



Universidad Austral de Chile

Escuela de Biología Marina

Profesora Patrocinante:

Dra. Andrea Silva

Instituto de Bioquímica y Microbiología
Facultad de Ciencias, U. Austral de Chile

Profesora Co-patrocinante:

Dra. Leyla Cárdenas

Instituto de Cs. Ambientales y Evolutivas
Facultad de Ciencias, U. Austral de Chile

Profesor Informante:

Dr. Roberto Néspolo

Instituto de Cs. Ambientales y Evolutivas
Facultad de Ciencias, U. Austral de Chile

**CAPACIDAD DE RESPUESTA A VARIACIONES TÉRMICAS EN
EL ERIZO ROJO *Loxechinus albus* (Molina, 1782): ESTUDIANDO
LA FLEXIBILIDAD FENOTÍPICA EN GENES CANDIDATOS
COMO MECANISMO DE ACLIMATACIÓN.**

Tesis de Grado presentada como parte
de los requisitos para optar al grado de
Licenciado en Biología Marina y
Título Profesional de *Biólogo Marino*.

JONATHAN ANDRÉS VERGARA AMADO

Valdivia – Chile

2014

Agradecimientos

Agradecer todo lo que debo de agradecer (valga la redundancia), es algo bien complejo, no terminaría nunca. Pero intentaré plasmar todos los que se me vengán a la mente en estos momentos.

Mi amada Mami, gracias por todo, simplemente sin tu apoyo incondicional, no estaría donde estoy, ni sería quien soy, eres una gran amiga, irradias alegría a quienes te rodean. Mi querido Padre, el mas regalón de todos, que sería de mi sin tus constantes presiones para terminar mis asuntos, me enseñaste a ser alguien responsable, y me apoyaste siempre, un gran amigo. Mi Wely, o mi otra mami, para ti siempre gracias, soy el nieto más afortunado del universo y mas allá. Mi broderin y hermana menor, jajajaja estos cauritos y sus historias me han alegrado a la distancia por todos estos años, y me han hecho crecer junto a ellos. No existió la distancia con ninguno de ustedes, siempre cercanos a mi.

A la Profesora Andrea Silva, mi guía y amiga en todo momento, siempre pensando en sus alumnos y sus amigos, gracias por todo. A la profesora Leyla Cárdenas, su exigencia y empatía, hace que uno se divierta con lo que va aprendiendo. Al profesor Roberto Néspolo, por hacer de esas cosas complejas, cosas más sencillas. A todos ustedes, gracias por su tiempo.

A mis amigos, los cuales son bastantes. Si nombro a uno, y no a otros, se picarán algunos, por consiguiente gracias a todos los BIMA y otros ex BIMA, que esta mas que claro que somos familia. A mis amigos que conocí en Niebla (Candy, Javi, Nico, Papix, Migueral, Yisiland, Norway y algún otro por ahí que quizás me faltó nombrar), otra linda familia que formé y con la que compartí lindos momentos. A la pequeña familia de empaques unimarc.

Y algunos amigos que fueron mi gran familia por 7 años, Carlala, Pobemin, Madrinas, Karina Gabriel, y la querida Juanin, eterna compañera y apañadora. También a mi amigo de infancia, Manolete. Gracias por la buena onda emanada y compartida todo este tiempo.

Doger, Teodoro, y Saruka, mis amigos/mascotas, por recibirme siempre con alegría.

A mi Superheroína cactácea por su alegría y apoyo.

Agradezco también al proyecto FONDEF D09I1065 que hizo posible que esta tesis se lleve a cabo.

Índice:

1. Resumen.....	4
2. Introducción.....	5
3. Hipótesis.....	10
4. Objetivos	
4.1 Objetivo general.....	10
4.2 Objetivos específicos.....	10
5. Materiales y Métodos	
5.1 Recolección de muestras.....	11
5.2 Experimento de aclimatación.....	12
5.3 Sistema de evaluación para la salud de los erizos.....	13
5.4 Perfil temporal de expresión.....	14
5.5 Extracción de RNA y síntesis de cDNA.....	15
5.6 Elección de genes candidatos, diseño de partidores y RT-qPCR.....	17
5.7 Caracterización de los perfiles de expresión.....	17
5.8 Tratamiento Control o muestra calibradora.....	19
5.9 Análisis estadístico.....	19
6. Resultados	
6.1 Respuesta de la aclimatación.....	21
6.2 Extracción de RNA para los distintos tratamientos.....	21
6.3 Elección de genes candidatos.....	23

6.4	Diseño y validación de partidores.....	24
6.5	Perfiles de expresión	
6.5.1	α -Na ⁺ /K ⁺ /ATPase.....	27
6.5.2	β Na ⁺ /K ⁺ /ATPase.....	28
6.5.3	Citocromo P 450.....	29
6.5.4	HSP 70.....	30
6.5.5	HSP 90.....	31
6.6	Análisis estadístico.....	32
6.6.1	Análisis estadístico incluyendo el gen <i>RBM8A</i> como gen candidato.....	34
7.	Discusión.....	36
7.1	Caracterización de la viabilidad de los erizos frente a variación térmica.....	36
7.2	Respuesta molecular de la capacidad aclimatatoria en <i>Loxechinus albus</i>	37
7.3	Genes codificantes <i>Na⁺/K⁺-ATPase</i> (Subunidades α y β).....	37
7.4	Gen codificante para Citocromo P 450.....	39
7.5	Genes codificantes para proteínas de choque térmico, familia 70 y 90.....	40
7.6	Gen RNA-binding protein 8A (<i>RBM8A</i>).....	41
7.7	Flexibilidad fenotípica.....	41
8.	Conclusión.....	42
9.	Bibliografía.....	43

1. Resumen:

Las condiciones ambientales tienen un fuerte efecto en los organismos, siendo uno de los principales factores que determina su rango de distribución. La persistencia de una población en un determinado ambiente depende de su capacidad de responder a los cambios ambientales, y esta capacidad de respuesta está determinada tanto por su constitución genética como por su tolerancia fisiológica. La temperatura es uno de los principales factores determinantes de la distribución y abundancia de las especies, y en forma muy significativa para los ectotermos. Para este grupo se ha descrito que la resistencia a variaciones térmicas, involucra en muchos casos “flexibilidad fenotípica”. Un enfoque para estudiar flexibilidad fenotípica, es a través de estudios transcriptómicos en genes claves llamados “genes candidatos”. En esta tesis, se exploró el efecto de la temperatura sobre la capacidad aclimatoria del erizo rojo *Loxechinus albus*. En otras palabras, se abordó la respuesta de flexibilidad fenotípica de esta especie a la temperatura, utilizando un enfoque molecular de genes que estarían putativamente involucrados en esta respuesta fisiológica. En este estudio se observó la expresión de 5 genes candidatos asociados a estrés en el erizo rojo *Loxechinus albus*, recolectado en la localidad Los Molinos. Los erizos fueron aclimatados a dos tratamientos de temperatura, calor ($18 \pm 1^\circ\text{C}$) y frío ($10 \pm 1^\circ\text{C}$), y un tratamiento control ($14 \pm 1^\circ\text{C}$) que utilizado como calibrador. Los individuos fueron recolectados durante distintos periodos de tiempo (2, 6, 12 y 48 horas) para luego comparar los valores de expresión, en los 5 genes candidatos, mediante análisis de RT-qPCR. Los resultados muestran que existe un efecto significativo de los tratamientos Temperatura y de Tiempo, mostrando una mayor sobreexpresión de los genes en el tratamiento calor para los 5 genes candidatos seleccionados. Para el caso del tiempo, se observa un aumento de la expresión al inicio (2 y 6 horas), la cual disminuye en los tiempos restantes (12 y 48 horas), siendo igual para todos los genes. Así, la exposición a una variación térmica induciría en *L. albus* una respuesta plástica transcripcional que involucraría al menos la sobre expresión en los 5 genes estudiados en esta tesis, produciendo una alteración en el fenotipo de un organismo para aclimatarse a la nueva condición ambiental. Dicho proceso es una respuesta plástica flexible que le permite a los individuos volver a sus condiciones transcriptómicas iniciales una vez alcanzada la aclimatación.

2. Introducción:

Las alteraciones ambientales son, en general, percibidas por las poblaciones como presiones de selección sobre uno o un conjunto de rasgos relacionados con el desempeño (Gienapp *et al.* 2008). Es así que, cuando hay presiones de selección generadas por algún estrés, las poblaciones podrían responder de tres maneras (Davis *et al.* 2005; Gienapp *et al.* 2008): (1) persistencia mediada por plasticidad fenotípica, en donde el estrés sigue estando dentro de los límites tolerables para la especie, la cual es capaz de alterar o modificar rasgos sin alterar su constitución genética; (2) migración, a regiones donde las condiciones estén dentro de los límites de tolerancia para la especie, provocando eventos de extinción local o extensión de la distribución, y (3) evolución, donde las especies generarán adaptación local a las nuevas condiciones a través de cambios en la media fenotípica, y frecuencias alélicas. En la naturaleza, una combinación de estos tres procesos es la que generalmente da cuenta de los cambios observados (Davis & Shaw 2001).

La plasticidad fenotípica, una de las respuestas más generalizadas frente situaciones de estrés, es la capacidad de un genotipo para generar diversos fenotipos en un gradiente ambiental, y su descriptor es la norma de reacción (Stearns 1989; Scheiner 1993; Piersma & Drent 2003). Así, la plasticidad fenotípica podría representar una estrategia exitosa de corto plazo para hacer frente a este factor estresante (Gabriel 2005; Gienapp *et al.* 2008). Esta es adaptativa solamente si las modificaciones asociadas al cambio plástico, aumentan la adecuación biológica del organismo en las nuevas condiciones ambientales (Ghalambor *et al.* 2007).

Las respuestas plásticas pueden ser gatilladas por factores bióticos. Por ejemplo, *Daphnia pulex* dependiendo de la presencia o ausencia de sus especies depredadoras, presentará distintas tasas de crecimientos, talla de madurez e incluso diferencias en su morfología (Lüning 1992; Black 1993). Así mismo, en erizos, se ha observado que cuando están en presencia de depredadores, presentan esqueletos más gruesos, gónadas más pequeñas y cambios en su tasa de crecimiento (Selden *et al.* 2009). Más aun, Rusell (1998) & Ebert (1996) encontraron, para este mismo grupo taxonómico, distintas respuestas morfológicas bajo disponibilidades de alimento variables. Por otra parte, las respuestas de plasticidad, también pueden deberse a factores abióticos. Por ejemplo, se conoce que en

varias especies de reptiles, el sexo está determinado por la temperatura a la cual se incuban los huevos (Shine 1999). En erizos, Hernandez & Rusell (2010), encontraron que los distintos tipos de sustrato, afectarán las tasas de crecimiento, su movimiento y alimentación.

Ambos factores, ya sea bióticos o abióticos, inducirán cambios en la fisiología, bioquímica, historia de vida y morfología, es decir en diversos rasgos del individuo (Gabriel 2005). El tipo de plasticidad depende del curso temporal del cambio ambiental en función del tiempo generacional. Si el efecto ambiental es más corto que el tiempo de vida de un organismo y la plasticidad fenotípica es irreversible, esta no será adaptativa y generaría una desventaja para el organismo, ya que no requeriría más de esa adaptación (Piersma & Drent 2003). En el caso de que esta fuera reversible, se ha clasificado como flexibilidad fenotípica (Piersma & Drent 2003), y permitiría volver al estado anterior en el caso de que este le confiera una ventaja adaptativa.

La temperatura, es quizás el factor abiótico más importante y más estudiado, que afecta la fisiología, ecología y evolución en animales endotermos y ectotermos (Antinuchi *et al.* 2003) y, afecta prácticamente todas las actividades bioquímicas y fisiológicas del organismo. Su variación espaciotemporal ocurre en diferentes escalas, lo que obliga a los organismos a verse desafiados constantemente a mantener su homeostasis (Johnston & Bennett 1996). Es así, que la fisiología térmica puede llegar a ser un factor significativo que enfatizará el éxito ecológico y evolutivo en un organismo (Antinuchi *et al.* 2003)

Los animales endotermos son aquellos que poseen la capacidad de regular la temperatura, mediante la producción de calor corporal, mientras que organismos ectotermos dependen de fuentes externas de calor (Antinuchi *et al.* 2003). Para ectotermos, la tasa metabólica aumenta con la temperatura, lo que ocasiona que absorban y metabolicen los recursos con lentitud cuando la temperatura es baja, y mayor rapidez si es alta (Iannacone & Alvarino 2007). Sin embargo, las temperaturas altas pueden ser peligrosas para los ectotermos, ya que pueden conducir a la inactivación o incluso la desnaturalización de las enzimas (Somero 1995). Si se somete a un ectotermo a mayores temperaturas durante varios días, su respuesta fisiológica sufrirá un cambio con respecto a otro organismo que no haya sido sometido a dicha temperatura, esta respuesta fisiológica de corto plazo es

denominada aclimatación (Barua & Heckathorn 2004; Bowler 2005). Esta última es una forma de flexibilidad fenotípica que se producen en respuesta a los cambios en el medio ambiente natural (Wilson & Franklin 2002).

Estudios de fisiología comparada han descrito que los componentes de la adecuación biológica en ectotermos incrementan gradualmente desde una temperatura mínima crítica (CT_{min}), alcanzando un óptimo a una determinada temperatura (T_{opt}), para decaer bruscamente cuando la temperatura ambiental se aproxima a su temperatura crítica máxima (Ct_{max}). Diversos factores influyen el desempeño térmico de los organismos, tales como; tiempo de exposición, edad, tamaño, experiencia térmica previa, estación del año (verano, invierno), entre otros (Schmidt-Nielsen 1995; Huey *et al.* 2012). Así, el desempeño que tenga un ectotermo dependerá de su experiencia térmica previa, principalmente la temperatura inmediatamente anterior a la actual (Huey *et al.* 2012). Por tanto, para minimizar el efecto las condiciones ambientales de procedencia, en estudios de fisiología animal, es recomendado someter a los organismos a un período de aclimatación común, para favorecer que su metabolismo fisiológico y bioquímico se ajuste a las nuevas condiciones.

De acuerdo a lo discutido anteriormente, la temperatura puede ser un agente selectivo importante, y la capacidad de respuesta para ajustar su fisiología térmica es clave en determinar su éxito ecológico y evolutivo (Antinuchi *et al.* 2003). En ectotermos, se ha descrito que la resistencia a estrés involucra en muchos casos “flexibilidad fenotípica” (Seebacher 2005). Una forma de estudiar flexibilidad fenotípica como respuesta a estrés, es a través de estudios transcriptómicos en genes claves llamados “genes candidatos”. Un gen candidato es cualquier gen putativamente asociado con un rasgo, fenómeno o cambio evolutivo, en base a comparaciones genéticas o funcionales y para el cual se hipotetiza que influya de manera similar en el fenotipo de otro organismo (Fitzpatrick *et al.* 2005; Hoffmann & Willi 2008; Franks & Hoffmann 2012). Existen varios estudios en que esta aproximación es utilizada. Por ejemplo, Hammond & Hofmann (2012) seleccionan genes candidatos para ver la respuesta transcriptómica en embriones de *Strongylocentrotus purpuratus* sometidos, a elevadas tasas de CO_2 . Por otra parte, Killian (2010), estudia en *S. purpuratus*, los patrones de expresión en genes candidatos asociados a la biomineralización, reportando diferencias en los niveles de expresión en distintos tejidos u

órganos. Núñez y col. (2011) observa en *Mytilus chilensis* el diferencial de expresión de distintos genes candidatos, en relación a su lugar de origen, para así poder cuantificar la diferencia, según área geográfica. En erizos marinos, Osovitz & Hofmann (2005) estudiaron en *S. purpuratus*, la expresión de un gen candidato (*hsp70*) asociado a estrés térmico expuesto a distintas temperaturas.

