

ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas, Oceánicas y
Recursos Naturales



**“ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL DE GENES DEL
ERIZO DE MAR ANTÁRTICO (*Sterechinus neumayeri*) EN
RESPUESTA AL ESTRÉS INDUCIDO POR CADMIO”**

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del título de:

BIÓLOGO

Presentado por:

JAVIER ANDRÉS GILBERT JARAMILLO

Guayaquil-Ecuador

2014

AGRADECIMIENTO

El autor desea agradecer a Dios por darme la vida, fortaleza y sabiduría. A mis Padres, Hermanos y Abuela por confiar siempre en mí.

Al Dr. Marcelo Muñoz y al Dr. Marcelo González, por sus conocimientos, palabras de motivación y confianza. De igual manera a mis evaluadores MsC. César Bedoya y Ph.D. Juan Cevallos por el apoyo brindado, y por la ayuda durante el transcurso del presente proyecto.

A los docentes de la FIMCBOR, especialmente al MsC. Eduardo Molina, Dra. Elba Camba, MsC. Ecuador Marcillo, MsC. Francisca Burgos por su apoyo, enseñanzas, conocimientos transmitidos y amistad brindada.

A mi hermano Guille, a Kim y a Carlos por su ayuda en la culminación del presente trabajo escrito y su amistad incondicional.

También agradecer al INAE y al INACH por su apoyo, oportunidad y financiamiento durante toda mi estadía en territorio Antártico y Chileno. Por último pero no menos importante, al Biólogo Alberto Lino del CSA y al personal del Laboratorio de Biorrecursos del INACH, por sus conocimientos transmitidos.

DEDICATORIA

A mis padres:

Fernando Gilbert y Marcela Jaramillo, por enseñarme los principios y valores que rigen mi vida y que me han convertido en lo que soy hoy por hoy.

A mi abuela:

María Magdalena “Malena” Gilbert

A mis hermanos:

Guillermo y Fernando

Gracias, no hubiese logrado nada sin ustedes en mi vida.

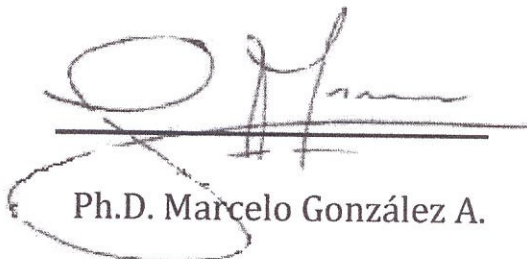
Javier Andrés Gilbert Jaramillo

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



Ing. Marco Velarde T.

PRESIDENTE



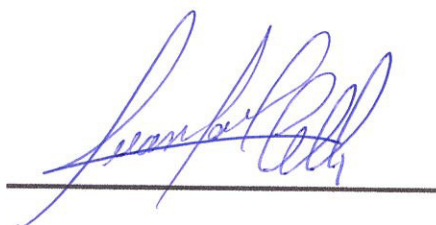
Ph.D. Marcelo González A.

DIRECTOR DE TESIS



MsC. César Bedoya

VOCAL PRINCIPAL



Ph.D. Juan Manuel Cevallos Cevallos

VOCAL ALTERNO

DECLARACIÓN EXPRESA

"La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL".

(Reglamento de Graduación de la ESPOL)



Javier Andrés Gilbert Jaramillo

RESUMEN

El presente trabajo describe la diferencia en la acumulación de transcritos de ARNm de los genes de Metalotioneínas (MT), y Proteínas de Estrés Térmico 70 (HSP 70) en muestras de intestino en ejemplares de erizo de mar Antártico (*Sterechinus neumayeri*) confrontados a 2mM y 5mM de Cloruro de Cadmio (CdCl_2) mediante bioensayo. Los resultados obtenidos mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real fueron normalizados con los valores de expresión del gen ARN Ribosomal 28S; considerado como estándar interno de la evaluación cuantitativa del estado fisiológico del erizo de mar Antártico; y posteriormente sometidos a un ANOVA de 1 factor ($p=0,05$).

Dichos resultados evidencian variaciones en los niveles de expresión transcripcional de los genes de MT y HSP 70. De esta manera, la información preliminar obtenida sugiere la posibilidad de que el estudio genético del *S. neumayeri* permita emplearlo como una potencial especie bioindicadora de la contaminación a causa de metales pesados en el continente blanco.

Palabra clave: Erizo de mar Antártico, *Sterechinus neumayeri*, Proteína de Estrés Térmico 70, Metalotioneína, ARN ribosomal 28S, bioindicadora.

INDICE GENERAL

RESUMEN.....	I
ÍNDICE GENERAL.....	II
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	VIII
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	X
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
INTRODUCCIÓN.....	1
1 GENERALIDADES.....	6
1.1 Erizo de Mar Antártico (<i>Sterechinus neumayeri</i>).....	6
1.1.1 Clasificación Taxonómica.....	8
1.1.2 Distribución y Hábitat.....	8
1.1.3 Nicho ecológico.....	10
1.2 Metales Pesados y Ambiente Antártico.....	10
1.3 Metalotioneínas.....	18
1.4 Proteínas de Estrés Térmico 70.....	23
1.5 Genes Control del Estado Fisiológico o “Housekeeping Genes” (ARN28S ribosomal y Actina).....	26
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
2.1. Área de Estudio	30
2.2. Material Biológico.....	31
2.3. Bioensayo.....	32
2.4. Extracción de RNA total.....	36
2.5. Producción de ADN complementario (cDNA).....	37
2.6. PCR en Tiempo Real.....	37
2.7. Análisis Estadístico.....	39
3. RESULTADOS.....	41
Validación de los “genes control” o “housekeeping gene”	42
Validación del Gen ARNr 28S para las muestras del “POOL Genético”.....	44
Validación del Gen Actina para las muestras del “POOL Genético”.....	47
Corroboración del gen control ARNr 28S para las muestras individuales.....	50
Validación del Gen ARNr 28S para las muestras individuales.....	50
Cuantificación de la expresión de los genes de estrés HSP 70 y MT.....	53

Cuantificación relativa de los niveles de expresión transcripcional del gen de estrés Proteína de Estrés Térmico 70 (HSP 70).....	54
Medición de los niveles de expresión transcripcional del Gen HSP70 (99bp).....	54
Medición de los niveles de expresión transcripcional del Gen HSP70 (500bp).....	56
Medición de los niveles de expresión transcripcional del Gen MT(292bp).....	59
4. DISCUSIÓN.....	62
RECOMENDACIONES.....	70
CONCLUSIONES.....	72
ANEXO A.....	76
ANEXO B.....	87
ANEXO C.....	92
BIBLIOGRAFÍA.....	95

ABREVIATURA

ADN/DNA Ácido Desoxi-Ribonucleico

Al Aluminio

ANOVA Análisis de Varianza

Arg Arginina

ARN/RNA Ácido Ribonucleico

ARNr Ácido Ribonucleico Ribosomal o Ácido Ribonucleico Ribosómico

ARN-Safer/RNA-Safer Compuesto rico en sales para preservar el Ácido Ribonucleico

bp pares de base

cADN/cDNA Ácido Desoxi-Ribonucleico Complementario

Cd Cadmio

CdCl₂ Cloruro de Cadmio

Cd-MT Cadmio-Metalotioneína, Cadmio-Tioneína, o Cd-Tioneína

CO₂ Dioxido de Carbono

Cr Cromo

Ct Valores de umbral de los ciclos

Cu Cobre

Cys Cisteínas

C-terminal Grupo Carboxilo Terminal

Da Dalton

dATP desoxi adenina tri-fosfato

dCTP desoxi citosina tri-fosfato

DEPC **water** agua con dietilpirocarbonato

dGTP desoxi guanidina tri-fosfato

dNTP o dNTPS desoxi nucleótidos tri-fosfato

DTT di-tio treiol

dTTP desoxi timina tri-fosfato

EZNA

GroEL Proteína Chaperona Molecular de *Escherichia Coli*

Hg Mercurio

Hg Mercurio

HSP/HSPs Proteínas de Estrés Térmico

HSP10 Familia de Proteínas Co-Chaperonas de Estrés Térmico 10

HSP60 Familia de Proteínas Chaperonas de Estrés Térmico 60

HSP70 Familia de Proteínas Chaperonas de Estrés Térmico 70

HSP90 Familia más abundante de Proteínas de Estrés Térmico 90

INACH Instituto Antártico Chileno

kDa Kilo Daltons

Lys Lisina

M Molar

min Minutos

ml Mili Litros

mM Mili Molar

MT/MTs Metalotioneínas

MT-I/MT-II Metalotioneínas I y II

M-MLV-RT Transcriptasa Reversa del Virus de Leucemia Murina de Moloney

ng Nano gramos

Ni Níquel

N-terminal Grupo Amino Terminal

Oligo-dT DNA corto de cadena sencilla de desoxitimidina

Pb Plomo

PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa

qPCR o **Q-PCR** Reacción cuantificable en Cadena de la Polimerasa

RNase H enzima hidrolítica de RNA

RPM Revoluciones por minuto

RT-PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa, o transcriptasa inversa - Reacción en cadena

SAM Modo Anular del Sur

SCAR Comité Científico de Investigación Antártica

SD desviación estándar

Se Selenio

UV Ultra Violeta

X-Cys Aminoácido enlazado a la Cisteína

Zn Cinc

Zn-MT Cinc-Metalotioneína, Cinc-Tioneína, o Zn-Tioneína

μl Micro-litros

μg Micro gramos

ΔΔCt doble delta Ct

2-ΔΔCt exponente doble delta Ct

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción de partidores diseñados para genes caracterizados de *S. neumayeri* (*) de acuerdo al gen de interés a amplificar. La temperatura de hibridación varía debido a la especificidad del juego de partidores y de los tamaños de los fragmentos de PCR. _____ 38

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Diferencia en los valores de las medias del grupo control y los grupos experimentales del gen ARNr 28S para la concentración de 2mM_____44

Gráfico 2. Diferencia en los valores de las medias del grupo control y los grupos experimentales del gen ARNr 28S para la concentración de 5mM_____45

Gráfico 3. Diferencia en los valores de las medias del grupo control y los grupos experimentales del gen Actina para la concentración de 2mM_____47

Gráfico 4. Diferencia en los valores de las medias del grupo control y los grupos experimentales del gen Actina para la concentración de 5mM_____48

Gráfico 5. Diferencia en los valores de las medias del grupo control y los grupos experimentales del gen ARNr 28S para la concentración de 2mM de las muestras individuales_____50

Gráfico 6. Diferencia en los valores de las medias del grupo control y los grupos experimentales del gen ARNr 28S para la concentración de 5mM de las muestras individuales_____51

Gráfico 7. Diferencia en los valores de las medias del grupo control y los grupos experimentales del gen HSP 70 (99 bp) normalizado con el gen ARNr 28S, para la concentración de 2mM de las muestras individuales_____54

Gráfico 8. Diferencia en los valores de las medias del grupo control y los grupos experimentales del gen HSP 70 (500 bp) normalizado con el gen ARNr 28S, para la concentración de 2mM de las muestras individuales_____56

Gráfico 9. Diferencia en los valores de las medias del grupo control y los grupos experimentales del gen HSP 70 (500 bp) normalizado con el gen ARNr 28S, para la concentración de 5mM de las muestras individuales_____57

Gráfico 10. Diferencia en los valores de las medias del grupo control y los grupos experimentales del gen MT (292 bp) normalizado con el gen ARNr 28S, para la concentración de 2mM de las muestras individuales_____59

Gráfico 11. Diferencia en los valores de las medias del grupo control y los grupos experimentales del gen MT (292 bp) normalizado con el gen ARNr 28S, para la concentración de 5mM de las muestras individuales_____60

Gráfico 12: Grafico de barras de los valores de la media de Ct de los genes experimentales HSP 70 (99bp y 500bp) y MT (292bp), para las diferentes concentraciones (2mM y 5mM) de CdCl₂_____61

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Mapa y Foto satelital de la Península de Fildes, Isla Rey Jorge (Antártida)	31
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Metodología implementada para la obtención de muestras de *S. neumayeri*._____35

Figura 2. Diagrama de Amplificación del programa de qPCR para el gen Actina____43

Figura 3. Diagrama de Amplificación del programa de qPCR para el gen ARNr 28S_43

INTRODUCCIÓN

El erizo de mar Antártico (*Sterechinus neumayeri*), forma parte del Phylum Echinodermata, los cuales juegan un papel importante en la biodiversidad, composición, organización, y estructura de los ecosistemas que habitan en todas las latitudes en las que se encuentran. Tanto en climas templados y fríos (1, 2, 3).

De manera general, los erizos de mar se encuentran en altas densidades, las mismas que causan cambios en la composición de las comunidades de organismos sésiles (1, 3).

Normalmente, conforme aumentan las comunidades de erizos; comunidades de algas disminuyen considerablemente (3). De igual manera disminuyen otras comunidades de invertebrados debido a la competencia por el sustrato (2, 4).

Específicamente en el medio Antártico, estos invertebrados, consumidores primarios y organismos esenciales para el ecosistema debido a su rol fundamental como estructurador de comunidades, y su amplia distribución, comprendida entre los 5 y 30 metros de profundidad; son organismos fundamentales no solo para las cadenas tróficas de vertebrados superiores que se pueden alimentar de ellos, como lobos de mar o ballenas, sino también para diversos eslabones de la cadena trófica, debido a que su alimentación, principalmente basada en algas, los convierte en organismos primordiales para el control, regulación y equilibrio entre las poblaciones de productores primarios y consumidores (4, 5). Basado en lo antes expuesto, se puede citar como ejemplo que, en caso de erradicar al erizo de mar Antártico de su ecosistema, se podrían ver afectados no solo vertebrados superiores que se alimentan de ellos, sino también toda la cadena trófica Antártica, debido a que la proliferación de algas sería mayor; llevando consigo un cambio total de las condiciones de vida marinas, principalmente debido a las fluctuaciones de agua con mayor O_2 durante el día y mayor CO_2 durante la noche, así como la menor disponibilidad de espacios para el correcto desenvolvimiento de especies marinas; procesos que podrían afectar y concluir en la erradicación de más especies dentro de este ecosistema (4). Así, el estudio de la abundancia y el estado fisiológico del erizo de mar Antártico, pueden reflejar la salud de este ecosistema, tomando en cuenta su rol en la cadena trófica.

En lo que respecta a investigaciones con metales pesados en invertebrados, el erizo de mar, se ha convertido en un organismo utilizado a nivel mundial, realizando experimentos tanto en estadios primarios de desarrollo como en adultos, para la determinación de niveles de concentración de metales pesados en ecosistemas marinos (6). Esto se debe a su comportamiento cosmopolita, facilidad de manipulación y gran abundancia en diferentes ecosistemas alrededor del mundo (5, 6).

La contaminación por metales pesados, contenidos en aerosoles, pinturas, textiles, infraestructura, entre otros, son las causas principales de que en la Antártida la contaminación ambiental y marina esté aumentando (7, 8). Siendo por estas razones que lo que para muchos era un sitio “virgen”, ya no pueda ser visto como tal debido a la disminución de las condiciones prístinas que antes poseía.

El análisis de la problemática a causa de la contaminación por metales pesados en el continente Antártico, es de suma importancia. Razón por la cual, el estudio de dichos metales, uno de los cuales es el Cadmio, que debido a la peligrosidad y toxicidad por sus propiedades de persistir en el medio marino bioacumulándose y biomagnificándose en la cadena trófica, es de importante relevancia con la finalidad de encontrar una respuesta para mitigar los daños causados (8, 9).

En diferentes organismos se ha demostrado que tanto las proteínas de la familia de Proteínas de Estrés térmico 70 (HSP70), como las Metaloproteínas, en especial las Metalotioneínas (MTs), son buenos indicadores de estrés fisiológico ante agentes estresantes (10, 11). Las HSP70 son otra familia de proteínas distribuidas en todas las células y en el espacio intercelular, y que participan en la maduración de otras proteínas (12, 13). Las MTs, son una superfamilia de proteínas intracelulares capaces de unir metales de transición y metales pesados (14, 15).

De igual manera, en experimentos con aumentos de temperatura en el erizo de mar Antártico, *S. neumayeri*, se han caracterizado dichas moléculas de respuesta ante el estrés fisiológico como son las Proteínas de Estrés Térmico 70 (HSP70). (12, 16). Dando como resultado el uso del erizo de mar Antártico como especie bioindicadora del cambio climático (5, 16).

Razón por la cual, se ha experimentado con el erizo de mar Antártico para la obtención de Metalotioneínas (MTs), obteniendo resultados que en paralelo a los análisis de celomocitos (células del erizo de mar), indican que existe una inducción de las MTs debido a la estimulación con CdCl₂ (2, 17).

El presente trabajo abordará el estudio de la tasa transcripcional de genes de respuesta ante el estrés a causa de metales pesados, (Metalotioneínas y

Proteínas de Estrés Térmico 70), en tejidos del erizo de mar Antártico, *S. neumayeri*, a diferentes concentraciones de Cloruro de Cadmio (CdCl_2), mediante el análisis de los niveles relativos de acumulación de los ARNm de ambos genes, normalizados con los ARNm constitutivos de Actina y 28S Ribosomal, debidamente validados como controles para la normalización del estado fisiológico del erizo de mar Antártico.

Dicho estudio, basado en la expresión o supresión de los genes de respuesta ante el estrés a causa de metales pesados, servirá para conocer si el erizo de mar Antártico, *S. neumayeri*, genera una respuesta ante la presencia de CdCl_2 en el medio circundante, por medio de lo cual, se podrá determinar el uso del erizo de mar Antártico como bioindicador de la presencia de CdCl_2 en el medio marino.

CAPITULO I

1 GENERALIDADES

1.1 Erizo de Mar Antártico (*Sterechinus neumayeri*)

Los equinoideos, más conocidos como erizos de mar, forman parte del Phylum Echinoidea. Su cuerpo es de forma globosa o discoidal, carecen de brazos y poseen un esqueleto interno, cubierto sólo por la epidermis, el mismo que está constituido por numerosas placas calcáreas unidas entre sí formando un caparazón, en las que se articulan las púas móviles (1, 3, 4).

Viven en todos los fondos marinos alrededor del mundo, son especies con un alto índice de abundancia en sus ecosistemas y se caracterizan por ser cosmopolitas (1, 3).

Los erizos de mar son animales bentónicos que se desplazan sobre el sustrato marino debido a la acción combinada de los pies ambulacrales y las espinas móviles. Su alimentación es muy variada y se diferencia por especies y por hábitat, teniendo así que pueden ser herbívoros, suspensívoros, detritívoros y una muy baja cantidad de depredadores. Su forma de reproducción es exclusivamente sexual (1, 3, 18).

Por otra parte, el erizo de mar Antártico, *Sterechinus neumayeri*, gracias a su abundancia y características biológicas dentro de su ecosistema ha sido usado como organismo modelo en áreas de investigación como biología reproductiva, embriología, ecología, fisiología y toxicología (10, 19, 20).

El erizo de mar Antártico posee una coloración que va de rojo brillante a morado opaco (Véase Anexo B-FIGURA 1), y puede crecer hasta 5 centímetros de diámetro (10, 21).

Su cuerpo es globular con filas verticales de espinas largas, fuertes, de punta blanca entre las cuales hay una cubierta densa de espinas más pequeñas y filas verticales de pies de tubo (1, 4, 22).

Carecen de brazos y su esqueleto interno está constituido por numerosas placas calcáreas unidas entre sí formando un caparazón, en el cual se articulan las espinas o púas móviles. Las espinas y los pies ambulacrales permiten que el animal se mueva a través del suelo (1, 22, 23).

Su alimentación se basa principalmente en diatomeas y algas, aunque también consume foraminíferos, anfípodos, briozoos, hidrozoos, poliquetos y esponjas (3, 4, 18).

1.1.1 Clasificación taxonómica

Reino Animalia
Phylum Echinodermata
Clase Echinoidea
Superorden Echinacea
Orden Camarodonta
Familia Echinidae
Genero *Sterechinus*
Especie *Sterechinus neumayeri*

(Fuente: Elaborado por el Autor)

1.1.2 Distribución y hábitat

La distribución de esta especie es en todas las aguas del círculo polar incluyendo; Océano Austral, Islas Ballenas, las islas South Georgia y South Sandwich, Bahía Terra Nova e Isla Victoria (16).

La mayoría de estos organismos han sido encontrados alrededor de los 250 metros de profundidad, aunque también hay presencia en menor abundancia, desde los 10 metros de profundidad en pequeñas ensenadas o en las cercanías de algunos islotes (16, 18, 21).

El erizo de mar Antártico, es una especie que habita las aguas frías alrededor del continente Antártico, desde hace alrededor de 25 a 35 millones de años que dicho continente se separó de América del Sur (4, 16).

Dicho hábitat, constituido por aguas frías con abundante oxígeno disuelto y muy poca turbidez, nos haría pensar que esta especie es muy diferente a las encontradas en otros lugares del planeta como por ejemplo Centro y Sur-América (16, 22). Sin embargo análisis del DNA mitocondrial, ha demostrado que el *S. neumayeri* se adaptó, millones de años atrás, a las condiciones de este continente, debido a que comparte mucha relación genética con dos especies que habitan la parte más meridional de América del Sur (*Paracentrotus lividus* y *Loxechinus albus*) (17, 24).

Adicionalmente, estudios referente a la distribución de fauna bentónica con erizos de mar del género *Sterechinus*, distribuidos a lo largo de la Antártida denotan; pese a que *S. neumayeri* comparte relación con especies de América del Sur; se ha evidenciado que las especies superficiales de erizo de mar Antártico *S.*

neumayeri, poseen divergencia genética en relación a las especies de mayor profundidad *S. dentifer* y *S. antarticus*. Dichas especies de profundidad se encuentran genéticamente más relacionadas a las especies sub-Antárticas, fenómeno que no puede ser explicado por ninguna de las dos hipótesis de conexión evolutiva entre faunas Antárticas: emersión o sumersión. (25).

1.1.3 Nicho Ecológico

Las interacciones ecosistémicas del erizo de mar Antártico, consisten en las asociaciones con la vieira Antártica, *Adamussium colbecki*, y la estrella de mar, *Odontaster validus* (4). Muy a menudo presentan fragmentos de algas rojas que se adhieren a las espinas, esto es debido a que son ingeridas para alimentación, y porque comparten distribución espacial en toda la región circumpolar (4, 18).

1.2 Metales pesados y Ambiente Antártico

Una definición precisa de metal pesado, todavía no es establecida por los científicos y es tema de constante discusión y polémica (26).

Una de las definiciones existentes se basa en la gravedad específica: “metal pesado es aquel metal con gravedad específica $> 5 \text{ g/cm}^3$ ”, sin embargo

esto no es útil desde el punto de vista del estudio de los efectos toxicológicos que algunos metales tienen sobre el ambiente y los seres vivos (26, 27).

Es por esta razón que una definición de metal pesado adoptada corresponde a *"el grupo de metales o metaloides asociados con contaminación y toxicidad potencial"* (26).

