factores de shock térmico (HSFs) que regulan la síntesis de Hsp70. Por otra parte Sconzo *et al.* (1995) aclara que probablemente las distintas tasas de transcripción génica de Hsp70 en erizos de mar, se debería a la presencia de diferentes tipos de HSFs involucrados en la respuesta de shock térmico transiente o sostenida, otra explicación alternativa es que la estabilidad del ARNm de Hsp70 dependa de la temperatura.

### **2.5.1 Mecanismo que regula la expresión de Hsp70.**

Wirth *et al.* (2003) aclara que en eucariotas la regulación de la expresión de Hsp70 se encuentra a nivel transcripcional, aunque varía en las diferentes especies.

Cabe destacar que en condiciones normales, el grado de expresión de Hsp70 depende de la actividad metabólica, no obstante, la exposición de la célula a un estrés responde a tres etapas. La primera etapa es la alteración traducida a nivel molecular (la degradación de proteínas se traduce en pérdida de la función y formación de agregados insolubles). La segunda etapa es la

respuesta de shock térmico en sí, se caracteriza por la activación transcripcional de genes Hsp70 y se detecta un nivel mucho mayor que en condiciones normales. La tercera etapa es la fase de recuperación, durante la que se corrigen las alteraciones y el proceso termina con la interrupción en la activación de genes Hsp (Wirth *et al.*, 2003)

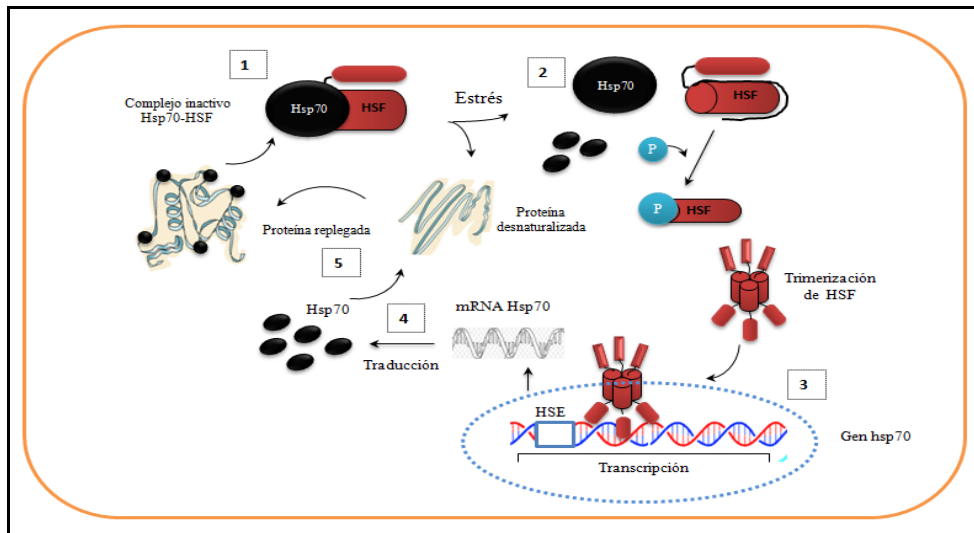
Como ya se describió anteriormente los ARNm de genes Hsp70 inducibles no tienen intrones, por lo tanto no requiere de la maduración nuclear y está disponible rápidamente en el citoplasma, donde su secuencia líder promueve la traducción.

La inducción de Hsp requiere de la activación y translocación en el núcleo del factor de shock térmico (HSF), que a continuación reconoce secuencias específicas del elemento de shock térmico (HSE), presente en múltiples copias en el promotor del gen Hsp70, la unión de HSE a los genes Hsp70 es necesario para la transcripción (Burdon, 1986).

En condiciones normales HSF se encuentra en el citoplasma y en el núcleo como un monómero inerte que carece de actividad transcripcional. La unión al ADN y el dominio de transactivación de la transcripción es suprimida por interacciones intramoleculares y fosforilación de residuos serina (importante en la activación transcripcional de HSF). En eucariotas cuando se produce un estímulo por ejemplo, un estrés térmico, causa la desrepresión de HSF, esta situación conlleva a la formación de un trímero con alta afinidad por los promotores de genes Hsp70 (HSE), facilitando así la transcripción (Wirth *et al.*, 2003). La transcripción de Hsp70 es un proceso modulado por la fosforilación de HSF, al fosforilarse HSF se activa transcripcionalmente para unirse a HSE, a su vez la fosforilación es regulada por una gran cantidad de factores y enzimas (Barragán-Veloz, 2007).

Los eventos que regulan el ciclo de activación y desactivación de HSF revelan que las Hsp70 parecen jugar un papel directo en la regulación de su propia expresión, algo así como un mecanismo de auto-regulación (Wirth *et al.*, 2003). Como se muestra en la figura 3, en ausencia de estrés, HSF está presente como un complejo de proteínas que incluye la unión de Hsp70 a HSF y otras moléculas chaperonas, este complejo no se une al ADN con eficacia por lo tanto los genes Hsp70 posiblemente no se transcriban (Fangue *et al.*, 2006). No obstante cuando se produce el estrés térmico las Hsp70s se disocian del complejo HSF y se unen a las proteínas parcial o totalmente desnaturalizadas para su correcto plegamiento, liberando a HSF de la inhibición (Carrasco *et al.*, 2010; Fangue *et al.*, 2006). Al disminuir las Hsp70 a las que

están unidas las proteínas desnaturalizadas, se produce la unión de HSF a la región 5' del gen que contiene el elemento promotor HSE, iniciándose así la transcripción de los genes Hsp70 y posterior producción de Hsp70, que conlleva a una nueva asociación HSP-HSF, evitando así la unión del HSF en la región 5' del gen precursor, controlando, por tanto, la concentración intracelular de Hsp70 (Barragán-Veloz, 2007; Carrasco *et al.*, 2010).



**Figura 3.** Mecanismo de regulación de la síntesis de Hsp70. (1) En condiciones normales, la forma monomérica de HSF se mantiene inactiva mediante la unión a Hsp70. (2) Cuando se aplica un estrés, HSF y Hsp70 se disocian, se forma la trimerización y fosforilación de HSF (forma activa) y las Hsp70 se unen a las proteínas parcialmente denaturadas. (3) La disminución de Hsp70, induce la unión de HSF a HSE, iniciando la transcripción de genes Hsp70. (4) La inducción de nuevos ARNm-Hsp70 se traducen a nuevas proteínas, incrementando la expresión de Hsp70. (5) Las Hsp70 recién sintetizadas se unen a las proteínas denaturadas para su reparación, una vez realizadas las correcciones, las Hsp70 se unen nuevamente al dominio de transactivación de HSF, inhibiendo su actividad. Modificado de Wirth *et al.* (2003) y Carrasco *et al.* (2010).

Sconzo *et al.* (1997) reportaron la presencia del factor de transcripción de shock térmico HSF en núcleos de embriones de *P.lividus* a 20°C (temperatura fisiológica), capaz de unirse específicamente al elemento de shock térmico HSE (promotor del gen Hsp70). Cuando se someten a un estrés térmico (31°C) la capacidad de unirse a HSE llega a ser mucho más alto.



## 2.6 Control de la traducción después de un estrés térmico.

Para acelerar la síntesis de Hsps el estrés térmico induce mecanismos de control de la traducción, que favorece la traducción de ARNm-Hsp y reprime la traducción de ARNm-preexistentes. Respecto a la regulación de la traducción, Burdon (1986) aclara que hay dos puntos de regulación que parecen ser importantes, sugiere que hay un cambio en el mecanismo de traducción que permite el reconocimiento exclusivo de ARNm -Hsp y segundo existen características estructurales presentes en el ARNm-Hsp que les permite ser reconocidas.

El aumento en la concentración de Hsp en células afectadas, se presenta en un curso de tiempo predecible que consiste en un aumento progresivo hasta un valor máximo, seguido por un periodo temporal de elevación y subsecuente declinación a niveles normales (Diller, 2006), pese a incluso antes de un estrés en muchos tipos celulares las Hsps constituyen 1-2% del total de las proteínas (Stephanou y Latchman, 2011).

## 2.7 Hsp70 en erizos de mar.

Las Hsp70 han sido estudiadas en diferentes especies de erizos de mar para comprender los mecanismos de respuesta frente a diferentes factores de estrés. Por ejemplo en el erizo de mar *S.purpuratus* se demostró cómo los niveles de Hsp70 y la temperatura de inducción difieren entre las poblaciones intermareales de erizos (Hofmann *et al.*, 2002). En la especie *Echinus acutus* se observó cambios en la expresión génica de Hsp70 en intestino y en el músculo de la linterna de Aristóteles después del tratamiento con sedimentos, lo que provocó aumentos significativos en la expresión del gen Hsp70 en el tejido muscular (Hughes *et al.*, 2010).

Por otra parte existen varias investigaciones que se han focalizado en la utilización de embriones de erizos de mar (modelo bien establecido en biología del desarrollo y ecotoxicología) para evaluar como el estrés puede afectar el desarrollo de embriones y a la expresión de Hsp. En estos estudios se ha demostrado que el tratamiento con metales pesados induce la síntesis de Hsp (70/72 kDa) en embriones de erizos de mar y que la exposición a distintas dosis de radiación con rayos-X provoca un incremento en los niveles Hsp70

(proteína y ARNm) (Geraci *et al.*, 2004; Bonaventura *et al.*, 2011). Chiarelli *et al.* (2011) señalan que los embriones de erizo de mar son capaces de activar diferentes estrategias de defensa contra el estrés a través de la síntesis de proteínas de choque térmico y/o la iniciación de la apoptosis cuando son expuestos a cadmio, para proteger el proceso de desarrollo en el embrión.

Los celomocitos de erizos de mar se han convertido en otro modelo de estudio utilizado para analizar la expresión de Hsp70. Matranga *et al.* (2000) demostraron que los celomocitos de *P.lividus* responden al estrés causado por cambios bruscos de temperatura y agua de mar contaminada, activando e incrementando la expresión de Hsp70.

Actualmente los estudios de Hsp70 se han ampliado considerablemente en celomocitos mediante el análisis de sus respuestas a varios factores como; temperatura, pH ácido, lesiones, metales pesados y otros contaminantes que aumentan los niveles de expresión de Hsp70, de ahí a que se estén utilizando como marcador de estrés (Matranga *et al.*, 2000; Matranga *et al.*, 2002; Pinsino *et al.*, 2007).

## **2.8 Estudios realizados en especies marinas antárticas.**

Al parecer todos los estudios que se han realizado en respuesta al estrés térmico parecen contribuir a la sobreexpresión de Hsps como un mecanismo universal de supervivencia de los organismos y/o células, excepto en aquellas especies como peces antárticos, la hydra y el ciliado antártico (*Euplotes focardii*) que no reaccionan incrementando la expresión de Hsps (Piano *et al.*, 2004; Piano *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2007). En el caso de los nototénidos antárticos se sostiene que esto no refleja la pérdida de funcionalidad (Portner *et al.*, 2007) puesto que el gen Hsp70 se ha mantenido, pero su forma de expresión ha sido alterada de inducible a constitutiva (Clark *et al.*, 2008), donde las tasas de producción son relativamente altas, sin embargo, ni la tasa de transcripción de Hsp70 ni la concentración de Hsp70 se ve reforzada por el incremento de la temperatura, la respuesta de por qué ocurre esta situación implicaría un fenómeno de desnaturalización al frío (similar a lo que ocurre por calor) constituyendo entonces un cambio adaptativo (Portner *et al.*, 2007).

Clark *et al.* (2008) al estudiar la respuesta de estrés térmico en dos especies antárticas; el equinodermo *Odontaster validus* y el crustáceo *Paraceradocus gibber* que viven a temperaturas entre  $-1,86^{\circ}\text{C}$  y  $1^{\circ}\text{C}$ , demostró que en estas especies la expresión del gen Hsp70 también está ausente. Con respecto a la ausencia en expresión de genes Hsp70 inducibles por estrés térmico, Park *et al.* (2007) sugiere que la incapacidad de inducir Hsp70 se debe a la pérdida de la vía de regulación en la expresión génica de Hsp durante la historia evolutiva.

Por otro lado en otras especies marinas especialmente en moluscos la expresión de los genes de shock térmico juega un papel fisiológico relevante en la tolerancia térmica (Piano *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2007).

## **2.9 Concepto de Biomarcador.**

Un biomarcador es un cambio en la respuesta biológica (nivel molecular, celular, bioquímica o fisiológica) que un organismo refleja frente a la exposición y/o peligro potencial, el que puede ser químico, físico o biológico (Guzmán, 2007; Toro-Restrepo, 2010). Los biomarcadores son señales identificables, evaluadas por cambios en células y tejidos, que proporcionan advertencias tempranas del daño provocado y las consecuencias biológicas de la exposición (Guzmán, 2007). Las señales pueden incluir cambios bioquímicos, histológicos, morfológicos, fisiológicos o de expresión genética (ARN y proteínas) que pueden ser observadas en el organismo y que indica un alejamiento de la condición normal (Gestel y Brummelen, 1996; Guzmán, 2007).

Si bien el uso de biomarcadores fue evidenciado durante años, actualmente han retomado mayor interés en relación al desarrollo de los análisis de riesgo ambiental (se aplica ampliamente a la contaminación ambiental). El uso de biomarcadores constituye una herramienta de gran utilidad para diagnosticar el estrés al que están sometidos los organismos.

La inducción de metalotioneína, la inhibición de acetilcolinesterasa, la proliferación de peroxisomas, la inducción del citocromo P450 etc., han sido utilizados como biomarcadores para evaluar la exposición y el efecto de la contaminación en especies marinas (Cajaraville *et al.*, 2000; Guzmán, 2007). Por ejemplo, en moluscos bivalvos la presencia de glutatión se ha

empleado como biomarcador, donde la disminución de este se asocia con el incremento de la toxicidad de metales (Guzmán, 2007).