El erizo rojo *Loxechinus albus* es un ectotermo endémico de las costas peruanas y chilenas que está distribuido desde Isla Lobos de Afuera, Perú (6°- 53 'S), hasta el extremo sur de América del Sur (Cabo de Hornos, Chile 56° - 70' S)(Vásquez 2001). De comportamiento gregario (Larrain 1975; Orensanz *et al.* 2005), habita en el intermareal rocoso, donde se han obtenido registros de parches de estos erizos hasta los 100 m de profundidad (Molinet *et al.* 2012). Es uno de los herbívoros bentónicos más importantes en estos ecosistemas, pastando grandes algas laminarias intermareales y submareales (Dayton 1985), y algas a la deriva (Castilla & Moreno 1982; Contreras & Castilla 1987). Varias evidencias indican que esta especie de erizo controla la densidad de varias especies de algas, presentando un comportamiento “generalista”, es decir preferirá el alga con más abundancia (Castilla & Moreno 1982; Vásquez 2001). Aun así, en su dieta prevalecen en mayor abundancia las algas de los géneros *Lessonia* y *Ulva* (Vásquez *et al.* 1984).

Las poblaciones de *Loxechinus albus*, están sujetas de forma natural a estrés constante ya que la región intermareal resulta ser una zona de ambientes contrastante, con diversas variaciones abióticas tales como temperatura, pH, salinidad, cambios en la concentración de oxígeno disuelto en agua, entre otras (Hewatt 1937; Tomanek & Helmuth 2002). Entre las variaciones bióticas existen factores tales como disponibilidad de alimento, depredación, competencia, etc. (Hewatt 1937; Tomanek & Helmuth 2002). Como se explicó anteriormente, un mecanismo que presentan los organismos para evitar las fluctuaciones ambientales, es la migración. Si bien el desplazamiento diario de *L. albus* no ha sido registrado, si se tienen datos para el erizo *Strongylocentrotus franciscanus*. Para esta especie se ha registrado un desplazamiento aproximado de 7,5 a 15 cm/día en presencia de algas, y de 15 a 100 metros, en ausencia de estas (Mattison *et al.* 1976). Lo anterior nos hace suponer, que los erizos en general, no se desplazarán grandes distancias, por lo cual

diariamente están expuestos a variaciones abióticas como cambios de marea y a importantes fluctuaciones térmicas.

Como complemento a las características biológicas de *Loxechinus albus*, es importante destacar que es una especie de gran importancia económica, siendo uno de los equinodermos con mayor captura a nivel mundial y el principal constituyente de la pesquería bentónica en Chile (Bustos & Olave 2001), reportándose un desembarque de 30.000 toneladas en el año 2010 y generando ganancias de 75 millones de dólares durante el 2011 (IFOP 2012).

La transcriptómica es una poderosa herramienta que permite cuantificar el nivel de expresión de genes, siendo un potencial recurso para comprender fenómenos complejos ecológicos como cambios en el hábitat y adaptaciones locales (Gibson 2002). A su vez, el estudio de los perfiles de expresión de genes, permite hacer un link entre el conocimiento estático del genoma y el dinamismo del proteoma (Lesk 2007), aproximándonos en el conocimiento de la respuesta celular específica de los organismos frente al ambiente. La información genética disponible para la especie hasta la fecha es escasa, solo existe un trabajo donde *L. albus* es usado como grupo externo en estudios filogenéticos de especies antárticas utilizando 945pb del gen *Cytochrome oxidase COI* (Díaz *et al.* 2011). Un estudio reciente, construye el genoma mitocondrial completo de la especie y demuestra que *Paracentrotus lividus* seguido de *S. purpuratus*, son las especies más cercanas a *Loxechinus albus* (Aguilar *et al.* 2013, tesis de pregrado). Es por esto que en esta tesis, la información genética disponible para *P. lividus*, y *S. purpuratus* fue utilizada a manera comparativa para el estudio transcriptómico acá realizado.

Todos estos antecedentes, nos hacen proponer a *L. albus* como un buen modelo para estudiar la respuesta fisiológica frente a variaciones ambientales de temperatura. Así, en esta tesis exploramos el efecto de la temperatura en *Loxechinus albus*, abordando su respuesta de flexibilidad fenotípica mediante un enfoque transcriptómico de genes candidatos.

3. Hipótesis

La temperatura es uno de los principales factores abióticos que tiene un efecto inmediato e importante en el metabolismo fisiológico y bioquímico de los organismos ectotermos y por tanto genera respuestas asociadas a restablecer la homeostasis. Para *Loxechinus albus*, un aumento de la temperatura medioambiental genera flexibilidad fenotípica en la expresión de genes asociados a estrés. Esto debido a que se favorecerá la aclimatación y por tanto la restitución de los niveles de expresión génica iniciales.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Explorar los cambios de expresión en los genes candidatos asociados a estrés térmico en *Loxechinus albus*.

4.2 Objetivos específicos

- I. Determinar la respuesta conductual (Definida por Hernández *et. al* 2004) a la aclimatación en individuos juveniles de *L. albus* expuestos a diferentes temperaturas de agua.
- II. Identificar y desarrollar partidores para genes candidatos, seleccionados en base a una búsqueda bibliográfica, para un conjunto de genes asociados a estrés en *L. albus*.
- III. Caracterizar los perfiles de expresión, mediante RT-qPCR, de los genes candidatos, bajo estrés térmico y en una escala temporal, incluyendo 3 réplicas biológicas por tratamiento y un control de expresión, que será utilizado como un nivel de expresión basal.

5. Materiales y métodos

5.1 Recolección de muestras:

Mediante buceo autónomo realizado a unos 15 metros de profundidad, se recolectaron 100 individuos de *Loxechinus albus* en estado juvenil (30 a 50 mm; Barahona, 2003), de la caleta Los Molinos (39°40'S-73°12'W) (Fig. 1a). Se escogió trabajar con juveniles con el fin de evitar un “sobre estrés” por una posible liberación de gametos al colocarlos en los distintos tratamientos, o sea, trabajar solo con estrés asociado a temperatura, y no otros factores

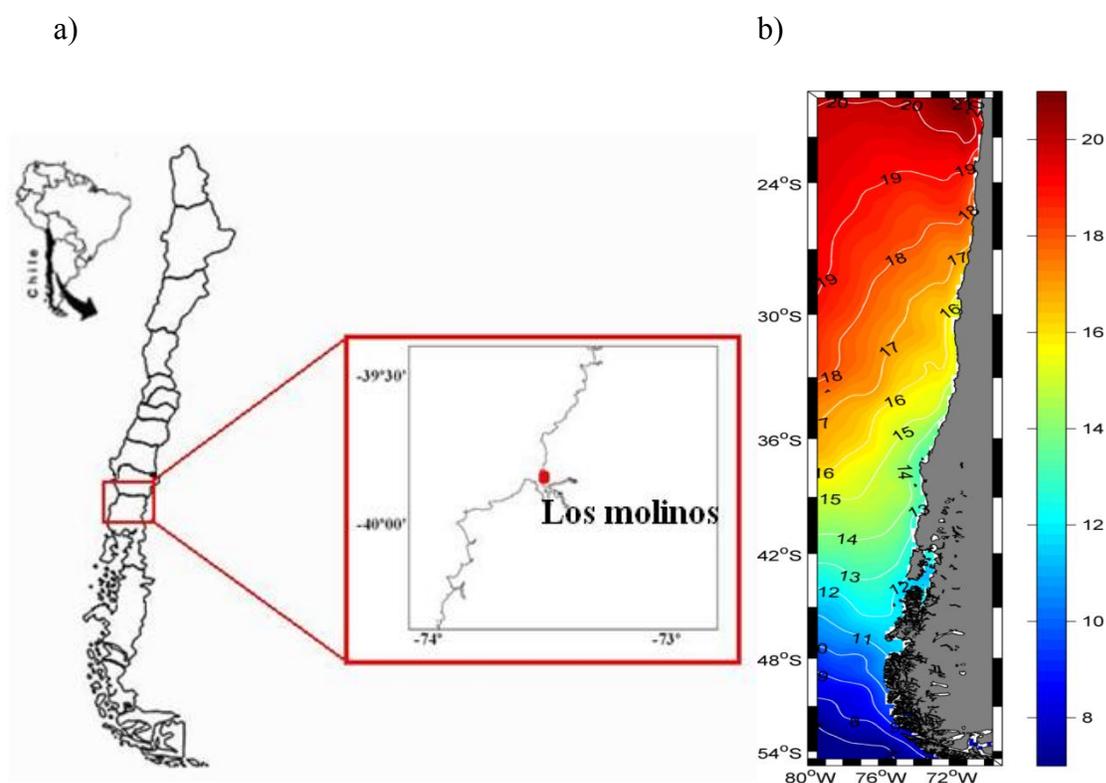


Figura 1. Detalle de la zona de muestreo y las temperaturas superficiales del mar.a) Localidad muestreada “Los Molinos”. El círculo rojo muestra la zona de donde se obtuvieron las muestras (39°40'S-73°12'W). b) Temperaturas de aguas superficiales en Chile obtenidas de un análisis satelital.

5.2 Experimento de aclimatación:

Un experimento de aclimatación fue realizado en el Laboratorio costero Calfuco (39°46'44"S- 73°23'31"W), ubicado aproximadamente a unos 9 Km. desde el sitio de muestreo, perteneciente a la Universidad Austral de Chile. En una primera instancia, los erizos fueron colocados en 2 estanques (32.5 x 62.5 cm y 28 cm) de aclimatación por 2 días, utilizando una temperatura de 14-15°C, correspondiente a la encontrada en la playa de Calfuco en la época de Verano. Posteriormente, las muestras fueron distribuidas en 3 tratamientos de temperatura, en estanques de las mismas medidas para cada tratamiento.

Las temperaturas de los tratamientos fueron elegidas a través de análisis del rango de distribución del erizo en Chile y la variabilidad térmica existente en esta zona en la época de verano (Fig. 1b), utilizando datos satelitales de las temperaturas superficiales del mar. Estos datos se obtuvieron del promedio entre los meses de Septiembre 2011 a Abril del 2012, procedentes de la combinación de sensores Advanced Very High Resolution Radiometer (AVHRR) y Advanced Microwave Scanning Radiometer (AMSR) e información in-situ procedentes de barcos y boyas con las cuales se corrige sus sesgos. Esta información se extrajo de <http://www.ncdc.noaa.gov/oa/climate/research/sst/oi-daily.php> con una resolución espacial de 25 km x 25 km (Reynolds *et al.* 2007), luego el perfil de temperaturas era confeccionado en el software Ocean Data View (ODV) (Schlitzer 2002). Para el tratamiento calor, la temperatura del agua fue elevada y mantenida entre $18 \pm 1^\circ\text{C}$ utilizando un termostato Atman Electronic Heater, mientras que para el tratamiento frío, la temperatura fue disminuida a $10 \pm 1^\circ\text{C}$ y mantenida mediante un enfriador. Finalmente, para el tratamiento Control, un grupo de erizos fue mantenido a $14 \pm 1^\circ\text{C}$. Para cada tratamiento un mínimo de 25-30 individuos fueron mantenidos con el fin de garantizar un mínimo de 3 réplicas biológicas finales.

Para los experimentos se utilizó agua de mar proveniente de la playa Calfuco, y se mantuvo un flujo constante del agua en los estanques. En cada estanque se introdujeron 30 erizos, el cual estaba dividido en 6 compartimientos con un total de 4 a 5 individuos, evitando así la sobrepoblación de la unidad experimental y facilitando la observación de los erizos (Fig. 2). Para todos los tratamientos, los erizos fueron alimentados a saciedad con el mismo género de algas (*Lessonia*) (Fig. 3).

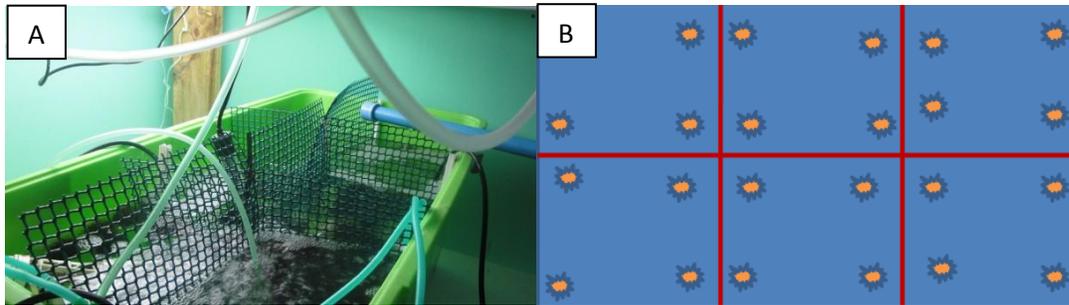


Figura 2: Detalle de los experimentos en laboratorio. (A) Estanques de erizos vistos desde arriba. (B) Esquema de la distribución de los erizos en los tanques. Los erizos se dispusieron en distintas zonas dentro de cada cuadro (6 cuadros por estanque), y estos cuadros estaban divididos en mallas que permitieron la adhesión de los erizos.

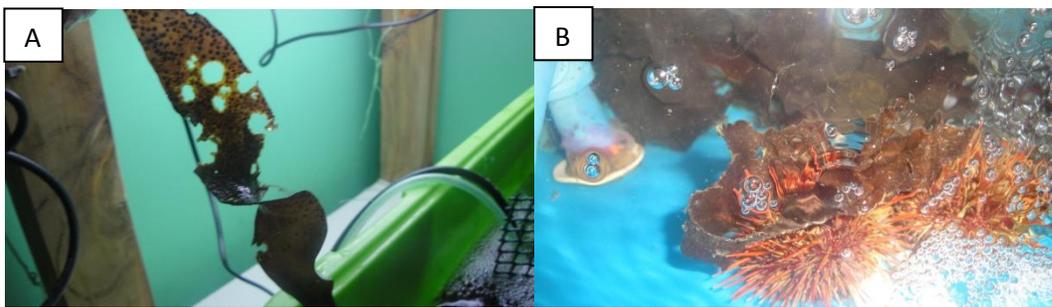


Figura 3: Alimentación de los erizos. (A) Alga del género *Lessonia* ocupada para la alimentación de los erizos en los experimentos. (B) Erizos alimentándose de *Lessonia*.