Los metales pesados se clasifican en esenciales: cinc (Zn), cobre (Cu), cromo (Cr), níquel (Ni), selenio (Se) y aluminio (Al) y no esenciales: como cadmio (Cd), mercurio (Hg) y plomo (Pb). (11, 25). *"Los metales esenciales son necesarios para un crecimiento normal y pueden encontrarse unidos a proteínas o metaloproteínas (hemoglobinas y hemocianinas) o libres"* (11).

"El Zn y el Cu han sido identificados como componentes esenciales en reacciones enzimáticas, no obstante, ambos pueden ser de alta toxicidad si están presentes en exceso" (11).

Por otro lado, es demostrado que los metales no esenciales no cumplen funciones metabólicas útiles en el organismo de los individuos que los contienen (11, 28). (Véase Anexo A Tabla I).

“Los principales orígenes de dichos contaminantes incluyen actividades agropecuarias, portuarias y petroleras, aguas residuales domésticas e industriales; así como también los que llegan a través del aire y el escurrimiento natural desde ríos y arroyos hasta el mar” (11, 26, 27).

Los metales en general se encuentran en todos los organismos vivos y juegan diferentes roles. Pudiendo ser algunos de estos como elementos estructurales, estabilizadores de estructuras biológicas, componentes de mecanismos de control y/o activadores de los sistemas redox (26).

Por esta razón, algunos metales son elementos esenciales y su deficiencia afecta a distintas funciones biológicas. Sin embargo cuando éstos se presentan en exceso pueden llegar a ser tóxicos (26, 27).

“Algunos metales no tienen una función esencial conocida; por el contrario muestran manifestaciones tóxicas a exposiciones moderadas, pero dentro de los organismos interactúan en sitios importantes como son los grupos SH de los sistemas enzimáticos” (29).

Se ha comprobado que entre metales esenciales y no esenciales se existe una competencia intrínseca por presencia de ambos en un organismo, por

ejemplo el Cd no penetra en el feto, sin embargo causa un efecto negativo en el feto como consecuencia de una deficiencia de Zn (26).

Desde 1940 grandes cantidades de metales tóxicos y no naturales vertidos en el ambiente marino han producido accidentes generando fatalidades. Algunos ejemplos son: la intoxicación por metil-mercurio en las bahías de Minimata y Niigata en Japón y en Irak, y según Nriagu (1990) la entrada de metales pesados a la atmósfera se ha triplicado y aún cuadruplicado en el período entre 1900 y 1990 (30).

La distribución de los metales pesados en medios marinos y terrestres, permanece relativamente constante debido a la existencia de procesos biológicos naturales, tanto de síntesis como de degradación (26).

Los metales pesados, pese a su toxicidad en determinadas concentraciones, son componentes naturales de los océanos y son requeridos por la biota en cantidades pequeñas. Como se ha mencionado con anterioridad, las dificultades surgen cuando dichos metales aparecen en concentraciones excesivas, principalmente en estuarios o en océanos; y, debido a que algunos de estos metales presentan una elevada toxicidad aún en bajas concentraciones, pueden en un corto periodo de tiempo dañar o finalizar con la vida vegetal o animal (9, 26, 28).

El cadmio fue descubierto en el año de 1817, por Stromeyer en Göttingen y de manera independiente pero simultánea por Hermann en Schöneberg (29).

El cadmio es un elemento que se encuentra en escasa proporción en la corteza terrestre y que se presenta generalmente en forma de cloruro, sulfito, sulfato y, más habitualmente, formando compuestos complejos con otros metales (27, 28, 31).

Este elemento se genera, normalmente, como subproducto durante los procesos de producción de metales como el cinc, el plomo o el cobre. La mayor contaminación por cadmio alrededor del planeta es la proveniente de las actividades de minería y refinado de materiales no ferrosos (29, 31).

El cadmio es un elemento que no se oxida fácilmente, y tiene muchos usos incluyendo en las actividades y productos del ser humano como son baterías, pigmentos, revestimientos para metales, y plásticos (27, 28).

El cadmio ingresa al aire por medio de diferentes fuentes como la minería, industria, y al quemar carbón y desechos domésticos. Mientras que, al agua y al suelo, ingresa por medio de vertederos y derrames en sitios de desechos peligrosos, en donde una parte se adhiere a partículas del suelo, y la otra parte se disuelve en el agua (27, 28, 31).

Cabe mencionar también, que el cadmio no se degrada en el medio ambiente, pero puede cambiar de forma y “desaparecer” de nuestro alcance, esto es debido a que las plantas, peces y otros animales lo incorporan en su organismo posterior a su captación del medio ambiente (27, 29).

El cadmio tiene la particularidad de permanecer en el organismo por largo tiempo, y a su vez tiene la capacidad de poder acumularse en los organismos después de años de exposición a bajos niveles. Ocasionando los procesos que conocemos como Bioacumulación y Biomagnificación (9, 27, 28, 31).

Como se mencionó anteriormente, el cadmio se presenta en la naturaleza y en los diferentes compuestos de uso antrópico en forma de cloruro, sulfito o sulfato. Una de estas formas más presentes es la de cloruro de cadmio (CdCl_2) (9).

La sal de Cloruro de Cadmio se presenta en forma de cristales incoloros, inodoros e higroscópicos, la solubilidad en agua es elevada, y es utilizado en la fabricación de fungicidas, tinción e impresión de textiles, y en baños de acabado metálico (9, 26, 27, 28).

Esta sal de cadmio para el ser humano es peligrosa, no solo por los efectos negativos que puede causar al ambiente, sino porque demanda un gran riesgo a la salud por la exposición, debido a que es un compuesto carcinógeno, mutágeno y teratógeno (9, 29, 31).

El cloruro de cadmio es tóxico para los organismos acuáticos, y en ambientes marinos, el cloruro de cadmio tiende a bioacumularse y biomagnificarse a través de la cadena trófica, estos procesos se originan principalmente en las algas debido a la captación de nutrientes en suspensión para realizar fotosíntesis, aunque también puede originarse por medio del ingreso en organismos filtradores a través de los sedimentos y agua (9, 27, 39).

Como se ha mencionado con anterioridad, la peligrosidad de todos los metales pesados, incluido el cadmio por su facilidad de llegar a afectar la salud humana y animal, es un aspecto relevante a estudiar. Independiente de que la Antártida sea el cuarto continente más extenso del mundo, que no está habitado por el hombre, y que presenta cualidades de un ambiente extremo único, presentando en invierno un aumento del doble de su tamaño por la cantidad de hielo que se forma en su periferia al congelarse el mar, mientras que en verano algunas zonas permaneces libre de hielo (32). Éste no se encuentra excepto de la afectación por contaminantes.

Uno de esos contaminantes más recurrentes, como consecuencia de todos los materiales que se emplean en construcción, vestimenta y el mecanismo de eliminación de desechos depositados en la Antártida producto de la Investigación, así como la afluencia turística, es el Cadmio (9, 29, 33).

La relación existente entre la contaminación del continente Antártico y los metales pesados es muy estrecha. Pese a que la costa de la Antártida es en gran parte un sitio prístino, los hábitats marinos bentónicos poco profundos adyacentes a las bases científicas actuales, así como los abandonados son a menudo altamente contaminados (34). El transporte marítimo, los derrames, vertidos de residuos sólidos y líquidos, la quema de combustibles fósiles, y la salida de las aguas de lastre, así como la de aguas residuales mal tratadas, son causas primordiales del aumento de los niveles de contaminación en la Antártida (35, 36, 37).

En referencia al Cadmio como uno de los metales de mayor toxicidad en la actualidad, debido a las diferentes formas en que se lo puede encontrar en la industria, empleado para el presente proyecto. No se puede estimar las consecuencias ecotóxicas presentes en agua o sedimento, sin embargo, parece denotar que concentraciones de entre 5 a 50mg de Cd/Kg en suelo, pueden inhibir procesos microbianos tales como la reproducción y el crecimiento (38, 39), concentraciones que podrían afectar de igual manera en ambientes marinos.

Estudios realizados en invertebrados del continente Antártico, que puedan estar expuestas a la ingesta de cadmio proveniente de fuentes ambientales, tenemos que en musgos obtenidos en los alrededores de la base Pedro Vicente Maldonado, se presentan valores máximos de 0,0031 ug/g de Cadmio; siendo este metal uno de los que se encuentra en menores concentraciones dentro de estas especies Antárticas (39).

Como ha sido descrito, la Antártida no es ajena a los contaminantes que el hombre ha emitido durante décadas. Además, debido a otros factores, como el cambio climático o el creciente desarrollo urbanístico e industrial y el aumento poblacional de los países del hemisferio sur, en conjunto con los presentados actualmente, pueden aumentar la deposición e impacto de la contaminación antropogénica en la Antártida, que a la actualidad no se ve afectada en gran medida por Cadmio (33, 35, 39).

1.3 Metalotioneínas

Las metalotioneínas (MTs) son una superfamilia de proteínas intracelulares que se encuentran presentes en todos los organismos vivos, y que son capaces de unir metales de transición y metales pesados (2, 12).

Las MTs fueron descubiertas por Margoshes y Valle en 1957 cuando las aislaron de la corteza renal de los equinos, y las identificaron como proteínas capaces de unir cadmio (Cd), actualmente se las define como “Proteínas de bajo peso molecular, menores a 7 000 Da compuestas por 61 a 68 aminoácidos” (2, 11, 15).

“Un rasgo destacable en la secuencia de aminoácidos dentro de la composición de las MTs, es la gran proporción de cisteínas (Cys) altamente conservadas, aproximadamente de 18 a 23, agrupadas en secuencias Cys- X-Cys, Cys-Cys y Cys-X-Y-Cys, donde X y Y son aminoácidos diferentes de la cisteína” (2, 11).

Hasta la actualidad se han descrito cuatro isoformas de las MTs (numeradas del I al IV). Las MT-I y MT-II no se expresan en todas las células, pero si en todos los tejidos del organismo, siendo particularmente importante su presencia en órganos parenquimatosos como el hígado, riñón, intestino, testículos, pulmón, corazón y cerebro (Véase Anexo B-Figura 2). (2, 41).

Las MTs están formadas por dos dominios globulares similares, ubicados uno en el extremo C-terminal y el otro en el N-terminal. Cada dominio se encuentra unido entre sí por un *loop* o asa flexible (11, 40).

Las MTs se clasifican y nombran en base al metal al que se pueden enlazar. Una MT que contiene un solo metal (por ej. Cd) se le denomina cadmio-metalotioneína (CdMT) ó Cd-tioneína (2, 40).

“Por otro lado, se ha observado que al administrar sales de Cd en animales superiores de experimentación, éste se transporta a través del torrente sanguíneo acumulándose inicialmente en el hígado, donde se induce la síntesis de la MT respectiva. Posteriormente el Cd hepático continúa su camino hacia el riñón como CdMT, este complejo es una potente nefrotoxina que tiene una vida media mayor a la de ZnMT, y cuando la concentración de Cd en tejido renal alcanza niveles críticos (100-200 mg/g), se producen los daños tubulares” (41).

Esta particularidad de las MTs, las ha convertido en proteínas muy importantes a la hora de hablar de contaminación principalmente producto de las actividades antrópicas. El uso por parte del hombre de metales pesados en distintas industrias, como avance del desarrollo tecnológico y social; partiendo que se tienen metales pesados desde elementos textiles hasta alimenticios, los transforma en un alto impacto al medio ambiente (41). De esta manera, la importancia de comenzar el estudio de distintos genes capaces de relacionarse con metales pesados y otros tipos de contaminantes es de gran relevancia al hablar de posibles indicadores de estados ecosistémicos dentro de un ambiente en particular.

Las MTs, al poseer esta particularidad de relacionarse con el tipo de contaminantes analizados en el proyecto y de gran incidencia y efecto al encontrarse presente en distintos ecosistemas, las vuelve cada día más importantes al momento de obtener información relevante del estado actual y manejo de diferentes sitios alrededor del planeta (41). Por este motivo, el continuar analizando distintos genes de MTs y sus relaciones con situaciones de estrés fisiológico a causa de metales pesados y contaminación de ecosistemas a causa de la acción antrópica, bioacumulación y biomagnificación propia de los cambios y condiciones ambientales, es un tópico que debe profundizarse cada día más a fin de lograr determinar el patrón que sigue la naturaleza a causa de la influencia y afectación de ciertas actividades antrópicas y las modificaciones en los ecosistemas.

Referente al estudio de metalotioneínas, en diversas especies de peces y mamíferos, como delfines, ratones e inclusive el ser humano, se ha caracterizado moléculas de metalotioneínas, que difieren en algunas características obedeciendo al grado evolutivo de organismos, pero que comparten otras, principalmente en los dominios globulares (41).

Dicha caracterización ha sido producto, principalmente, por ensayos de exposición a ambientes contaminados con metales pesados (41). Por consiguiente, debido a la identificación y expresión de metalotioneínas en grupos evolutivos diversos, se procedió al estudio de las metalotioneínas en el erizo de mar, exponiendo su relevancia en el rol fundamental que juegan en los ecosistemas alrededor del planeta, principalmente en la Antártida.

Anteriormente, se había caracterizado por primera vez la expresión de Metalotioneína en ovocitos de dos especies de erizos de mar, en el erizo del mediterráneo *Sphaerechinus granularis* y el erizo antártico *Sterechinus neumayeri* (40). De igual manera, análisis en células inmuno-competentes, celomocitos, del *S. neumayeri*, reveló que la Metalotioneína, es una proteína claramente inducible por el estrés a CdCl_2 , y que su expresión aumenta por la presencia de este metal (2). Sin embargo la inducción de la Metalotioneína, es variable intraespecíficamente e interespecíficamente por varias razones pudiendo ser éstas, ambientales o fisiológicas (2, 38). Por otro lado, podemos acotar que, la Metalotioneína en el erizo de mar Antártico, posee un rol protector contra el estrés oxidativo debido a los radicales libres de oxígeno producidos por la exposición al CdCl_2 (2, 41, 42).

1.4 Proteínas de Estrés Térmico 70

Las Proteínas de Estrés Térmico (Heat Shock Proteins – “HSPs”), son una familia de proteínas conservadas a través del tiempo, cuya expresión se incrementa en respuesta a una variedad de diferentes compuestos metabólicos y situaciones de desequilibrio celular consecuencia del estrés metabólico (12, 13).

La mayoría de las HSPs son expresadas constitutivamente y desempeñan funciones esenciales, donde la más notable es su rol como “chaperonas” facilitando la síntesis y plegamientos de proteínas a través de la célula (12, 13).

Adicionalmente, ha sido demostrado que las HSPs participan en el ensamblaje proteico, secreción, degradación de proteínas, y la regulación de factores de transcripción y proteínas quinasas, por lo cual incrementos de los niveles de HSPs en diferentes tipos de estrés juegan un rol principal en la homeostasis celular (13).

En la actualidad, sabemos que todas estas familias de proteínas son sintetizadas en células bajo condiciones normales (constitutivas) y que su expresión aumenta (inducibles) debido al estrés metabólico” (13).

La familia HSP70 representa una de las más grandes, la misma que se encuentra distribuidas en todas las células y en el espacio intercelular, diferentes proteínas de esta familia, participan en la maduración de otras proteínas y por esa razón han sido llamadas “chaperoninas” (12, 13). (Véase Anexo B-Figura 3).

Referente al estudio y análisis de HSP 70 en organismos antárticos, podemos mencionar entre lo más relevante diferentes trabajos en peces, equinodermos y crustáceos. Aparentemente, todos los estudios efectuados en respuesta al estrés térmico, en distintos organismos alrededor del mundo, parecen contribuir a la sobreexpresión de Proteínas de estrés térmico (Hsps), como un mecanismo universal de supervivencia de los organismos y/o células a cambios de temperatura del medio, excepto en aquellas especies como peces antárticos, la hydra y el ciliado antártico (*Euplotes focardii*), los mismos que no reaccionan incrementando la expresión de Hsps (48, 49). En el caso de los nototénidos antárticos, conocidos vulgarmente como nototenias, se sostiene que la falta incremento en la producción de Hsp 70 ante cambios de temperatura, no refleja la pérdida de funcionalidad puesto que el gen Hsp70 se ha mantenido, pero su forma de expresión ha sido alterada de inducible a constitutiva (48, 49, 51).

En este proceso, donde las tasas de producción de Hsp 70 son relativamente altas, sin embargo, ni la tasa de transcripción de Hsp70 ni la

concentración de Hsp70 se ve reforzada por el incremento de la temperatura; nos sugieren que, la respuesta de por qué ocurre esta situación implicaría un fenómeno de desnaturalización al frío (similar a lo que ocurre por calor), constituyéndose entonces en un cambio adaptativo (48, 50, 51).

De igual manera, estudios de respuesta de estrés térmico en dos especies antárticas; el equinodermo *Odontaster validus* y el crustáceo *Paraceradocus gibber*, que viven a temperaturas entre -1,86°C y 1°C, demostró que en estas especies la expresión del gen Hsp70 también está ausente (50, 51). Con respecto a la ausencia en expresión de genes Hsp70 inducibles por estrés térmico, la respuesta sugerida sobre la incapacidad de inducir Hsp70, obedece a la pérdida de la vía de regulación en la expresión génica de Hsp durante la historia evolutiva (48, 51). Por otro lado en otras especies marinas especialmente en moluscos la expresión de los genes de shock térmico juega un papel fisiológico relevante en la tolerancia térmica (51, 52).

En lo que respecta a lo identificado en *S. neumayeri*, se obtuvo una secuencia parcial del gen Hsp70 (Sn-Hsc70) a partir del análisis de secuencias de *S. purpuratus*. Esta secuencia parcial se caracteriza por tener un tamaño de 650 pb y una secuencia de 180 aminoácidos, correspondiente a la región N-terminal de la proteína (12).

Por otra parte, Sn-Hsc70, demuestra tener una mayor homología con la secuencia HSP70 del erizo de mar, *Echinus acutus* (94% identidad nucleótidos, 97% identidad de aminoácidos y 98% similaridad de aminoácidos), que con el *S. purpuratus*. Actualmente se tiene una secuencia descrita en los celomocitos de 1991 pb, que corresponde a 651 aminoácidos y que contiene los motivos característicos para HSP70 de tipo constitutiva (53).

1.5 Genes Control del Estado Fisiológico o “Housekeeping Genes” del Estado Fisiológico (ARN 28S Ribosomal y Actina)

Los genes control o “housekeeping genes” son nomenclaturas empleadas en Biología Molecular y Celular para determinar a un grupo de genes que típicamente son genes constitutivos en los diferentes organismos en los que se emplean y son requeridos para el mantenimiento básico de la célula (40). De igual manera, los genes control del estado fisiológico son expresados en todas las células de los distintos organismos bajo condiciones normales y de alteración fisiológica (40).

La importancia del empleo de los “housekeeping genes” radica en que, todos los organismos, ante estímulos que originen una condición de estrés fisiológico en las células, responden aumentando o disminuyendo, dependiendo sea el caso, los niveles de expresión de genes inducibles ante dichas condiciones de alteración (40). En estos casos, el análisis molecular que determine

correctamente los cambios en los niveles de expresión transcripcional de genes inducibles ante diferentes condiciones de estrés en un organismo, se debe hacer empleando una comparación entre los niveles de los genes inducibles y los niveles de genes no inducibles que mantengan constante la expresión (40, 45).

Por este motivo, emplear genes “housekeeping” que, como se mencionó anteriormente, son genes que mantienen un nivel constante de expresión, debido a sus funciones estructurales, protectoras o mensajeras, independientes de la respuesta celular mediada por la alteración del estado fisiológico que mantenga el organismo; son la fuente primordial en la obtención de los resultados que permitan denotar el estado de cambio del organismo ante un factor de estrés. Por lo tanto, podríamos indicar que el empleo comparativo de estos genes, en contraste con genes inducibles ante una condición de estrés, es la clave para lograr normalizar los valores de expresión y determinar con certeza la verdadera inducción genética que evidencia la célula a causa de un factor de estrés y/o alteración fisiológica. Caso contrario, al carecer de información base sobre la expresión de dichos genes inducibles en un estado fisiológico normal (niveles de expresión de los genes “control” o “housekeepig”, podría generar falsos resultados (40, 45).

Dentro de los genes “control” tenemos una gran diversidad, encontrándose algunos en organismos eucariontes y otros en procariontes; difiriendo de acuerdo al grado evolutivo que posea el individuo (40, 45, 46). Por este motivo, entre los genes “control” más conocidos encontramos a los tRNA, rRNA, GADPH, HSP90 y el gen de actina con sus isoforma más representativa para este caso (b-actina); de entre los cuales, debido a diversas investigaciones, se ha sabido mencionar que los más estables para organismos eucariontes son los rRNA y actina (45, 46, 47).

Los genes del ARN ribosomal (ARNr) están entre los más estables e inmutables conocidos. Principalmente, los genes de la unidad pequeña del ARN (16S in procariontes o 18S en eucariontes) se usan para comparar organismos vivos altamente diversos como bacterias, hongos y humanos (44, 45).

Pese a esto, todos los cuatro tipos de ARNr: 18S, 5.8S, 28S y 5S, juegan un papel fundamental en el proceso de traducción en la síntesis de proteínas, y sus variaciones son poco frecuentes. Esta es la razón por lo cual son genes viables para su uso comparativo con genes inducibles en diferentes organismos (44, 46).

La actina es una familia de proteínas globulares que forman los microfilamentos, los cuales son uno de los tres componentes fundamentales del citoesqueleto de las células de los organismos eucariotes, razón por lo cual están involucradas con la movilidad celular (45, 47).

La beta-actina es una de las 6 isoformas de la actina identificada en humanos, esta forma parte del citoesqueleto no muscular, y está relacionada con la integridad celular, siendo así que por estas características tanto la actina, como la beta-actina son utilizadas como genes control en experimentos comparativos de genes inducibles en diferentes organismos (46, 47).

CAPITULO II

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Área de Estudio

El bioensayo se realizó en la Península Fildes (Antártida), en la Base Científica “Profesor Julio Escudero” del Instituto Antártico Chileno, INACH. (62°12'4.96" latitud Sur, 58°57'45.50" Longitud Oeste).

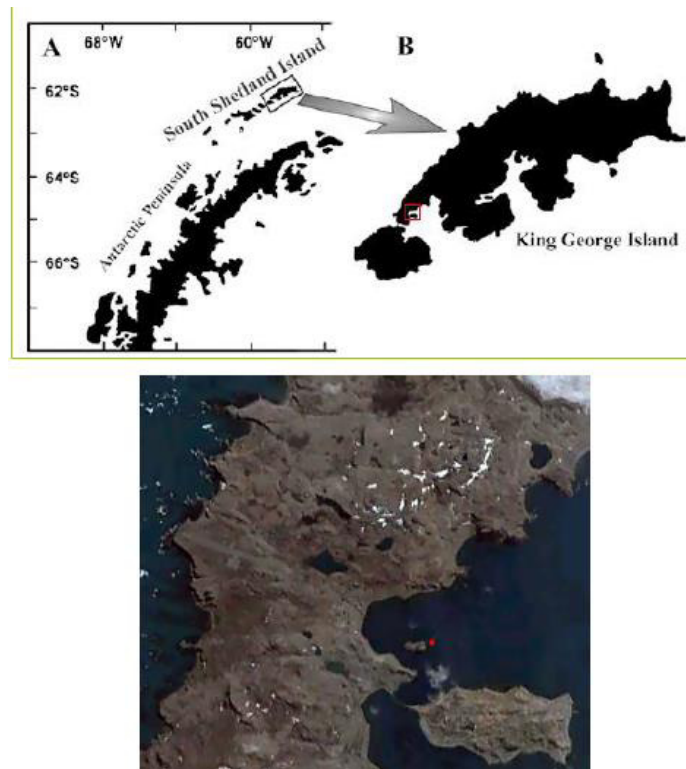


Ilustración 1. Mapa y Foto satelital de la Península de Fildes, Isla Rey Jorge (Antártida).