### **2.9.1 Uso de Hsp70 como Biomarcador.**

Debido a la directa relación con el estrés celular, las Hsp70s inducibles son de gran interés para la investigación sobre el uso de su expresión como un biomarcador de daño celular (Wirth *et al.*, 2003). En muchos casos, las Hsp70s se han usado como biomarcadores porque su inducción es mucho más sensible a estrés que índices tradicionales como por ejemplo inhibición del crecimiento (Feder y Hofmann, 1999). Algunos bivalvos (ostras y mejillones), se han utilizado como organismos centinela para el biomonitoreo ambiental, donde la biosíntesis de Hsp70 se ha sugerido como un biomarcador de estrés (Piano *et al.*, 2004). El uso de Hsps como biomarcadores es más común en toxicología acuática (Feder y Hofmann, 1999).

Ante la posibilidad de utilizar a Hsp70 como un biomarcador, Clark *et al.*, (2008) en su trabajo con especies antárticas, concluyen que un biomarcador antártico (u otro tipo) es eficaz, si presenta un notable cambio en la expresión génica, haciendo referencia a que los niveles de expresión del gen biomarcador debe mostrar una fuerte señal, por encima de la variación de fondo o umbral, el cumplimiento de estas características permitirán obtener conclusiones validas cuando se apliquen sobre efectos perturbadores.

Por lo tanto, al igual de lo que sugieren otras investigaciones, la respuesta de Hsp70 en la antártica debe ser evaluada de forma especie-específica si se requiere como un biomarcador. Para una buena aplicación de un biomarcador es esencial saber cuál es el nivel normal y como es la persistencia de la respuesta en el tiempo (Gestel y Brummelen, 1996).

### 3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Actualmente el calentamiento global está provocando serios problemas, si bien se han realizado investigaciones con la finalidad de evaluar los efectos inducidos por la temperatura, existen pocos estudios en que se ha monitoreado el efecto que puede provocar el incremento de la temperatura en especies marinas antárticas que se caracterizan por una sensibilidad térmica. La escasez de estudios al respecto y la necesidad de conocer el estado de los ecosistemas marinos justifica la búsqueda de métodos precisos que permitan obtener información para poder establecer el riesgo que corren especies importantes en la red trófica bentónica como *S.neumayeri*.

Debido a la directa relación con el estrés celular y como molécula responsable de la respuesta a elevadas temperaturas, las Hsp70s son de gran interés sobre el uso de su expresión como un biomarcador, ya que su inducción es mucho más sensible a estrés que índices tradicionales.

Si bien no se tienen reportes acerca del estudio de Hsp70 en erizos antárticos, los estudios que se han realizado en otras especies marinas antárticas demuestran que el gen se ha mantenido sin variaciones en la expresión, no obstante, existen otras especies en que la expresión de Hsp70 se ve reforzada por el incremento de la temperatura, aunque presentan una baja inducción del gen. Es por esto que surge la necesidad de evaluar la respuesta de estrés térmico de manera específica en el erizo antártico.

La identificación de una proteína de estrés térmico de tipo Hsp70 en *S.neumayeri* y la determinación de la inducción ante el incremento de temperatura, permitirá determinar si los erizos antárticos poseen una respuesta de estrés térmico cuando son sometidos a estrés por calor, incluso permitirá el uso de esta molécula como un potencial biomarcador para evaluar el efecto de la elevación de la temperatura en equinodermos antárticos.

### 3.1 HIPÓTESIS

Producto de la estabilidad térmica de las aguas antárticas, se ha demostrado que en equinodermos antárticos la expresión de Hps70s no se ve influenciada por la elevación de la temperatura, debido a que la clásica respuesta de estrés térmico está ausente en estas especies. Por lo tanto el aumento de la temperatura como agente estresor para *Sterechinus neumayeri*, no manifiesta un incremento en la expresión de Hsp70, en tejidos y células inmunes.

### 3.2 OBJETIVO GENERAL

Analizar la respuesta de *Sterechinus neumayeri* ante un estrés térmico de 5 y 10°C, a través de la expresión de Hsp70 en tejidos y células inmunes a nivel de transcrito y proteína.

### 3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener la secuencia parcial del gen que codifica para una Hsp70 en *S.neumayeri* a partir de partidores conservados diseñados desde secuencias homólogas de invertebrados marinos.
2. Cuantificar la expresión del transcrito Hsp70 en una cinética de estrés térmico a nivel tisular y celular mediante PCR en tiempo real.
3. Detectar la proteína Hsp70 en tejido y células inmunes de *S.neumayeri*, a través de inmohistoquímica, inmunocitoquímica e inmunofluorescencia.
4. Evaluar el efecto de la temperatura en la expresión de Hsp70 en células inmunes de *S. neumayeri* a nivel de la expresión proteica por medio de técnicas de inmunocitoquímica.

## 4. METODOLOGÍA

Los experimentos se realizaron en el laboratorio de Biorrecursos Antárticos del Instituto Antártico Chileno en Punta Arenas. En la fase experimental de estrés térmico se utilizaron erizos antárticos para evaluar como estos organismos responden a aumentos de temperatura a distintas horas. Después de los tratamientos, se extrajo desde la cavidad interna de los erizos, líquido celómico y tejidos, se aisló RNA total, se determinó la expresión a nivel del transcrito y la proteína Hsp70 por técnicas moleculares e inmunológicas.

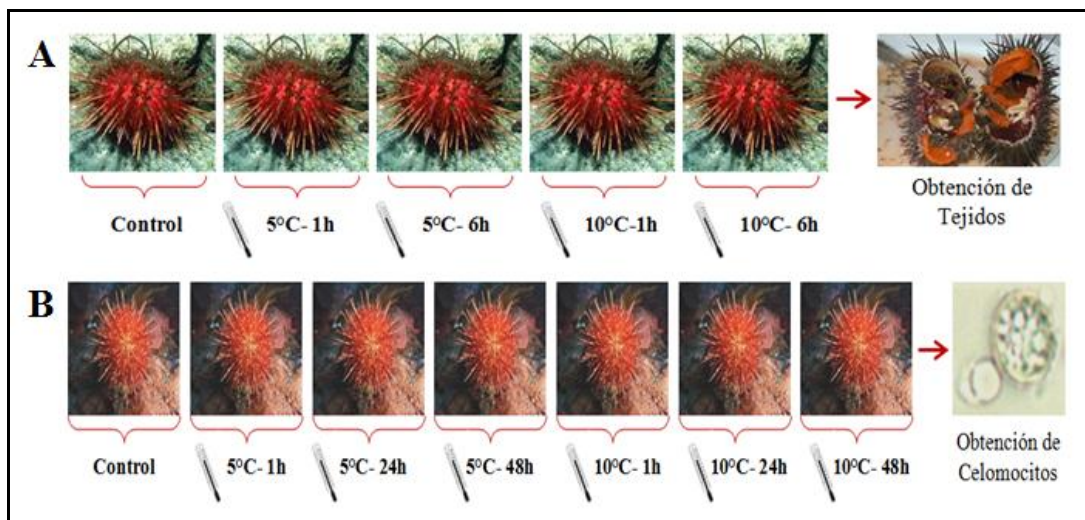
### 4.1 Obtención de muestras y diseño experimental.

Las muestras que se utilizaron en este estudio, se obtuvieron de la Expedición Científica Antártica 47 (año 2011), con el objetivo de analizar la respuesta a estrés térmico de *S.neumayeri*. Se recolectaron erizos antárticos del género *S.neumayeri* por buceo autónomo desde la península Fildes (Isla Rey Jorge, Antártica). Estos se aclimataron durante 48 horas y se dividieron en tres grupos de 20 individuos poniendo los erizos en acuarios con aireación constante, para cada grupo la temperatura se estableció a 0°C, 5° y 10°C por medio de una termocupla asociada a un controlador que encendía o apagaba un calefactor para mantener la temperatura constante (Fig.4). Todos los experimentos se realizaron en una cámara de frío a -5°C.



**Figura 4.** Erizos antárticos en acuarios con aireación constante sometidos a estrés térmico.

A intervalos de 1, 6, 24 y 48 horas se quitaron los erizos de los acuarios y se procedió a extraer desde la cavidad interna el líquido celómico y tejidos (intestino y esófago). De este modo se generaron dos diseños experimentales que consistieron en una cinética de estrés térmico para celomocitos con 7 condiciones distintas y una cinética de estrés térmico para tejido intestinal de 5 condiciones, como se muestra en la figura 5, en ambas cinéticas los organismos control se mantuvieron a una temperatura  $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  simulando la temperatura normal en que viven los erizos.



**Figura 5.** Tratamientos utilizados en las distintas cinéticas de estrés térmico. (A) Cinética de estrés térmico de tejido intestinal, (B) cinética de estrés térmico de celomocitos.

Las muestras colectadas se separaron para los diferentes análisis que se realizaron, que incluía: extracción de ARN, fijación de celomocitos y tejidos, muestras congeladas para análisis de proteínas.

#### 4.2 Extracción de ARN y Cuantificación de RNA por espectrofotometría.

Se aisló ARN total de celomocitos provenientes del líquido celómico y ARN total de tejido intestinal por medio del método de TRIZOL (Invitrogen). En el caso de tejido intestinal se saco 1g de tejido a partir de muestras conservadas en RNA later y se depositó en un nuevo tubo, posteriormente tanto para tejido como para celomocitos se procedió con el método de extracción fenólica con TRIZOL (Total RNA Isolation Reagent). Los RNA se precipitaron



con etanol 75% y se resuspendieron en agua ultra pura (UPW), para una mejor solubilización los RNA se incubaron a 65°C en baño de temperatura controlada por 10 minutos y se conservaron a -20 °C. La concentración de RNA total se determinó por la medición en espectrofotómetro a 260 nm. La pureza del RNA se comprobó mediante la determinación de la relación A260/A280 y su integridad se identificó por electroforesis en gel de agarosa 1%.

#### **4.2.1 Obtención de cDNA.**

Se sintetizó cDNA a partir de 1µg de RNA total en un volumen final de 20 µl, conteniendo 1µl Oligo-dT, 1 µl de dNTP's (10mM), 4 µl Buffer FS 5X, 2 µl DTT, 1µl de RNasa Out y 1µl MMLV transcriptasa inversa (Invitrogen). Las reacciones fueron incubadas durante 5 minutos a 65°C, seguido de 55 minutos a 37°C y calentamiento a 72°C durante 15 minutos.

#### **4.3 Diseño de partidores a partir de secuencias homólogas de Hsp70.**

Debido a que no existen secuencias de Hsp70 descritas en *S.neumayeri*, se recuperaron secuencias homólogas completas de Hsp70 de invertebrados marinos desde la base de datos GenBank. Se seleccionaron 3 secuencias de erizos de mar pertenecientes a *Brissopsis lyrifera* (número de acceso FN667017), y dos secuencias de *Strongylocentrotus purpuratus* (número de acceso: XM001184976 y XM001201438) y se alinearon con el programa de alineamiento múltiple Clustal 2, estas presentaron gran parte de las regiones de aminoácidos conservadas, lo cual permitió el diseño de los partidores con el programa online Primer3.

Se diseñaron cuatro partidores *forward* y dos *reverse* que fueron combinados de distinta forma. Los partidores se caracterizaron por tener entre 20-23 nucleótidos de longitud y algunos particularmente eran partidores degenerados. Los partidores diseñados del alineamiento se describen en la tabla 1.

**Tabla 1.** Secuencias de los partidores que fueron diseñados para la amplificación del gen Hsp.

Partidores	Descripción	Secuencia	Características
Hsp1-Fw	Hsp1	GATCTAGGGACCACGTACTCGTG	23 nt
Hsp2-Fw	Hsp2	GCAAATGACCAGGGTAACAGG	21 nt
Hsp3-Fw	Hsp3	CGGTGGAACCTTCGATGTTT	20 nt
Hsp4-Rv	Hsp4	CCTTCTTGTTCTTCCGCTTG	20 nt
Hsp6-Rv	Hsp5	CCTTCTTGTKYTTSCGCTTG	20 nt Degenerado
Hsp7-Fw	Hsp6	GATCTMGGRACCACRTACTCSTG	23 nt Degenerado

\* **K**, G/T; **Y**, C/T; **S**, C/G; **M**, A/C; **R**, A/G.

\* **nt**: nucleótidos

#### 4.3.1 Amplificación del gen y secuenciación parcial de Hsp70 en *S.neumayeri*.

Mediante PCR en gradiente se probaron los distintos juegos de partidores que fueron diseñados a partir de secuencias homólogas de Hsp70 de invertebrados marinos, determinando de esta manera la temperatura óptima y la mejor combinación de partidores para la amplificación de Hsp.

Se usaron dos muestras de cDNA correspondiente a celomocitos y tejido intestinal que se amplificaron por PCR usando 1 µg de cDNA como templado en un volumen final de 20 µl que contiene 2 µl de Buffer KapaTaq (10x) suplementado con MgCl<sub>2</sub> (25mM), 0,4 µl dNTPs (10mM), 0,8 µl de Hsp1 (10mM), 0,8 µl Hsp4 (10mM) y 0,08 µl de polimerasa KapaTaq (5U/µl). La PCR se llevó a cabo siguiendo un programa de amplificación de desnaturalización inicial por 95°C durante 2 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 1 min, hibridación a 41°C durante 1 min, extensión a 72°C durante 1 min, y una extensión final a 72°C por 7 minutos. Los productos de PCR fueron identificados por electroforesis en gel de agarosa 1%, revelando un amplicón de aproximadamente 600 pb.