5.3 Sistema de evaluación para la salud de los erizos:

Para poder determinar la salud de los erizos expuestos a distintos tratamientos, se utilizó un sistema de evaluación generado por Hernández (2004), y se correlacionó a las temperaturas de agua al momento de obtener la muestra. Hernández determina que los erizos muestran una serie de respuestas conductuales bien definidas, clasificando el estado de salud del erizo en cinco etapas (Fig. 4):

- E1: Los erizos de mar se mueven activamente hacia el fondo del acuario con los pies ambulacrales extendidos al máximo
- E2: Retracción y disminución del movimiento de los pies ambulacrales seguido también por la disminución del movimiento de las espinas.
- E3: Con los pies ambulacrales retractados, los erizos incrementan el movimiento utilizando mayormente las espinas dorsales grandes y pequeñas.

- E4: Los erizos dejan de moverse, relajan las grandes espinas, pero la actividad continúa con movimientos ligeros de las pequeñas espinas.

- E5: Los erizos detienen el movimiento de todas sus espinas y pies ambulacrales, y en algunos especímenes el ano se abre.

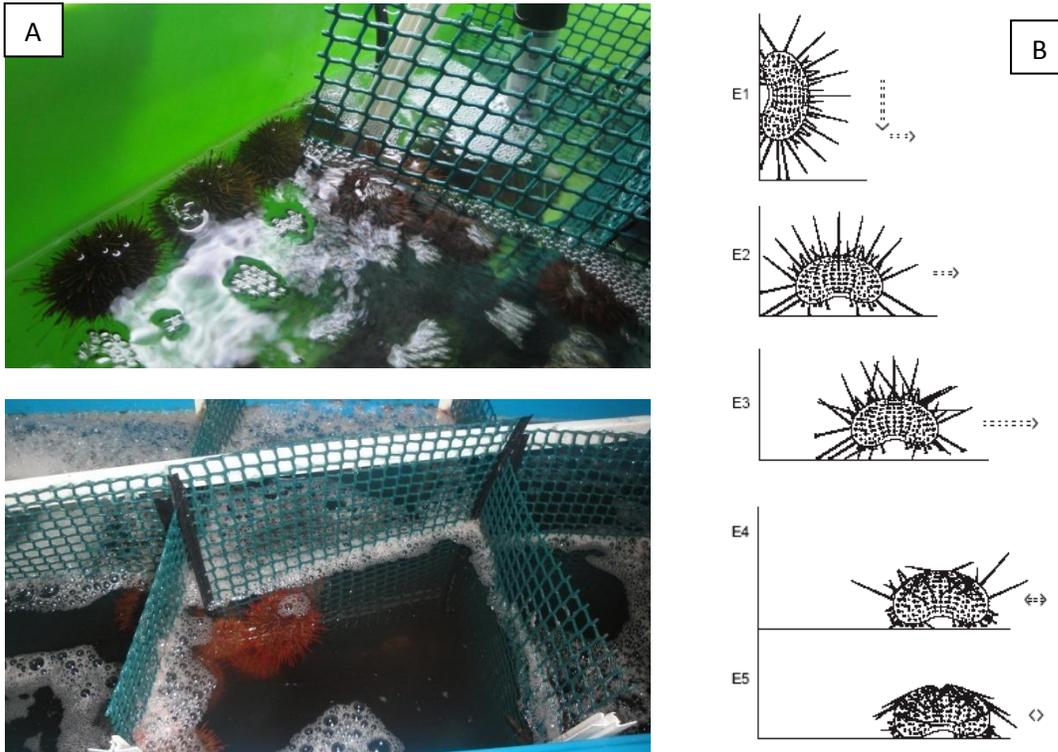


Figura 4: Sistema de evaluación estado de salud de los erizos. (A) Posicionamiento inicial de los organismos al iniciar el experimento. (B) Clasificación de la respuesta conductual a aclimatación del erizo. Erizos con mejor estado de salud se ubica en las paredes del recipiente y con espinas y pies móviles (estado E1). Erizos con menor estado de salud se inactivan y se ubican en el fondo del recipiente, con evidente pérdida de firmeza de espinas (estado E5) (Hernández *et al.* 2004).

5.4 Perfil temporal de expresión:

Con el fin de obtener un perfil de expresión de los genes de interés, bajo los diferentes tratamientos en evaluación (tratamientos calor, frio y control) y desarrollar un perfil temporal de respuesta de cada organismo, se seleccionaron al azar 3 erizos por tratamiento a 4 diferentes tiempos: 2, 6, 12 y 48 horas. Con esta metodología se obtuvieron un total de 12 individuos por tratamiento, con tres réplicas biológicas por cada tiempo y un total de 36 muestras. El tejido utilizado para la extracción de RNA fue la “Linterna de Aristóteles” (Fig. 5), el cual había sido previamente testado mostrando los mejores

resultados en cantidad e integridad de RNA obtenido. Las muestras fueron colocadas en tubos eppendorf, libre de RNAsa y DNAsa, y con su respectiva rotulación, para luego ser depositados dentro de un tanque de nitrógeno líquido. Posteriormente se almacenaron en un freezer a -80°C , hasta la extracción de RNA.

Al momento de la extracción de los individuos desde los distintos tratamientos, se registró su salud y se clasificó su estado como se indicó en la sección 2.1 (E1, E2, E3, E4, y E5).

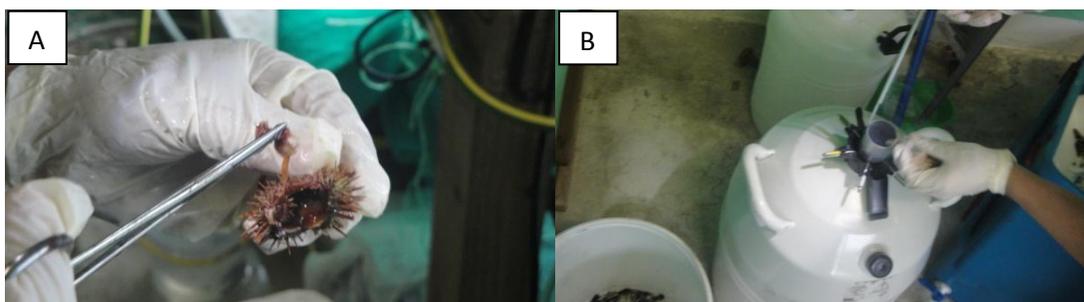


Figura 5: Procedimiento para la obtención de tejido. (A) Extracción linterna de Aristóteles de un erizo *Loxechinus albus*. (B) Deposito de la muestra en nitrógeno líquido para la conservación del RNA.

5.5 Extracción de RNA y síntesis de cDNA:

A partir de un tejido de aproximadamente 20 mg provenientes de la “Linterna de Aristóteles” se obtuvo RNA total usando el protocolo estándar de TRIZOL (Chomczynski & Sacchi 1987). En resumen este protocolo consiste en la separación de fases usando cloroformo al 100%, luego la precipitación del RNA se llevó a cabo con isopropanol 100%. Posteriormente se lavó con etanol al 75% preparado con agua DEPC, para que finalmente fuera resuspendido en 20 μL de agua DEPC. La concentración del RNA aislado, fue estimada mediante fluorescencia utilizando el kit Quant-iT™ RiboGreen® (Life Technologies) y el fluorómetro DQ300 Hoefer. La integridad del RNA se estimó en el equipo Bioanalyzer 2100 (Agilent) con el chip Agilent RNA 6000 Nano Kit, el cual es una plataforma altamente reproducible y adecuada para verificar el nivel de degradación del RNA. Este instrumento entrega un valor de integridad del RNA (RIN), con valores de 1 a 10, donde RIN 1 representa un RNA fragmentado y degradado, y un RIN 10 corresponde a un RNA intacto y no fragmentado (Becker *et al.* 2010). Si no existían muestras que

cumplieran este requisito (buena integridad), la extracción de RNA total fue repetida. Finalmente el RNA obtenido fue diluido para que así todas las muestras tengan la misma concentración, la cual fue igual a la menor concentración medida en la fluorescencia, dejando por muestra un tubo con RNA stock y otro con RNA igualados en concentraciones, que fueron guardados a -80°C para su posterior uso.

Para asegurar que trabajamos solamente con RNA, el DNA genómico fue eliminado utilizando el kit Turbo DNA -free™. Para esto, en un tubo 0,5mL se colocaron 17 μL de RNA, 2 μL Buffer 10x y 1 μL de DNAsa, dando un total de 20 μL , los que fueron incubados en un termociclador a 37°C por 30 minutos. A continuación se agregaron 2 μL de Reactivo de inactivación por 2 minutos a temperatura ambiente, para finalmente centrifugar a 10.000 g por 1 $\frac{1}{2}$ minuto, rescatando el sobrenadante en un nuevo tubo.

El siguiente paso en la preparación de las muestras consistió en la realización de una retrotranscripción, la cual permite sintetizar DNA complementario (cDNA) a partir de mRNA a través de la enzima transcriptasa reversa (Freeman *et al.* 1999). Para esto, se utilizaron 6 μL de RNA total (previamente igualadas a una misma concentración) que fue retrotranscrito para cada muestra, utilizando el Kit Affinity Script qPCR cDNA Synthesis (Stratagene). En detalle el protocolo, aplicado a cada muestra, consistió en colocar en un tubo de 0,2 mL First strand mastermix (10 μL), 3 μL de oligo dt, 1 μL de la enzima Affinity script y los 6 μL de RNA (tratado con DNAsa). A continuación en un termociclador se incubó a:

- 25°C por 5 minutos.
- 42°C por 45 minutos.
- 95°C por 5 minutos.

Una vez terminado el ciclo, los tubos con cDNA fueron almacenados a -20°C .

La retrotranscripción se realizó utilizando oligo (dT) como partidores, para asegurar que el cDNA obtenido provenga solo de mRNA. En este paso se incluyeron controles sin enzima de retrotranscripción (No-RT controles) para comprobar que no exista DNA genómico en las muestras.

Todos los procesos llevados a cabo en esta fase, se realizaron a bajas temperaturas (reactivos y muestras sobre hielo), para así evitar la degradación del RNA.

5.6 Elección de genes candidatos, diseño de partidores y RT-qPCR:

Los genes candidatos fueron elegidos mediante el análisis de la literatura científica existente en las bases de datos como ISI Web. La búsqueda bibliográfica se centró principalmente en especies emparentadas filogenéticamente, tales como *Strongylocentrotus purpuratus* y *Paracentrotus lividus* (Aguilar *et. al* 2013, tesis de pregrado). Además, se eligieron 2 genes, que fueron utilizados como normalizadores. Estos genes son requeridos para normalizar los resultados de RT-qPCR y deben cumplir requisitos como: (1) tener una eficiencia de las reacciones de PCR similar a los genes candidatos y (2) mantener un nivel de expresión constante entre las distintas muestras. El mejor gen normalizador, fue elegido a través del algoritmo NormFinder, y fue utilizado para los análisis de expresión de genes. Una vez que los genes candidatos y normalizadores fueron seleccionados, se obtuvieron sus secuencias en bases de datos como GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), y de erizos marinos (<http://www.spbase.org/SpBase/>), para finalmente hacer una comparación mediante Blast-n con la base de datos transcriptómicos de *L. albus* del proyecto Fondef D09I1065 utilizando el Software Genious (Drummond *et al.* 2011).

Los partidores específicos para la especie objetivo se diseñaron utilizando las secuencias obtenidas desde el transcriptoma de *L.albus*, con ayuda del software AmplifX 1.3.7 (Jullien, 2005), y se revisaron con el software FastPCR Professional 5.3.103 (Kalendar *et al.* 2009), procurando reducir la formación de dímeros y que todos los partidores obtenidos tengan temperaturas de alineamiento similares.

5.7 Caracterización de los perfiles de expresión:

Las PCR cuantitativas (RT-qPCR), se realizarán con el cDNA obtenido de las muestras de *Loxechinus albus* en el equipo Eco Real-Time PCR System de Illumina,

utilizando el kit Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies). Para realizar las RT-qPCR primero se realizó una prueba y una optimización (estandarización) de los partidores, usando 1 μL de cada partidor (forward y reverse de cada gen), 6,25 μL de SYBR Green QPCR Master Mix, y 3,25 μL de H_2O ultra pura.

La eficiencia de los partidores fue estimada, esto debido a que el método de análisis transcriptómico utilizado posteriormente, requiere que los valores de eficiencia no difieran en más de un 10% entre genes (Pfaffl 2001). Esta estimación se realizó a través de una serie de diluciones seriadas (3 a 4) y 3 réplicas técnicas para cada una, con lo cual se graficaron los valores de C_q obtenidos (corresponde al ciclo de termociclación que alcanza un determinado valor umbral) versus las diluciones, estimado luego la ecuación de la recta. La pendiente de la recta obtenida era ingresada en la siguiente fórmula para obtener la Eficiencia (E) de los partidores por gen: $E = (10^{-1/\text{pendiente}-1}) \times 100$ (Pfaffl 2001).

Una vez estandarizadas todas las condiciones de PCR para cada gen, se realizaron las RT- qPCR, donde cada tubo contenía un mix de 1 μL de cada partidor (Forward y reverse de cada gen), 6,25 μL de SYBR Green QPCR Master Mix, 3,25 μL de H_2O ultra pura y 1 μL de cDNA (12,5 μL en total). Este mix era homogenizado mediante vortex y colocado en las placas de 48 pocillos (Ecoplates, Illumina), utilizando tres réplicas técnicas por cDNA y dos tubos como control negativo (sin templado), el cual contendría 1 μL de H_2O ultra pura, y serviría para descartar la presencia de contaminantes externos en los reactivos y agua empleados. A cada Ecoplates, se le colocó un adhesivo que impedía que el mix junto a la muestra se evaporara, y para evitar burbujas en cada pocillo la placa fue centrifugada. Las temperaturas y ciclos de la RT-qPCR consisten en:

- Activación de la polimerasa; 10 minutos a 95°C
- Ciclos de la PCR; 45 ciclos de 15 segundos a 95°C (denaturación), 30 s a 58°C (temperatura de alineamiento de los partidores) y 15 s a 72°C (extensión del templado)
- Curva de Melting; 20 s a 95°C, 10 s a 58°C, 10 s a 95°C
- 1 minuto a 40 °C, dándole un total de 1:23 horas de duración aproximada a la PCR.

Por otro lado, el estudio de expresión génica mediante RT-qPCR, se realizó mediante el análisis de los valores de Cq (ciclo de cuantificación, de acuerdo a RDML: Real-Time PCR Data Markup Language, <http://www.rdml.org>). El valor de expresión fue normalizado usando el método descrito por Pfaffl, que permite una comparación consistente de los niveles de expresión entre distintos tratamientos, sin requerir estandarizar mediante el uso de plásmidos (Pfaffl 2001; Schmittgen & Livak 2008). Este método calcula los niveles de expresión de una muestra y gen de interés en relación a una muestra de referencia para el mismo gen de interés (calibrador), utilizando además un gen normalizador (Giulietti *et al.* 2001). Para las estimaciones se utilizaron tres réplicas técnicas para cada valor de Cq. La fórmula implementada por Applied Biosystem (Pfaffl 2001) para medir el nivel relativo de expresión de un transcrito en particular (Bookout & Mangelsdorf 2003) es la siguiente: **Expresión** = $2^{-\Delta\Delta Cq}$. En esta fórmula (i) Cq corresponde al ciclo de termociclación en el cual se cuenta con una cantidad detectable de ADN, es decir, que sobrepasa el umbral de fluorescencia basal, (ii) ΔCq es igual a Cq gen interés – Cq gen endógeno o de referencia y (iii) $\Delta\Delta Cq$ corresponde a ΔCq muestra interés – ΔCq muestra calibradora.