Mapa y foto satelital del lugar de toma (Punto rojo), y procesamiento inicial (Cuadro Rojo) de las muestras de erizos de mar Antártico. Fuente: Figueroa T. (2009). Islas Shetland del Sur, Península Antártica.

2.2 Material biológico

La toma de los ejemplares de *Sterechinus neumayeri* se llevó a cabo en los alrededores de la Base Científica “Profesor Julio Escudero” por medio de buceo autónomo, efectuado por buzos científicos del Instituto Antártico Chileno (INACH), para su posterior traslado a la Base, sitio en el cual se realizó el experimento de estrés con Cloruro de Cadmio (CdCl_2).

Los 50 ejemplares fueron obtenidos a una profundidad de entre 10 y 15 metros, de igual manera para su traslado se obtuvo agua de mar de la superficie.

2.3 Bioensayo

En el montaje del bioensayo se preparó una solución madre (Stock) de Cloruro de Cadmio (CdCl_2) a 0.5M. Partiendo de esta solución madre, se prepararon dos diluciones correspondientes a las concentraciones de 2mM (recipiente 1), y 5mM (recipiente 2).

La temperatura del bioensayo fue mantenida entre 0 y 1 grados Celsius dentro de una cámara de frío para facilitar la simulación de la temperatura en su hábitat natural.

En efecto, la temperatura permaneció constante durante 48 horas. Las primeras 24 horas fueron empleadas en el mantenimiento adecuado del agua, y corroboración del buen funcionamiento de los equipos, mientras que las últimas 24 horas fueron establecidas como duración total del estrés.

Otro aspecto a tomar en consideración fue la distribución de los ejemplares dentro de los recipientes para el bioensayo, para la distribución se emplearon 9 ejemplares en el recipiente control. Y para los recipientes

experimentales se emplearon 24 ejemplares distribuidos 12 para el experimento de 2mM y 12 para el experimento de 5mM.

Durante el montaje del bioensayo se estableció la cinética correspondiente a 2, 6 y 24 horas de haber sido iniciado el estrés, tiempos en los cuales se realizó la respectiva toma de muestras de los tejidos objetivos del análisis, y células del erizo de mar (celomocitos), de los ejemplares recolectados.

La obtención de las muestras de celomocitos, se efectuó disectando la membrana peristomal alrededor de la “linterna de Aristóteles” de los ejemplares seleccionados, posterior a esta disección, se procedió a inclinar a los ejemplares sobre un embudo, el cual estaba dentro de un tubo Falcon de 50ml ubicado en el interior de un vaso de precipitación, dejando verter todo el líquido rosado que salía del interior del cada ejemplar.

El líquido recolectado de cada ejemplar, se lo distribuyó en 3 tubos eppendorf de 1.5ml que fueron centrifugados a 4 grados a 6000 RPM durante 8 minutos en una centrifuga refrigerada Sartorius. Una vez concluida la centrifugación, el sobrenadante del tubo se descartó. Luego se diluyó el sedimento de celomocitos formado con 400 μ l de ARN-safer (Omega Bio-Tek), y se lo agitó hasta que se encuentre completamente disuelto.

Por otra parte, para la obtención de los tejidos objetivos del análisis, los ejemplares previamente disectados alrededor de la “linterna de Aristóteles” fueron, a partir de este punto, seccionados en forma triangular hacia el extremo externo. Así, para la obtención de muestras de esófago se procedió a levantar y cortar el tejido rojo (esófago) unido a la “linterna de Aristóteles”. La muestra de esófago obtenida se colocó sobre un porta-objetos fue dividida en 4 o 5 partes pequeñas, donde solo una de estas partes se colocó en un microtubo de 1.5ml con 1 ml de ARN-safer.

Del mismo modo para la obtención de muestras de intestino, se procedió a extraer parte del tejido laminar ubicado en el interior del cuerpo del erizo (intestino), ingresando por el extremo previamente seccionado, dos pequeñas cantidades de dicho tejido, que luego fueron colocadas en dos microtubos de 1.5ml con 1ml de ARN-safer cada uno (Véase Figura 1).

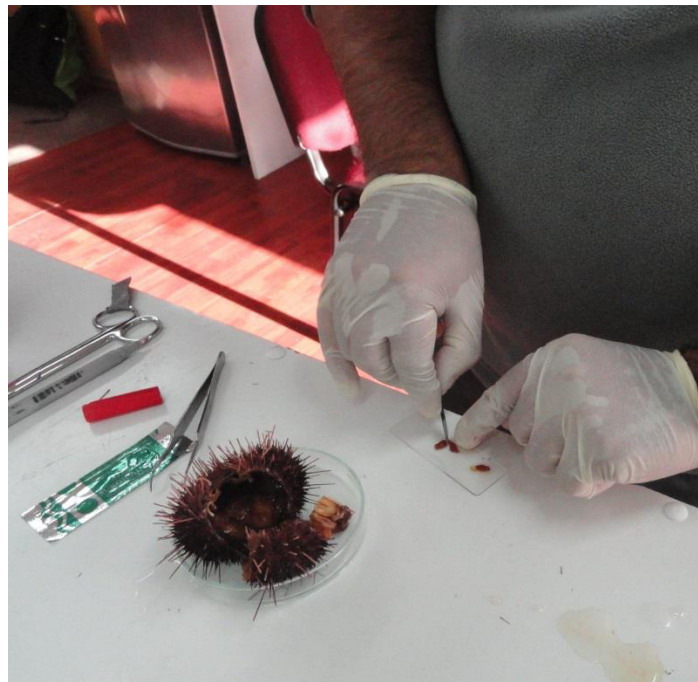


Figura 1. Metodología implementada para la obtención de muestras de *S. neumayeri*.

Metodología implementada para la obtención de muestras de esófago e intestino en el erizo de mar Antártico *Sterechinus neumayeri*. Fuente: Autor

Posterior a la obtención de las muestras de celomocitos y de los tejidos de interés, los tubos fueron debidamente rotulados y se agitaron hasta evidenciar un cambio de coloración del RNA-safer, el mismo que iba de transparente a rojizo. Estos tubos se almacenaron a 4 grados Celsius durante 12 horas para que el ARN-safer penetre correctamente en las muestras y permita su preservación. Subsecuentemente los tubos se almacenaron y preservaron a -20 grados Celsius hasta su respectivo uso.

Finalmente las muestras fueron trasladadas vía aérea hasta Punta Arenas para ser preservadas en el laboratorio de Biorecursos Antárticos del INACH, a -80 grados Celsius, para su procesamiento.

2.4 Extracción de RNA total

Para la obtención de los ARN totales de las muestras preservadas empleamos 1 muestra de intestino, 1 de esófago y 1 de celomocitos de los grupos controles de 5mM. Además, para el respectivo procesamiento de las muestras se empleó el protocolo “EZNA total RNA Isolation Protocol” de Omega Bio-Tek (Ver Anexo C-Protocolo 1), del kit de extracción de ARN totales de EZNA.

Luego de la extracción de los RNA totales, se procedió a la cuantificación de su pureza y concentración, con estos resultados (Véase Anexo A-TABLA II), se decidió procesar el resto de muestras con este último protocolo.

Las muestras que finalmente se procesaron, correspondieron a un total de 27 tubos distribuidos de la siguiente forma, 3 controles (2mM) para toda la cinética, y 4 individuos de cada estrés (2mM y 5mM CdCl₂) a las 2 horas, 6 horas y 24 horas de exposición, de los tubos con muestras de intestino, obteniendo excelentes resultados. (Véase Anexo A-TABLA III).

2.5 Producción de ADN complementario (cDNA).

Una vez extraídos los ARN totales correspondientes a la cinética de la expresión transcripcional de ARNm de las muestras de intestino, se procedió a elaborar un mix de todas las muestras correspondientes a la misma concentración y tiempo de extracción.

El mix de las muestras se realizó agregando en un tubo de PCR, 100µl de cada tubo que contenía los RNA totales, es decir se efectuó, un “POOL Genético” de los controles, correspondientes a las concentraciones de 2mM y 5mM a las 2, 6 y 24 horas, al cuantificarlos y medir su pureza, se obtuvo buenos resultados. (Véase Anexo A-TABLA IV).

Estos “POOL Genéticos” fueron transformados a ADN complementario (cDNA), por medio de la RT-PCR usando el protocolo de Kit M-MLV-RT de Invitrogen (Ver Anexo C-Protocolo 2), y para la RT-PCR se realizaron los cálculos respectivos (Véase Anexo A-TABLA V), basados en el procedimiento empleado en el laboratorio.

2.6 PCR en Tiempo Real

Posterior a la obtención de los tubos de los “POOL Genéticos” transformados a cDNA, se efectuó la PCR en tiempo real, empleando el programa

de qPCR del Laboratorio de Biorecursos Antárticos del INACH, optimizado para el marcador de fluorescencia FAM/Sybr Green (Véase Anexo B-Figura 4).

Cabe señalar, que con este programa de qPCR se realizó la medición de los niveles de expresión transcripcional de los genes control y experimentales, empleando los iniciadores respectivos para cada caso, los mismos que han sido debidamente estandarizados en el Laboratorio de Biorrecursos Antárticos del INACH, y denominados específicamente para este proyecto como 28S (Véase Anexo B-Figura 5), ACT (Véase Anexo B-Figura 6), HSP-1 (Véase Anexo B-Figura 7), HSP-2 (Véase Anexo B-Figura 8), y MT (Véase Anexo B-Figura 9).

Tabla 1: Descripción de partidores diseñados para genes caracterizados de *S. neumayeri* (*) de acuerdo al gen de interés a amplificar. La temperatura de hibridación varía debido a la especificidad del juego de partidores y de los tamaños de los fragmentos de PCR.

Partidores	Secuencia	Tamaño de amplificación	Temperatura de hibridación
FW Sp28s RV Sp28s	GGGTATAGGGGCGAAAGACT GTCGGGCCTCTTACCAATTT	174 pb	55°C
FW S1 RV QHSP70-M1	CCAGCAGTAGGAATTGATC AACACCAGCATCCTTCGT	497pb	50°C
FW Act Sn RV Act Sn	CCTCTCCCTCTACGCATCTG AGCGGTGGTTGTGAAAGAGT	156 pb	50°C
FW MT RV MT	CACCATGCCTGATGTCAAGT TGTCTGCTTGGAGCATGTTG	292 pb	50°C

Los genes amplificados, tanto los controles como los experimentales, se amplificaron con el mismo programa de qPCR (Ver Anexo C-Protocolo 3), y en base a los resultados obtenidos, correspondientes a los niveles de expresión transcripcional de los genes 28S, Metalotioneínas (MTs), Proteína de Estrés Térmico70 (HSP70) y Actina de los “POOL Genéticos” analizados (Véase Anexo A-TABLA VI), visualizados a través de los valores de Ct mostrados, se procedió a realizar el análisis de las muestras individuales.

2.7 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos consistió en primer plano en la medición de los niveles de expresión transcripcional de los genes constitutivos del “POOL Genético”, 28S y Actina con ayuda del programa *Statistica 7*, por medio del cual se efectuó un ANOVA de 1 vía con un nivel de $p=0.05$ para determinar el gen control para la normalización de los genes experimentales; basándose en la estabilidad presenciada en sus niveles de expresión.

Una vez determinado el gen fisiológico más estable en el experimento para las muestras del “POOL Genético”, se procedió a corroborar el resultado obtenido, analizando en las muestras individuales el posible gen control, por medio de una prueba ANOVA de 1 vía con un nivel de $p=0.05$. Corroborado el gen control, los datos de expresión transcripcional obtenidos para los genes experimentales HSP 70 y MT fueron analizados con el método de doble delta Ct

$(2^{-\Delta\Delta C_T})$, el cual expresa la proporción obtenida de la relación entre los valores de C_t de los genes experimentales y los valores del gen control (54), para las muestras individuales (Véase Anexo A-TABLA VII).

Los valores obtenidos gracias al método de doble delta C_t , fueron insertados en el programa *Statistica 7*, en el cual también se efectuó un ANOVA de 1 vía con un nivel de $p=0,05$ para determinar la variación de la expresión transcripcional a causa de la diferencia de tiempo de exposición al que estuvieron sometidos los ejemplares al estrés, dentro de cada concentración.

Previo al análisis de ANOVA de 1 factor, se efectuó una transformación de los datos por medio de la función *Log10*, para cumplir las asunciones de ANOVA. De igual manera se empleó la suma de una constante “1” para evitar los valores negativos de la transformación. (Véase Anexo A-TABLA VIII).

Cabe mencionar que el análisis de la variación en la expresión transcripcional de los genes experimentales fue efectuado de manera independiente para cada gen, es decir, un análisis para el gen HSP-1, otro para el gen HSP-2 y otro para el gen MT. Los resultados del análisis entre tiempos de exposición, sirvieron para evaluar la diferencia en la expresión transcripcional existente por las distintas concentraciones de Cloruro de Cadmio.

CAPITULO III

RESULTADOS

Previo a efectuar el análisis con el método Doble Delta Ct de los datos obtenidos del PCR en tiempo real, correspondientes a los genes experimentales HSP 70 y MT, se efectuó para las muestras de tejido de Erizo de Mar Antártico correspondientes al “POOL Genético” y a las muestras “Individuales” un ANOVA de 1 vía para determinar por medio de comparación de medias por el método de Tuckey HSD, el gen categorizado como estándar interno para la normalización de genes diferencialmente expresados.

Validación de los “Genes Control” o “Housekeeping gene”

La validación de genes denominados “Control” o “Housekeeping” es un paso primordial y necesario previo a cualquier análisis efectuado por qPCR debido a que éstos, una vez que contrastados con los niveles de expresión de los genes experimentales, nos permiten visualizar los niveles relativos de expresión transcripcional a causa del estrés. La validación y empleo del gen “Control” para el presente proyecto, como se mencionó con anterioridad, corresponde a la medición de los niveles de expresión transcripcional de los dos genes constitutivos empleados (Actina y ARNr 28S), a través de un ANOVA de 1 vía, siendo seleccionado como estándar interno para la normalización de los genes diferencialmente expresados, el gen constitutivo de menor variación estadística.

Los valores para la elaboración del análisis estadístico de los resultados se obtuvieron a través de los valores denotados en el programa de qPCR; analizados preliminarmente de manera gráfica, por medio de los diagramas de amplificación; diagramas que sirvieron para generar una idea de la estabilidad de los genes “control” con los que se iba a trabajar para el presente experimento y seleccionar el más estable, corroborándolo posteriormente con pruebas estadísticas (Véase Figura 2 y 3).

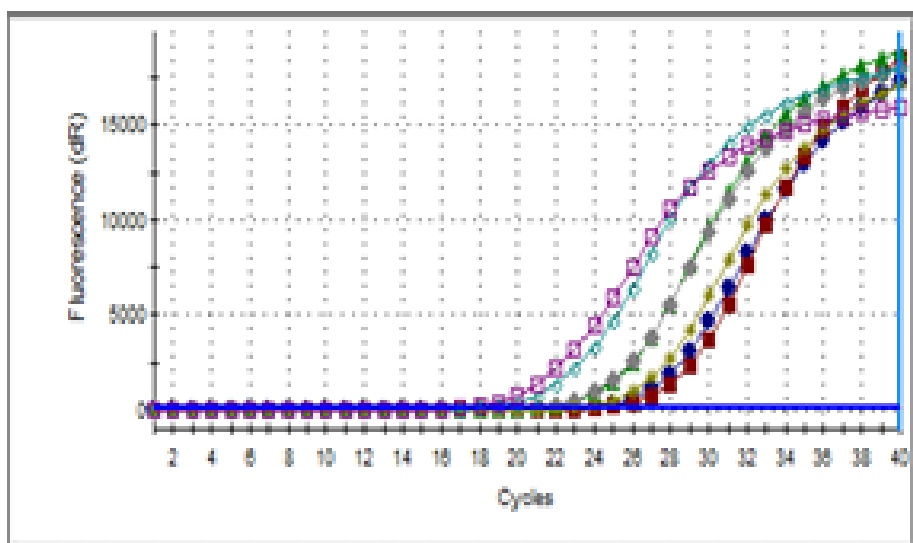


Figura 2. Diagrama de Amplificación del programa de qPCR para el gen Actina

Diagrama de Amplificación del programa de qPCR para el gen Actina correspondiente a las muestras del "Pool Genético". Fuente: Laboratorio de Biorrecursos Antárticos Chileno (INACH)

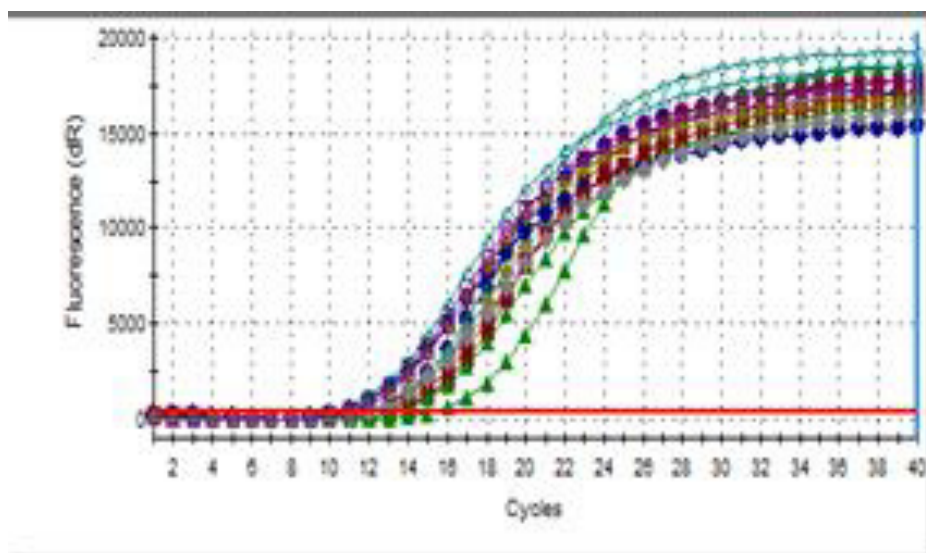


Figura 3. Diagrama de Amplificación del programa de qPCR para el gen ARNr 28S

Diagrama de Amplificación del programa de qPCR para el gen ARNr 28S correspondiente a las muestras del "Pool Genético". Fuente: Laboratorio de Biorrecursos Antárticos Chileno (INACH)

Validación del gen ARNr 28S para las muestras del “POOL Genético”

ARNr 28S 2mM

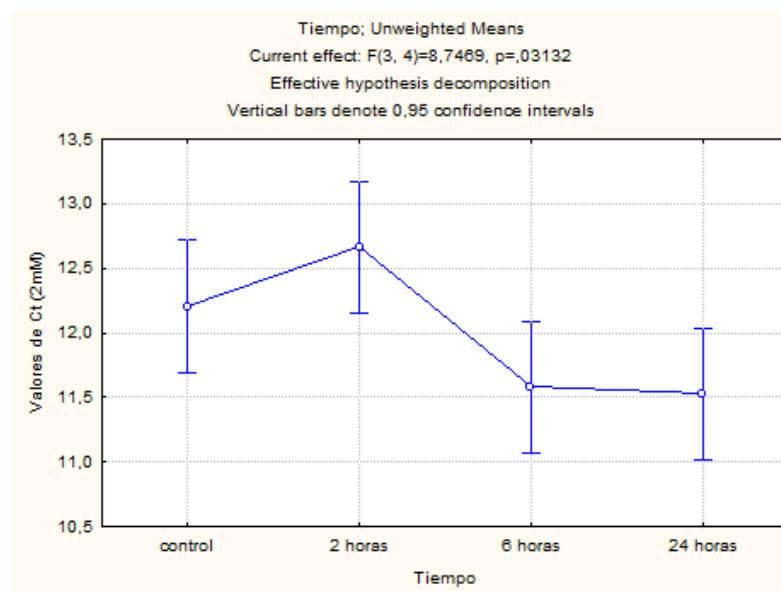


Gráfico 1: Diferencia en los valores de las medias del grupo control y los grupos experimentales del gen ARNr 28S para la concentración de 2mM de CdCl₂.

Gráfico que demuestra la diferencia de medias y las varianzas existentes en el grupo control y los tiempos de exposición al estrés (grupos experimentales), para el gen ARNr 28S en la concentración de 2mM de CdCl₂. (Fuente: Elaborado por el Autor).

El análisis de comparación de medias por el método de Tuckey para el gen ARN 28S Ribosomal del POOL Genético 2mM, demuestra que no se presentan diferencias significativas entre los tiempos de exposición al estrés en relación al control. Sin embargo se evidencia diferencias significativas entre las 6 y 24 horas en relación a las 2 horas de exposición al estrés. (Véase ANEXO A, Table IX).

ARNr 28S Ribosomal 5mM

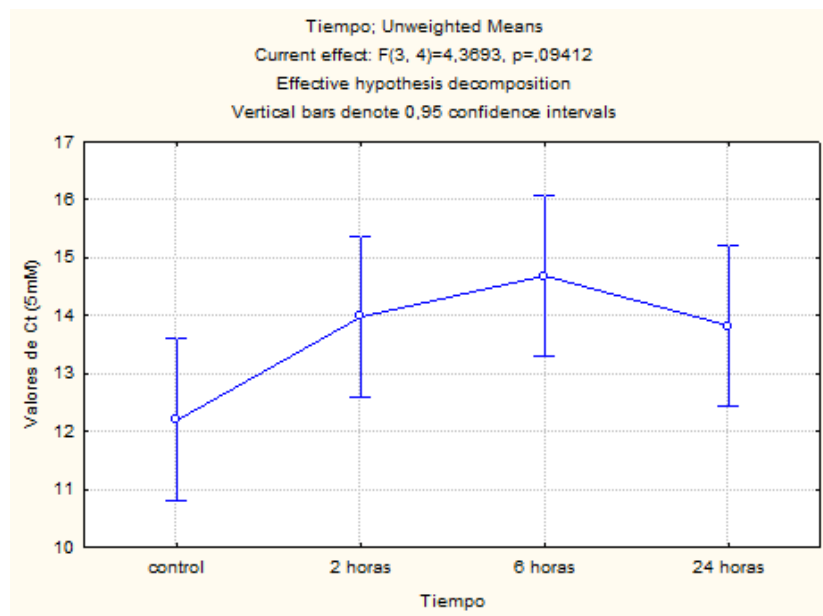


Gráfico 2: Diferencia en los valores de las medias del grupo control y los grupos experimentales del gen ARNr 28S para la concentración de 5mM de CdCl₂.