Por PCR se obtuvo una banda única del gen Hsp desde muestras de celomocitos y tejido intestinal que se identificaron a través de electroforesis, posteriormente se usó el kit “AxyPrep DNA Gel Extraction Spin Protocol” (Axigen) para eluir desde gel el fragmento amplificado, por último se realizó PCR de la muestra que fue eluída y se aisló el material genético desde el producto de PCR purificado usando el kit “AxyPrep PCR Clean-up” (Axigen). Las muestras se enviaron a los laboratorios de Macrogen en Corea para la secuenciación del fragmento de aproximadamente 600 pb.

Una vez conseguida la secuencia se analizó mediante el programa Secuencer y posteriormente se realizó una búsqueda de similitudes de la secuencia de interés usando BLAST proporcionado por la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information) y Expasy. De este modo se obtuvo la secuencia parcial de nucleótidos y aminoácidos que codifica para una proteína de estrés térmico de 70 kDa (Hsp70).

Posteriormente la secuencia parcial obtenida por RT-PCR se usó para diseñar partidores específicos de Hsp70 de *S.neumayeri* con el programa online primer3 (versión 0.4.0), determinándose la mejor combinación de partidores que luego se usaron para cuantificar la expresión relativa del gen Hsp70 en *S.neumayeri*. Los partidores que se diseñaron se describen en la tabla 2.

**Tabla 2.** Partidores específicos que fueron diseñados para la secuencia parcial Hsp70 de *S.neumayeri*.

Partidores	Descripción	Secuencia	Combinación y tamaño del amplicón
QHSP70-M1-Fw	HspM1	TGGCAGACCCAAGATCAAGA	HspM1 y HspM2: 196 pb
QHSP70-M1-Rv	HspM2	AACACCAGCATCCTTCGT	
QHSP70-Fw1	HspQ1	GCAGAGGCATACCTTGGAAA	HspQ1 y HspQ2: 153 pb
QHSP70-Rv2	HspQ2	AATGGCAGCTGCAGTAGGTT	
QHSP70-Rv3	HspQ3	CCACCACCCAAGTCAAAGAT	HspQ1 y HspQ3: 200 pb

#### 4.4 Expresión Relativa del gen Hsp70 por PCR semicuantitativa y PCR cuantitativa.

Para los análisis de expresión relativa del gen Hsp70 se realizó una PCR semicuantitativa en el que se utilizó el juego de partidores específico para Hsp70 de *S.neumayeri*, HspQ1Fw y HspQ2Rv que producen un amplicón de 153 pb. Las reacciones de PCR semicuantitativa se realizaron con 20 µl de reacción, conteniendo cDNA generado de 1 µg de RNA, en un termociclador mediante el siguiente perfil térmico: desnaturalización inicial por 95°C durante 2 minutos, seguido de 25 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 1 minuto, hibridación a 50°C durante 1 minuto, extensión a 72°C durante 1 minuto, y una extensión final a 72°C por 7 minutos. Los productos fueron identificados por electroforesis en gel de agarosa 1%, se tomaron fotografías de los geles y se analizaron con el programa Image J (este programa tiene la particularidad de medir la intensidad de la banda del amplicón en pixeles), los datos obtenidos por el programa se relacionan con el nivel de expresión obtenido en cada banda.

Para normalizar la expresión del gen en estudio, se evaluaron los genes actina, 18S y 28S como posibles candidatos de gen control. Al analizar con el programa Image J se comprobó que el gen ribosomal 18 mostraba menor variación que los otros genes, por lo que su expresión se usó como gen control para normalizar la expresión del gen Hsp70 *S.neumayeri*.

Para obtener datos más fehacientes de la expresión del gen Hsp70, se realizó una PCR cuantitativa utilizando el mismo juego de partidores HspQ1Fw y HspQ2Rv. Para las reacciones de qPCR se realizaron diluciones 1/10 de las muestras de cDNA de las cinéticas de estrés térmico de celomocitos y tejido intestinal. Se usó 1 µl de cDNA como templado en un volumen final de 25 µl que contiene 12,5 µl de SYBR green, 0,5 µl de HspQ1 (10mM), 0,5 µl de HspQ2 (10mM) y 10,5 µl de agua ultra pura. Cada una de las muestras se preparó por duplicado y posteriormente se analizó cada reacción de PCR mediante 5700 *applied biosystems* siguiendo un perfil térmico de desnaturalización inicial por 95°C durante 2 minutos, seguido de ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 1 minuto, hibridación a 50°C durante 1 minuto, extensión a 72°C durante 1 minuto, y una extensión final a 72°C por 7 minutos. La cuantificación y determinación del número de copias iniciales para las muestras se examinó con el software del sistema 5700 (v2.0.1) que calcula el Ct (número de ciclos PCR donde la fluorescencia se detecta por encima del umbral y disminuye linealmente con el aumento de la cantidad de target) para cada reacción. En el caso de la PCR-cuantitativa para la normalización del gen Hsp70, se usó como gen control la expresión del gen actina.

Para los análisis de la expresión relativa (*fold change* de la expresión relativa) del gen Hsp70 se utilizó el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak y Schmittgen, 2001), en el que se comparan directamente los Cts del gen testado y gen de referencia ( $\Delta Ct$ ) en cada muestra, y posteriormente se comparan los  $\Delta Ct$  de las muestras experimentales con respecto a la muestra control. Todos los datos se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar (SD) y se analizaron por T-student después de la normalización.

#### **4.5 Síntesis peptídica y producción del Anticuerpo anti-Hsp70 e identificación en celomocitos.**

En colaboración con el grupo de marcadores inmunitarios del Laboratorio de Genética e Inmunología Molecular de la Universidad Católica de Valparaíso, a partir de los alineamientos realizados con varias Hsp70 de organismos marinos se obtuvo la secuencia CSEVITWLDANQLAEKDE correspondientes a la región C- terminal de la proteína traducida. Esta secuencia de 18 aminoácidos fue sintetizada químicamente por la técnica de Fmoc. El péptido se precipitó y lavó con éter y la extracción se realizó con agua destilada-desionizada. Posteriormente la masa del péptido fue confirmada por MALDI-TOF. Este péptido fue utilizado como inmunógeno para producir anticuerpos policlonales en ratones por medio de tumores ascíticos. El anticuerpo se validó por medio de técnicas de dot-blot y western blot, el procedimiento de esta técnica fue similar a lo descrito por Edmond y Roth (2001).

#### **4.6 Análisis de la proteína Hsp70 en la cinética de estrés térmico de celomocitos mediante inmunocitoquímica e inmunofluorescencia.**

Las muestras que fueron utilizadas para los ensayos de inmunocitoquímica se tomaron de la cinética de estrés térmico (control; 5°C-1h; 5°C-24h; 5°C-48h; 10°C-1h; 10°C-24h; 10°C-48h, sumado un control negativo sin el primer anticuerpo) y se hicieron por triplicado. Para la inmunofluorescencia de las células sólo se realizaron cito-spin de las muestras control, muestras 5°C-48 horas y 10°C 48 horas sumado un control negativo sin el primer anticuerpo, todas por duplicado.

Para ambas metodologías, se prepararon portaobjetos recubiertos con poly-L-lisina y se hicieron cito-spin por cada muestra de celomocitos contenidas en una solución de formaldehído 1% con agua de mar filtrada, las células se citocentrifugaron a 2500 rpm en una centrífuga para inmunología, posteriormente se permeabilizaron con TBS (Tris 25mM a pH 7,4, Gelatina 0,2 %, Triton X100 0,5%, Cloruro de Amonio 50 mM) por 10 minutos, seguido de una solución de lavado (distintas soluciones en cada técnica, como se muestra en la tabla 3). Para bloquear las proteínas presentes en la muestra se añadió buffer de saturación y se realizó un lavado rápido. Se incubó durante toda la noche a 4°C con el primer anticuerpo con una solución de incubación, conteniendo una concentración 1/25 del Ac-Hsp70 purificado (se usó la misma concentración para ambas técnicas). Posteriormente las muestras se lavaron 3 veces con las respectivas soluciones de lavados por 5 minutos y se incubaron con un segundo anticuerpo a una concentración de 1/500 por 3 horas a temperatura ambiente.

Para inmunocitoquímica las muestras se incubaron con el sustrato (NBT/BCIP suppressor, 1 mM levamisol) por 40 minutos, finalizado este tiempo se lavó con PBS (pH 7,4) y agua destilada por 5 minutos. Las muestras se secaron y montaron, para su posterior análisis.

En el caso de la inmunofluorescencia, finalizado el tiempo de incubación se lavó tres veces con PBS durante 5 minutos, posteriormente las muestras se secaron y montaron con buffer.

Para el reconocimiento de la proteína de shock térmico de 70 kDa en celomocitos, se observaron las células al microscopio óptico (Olympus CX21FS1) y se cuantificaron de forma manual los celomocitos que presentaron marcaje positivo por parte del anticuerpo purificado en las distintas condiciones. Se tomaron fotografías de los celomocitos con una cámara digital (DCM130E) para microscopía y mediante el software Scoper Photo se analizaron las imágenes.

En el caso de inmunofluorescencia los celomocitos se observaron al microscopio de fluorescencia (Nikon, modelo LH-M100C-1) y posteriormente se tomaron fotografías (con cámara CMOS). Todas las imágenes se recopilaron a partir del Software Micrometrics SE Premium (versión 2.8).

**Tabla 3.** Resumen de los materiales usados en las distintas técnicas de inmunología.

	<b>Inmunocitoquímica</b>	<b>Inmunofluorescencia</b>
Solución de lavado	PBS-Tween 20 0.1%	PBS (pH 7.4)
Buffer de saturación	PBS-Tween 20 0.1 % - leche 5%	PBS-leche 5%
Solución de incubación	PBS-Tween 20 0.1 %, leche 0.5%	PBS-leche 0.5%
Anticuerpo secundario	<i>Anti-Mouse IgG (Fc specific)-Alkaline Phosphatase, antibody produced in goat</i>	<i>Anti IgG de ratón conjugado con fluoresceína (FITC)</i>
Solución de incubación para el anticuerpo secundario	PBS-Tween 20 0.1 %, leche 0.5%	PBS-leche 0.5%-1% blue de Evans
Sustrato	NBT/BCIP suppressor, 1 mM levamisol	No
Solución para el montaje de las muestras	Neo-mount	Buffer (9 vol.gilcerol/1 vol.TBS)

#### **4.7 Análisis de la proteína Hsp70 en la cinética de estrés térmico mediante inmunohistoquímica e inmunofluorescencia en tejidos de *S.neumayeri*.**

Se obtuvieron cortes de tejidos (intestino y esófago) de erizos sometidos a temperaturas de 5 y 10°C por periodos de 1 a 48 horas. Las muestras de tejido fueron fijadas usando el método básico de fijación, seguidamente se procedió a la inclusión mediante deshidratación de los tejidos en sucesivos alcoholes de grado creciente y posterior aclaramiento en Neo-clear, que luego fueron embebidos en parafina. De este modo se obtuvieron cortes de 3-4 micras de espesor sobre portas de poly-L-lisina.

Ambas técnicas son similares en cuanto al proceder de su metodología, sin embargo difieren en el tipo de soluciones y anticuerpos secundarios que fueron utilizados, como se muestra en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Soluciones que se utilizaron para inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.

Soluciones	Inmunocitoquímica	Inmunofluorescencia
Solución de preincubación	PBS, 1% BSA, 1% suero de cabra y 0,1% Triton X100 por 1 hora	PBS, 5% leche y 0,1% Triton X100
Solución de lavado	TBS (NaCl, KCl y Tris Base)	PBS (pH 7.4)
Solución de incubación para el anticuerpo primario	PBS-1% BSA-1 % suero de cabra	PBS-0.5%leche
Anticuerpo secundario	<i>Anti-Mouse IgG (Fc specific)-Alkaline Phosphatase, antibody produced in goat</i>	<i>Anti IgG de ratón conjugado con fluoresceína (FITC)</i>
Solución de incubación para el anticuerpo secundario	PBS-1% BSA-1 % suero de cabra	PBS-0.5% leche-1 % blue de Evans

Para ambas metodologías, las muestras de tejido se desparafinaron en sucesivos baños con Neo-clear (xileno), etanol 100%, etanol 96%, etanol 70% y breves lavados con agua destilada. Se equilibraron con PBS (0,01 M) a pH 7,4 durante 1 hora, posteriormente se cambio de solución de PBS por 10 minutos y se preincubaron por 1 hora. Las muestras se incubaron durante toda la noche a 4°C con el primer anticuerpo anti-Hsp70 purificado a una concentración de 1/50 con 200 µl de solución por muestra. Se lavó tres veces con las respectivas soluciones de lavado y se incubó con el segundo anticuerpo a una concentración de 1/200 por 3 horas a temperatura ambiente.

Para inmunohistoquímica las muestras se incubaron con 200 µl del sustrato durante 40 minutos, finalizado este tiempo se lavaron con agua destilada por 5 minutos y se deshidrataron con cambios graduales de alcohol de menor a mayor concentración (etanol 70%, etanol 96%, etanol 100% y neo-clear), se secaron a temperatura ambiente y por último se montaron con Neo-mount.

En el caso de la inmunofluorescencia, finalizada la incubación se lavó tres veces con PBS por 3 minutos. Las muestras se secaron y montaron con una gota de buffer que contiene 9 vol. glicerol/1 vol.TBS.

Los tejidos, se observaron por microscopía de luz y fluorescencia respectivamente, se tomaron fotografías de las muestras y se analizaron las imágenes.



#### **4.8 Análisis estadístico.**

Se evaluó la expresión del gen Hsp70 tanto en la cinética de estrés térmico de celomocitos como tejido intestinal mediante el programa SPSS versión 18.0, se analizaron las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas. Tras este análisis y ante la ausencia de diferencias significativas en los supuestos estadísticos, los datos se sometieron a análisis de T-student para demostrar si existen diferencias significativas en cada condición de estrés térmico con respecto al control. Considerando que los grupos difieren significativamente cuando el nivel crítico obtenido es  $< 0,05$ .