5.8 Tratamiento Control o muestra calibradora:

El tratamiento control o calibrador escogido corresponde a aquel que emulaba las condiciones de la Playa Calfuco en la época de verano ($14 \pm 1^\circ\text{C}$). Por consiguiente, en relación a este tratamiento se estimó la expresión de los de los demás tratamientos en los distintos tiempos (expresión relativa).

5.9 Análisis Estadístico:

Para determinar si existen diferencias significativas entre los niveles de expresión encontrados, se realizó una ANOVA de 3 vías, utilizando como factores; Tiempo, Tratamiento, Gen y la expresión relativa como variable respuesta. Se observó si existe alguna relación de estos factores individualmente, y entre los distintos factores en relación a

la expresión. El supuesto de homogeneidad de varianzas se probó con el método estadístico Hartley F- max, y Bartlett.

6. Resultados

6.1 Respuesta a la Aclimatación:

Hasta las 12 primeras horas los erizos se encontraban en muy buenas condiciones, lo cual se reflejaba en sus movimientos continuos, alimentación y los pies ambulacrales extendidos al máximo (Estado E1). Recién a las 48 horas estos empiezan a mostrar una retracción y disminución de sus pies ambulacrales y espinas (Estado E2) en los tratamientos frío y calor (un individuo por cada tratamiento). No se observó mortalidad en ningún erizo en el último tiempo, y el estado máximo alcanzado fue E2. Para el tratamiento control, el único estado encontrado en todos los tiempos fue E1.

6.2 Extracción de RNA para los distintos tratamientos:

Treinta distintas muestras fueron utilizadas en este estudio. La tabla 2 muestra la distribución de estas muestras entre los tratamientos y tiempos. La concentración e integridad obtenida para las muestras utilizadas en este estudio también es detallada en la tabla 2. Cada extracción de RNA realizada fue sometida al análisis de integridad y un valor mínimo de RIN 7 fue seleccionado (ver figura 6), asegurando que se trabajará con RNA íntegro lo cual es indispensable para estudios transcriptómicos (Bustin *et al.* 2009). En algunos tiempos dentro de cada tratamiento, el número de réplicas biológicas logradas fue 2 y no 3 como lo estipulado inicialmente. Lo anterior debido a que la tercera réplica no poseía el RIN necesario para continuar con el siguiente punto de la metodología. La figura 6 muestra los electroferogramas obtenidos en el equipo Bioanalyzer Agilent, utilizado para estimar la integridad de las muestras. Todas las muestras se dejaron a una concentración final de 8.34ng/ μ L para hacer comparables los resultados de RT-qPCR, la cual era igual a la menor concentración obtenida del total de extracciones.

Tabla 2: Concentración y valor de integridad de RNA (RIN) obtenido para las muestras de RNA incluidas en el estudio

Tratamientos	Tiempos (horas)	Réplicas Biológicas	Concentración (µg/mL)	RIN
Control	2	1	20,6	9,2
		2	11,24	8,7
		3	51,82	9,3
Calor		1	8,34	8,8
		2	56,94	9
Frío		1	63,94	8,7
		2	17,38	8
		3	17,28	8
Control		6	1	287,34
	2		28,14	8,3
Calor	1		13,9	6,9
	2		69,88	9,2
Frío	1		49,9	8,8
	2		21,32	8,9
Control	12	1	7,34	8,4
		2	52,36	7,8
		3	184,08	7
Calor		1	12,52	9,1
		2	8,94	9
		3	11,84	9,1
Frío		1	12,74	8,6
		2	19,94	8,8
		3	25,36	7,9
Control	48	1	52,28	8,9
		2	8,14	9,5
Calor		1	118,36	8,3
		2	10,34	8,8
		3	50,98	8,9
Frío		1	29,9	8
	2	24,22	8	

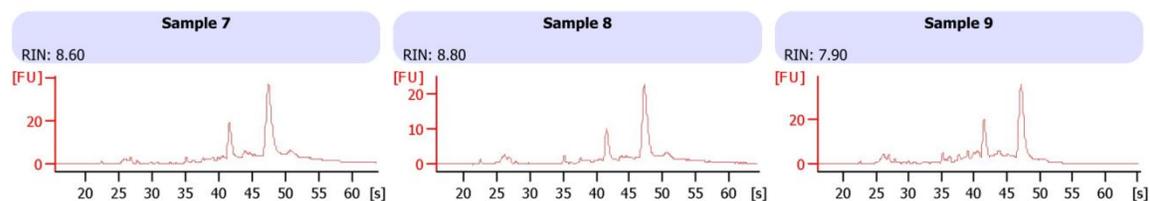


Figura 6: Electroferogramas que muestran la integridad de las muestras de RNA obtenidas. Se muestran tres casos a modo de ejemplo.

6.3 Elección de genes candidatos

Luego de una revisión exhaustiva de literatura, seis genes candidatos y tres normalizadores fueron seleccionados para este estudio. El detalle de los genes y la literatura desde donde fueron seleccionados se muestra en la tabla 3.

Tabla 3: Genes candidatos seleccionados para este estudio. El código de acceso, la base de datos en la que se encuentran, la especie con la cual se realizó el Blast-n, también son detallados. Adicionalmente se entregan el detalle del artículo en el cuál se ha repostado cambios de expresión de los genes estudiados, el tipo de estrés al que fueron sometidos los animales y el signo + es utilizado para indicar que la respuesta transcriptómica obtenida corresponde a sobre expresión.

Genes candidatos	Función Primaria	Código de acceso	Especie	Artículo	Tipo de estrés	Expresión
HSP 70	Molécula chaperona	XM_791153.3	<i>S. purpuratus</i>	(Runcie et al. 2012)	Temperatura	+
HSP 90	Molécula chaperona	NM_214643.2	<i>S. purpuratus</i>	(Runcie et al. 2012)	Temperatura	+
α – Na ⁺ /K ⁺ /ATPase	Bomba sodio potasio	AM562805	<i>P. lividus</i>	(Martin et al. 2011)	CO2/ pH	+
β – Na ⁺ /K ⁺ /ATPase	Bomba sodio potasio	AM554663.1	<i>P. lividus</i>	(Martin et al. 2011)	CO2/ pH	+
Cytochrome P 450	Detoxificación	SPU_010576 *	<i>S. purpuratus</i>	(Goldstone et al. 2006)		No aplica
SM30D	Biomíneralización	XM_790831.2	<i>S. purpuratus</i>	(Killian et al. 2010)		No aplica
Genes de referencia						
18S		L28056.1	<i>S. purpuratus</i>	(Turbeville et al. 1994)	Localidad	Normalizador
RBM8A		XM_782434.3	<i>S. purpuratus</i>	(Runcie et al. 2012)	Temperatura	Normalizador
Alphatubulin		XM_775024	<i>S. purpuratus</i>	(Núñez-Acuña et al. 2012)	Localidad	Normalizador

6.4 Diseño y validación de partidores:

A través de un blast-n del transcriptoma de *L. albus*, con los genes ya existentes en la literatura para las especies *P. lividus* y *S. purpuratus*, se obtuvieron partidores para cada gen (forward y reverse). La tabla 4 entrega las secuencias de los partidores diseñados y utilizados en esta tesis.

Tabla 4: Partidores realizados de los genes elegidos en este estudio, todos de 20 pb y temperaturas de alineamiento similares.

	Nombre primer	Primer For	Primer Rev
Genes Candidatos		5` 3`	5` 3`
<i>hsp70</i>	HSP70-A	TGC CCG GTT TGA AGA CAT GA	GTT GAG CTC TTT GCC GTT GA
<i>hsp90</i>	HSP90-A	TGA AGA CCA CGG CAA CAG AT	TCA GGA GTC GCT CAA CGA AT
<i>a-Na⁺/K⁺/ATPase</i>	aATPase-A	AGC GTA TCC TTG ACC GTT GT	ATC GGC TGG CAT GAA GCA TT
<i>b-Na⁺/K⁺/ATPase</i>	bATPase-A	ACA ACT TTC GGG CAG CGA AT	AGG CCC AGA ATG CAG CTA AA
<i>Cytochrome P450</i>	Cyt P450- A	TGG CAT GAT CCG CAC GTA TT	TGC TGG AAG AGG TTG GTG AA
SM30D	SM30D- A	TAG CGC CAA ACC GCA TCT GA	TAG CGC CAA ACC GCA TCT GA
Genes de referencia			
<i>18S</i>	18S-A	GTG GAG CGA TTT GTC TGG TT	AAG GGC ATC ACA GAC CTG TT
<i>RBM8A</i>	RBM8A-A	GCG GAC GTT TTG GAC ATT CA	CAT CGT CAG CTG TTC GGA TT
<i>alphatubulin</i>	aTubulin-A	AAG CGT ACC ATC CAG TTC GT	TGG TGT TGC TCA ACA TGC AG

Para ver el correcto funcionamiento de los partidores, principalmente su selectividad, lo que se traduce en un solo producto de PCR amplificado, se realizó al final de cada RT-qPCR una curva de disociación (curva de melting). Una única curva es indicativa de un solo producto de PCR (ver figura 7). Si para un gen se obtiene más de una curva es debido a que los partidores amplifican más de un producto y por tanto no sirven para su cuantificación (Fig. 8). Para los siguientes genes se obtuvieron amplificaciones que cumplían con todos los requisitos para ser utilizado en estudios de expresión génica relativas: *hsp 70*, *hsp90*, α -*Na⁺/K⁺/ATPase*, β -*Na⁺/K⁺/ATPase*, *Cytochrome P 450*, *18 S* y *RBM8A*. Otros 2 genes fueron probados, *SMB30*(gen involucrado en biomineralización) y *alphatubulin* (gen a utilizar putativamente como normalizador), los cuales no amplificaron correctamente independiente de las múltiples variaciones en las condiciones de PCR testeadas y por consiguiente fueron excluidos del estudio.

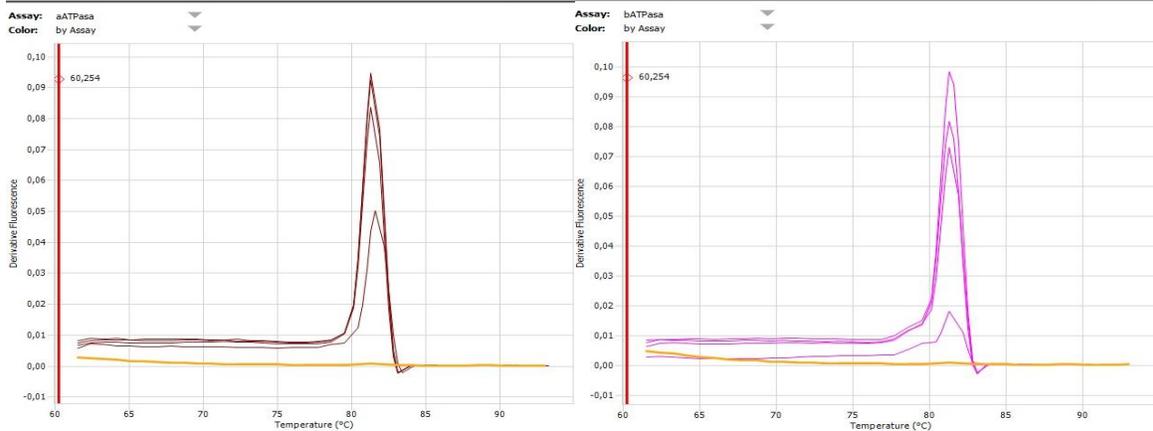


Figura 7: Curva de melting o disociación, correspondiente a los genes $\alpha\text{-Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ y $\beta\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$. En el eje X se observa la temperatura, mientras que en el eje Y, la fluorescencia obtenida. Se observa un solo producto amplificado para ambos genes con de 4 réplicas técnicas y dos biológicas. En naranja se observa el control agua, el cual no presenta amplificación, tal como se espera.

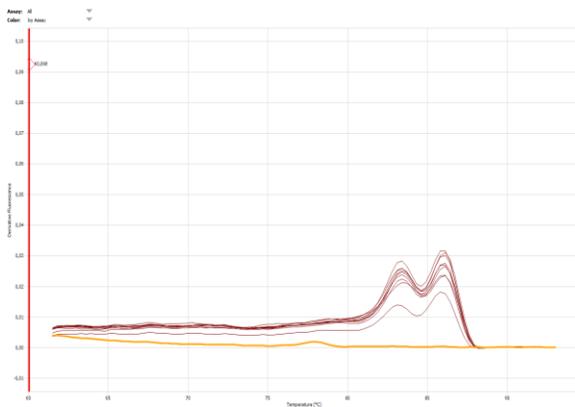


Figura 8: Curva de melting para el gen *alphatubulin*. En el eje X se observa la temperatura, mientras que en el eje Y, la fluorescencia obtenida. La curva muestra que los partidores diseñados no son específicos ya que al menos 2 productos amplificados. En naranja se observa el control agua, el cual no presenta amplificación.

Por otra parte, debido a que el método de análisis transcriptómico utilizado requiere que los valores de eficiencia de los partidores son difieran en más de un 10%, la eficiencia para cada gen fue calculada (ver materiales y métodos para más detalles). En la Tabla 5, se muestran estos resultados.

Tabla 5: Eficiencia de los genes mostrada en porcentaje (%). Para ninguno de los genes de interés se encontró una diferencia de eficiencia mayor a 10% entre estos y los genes de referencia.

Gen	Eficiencia (%)
a-Na+/K+/ATPase	93,56
b-Na+/K+/ATPase	94,58
Cyt P 450	93,77
HSP 70	93,56
HSP 90	100,64
18 S	96,14
RBM8A	93,69

6.5 Perfiles de expresión:

6.5.1 α -Na⁺/K⁺ ATPase:

La expresión relativa de este gen usando comoreferencia el gen 18S (Fig. 9), mostro que hubo un aumento de la expresión a las 2 (\bar{X} : 2,19 $\log_2 \pm$ 0,56) y 6 horas (\bar{X} : 1,08 $\log_2 \pm$ 0,28) en el tratamiento calor, con respecto al tratamiento control, la cual disminuye a las 12 y 48 horas. Para el tratamiento frío se observa un aumento a las 6, seguido de una baja en los siguientes horarios.

