

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



PROGRAMA DE MAESTRÍA EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

Evaluación de la expresión de tres genes de HSPs en botete diana *Sphoeroides annulatus* expuesto a estrés térmico.

TESIS

Qué para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

Maestro en ciencias

Presenta:

Maricela Cortez García

Ensenada, Baja California, México, septiembre de 2017.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

Evaluación de la expresión de tres genes de HSPs en botete diana *Sphoeroides annulatus* expuesto a estrés térmico.

TESIS

QUÉ PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER
EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

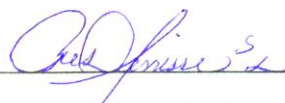
Maricela Cortez García

Aprobada por:



Dra. Ivone Giffard Mena

Directora de tesis



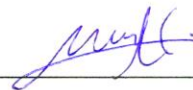
Dra. Ana Denise Re Araujo

Sinodal



Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez

Sinodal



Dra. Alicia Abadía Cardoso

Sinodal

RESUMEN

Sphoeroides annulatus es un pez estuarino ectotermo que se encuentra distribuido a lo largo del Pacífico mexicano y es considerado con un alto potencial en acuicultura en México ya que su carne es un producto muy apreciado en los mercados mundiales como el japonés y el coreano. Conocer la fisiología del pez globo (o botete) es indispensable para entender el funcionamiento del organismo, mejorar las condiciones de cultivo y por ende su producción. Para evaluar cómo responde el botete al estrés térmico, se evaluó la expresión de tres genes, *hsp40*, *hsp70* y *hsp90*, los cuales se sobre-expresan durante el estrés, incluyendo el causado por el incremento de temperatura. Para ello se evaluaron sus niveles de transcritos en branquias bajo tres condiciones experimentales. En la primera se sometieron a diferentes temperaturas de aclimatación (TAs: 20, 26 y 32 °C) durante 21 días. En la segunda se sometieron al choque de calor, en el cual se expuso a los organismos al 95% de la temperatura crítica máxima (TCMax-5%) que toleran. Por último se tomaron muestras después de haber evaluado el consumo de oxígeno para cada temperatura experimental. En cada una de las tres condiciones se realizaron extracciones de ARN total a partir de las branquias (n=5), el material genético se trató con ADNasa, se realizó la síntesis de ADNc, finalmente, se evaluaron los niveles de expresión mediante PCR en tiempo real. Los resultados de este estudio muestran que el gen que responde más al estrés térmico es *hsp90* en las tres condiciones experimentales ($\alpha=0.05$). No se observaron diferencias significativas de expresión de los genes *hsp90* y *hsp70* entre las temperaturas de aclimatación pero sí en *hsp40*. La menor expresión durante el choque térmico se registró a 20 °C y la mayor a 32 °C. Se observó un comportamiento inverso para la condición de consumo de oxígeno, obteniéndose la mayor expresión a 20° y la menor a 32 °C. Finalmente se evaluó la expresión de los tres genes en diferentes tejidos (músculo, branquia, hígado y cerebro) bajo condiciones óptimas de temperatura. Los resultados mostraron que el tejido del cerebro presenta la mayor expresión y que el gen más abundante en los cuatro tejidos evaluados fue *hsp90*. Concluimos que *Sphoeroides annulatus* muestra signos de estrés conforme la temperatura de aclimatación aumenta. Por lo que se recomienda su cultivo a temperaturas de aclimatación menores (24-26 °C). Los niveles de

expresión de *hsp70* y *hsp40* no pueden utilizarse como bioindicadores de estrés en *S. annulatus*, pero, el gen *hsp90* tiene potencial para utilizarse como indicador del estrés térmico en el botete diana.

Palabras clave: HSPs, expresión genética, botete, estrés térmico, PCR en tiempo real.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a cada una de las personas que formaron parte del desarrollo de esta tesis, tanto en la parte académica, como en la personal.

A los miembros de mi comité de tesis, Dra. Ivone Giffard por todo el conocimiento brindado por siempre estar disponible para resolver mis dudas y crisis existenciales. Por confiar en mí y darme la oportunidad de llevar cabo este proyecto. Es una excelente asesora y directora. Dra. Denisse Re por sus consejos y disponibilidad, por su paciencia y su manera tan sencilla de decirme las cosas. Dra. Clarissa Galindo por sus consejos y recomendaciones siempre acertadas y directas que nos ayudaron a mejorar este proyecto. Dra. Alicia Abadía por su apoyo en las revisiones de esta tesis.

Al Dr. Luis Enríquez Paredes del laboratorio de Ecología Molecular por todos sus consejos y apoyo en la parte experimental, siempre dispuesto a ayudarnos y aconsejarnos. A la Dra. Edna Sánchez por su apoyo y asesoría en algunas de las técnicas de laboratorio.

A los laboratorios de Biotecnología Marina y Genética acuícola de CICESE. Al laboratorio de Biología Del desarrollo del IIO por brindarnos el acceso a sus instalaciones y permitirnos hacer uso de sus equipos.