Se obtuvieron valores promedio del porcentaje de células marcadas positivamente por tratamiento. Para determinar si el porcentaje de células con marcaje positivo para Hsp70 era diferente entre los tratamientos, se analizó la expresión de la proteína en celomocitos, mediante T-student con un nivel de confianza del 5%.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Obtención de la secuencia parcial Sn-Hsp70.

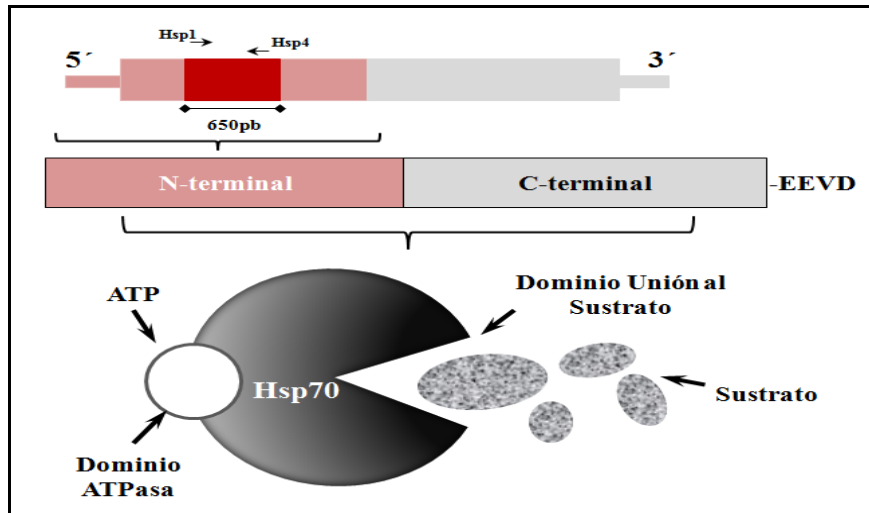
Dos muestras de ADNc correspondiente a celomocitos y tejido intestinal de *S.neumayeri* sin estresar fueron amplificadas por RT-PCR y posteriormente secuenciadas. Los partidores identificados como Hsp1 y Hsp4 (diseñados a partir de regiones altamente conservadas de genes Hsp70 descritas en erizos de mar) (Tabla1), amplificaron un fragmento de aproximadamente 600 pb. Se obtuvo una secuencia parcial de 650 pb para celomocitos que se traduce en 216 aminoácidos y para tejido intestinal el tamaño de la secuencia parcial fue de 637 pb que codifica un polipéptido de 211 aminoácidos. Ambas secuencias se analizaron con el programa de búsqueda BLAST proporcionado por (NCBI) presentando una fuerte identidad con otras secuencias de la familia de proteínas de Hsp70 perteneciente a otros géneros de erizos de mar.

Se comparó la secuencia parcial del gen Hsp70 de *S.neumayeri* (Sn-Hsp70) con genes Hsp70 descritos en otros organismos (Tabla 5), la secuencia de nucleótidos comparte un 78-94% de identidad, sin embargo, la secuencia de aminoácidos deducida posee 87-97% de identidad y 94-99% de similaridad, confirmando así el grado de homología de la secuencia parcial con genes Hsp70 conocidos. Por otra parte Sn-Hsp70 muestra una mayor homología con la secuencia Hsp70 del erizo de mar, *Echinus acutus* (94% identidad nucleótidos, 97% identidad de aminoácidos y 98% similaridad de aminoácidos).

**Tabla 5.** Homología de secuencias nucleotídicas y de aminoácidos de la secuencia parcial de *S. neumayeri* con otros miembros de la familia Hsp70. La secuencia Sn-Hsp70 presentó fuerte identidad con otros géneros de erizos de mar.

Especies	N° acceso GenBank	Nucleótidos (%) Identidad	Amino ácidos	
			Identidad (%)	Similaridad (%)
Erizo de honduras ( <i>Echinus acutus</i> )	FM877470	94%	97%	98%
Erizo de mar ( <i>Paracentrotus lividus</i> )	X16544	94%	90%	94%
Erizo púrpura ( <i>S.purpuratus</i> )	XM_001175646	85%	86%	94%
Chaparrudo ( <i>Gobius niger</i> )	AY762086	82%	94%	99%
Tiburón toro ( <i>Carcharias taurus</i> )	AF502521	79%	89%	96%
Caimán ( <i>A.mississippiensis</i> )	AB306280	78%	87%	94%

Al analizar la ubicación de la secuencia parcial Sn-Hsp70 dentro de la secuencia completa del gen Hsp70, se determinó que se posiciona cerca del extremo 5' del gen que correspondería al extremo N-terminal de la proteína y al dominio estructural sitio de unión al ATP o dominio ATPasa (Fig.6)

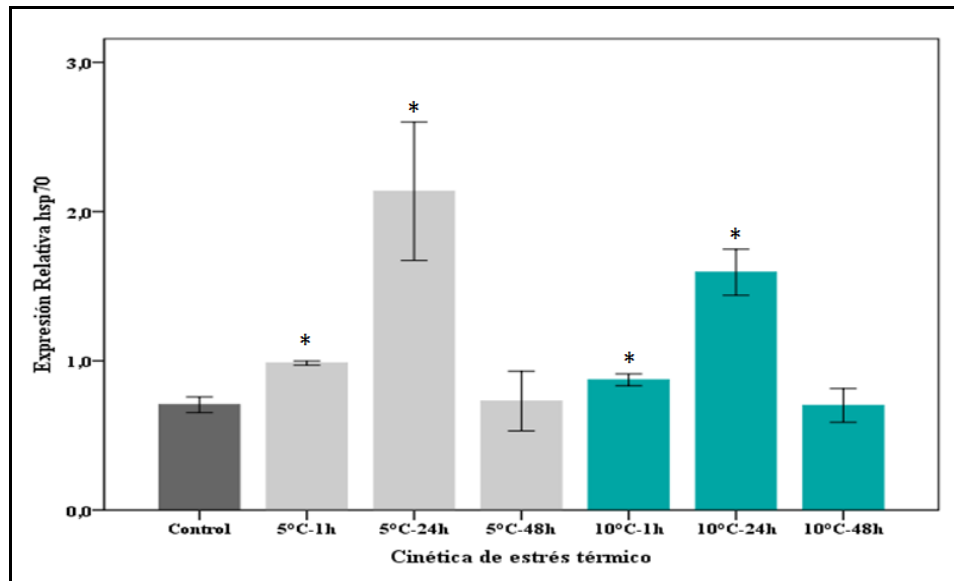


**Figura 6.** Estructura de la proteína Hsp70, en rojo región en que se posiciona la secuencia parcial de *S.neumayeri* (Sn-Hsp70).

## 5.2 Expresión relativa del transcrito Sn-Hsp70 en la cinética de estrés térmico de celomocitos.

Mediante RT-PCR se obtuvo una estimación aproximada de los niveles de expresión relativa de Sn-Hsp70 en las distintas condiciones de estrés térmico, normalizadas en base a la expresión del gen ribosomal 18S. El transcrito Sn-Hsp70 se detectó tanto en los grupos control como en los grupos estresados (Anexo 1).

Los resultados obtenidos por PCR cuantitativa de la cinética de celomocitos revelaron diferencias significativas en la expresión entre 1 y 24 horas post estrés tanto a 5°C como a 10°C. Mientras que los tratamientos 5°C-48h y 10°C-48h se mantuvieron similares a la condición control, no existiendo diferencias entre ellos (Fig.7). Como se ha descrito anteriormente la expresión relativa de Sn-Hsp70 por PCR cuantitativa se normalizó en base a la expresión del gen de la actina.

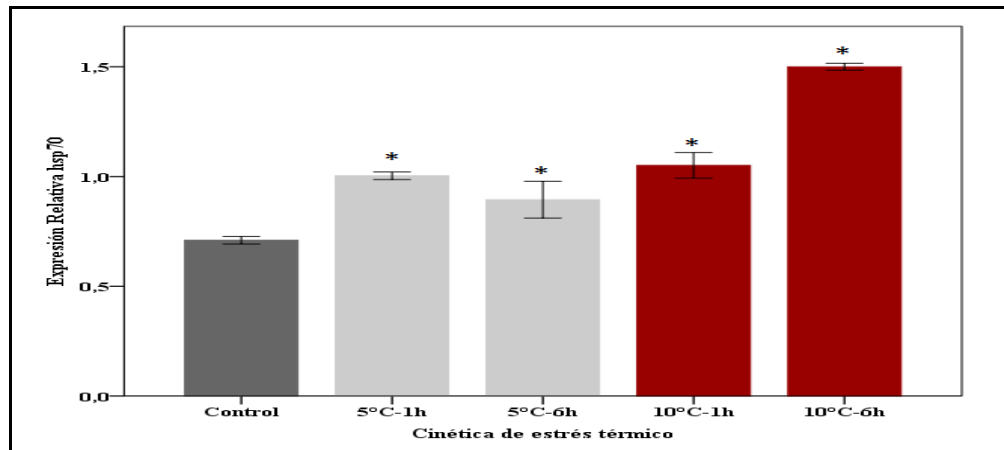


**Figura 7.** Expresión relativa del transcrito Sn-Hsp70 en la cinética de celomocitos de *S.neumayeri* mediante PCR cuantitativa. El análisis T-student, reveló variaciones en la expresión a 1 y 24 horas a 5 y 10°C (asteriscos), mientras que después de 48 horas a 5 y 10°C la expresión de Hsp70 disminuyó considerablemente al nivel normal (control). (\*) Tratamientos que presentaron diferencias significativas respecto al control (considerando que los grupos difieren significativamente cuando el nivel crítico obtenido es  $< 0,05$ ).

### 5.3 Expresión relativa del transcrito Sn-Hsp70 en la cinética de estrés térmico de tejido intestinal.

Se detectó el transcrito en todas las condiciones de la cinética de tejido intestinal por RT-PCR, los resultados de la PCR semicuantitativa revelaron variaciones en la expresión del transcrito Sn-Hsp70 en este tejido (Anexo 2), como primera aproximación.

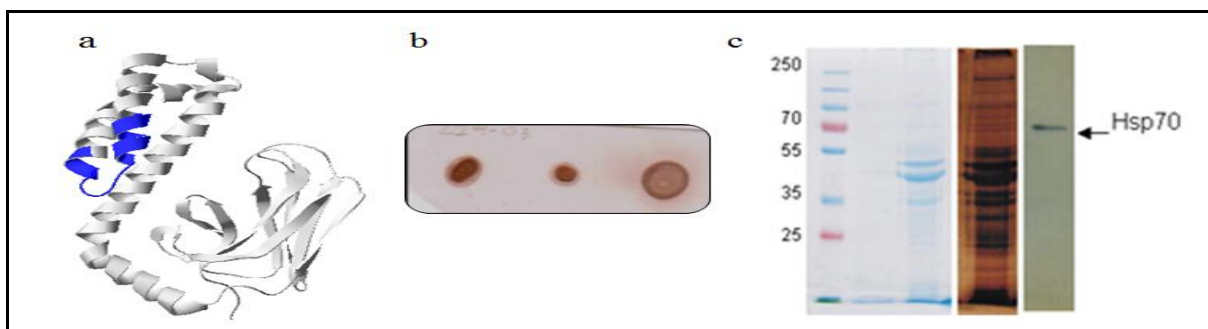
Los análisis de la expresión del transcrito mediante PCR cuantitativa en tejido intestinal, demuestran que existe una leve inducción en la expresión de Sn-Hsp70 en respuesta a estrés térmico. La expresión de Sn-Hsp70 mostró diferencias en todas las condiciones cuando se compararon en relación a la condición control, donde alcanzó su punto más alto de inducción a las 6 horas 10°C post- estrés (Fig.8).



**Figura 8.** Expresión relativa del transcrito Sn-Hsp70 en la cinética de tejido intestinal de *S. neumayeri* mediante PCR cuantitativa. El análisis T-student, reveló que los niveles de expresión a 1 y 6 horas 5 y 10°C (asteriscos) difieren con respecto al control. (\*) Tratamientos que presentaron diferencias significativas respecto al control (considerando que los grupos difieren significativamente cuando el nivel crítico obtenido es  $< 0,05$ ).

#### 5.4 Inmunodetección de la proteína Hsp70 por un anticuerpo policlonal Anti-Hsp70.

En colaboración con el grupo de marcadores inmunitarios del Laboratorio de Genética e Inmunología Molecular de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, se detectó la presencia de la proteína Hsp70 en celomocitos del erizo antártico. El péptido que se diseñó para producir anticuerpos policlonales en ratones, se validó por medio de la técnica de dot-blot, por el reconocimiento del péptido sintético. Posteriormente a partir del extracto de proteínas totales de los celomocitos, fue posible reconocer una banda de 70 kDa, por medio de la técnica de Western blot, indicando que los celomocitos de erizo antártico expresan una proteína de un peso aparente de 70 kDa (Fig.9)

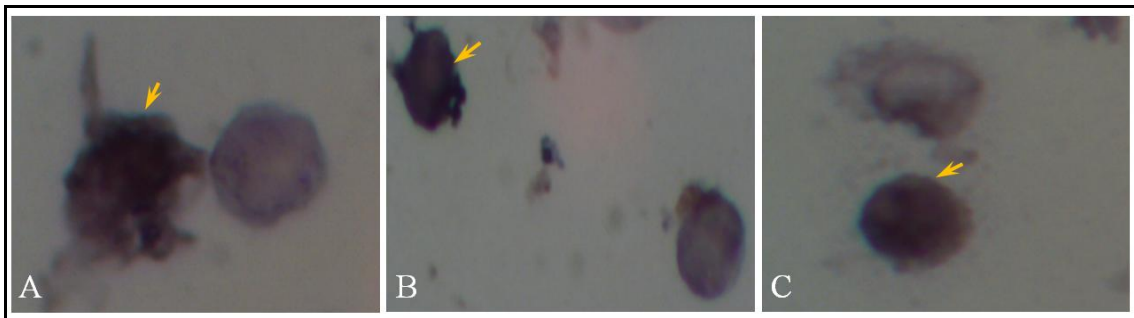


**Figure 9.** Inmunodetección de la proteína Hsp70 en *S. neumayeri*. (a) Región de la proteína usada como epítipo para la síntesis del péptido antigénico. (b) Inmunoespecificidad por Dot blot. (c) Western blot de proteínas totales de celomocitos revelado por quimioluminiscencia.