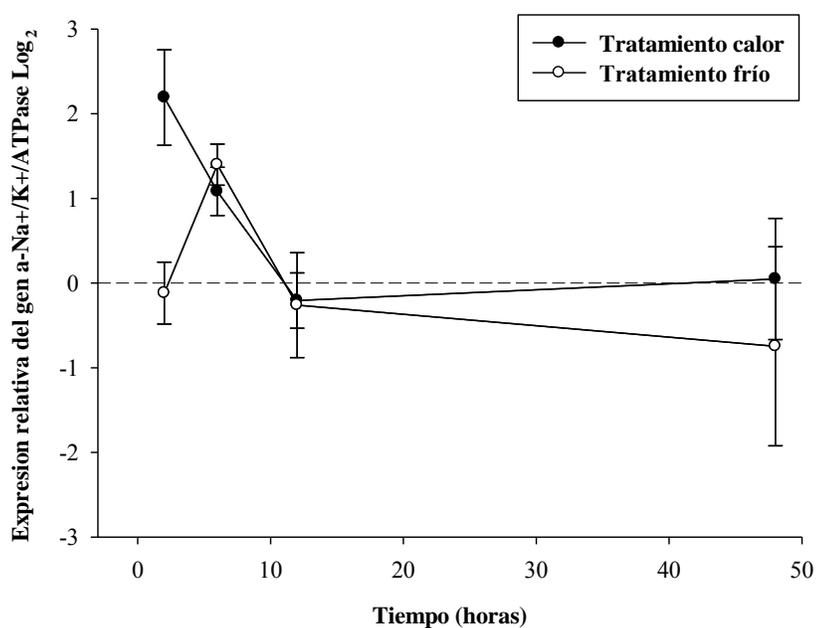


Figura 9: Expresión del gen de interés “ α -Na⁺/K⁺ ATPase” ($\log_2 \pm$ error estándar). El gen 18S fue usado como normalizador. La línea punteada en cero, representa la línea basal de no cambio de expresión. Valores sobre 0 indican sobre-expresión y valores menores a 0 indican sub-expresión entre tratamientos (frío y calor).

6.5.2 β -Na⁺/K⁺/ATPase:

La expresión relativa de este gen (Fig. 10) en los distintos tiempos, muestra un claro aumento a las 2 horas (\bar{X} : 2,97 $\log_2 \pm 1,28$) en el tratamiento calor, y en las siguientes horas esta sobreexpresión no es tan clara, mostrando variación entre réplicas biológicas. Para el tratamiento frío, la expresión del gen presenta un patrón similar al del tratamiento calor, mostrando una sobreexpresión a las 2 horas (\bar{X} : 1,61 $\log_2 \pm 0,607$), y bajando a las horas siguientes.

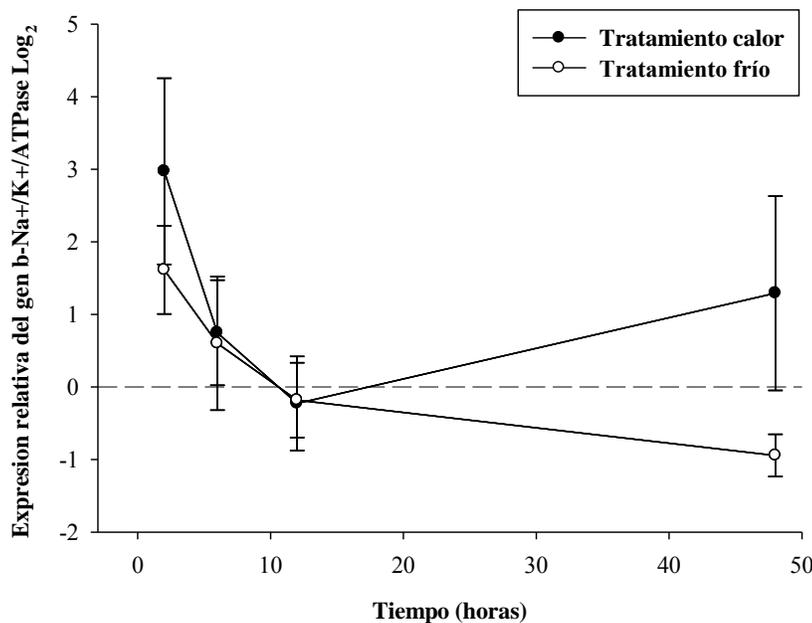


Figura 10: Expresión relativa del gen “ β -Na⁺/K⁺/ATPase”(log₂±error estándar). Se grafica el promedio de cada expresión a las distintas horas, relativo a la expresión del tratamiento control a las mismas horas. El gen 18S fue usado como normalizador. La línea punteada en cero, representa la línea basal de no cambio de expresión (Tratamiento control). Valores sobre 0 indican sobre-expresión y valores menores a 0 indican sub-expresión entre tratamientos (frío y calor).

6.5.3 CitocromoP 450:

La expresión relativa para el gen *Citocromo P 450*(Fig. 11)para el tratamiento calor, muestra una clara sobreexpresión de transcritos a las 2 horas (\bar{X} : 3,69 $\log_2 \pm 0,89$), la cual disminuye en forma constante hasta llegar a las 48 horas, donde presenta un leve aumento. Para el tratamiento frío se observa un patrón similar, aumento leve de los transcritos a las 2 y 6 horas de tratamiento, seguido de una disminución mantenida hasta las 48 horas.

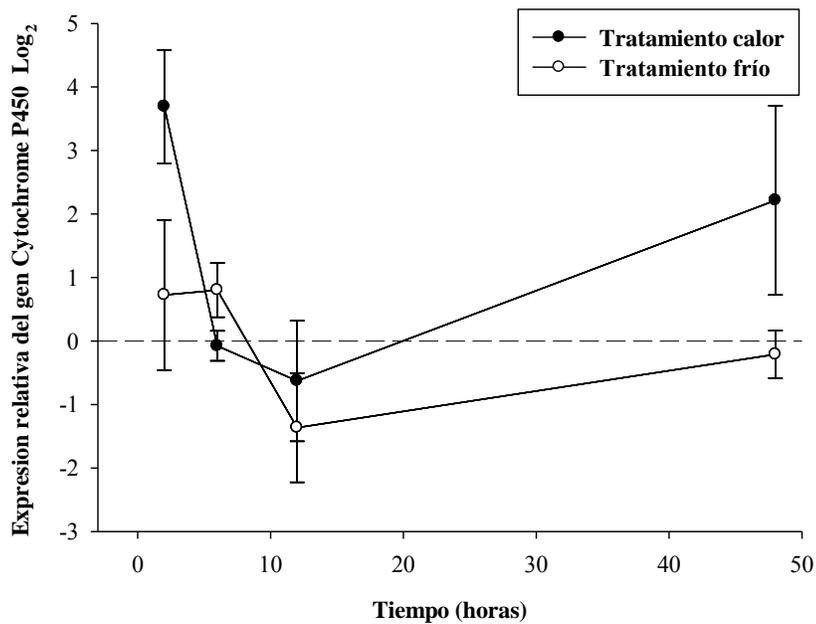


Figura 11: Expresión basal del gen de estrés “CitocromoP 450” ($\log_2 \pm$ error estándar). El gen 18S fue usado como normalizador. La línea punteada en cero, representa la línea basal de no cambio de expresión (Tratamiento control). Valores sobre 0 indican sobre-expresión y valores menores a 0 indican sub-expresión entre tratamientos (frío y calor).

6.5.4 HSP 70:

La expresión relativa para este gen (Fig. 12), muestra en el tratamiento calor, una sobreexpresión de los transcritos en todos los tiempos, pero se observa que a las 2 (\bar{X} : 2,47 $\log_2 \pm 0,75$) y 6 horas (\bar{X} : 3,302 $\log_2 \pm 1,13$), este aumento es máximo, disminuyendo a las siguientes horas. Para el tratamiento frío, en términos generales, no se observa una tendencia clara de sobre-expresión, principalmente a causa de la variación entre réplicas biológicas, sin embargo a las 2 horas (\bar{X} : 0,57 $\log_2 \pm 0,49$) y 12 horas (\bar{X} : 0,73 $\log_2 \pm 1,37$) existen un aumento de los transcritos.

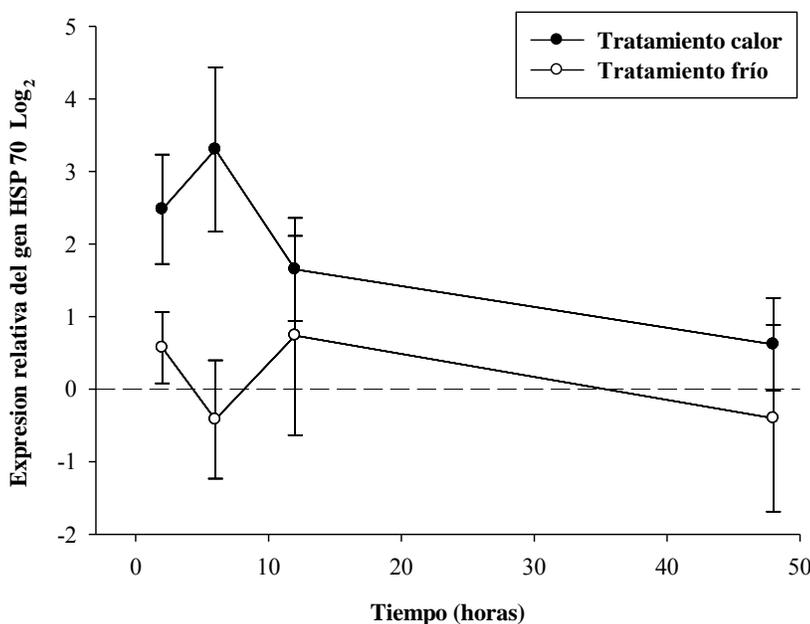


Figura 12: Expresión basal del gen de estrés “HSP 70” ($\log_2 \pm$ error estándar). El gen 18S fue usado como normalizador. La línea punteada en cero, representa la línea basal de no cambio de expresión (Tratamiento control). Valores sobre 0 indican sobre-expresión y valores menores a 0 indican sub-expresión entre tratamientos (frío y calor).

6.5.5 HSP 90:

En la expresión relativa para el gen *HSP 90* (Fig. 13) en el tratamiento calor, se observa que a las 2 horas (\bar{X} : 2,23 $\log_2 \pm 1,13$) existe una sobreexpresión para este gen, la cual va en disminución para los siguientes 3 tiempos (6 horas \bar{X} : 1,10 $\log_2 \pm 1,65$; 12 horas \bar{X} : 0,14 $\log_2 \pm 0,71$; 48 horas \bar{X} : 0,94 $\log_2 \pm 0,64$), se observa variación entre réplicas biológicas. Para el tratamiento frío se observa un ligero aumento de los transcritos a las 2 horas (\bar{X} : 0,42 $\log_2 \pm 0,85$), seguido de una baja prolongada en la expresión en los siguientes tiempos (6 horas \bar{X} : 0,016 $\log_2 \pm 0,94$; 12 horas \bar{X} : - 0,69 $\log_2 \pm 0,57$; 48 horas \bar{X} : - 3,02 \log_2).

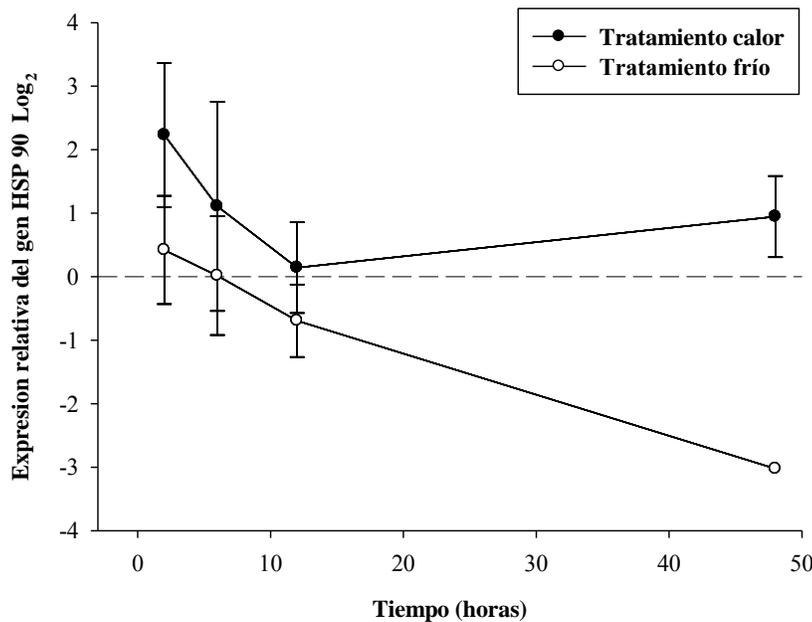


Figura 13: Expresión basal del gen de estrés “HSP 90” ($\log_2 \pm$ error estándar). El gen 18S fue usado como normalizador. La línea punteada en cero, representa la línea basal de no cambio de expresión (Tratamiento control). Valores sobre 0 indican sobre-expresión y valores menores a 0 indican sub-expresión entre tratamientos (frío y calor).

6.6 Análisis estadístico:

Para poner a prueba el efecto de los tratamientos, los tiempos y los genes estudiados, se utilizó un ANOVA factorial de 3 vías, con factores: Tiempo, Tratamiento y Gen (Tabla 6). Se encontró efectos significativos de “Tratamiento” ($F_{(1,60)}=21,109$; $p=0.000023$), detectándose en general una sobreexpresión en el tratamiento calor y subexpresión en el tratamiento frío (Fig. 14). Además se identificaron efectos no lineales significativos del factor “Tiempo” ($F_{(4,69)}= 11,58348$; $p=0.000004$) (Fig. 15), observándose un aumento de la expresión en las primeras horas (2 y 6 horas) y una disminución en los siguientes tiempos (12 y 48 horas). No se observa un efecto del factor “Gen”, ya que todos los genes se sobre o sub- expresan de manera similar. Tampoco se observó una interacción entre los factores. El supuesto de homogeneidad de varianzas fue evaluado con la prueba Hartley F- max (Hartley 1959), y Bartlett (Bartlett 1950) aceptándose el supuesto.

Tabla 6: ANOVA de 3 vías, donde sus factores son; Tiempo, tratamiento y gen. En rojo se observa un valor significativo $>0,05$.

	SS	Grados de libertad	MS	F	P
Gen	16,0098	4	4,00246	1,91718	0,119216
Tiempo	72,5479	3	24,18265	11,58348	0,000004
Tratamiento	44,0691	1	44,06914	21,10910	0,000023
Gen*tiempo	29,3905	12	2,44921	1,17317	0,322751
Gen*tratam	12,3255	4	3,08138	1,47598	0,220767
tiempo*tratam	13,6658	3	4,55525	2,18196	0,099458
Gen*tiemp*trat	32,3098	12	2,69248	1,28970	0,248437
Error	125,2611	60	2,08768		

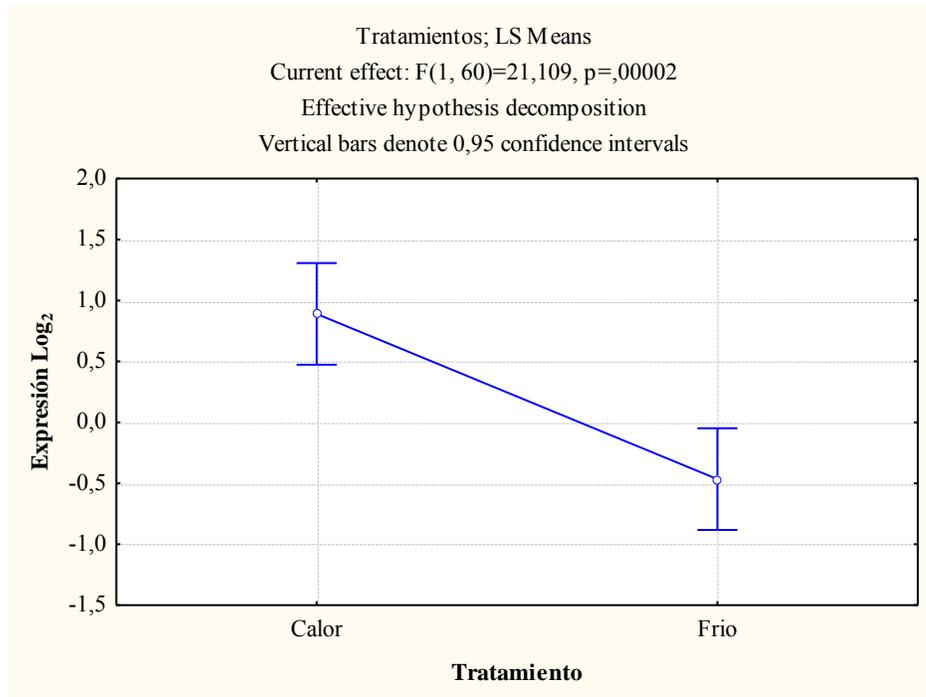


Figura 14: Grafico tratamiento versus expresión relativa de todos los genes candidatos estudiados con respecto al tratamiento control. Se grafica el promedio \pm error estándar. El gen 18 S es usado como normalizador. Se observa que existe efecto significativo del tratamiento (frio-calor) con un $p=0,000023$. Se detecta que el tratamiento calor tiene en general un efecto de sobreexpresión para los genes, por otra parte el tratamiento frio muestra en promedio una subexpresión de los genes.