A la M.C. Ruth Areli García Villareal quien realizó la parte de los bioensayos y toma de algunas de las muestras.

A la Biol. Aleyka Barraza, estamos juntas en esto amiga, gracias por los ánimos, consejos y jaladas de orejas. Por todo el apoyo tanto en la parte experimental como en las crisis de redacción y entregas de avances.

A mis compañeros de generación Ana, Diana, Karina, Silvia, Daniela y Ricardo. Por esas tardes anti-estrés que nos sirvieron de mucho, espero sigamos en contacto después de concluir esta etapa de nuestras vidas.

A la UABC, Facultad Ciencias Marinas como unidad receptora y también al Posgrado en Ecología Molecular y Biotecnología por brindarme la oportunidad de ser parte de esta generación de Maestros en Ciencias.

Finalmente agradezco al CONACYT por otorgarme la beca de maestría que me permitió concluir este proyecto. No. Becario: 583722 (Programa Becas Nacionales) y otorgar los recursos a la Dra. Ivone Giffard Mena a través del proyecto de Laboratorios Nacionales Bioseguridad CONACYT FONINST. 1132015-264455.

DEDICATORIA

A mi familia, gracias por el todo apoyo y la confianza que me han brindado.

En especial a mi mami, Amelia te agradezco enormemente el haberme educado de la forma en que lo hiciste, por haber hecho de mí la mujer que hoy soy, sé que el camino no ha sido sencillo y por eso te estoy aún más agradecida, por nunca rendirte y apoyarme en cada etapa de mi vida. Te amo.

A mis hermanos tanto los que están lejos, María, Patricia, José, Ana; como a las que están cerca Yesenia, Carmen y Aleyka que te has convertido en una hermana más para mí. A mi David, llenas de luz mi vida. Los amo a todos.

A Daniel, me haces ser mejor cada día. Te amo.

CONTENIDO

RESUMEN.....	i
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA	v
LISTA DE TABLAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
II.1 Respuestas fisiológicas al estrés en peces	4
II.2 Influencia de la temperatura en la fisiología de peces	5
II.3 Proteínas de Choque Térmico (HSPs).....	7
II.4 Niveles de expresión de <i>hsp</i> 's en diferentes órganos	10
II.5 Estudios previos de expresión de <i>hsp</i> 's en peces bajo factores de estrés.	11
II.6 Aclimatación en peces	12
II.7 Temperatura Critica Máxima (TCMax).....	13
II.8 Consumo de oxígeno y estrés	14
III. JUSTIFICACIÓN	16
IV. OBJETIVOS	17
IV.1 Objetivo General.....	17
IV.2 Objetivos Particulares	17
V. HIPOTESIS.....	18
VI. METODOLOGÍA	19
VI.1 Obtención de muestras	19
VI.2 Extracción de ARN total	23
VI.3 Síntesis de ADNc por RT.....	23
VI.4 Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final	24
VI.5 PCR en tiempo real (qPCR)	25
VI.6 Determinación del patrón de expresión de los genes <i>hsp40</i> , <i>hsp70</i> y <i>hsp90</i> en diferentes tejidos a temperatura óptima.	27

VI.7 Evaluación de los niveles de expresión de <i>hsp</i> 's (40, 70 y 90) bajo condiciones de estrés térmico.....	27
VI.8 Tolerancia al estrés térmico	28
VI.9 Análisis estadístico.....	28
VII. RESULTADOS	29
VII.1 Extracciones de ARN total	29
VII.2 Amplificación de <i>hsp</i> 's por PCR de punto final	30
VII.3 Secuencias parciales obtenidas para cada gen.	31
VII.4 Curvas estándar.....	32
VII.5 Evaluación de la expresión de <i>hsp</i> 's.	36
VII.6 Posible isoforma de <i>hsp90</i>	39
VII.7 Tolerancia al estrés térmico.	41
VIII. DISCUSIÓN.....	43
IX. CONCLUSIONES	48
X. ANEXOS.....	50
X.1 Lista de abreviaciones	50
X.2 Extracción ARN TRI-Reagent (SIGMA).....	51
X.3 Tratamiento con ADNasa.....	52
X.4 Retrotranscripción (RT)	53
X.5 Purificación de productos PCR	54
X.6 Concentraciones de ARN total (después del tratamiento con ADNasa)	55
XI. LITERATURA CITADA	58