### 5.5 Análisis de la expresión de la proteína Hsp70 en celomocitos de *S.neumayeri*.

Por técnicas inmunológicas se identificó y evaluó la expresión de la proteína de tipo Hsp70 en células inmunes de tipo celomocitos sometidos a estrés térmico de 5°C y 10°C, mediante el uso de anticuerpos policlonales anti-Hsp70.

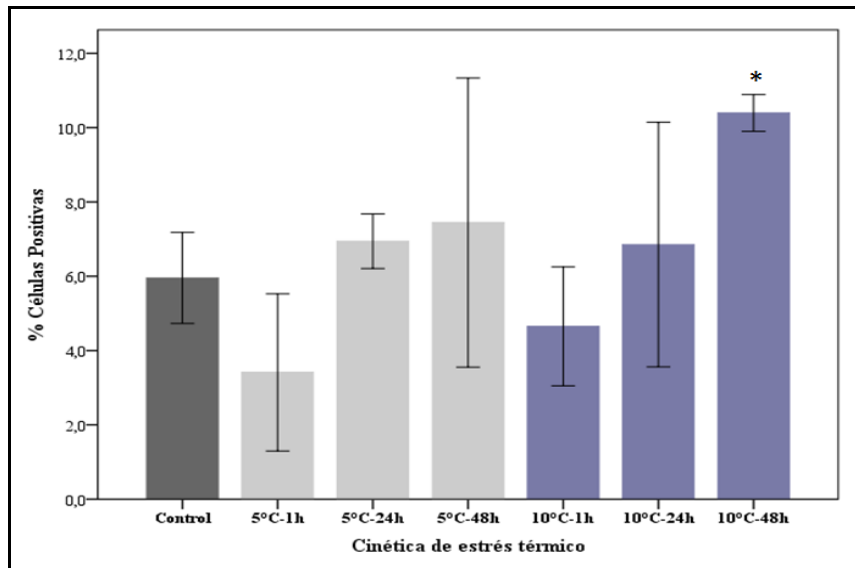
A través de inmunocitoquímica se validó el anticuerpo anti-Hsp70 sobre cito-spin de celomocitos. La proteína Hsp70 se detectó en celomocitos sometidos a distintas condiciones de estrés térmico, evidenciando marcaje positivo por parte del anticuerpo anti-Hsp70, puesto que los celomocitos toman una coloración púrpura cuando se forma el conjugado antígeno-anticuerpo (Fig.10).



**Figura 10.** Inmunocitoquímica (indirecta) de celomocitos de *S.neumayeri*. Celomocitos que expresan la proteína (flecha amarilla) y celomocitos negativos a la proteína, (A) Control; (B) 5°C-48h; (C) 10°C-48h. Aumento 100X.

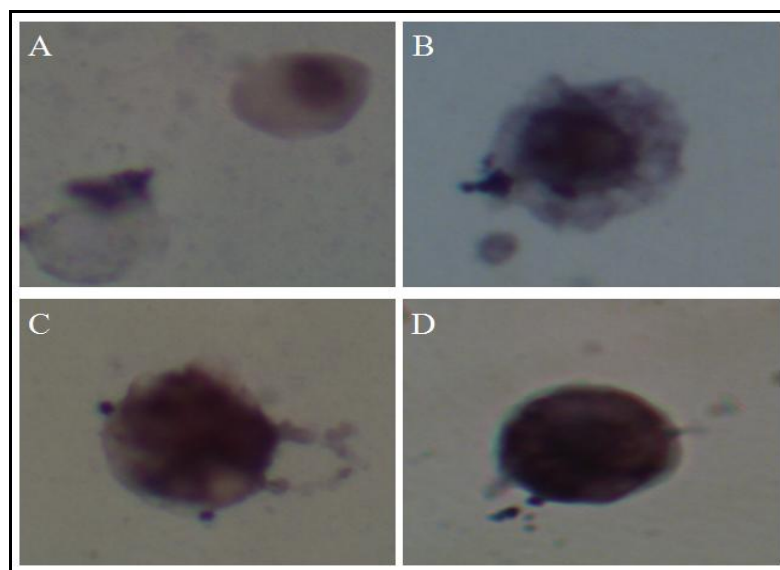
El porcentaje de celomocitos positivos que expresarían la proteína se calculó en relación al total de celomocitos que fueron contabilizados (rango total de 70-80 células en cada condición). Se evaluó la expresión de la proteína en celomocitos, por medio del porcentaje de células marcadas positivamente. El promedio de células positivas varió entre  $3,41 \pm 2,11$  y  $10,39 \pm 0,40$  % en las distintas condiciones (Anexo 3)

El análisis T-student reveló que existen leves diferencias en el porcentaje de celomocitos que expresaron la proteína, donde la condición 10°C-48h presentó el mayor porcentaje de células positivas encontrándose que difieren significativamente con respecto al grupo control (considerando que los grupos difieren significativamente cuando el nivel crítico obtenido es  $< 0,05$ ). Aún cuando el porcentaje de células varió en las otras condiciones de estrés, estas variaciones no fueron significativas en relación al control (Fig.11 y Anexo 4).



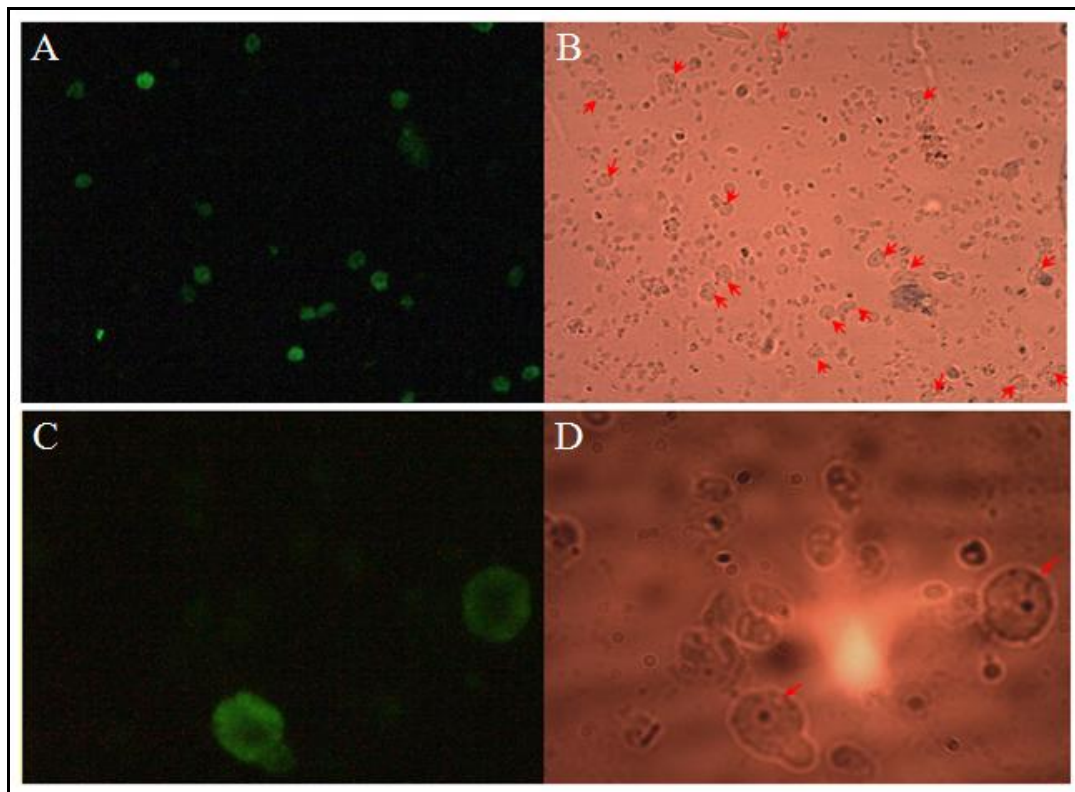
**Figura 11.** Porcentaje de celomocitos positivos que expresarían la proteína Hsp70 en la cinética de estrés térmico. El análisis T-student, reveló diferencias en el porcentaje de celomocitos que expresan la proteína a 10°C-48horas (asteriscos), mientras que en las otras condiciones no se identificaron diferencias con respecto al control.

Se logró visualizar la localización de la proteína Hsp70, tanto en el núcleo como en el citoplasma de celomocitos de *S.neumayeri*, como se muestra en la Figura 12. Es importante destacar que en todas las condiciones de estrés se pudo visualizar este tipo de localización.



**Figura 12.** Reconocimiento de la proteína Hsp70 en celomocitos por Inmunocitoquímica visualizados en un microscopio óptico con un rango de aumento de 100X. (A) y (B) celomocitos positivos que expresan la proteína Hsp70 en el núcleo; (C) y (D) celomocitos positivos que expresan proteína en el citoplasma.

La detección de la proteína en celomocitos también se confirmó por inmunofluorescencia indirecta usando el mismo anticuerpo primario anti-Hsp70 junto a un anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado con fluoresceína (FITC). Las imágenes adquiridas por microscopía de fluorescencia mostraron células de color verde que expresan la proteína Hsp70. Los celomocitos positivos se visualizaron con un rango de aumento a 10X y 40X, al observar la típica estructura circular de los celomocitos se comprobó que eran inmunológicamente específicos a la proteína Hsp70 (Fig.13).



**Figura 13.** Reconocimiento de la proteína Hsp70 en celomocitos por inmunofluorescencia, (A) celomocitos positivos fluorescentes representan células que expresan la proteína a un aumento de 10X. (C) Celomocitos positivos en aumento 40x. (B) y (D) estructura de los celomocitos positivos (flechas rojas).

La proteína se identificó en todas las condiciones de estrés y en el control, mostrando células positivas en cada condición.



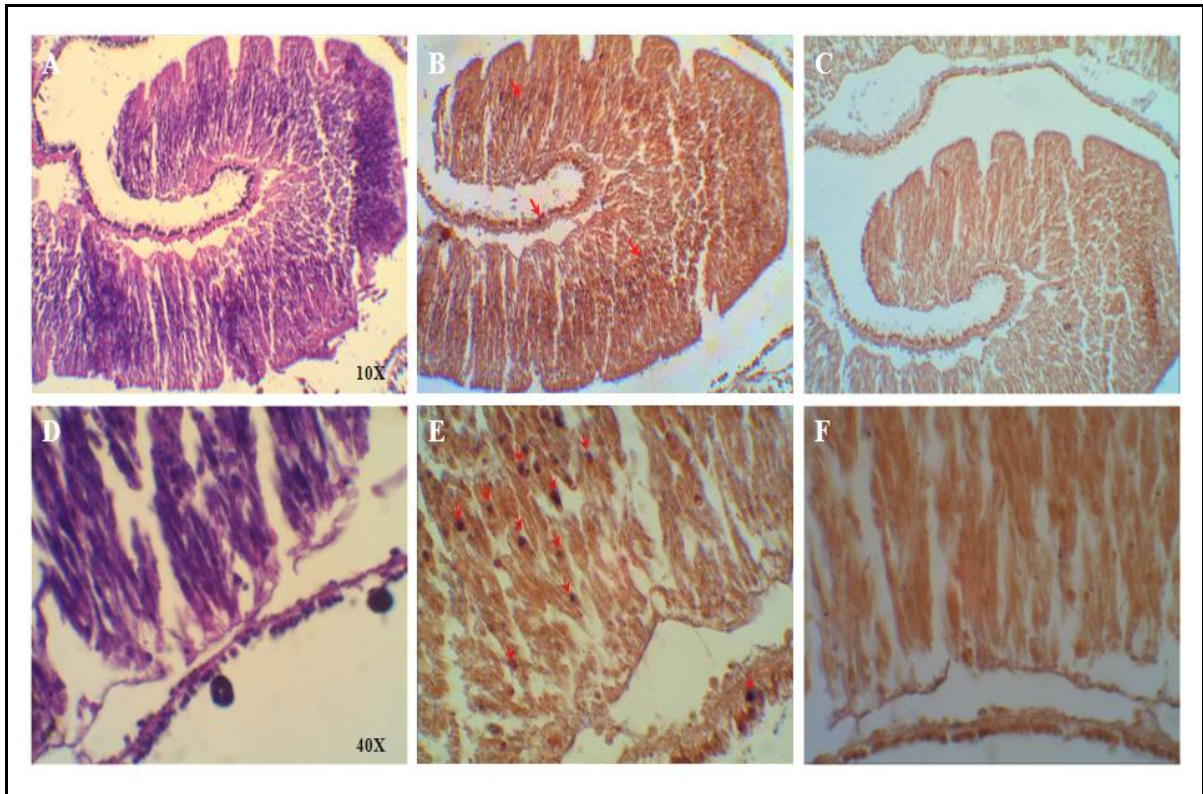
## 5.6 Análisis de la expresión de la proteína Hsp70 en tejidos de *S.neumayeri*.

El método de tinción NBT-BCIP utilizado en inmunohistoquímica permitió detectar la presencia de la proteína Hsp70 en cortes de tejido intestinal y de esófago de *S.neumayeri*, en que se observó coloración púrpura cuando el anticuerpo reconoce a la proteína. Es importante resaltar que ambos tejidos (intestino y esófago) expresaron la proteína en condición normal y de estrés térmico (imágenes no mostradas).