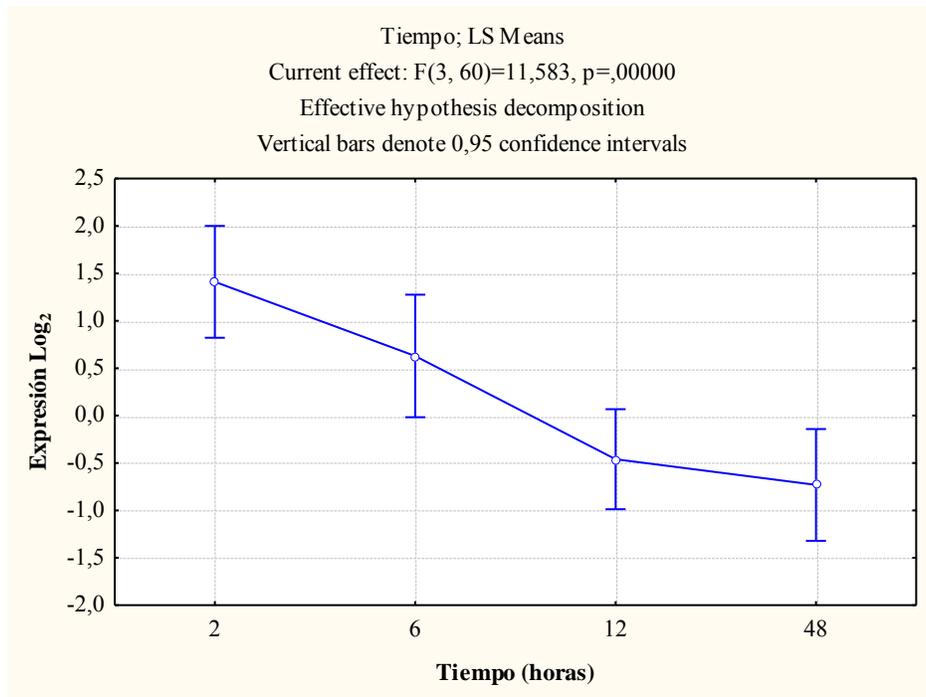


Figura 15: Gráfico Tiempo versus expresión. Con un $P= 0,000001$ se ve una tendencia de aumento de la expresión para cualquier gen a las 2 horas, disminuyendo hasta las 48 horas.

6.6.1 Análisis estadístico incluyendo el gen *RBM8A* como gen candidato:

Para testear si existe un efecto significativo de los genes, se utilizó un ANOVA de 3 vías, con factores: Tiempo, Tratamiento y Gen (Tabla 7), pero esta vez se incluyó los cambios de expresión del gen *RBM8A*, seleccionado inicialmente como un putativo normalizador, dentro de los genes de interés. Se detectaron efectos significativos de los factores “Tratamiento”, y “Tiempo”, tal como en la prueba estadística anterior, pero interesantemente en este caso, el factor “Gen” si presentó un efecto significativo (Fig. 16). Indicando entonces que el gen *RBM8A* se sale del patrón de sobre y sub expresión que presentaron los demás genes en este estudio. Las pruebas para homogeneidad de varianzas fueron realizadas al igual que en el análisis anterior. En este análisis, no todos los genes de sobre o subexpresan de igual manera, siendo el gen *RBM8A* la excepción. Nuevamente, no se observó interacción entre los factores. Al igual que en el análisis estadístico del punto anterior, el supuesto de homogeneidad de varianzas se testeó con la prueba Hartley F- max, y Bartlett, aceptándose.

Tabla 7: Análisis con la inclusión del gen RBM8A, se observa un ANOVA de 3 vías, donde sus factores son; Tiempo, tratamiento y gen. En rojo se observa un valor significativo >0,05.

	SS	Grados de libertad	MS	F	P
Gen	26,5280	5	5,30559	3,14402	0,012843
Tiempo	57,5514	3	19,18380	11,36806	0,000004
Tratamiento	29,9107	1	29,91075	17,72470	0,000075
Gen*tiempo	24,0762	15	1,60508	0,95115	0,514217
Gen*tratam	10,8994	5	2,17988	1,29177	0,277361
tiempo*tratam	10,3357	3	3,44522	2,04159	0,115926
Gen*tiemp*trat	15,3951	15	1,02634	0,60820	0,858578
Error	118,1263	70	1,68752		

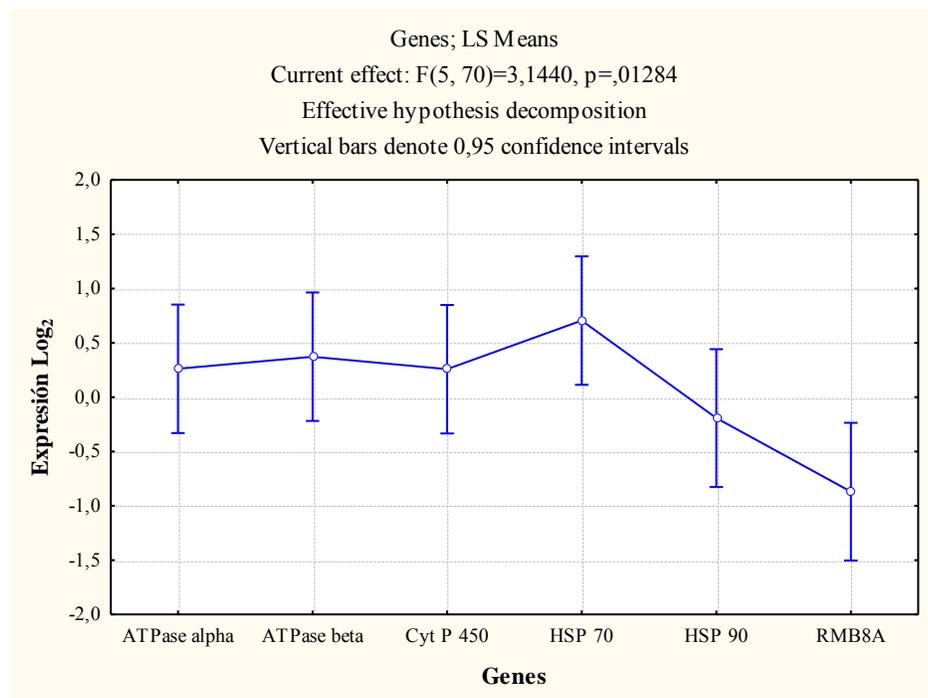


Figura 16: Gráfico Genes versus expresión. Con un P= 0,012843 se ve una respuesta significativa de los genes.

7. Discusión

Las condiciones ambientales tienen un fuerte efecto en los organismos, siendo uno de los principales factores que determina el rango de distribución de las especies (Hammond & Hofmann 2010; Hofmann & Todgham 2010). La persistencia de una población en un determinado ambiente depende de su capacidad de responder a los cambios ambientales (Antinuchi *et al.* 2003) y esta capacidad de respuesta está determinada tanto por su constitución genética como por su tolerancia fisiológica (Hoffmann & Willi 2008).

La temperatura es uno de los principales factores determinantes de la distribución y abundancia de las especies (Johnston & Bennett 1996; Antinuchi *et al.* 2003) y para ectotermos la temperatura ambiental condiciona los límites en que la población es capaz de ajustar su fisiología (Antinuchi *et al.* 2003). Diversos estudios de fisiología comparada han examinado y comparado la tolerancia térmica de ectotermos (Hofmann & Todgham 2010), haciendo énfasis en conocer los mecanismos subyacentes que definen los límites, y óptimos de sus capacidades fisiológicas (Huey *et al.* 2012).

En esta tesis, se exploró el efecto de la temperatura sobre la capacidad aclimatatoria del erizo rojo *Loxechinus albus*. En otras palabras, se abordó la respuesta de flexibilidad fenotípica de esta especie a la temperatura, utilizando un enfoque molecular de genes que estarían putativamente involucrados en esta respuesta fisiológica.

7.1 Caracterización de la viabilidad de los erizos frente a variación térmica.

Cinco diferentes estados conductuales (E1 a E5) han sido caracterizadas para el erizo *Strongylocentrotus franciscanus* cuando es expuesto a temperatura (Hernández *et al.* 2004). Estos estados están inversamente relacionados con la viabilidad del erizo. Para los experimentos descritos por Hernández y colaboradores (2004), los erizos fueron aclimatados a 3 temperaturas (15, 18 y 21 °C) durante una semana, para luego determinar que la temperatura crítica máxima (CT_{max}) de esta especie esta entre 33.2 °C - 33.6 °C, independiente de la temperatura inicial de aclimatación. Todos los individuos empleados en este trabajo y caracterizados a través de este sistema de observación, presentaban un estado E1 al inicio del experimento, sin diferencias entre tratamientos. Esta condición se mantuvo,

en casi todos los organismos, hasta las 48 horas de iniciado el experimento térmico. Solo dos erizos (uno por tratamiento: calor y frío) mostraron un estado conductual E2 y no fueron seleccionados para los experimentos de expresión génica. Lo anterior refleja que los erizos en experimentación en esta tesis, no se encontraban en una situación cercana a la muerte, con lo cual se pudieron mantener vivos hasta el final de los experimentos y cumplir con el principal objetivo de esta tesis: determinar la flexibilidad fenotípica a nivel molecular de los cambios en la expresión de genes gatillados como parte de la respuesta aclimatatoria.

7.2 Respuesta molecular de la capacidad aclimatatoria en *Loxechinus albus*.

Los cinco genes estudiados, fueron seleccionados por su rol putativo en la respuesta aclimatatoria de ectotermos (Osovitz & Hofmann 2005; Goldstone *et al.* 2006; Martin *et al.* 2011; Runcie *et al.* 2012). Esta tesis revela plasticidad a nivel de la expresión de genes para los 5 genes candidatos, ya que aumentaron sus niveles de expresión en algunos casos hasta 15 veces, cuando los erizos fueron sometidos a tratamientos superiores e inferiores al promedio ambiental. En resumen, con respecto al tratamiento control existió una sobre expresión de los genes cuando los erizos se sometieron a calor, y esta sobre expresión fue disminuyendo con el tiempo. Para el tratamiento frío, también se detectaron cambios en los niveles de expresión de los genes, pero esta respuesta presento mayor variación entre réplicas biológicas, detectándose en general una sobre-expresión inicial (aunque menor a la detectada para el tratamiento calor), que con el paso de las horas se transformó en una sub-expresión. A continuación se discute la respuesta molecular para cada gen en los dos tratamientos.

7.3 Genes codificantes Na^+/K^+ -ATPase (Subunidades α y β)

Se sabe que las enzimas Na^+/K^+ -ATPase (Subunidades α y β), están encargadas de impulsar los procesos de transporte de energía en erizos marinos. Estas enzimas trabajan en la bomba sodio potasio, una proteína integral de la membrana fundamental en la fisiología de las células, ya que permite el intercambio de los iones inorgánicos sodio (Na^+) y potasio (K^+) entre el medio extracelular y el citoplasma a través de transporte activo (gasto de

ATP), y que posee diversas funciones; (1) Mantenimiento de la osmoralidad y volumen celular, (2) Absorción y reabsorción de moléculas, (3) Potencial eléctrico de membrana, (4) Mantenimiento de los gradientes sodio y potasio, (5) Transducción de señales (Nelson *et al.* 2001). El mantenimiento de los gradientes iónicos en las células es uno de los procesos que más energía consume, siendo de un 20-30% de la energía total (Tomšić *et al.* 2011). Es bien sabido que un aumento en las temperaturas generará en organismos ectotermos un aumento de su tasa metabólica, tal es el ejemplo de Ulbricht 1973, quien demostró que en el erizo *S. franciscanus* la tasa metabólica (medida en consumo de oxígeno), es directamente proporcional al aumento de temperatura. Por otra parte, un aumento de las temperaturas, provocará un aumento de las concentraciones de Na^+ debido a la evaporación del agua. Por consiguiente, las evidencias mostradas nos darían a entender que los erizos para poder mantener todas sus funciones vitales aumentarán la actividad enzimática de la bomba sodio potasio (Leong & Manahan 1997; Leong & Manahan 1999; Tomšić *et al.* 2011).

Los niveles de expresión para los genes que codifican para las proteínas de la bomba de Na^+/K^+ -ATPase (Subunidades α y β) fueron medidos en este trabajo. Se observa que tanto el tiempo como la temperatura tienen un efecto significativo sobre el cambio de expresión de estos genes en relación al control, siendo mayor en el tratamiento calor y a horas iniciales, mostrando un resultado similar en ambos genes Na^+/K^+ -ATPase y αHSP . El mayor efecto del tratamiento calor, es debido probablemente a los mayores efectos que el tratamiento de calor aplicado tiene sobre la fisiología de los organismos (mayor tasa metabólica, aumento de las concentraciones de Na^+ en el medio). En cuanto al tiempo, el aumento al inicio del tratamiento se puede deber a una respuesta aclimatoria de los individuos para así poder mantener su homeostasis, mientras que la disminución a mayores tiempos se debería a que los organismos ya alcanzaron un nuevo nivel de aclimatación, recuperando su normal funcionamiento. En el caso del tratamiento frío, se observa un patrón similar en cuanto a los tiempos para el gen β - Na^+/K^+ -ATPase pero en el caso del gen α - Na^+/K^+ -ATPase, no se observa una tendencia clara, mostrando una gran variación entre réplicas biológicas. Leong & Manahan (1999) encontraron una relación directa entre la temperatura y la actividad enzimática de Na^+/K^+ -ATPase para los erizos marinos *S. purpuratus* y *Lytichenus pictus*. A la fecha, no existen estudios de los cambios de expresión

de estos genes en respuestas a cambios de temperatura en erizos. Por consiguiente, este trabajo es el primero en ver la respuesta de estos genes a distintas temperaturas.