Gráfico que demuestra la diferencia de medias y las varianzas existentes en el grupo control y los tiempos de exposición al estrés (grupos experimentales), para el gen ARNr 28S en la concentración de 5mM de CdCl₂. (Fuente: Elaborado por el Autor).

El análisis de comparación de medias por el método de Tuckey para el gen ARN 28S Ribosomal del POOL Genético 5mM, demuestra que no se presentan diferencias significativas entre los tiempos de exposición al estrés. De igual manera, no se presentan diferencias significativas en relación al grupo control. (Véase ANEXO A, Tabla X).

El análisis estadístico del gen ARNr 28S para la concentración de 2mM con un valor de $p=0,031$ rechaza la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas entre los grupos experimentales y el grupo control, mientras que para la concentración de 5mM con un valor de $p=0,094$ acepta la hipótesis nula.

El rechazo de la hipótesis nula para la concentración de 2mM corresponde a un aumento en la acumulación de transcritos de ARNr 28S a las 2 horas, seguido de una disminución en la concentración de transcritos para las 6 y 24 horas de exposición al estrés.

Por otra parte, para la concentración de 5mM, la aceptación de la hipótesis nula corresponde a un incremento en la acumulación de transcritos a las 2 y 6 horas de exposición al estrés, mientras que a las 24 horas, se evidencia una ligera disminución en los valores de expresión transcripcional similares a los presentados a las 2 de exposición al estrés.

Validación del gen Actina para las muestras del “POOL Genético”

Actina 2mM

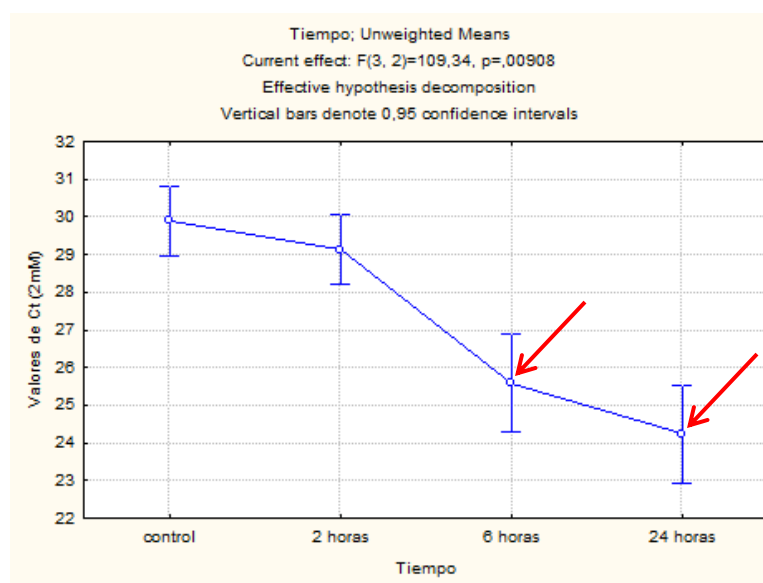


Gráfico 3: Diferencia en los valores de las medias del grupo control y los grupos experimentales del gen Actina para la concentración de 2mM de CdCl_2 .

Gráfico que demuestra la diferencia de medias y las varianzas existentes en el grupo control y los tiempos de exposición al estrés (grupos experimentales), para el gen Actina en la concentración de 2mM de CdCl_2 . (Fuente: Elaborado por el Autor).

El análisis de comparación de medias por el método de Tuckey para el gen Actina del POOL Genético 2mM, demuestra que se presentan diferencias significativas entre las 6 horas y las 24 horas en relación al grupo control y a las 2 horas de exposición. (Véase ANEXO A, Tabla XI).

Actina 5mM

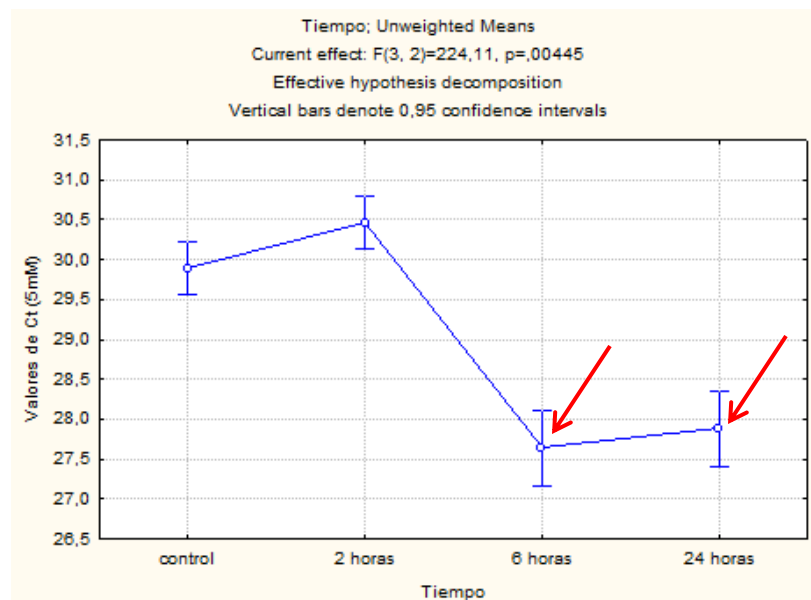


Gráfico 4: Diferencia en los valores de las medias del grupo control y los grupos experimentales del gen Actina para la concentración de 5mM de CdCl₂.

Gráfico que demuestra la diferencia de medias y las varianzas existentes en el grupo control y los tiempos de exposición al estrés (grupos experimentales), para el gen Actina en la concentración de 5mM de CdCl₂. (Fuente: Elaborado por el Autor).

El análisis de comparación de medias por el método de Tuckey para el gen Actina del POOL Genético 5mM, demuestra que se presentan diferencias significativas entre las 6 horas y las 24 horas en relación al grupo control y a las 2 horas de exposición. (Véase ANEXO A, Tabla XII).

El análisis estadístico del gen Actina, tanto para la concentración de 2mM con un valor de $p=0,009$, como para la concentración de 5mM con un valor de $p=0,004$, rechaza la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas entre los grupos experimentales y el grupo control. El rechazo de la hipótesis nula para la concentración de 2mM corresponde a una disminución paulatina en la acumulación de transcritos de HSP 70 a partir de las 2 horas de exposición al estrés. De igual manera para la concentración de 5mM el rechazo de la hipótesis nula corresponde a un ligero incremento en la acumulación de transcritos a las 2 horas, seguido de una disminución considerable a las 6 horas, la cual se mantuvo en similares condiciones a las 24 horas de exposición al estrés.

Dicho análisis estadístico determinó que el gen ARNr 28S, debido a su mayor estabilidad para el presente proyecto ($p=0,094$ para la concentración de 5mM, y $p=0,031$ para la concentración de 2mM), en comparación al gen Actina ($p=0,004$ para la concentración de 5mM, y $p=0,009$ para la concentración de 2mM), será empleado como gen control para la normalización de los genes diferencialmente expresados.

Corroboración del gen control ARNr 28S para las muestras individuales

Posterior a la determinación del gen control para la normalización de los datos de la cuantificación relativa de los ARNm de los genes experimentales HSP 70 y MT. Se efectuó la corroboración de dicho control en las muestras individuales, para determinar la eficiencia del gen ARNr 28S como estándar interno de la evaluación cuantitativa para el presente proyecto.

Validación del gen ARNr 28S para las muestras Individuales

ARNr 28S 2mM

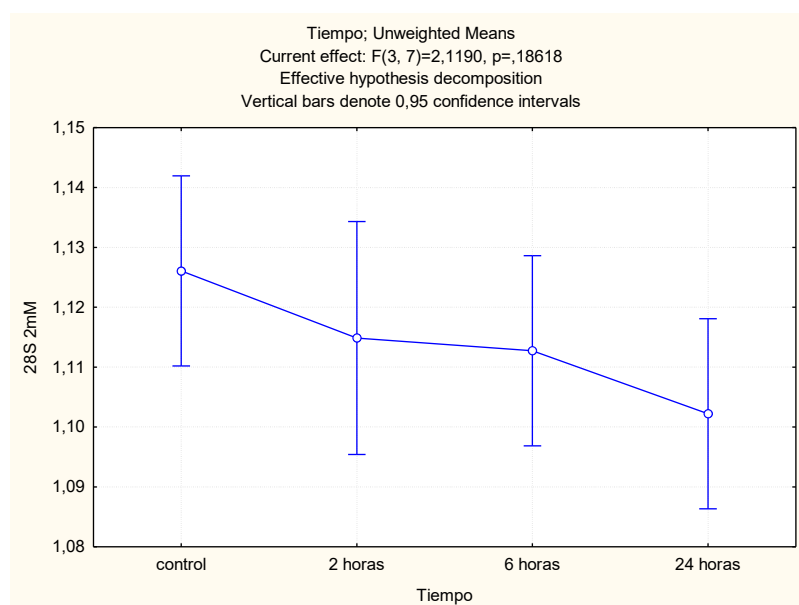


Gráfico 5: Diferencia en los valores de las medias del grupo control y los grupos experimentales del gen ARNr 28S para la concentración de 2mM de CdCl₂ en las muestras individuales

Gráfico que demuestra la diferencia de medias y las varianzas existentes en el grupo control y los tiempos de exposición al estrés (grupos experimentales), para el gen ARNr 28S (individuales) en la concentración de 2mM de CdCl₂. (Fuente: Elaborado por el Autor).

El análisis de comparación de medias por el método de Tuckey para el gen ARNr 28S (Individual 2mM), demuestra que no se presentan diferencias significativas entre horas de exposición al estrés en relación al grupo control. (Véase ANEXO A, Tabla XIII).

ARNr 28S 5mM

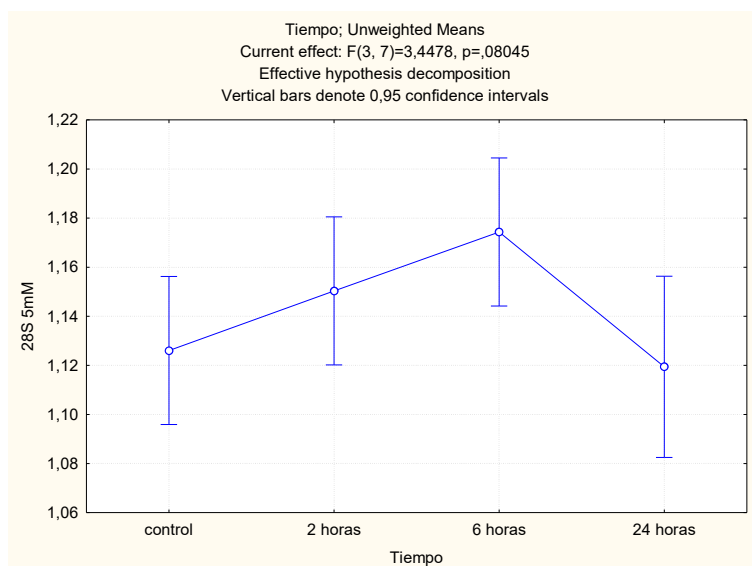


Gráfico 6: Diferencia en los valores de las medias del grupo control y los grupos experimentales del gen ARNr 28S para la concentración de 5mM de las muestras individuales

Gráfico que demuestra la diferencia de medias y las varianzas existentes en el grupo control y los tiempos de exposición al estrés (grupos experimentales), para el gen ARNr 28S (individuales) en la concentración de 5mM de CdCl_2 . (Fuente: Elaborado por el Autor).

El análisis de comparación de medias por el método de Tuckey para el gen ARNr 28S (Individual 5mM), demuestra que no se presentan diferencias significativas entre horas de exposición al estrés, en relación al grupo control. (Véase ANEXO A, Tabla XIV).

El análisis estadístico para el gen ARNr 28S (individuales), tanto en la concentración de 2mM, con un valor de $p=0,186$, como en la concentración de 5mM con un valor de $p=0,08$, acepta la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas entre los niveles de expresión transcripcional durante los diferentes tiempos de exposición al estrés con cadmio en contraste con los niveles de expresión transcripcional del grupo control. La aceptación de la hipótesis nula para la concentración de 2mM corresponde a una ligera disminución paulatina en la acumulación de transcritos de ARNr 28S (individuales) a partir de las 2 horas de exposición al estrés. De igual manera para la concentración de 5mM la aceptación de la hipótesis nula corresponde a un ligero incremento en la acumulación de transcritos a partir de las 2 horas de exposición al estrés, presentando una ligera disminución a las 24 horas de exposición al estrés.

Cuantificación de la expresión de los genes de estrés HSP 70 y MT

Una vez efectuada la validación del gen control del experimento, se procedió a emplear el método doble delta Ct para los genes experimentales HSP 70 (99bp y 500bp) y el gen MT (292 bp). Los resultados obtenidos de este método, debido al incumplimiento de las asunciones de ANOVA, fueron transformados con la función “Log10” y sumados con una constante “1”. Las asunciones de ANOVA no cumplidas, previo a la transformación, para el gen HSP 70 correspondieron, en la concentración de 2mM para el amplicón de 99bp, a la distribución normal de la población y homogeneidad de varianzas. Mientras que en la concentración de 5mM, para el amplicón de 99 bp, correspondió a la homogeneidad de varianzas. Posterior a la transformación de los datos del método Doble Delta Ct, las asunciones de ANOVA no cumplidas, disminuyeron sólo a la homogeneidad de varianzas para el amplicón de HSP 70 (99 bp) en la concentración de 5mM.

Cuantificación relativa de los niveles de expresión transcripcional del gen de estrés Proteína de Estrés Térmico 70 (HSP 70)

Medición de los niveles de expresión relativa del gen HSP 70 (99bp)

HSP 70 (99 bp) 2mM

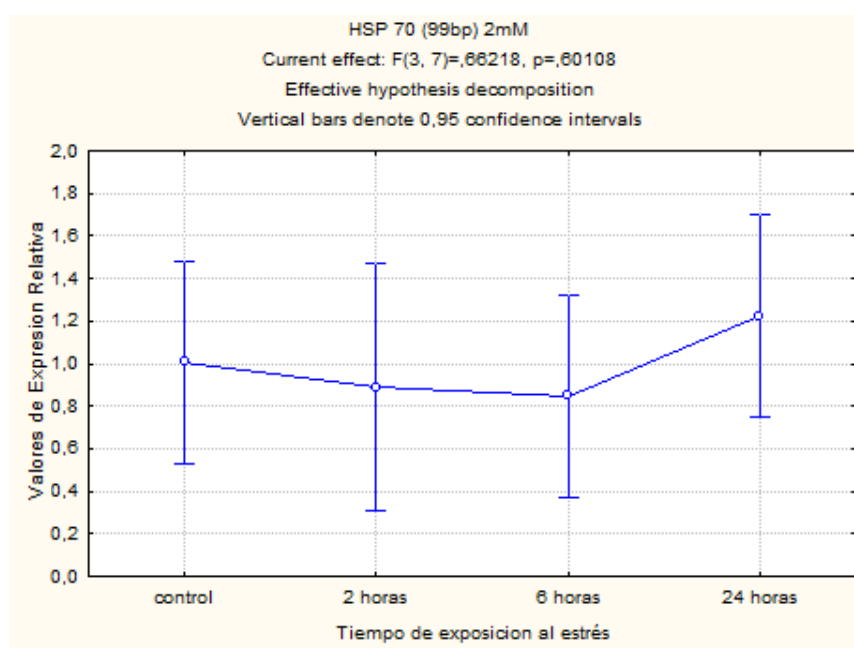


Gráfico 7: Diferencia en los valores de expresión relativa del grupo control y los grupos experimentales del gen HSP 70 (99 bp) normalizado con el gen ARNr 28S, para la concentración de 2mM de CdCl₂ para las muestras individuales.

Gráfico que demuestra la diferencia de medias y las varianzas existentes en el grupo control y los tiempos de exposición al estrés (grupos experimentales), para el gen HSP 70 (99 bp) normalizado con el gen ARN 28S (gen control) en la concentración de 2mM de CdCl₂. (Fuente: Elaborado por el Autor).

El análisis de comparación de medias, efectuado por el método de Tuckey para el gen HSP 70 (99 bp), normalizado con el gen control ARNr 28S para la concentración de 2mM, demuestra que no se presentan diferencias significativas entre los tiempos de exposición al estrés en relación al grupo control. (Véase ANEXO A, Tabla XV).

El ANOVA de 1 vía para el gen HSP 70 (99 bp) en la concentración de 5mM de CdCl₂, no se pudo llevar a cabo debido a que los datos no cumplen con la asunción de homogeneidad de varianzas. (Véase ANEXO A, Tabla XVI). De esta manera, el análisis estadístico de Homogeneidad de Varianzas por el método de Barlett-Cochran, con un valor de $p=0,024$ nos indica que se rechaza la hipótesis nula de que existe Homogeneidad de Varianzas en la Población.

El análisis estadístico de comparación de medias del HSP 70 (99 bp) para la concentración de 2mM con un valor de $p=0,601$, acepta la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas entre los grupos experimentales y el grupo control. La aceptación de la hipótesis nula para la concentración de 2mM obedece a que los niveles de acumulación de transcritos de ARNm HSP 70 (99bp) durante las 2 y 6 horas de exposición son similares al grupo control, mientras que los mismos presentan un ligero aumento en su acumulación a las 24 horas de exposición al estrés con CdCl₂.

Medición de los niveles de expresión relativa del gen HSP 70 (500bp)

HSP 70 (500 bp) 2mM

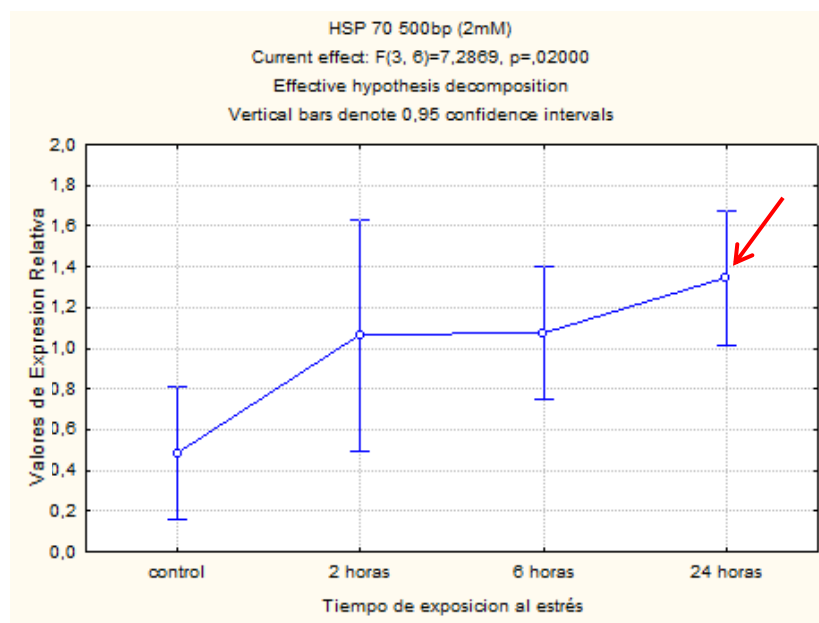


Gráfico 8: Diferencia en los valores de expresión relativa del grupo control y los grupos experimentales del gen HSP 70 (500 bp) normalizado con el gen ARNr 28S, para la concentración de 2mM de CdCl_2 para las muestras individuales

Gráfico que demuestra la diferencia de medias y las varianzas existentes en el grupo control y los tiempos de exposición al estrés (grupos experimentales), para el gen HSP 70 (500 bp) normalizado con el gen ARNr 28S (gen control) en la concentración de 2mM de CdCl_2 . (Fuente: Elaborado por el Autor).

El análisis de comparación de medias, efectuado por el método de Tuckey, para el gen HSP 70 (500 bp) normalizado con el gen ARNr 28S para la concentración de 2mM, demuestra que se presentan diferencias significativas entre las 24 horas de exposición al estrés en relación a las 2 horas, 6 horas, y al grupo control. (Véase ANEXO A, Tabla XVII).

HSP 70 (500 bp) 5mM

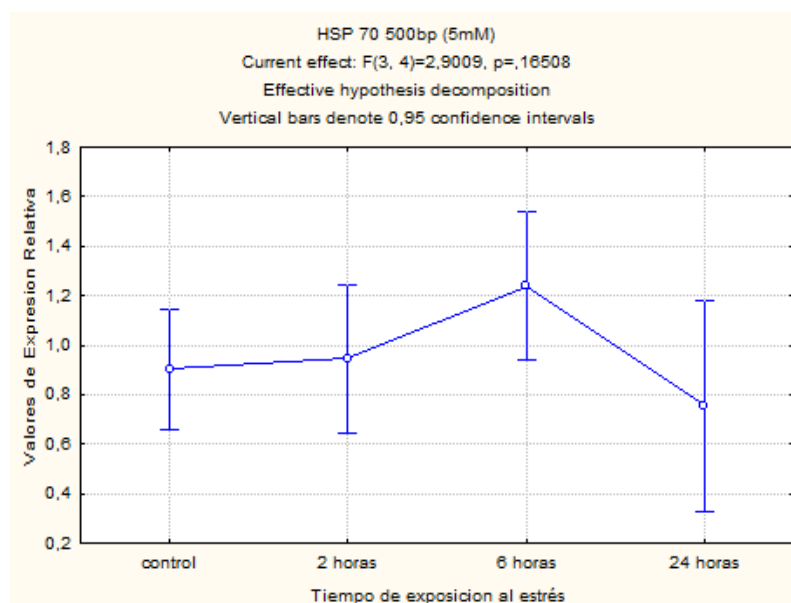


Gráfico 9: Diferencia en los valores de expresión relativa del grupo control y los grupos experimentales del gen HSP 70 (500 bp) normalizado con el gen ARNr 28S, para la concentración de 5mM de CdCl₂ para las muestras individuales.

Gráfico que demuestra la diferencia de medias y las varianzas existentes en el grupo control y los tiempos de exposición al estrés (grupos experimentales), para el gen HSP 70 (500 bp) normalizado con el gen ARNr 28S (gen control) en la concentración de 5mM de CdCl₂. (Fuente: Elaborado por el Autor).

El análisis de comparación de medias, llevado a cabo por el método de Tuckey, para el gen HSP 70 (500 bp), normalizado con el gen control ARNr 28S para la concentración de 5mM, demuestra que no se presentan diferencias significativas entre los tiempos de exposición en relación al grupo control. (Véase ANEXO A, Tabla XVIII).

El análisis estadístico del gen experimental HSP 70 (500 bp), normalizado con el gen ARNr 28S para la concentración de 2mM con un valor de $p=0,02$, rechaza la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas entre los grupos experimentales y el grupo control. Por otra parte, para la concentración de 5mM con un valor de $p=0,165$ se acepta la hipótesis nula.