Los tejidos se observaron al microscopio óptico a 10X y 40X, se determinó sólo el marcaje positivo de la proteína Hsp70 no diferenciando entre estimulados y no estimulados. En cuanto a la localización de la proteína se observó en mayor proporción en la región epitelial de ambos tejidos (intestino y esófago).

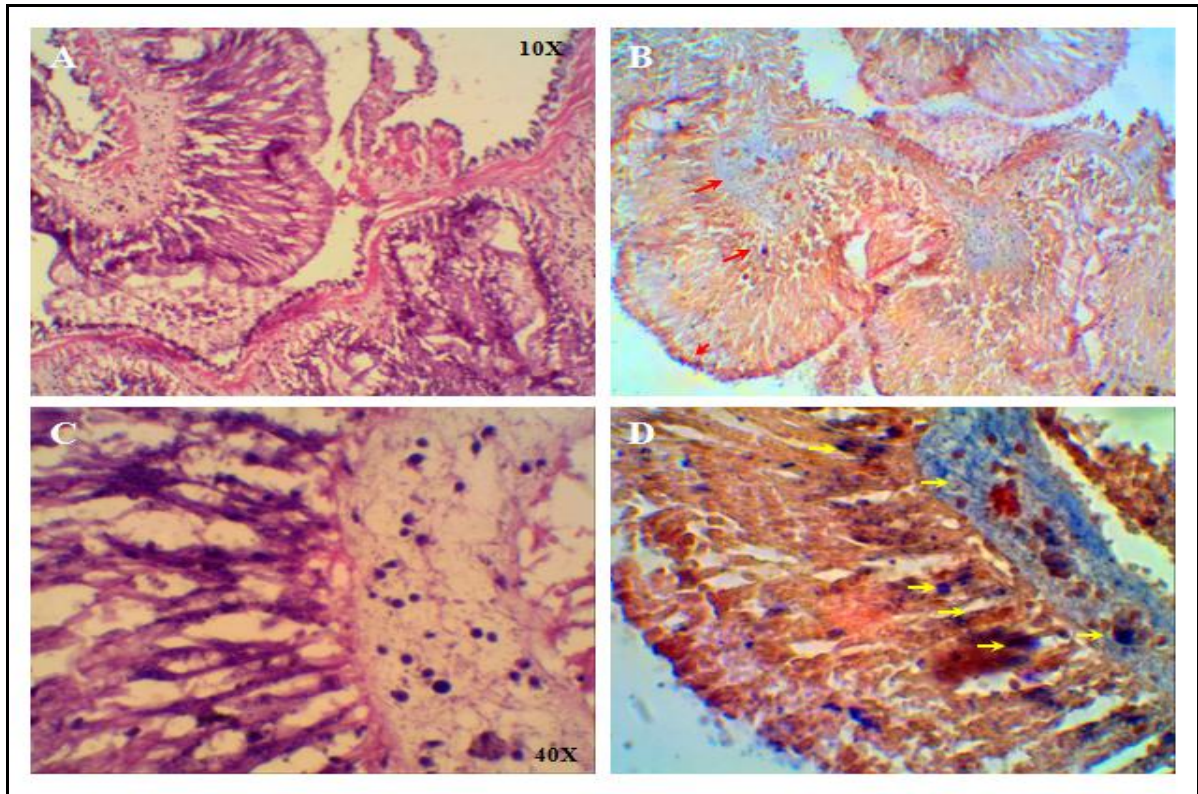
Las muestras usadas como controles negativos (sin el anticuerpo anti-Hsp70), presentan una coloración café después de que son incubados con el sustrato NBT-BCIP (Fig. 14 C y F). La tinción con Hematoxilina y Eosina permitió distinguir las características histológicas de los tejidos (Fig.14 A y D), de esta manera se logró identificar que la localización de la proteína se encuentra en mayor frecuencia en la región epitelial del tejido intestinal.

Al observar con un mayor aumento, se identificó marcaje positivo en células epiteliales (coloración púrpura), característica que no se distinguió en controles negativo mediante el método de tinción NBT-BCIP (Fig.14 E y F).



**Figura 14.** Cortes histológicos de tejido intestinal de *S.neumayeri*. Tinción con hematoxilina y eosina de tejido intestinal (A) 10X y (D) 40X. Identificación de la proteína Hsp70 en células epiteliales de intestino por el método de tinción NBT-BCIP utilizado en inmunohistoquímica indirecta (B) 10X y (E) 40X. Tejido intestinal sin el anticuerpo primario anti-Hsp70 visualizados a 10X (C) y 40X (F)

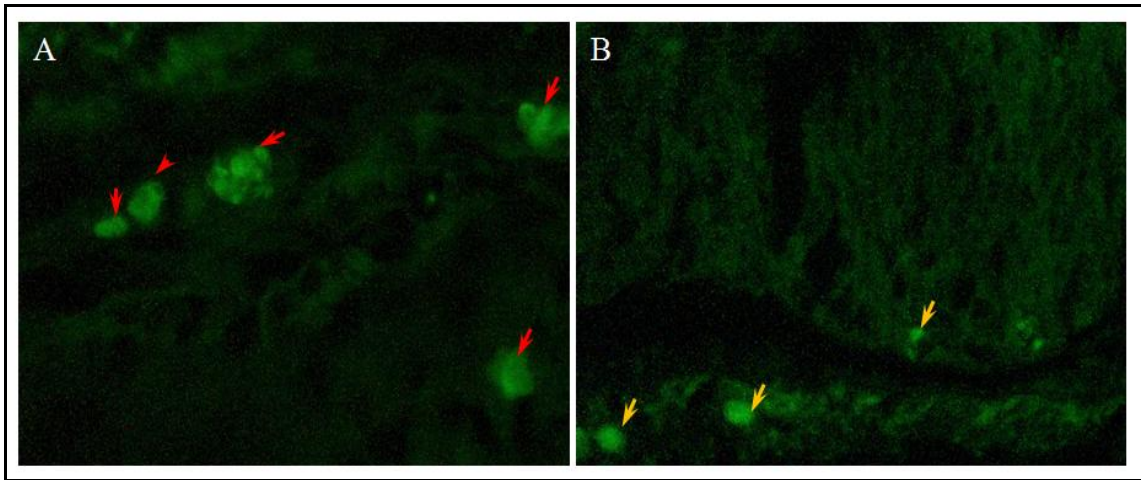
Como se muestra en la Figura 15, en el esófago la proteína Hsp70 se expresa en la matriz del tejido y en núcleos de las células epiteliales (Fig.15 B y D). Del mismo modo este tejido también expresaría proteínas de estrés térmico en células del tejido conectivo, ya que presentó una marcada coloración en la región mencionada (debe ser comprobado). La tinción con hematoxilina y eosina permitió distinguir dos regiones bien notorias en esófago, el tejido conectivo y epitelial (Fig.15 A y C).



**Figura 15.** Cortes histológicos de esófago de *S.neumayeri*. Tinción con hematoxilina y eosina de esófago (A) y (C). Identificación de la proteína Hsp70 en la matriz del tejido (flechas rojas) y células epiteliales (flechas amarillas) de *S.neumayeri*, mediante el método de tinción NBT-BCIP utilizado en inmunohistoquímica (B) y (D). Aumento 10Xy 40X.

Al igual que en celomocitos, la detección de la proteína en tejidos se confirmó por inmunofluorescencia indirecta usando el mismo anticuerpo primario anti-Hsp70 junto a un anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado con fluoresceína (FITC). Las imágenes adquiridas por microscopía de fluorescencia mostró zonas de color verde que expresan la proteína Hsp70 en ambos tejidos, en el caso del intestino se trataría de células del epitelio basal (Fig.16B) y en esófago no se logró distinguir la localización en que se expresa Hsp70, sólo se identificó la presencia de la proteína que al parecer estarían agrupadas en este tejido (Fig.16A).

La proteína Hsp70 marcada con fluoresceína, se identificó en muestras de tejido sin estresar como aquellos que se sometieron a estrés térmico (imágenes no mostradas).



**Figura 16.** Identificación de la proteína Hsp70 en tejidos por Inmunofluorescencia indirecta con fluoresceína (FITC). **(A)** Expresión de Hsp70 en esófago (flechas rojas). **(B)** Expresión de Hsp70 en células del epitelio basal del intestino (flechas amarillas). Aumento 40X.

## 6. DISCUSIÓN

En este estudio se reporta que el aumento de la temperatura actúa como un agente estresor para *Sterechinus neumayeri*, este estado se manifiesta por un incremento en la expresión de Hsp70, presentando variaciones en celomocitos y tejidos. Esto significa que los erizos antárticos sí presentan una respuesta de estrés térmico cuando se exponen a altas temperaturas. La elevación de la temperatura estresa a los erizos antárticos, este hecho se explica por la sensibilidad térmica que presentan estos organismos.

### 6.1 Obtención de la secuencia parcial Sn-Hsp70.

Actualmente no existen estudios que identifiquen y describan la expresión del gen y de la proteína Hsp70 en erizos de mar antártico, a pesar de que sí se han reportado varios genes Hsp70 y Hsc70 en otros organismos marinos (ostras, peces, crustáceos, bivalvos etc.) (Liu *et al.*, 2004).

A partir de tejido y celomocitos del erizo antártico *S.neumyeri* se logró aislar un cDNA parcial de 650 pb cuya secuencia alinea con Hsp70s de erizos de mar.

La secuencia deducida presentó fuerte identidad con secuencias Hsp70 descritas en los erizos de mar *Echinus acutus*, *Paracentrotus lividus* y *Strongylocentrotus purpuratus*. La mayor homología a nivel de secuencias de nucleótidos y de aminoácidos la presentó con la especie *Echinus acutus* (94% identidad nucleótidos, 97% identidad de aminoácidos y 98% similaridad de aminoácidos).

A partir de esta secuencia parcial se diseñaron partidores específicos para amplificar el gen Hsp70 del erizo antártico y analizar su expresión relativa bajo condiciones de estrés térmico.

## 6.2 Expresión relativa del gen Sn-Hsp70 en la cinética de estrés térmico.

Los primeros resultados obtenidos en celomocitos mediante RT-PCR semicuantitativa no demostraron diferencias significativas en la expresión de Hsp70 en las distintas condiciones de estrés térmico evaluadas en relación al control, estos resultados nos hicieron suponer lo explicado por Clark *et al.*(2008) que en organismos antárticos la capacidad para sobreexpresar este tipo de chaperonas se habría perdido.

Para validar estos resultados se realizó PCR cuantitativa por su mayor sensibilidad, demostrando que sí había diferencias significativas entre las muestras. El transcrito Hsp70 presentó un aumento de su expresión a las 1 y 24 hrs a 5 y 10°C, respectivamente, mientras que a las 48 horas disminuyó su expresión hasta un nivel normal (+/- 0,5 °C). La inducción del transcrito de Hsp70 mediante un estrés térmico provocaría protección celular, evitando daños o muerte del organismo frente a un estrés mayor (Diller, 2006), lo cual explicaría el aumento de expresión del gen a las 24 hrs y debido a la estabilidad de este mensajero su disminución a las 48 hrs, sosteniendo lo reportado por Holm *et al.*(2008), quienes señalaron que los celomocitos de erizos de mar muestran un aumento de Hsp70 en respuesta a cambios de temperatura. La expresión de Hsp70 es importante para la supervivencia de este organismo expuesto a estímulos de estrés térmico y durante el proceso celular normal (Stephanou y Latchman, 2011), favoreciendo su respuesta frente al estrés térmico.

Respecto a la expresión del transcrito en tejido intestinal, los resultados obtenidos por PCR semicuantitativa como cuantitativa demostraron un incremento en la expresión del transcrito donde la máxima expresión se alcanzó a las 6 horas a un estrés térmico de 10°C, muy similar a lo reportado en los estudios de Park *et al.*(2007), cuyas observaciones señalan que a un estrés térmico de 10°C los tejidos de almejas antárticas también presentan una inducción de Hsp70. La explicación probable de este hecho es que en tejidos Hsp70 estaría protegiendo al organismo de un daño tisular, que se incrementa a medida que se presenta un estrés más severo.

Luego de un estrés la síntesis de Hsps se eleva o bien existe una tasa de expresión diferencial comparada con la condición normal (Diller, 2006). En este contexto, los erizos antárticos presentan un aumento de la expresión de Hsp70, existiendo diferencias significativas en la

inducción del transcrito en tejidos y celomocitos respecto a la condición control. Si bien existe una inducción del transcrito, esta respuesta es leve.

Al comparar los datos obtenidos con especies marinas templadas, se demuestra que la elevación de la temperatura alrededor de 40°C provoca una sobreexpresión significativa de Hsp70 en el mejillón *Mytilus galloprovincialis* y en la almeja *Tapes philippinarum*.

Aunque los erizos antárticos tienen una demostrable respuesta de estrés térmico a temperaturas de 5 y 10°C, estos niveles temperatura son incompatibles con los efectos nocivos de la elevación de las temperaturas polares del agua de mar (Park, et al 2007). El bajo nivel en que se expresa ARNm-Hsp70 en tejido intestinal y celomocitos de *S.neumayeri*, se explica en base a que los organismos antárticos son muy sensibles y más vulnerables a los cambios de temperatura que otros, lo cual hace que respondan lentamente (Portner *et al.*, 2007).

### **6.3 Expresión de la proteína Hsp70 en celomocitos de *S.neumayeri*.**

En cuanto a la expresión de la proteína en la cinética de estrés térmico de celomocitos, sólo se obtuvieron diferencias significativas a 10°C-48 horas, siendo esta condición de estrés la que presentó el mayor porcentaje de celomocitos positivos de 10,39%, el doble de lo que se obtuvo en la condición normal (5,9%), es decir en condiciones de temperatura más elevadas aparecen más celomocitos que expresan la proteína en comparación con el control que es menor. Este incremento en el porcentaje de celomocitos que expresan la proteína se debe al efecto del estrés térmico y la duración de la exposición, que inducen la síntesis de proteínas Hsp70 en celomocitos que no se expresaban en condiciones normales.