7.4 Gen codificante para Citocromo P 450

Este sistema de monooxigenasas (enzimas que incorporan un grupo hidroxilo en sustratos en muchas rutas metabólicas) es un complejo multienzimático cuya oxidasa final es una hemoproteína denominada Citocromo p450 (CYP), que participa en el metabolismo de sustratos de naturaleza exógena (xenobióticos) como drogas, insecticidas, procarcinógenos, anestésicos, solventes orgánicos, entre muchos otros (Goeptar *et al.* 1995). La denominación citocromo P450 proviene de la característica de que esta hemoproteína en su forma reducida y unida a monóxido de carbono que presenta un máximo de absorbancia a los 450 nm (Coon *et al.* 1992). La gran gama de reacciones químicas catalizada y la amplia especificidad de sustratos característicos de estas enzimas, hacen de ellas uno de los catalizadores más versátiles conocidos (Gillam *et al.* 1995). Además de la inducción de estos genes por una amplia gama de xenobióticos en una gran variedad de grupos animales y plantas (i.e *Myzus persicae* (Silva *et al.* 2012); *Culex sp* (Hardstone *et al.* 2009); *Arabidopsis sp.* (Bak *et al.* 2001)), la actividad y la inducción de enzimas del citocromo P450 en peces se ha observado que está influenciado por un gran número de otros factores bióticos y abióticos, tales como la temperatura del agua, dieta, la edad, el sexo y la madurez sexual (Andersson & Förlin 1992; Sleiderink *et al.* 1995).

Para los erizos de mar, se ha descrito que contienen más de 120 genes *CYP*, y entre estas, las familias de *CYP 1* y *4*, constituyen el 80% del total (Goldstone *et al.* 2006). Estas enzimas en erizos son claves en la biotransformación de productos químicos endobióticos y xenobióticos, y además son importantes como mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo (Zhang *et al.* 2012). A la fecha, no existen estudios transcriptómicos para Citocromo P450, en relación a cambios térmicos en erizos marinos.

En este estudio, se observó un patrón similar de cambio de expresión para el gen Citocromo P450 en relación a los otros genes, con un efecto significativo del tiempo y los tratamientos de temperatura. Para ambos tratamientos de temperatura, calor y frío, se detectó un aumento inicial de la transcripción a las 2 horas, seguido de una baja prolongada. Tal como para los

genes anteriores, este aumento inicial de expresión sería producto a la respuesta y su posterior disminución se deba a que ya una vez aclimatado, ya no requiere este mecanismo y la mantención de él solo les conllevaría a un costo energético extra.

7.5 Genes codificantes para proteínas de choque térmico, familia 70 y 90

Los genes de choque térmico (*HSP*), codificantes de las proteínas de choque térmico (*HSP*), corresponden a uno de los mecanismos de respuesta molecular a estrés más generalizados y estudiados (Osovitz & Hofmann 2005; Gupta *et al.* 2010; Hammond & Hofmann 2010; Hofmann & Todgham 2010). Las proteínas de estrés térmico de la familia 70 (*HSP70*) y 90 (*HSP90*) parecen cumplir funciones de protección y reparación celular, actuando como chaperonas estabilizadoras que reducen la agregación y conformaciones no nativas que sufren las proteínas a causa del estrés celular (Feder & Hofmann 1999; Sørensen *et al.* 2003). En particular para el estrés térmico de ectotermos, la sobreexpresión de *HSP* ha sido detectado en especies como *Strongylocentrotus purpuratus* y *Paracentrotus lividus* (Sconzo *et al.* 1992; Osovitz & Hofmann 2005; Hammond & Hofmann 2010; Runcie *et al.* 2012), y el ostión *Crassostrea gigas* (Farcy *et al.* 2009).

Este trabajo apoya la propuesta inicial de que los genes candidatos *HSP70* y *HSP90* estudiados, estarían involucrados en la respuesta a estrés térmico del erizo rojo, ya que se observó un cambio de expresión significativo de estos genes en el tiempo y los dos tratamientos, con respecto al control. La sobre expresión detectada para los genes *HSP70* y *90* en el tratamiento calor, alcanza su máximo entre las 2 y 6 horas de exposición, y comienza paulatinamente a disminuir en el tiempo. Para el tratamiento frío, la respuesta no es tan clara a las primeras horas de exposición, pero se observa la tendencia de sub-expresión en estos genes con el tiempo. Esta cinética puede ser explicada por la respuesta aclimatatoria de *L. albus*, reflejando que después de las 12 horas, el organismo no requiere el mecanismo de reparación y protección celular mediados por estos genes. Por consiguiente, la disminución de 4 grados en la temperatura ambiental del erizo, no requeriría este mecanismo de aclimatación. En efecto, para aumentos de la temperatura, autores como Tomanek, 2010 y Runcie, 2012 proponen que los aumentos en la expresión de estos genes *HSP*, serían parte de la estrategia fisiológica de los organismos intermareales para ocupar nichos ecológicos cerca de sus límites térmicos. En adición, Osovitz &

Hoffman (2005), observaron en *S. purpuratus*, la sobre-expresión de *HSP70* cuando fueron sometidos a distintos tratamientos térmicos, concluyendo que para resistir la variación térmica la sobreexpresión de este gen es esencial y suficiente. Por otra parte, Runcie el 2012, ve la expresión en larvas de *S. purpuratus* para los genes *HSP 70* y *90*, pero a temperaturas subextremas, concluyendo que una exposición crónica a intensidades bajas de estrés térmico (temperaturas bajo el CT_{max}) es suficiente para inducir la expresión de estos genes.

7.6 Gen RNA-binding protein 8A (RBM8A)

El gen RNA-binding protein 8A (RBM8A), codifica una proteína de unión a mRNA, de preferencia a aquellos producidos luego de una modificación post-transcripcional del mRNA (Genecard.org). Este gen fue usado por Runcie y colaboradores en un estudio del 2012 como un gen constitutivo para estudiarla expresión de 2 genes codificantes de chaperonas (*hsp 70* y *90*) frente a un aumento en las temperaturas. Un gen constitutivo es aquel que constantemente se está expresando, debido a que es requerido para el correcto funcionamiento y mantenimiento de funciones celulares, como también procesos metabólicos de un organismo, por ende no se encuentra regulado y se expresa en forma continua (Pierce 2010). En esta tesis, el gen constitutivo RBM8A inicialmente fue incluido como normalizador junto al gen 18S, sin embargo, en un análisis estadístico fue incluido como un nuevo gen candidato para observar si su expresión difería significativamente de los demás genes del estudio. Un ANOVA de 3 vías realizado, muestra un efecto significativo del factor gen, al incluirse el gen *RBM8A* como gen de interés, indicando que estos genes son buenos candidatos y muestran una respuesta transcriptómica similar frente a variaciones de temperatura.

7.7 Flexibilidad fenotípica

El término "flexibilidad fenotípica" se utiliza para describir las respuestas plásticas que son reversibles y repetibles en el tiempo de vida de un individuo (Piersma & Drent 2003), y que se producen en respuesta a las fluctuaciones ambientales. Así por ejemplo, Fansler (1983) trabajando con el erizo *S. purpuratus*, demostró que el tamaño de la mandíbula cambiaba por distintos tipos de alimentos, y que este cambio morfológico era reversible en

cuanto se le cambiaba la dieta. También, Levitan (1989) demostró que el erizo del caribe *Diadema antillarum*, es capaz de cambiar de tamaño en respuesta a las variaciones en las condiciones locales de alimentos. Concluye que esta respuesta aclimatatoria de un ajuste en el tamaño corporal, va a reducir los costes de mantenimiento, para así optimizar su reproducción y supervivencia según la disponibilidad local de alimentos. Sedden *et al.* 2009 observó en el erizo *Strongylocentrotus droebachiensis*, que cuando están en presencia de depredadores, presentan esqueletos más gruesos, gónadas más pequeñas y cambios en su tasa de crecimiento, mientras que en ausencia los rasgos recién nombrados se presentaban de forma normal. Así, la mayoría de los trabajos que demuestran algún tipo de plasticidad reversible, están mostrando flexibilidad en rasgos asociados a crecimiento, fisiología o comportamiento (Fansler 1983; Levitan 1989; Ebert 1996; Hernandez & Russell 2010). Se sabe ampliamente que los cambios antes descritos están principalmente generados por diferencias en expresión génica en distintos ambientes (Auld *et al.* 2010), sin embargo la literatura científica para estudios transcriptómicos a cambios de temperatura es escasa, más aún en erizos marinos. Se sabe que los fenotipos son determinados por la expresión génica en condiciones ambientales particulares (Auld *et al.* 2010). Por ejemplo, Podrabsky *et al.* 2004, trabajando en el pez de agua dulce *Austrofundulus limnaeus*, al cual expuso a 4 tratamientos distintos de temperatura (tres tratamientos fijos 20°C, 26°C, 37°C y un tratamiento fluctuante cada 4 horas de 20°C a 37°C, todos por un total de 348 horas), observaron que la expresión de genes (caracterizada por microarreglos) a ambientes constantes y fluctuantes provocan diferentes respuestas transcriptómicas y probablemente fisiológicas. Para el caso de los erizos, O'Donnell *et al.* 2009, trabajando con larvas de *S. franciscanus* criadas a altas condiciones de CO₂, y sometidos a cambios de temperatura, mostró una reducción y retraso de la respuesta en el nivel de transcripción de hsp70. Esto sugiere, que la respuesta fisiológica puede ser inhibida a un nivel molecular, como resultado de una exposición anterior al CO₂. Por otra parte Martinet *et al.* 2011 mostraron que existe plasticidad transcriptómica en larvas de *P. lividus* expuestas a distintos pH pues observaron un aumento en la expresión de genes asociados al desarrollo y biomineralización en un función de una disminución del pH (pH>7,25). Sin embargo, valores inferiores de pH hacen que los transcritos vuelvan a aumentar sugiriendo que existe un alto costo fisiológico de las células para funcionar en un ambiente tan alterado.

En este trabajo, el ANOVA factorial entrega un efecto significativo del tiempo de exposición a las distintas temperaturas, mostrando una tendencia a aumentar de golpe la expresión de todos los genes candidatos en las primeras 2 y 6 horas (siendo mayor a las 2 horas). Sin embargo, a las 12 y 48 horas se observó una disminución significativa de los niveles de transcritos. Por consiguiente, es posible inferir que la expresión de los genes estudiados alcanza rápidamente un máximo, momento en el que se logra la aclimatación. Luego de ello, no necesitará seguir generando más transcritos lo que se refleja en la reducción posterior en la expresión génica. Esto representa un interesante caso de flexibilidad fenotípica en equinodermos, la cual está principalmente interpretada por los costos de mantener un fenotipo exacerbado en forma constitutiva.

Los costos de la plasticidad están con frecuencia citados como un tema importante que requiere más estudio (DeWitt *et al.* 1998). El costo de la plasticidad se evidencia en un ambiente focal, cuando un organismo plástico exhibe una menor adecuación biológica para el valor de un rasgo que un organismo no plástico (i.e., canalizado) (DeWitt *et al.* 1998). Usando este razonamiento, DeWitt (1998) propuso 5 posibles costos de la plasticidad. Primero, los costos de mantenimiento, que representan gastos energéticos de los sistemas sensoriales necesarios para detectar las condiciones ambientales; Segundo, los costos de producción que se refieren a los costos de un individuo plástico para expresar cierto rasgo comparado con un individuo canalizado expresando el mismo rasgo; Tercero, los costos de adquisición de información, son los que incurren los organismos plásticos para obtener información sobre las condiciones ambientales (individuos canalizados no requieren esta información para la construcción de su fenotipo); Cuarto, los costos de la inestabilidad del desarrollo, que representan gastos asociados con la asociación fenotipo-ambiente, debido a procesos de desarrollo ambientalmente sensibles; y por último, los costos genéticos, que resultan directamente de la interacción entre un gen plástico y un gen que afecta negativamente la adecuación biológica, teniendo como consecuencia interacciones epistáticas negativas. A pesar de los altos costos que se requieren para mantener la maquinaria de la aclimatación constantemente encendida, es un costo menor en relación a un organismo canalizado (i.e. que no es plástico para algún rasgo), el cual mantendrá constante un determinado fenotipo en los distintos ambientes (Meiklejohn & Hartl 2002). Esto debido a que en ambientes tan contrastantes como en los que habita el erizo acá

presentado, es necesario mostrar un diverso abanico de respuestas aclimatorias, para así poder sobrevivir y prosperar, por lo que el costo de poseer rasgos canalizados para la aclimatación podría llevar a un costo tan alto como la muerte.

Finalmente, Osovitz y Hofmann (2005), concluyen que para poder resistir la variación térmica en *S. purpuratus*, es suficiente con los efectos de la regulación de genes sensibles al calor como *HSP 70*. En esta tesis, se observa que la variación transcriptómica incurrida es más general y que al menos involucraría los 5 genes acá estudiados. Así, sería necesario el funcionamiento en conjunto de múltiples genes, los cuales permitirán al organismo aclimatarse antela situación de estrés térmico.

8. Conclusión

La exposición a una variación térmica induciría en *Loxechinus albus* una respuesta plástica transcripcional que involucraría al menos sobre expresión en los 5 genes candidatos estudiados en esta tesis, produciendo una alteración en el fenotipo de un organismo para aclimatarse a la nueva condición ambiental. Dicho proceso es una respuesta plástica flexible que le permite a los individuos volver a sus condiciones transcriptómicas iniciales una vez alcanzada la aclimatación, permitiéndoles no incurrir de forma excesiva, los altos costos energéticos necesarios para mantener encendidos de forma constantes los mecanismos de aclimatación.

No es raro que estos erizos de mar sean capaces de amortiguar los efectos del estrés térmico, poseen una distribución latitudinal muy amplia y viven en la zona intermareal. Por otra parte, su ciclo de vida posee una larva pluteus, la cual está provista de largas prolongaciones sostenidas por un delicado esqueleto calcáreo, que les permitirían moverse a la deriva de las corrientes, indicando una buena dispersión y un amplio flujo de genes entre poblaciones que habitan a distintas temperaturas, promoviendo que la selección de alelos que promuevan el desarrollo en distintas temperaturas, sea muy eficiente.

9. Bibliografía

- Andersson, T. & Förlin, L. (1992). Regulation of the cytochrome P450 enzyme system in fish. *Aquatic Toxicology*, 24, 1-19.
- Antinuchi, C., Cutrera, A., Luna, F. & Zenuto, R. (2003). Animales y temperatura: estrategias termorregulatorias durante la ontogenia. In: *Fisiología Ecológica y Evolutiva: Teoría y Casos de Estudio* (ed. Chile, EUCd), pp. 399 - 420.
- Auld, J.R., Agrawal, A.A. & Relyea, R.A. (2010). Re-evaluating the costs and limits of adaptive phenotypic plasticity. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 277, 503-511.
- Bak, S., Tax, F.E., Feldmann, K.A., Galbraith, D.W. & Feyereisen, R. (2001). CYP83B1, a cytochrome P450 at the metabolic branch point in auxin and indole glucosinolate biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, 13, 101-111.
- Bartlett, M.S. (1950). PERIODOGRAM ANALYSIS AND CONTINUOUS SPECTRA. *Biometrika*, 37, 1-16.
- Barua, D. & Heckathorn, S.A. (2004). Acclimation of the temperature set-points of the heat-shock response. *Journal of Thermal Biology*, 29, 185-193.
- Becker, C., Hammerle-Fickinger, A., Riedmaier, I. & Pfaffl, M.W. (2010). mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. *Methods*, 50, 237-243.
- Black, R.A. (1993). Predator-induced phenotypic plasticity in *Daphnia pulex*: Life history and morphological responses to *Notonecta* and *Chaoborus*. *Limnol. Oceanogr*, 38, 986-996.
- Bookout, A.L. & Mangelsdorf, D.J. (2003). Quantitative real-time PCR protocol for analysis of nuclear receptor signaling pathways. *Nuclear receptor signaling*, 1.
- Bowler, K. (2005). Acclimation, heat shock and hardening. *Journal of Thermal Biology*, 30, 125-130.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M. *et al.* (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry*, 55, 611-622.
- Bustos, E. & Olave, S. (2001). Manual: El cultivo del erizo (*Loxechinus albus*). . *IFOP. División de acuicultura.* , 22pp.