El rechazo de la hipótesis nula para la concentración de 2mM corresponde a un incremento en la acumulación de transcritos de HSP 70 (99 bp) a partir de las 24 horas de exposición al estrés en relación al grupo control, a las 2 y 6 horas de exposición al estrés, debido a que la acumulación de transcritos a corto plazo (2 y 6 horas) presentan niveles similares al observado en el grupo control. Subsecuentemente, para la concentración de 5mM la aceptación de la hipótesis nula obedece a que los niveles de acumulación de transcritos a las 2 y 24 horas de exposición al estrés son similares a los observados para el grupo control, mientras que durante las 6 horas de exposición al estrés, dichos niveles de acumulación presentan un ligero aumento en relación a los antes mencionados.

Medición de los niveles de expresión transcripcional del gen MT (292bp)

MT (292 bp) 2mM

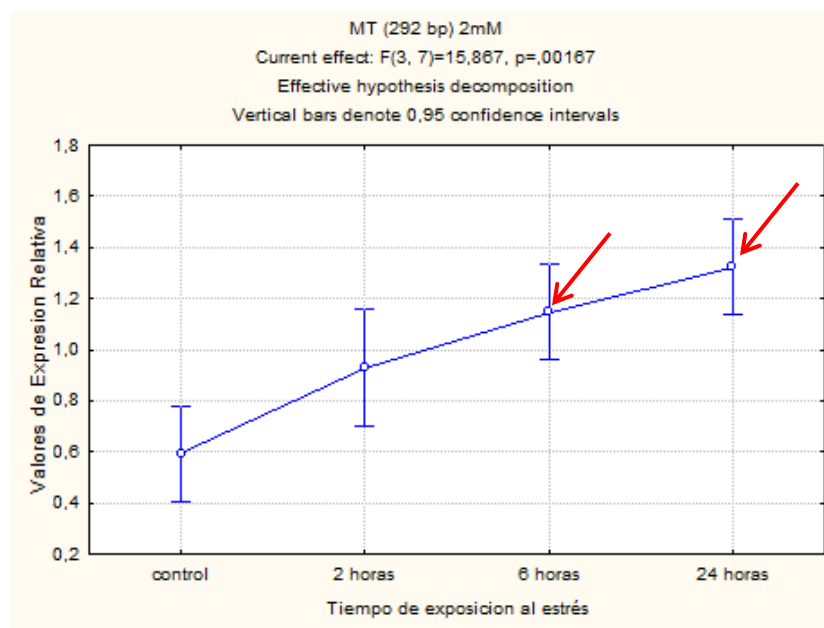


Gráfico 10: Diferencia en los valores de expresión relativa del grupo control y los grupos experimentales del gen MT (292 bp) normalizado con el gen ARNr 28S, para la concentración de 2mM de CdCl₂ en las muestras individuales.

Gráfico que demuestra la diferencia de medias y las varianzas existentes en el grupo control y los tiempos de exposición al estrés (grupos experimentales), para el gen MT (292 bp) normalizado con el gen ARNr 28S (gen control) en la concentración de 2mM de CdCl₂. (Fuente: Elaborado por el Autor).

El análisis de comparación de medias efectuado por el método de Tuckey para el gen MT (292 bp), normalizado con el gen control ARNr 28S para la concentración de 2mM, demuestra que se presentan diferencias significativas durante las 6 y 24 horas de exposición al estrés en relación a las 2 horas y al grupo control. (Véase ANEXO A, Tabla XIV).

MT (292 bp) 5mM

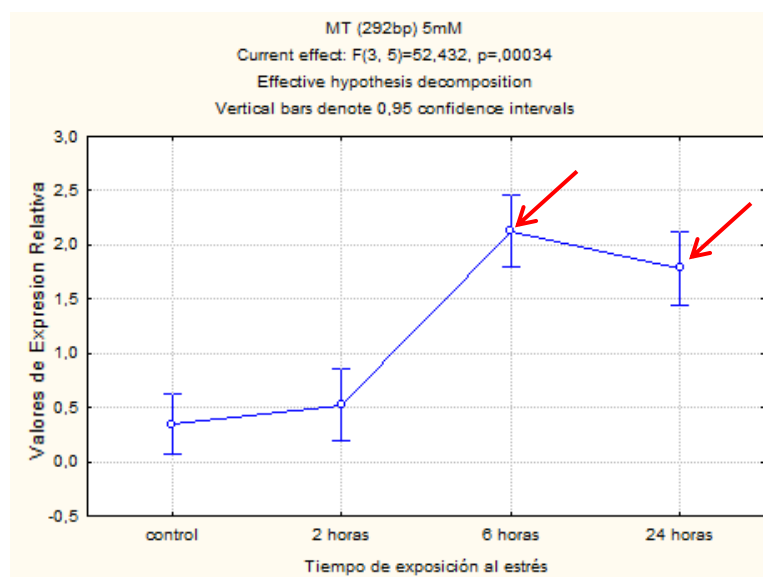


Gráfico 11: Diferencia en los valores de expresión relativa del grupo control y los grupos experimentales del gen MT (292 bp) normalizado con el gen ARNr 28S, para la concentración de 5mM de CdCl₂ en las muestras individuales.

Gráfico que demuestra la diferencia de medias y las varianzas existentes en el grupo control y los tiempos de exposición al estrés (grupos experimentales), para el gen MT (292 bp) normalizado con el gen ARNr 28S (gen control) en la concentración de 5mM de CdCl₂. (Fuente: Elaborado por el Autor).

El análisis de comparación de medias por el método de Tuckey para el gen MT (292 bp), normalizado con el gen control ARNr 28S para la concentración de 5mM, demuestra que se presentan diferencias significativas durante las 6 y 24 horas de exposición al estrés, en relación a las 2 horas y al grupo control. (Véase ANEXO A, Tabla XX).

El análisis estadístico efectuado para el gen experimental MT (292 bp), normalizado con el gen ARNr 28S (control del experimento) denota que, tanto

para la concentración de 2mM con un valor de $p=0,00167$, como para la concentración de 5mM con un valor de $p=0,00034$; la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas entre los grupos experimentales y el grupo control es rechazada. El rechazo de la hipótesis nula para ambas concentraciones (2mM y 5mM de CdCl_2), obedecen a un aumento significativo en la acumulación de transcritos de MT (292bp) a partir de las 6 horas de exposición al estrés, niveles que para la concentración de 2mM aumentan progresivamente hasta las 24 horas, mientras que, para la concentración de 5mM, dichos niveles tienden a disminuir ligeramente a las 24 horas de exposición al estrés con CdCl_2 .



Gráfico 12: Grafico de barras de los valores de expresión relativa de los genes experimentales HSP 70 (99bp y 500bp) y MT (292bp), para las diferentes concentraciones (2mM y 5mM) de CdCl_2 .

Gráfico que demuestra la diferencia en la acumulación de transcritos, entre el grupo control y los tiempos de exposición al estrés, de los genes experimentales evaluados con el gen control ARNr28S para 5mM y 2mM de CdCl_2 . (Fuente: Elaborado por el Autor).

CAPITULO IV

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos referentes a la determinación del gen control considerado como estándar interno de la cuantificación relativa de genes diferencialmente expresados en las diferentes concentraciones de CdCl₂, denotan que, para el gen Actina, pese a ser comúnmente usado como control interno para normalizar datos de estudio de expresión de genes (54), evidencia una disminución significativa en la acumulación de transcritos de ARNm a partir de las 6 horas de exposición al estrés con CdCl₂, comprobada por medio de la comparación de medias por el Método de Tukey.

Dichos resultados nos permiten inferir que hubo una alteración fisiológica en el erizo de mar Antártico a causa de la presencia de metales pesados, lo cual se podría explicar debido a la relación funcional que posee la Actina con el citoesqueleto celular (47), principalmente para el movimiento interno de los contenidos celulares que permiten llevar a cabo eventos metabólicos requeridos por el organismo.

Por el contrario, el efecto de ambas concentraciones de CdCl_2 en la acumulación de transcritos de ARNm del gen ARNr 28S, evidencia no presentar diferencias significativas. Los niveles de expresión transcripcional del gen ARNr 28S se ven afectados a partir de las 6 horas de exposición al estrés, denotando para la concentración de 2mM una disminución en la acumulación de transcritos, mientras que para la concentración de 5mM existe un aumento en la acumulación de transcritos, el mismo que disminuye en ambas concentraciones a las 24 horas de exposición al estrés. Dichos resultados evidencian similar tendencia en la acumulación de transcritos para las muestras Individuales y muestras del POOL Genético. Finalmente, basado en el análisis expuesto anteriormente, se determina al gen ARNr 28S como “gen control” para la normalización de los niveles de expresión de genes diferencialmente expresados del presente proyecto, pese a sufrir ligeras modificaciones en los niveles de acumulación de transcritos principalmente a las 6 horas de exposición al estrés;

proceso que también ocurre en células de respuesta inmune, celomocitos, del *S. neumayeri* ante situaciones similares de estrés con CdCl₂ (2).

En lo concerniente a los genes experimentales, se obtuvo para el presente proyecto que los resultados de los análisis del gen HSP 70 (99bp), evidencian un ligero incremento en la acumulación de ARNm transcrito de HSP 70 luego de 24 horas de exposición para la concentración de 2mM de CdCl₂, comprobado por medio de la comparación de medias por el método de Tukey. De igual manera, los resultados de los análisis del gen HSP 70 (500bp) para la concentración de 2mM evidencian un aumento en la acumulación de transcritos a las 24 horas, presentando diferencias significativas; mientras que para la concentración de 5mM no se evidencian diferencias significativas.

La variación en ambos resultados, concerniente al análisis del gen HSP 70, puede obedecer a la sensibilidad de la técnica de RT-PCR en Tiempo Real empleada para la medición de la expresión transcripcional de los genes; la misma que aumenta considerablemente en amplicones de menor tamaño (55). Teniendo como resultado que, para evidenciar diferencias significativas en el amplicón de 99bp, los niveles de acumulación de transcritos deberían ser mayores que para el amplicón de 500bp.

Adicionalmente, sabiendo que las HSP 70 son inducibles en otros animales marinos como mecanismo universal de supervivencia, exceptuando especies de peces Antárticos, (49, 50, 51), y otros organismos donde su forma de expresión ha sido alterada de inducible a constitutiva (51, 52), proceso similar a lo que ocurriría en invertebrados marinos Antárticos como la estrella de mar (*Odontaster validus*) y el crustáceo (*Paracedarocus gibber*), podría explicar por qué la HSP 70 en el *S. neumayeri* no sería inducible por calor, (56), pero sí podría ser inducida por estrés a causa de metales pesados (CdCl_2).

De esta manera, como se demostró en el presente proyecto, este compuesto que podría ser considerado agente inductor de diversas situaciones de estrés, debido a los cambios metabólicos que genera en las células, referente al aumento de los niveles de expresión de HSP 70; podría servir como punto de partida a futuras investigaciones en el erizo de mar Antártico, empleando diversos compuestos que denotan otras formas de visualizar la inducibilidad de las HSP 70 ante diferentes situaciones de estrés.

Compuestos que podrían ser considerados para determinar la inducibilidad de HSP 70 en el *S. neumayeri* podrían ser: inhibidor del proteasoma MG 132, compuesto que induce la producción de HSP 70 en experimentos en ratones in vitro e in vivo, como protección de los condrocitos al daño celular (57); o secreciones del nemátodo *T. spiralis*; las mismas que causan un

incremento en los niveles de HSP 70 en células de riñón canino Madin-Darby (58). Éstos y otros compuestos podrían ser empleados como agentes determinantes de diferentes condiciones de estrés en el erizo de mar Antártico; contrastando sus resultados con los obtenidos en experimentos con metales pesados y temperatura.

Adicionalmente, infiriendo que contrario al calor, el frío extremo del continente Antártico pueda ser considerado como factor detonante y regulador en la producción de niveles determinados de proteínas de estrés térmico para aumentar la tolerancia a esta condición única de vida. Tanto la presencia de microorganismos patógenos, metales pesados y condiciones de frío extremo en el cual estos organismos estenotermos desarrollan sus actividades celulares y moleculares (-1.8°C y 2°C); son posibles factores causantes de alteración en la inducción de estos tipos de proteínas para hacer frente a dichas condiciones (56).

De igual manera, por medio del presente proyecto podemos corroborar que la posible proteína HSP 70 del erizo de mar Antártico conserva similares funciones a las evidenciadas en otras especies, por ejemplo, los moluscos *Laternula elliptica* y *Nacella concinna*, especies en las cuales estudios sobre sus modificaciones funcionales a causa de los cambios de marea y experimentos con estrés térmico, produjeron variación en los niveles de expresión de HSP 70;

quedando demostrado que, para estas especies, el incremento en los niveles de expresión de dichas proteínas son respuesta a múltiples factores de estrés, permitiéndoles incrementar su tolerancia a los ambientes extremos (49, 50, 51).

Basado en los resultados obtenidos, podemos indicar que, el cadmio podría ser considerado un factor de estrés que induce a incrementos significativos en los niveles de expresión de HSP 70; evidenciando así que la HSP 70 del *S. neumayeri* podría cumplir su rol como proteína chaperona en la síntesis y mediación de la respuesta de otras proteínas como la MT en situaciones de estrés ambiental (13).

El análisis de los resultados del gen de Metalotioneína del *S. neumayeri*, denota que para las diferentes concentraciones experimentales se evidencia un aumento significativo en la acumulación de transcritos de ARNm a partir de las 6 horas de exposición al estrés con CdCl_2 , comprobada por medio de la comparación de medias por el Método de Tukey. Por este motivo fue posible determinar la presencia de un estrés fisiológico a corto plazo en el erizo de mar Antártico a causa de un metal pesado (CdCl_2).

Dicha inducción significativa se evidencia en similar manera en el protozoo ciliado Antártico, *Tetrahymena thermophila*, en quien se han caracterizado varias MTs que ayudan en los procesos de detoxificación celular. Dichas metalotioneínas son semejantes en función a las de otras especies como

M. musculus, pero difieren en estructura, siendo la mayor diferencia la carencia de intrones (59); intrones que son propios de las MTs y que evidencian mayor heterogeneidad en invertebrados (60, 61). Este hecho, permite inferir que el comportamiento de la MT del *S. neumayeri* es concomitante con la función de MT en otras especies en donde se encuentra involucrada en los procesos de detoxificación (14, 15). Respecto del erizo de mar Antártico es una primera validación de la expresión de este gen asociado a la función que se le conoce como secuestrador de metales pesados.

Desde el punto de vista fisiológico, también podemos inferir que la probable proteína MT del erizo de mar antártico al poseer perfiles de expresión análogos a las MT de otras especies, denotan que sus funciones también se encuentren relacionadas con las de otras especies, pudiendo ser una de éstas, el mantenimiento de la homeostasis celular a través de la regulación y captación de metales pesados libres en el medio circundante. (17).

De igual manera, por medio del análisis de los resultados de los genes diferencialmente expresados, podemos corroborar que el gen de Metalotioneína es “gatillado” por diversos factores de estrés, uno de los cuales puede ser la perturbación por cambios de temperatura o la presencia de iones de metales pesados (62).

También se puede inferir que el promotor del gen HSP 70 posiblemente se encuentre involucrado en la regulación de diversas rutas de respuesta intracelular ante condiciones de estrés (63), una de las cuales podría ser la regulación de la expresión del gen de Metalotioneína como mecanismo de manutención de la homeostasis celular en los procesos de detoxificación debido al estrés a causa de metales pesados (CdCl_2).

De esta manera, podríamos explicar la existencia de una relación intrínseca que mantenga a ambos genes de respuesta estudiados (HSP 70 y MT), como genes claves en el proceso de adaptación y tolerancia del erizo de mar Antártico a posibles cambios o perturbaciones del ecosistema. De igual forma, podríamos indicar que la relación conjunta de ambos genes, es clave para explicar la función mediadora de la proteína HSP 70, involucrada como “chaperona” en el modelaje y producción de proteínas de respuesta como la MT; y el aumento en la producción de MT producto de aumentos en los niveles de expresión de HSP 70 como resultado de cambios ecosistémicos.

Desde el punto de vista fisiológico, este particular nos permite inferir que el análisis de los niveles de expresión transcripcional de los genes HSP 70 y MT, permitirían emplear al Erizo de Mar Antártico como evaluador de primeros niveles de contaminación a causa de metales pesados en el continente Antártico.

RECOMENDACIONES

1. Se recomienda dar continuidad a este trabajo obteniendo un mayor tiempo de estrés para poder determinar con mayor exactitud la tendencia en la expresión transcripcional de los genes experimentales de MT y HSP70.
2. Con el fin de complementar la información generada en el presente trabajo, sería interesante efectuar una medición de los niveles de expresión protéica tanto de MT como de HSP 70 ante las mismas situaciones de estrés.
3. El presente trabajo nos mostró que el tejido empleado para efectuar los análisis de los niveles de expresión transcripcional de los genes de MT y HSP70 funciona de manera adecuada para la determinación de los mismos. Sin embargo, es recomendable efectuar una medición de estos niveles en los celomocitos (células de respuesta del erizo de mar), para de

esta manera poder determinar la presencia de contaminantes en el medio sin necesidad de sacrificar a los ejemplares obtenidos.

4. En base a los resultados obtenidos, se recomienda profundizar más en el estudio de la genómica y proteómica en tejidos y células del erizo de mar Antártico para de esta manera lograr obtener una especie clave del ecosistema Antártico que sirva como bioindicador de los primeros niveles de contaminación marina a causa de metales pesados.
5. También se recomienda generar un banco de cDNA diferencial del erizo de mar Antártico con el fin de poder determinar la presencia de nuevas moléculas o probables moléculas ya descubiertas que mantengan una relación con la respuesta de estos invertebrados ante diferentes condiciones de estrés ambiental.
6. Además, se recomienda continuar con investigaciones en otros organismos claves del ecosistema Antártico para que así, a través del análisis de diversas especies; sea factible conocer el estado general de dicho ecosistema y sus variaciones a causa de fenómenos naturales y acción antrópica.

CONCLUSIONES

1. El gen ARNr 28S, debido a su mayor estabilidad en los niveles de expresión transcripcional comparado con el gen Actina, fue empleado como estándar interno para la evaluación cuantitativa del estado fisiológico del Erizo de Mar Antártico *Sterechinus neumayeri*.
2. La expresión transcripcional de los genes experimentales analizados (HSP 70 y MT), denota que el aumento en la expresión transcripcional a causa de la exposición a CdCl_2 no es directamente proporcional a la concentración empleada. Adicionalmente, el análisis de los niveles de expresión transcripcional de los genes empleados nos permiten corroborar que la exposición a CdCl_2 causa en efecto un estrés fisiológico al *Sterechinus neumayeri*, pudiendo afectar el funcionamiento celular del erizo de mar Antártico.

3. Los cambios en la expresión transcripcional del gen hsp70 en el Erizo de Mar Antártico, son similares a los perfiles de expresión de transcritos de HSP 70 en otras especies sometidas a desafíos de estrés de distintos tipos. Este particular corrobora que la probable proteína HSP 70 del erizo de mar antártico comparte además similares funciones que las HSP de otras especies. Así, una de sus funciones podría estar implicada en la regulación y participación en los procesos de síntesis de proteínas de respuesta al estrés fisiológico a causa de metales pesados (CdCl₂).
4. Sabiendo que las HSP 70 en diversos organismos son inducibles por calor como mecanismo de supervivencia, y que de igual manera, en otros organismos su forma de expresión se ha visto alterada de inducible a constitutiva; los resultados del presente proyecto, en conjunto con experimentos de estrés térmico efectuados en el *S. neumayeri*, permiten evaluar la posibilidad de que dicha alteración también haya ocurrido en estos invertebrados marinos.
5. Los cambios evidenciados en la acumulación de transcritos de ARNm de MT de erizo de mar Antártico, son análogos con el perfil de expresión de MT caracterizados en otras especies. Este hecho, permite afirmar que el comportamiento de la MT del Erizo de Mar Antártico es concomitante con la

función de MT en otras especies en donde se encuentra involucrada en los procesos de detoxificación.

6. Las posibles proteínas MT y HSP 70, serían inducibles por contaminación a causa de metales pesados (CdCl_2). La MT será inducible a corto plazo y la HSP 70 a largo plazo, lo cual podría corroborar la función de las HSP 70 como proteínas chaperonas en la regulación post-traducciona l de proteínas de respuesta. Adicionalmente, se puede inferir que las HSP 70 intervienen junto con las MT en los procesos de respuesta ante la presente condición de estrés.
7. Con los resultados obtenidos en el presente proyecto, queda evidenciado por primera vez que efectivamente el gen de Metalotioneína en el erizo de mar Antártico es inducido por la presencia de Cadmio, como factor de estrés.
8. Tanto el gen de HSP70 como el gen MT, son buenos genes de referencia, siendo el gen de MT el más efectivo en indicar la presencia de CdCl_2 en el medio circundante del Erizo de Mar Antártico, *S. neumayeri*. De igual manera, el estudio de sus proteínas codificantes podrían convertir a este organismo en una especie bioindicadora de los primeros niveles de contaminación ambiental por metales pesados (CdCl_2) en la Antártida.

ANEXOS

ANEXO A

Tablas

TABLA I. Clasificación de Metales Pesados: Esenciales y No Esenciales

	Esencial		Tóxico		F. dominante en el suelo
	Vegetal	Animal	Vegetal	Animal	
As	NO	NO	SI	SI	AsO_4^{-3}
Cd	NO	NO	SI	SI	Cd^{2+}
Cr	NO	SI	NO	NO	Cr^{3+} , CrO_4^{2-}
Cu	SI	SI	SI	SI	Cu^{2+}
Hg	NO	NO	SI	SI	Hg^{2+} , $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$
Mo	SI	SI	SI	SI	MoO_4^{2-}
Ni	SI	SI	SI	NO	Ni^{2+}
Pb	NO	NO	SI	SI	Pb^{2+}
Se	NO	NO	SI	SI	SeO_4^{2-}
Zn	SI	SI	SI	SI	Zn^{2+}
Co	SI	SI	NO	NO	Co^{2+}
Sn	NO	NO	NO	SI	Sn^{4+}

Fuente: Boixadera J., M. Teira. (2001), Aplicación Agrícola de Residuos Orgánicos. Disponible en <http://www.docstoc.com/docs/107571405/ALGUNAS-CONSIDERACIONES-SOBRE-LOS-METALES-PESADOS>

TABLA II. Cuantificación y medición de Pureza de muestras de ARN extraídas con el kit de E.Z.N.A.