Bajo una condición de temperatura normal, las Hsps se expresan en bajos niveles (Asea *et al.*, 2002), este no fue el caso en erizos antárticos, ya que la expresión de la proteína en celomocitos control es mayor que cuando se somete a un estrés térmico de 5 y 10°C durante una hora.

Nuestros resultados muestran una relación entre el porcentaje de celomocitos positivos que expresan la proteína y el aumento de temperatura. Por lo tanto se podría atribuir la presencia de Hsp70 en celomocitos, un rol adicional como una señal de peligro producido cuando las células están bajo presión y como activadores del sistema inmune (Asea, 2006). Por lo demás se ha demostrado que la expresión de Hsp70s afecta a la propagación de la activa inmunidad de celomocitos en erizo de mar (Browne *et al.*, 2007; Holm *et al.*, 2008), al parecer ésta actuaría como una especie de antígeno ayudando de forma indirecta a la protección del organismo ante un factor adverso. En este contexto se ha propuesto el número de celomocitos y la expresión de Hsp70 como marcadores de estrés (Holm *et al.*, 2008).

Respecto a la identificación de la proteína Hsp70 en celomocitos mediante inmunofluorescencia, permitió confirmar los resultados obtenidos por inmunocitoquímica. Las imágenes adquiridas por microscopía de fluorescencia demostraron que los celomocitos emiten fluorescencia de color verde cuando expresan la proteína Hsp70, esta característica se presentó en todas las condiciones (normal y de estrés). Debido a que la fluorescencia es estable durante un corto periodo, no fue posible comprobar el porcentaje de celomocitos positivos.

En cuanto a la localización intracelular de las Hsp70 inducidas por calor Giudice *et al.* (1999), sostienen que durante el desarrollo de los erizos de mar la mayoría aparece en el citoplasma, poco después del estrés térmico y se mantiene durante al menos 22 horas. No obstante una cantidad sustancial también aparece en el núcleo, poco después del estrés térmico, permaneciendo durante al menos 5 horas y luego desaparece lentamente. Este hecho en cierta forma afirma los resultados obtenidos por inmunocitoquímica en que se visualizó células inmunes de *S.neumayeri* que expresan la proteína Hsp70 en el núcleo y citoplasma. Por lo tanto, queda por confirmar mediante microscopía confocal la localización de la proteína y durante qué periodos aparece en el núcleo y en el citoplasma. Al igual que en este trabajo, Holm *et al.* (2008) mediante inmunocitoquímica lograron visualizar la ubicación de Hsp70 en celomocitos durante el curso de tiempo del experimento.



#### 6.4 Expresión de la proteína Hsp70 en tejidos de *S.neumayeri*.

Al analizar la expresión de HSp70 en tejidos de *S.neumayeri* sometidos a estrés térmico, sólo se pudo determinar la presencia de la proteína Hsp70. Para comprobar si existe una sobreexpresión de Hsp70 en tejido, es necesario cuantificar y medir la expresión de la proteína mediante técnicas como Wester blot o bien algún software que mida la señal de las imágenes adquiridas por microscopía.

La utilización de dos metodologías inmunohistoquímica e inmunofluorescencia presenta una gran ventaja, ya que permitió identificar y a la vez comprobar que Hsp70 se expresa en tejido intestinal y esófago, de cierta manera esto demostraría que la expresión de estas chaperonas no es tejido-específico o que posiblemente esté relacionado con el grado de vulnerabilidad que presentan algunos tejidos frente al estrés térmico (Piano *et al.*, 2005).

Aunque la proteína se expresa en ambos tejidos (intestino y esófago) tanto en condición normal como de estrés térmico (imágenes no mostradas), es importante resaltar que la presencia de Hsp70 en todas las condiciones de estrés sólo se evaluó en tejido intestinal. En contraste con los resultados obtenidos, Piano *et al.* (2005) encontró que la expresión de Hsps inducible por calor en branquias y manto de ostras, no está presente en tejidos de animales control. Sin embargo otros datos sobre la expresión de proteínas en *Ostrea edulis* y *Crassostrea gigas* describen que las isoformas Hsp70 y Hsc70 se expresan al mismo tiempo en tejidos de ostras control y que tras el shock térmico aparece una nueva isoforma. Del mismo modo, tanto Hsp70 y Hsc70 están presentes en tejidos de *Mytilus sp.* sin estresar y los niveles de Hsp70 se incrementan en respuesta al calor (Franzellitti y Fabri, 2005).

Si bien se determinó la presencia de Hsp70 en tejidos control, no se sabe si la expresión en esófago e intestino de *S.neumayeri* es inducible por calor, por lo tanto es un gran desafío que queda por confirmar.

Actualmente existen muchos métodos de tinción que pueden ser usados para localizar antígenos en tejidos y células, en este estudio el método NBT-BCIP resultó ser eficaz en la detección de la proteína Hsp70.

A través de este estudio y a partir de todos los datos encontrados en organismos antárticos, se demuestra que no es sencillo generalizar acerca de la capacidad de los organismos marinos antárticos para inducir genes o proteínas Hsp70 en respuesta a elevadas temperaturas del agua de mar (Clark *et al.*, 2008), ya que no todas las especies muestran o carecen de la clásica respuesta de estrés térmico. Los datos indican que la presencia de Hsp70 en tejidos y células inmunes puede proporcionar un marcador biológico útil para los estudios ante un posible escenario de calentamiento global, que eleve las temperaturas en la Antártica.

## 7. CONCLUSIONES

Los erizos antárticos son capaces de inducir una respuesta de estrés térmico después de ser sometidos a aumentos de temperaturas, expresándose esta respuesta a nivel de transcrito y proteína en tejidos y células inmunes.

A partir de un ARNm se obtuvo la secuencia parcial del gen Hsp70 en el equinodermo antártico *S. neumayeri*, con un tamaño de 650 pb. La presencia de Hsp70 en *S. neumayeri*, representa el primer reporte de la expresión del gen como de la proteína de tipo Hsp70 en un erizo estenotermo. Los erizos antárticos presentan un aumento de la expresión de Hsp70, existiendo leves pero significativas diferencias respecto a la condición de temperatura normal. Por otra parte existen pequeñas variaciones de la expresión de la proteína en celomocitos. El uso de herramientas de inmunología complementarias a los trabajos de expresión a nivel de ARN, han sido un aporte ya que no existen trabajos que aborden estas dos aproximaciones en invertebrados marinos antárticos.

Estos resultados evidencian que estos equinodermos antárticos no han perdido la capacidad de expresar e inducir este tipo de chaperonas cuando son sometidos a elevadas temperaturas, presentando cierta capacidad de respuesta fisiológica frente al estrés térmico.

Con los resultados obtenidos se tiene una tendencia de un aumento en la expresión de Hsp70 en el erizo antártico *S. neumayeri*. Si bien los niveles de expresión son bajos, aún así demostró variaciones significativas en la expresión de Hsp70, por lo que no se descarta la posibilidad de utilizar este tipo de chaperona como un potencial biomarcador. Sin embargo, es necesario obtener datos más concluyentes acerca de esta proposición. Se espera obtener la secuencia completa del gen Hsp70 en *S. neumayeri* y validar los datos con otras cinéticas de estrés térmicos que consideren temperaturas menores a las utilizadas, para tener una idea clara de los límites térmicos. Con la finalidad de generar modelos que indiquen la salud de los ecosistemas antárticos, que se pueden ver seriamente afectados por el calentamiento global y debido a la directa relación con el estrés térmico, se propone el uso de Hsp70 como un biomarcador que permitirá detectar, cuantificar y/o evaluar de forma indirecta los efectos que podría provocar la elevación de la temperatura en erizos antárticos y en el ecosistema marino de la Antártica.

## 8. LITERATURA CITADA

**Asea, A.**, 2006. Initiation of the Immune Response by Extracellular Hsp72: Chaperokine Activity of Hsp72. *Curr Immunol Rev* 2, 209-215.

**Asea, A., Rehli, M., Kabingu, E., Boch, J.A., Bare, O., Auron, P.E., Stevenson, M.A., Calderwood, S.K.**, 2002. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem* 277, 15028-15034.

**Barnes, D.K.A., Fuentes, V., Clarke, A., Schloss, I., Wallace, M.**, 2006. Spatial and temporal variation in shallow seawater temperatures around Antarctica. *Deep-Sea Research II* 53, 853-865.

**Barragán-Veloz, E.**, 2007. Proteínas de Choque Térmico (HSP). *Expresiones Médicas*, Publicación del Programa de Médico Cirujano, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez 3, 13-17.

**Barriga, A.**, 2006. Enzimas lipolíticas de krill antártico: purificación y caracterización, ¿Enzimas adaptadas al frío? *Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas Universidad de Chile.*, Santiago-Chile. , p. 180.

**Bonaventura, R., Zito, F., Costa, C., Giarrusso, S., Celi, F., Matranga, V.**, 2011. Stress response gene activation protects sea urchin embryos exposed to X-rays. *Cell Stress and Chaperones* 16, 681-687.

**Brockington, S., Clarke, A.**, 2001. The relative influence of temperature and food on the metabolism of a marine invertebrate. *J Exp Mar Bio Ecol* 258, 87-99.

**Browne, C.L., Swan, J.B., Rankin, E.E., Calvert, H., Griffiths, S., Tytell, M.**, 2007. Extracellular heat shock protein 70 has novel functional effects on sea urchin eggs and coelomocytes. *The Journal of Experimental Biology* 210, 1275-1287.

**Burdon, R.H.**, 1986. Heat shock and the heat shock proteins. *Biochem J* 240, 313-324.

**Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A.**, 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci Total Environ* 247, 295-311.

**Carrasco, L., Sañudo, B., Martínez, I., De Hoyo, M.**, 2010. Proteínas de estrés y ejercicio físico. *Revista Internacional de Medicina y Ciencias de la Actividad Física y el Deporte* 10, 1-21.

**Clark, M.S., Fraser, K.P., Peck, L.S.**, 2008. Lack of an HSP70 heat shock response in two Antarctic marine invertebrates. *Polar Biol* 31, 1059-1065.

**Clarke, A.**, 2008. Antarctic marine benthic diversity: patterns and processes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 366, 48-55.

- Clarke, A., Johnston, N.,** 2003. Antarctic marine benthic diversity. *Oceanography and Marine Biology* 41, 47-114
- Chen, B., Kayukawa, T., Monteiro, A., Ishikawa, Y.,** 2006. Cloning and characterization of the HSP70 Gene, and its expression in response to diapauses and thermal stress in the onion maggot, *Delia antiqua*. *J Biochem Mol Biol* 39, 749-758.
- Chiarelli, R., Agnello, M., Roccheri, M.C.,** 2011. Sea urchin embryos as a model system for studying autophagy induced by cadmium stress. *Autophagy* 7, 1028-1034.
- Di Liegro, C.M., Rinaldi, A.M.,** 2007. Hsp56 mRNA in *Paracentrotus lividus* embryos binds to a mitochondrial protein. *Cell Biology International* 31, 1331-1335.
- Diller, K.R.,** 2006. Stress protein expression kinetics. *Annu Rev Biomed Eng* 8, 403-424.
- Edmondson, D.G., Roth, S.Y.,** 2001. Identification of protein interactions by far Western analysis. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 20, Unit 20 26.
- Elkon, R., Zlotorynski, E., Zeller, K.I., Agami, R.,** 2010. Major role for mRNA stability in shaping the kinetics of gene induction. *BMC Genomics* 11, 259.
- Fangue, N.A., Hofmeister, M. y Schulte, P.M.,** 2006. Intraspecific variation in thermal tolerance and heat shock protein gene expression in common killifish, *Fundulus heteroclitus*. *The Journal of Experimental Biology* 209, 2859-2872.
- Farcy, E., Serpentine, A., Fiévet, B., Lebel, J.M.,** 2006. Identification of cDNAs encoding HSP70 and HSP90 in the abalone *Haliotis tuberculata*: Transcriptional induction in response to thermal stress in hemocyte primary culture. *Comparative Biochemistry and Physiology* 146, 540-550.
- Feder, M.E., Hofmann, G.E.,** 1999. Heat shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol* 61, 243-282.
- Franzellitti, S., Fabbri, E.,** 2005. Differential HSP70 gene expression in the Mediterranean mussel exposed to various stressors. *Biochem Biophys Res Commun* 336, 1157-1163.
- Freeman, B.C., Myers, M.P., Schumacher, R., Morimoto, R.I.,** 1995. Identification of a regulatory motif in Hsp70 that affects ATPase activity, substrate binding and interaction with HDJ-1. *The EMBO Journal* 14, 2281-2292.
- Freeman, M.L., Borrelli, M.J., Meredith, M.J., Lepock, J.R.,** 1999. On the path to the heat shock response: destabilization and formation of partially folded protein intermediates, a consequence of protein thiol modification. *Free Radic Biol Med* 26, 737-745.
- Geraci, F., Pinsino, A., Turturici, G., Savona, R., Giudice, G., Sconzo, G.,** 2004. Nickel, lead, and cadmium induce differential cellular responses in sea urchin embryos by activating the synthesis of different HSP70s. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 322, 873-877

**Gerday, C., Aittaleb, M., Bentahir, M., Chessa, J.P., Claverie, P., Collins, T., D'Amico, S., Dumont, J., Garsoux, G., Georgette, D., Hoyoux, A., Lonhienne, T., Meuwis, M.A., Feller, G., 2000.** Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends Biotechnol* 18, 103-107.

**Gestel, C.A.M., Brummelen, T.C., 1996.** Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology* 5, 217-225.

**Giudice, G., Sconzo, G., Roccheri, M.C., 1999.** Studies on heat shock proteins in sea urchin development. *Develop. Growth Differ* 41, 375–380.