- Castilla, J. & Moreno, C. (1982). Sea urchins and *Macrocystis pyrifera*: experimental test of their ecological relations in southern Chile. In: *Proceedings of the International Echinoderm Conference, Tampa Bay, Florida, USA*, ed. JM Lawrence, pp. 257-263.
- Contreras, S. & Castilla, J. (1987). Feeding behavior and morphological adaptations in two sympatric sea urchin species in central Chile. *Marine Ecology Progress Series*, 38, 217-224.
- Coon, M., Ding, X., Pernecky, S.J. & Vaz, A. (1992). Cytochrome P450: progress and predictions. *The FASEB journal*, 6, 669-673.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162, 156-159.
- Davis, M.B. & Shaw, R.G. (2001). Range Shifts and Adaptive Responses to Quaternary Climate Change. *Science*, 292, 673-679.
- Davis, M.B., Shaw, R.G. & Etterson, J.R. (2005). EVOLUTIONARY RESPONSES TO CHANGING CLIMATE. *Ecology*, 86, 1704-1714.
- Dayton, P.K. (1985). The Structure and Regulation of Some South American Kelp Communities. *Ecological Monographs*, 55, 447-468.
- DeWitt, T.J., Sih, A. & Wilson, D.S. (1998). Costs and limits of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology & Evolution*, 13, 77-81.
- Díaz, A., Féral, J.P., David, B., Saucède, T. & Poulin, E. (2011). Evolutionary pathways among shallow and deep-sea echinoids of the genus *Sterechinus* in the Southern Ocean. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 58, 205-211.
- Drummond, A., Ashton, B., Buxton, S., Cheung, M., Cooper, A., Duran, C. *et al.* (2011). Geneious, version 5.4. *Geneious, Auckland, New Zealand*.
- Ebert, T. (1996). Adaptive aspects of phenotypic plasticity in echinoderms. *Oceanologica acta*, 19, 347-355.
- Fansler, S.C. (1983). Phenotypic plasticity of skeletal elements in the purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*.
- Farcy, É., Voiseux, C., Lebel, J.-M. & Fiévet, B. (2009). Transcriptional expression levels of cell stress marker genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to acute thermal stress. *Cell Stress and Chaperones*, 14, 371-380.

- Feder, M.E. & Hofmann, G.E. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual review of physiology*, 61, 243-282.
- Fitzpatrick, M.J., Ben-Shahar, Y., Smid, H.M., Vet, L.E., Robinson, G.E. & Sokolowski, M.B. (2005). Candidate genes for behavioural ecology. *Trends Ecol Evol*, 20, 96-104.
- Franks, S.J. & Hoffmann, A.A. (2012). Genetics of climate change adaptation. *Annual review of genetics*, 46, 185-208.
- Freeman, W.M., Walker, S.J. & Vrana, K.E. (1999). Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques*, 26, 112-125.
- Gabriel, W. (2005). How stress selects for reversible phenotypic plasticity. *Journal of evolutionary biology*, 18, 873-883.
- Genecard.org. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=RBM8A>.
- Ghalambor, C.K., McKay, J.K., Carroll, S.P. & Reznick, D.N. (2007). Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Functional Ecology*, 21, 394-407.
- Gibson, G. (2002). Microarrays in ecology and evolution: a preview. *Molecular ecology*, 11, 17-24.
- Gienapp, P., Teplitsky, C., Alho, J.S., Mills, J.A. & Merila, J. (2008). Climate change and evolution: disentangling environmental and genetic responses. *Molecular ecology*, 17, 167-178.
- Gillam, E.M., Guo, Z., Martin, M.V., Jenkins, C.M. & Guengerich, F.P. (1995). Expression of cytochrome P450 2D6 in Escherichia coli, purification, and spectral and catalytic characterization. *Archives of biochemistry and biophysics*, 319, 540-550.
- Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R. & Mathieu, C. (2001). An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, 25, 386-401.
- Goeptar, A.R., Scheerens, H. & Vermeulen, N.P. (1995). Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 25, 25-65.

- Goldstone, J.V., Hamdoun, A., Cole, B.J., Howard-Ashby, M., Nebert, D.W., Scally, M. *et al.* (2006). The chemical defensible: environmental sensing and response genes in the *Strongylocentrotus purpuratus* genome. *Developmental biology*, 300, 366-384.
- Gupta, S.C., Sharma, A., Mishra, M., Mishra, R.K. & Chowdhuri, D.K. (2010). Heat shock proteins in toxicology: how close and how far? *Life sciences*, 86, 377-384.
- 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 Biology*, 157, 2677-2687.
- Hardstone, M.C., Leichter, C.A. & Scott, J.G. (2009). Multiplicative interaction between the two major mechanisms of permethrin resistance, *kdr* and cytochrome P450-monooxygenase detoxification, in mosquitoes. *Journal of evolutionary biology*, 22, 416-423.
- Hartley, H.O. (1959). Smallest composite designs for quadratic response surfaces. *Biometrics*, 15, 611-624.
- Hernandez, J.C. & Russell, M.P. (2010). Substratum cavities affect growth-plasticity, allometry, movement and feeding rates in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *The Journal of experimental biology*, 213, 520-525.
- Hernández, M., Bückle, F., Guisado, C., Barón, B.n. & Estavillo, N. (2004). Critical thermal maximum and osmotic pressure of the red sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus* acclimated at different temperatures. *Journal of Thermal Biology*, 29, 231-236.
- Hewatt, W.G. (1937). Ecological studies on selected marine intertidal communities of Monterey Bay, California. *American Midland Naturalist*, 161-206.
- Hoffmann, A.A. & Willi, Y. (2008). Detecting genetic responses to environmental change. *Nature reviews. Genetics*, 9, 421-432.
- Hofmann, G.E. & Todgham, A.E. (2010). Living in the now: physiological mechanisms to tolerate a rapidly changing environment. *Annual review of physiology*, 72, 127-145.
- Huey, R.B., Kearney, M.R., Krockenberger, A., Holtum, J.A., Jess, M. & Williams, S.E. (2012). Predicting organismal vulnerability to climate warming: roles of behaviour, physiology and adaptation. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 367, 1665-1679.

- Iannacone, J. & Alvarino, L. (2007). Influencia de la aclimatación en la tolerancia a altas temperaturas del chanchito de la humedad *Por cellio laevis* (Isopoda: Porcellionidae). *Biologist (Lima)*, 5, 60-64.
- IFOP (2012). http://www.ifop.cl/wp-content/uploads/recursos_amerb/Erizo_2012.pdf.
- Johnston, I.A. & Bennett, A.F. (1996). *Animals and temperature : phenotypic and evolutionary adaptation*. Cambridge University Press, Cambridge [etc.].
- Kalendar, R., Lee, D. & Schulman, A.H. (2009). FastPCR software for PCR primer and probe design and repeat search. *Focus on Bioinformatics/Mansour, A.(Ed)*.
- Killian, C.E., Croker, L. & Wilt, F.H. (2010). SpSM30 gene family expression patterns in embryonic and adult biomineralized tissues of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *Gene expression patterns : GEP*, 10, 135-139.
- Larrain, A. (1975). Los equinoideos regulares fosiles y recientes de Chile. *Gayana (Zool)*, 35.
- Leong, P. & Manahan, D. (1997). Metabolic importance of Na⁺/K⁺-ATPase activity during sea urchin development. *Journal of experimental biology*, 200, 2881-2892.
- Leong, P. & Manahan, D. (1999). Na⁺/K⁺-ATPase activity during early development and growth of an Antarctic sea urchin. *Journal of experimental biology*, 202, 2051-2058.
- Lesk, A. (2007). *Genomics*. Oxford University Press.
- Levitán, D.R. (1989). Density-Dependent Size Regulation in *Diadema Antillarum*: Effects on Fecundity and Survivorship. *Ecology*, 70, 1414-1424.
- Lüning, J. (1992). Phenotypic plasticity of *Daphnia pulex* in the presence of invertebrate predators: morphological and life history responses. *Oecologia*, 92, 383-390.
- Martin, S., Richier, S., Pedrotti, M.L., Dupont, S., Castejon, C., Gerakis, Y. *et al.* (2011). Early development and molecular plasticity in the Mediterranean sea urchin *Paracentrotus lividus* exposed to CO₂-driven acidification. *The Journal of experimental biology*, 214, 1357-1368.
- Mattison, J., Trent, J., Shanks, A., Akin, T. & Pearse, J. (1976). Movement and feeding activity of red sea urchins (*Strongylocentrotus franciscanus*) adjacent to a kelp forest. *Marine Biology*, 39, 25-30.

- Meiklejohn, C.D. & Hartl, D.L. (2002). A single mode of canalization. *Trends in ecology & evolution (Personal edition)*, 17, 468-473.
- Molinet, C., Moreno, C.A., Niklitschek, E.J., Matamala, M., Neculman, M., Arévalo, A. *et al.* (2012). Reproduction of the sea urchin *Loxechinus albus* across a bathymetric gradient in the Chilean Inland Sea. *Revista de biología marina y oceanografía*, 47, 257-272.
- Nelson, D.L., Cox, M.M. & Cuchillo, C. (2001). *Lehninger principios de bioquímica*. Omega.
- Núñez-Acuña, G., Tapia, F.J., Haye, P.A. & Gallardo-Escárate, C. (2012). Gene expression analysis in *Mytilus chilensis* populations reveals local patterns associated with ocean environmental conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 420-421, 56-64.
- Orensanz, J.M., Parma, A.M., Jerez, G., Barahona, N., Montecinos, M. & Elias, I. (2005). What are the Key Elements for the Sustainability of "S-Fisheries"? Insights from South America. *Bulletin of Marine Science*, 76, 527-556.
- Osovitz, C.J. & Hofmann, G.E. (2005). Thermal history-dependent expression of the hsp70 gene in purple sea urchins: Biogeographic patterns and the effect of temperature acclimation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 327, 134-143.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29, e45-e45.
- Pierce, B.A. (2010). *Genetics: A conceptual approach*. Macmillan.
- Piersma, T. & Drent, J. (2003). Phenotypic flexibility and the evolution of organismal design. *Trends in Ecology & Evolution*, 18, 228-233.
- Reynolds, R.W., Smith, T.M., Liu, C., Chelton, D.B., Casey, K.S. & Schlax, M.G. (2007). Daily high-resolution-blended analyses for sea surface temperature. *Journal of Climate*, 20.
- Runcie, D.E., Garfield, D.A., Babbitt, C.C., Wygoda, J.A., Mukherjee, S. & Wray, G.A. (2012). Genetics of gene expression responses to temperature stress in a sea urchin gene network. *Molecular ecology*, 21, 4547-4562.

- Sconzo, G., Scardina, G. & Ferraro, M.G. (1992). Characterization of a new member of the sea urchin *Paracentrotus lividus* hsp70 gene family and its expression. *Gene*, 121, 353-358.
- Scheiner, S.M. (1993). Genetics and evolution of phenotypic plasticity. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24, 35-68.
- Schlitzer, R. (2002). Interactive analysis and visualization of geoscience data with Ocean Data View. *Computers & geosciences*, 28, 1211-1218.
- Schmidt-Nielsen, K. (1995). *Animal physiology : adaptation and environment*. Cambridge University Press, London.
- Schmittgen, T.D. & Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols*, 3, 1101-1108.
- Seebacher, F. (2005). A review of thermoregulation and physiological performance in reptiles: what is the role of phenotypic flexibility? *Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology*, 175, 453-461.
- Selden, R., Johnson, A. & Ellers, O. (2009). Waterborne cues from crabs induce thicker skeletons, smaller gonads and size-specific changes in growth rate in sea urchins. *Marine Biology*, 156, 1057-1071.
- Shine, R. (1999). Why is sex determined by nest temperature in many reptiles? *Trends in Ecology & Evolution*, 14, 186-189.
- Silva, A.X., Jander, G., Samaniego, H., Ramsey, J.S. & Figueroa, C.C. (2012). Insecticide resistance mechanisms in the green peach aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) I: a transcriptomic survey. *PLoS one*, 7, e36366.
- Sleiderink, H.M., Beyer, J., Scholtens, E., Goksøyr, A., Nieuwenhuize, J., Van Liere, J.M. *et al.* (1995). Influence of temperature and polycyclic aromatic hydrocarbons on CYP1A levels in North Sea dab (*Limanda limanda*). *Aquatic Toxicology*, 32, 189-209.
- Somero, G.N. (1995). Proteins and temperature. *Annual review of physiology*, 57, 43-68.
- Sørensen, J.G., Kristensen, T.N. & Loeschcke, V. (2003). The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters*, 6, 1025-1037.
- Stearns, S.C. (1989). The evolutionary significance of phenotypic plasticity. *BioScience*, 39, 436-445.

- Tomanek, L. & Helmuth, B. (2002). Physiological Ecology of Rocky Intertidal Organisms: A Synergy of Concepts. *Integrative and Comparative Biology*, 42, 771-775.
- Tomšić, S., Stanković, S. & Lucu, Č. (2011). Oxygen consumption rate and Na⁺/K⁺-ATPase activity in early developmental stages of the sea urchin *Paracentrotus lividus* Lam. *Helgoland Marine Research*, 65, 431-434.
- Turbeville, J.M., Schulz, J.R. & Raff, R.A. (1994). Deuterostome phylogeny and the sister group of the chordates: evidence from molecules and morphology. *Molecular biology and evolution*, 11, 648-655.
- Ulbricht, R. (1973). Effect of temperature acclimation on the metabolic rate of sea urchins. *Marine Biology*, 19, 273-277.
- Vásquez, J., Castilla, J. & Santelices, B. (1984). Distributional patterns and diets of four species of sea urchins in giant kelp forest (*Macrocystis pyrifera*) of Puerto Toro, Navarino Island, Chile. *Marine ecology progress series. Oldendorf*, 19, 55-63.
- Vásquez, J.A. (2001). Ecology of *Loxechinus albus*. In: *Developments in Aquaculture and Fisheries Science* (ed. John, ML). Elsevier, pp. 161-175.
- Wilson, R.S. & Franklin, C.E. (2002). Testing the beneficial acclimation hypothesis. *Trends in ecology & evolution (Personal edition)*, 17, 66-70.
- Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F. *et al.* (2012). The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature*, 490, 49-54.