RNA_1		260	280	Conc ng/μl	Ratio	Sample ID	ug/ul	1 ug
	A1	0,2412	0,1117	192,96	2,16	Esofago	0,19296	5,18242123
	A2	0,14550001	0,0681	116,4	2,14	Intestino	0,1164	8,59106529
	B1	0,0499	0,0257	39,92	1,94	Esofago	0,03992	25,0501002
	B2	0,08220001	0,0388	65,76	2,12	Intestino	0,06576	15,2068127
	C1	0,0936	0,0465	74,88	2,01	Celomocito	0,07488	13,3547009
	C2	0,0592	0,0274	47,36	2,16	Artemia	0,04736	21,1148649

Fuente: Autor

TABLA III. Cuantificación de concentración y pureza de muestras individuales obtenidas con el Kit de E.Z.N.A. para su transformación a cDNA

Para las muestras de intestino con un estrés de 5uM CdCl₂

RNA	Sample ID	260	280	Conc ng/μl	Ratio	ug/ul	1 ug
	I1 2h	0,0388	0,019	31,04	2,04	0,03104	32,2164948
	I2 2h	0,1129	0,054	90,32	2,09	0,09032	11,0717449
	I3 2h	0,15340001	0,0699	122,72	2,19	0,12272	8,14863103
	I4 2h	0,0239	0,0115	19,12	2,08	0,01912	52,3012552
	I1 6h	0,0342	0,017	27,36	2,01	0,02736	36,5497076
	I2 6h	0,0331	0,0158	26,48	2,09	0,02648	37,7643505
	I3 6h	0,0621	0,0276	49,68	2,25	0,04968	20,1288245
	I4 6h	0,055	0,0257	44	2,14	0,044	22,7272727
	I1 24h	0,0436	0,0227	34,88	1,92	0,03488	28,6697248
	I2 24h	0,15260001	0,0744	122,08	2,05	0,12208	8,19134993
	I3 24h	0,0876	0,0415	70,08	2,11	0,07008	14,2694064
	I4 24h	0,0613	0,0294	49,04	2,09	0,04904	20,3915171

Para las muestras de intestino con un estrés de 2uM CdCl₂

RNA_1	2uM Int	260	280	Conc ng/μl	Ratio	ug/ul	1 ug
	I1 2h	0,1668	0,0779	133,44	2,14	0,13344	7,4940048
	I2 2h	0,36299999	0,1699	290,4	2,14	0,2904	3,44352617
	I3 2h	0,69220002	0,3165	553,76	2,19	0,55376	1,80583646
	I4 2h	0,0948	0,04609999	75,84	2,06	0,07584	13,185654
	I1 6h	0,2788	0,1303	223,04	2,14	0,22304	4,48350072
	I2 6h	0,28149999	0,1336	225,2	2,11	0,2252	4,44049734
	I3 6h	0,30999999	0,143	248	2,17	0,248	4,03225806
	I4 6h	0,1409	0,0671	112,72	2,1	0,11272	8,8715401
	I1 24h	0,24159999	0,1129	193,28	2,14	0,19328	5,17384106
	I2 24h	0,1131	0,0528	90,48	2,14	0,09048	11,0521662
	I3 24h	0,3126	0,14459999	250,08	2,16	0,25008	3,99872041
	I4 24h	0,5008	0,23659999	400,64	2,12	0,40064	2,49600639

Fuente: Autor

TABLA IV. Cuantificación de concentración y pureza de muestras del “POOL Genético” para su transformación a cDNA

RNA_1	Sample ID	260	280	Conc ng/μl	Ratio	ug/ul	1 ug
	Control 1	1,06910001	0,49440002	855,28	2,16	0,85528	1,16920774
	Control 2	0,69930003	0,32310001	559,44	2,16	0,55944	1,78750179
	Control 3	0,4501	0,20680001	360,08	2,18	0,36008	2,77716063
	Mix control	0,73669999	0,33850001	589,36	2,18	0,58936	1,6967558
	mix 5uM 2h	0,0816	0,0392	65,28	2,08	0,06528	15,3186275
	mix 5uM 6h	0,042	0,0204	33,6	2,06	0,0336	29,7619048
	mix 5uM 24h	0,09180001	0,0454	73,44	2,02	0,07344	13,6165577
	mix 2uM 2h	0,3307	0,1543	264,56	2,14	0,26456	3,7798609
	mix 2uM 6h	0,24650001	0,1158	197,2	2,13	0,1972	5,07099391
	mix 2uM 24h	0,33479999	0,1556	267,84	2,15	0,26784	3,73357228

Fuente: Autor

TABLA V. Cálculos realizados para efectuar la RT-PCR de las muestras del “POOL Genético”.

	1ug	0.5ug	v. muestra (ul)	v. agua (ul)
mix control	1,7	0,85	0,9	9,1
mix 5mM 2 h	15,3	7,65	7,7	2,3
mix 5 mM 6 h	29,76	14,88	10,0	0
mix 5mM 24h	13,61	6,805	6,8	3,2
mix 2mM 2h	3,78	1,89	1,9	8,1
mix 2mM 6h	5,07	2,535	2,5	7,5
mix 2mM 24h	3,73	1,865	1,9	8,1

Fuente: Autor

TABLA VI. Resultados de la PCR en tiempo real de las muestras de ARN totales del POOL

Experiment	WellName	Dye	Array	WellType	Replicate	Threshold (dR)	Ct (dR)
1,ACTYMT	CONTROL	FAM	ACT	Calibrator	1	134.112	0
1,ACTYMT	52H	FAM	ACT	Unknown	2	134.112	24,55
1,ACTYMT	56H	FAM	ACT	Unknown	3	134.112	21,5
1,ACTYMT	524H	FAM	ACT	Unknown	4	134.112	21,32
1,ACTYMT	22H	FAM	ACT	Unknown	5	134.112	23,3
1,ACTYMT	26H	FAM	ACT	Unknown	6	134.112	18,5
1,ACTYMT	224H	FAM	ACT	Unknown	7	134.112	17,68
1,ACTYMT	CONTROL	FAM	MT	Calibrator	8	241.192	0
1,ACTYMT	52H	FAM	MT	Unknown	9	241.192	17,31
1,ACTYMT	56H	FAM	MT	Unknown	10	241.192	17,97
1,ACTYMT	524H	FAM	MT	Unknown	11	241.192	18,29
1,ACTYMT	22H	FAM	MT	Unknown	12	241.192	15,95
1,ACTYMT	26H	FAM	MT	Unknown	13	241.192	15,51
1,ACTYMT	224H	FAM	MT	Unknown	14	241.192	15,71
2,cadmia5 y 2,	control	FAM	MT	Calibrator	1	241.192	19,63
2,cadmia5 y 2,	52h	FAM	MT	Unknown	2	241.192	20,96
2,cadmia5 y 2,	56h	FAM	MT	Unknown	3	241.192	19,84
2,cadmia5 y 2,	524h	FAM	MT	Unknown	4	241.192	19,03
2,cadmia5 y 2,	22h	FAM	MT	Unknown	5	241.192	20,36
2,cadmia5 y 2,	26h	FAM	MT	Unknown	6	241.192	18,72
2,cadmia5 y 2,	224h	FAM	MT	Unknown	7	241.192	19
3,HSP y 28r exp 2	CONTROL	FAM	HSP	Calibrator	1	126.037	0
3,HSP y 28r exp 2	52H	FAM	HSP	Unknown	2	126.037	24,3
3,HSP y 28r exp 2	56H	FAM	HSP	Unknown	3	126.037	25,06
3,HSP y 28r exp 2	524H	FAM	HSP	Unknown	4	126.037	24,88
3,HSP y 28r exp 2	22H	FAM	HSP	Unknown	5	126.037	22,45
3,HSP y 28r exp 2	26H	FAM	HSP	Unknown	6	126.037	22,68
3,HSP y 28r exp 2	224H	FAM	HSP	Unknown	7	126.037	22,59
3,HSP y 28r exp 2	CONTROL	FAM	28S	Calibrator	8	399.645	0
3,HSP y 28r exp 2	52H	FAM	28S	Unknown	9	399.645	13,45
3,HSP y 28r exp 2	56H	FAM	28S	Unknown	10	399.645	15,4
3,HSP y 28r exp 2	524H	FAM	28S	Unknown	11	399.645	11,97
3,HSP y 28r exp 2	22H	FAM	28S	Unknown	12	399.645	12,37
3,HSP y 28r exp 2	26H	FAM	28S	Unknown	13	399.645	11,96
3,HSP y 28r exp 2	224H	FAM	28S	Unknown	14	399.645	10,67
4,HSP Y 28S	control	FAM	HSP	Calibrator	1	126.037	0
4,HSP Y 28S	52h	FAM	HSP	Unknown	2	126.037	25,06
4,HSP Y 28S	56h	FAM	HSP	Unknown	3	126.037	25,32
4,HSP Y 28S	524h	FAM	HSP	Unknown	4	126.037	25,41
4,HSP Y 28S	22h	FAM	HSP	Unknown	5	126.037	23,2
4,HSP Y 28S	26h	FAM	HSP	Unknown	6	126.037	22,81
4,HSP Y 28S	224h	FAM	HSP	Unknown	7	126.037	22,91
4,HSP Y 28S	control	FAM	28S	Calibrator	8	399.645	0
4,HSP Y 28S	52h	FAM	28S	Unknown	9	399.645	12,81
4,HSP Y 28S	56h	FAM	28S	Unknown	10	399.645	13,62
4,HSP Y 28S	524h	FAM	28S	Unknown	11	399.645	12,02
4,HSP Y 28S	22h	FAM	28S	Unknown	12	399.645	10,86
4,HSP Y 28S	26h	FAM	28S	Unknown	13	399.645	10,26
4,HSP Y 28S	224h	FAM	28S	Unknown	14	399.645	11,01

Fuente: Autor

Tabla VII. Resultados del método doble delta Ct para las muestras normalizadas con el gen 28S (2mM y 5mM)

Método Doble Delta Ct para la concentración 2mM

pool	Moyenne 28S	Hsp70 (500bp)	deltaCt	$\Delta\Delta Ct$	$2-\Delta\Delta Ct$	promedio	SD
control 1	13,05	33,13	20,09	2,24	0,21		
control 2	13,43	32,38	18,95	1,10	0,47		
control 3	13,26	32,17	18,91	1,06	0,48	0,39	0,1504358
2mM 2h1	14,34	33,31	18,98	1,13	0,46		
2mM 2h 2	13,03	31,69	18,66	0,81	0,57		
2mM 2h 3						0,51	0,0791008
2mM 6h 1	14,92	31,22	16,30	-1,55	2,93		
2mM 6h2	14,92	30,88	15,97	-1,88	3,69		
2mM 6h3		29,34				3,31	0,5411203
2mM 24h 1	12,80	29,31	16,51	-1,34	2,53		
2mM 24h 2	13,15	29,44	16,29	-1,56	2,96		
2mM 24 h 3		28,98				2,74	0,302081
			17,85				
pool	Moyenne 28S	mt	deltaCt	$\Delta\Delta Ct$	$2-\Delta\Delta Ct$	promedio	SD
control 1	13,05						
control 2	13,43	28,18	14,75	0,15	0,90		
control 3	13,26	27,43	14,18	-0,43	1,34	1,12	0,5750293
2mM 2h1	14,34	30,58	16,25	1,64	0,32		
2mM 2h 2	13,03	29,40	16,37	1,76	0,29		
2mM 2h 3		30,58				0,31	0,0180608
2mM 6h 1	14,92	27,91	12,99	-1,61	3,06		
2mM 6h2	14,92	27,81	12,90	-1,71	3,26		
2mM 6h3						3,16	0,1470436
2mM 24h 1	12,80	27,44	14,64	0,04	0,97		
2mM 24h 2	13,15	27,90	14,75	0,15	0,90		
2mM 24 h 3		28,34				0,94	0,0505344
			14,60				
pool	Moyenne 28S	Hsp70 (100bp)	deltaCt	$\Delta\Delta Ct$	$2-\Delta\Delta Ct$	promedio	SD
control 1	12,92						
control 2	13,33	26,24	12,92	1,50	0,35		
control 3	13,43	25,95	12,53	1,11	0,46	0,41	0,0775177
2mM 2h1	12,57	25,29	12,72	1,31	0,40		
2mM 2h 2	13,51	25,46	11,95	0,53	0,69		
2mM 2h 3						0,55	0,2033176
2mM 6h 1	12,82	23,64	10,83	-0,59	1,50		
2mM 6h2	12,11	23,10	10,99	-0,42	1,34		
2mM 6h3	12,26	23,22	10,96	-0,46	1,37	1,41	0,085908
2mM 24h 1	12,26	23,39	11,13	-0,28	1,22		
2mM 24h 2	12,84	23,32	10,48	-0,93	1,91		
2mM 24 h 3	12,87	22,52	9,65	-1,76	3,40	2,17	1,1128048
			11,41				

Método Doble Delta Ct para la concentración 5mM

pool	Moyenne 28S	Hsp70 (500bp)	deltaCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	promedio	SD
control 1	13,05	33,13	20,09	1,20	0,43		
control 2	13,43	32,38	18,95	0,07	0,95		
control 3	13,26	32,17	18,91	0,03	0,98	0,79	0,308141
5mM 2h1	14,34	32,08	17,75	-1,14	2,20		
5mM 2h 2	13,03	32,93	19,90	1,01	0,50		
5mM 2h 3						1,35	1,206598
5mM 6h 1	14,92	32,44	17,52	-1,36	2,57		
5mM 6h2	14,92	33,83	18,92	0,03	0,98		
5mM 6h3						1,78	1,128206
5mM 24h 1	12,80	32,41	19,61	0,73	0,60		
5mM 24h 2	13,15	31,47	18,32	-0,56	1,48		
5mM 24 h 3						1,04	0,61797
			18,88				
pool	Moyenne 28S	mt	deltaCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	promedio	SD
control 1	13,05						
control 2	13,43	28,18	14,75	2,64	0,16		
control 3	13,26	27,43	14,18	2,06	0,24	0,49	0,055669
5mM 2h1	14,34	25,79	11,46	-0,66	1,58		
5mM 2h 2	13,03	27,81	14,78	2,67	0,16		
5mM 2h 3						0,86	1,00449
5mM 6h 1	14,92	25,35	10,43	-1,68	3,21		
5mM 6h2	14,92	24,87	9,96	-2,16	4,46		
5mM 6h3						3,81	0,88538
5mM 24h 1	12,80	23,85	11,05	-1,06	2,09		
5mM 24h 2	13,15	23,46	10,31	-1,80	3,49		
5mM 24 h 3						2,77	0,990162
			12,11				
pool	Moyenne 28S	Hsp70 (100bp)	deltaCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	promedio	SD
control 1	13,17						
control 2	13,54	26,24	12,71	2,39	0,19		
control 3	13,30	25,95	12,65	2,33	0,20	0,19	0,00525
5mM 2h1	13,87						
5mM 2h 2	12,95	24,93	11,99	1,67	0,31		
5mM 2h 3						0,31	#DIV/0!
5mM 6h 1	15,19	22,30	7,11	-3,21	9,24		
5mM 6h2	15,01						
5mM 6h3	14,89	22,30	7,41	-2,91	7,53	8,38	1,207628
5mM 24h 1	13,15	23,62	10,47	0,15	0,90		
5mM 24h 2	13,57	23,47	9,90	-0,42	1,34		
5mM 24 h 3						1,12	0,305958
			10,32				

Tabla VIII. Resultados de la Transformación de las muestras normalizadas por el método Doble Delta Ct (2mM y 5mM).

Transformación de las muestras 2mM

	Log 10			(+) Constante		
	hsp500bp	hsp 100bp	mt	hsp500bp	hsp 100bp	mt
control	-0,5360843	-0,4089354	-0,4089354	0,46391575	0,59106461	0,59106461
control	-0,3903356	-0,455932	-0,455932	0,60966444	0,54406804	0,54406804
control	-0,6258915	-0,3565473	-0,3565473	0,37410847	0,64345268	0,64345268
2 horas		-0,0457575	-0,0457575		0,95424251	0,95424251
2 horas	0,06261424	-0,09691	-0,09691	1,06261424	0,90308999	0,90308999
2 horas						
6 horas	-0,3279021	0,18752072	0,18752072	0,67209786	1,18752072	1,18752072
6 horas	0,34830486	0,10037055	0,10037055	1,34830486	1,10037055	1,10037055
6 horas	0,20411998	0,14921911	0,14921911	1,20411998	1,14921911	1,14921911
24 horas	0,20411998	0,09691001	0,09691001	1,20411998	1,09691001	1,09691001
24 horas	0,34044411	0,29225607	0,29225607	1,34044411	1,29225607	1,29225607
24 horas	0,48713838	0,58433122	0,58433122	1,48713838	1,58433122	1,58433122

Transformación de las muestras 5mM

	Log 10			(+) Constante		
	hsp500bp	hsp 100bp	mt	hsp500bp	hsp 100bp	mt
control	-0,3307985	-0,7212464	-0,552842	0,66920148	0,2787536	0,44715803
control	0,0374265	-0,76955108	-0,6575773	1,0374265	0,23044892	0,34242268
control	0	-0,67778071	-0,7447275	1	0,32221929	0,25527251
2 horas		-0,19382003			0,80617997	
2 horas	-0,0555173	0,56466606	-0,6575773	0,94448267	1,56466606	0,34242268
2 horas	-0,0555173		-0,2924298	0,94448267		0,70757018
6 horas	0,31597035	0,5171959		1,31597035	1,5171959	
6 horas		0,46089784	0,99343623		1,46089784	1,99343623
6 horas	0,161368	0,55388303	1,26126287	1,161368	1,55388303	2,26126287
24 horas		-0,01322827	0,62634037		0,98677173	1,62634037
24 horas	-0,2441251	0,14612804		0,75587486	1,14612804	
24 horas			0,94546859			1,94546859

Tabla IX.- Comparación de Medias por el Método de Tuckey HSD, para el gen ARNr 28S del “POOL Genético” a la concentración de 2mM de CdCl₂.

Tukey HSD test; variable 2mM Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,06754, df = 4,0000					
Cell No.	Tiempo	{1}	{2}	{3}	{4}
		12,205	12,665	11,580	11,525
1	control		0,400939	0,217871	0,177957
2	2 horas	0,400939		0,046192	0,039303
3	6 horas	0,217871	0,046192		0,996160
4	24 horas	0,177957	0,039303	0,996160	

Tabla X.- Comparación de Medias por el Método de Tuckey HSD, para el gen ARNr 28S del “POOL Genético” a la concentración de 5mM de CdCl₂.

Tukey HSD test; variable 5mM Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,50216, df = 4,0000					
Cell No.	Tiempo	{1}	{2}	{3}	{4}
		12,205	13,990	14,680	13,820
1	control		0,195294	0,080533	0,245978
2	2 horas	0,195294		0,771549	0,994433
3	6 horas	0,080533	0,771549		0,651373
4	24 horas	0,245978	0,994433	0,651373	

Tabla XI.- Comparación de Medias por el Método de Tuckey HSD, para el gen Actina del “POOL Genético” a la concentración de 2mM de CdCl₂.

Tukey HSD test; variable 2mM Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,09050, df = 2,0000					
Cell No.	Tiempo	{1}	{2}	{3}	{4}
		29,890	29,140	25,590	24,240
1	control		0,299536	0,018289	0,010755
2	2 horas	0,299536		0,026561	0,014184
3	6 horas	0,018289	0,026561		0,205359
4	24 horas	0,010755	0,014184	0,205359	

Tabla XII.- Comparación de Medias por el Método de Tuckey HSD, para el gen Actina del "POOL Genético" a la concentración de 5mM de CdCl₂.

Tukey HSD test; variable 5mM Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,01212, df = 2,0000					
Cell No.	Tiempo	{1}	{2}	{3}	{4}
		29,890	30,465	27,640	27,880
1	control		0,085392	0,009141	0,011363
2	2 horas	0,085392		0,005896	0,006981
3	6 horas	0,009141	0,005896		0,548150
4	24 horas	0,011363	0,006981	0,548150	

Tabla XIII.- Comparación de Medias por el Método de Tuckey HSD, para el gen ARNr 28S de las muestras "Individuales" a la concentración de 2mM de CdCl₂.

Tukey HSD test; variable 28S 2mM Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,00014, df = 7,0000					
Cell No.	Tiempo	{1}	{2}	{3}	{4}
		1,1261	1,1149	1,1127	1,1022
1	control		0,725070	0,535127	0,142167
2	2 horas	0,725070		0,996932	0,650621
3	6 horas	0,535127	0,996932		0,696402
4	24 horas	0,142167	0,650621	0,696402	

Tabla XIV.- Comparación de Medias por el Método de Tuckey HSD, para el gen ARNr 28S de las muestras "Individuales" a la concentración de 5mM de CdCl₂.

Tukey HSD test; variable 28S 5mM Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,00049, df = 7,0000					
Cell No.	Tiempo	{1}	{2}	{3}	{4}
		1,1261	1,1503	1,1743	1,1194
1	control		0,566551	0,114752	0,986681
2	2 horas	0,566551		0,574428	0,469106
3	6 horas	0,114752	0,574428		0,107872
4	24 horas	0,986681	0,469106	0,107872	

Tabla XV.- Comparación de Medias por el Método de Tuckey HSD, para el gen HSP 70 (99bp) de las muestras "Individuales" a la concentración de 2mM de CdCl₂.

Tukey HSD test; variable hsp 99bp Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,12121, df = 7,0000					
Cell No.	Tiempo	{1}	{2}	{3}	{4}
		1,0084	,88973	,84849	1,2217
1	control		0,980868	0,940113	0,874010
2	2 horas	0,980868		0,999194	0,730967
3	6 horas	0,940113	0,999194		0,584029
4	24 horas	0,874010	0,730967	0,584029	

Tabla XVI.- Análisis de Homogeneidad de Varianzas por el Método de Barlett-Cochran para el gen HSP 70 (99bp) a la concentración de 5mM de CdCl₂.

Tests of Homogeneity of Variances Effect: Tiempo					
	Hartley F-max	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	df	p
hsp70 99bp (5mM)	136,4954	0,944204	9,418344	3	0,024216

Tabla XVII.- Comparación de Medias por el Método de Tuckey HSD, para el gen HSP 70 (500bp) de las muestras "Individuales" a la concentración de 2mM de CdCl₂.

Tukey HSD test; variable hsp70 500bp (2mM) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,05367, df = 6,0000					
Cell No.	Tiempo	{1}	{2}	{3}	{4}
		,48256	1,0626	1,0748	1,3439
1	control		0,233999	0,073712	0,015326
2	2 horas	0,233999		0,999964	0,728495
3	6 horas	0,073712	0,999964		0,531044
4	24 horas	0,015326	0,728495	0,531044	

Tabla XVIII.- Comparación de Medias por el Método de Tuckey HSD, para el gen HSP 70 (500bp) de las muestras "Individuales" a la concentración de 5mM de CdCl₂.

Tukey HSD test; variable hsp70 500bp (5mM) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,02352, df = 4,0000					
Cell No.	Tiempo	{1}	{2}	{3}	{4}
		,90221	,94448	1,2387	,75587
1	control		0,989110	0,218249	0,840420
2	2 horas	0,989110		0,348301	0,756626
3	6 horas	0,218249	0,348301		0,185970
4	24 horas	0,840420	0,756626	0,185970	

Tabla XIX.- Comparación de Medias por el Método de Tuckey HSD, para el gen MT (292bp) de las muestras "Individuales" a la concentración de 2mM de CdCl₂.