**Griffiths, H.J., 2010.** Antarctic Marine Biodiversity – What Do We Know About the Distribution of Life in the Southern Ocean? *PLoS ONE* 5, 1-11

**Guzmán, X., 2007.** Empleo de biomarcadores para evaluar el proceso de daño en ostión *Crassostrea virginica* y su respuesta ambiental. Tesis Doctoral para obtener el grado de doctora en Biología Experimental. División de Ciencias Biológicas y de la Salud Universidad Autónoma Metropolitana, México, D. F.

**Hammond, L.M., Hofmann, G.E., 2010.** Thermal tolerance of *Strongylocentrotus purpuratus* early life history stages: mortality, stress-induced gene expression and biogeographic patterns. *Marine Biol* 157, 2677–2687.

**Hochachka, P.W., Somero, G.N., 2002.** Biochemical adaptation: Mechanism and process in physiological evolution. Oxford University Press, Oxford, 466pp.

**Hofmann, G.E., Buckley, B.A., Place, S.P., Zippay, M.L., 2002.** Molecular Chaperones in Ectothermic Marine Animals: Biochemical Function and Gene Expression. *Integ. and Comp.Biol.* 42, 808–814.

**Holm, K., Hernroth, B., Thorndyke, M., 2008.** Coelomocyte numbers and expression of HSP70 in wounded sea stars during hypoxia. *Cell Tissue Res* 334, 319–325.

**Hughes, S.J.M., Jones, D.O.B., Hauton, C., Gates, A.R., Hawkins, L.E., 2010.** An assessment of drilling disturbance on *Echinus acutus* var. *norvegicus* based on in-situ observations and experiments using a remotely operated vehicle (ROV). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 395, 37-47.

**King, C.K., Riddle, M.J., 2001.** Effects of metal contaminants on the development of the common Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri* and comparisons of sensitivity with tropical and temperate echinoids. *MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES* 215, 143–154.

**Kohno, S., Katsu, Y., Urushitani, H., Ohta, Y., Iguchi, T., Guillette, L.J., Jr., 2010.** Potential contributions of heat shock proteins to temperature-dependent sex determination in the American alligator. *Sex Dev* 4, 73-87.

**Kourtidis, A., Drosopoulou, E., Nikolaidis, N., Hatzi, V.I., Chintiroglou, C.C., Scouras, Z.G., 2006.** Identification of several cytoplasmic HSP70 genes from the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and their long-term evolution in Mollusca and Metazoa. *J Mol Evol* 62, 446-459.

- Lee, Y.H., Song, M., Lee, S., Leon, R., Godoy, S.O., Canete, I.,** 2004. Molecular phylogeny and divergence time of the Antarctic sea urchin (*Sterechinus neumayeri*) in relation to the South American sea urchins. *Antarctic Science* 16, 29-36.
- Lister, K.N., Lamare, M.D., Burritt, D.J.,** 2010. Sea ice protects the embryos of the Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri* from oxidative damage due to naturally enhanced levels of UV-B radiation. *J Exp Biol* 213, 1967-1975.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D.,** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Lo, W.Y., Liu, K.F., Liao, I.C., Song, Y.L.,** 2004. Cloning and molecular characterization of heat shock cognate 70 from tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Cell Stress Chaperones* 9, 332-343.
- Matranga, V., Bonaventura, R., Di Bella, G.,** 2002. Hsp70 as a stress marker of sea urchin coelomocytes in short term cultures. *Cell. Mol. Biol* 48, 345-359.
- Matranga, V., Toia, G., Bonaventura, R., Muller, W.E.G.,** 2000. Cellular and biochemical responses to environmental and experimentally induced stress in sea urchin coelomocytes. *Cell Stress & Chaperones* 5, 113-120.
- Meredith, M.P., King, J.C.,** 2005. Rapid climate change in the ocean west of the Antarctic Peninsula during the second half of the 20th century. *GEOPHYSICAL RESEARCH LETTERS* 32, 1-5.
- Noonan, E.J., Place, R.F., Giardina, C., Hightower, L.E.,** 2007. Hsp70B' regulation and function. *Cell Stress Chaperones* 12, 219-229.
- Pace, D.A., Manahan, D.T.,** 2007. Cost of protein synthesis and energy allocation during development of antarctic sea urchin embryos and larvae. *Biol Bull* 212, 115-129.
- Park, H., Ahn, I.Y., Lee, H.E.,** 2007. Expression of heat shock protein 70 in the thermally stressed antarctic clam *Laternula elliptica*. *Cell Stress Chaperones* 12, 275-282.
- Parsell, D.A., Lindquist, S.,** 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet* 27, 437-496.
- Peck, L.S.,** 2005. Prospects for surviving climate change in Antarctic aquatic species. *Front Zool* 2, 9.
- Piano, A., Franzellitti, S., Tinti, F., Fabbri, E.,** 2005. Sequencing and expression pattern of inducible heat shock gene products in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Gene* 361, 119-126.
- Piano, A., Valbonesi, P., Fabbri, E.,** 2004. Expression of cytoprotective proteins, heat shock protein 70 and metallothioneins, in tissues of *Ostrea edulis* exposed to heat and heavy metals. *Cell Stress Chaperones* 9, 134-142.

- Pinsino, A., Thorndyke, M.C., Matranga, V., 2007.** Coelomocytes and post-traumatic response in the common sea star *Asterias rubens*. *Cell Stress & Chaperones* 12 331–341.
- Podrabsky, J.E., Somero, G.N., 2004.** Changes in gene expression associated with acclimation to constant temperatures and fluctuating daily temperatures in an annual killifish *Austrofundulus limnaeus*. *J Exp Biol* 207, 2237-2254.
- Portner, H.O., Peck, L., Somero, G., 2007.** Thermal limits and adaptation in marine Antarctic ectotherms: an integrative view. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 362, 2233-2258.
- Roccheri, M.C., Agnello, M., Bonaventura, R., Matranga, V., 2004.** Cadmium induces the expression of specific stress proteins in sea urchin embryos *Biochem and Biophysical Research Communications* 321, 80-87.
- Sconzo, G., Ferraro, M.G., Amore, G., Giudice, G., Cascino, D., Scardina, G., 1995.** Activation by heat shock of hsp70 gene transcription in sea urchin embryos. *Biochem Biophys Res Commun* 217, 1032-1038.
- Sconzo, G., Geraci, F., Melfi, R., Cascino, D., Spinelli, G., Giudice, G., Sirchia, R., 1997.** Sea urchin HSF activity in vitro and in transgenic embryos. *Biochem Biophys Res Commun* 240, 436-441.
- Sea Urchin Sequencing Consortium., 2006.** The Genome of the Sea Urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science* 314, 941-952.
- Shimada, J.C., Porto-Neto, L.R., Dauriz, M.B.B.C., Jensch-Junior, B.E., Silva, J.R.M.C., 2002.** Phagocytosis in vitro and in vivo in the Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri* at 0 °C. *Polar Biol* 25, 891-897.
- Smith, L.C., Rast, J.P., Brockton, V., Terwilliger, D.P., Nair, S.V., Buckley, K., Majeske, A.J., 2006.** The sea urchin immune system. *Inv Surv Journal* 3, 25-39.
- Stephanou, A., Latchman, D.S., 2011.** Transcriptional modulation of heat-shock protein gene expression. *Biochem Res Int* 2011, 238601.
- Stumpp, M., Wren, J., Melzner, F., Thorndyke, M.C., Dupont, S.T., 2011.** CO<sub>2</sub> induced seawater acidification impacts sea urchin larval development I: elevated metabolic rates decrease scope for growth and induce developmental delay. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 160, 331-340.
- Teixidó, N., 2004.** Patrons de les comunitats bentòniques d'altres latituds a l'antàrtida. *Omnis cellula* 6, 24-34.
- Toro-Restrepo, B., 2010.** Uso de los biomarcadores en la evaluación de la contaminación. *Rev Luna Azul* 32.
- Tutar, Y., Song, Y., Masison, D.C., 2006.** Primate chaperones Hsc70 (constitutive) and Hsp70 (induced) differ functionally in supporting growth and prion propagation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 172, 851-861.



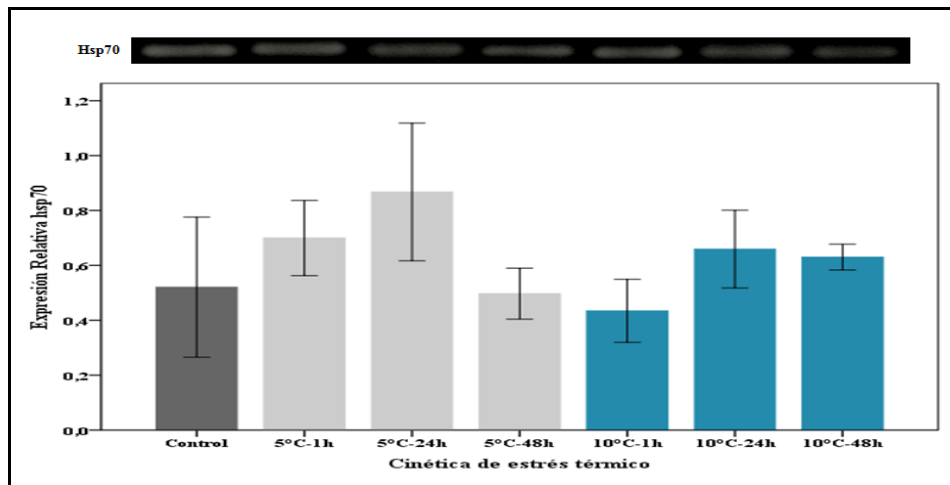
**Ueda, N., Boettcher, A.,** 2009. Differences in heat shock protein 70 expression during larval and early spat development in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791). *Cell Stress Chaperones* 14, 439-443.

**van Dijk, P.L., Tesch, C., Hardewig, I.I., Portner, H.O.,** 1999. Physiological disturbances at critically high temperatures: a comparison between stenothermal antarctic and eurythermal temperate eelpouts (Zoarcidae). *J Exp Biol* 202 Pt 24, 3611-3621.

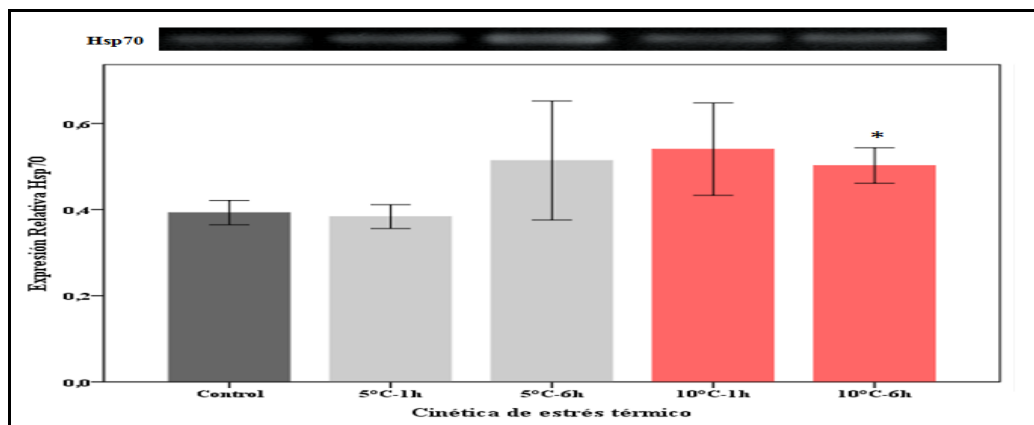
**Wirth, D., Christians, E.S., Drion, P.V., Dessy-Doize, C., Gustin, P.,** 2003. Les protéines de choc thermique (heat shock proteins-Hsps).II. Hsp70: biomarqueur et acteur du stress cellulaire. *Ann Méd Vét* 147, 127-144.

**Young, R.A.,** 1990. Stress proteins and immunology. *Annu Rev Immunol* 8, 401-420.

## 9. ANEXOS



**Anexo 1.** Expresión relativa del transcrito SNHsp70 en la cinética de celomocitos de *S.neumayeri* mediante RT-PCR semicuantitativa. Los promedios se expresan en UA (unidades arbitrarias). El análisis T-student, confirma que los promedios no difieren significativamente.



**Anexo 2.** Expresión relativa del transcrito SNHsp70 en la cinética de tejido intestinal de *S.neumayeri* mediante RT-PCR semicuantitativa. Los promedios se expresan en UA (unidades arbitrarias). El análisis T-student reveló variaciones en la expresión del transcrito, la condición 5°C-1h se mantuvo similar al control, las condiciones 5°C-6h, 10°C-1h y 10°C-6h presentaron una leve inducción encontrándose solo diferencias significativas en esta última.

**Anexo 3.** Tabla con los porcentajes de celomocitos positivos que expresa la proteína en cada condición de estrés térmico.

<b>% Celomocitos (+) (con tres repeticiones)</b>	<b>Control</b>	<b>5°C-1h</b>	<b>5°C-24h</b>	<b>5°C-48h</b>	<b>10°C-1h</b>	<b>10°C-24h</b>	<b>10°C-48h</b>
1	4,583	2,5	6,38	6,66	3	8,88	10,23
2	6,33	5,83	7,77	4	6,19	3,05	10,95
3	6,94	1,90	6,66	11,66	4,76	8,61	10
Promedio	5,953	3,41	6,94	7,44	4,65	6,85	10,39
DE	1,2	2,11	0,73	3,89	1,59	2,68	0,40

**Anexo 4.** Tabla resumen de los resultados de la prueba estadística T-student, considerando un valor crítico  $< 0,05$

<b>Condición control v/s estrés</b>	<b>Valor p. de T-student</b>
Control - 5°C-1h	0,146
Control - 5°C-24h	0,296
Control - 5°C-48h	0,561
Control - 10°C-1h	0,325
Control - 10°C-24h	0,681
Control - 10°C-48h	0,004