Tukey HSD test; variable mt (2mM) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,01863, df = 7,0000					
Cell No.	Tiempo	{1}	{2}	{3}	{4}
		,59286	,92867	1,1457	1,3245
1	control		0,111853	0,006997	0,001527
2	2 horas	0,111853		0,372047	0,059538
3	6 horas	0,006997	0,372047		0,434172
4	24 horas	0,001527	0,059538	0,434172	

Tabla XX.- Comparación de Medias por el Método de Tuckey HSD, para el gen MT (292bp) de las muestras "Individuales" a la concentración de 5mM de CdCl₂.

Tukey HSD test; variable mt (5mM) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,03438, df = 5,0000					
Cell No.	Tiempo	{1}	{2}	{3}	{4}
		,34828	,52500	2,1273	1,7859
1	control		0,734222	0,000709	0,001592
2	2 horas	0,734222		0,001483	0,004142
3	6 horas	0,000709	0,001483		0,355598
4	24 horas	0,001592	0,004142	0,355598	

ANEXO B

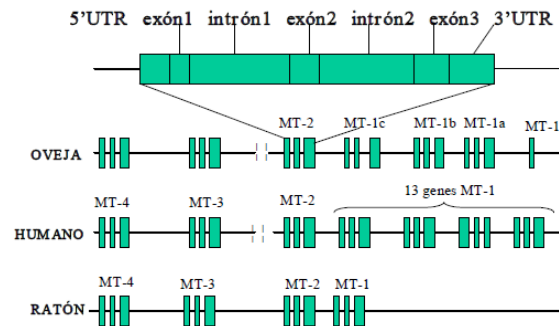
Figuras

Figura 1. Erizo de mar Antártico *S. neumayeri*, en su hábitat natural



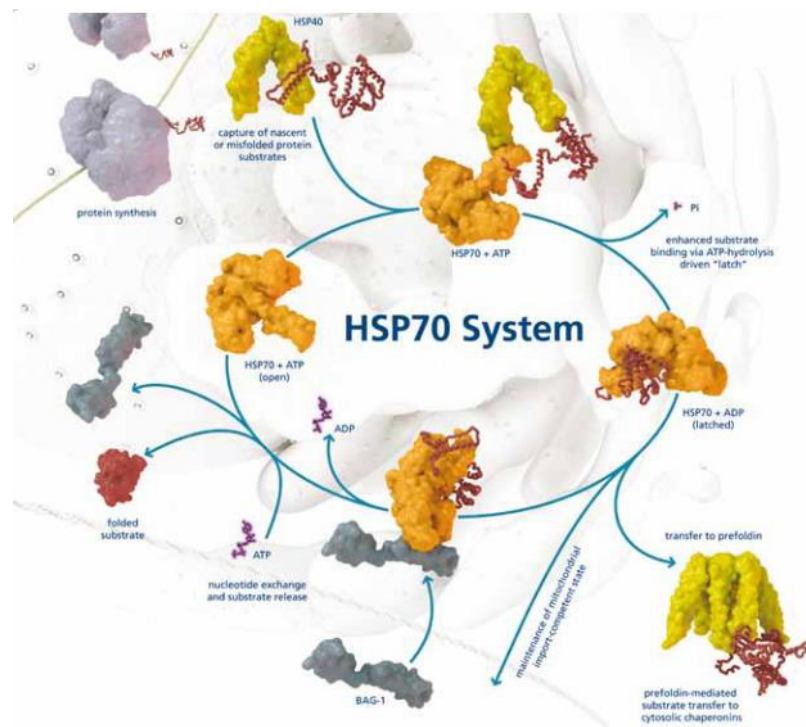
Fuente: Autor

Figura 2. Mapas genéticos de diferentes metalotioneínas en oveja, humano y ratón.
Ampliación del Mapa Genético de la MT2 de la oveja.



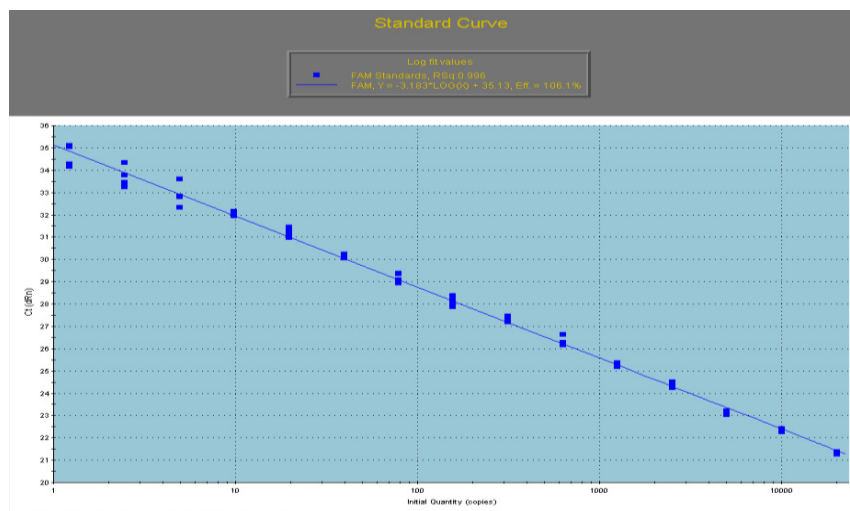
Fuente: García L., Robles M., Valenzuela E., (1999). Mapas genéticos que incluyen a los genes que codifican para diferentes metalotioneínas en oveja, humano y ratón. Ampliación del mapa físico de la metalotioneína MT-2.

Figura 3. Familia Heat-Shock Proteins 70 (HSP70) en el ser humano



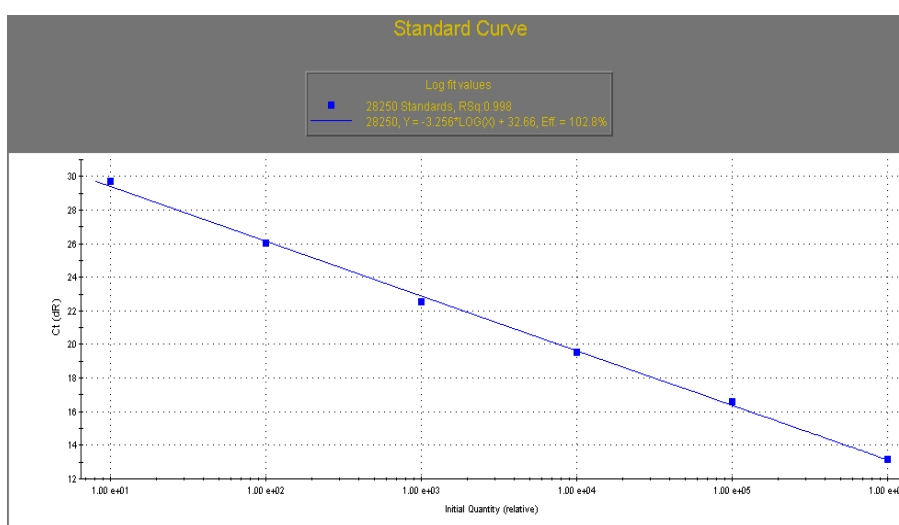
Fuente: Heat Shock Proteins and the Cellular Stress Response. (2010) EnzoLifeSciences, Pág. 12

Figura 4. Estandarización del marcador fluorescente FAM de la qPCR del Laboratorio de Biorecursos Antárticos (INACH).



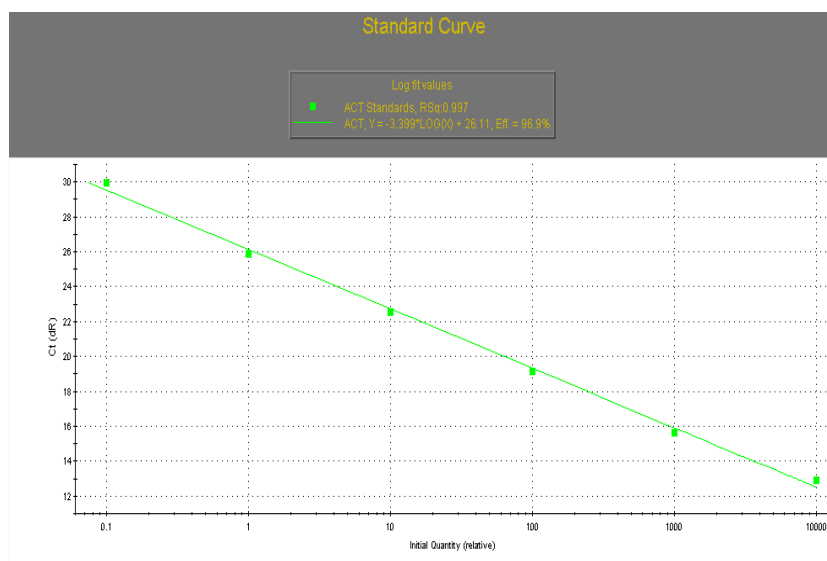
Fuente: Laboratorio de Biorecursos Antárticos. INACH

Figura 5. Estandarización del iniciador 28S empleado en el proyecto.



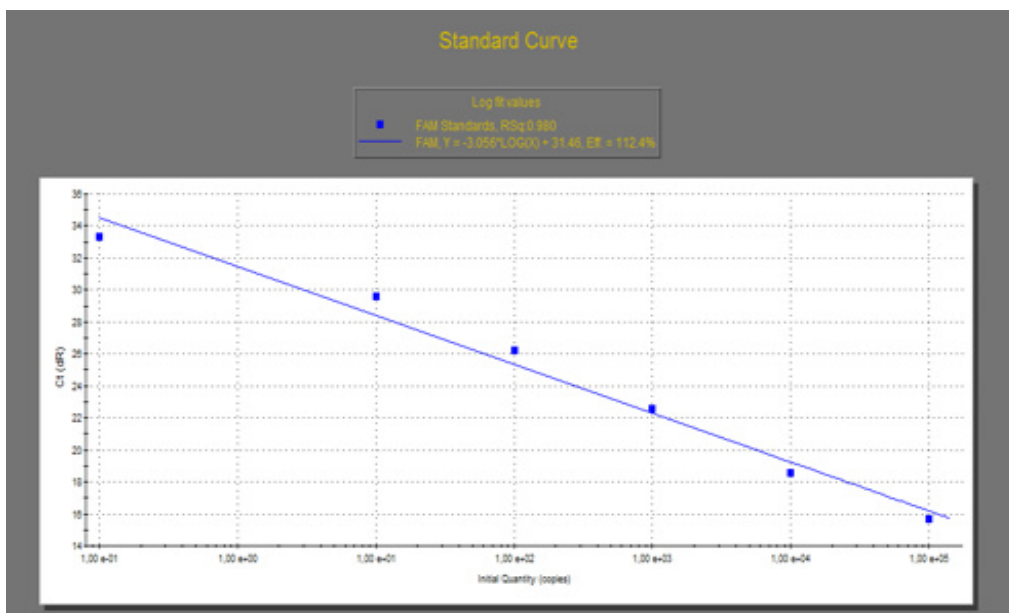
Fuente: Laboratorio de Biorecursos Antárticos. INACH

Figura 6. Estandarización del iniciador ACT empleado en el proyecto.



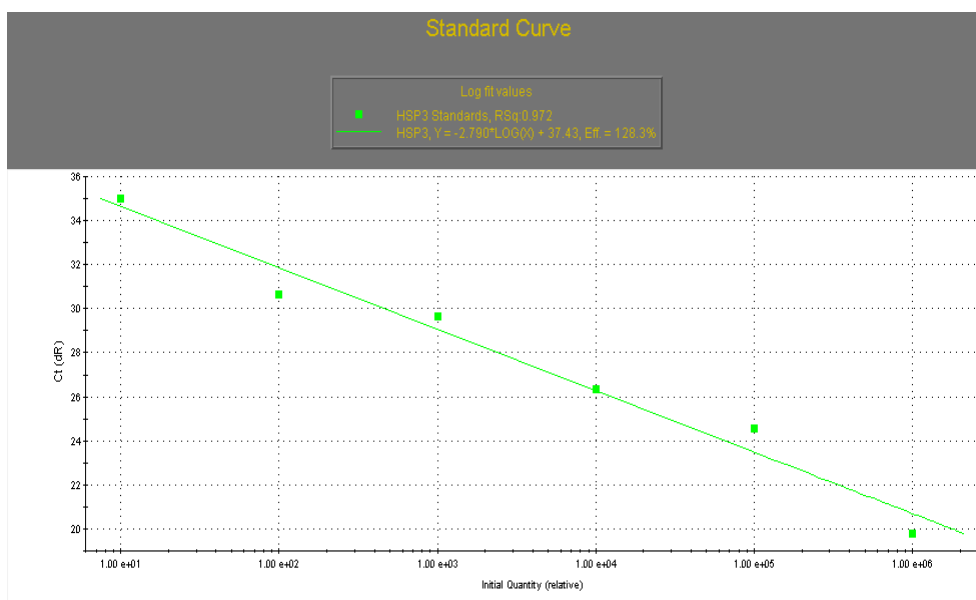
Fuente: Laboratorio de Biorecursos Antárticos. INACH

Figura 7. Estandarización del iniciador HSP-1 empleado en el proyecto.



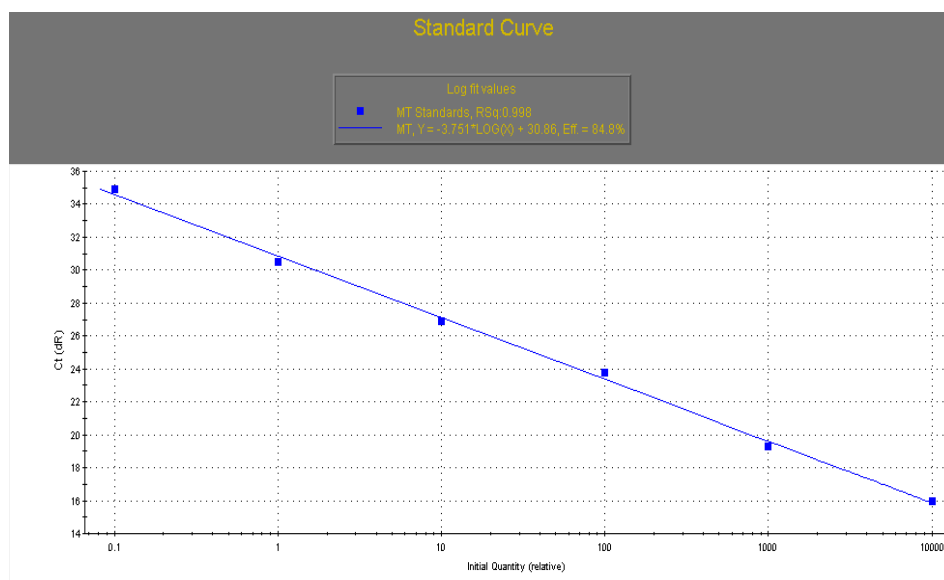
Fuente: Laboratorio de Biorecursos Antárticos. INACH

Figura 8. Estandarización del iniciador HSP-2 empleado en el proyecto.



Fuente: Laboratorio de Biorecursos Antárticos. INACH

Figura 9. Estandarización del iniciador MT empleado en el proyecto.



Fuente: Laboratorio de Biorecursos Antárticos. INACH

ANEXO C

PROTOCOLOS

Protocolo 1. Protocolo empleado para la obtención de ARN totales con el kit de Miniprep de E.Z.N.A

E.Z.N.A. total RNA isolation kit miniprep

1. Añadir al cultivo celular o tejido 350-700ul de TRK lysis buffer, mezclar bien el buffer con la muestra por pipeteo (usamos 500ul)
2. Centrifugar a 13000 g por 5 minutos
3. Colocar el sobrenadante en un tubo de 1.5ml estéril libre de RNasas
4. Añadir un mismo volumen de etanol 70% y homogenizar la muestra (puede usarse vortex)
5. Colocar la muestra sobre Hi-bind column puesta sobre un tubo colector de 2ml (volumen máximo de la columna 700 ul)
6. Centrifugar a 10000 g por 60 segundos, descartar el flow-through (repetir este procedimeinto cuantas veces sean necesarias para terminar todo el volumen de muestra).
7. Añadir 500 ul de wash buffer I (incluido en el kit) y centrifugar a 10000 RPM por 30 segundos (descartar el flow-through)
8. Añadir 500 ul de wash buffer II (incluido en el kit y previamente preparado añadiéndole 48ml de etanol absoluto).
9. Centrifugar a 10000 RPM por 30 segundos (descartar el flow-through)
10. Colocar nuevamente 500 ul de wash buffer II y centrifugar a 10000 RPM por 30 segundos (descartar el flow-through)
11. Centrifugar por 2 minutos a 11000 RPM y descartar el flow-through
12. Colocar la columna en un tubo de 1.5ml estéril libre de RNasas.
13. Añadir 50 ul de DEPC wáter (incluida en kit) directamente al centro de la membrana.
14. Centrifugar a 13000 RPM por 1 minuto y descartar la columna
15. Colocar los tubos inmediatamente en hielo y almacenarlos en -80 grados o en -20 si van a ser usados en menos de 1 hora.

Fuente: Autor

Protocolo 2. Protocolo de M-MLV empleado para efectuar la RT-PCR.

First-Strand cDNA Synthesis Using M-MLV RT

A 20- μ l reaction volume can be used for 1 ng–5 μ g of total RNA or 1–500 ng of mRNA.

1. Add the following components to a nuclease-free microcentrifuge tube:
 1. 1 μ l oligo (dT) 12-18 (500 μ g/ml), or 50–250 ng random primers, or 2 pmole gene-specific primer
 2. 1 ng to 5 μ g total RNA or 1 ng to 500 ng of mRNA
 3. 1 μ l 10 mM dNTP Mix (10 mM each dATP, dGTP, dCTP and dTTP at neutral pH) Sterile, distilled water to 12 μ l
(preparar un tubo de muestra que contenga la mezcla de 1ul de oligo dT y 1ul de Mix dNTP; multiplicado x el número de reacciones a trabajar y luego colocar 2ul de la mezcla a cada tubo)
2. Heat mixture to 65°C for 5 min and quick chill on ice. Collect the contents of the tube by brief centrifugation and add:
 1. 4 μ l 5X First-Strand Buffer
 2. 2 μ l 0.1 M DTT
 3. 1 μ l RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 units/ μ l) (Note: When using less than 50 ng of starting RNA, the addition of RNaseOUT™ is essential.)
3. Mix contents of the tube gently and incubate at 37°C for 2 min.
4. Add 1 μ l (200 units) of M-MLV RT, and mix by pipetting gently up and down. If using random primers, incubate tube at 25°C for 10 min.
5. Incubate 50 min at 37°C.
6. Inactivate the reaction by heating at 70°C for 15 min.

The cDNA can now be used as a template for amplification in PCR. However, amplification of some PCR targets (>1 kb) may require the removal of RNA complementary to the cDNA. To remove RNA complementary to the cDNA, add 1 μ l (2 units) of E. coli RNase H and incubate at 37°C for 20 min. If less than 1 ng of RNA is used, reduce the amount of M-MLV RT in the reaction to 0.25 μ l (50 units), and add the sterile, distilled water to 20- μ l final volume.

Fuente: Autor

Protocolo 3. Programa de qPCR para amplificación y detección de la acumulación de transcritos de ARN de los genes control y experimentales

qPCR 28s, 18s, HSP70 (MI), ACT, MT

95°C > 10 min
95°C > 15 s
60°C > 15 s
72°C > 15 s



40 ciclos

Fuente: Laboratorio de Biorecursos Antárticos. INACH

BIBLIOGRAFIA

1. Ortega L., Tuya F., y Haroun R. (2009). El erizo de mar *Diadema antillarum phillipi*, 1845, influye sobre la diversidad y composición de la comunidad de mega-invertebrados vágiles en fondos rocosos del Archipiélago Canario. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, Vol. 44 (2), 489-495. doi 10.4067/S0718-19572009000200021
2. Figueroa T. (2009). *Caracterización Molecular de la Expresión del Gen de la Metalotioneína en el Erizo Antártico (Sterechinus neumayeri)* (tesis de pregrado). Universidad de Magallanes, Región de Magallanes, Chile.
3. Kroh, A. y Mooi, R. (2011). *World Echinoidea Database*. Recuperado de <http://www.marinespecies.org/echinoidea>.
4. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. (2011). *Guía didáctica, El mar a fondo: La Red Trófica*. Recuperado de <http://www.elmarafondo.com/documents/10180/15253/gu%C3%ADa>

+did%C3%A1ctica+red+tr%C3%B3fica/461f8184-46dd-4476-bfff-23890d811320. Consultado 07.08.2013

5. Centro de Artigos. (2012-2014). *Sterechinus neumayeri, Filogenia molecular, Descripción, Distribución, Biología, Investigación*. Recuperado de http://centrodeartigos.com/articulos-informativos/article_78891.html Consultado 27.07.2013
6. Cesar A., Marín Guirao L., Vita R., y Marín A. (2002). Sensitivity of amphipods and sea urchins to reference toxicants. *Ciencias Marinas, Vol. 28* (4), 407-417. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/480/48028408.pdf>. ISSN 0185-3880
7. Bargagli, R. (2005). Antarctic Ecosystems: Environmental Contamination, Climate Change, and Human Impact. *Ecological Studies, Vol. 175*, 309. ISBN 978-3-540-26465-1 (Online).
8. Bargagli, R. (2008). Antarctic Ecosystems: Environmental contamination in Antarctic ecosystems. *Sci Total Environ, Vol. 400* (1-3), 212-226. Doi: 10.1016/j.scitotenv.06.062.
9. New Jersey Department of Health. (2009). *Hoja informativa sobre Sustancias Peligrosas: Cloruro de Cadmio*. New Jersey. Recuperado de <http://nj.gov/health/eoh/rtkweb/documents/fs/0308sp.pdf>
10. Ragusa MA., Costa S., Gianguzza M., Roccheri MC., y Gianguzza F., (2013). Efectos de la exposición al cadmio en desarrollo erizo de mar evaluado

por SSH y RT-qPCR: genes de metalotioneína y su inducción diferencial.

Mol. Biol., Vol 40 (3), 2157-2167. doi 10.1007/s11033-012-2275-7

11. Panebianco M. (2012). Análisis de los niveles de metales pesados (Pb, Cu, Cr, Zn, Ni y Cd) y aspectos reproductivos del delfín franciscana (*Pontoporia blainvillei*). *Mastozoología Neotropical*, Vol. 19 (1), 179-180. ISSN 1666-0536 (Online).
12. Calfio CP. (2011). *Identificación y Análisis de la expresión de un transcrito y una proteína de Shock Térmico de 70kD de Sterechinus neumayeri, en respuesta a estrés térmico y uso potencial como biomarcador*. (tesis de pregrado). Universidad de la Frontera, Temuco, Chile.
13. Enzo Life Sciences. (2010). *Heat Shock Proteins and the Cellular Stress Response*. Recuperado de http://www.enzolifesciences.com/fileadmin/files/catalog/zz-c0210-1002_hsp_us_lowres.pdf
14. Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C., y Ramade F. (1997). *Les métallothionéines. Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects Fondamentaux*. ISBN-13: 978-2225830532
15. Amiard, J.C., Amiard-Triquet C., Barka S., Pellerin J., Rainbow P.S. (2006). Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology*, Vol. 40 (1), 160-202.

16. Centro Virtual de Información del Agua. (2012). *La Antártida y el Cambio Climático*, Mexico D.F., Fondo para la Comunicación y Educación Ambiental, A. C. Recuperado de http://www.agua.org.mx/h2o/index.php?option=com_content&view=article&id=248:-la-antartida-y-el-cambio-climatico&catid=1310:agua-y-cambio-climatico&Itemid=300058. Consultado 03.04.2013

17. Cserjesi. P., Fang H., y Brandhorst B.P. (1997). Metallothionein Gene Expression in Embryos of the Sea Urchin *Lytechinus pictus*. *Molecular Reproduction and Development*, Vol. 47 (1) 39-46.

18. Kroh, A. (2014). *Sterechinus neumayeri* (Meissner, 1900). In: Kroh, A. & Mooi, R. (2014) World Echinoidea Database. Accessed through: De Broyer, C.; Clarke, A.; Koubbi, P.; Pakhomov, E.; Scott, F.; Vanden Berghe, E. and Danis, B. (Eds.) (2014) Register of Antarctic Marine Species at <http://www.marinespecies.org/rams/aphia.php?p=taxdetails&id=160831>

19. Branco P., Pressinotti L., Borges J., Iunes R., Kfoury J., Silva M.,... Silva J. (2012). Cellular biomarkers to elucidate global warming effects on Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri*. *Polar Biology*. Vol 35, 221-229. doi 10.1007/s00300-011-1063-5

20. Brockington S., Clarke A., y Chapman A., (2001) Seasonality of feeding and nutritional status during the austral winter in the Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri*. *Marine Biology*, Vol. 139, 127-138. doi 10.1007/s00227-010-0561

21. Ericson J., Lamare M., Morley S., y Barker M. (2010). The response of two ecologically important Antarctic invertebrates (*Sterechinus neumayeri* and *Parbolasia corrugatus*) to reduced seawater pH: effects on fertilization and embryonic development. *Marine Biology*, Vol. 157, 2689-2702. doi 10.1007/s00227-010-1529-y

22. Ericson, J., Ho, M., Miskelly, A., King, C., Virtue, P., Tilbrook, B., y Byrne, M. (2012). Combined effects of two ocean change stressors, warming and acidification, on fertilization and early development of the Antarctic echinoid *Sterechinus neumayeri*. *Polar biology*, 35(7), 1027-1034. doi 10.1007/s00300-011-1150-7

23. Marsh, A., Maxson Jr, R., y Manahan, D. (2001). High macromolecular synthesis with low metabolic cost in Antarctic sea urchin embryos. *Science*, Vol. 291, 1950-1952. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11239152>

24. Lee Y., M. Song, S. Lee, R. Leon, S. Godoy, y I. Canete Molecular phylogeny and divergence time of the Antarctic sea urchin (*Sterechinus neumayeri*) in relation to the South American sea urchins. *Antarctic Science* 2004. Vol. 16 (1). 29–36. doi 10.1017/S0954102004001786
25. Díaz, A., Féral, J., David B., Saucède T., y Poulin, E. (2011). Evolutionary pathways among shallow and deep-sea echinoids of the genus *Sterechinus* in the Southern Ocean. *Deep-Sea Research II*, Vol. 58 (1-2), 205-211. doi: 10.1016/j.dsr2.2010.10.012
26. Reyes M., Alvarado A., Antuna D., Garcia A., Gonzalez L., y Vasquez E. (2012). *METALES PESADOS: IMPORTANCIA Y ANALISIS*. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Durango, Instituto Politécnico Nacional. Recuperado de <http://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/8815/AN%C3%81LISIS%20DE%20ARS%C3%89NICO%20Y%20METALES%20PESADOS%20EN%20E%20L%20AGUA%202.pdf?sequence=1>
Consultado 30.07.2013
27. AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. (2011). *CADMIO (CADMIUM)*. Toxic Substances Portal. Recuperado de <http://www.atsdr.cdc.gov/substances/toxsubstance.asp?toxid=15>
Consultado 30.07.2013

28. Fichas Internacionales de Seguridad Química. (1994). *Cloruro de Cadmio*. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. (España). Recuperado de <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/FISQ/Ficheros/101a200/nspn0116.pdf> Consultado 30.07.13
29. Saldívar L., Tovar A., y Fortoul T. (2009). *Capítulo 13 Cadmio*. Recuperado de <http://www.bvsde.ops-oms.org/bvstox/fulltext/toxico/toxico-03a13.pdf> Consultado 30.07.2013
30. Mohammed, J., y AL-Yasari, W. (2011). INVESTIGATING MERCURY EXISTENCE IN TOW PLANTS OF DRINKING WATER ON BABYLON PROVINCE, IRAQ. Recuperado de <http://www.geosp.net/research/research-en/2013/5160.html>
31. Departamento de Salud de Catalunya. Contaminantes Químicos, Estudio de dieta total en Cataluña (Resumen 113-128). Recuperado de http://www.gencat.cat/salut/acsa/html/ca/dir1538/dn1538/11-resumen_castellano.pdf Consultado: 30.07.2013
32. Bargagli, R., (2008, 1 de Agosto). Environmental contamination in Antarctic ecosystems. *Science of Total Environment*. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004896970800716>

33. Bargagli, R., Nelli, L., Ancora, S., y Focardi, S. (1996). Elevated cadmium accumulation in marine organisms from Terra Nova Bay (Antarctica). *Polar Biology* Vol. 16, 513-520. Recuperado de <http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF02329071#page-1>
34. Bargagli, R., (2005). *Antarctic Ecosystems: Environmental Contamination, Climate Change, and Human Impact*. ISBN 978-3-540-26465-1 (Online).
35. Cripps, G., (1992). Natural and anthropogenic hydrocarbons in the Antarctic marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 25 (9-12), 266-273. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0025326X9290681U?np=y>
36. Kennicutt, M., Klein, A., Montagna, P., Sweet, S., Wade, T., Palmer, T., Sericano, J., y Denoux, G. (2010). Spatial and Temporal Scales of Human Disturbance McMurdo Station, Antarctica. *Environmental Research Letters* (5). doi:10.1088/1748-9326/5/3/034010.
37. Kennicutt, M., McDonald, S., Sericano, J., Boothe, P., Oliver, J., Safe, S.,... Bockus, D., (1995). Human contamination of the marine environment e Arthur Harbor and Mcmurdo Sound, Antarctica. *Environmental Science & Technology*, Vol. 29 (5), 1279-1287. DOI: 10.1021/es00005a600
38. Colin Baird. (2001). *Química Ambiental*. Recuperado de http://books.google.com.ec/books?id=bgUaHUqGPYIC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

39. Sarmiento D. (2011). *Evaluación de la contaminación por metales pesados en muestras de musgo recolectadas durante el período febrero – marzo 2011 en la Estación Antártica Ecuatoriana Pedro Vicente Maldonado* (Tesis de pregrado). Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.
40. Scott E. (2007). Las metalotioneínas y el estrés quirúrgico. *Research Ethics Board*, Vol. 26 (2), 67-72. Recuperado de <http://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2007/reb072d.pdf>
41. García L., Robles M., y Valenzuela E. (1999). Las Metalotioneínas y su relación con la toxicidad del cadmio en los mamíferos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, Vol. 15 (2), 13-120. ISSN 0188-4999.
42. Scudiero, R., Capasso, C., Carginale, V., Riggio, M., Capasso, A., Ciaramella, M., Filosa, S., y Parisi, E. (1997). PCR amplification and cloning of metallothionein complementary DNAs in temperate and Antarctic sea urchin characterized by a large difference in egg metallothionein content. *Cellular and Molecular Life Science*, Vol. 53, 472-477. Recuperado de <http://link.springer.com/article/10.1007/s000180050058#page-1>
43. Trancoso, J. (2000). Regulación de las metalotioneínas durante el estrés y la inflamación, y su influencia durante la respuesta inflamatoria (Tesis Doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.

44. Maillet Marc. (2002). Manual Biología Celular. Capítulo3, Citoesqueleto, 130-150. ISBN 84-458-1105-3. Recuperado de http://books.google.com.ec/books?id=54vSCCv33pYC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbg_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
45. Weaver, R. (2002). Molecular Biology, 2nd Edition. Estados Unidos, Boston. Editorial McGraw Hill. Págs. 73-79. ISBN 9780072345179
46. Universidad de Murcia. Sección de Biología Molecular, Servicio de apoyo a la Investigación. (2012). PCR a Tiempo Real. Recuperado de: <http://sbmsaiumu.files.wordpress.com/2012/11/pcrrt311012.pdf>
Consultado 08.11.13
47. Perrin B., y Ervasti J. (2010). The actin gene family: function follows isoform. *Cytoskeleton (Hoboken)*, Vol. 67 (10), 630-634. doi: 10.1002/cm.20475
48. Clark, M. S., Thorne, M. A. S., Toullec, J. Y., Meng, Y. and Guan, L. L. (2011) Antarctic Krill 454 Pyrosequencing Reveals Chaperone and Stress Transcriptome. PLoS ONE 6(1): e15919. doi:10.1371/journal.pone.0015919
49. Clark, M., Fraser, K. y Peck, L. (2008). Low heat shock thresholds in wild Antarctic intertidal limpets (*Nacella concinna*). *Cell Stress Chaperones*, Vol. 13 (1), 51-58. doi: 10.1007/s12192-008-0015-7

50. Clark, M., Fraser, K. y Peck, Ll. (2008). Antarctic marine molluscs do have an HSP70 heat shock response. *Cell Stress Chaperones*, Vol. 13 (1), 39-49. doi 10.1007/s12192-008-0014-8
51. Clark M, Fraser K, y Peck LL. (2008). Lack of an HSP70 heat shock response in two Antarctic marine invertebrates. *Polar Biol.* Vol. 31, 1059-1065. doi: 10.1007/s00300-008-0447-7. Recuperado de <http://link.springer.com/article/10.1007/s00300-008-0447-7#page-1>
52. Portner, H., Peck, Ll., Somero G. (2007). Thermal limits and adaptation in marine Antarctic ectotherms: an integrative view. *Royal Society Publishing*, Vol. 362 (1488), 2233- 2258. doi:10.1098/rstb.2006.1947.
53. Pérez C. (2013). *Expresión de genes relacionados a la respuesta inmune del Erizo Antártico Stereochinus neumayeri, expuesto a Vibrio anguillarum* (Tesis de pregrado). Universidad de Concepción, Concepción, Chile.
54. Livak, K., y Schmittgen, T., Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method. *METHODS*, Vol. 25 (4), 402-408. doi 10.1006/meth.2001.1262.
55. Vinueza, C. (2009, 2 de Febrero). PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información genética celular (Real Time PCR: the new age of cellular genetic information). *REDVET. Revista electrónica de veterinaria*, Vol. 10 (2) ISSN: 1695-7504 Recuperado de <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n020209/020910.pdf>

56. INACH 2013, Boletín Antártico Chileno, Vol. 32 (1-2), 15-18. Recuperado de <http://www.inach.cl/sala-de-prensa/boletin-antartico-2/>
57. Grossin, L., Etienne, S., Gaborit, N., Pinzano, A., Cournil-Henrionnet, C., Gerard, C., Paya, E.,... Gillet, P. (2004). Induction of heat shock protein 70 (Hsp70) by proteasome inhibitor MG 132 protects articular chondrocytes from cellular death in vitro and in vivo. *Biorheology, Vol. 41* (3-4), 521-534. Recuperado de <http://iospress.metapress.com/content/58mv7hvnn1nvbk59/?genre=article&issn=0006-355X&volume=41&issue=3&spage=521>
58. Cardona, F., Barbosa, C., Alvarado, Z., Macías, M., y Sánchez, S. (2008). *Expresión de Hsp70 en células MDCK inducida por compuestos de secreción del nematodo T. spiralis*. Zacatecas, Mexico. Recuperado de <http://archivosdemedicina.com>
59. Amaro, F. (2010). *La familia de las metalotioneínas en Tetrahymena y su aplicación en el desarrollo de biosensores celulares para la detección de metales pesados* (Tesis Doctoral). Universidad Complutense, Madrid, España.
60. Samson, S., y Gedamu, L. (1998). Molecular analyses of metallothionein gene regulation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, Vol. 59*, 257-288. doi. 10.1016/S0079-6603(08)61034-X

61. Samson, S., Paramchuk, W., y Gedamu L. (2001). The rainbow trout metallothionein-B gene promoter: contributions of distal promoter elements to metal and oxidant regulation. *Biochim-Biophys Acta*, 1517 (2), 202-211
62. Van Cleef-Toedt, K., Kaplan, L., y Crivello, J. (2001). Killifish metallothionein Messenger RNA expression following temperature perturbation and cadmium exposure. *Cell Stress & Chaperones*, 6 (4), 351–359.
63. Kiang, J., y Tsokos, G. (1998). Heat Shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol Ther*, 80 (2), 183-201.
64. Cuervo, C. (2011). *Caracterización Molecular de los genes codificantes de la proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70) de Trypanosoma rangeli* (Tesis Doctoral). Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, D.C., Colombia.
65. Carrion, A. (2012). Northern Blot. Recuperado de <http://www.slideshare.net/alancarrion18/northern-blot>.
66. Villalobos, C., Gómez, V., y Ponce de León, S. (2010). *La Epidemia de Influenza A/H1N1 en México*. Recuperado de <http://www.medicapanamericana.com/Libros/Libro/4081/La-Epidemia-de-Influenza-AH1N1-en-Mexico.html>

67. Gandica, C., Hernández, J., Berruete, L., Colmenares, M., Barboza, L...Berrueta, L. (2009). *Diagnóstico molecular de la infección por el virus de la hepatitis C mediante PCR en tiempo real*. Recuperado de http://www.medic.ula.ve/idic/docs/hepatitis_c.pdf
68. Riquelme, A., y Pinto, M. (2005). Introducción a la Genómica en VID. Recuperado de <http://www.gie.uchile.cl/pdf/Manuel%20Pinto/Introducci%F3n%20a%20la%20gen%F3mica%20en%20vid.pdf>
69. Kelmansky, D. (2010). Aspectos Estadísticos de Microarrays. Recuperado de http://www.dm.uba.ar/materias/optativas/aspectos_estadisticos_de_microarreglos/2010/1/teoricas/Clase1.pdf
70. García, M. (2006). Conceptos generales de inferencia estadística. Estimación de parámetros. Intervalos de confianza. Recuperado de http://www.dm.uba.ar/materias/estadistica_Q/2011/1/EstadQuimEstimacionIntConfianza.pdf.
71. One-Way ANOVA in SPSS. Recuperado de <https://statistics.laerd.com/spss-tutorials/one-way-anova-using-spss-statistics.php>.
72. One Way ANOVA. Chapter 7. Recuperado de <http://www.stat.cmu.edu/~hseltman/309/Book/chapter7.pdf>

73. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL O Q-PCR. Recuperado de http://www.ehu.es/SGIker/es/expresion_genica/documentos/analisis_de_expresion.pdf
74. PCR a tiempo real o PCR cuantitativa (Q-PCR) para medir la expresión génica. Recuperado de http://www.ikerkuntza.ehu.es/p083-8991/es/contenidos/informacion/expresion_genica/es_genomica/adjuntos/PCR%20a%20tiempo%20Real.pdf
75. Guzmán, L. (2009). PCR en Tiempo Real. Recuperado de <http://www.slideshare.net/dianyu/pcr-en-tiempo-real>
76. Marín de la Torre, I. (2007). PCR en tiempo real para la detección cuantitativa de ADN bovino en piensos vegetales. *Revista complutense de ciencias veterinarias*, (2). ISSN-e 1988-2688.
77. Transformación de Datos para ANOVA. Recuperado de <http://es.scribd.com/doc/95727470/transformacion-de-datos>
78. Molinero, L. (2003). Transformaciones, Pruebas No Paramétricas. Recuperado de <http://www.seh-lelha.org/pdf/noparame.pdf>
79. Alleman, L., Curch, T., Ganguli, P., Vèron, A., Hamelin, B., y Flegal, A. (2001). Role of oceanic circulation on contaminant lead distribution in the South Atlantic. *Deep-Sea Research Part II*, 48 (13), 2855-2876. DOI 10.1016/S0967-0645(01)00021-2

80. Biederman, J., Yee, J., y Cortes, P. (2004). Validation of internal control genes for gene expression analysis in diabetic glomerulosclerosis. *Kidney Int*, 66, 2308-2314. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15569320>
81. Brouwer, M., Winge, D., y Gray, W. (1989). Structural and functional diversity of copper-metallothioneins from the american lobster *Homarus americanus*. *J. Inorg. Biochem.* 35 (4), 289-303. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2709004>
82. Coffaro, K., y Hinegardner, R. (1977). Immune response in the sea urchin *Lytechinus pictus*. *Science* 197 (4311), 1389-1390. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/331476>
83. Coteur, G., Gosselin, P., Wantier, P., Chambost-Manciet, Y., Danis, B... Dubois, P. (2003). Echinoderms as Bioindicators, Bioassays, and Impact Assessment Tools of Sediment-Associated Metals and PCBs in the North Sea. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 45 (3), 190–202 Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14565576>
84. Couillard, Y., Campbell, P., Tessier, A., Pellerin-Massicotte, J., y Auclair, J. (2011). Field transplantation of a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*, across a metal contamination gradient. II. Metallothionein response to Cd and Zn exposure, evidence for cytotoxicity, and links to effects at higher levels of biological organization. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 52 (4), 703-715. DOI: 10.1139/f95-071

85. Couillard, Y., Campbell, P., Tessier, A., Pellerin-Massicotte, J., y Auclair, J. (2011). Field transplantation of a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*, across a metal contamination gradient. I. Temporal Changes in Metallothionein and Metal (Cd, Cu and Zn) concentrations in soft tissues. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 52 (4), 690-702. DOI 10.1139/f95-070
86. Coyle, P., Philcox, J., Carey, L., y Rofe, A. (2002). Metallothionein: The multipurpose protein. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59 (4), 627-647. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12022471>
87. Evans, C., Hills, J., y Dickson, J. (2000). Heavy metal pollution in Antarctica: a molecular ecotoxicological approach to exposure assesment. *Journal of Fish Biology* 57 (1), 8-19. DOI: 10.1111/j.1095-8649.2000.tb02241.x
88. Hammer, D. (1986). Metallothionein. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 913-951
Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3527054>
89. Hernández, A., Vasallo, P., Torres, A., y Salido, E. (1995). Análisis del RNA: Estudio de la expresión génica. *NEFROLOGÍA*, 15 (2), 67-84 Recuperado de <http://revistanefrologia.com/revistas/P7-E121/P7-E121-S140-A2574.pdf>
90. Kagi, J., y Vallee, B. (1961). Metallothionein: A cadmium-and zinc containing protein from equine renal cortex. *J. Biol. Chem.* 236, 2435-2442
Recuperado de <http://www.jbc.org/content/236/9/2435.full.pdf>

91. Kagi, J., y Schaffer A. (1988). Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry* 27 (23), 8509-8514. DOI 10.1021/bi00423a001
92. Karin, M., Haslinger, A., Heguy, A., Dietlin, T., y Cooke, T. (1987). Metal responsive elements act as positive modulators of human metallothionein-IIA enhancer activity. *Mol Cell Biol* 7 (2), 606-613.
Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3821726>
93. Imber, B., Thompson, J., y Ward, S. (1987). Metal-binding protein in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: assessment of the protein as a Biochemical Environment Indicator. *Bull. Environ. Contam, Toxicol.* 38, 707-714.
Recuperado de <http://link.springer.com/article/10.1007/BF01608607#page-1>
94. Lionetto, M., Giordano, M., Caricato, R., Pascariello, M., Marinosci, L., y Schettino, T. (2001). Biomonitoring of heavy contamination along the Salento coast (Italy) by metallothionein evaluation in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus*. *Aquat. Conserv. Mar. Freshwater Ecosyst.* 11 (4), 305-572. DOI 10.1002/aqc.458
95. McKay, E., Overnell, J., Dunbar, B., Davidson, I., Hunziker, P... Forthergill, J. (1990). Polymorphism of cadmium-induced mussel metallothioneins.
Recuperado de <http://gradworks.umi.com/U0/24/U024434.html>
96. Moreno, J., Gerpe, M., Moreno, V., y Vodopivec, C. (1997). Heavy metals in Antarctic organisms. *Polar Biol.* 17, 131-140. Recuperado de <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs003000050115#page-1>

97. Mourgaud, Y., Martinez, E., Geffard, A., Andral, B., Stanisière, J., y Amiard, J. (2002). Metallothionein concentration in the mussel *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of response to metal contamination: validation in the field. *Biomarkers* 7 (6), 479-490. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12581483>
98. Petrovic, S., Ozretic, B., Krajnovic-Ozretic, M., y Bobinac, D. (2001). Lysosomal membrana stability and metallothionein in digestive gland of mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lam) as biomarkers in a field study. *Marine Pollution Bulletin* 42 (12), 1373-1378. Recuperado de <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=13378828>
99. Pellerin, J., y Amiard, J.C. (2009). Comparison of bioaccumulation of metal and induction of metallothioneins in two marine bivalves (*Mytilus edulis* and *Mya arenaria*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 150 (2), 186-195. Recuperado de <http://yadda.icm.edu.pl/yadda/element/bwmeta1.element.elsevier-372117c0-3bad-350e-a222-024ab38baf38>
100. Riek, R., Prêcheur, B., Wang, Y., Mackay, E., Wider, G...Wüthrich, K. (1999). NMR structure of the sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) metallothionein MTA. *Journal of Molecular Biology* 291(2):417-428. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10438629>
101. Russo, R., Bonaventura, R., Zito, F., Schroder, H., Muller, I., Muller, W., y Matranga, V. (2003). Stress to cadmium monitored by

- metallothionein gene induction in *Paracentrotus lividus* embryos. *Cell Stress Chaperones*, 8 (3), 232-241. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14984056>
102. Blackwell, W. (2012). Antarctic Ecosystems. An Extreme Environment in a Changing World. DOI: 10.1002/9781444347241
103. Lee, H., y Xu, C. (1984). Effects of metals on sea urchin development: A rapid bioassay. *Marine Pollution Bulletin*, 15(1): 18-21
Recuperado de <http://eurekamag.com/research/015/663/influences-metals-sea-urchin-development-fast-bioassay.php>
104. Kobayashi, N. (1980). Comparative sensitivity of various developmental stages of sea urchins to some chemicals, *Marine Biology*, 58, 163-171. Recuperado de <http://link.springer.com/article/10.1007%2F00391872#page-1>
105. Abumourad, I., Mohammad, M., Abbas, A., y Abbas, W. (2013). Heavy Metal Pollution and Metallothionein Expression: A survey on Egyptian Tilapia Farms. *Journal of Applied Sciences Research*, 9 (1), 612-619. ISSN1819-544X