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Descripción de tres de las principales familias de HSPs	9
Tabla 2. Condiciones experimentales de TCM _{Max} -5%	20
Tabla 3. Condiciones a las que fueron tomadas las muestras de tejidos..	22
Tabla 4. Cebadores utilizados para la amplificación de <i>hsp</i> 's de <i>S. annulatus</i>	24
Tabla 5. Ecuaciones empleadas para obtener el número de copias	27
Tabla 6. Secuencias de nucleótidos (nt) parciales obtenidas para cada gen	31
Tabla 7. Datos de las curvas estándar	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Marco bioenergético para evaluar los impactos del estrés en la fisiología de un organismo	6
Figura 2. Gráfico de resultados obtenidos para para las evaluaciones de TCMax.....	20
Figura 3. Sistema de respirómetro utilizado durante el bioensayo para determinar el consumo de oxígeno	21
Figura 4. Gráfico de resultados para el consumo de oxígeno en cada temperatura de aclimatación.....	22
Figura 5. Ejemplo de extracción de ARN	29
Figura 6. Productos de amplificación de PCR de punto final de <i>hsp</i> 's	30
Figura 7. Curva estándar para el gen <i>hsp40</i>	33
Figura 8. Curva estándar para el gen <i>hsp70</i>	34
Figura 9. Curva estándar para el gen <i>hsp90</i>	35
Figura 10. Expresión de <i>hsp40</i> , <i>hsp70</i> y <i>hsp90</i> en diferentes tejidos de <i>S. annulatus</i>	37
Figura 11. Expresión de <i>hsp40</i> , <i>hsp70</i> y <i>hsp90</i> en branquias de <i>S. annulatus</i>	38
Figura 12. Curvas de disociación obtenidas para <i>hsp90</i> a partir de las muestras de ADNc de tejidos de <i>S. annulatus</i>	40

I. INTRODUCCIÓN

Sphoerides annulatus es un teleósteo marino perteneciente a la familia Tetradontidae (Chávez Sánchez et al., 2008), de talla pequeña a moderada con cuerpo robusto y romo (FAO, 1995). Estos peces se caracterizan por poseer un patrón de anillos concéntricos en la espalda que se asemejan a una "diana" (tiro al blanco), por ello se le atribuye el nombre común de botete diana, pero dicho patrón puede oscurecerse en los peces adultos. Una característica peculiar de este pez es que contiene tetrodotoxina (una neurotoxina mortal para el ser humano) en diversos tejidos viscerales (Chulanetra et al., 2011; Nuñez-Vazquez et al., 2012) lo cual hace altamente letal su consumo si no se eviscera correctamente. Debido a que los músculos están libres de este veneno es que se permite su consumo (Nuñez-Vazquez et al., 2012). *S. annulatus* representa un producto de alto valor comercial debido a diversas características, como la calidad de su carne (blanca, firme y filete sin hueso), su delicado sabor, su alto precio en el mercado (de cinco a siete dólares el kilogramo), su importante potencial para la exportación debido a la alta demanda de pescado de la misma familia (fugus) en países asiáticos como Japón y Corea, donde tiene el valor de mercado más alto que cualquier otro pescado (Chávez Sánchez et al., 2008).

En su hábitat natural, el botete se distribuye desde el estado de California, Estados Unidos hasta Perú (Chávez Sánchez et al., 2008). *S. annulatus* es una especie considerada de tipo estuarino ya que suele encontrarse en aguas someras y zonas arenosas, dentro de esteros, lagunas costeras, manglares y en áreas cerca de las desembocaduras de ríos. Los estuarios son zonas altamente dinámicas en las cuales ocurren variaciones amplias de temperatura, salinidad y oxígeno, y donde influyen de manera importante el flujo de agua dulce proveniente de los ríos y arroyos, las precipitaciones pluviales o la evaporación, además de los ciclos de mareas. Esto significa que el botete tolera amplias variaciones térmico-salinas (Prodocimo y Freire, 2004). Se sabe que esta especie, bajo condiciones de cultivo, tolera temperaturas de 25-30 °C (Chávez Sánchez et al., 2008). Se ha determinado también que su temperatura óptima es de 26 °C (Reyes et al., 2011).

La temperatura es un factor ambiental clave que afecta la fisiología, comportamiento y ecología de todos los organismos, particularmente de los ectotermos (Sokolova, 2013). En el caso de los ectotermos marinos, como los peces, la temperatura ambiental tiene efectos generalizados e influye sobre las funciones fisiológicas y bioquímicas en todos los niveles de organización, desde el molecular hasta el poblacional. Esto, debido a que, durante condiciones adversas, las respuestas de estrés fisiológico de los organismos deben activarse rápidamente para responder saludablemente a la perturbación, consecuentemente se activan mecanismos citoprotectores para mantener las células viables y funcionales, de lo contrario, la supervivencia del organismo estará en peligro (Tang et al., 2014).

La interrupción de los procesos metabólicos celulares normales, incrementa y acelera la síntesis de un grupo de proteínas pertenecientes a la familia de proteínas de choque térmico (HSPs) (Deane y Woo, 2005). Las HSPs son proteínas celulares altamente conservadas. Las HSPs llevan a cabo diversas funciones como proteger las membranas lipídicas, los lípidos, las proteínas, los componentes del citoesqueleto y los ácidos nucleicos en las células, pero, principalmente son conocidas por participar en la reparación de proteínas dañadas en condiciones de estrés (Tkáčová y Angelovičova, 2012). Por ello, se dice que su principal función es mediar como chaperonas moleculares, ya que en su mayoría están involucradas en el correcto plegamiento de las proteínas citoplasmáticas y en el retículo endoplasmático rugoso (RER) (Becker y Craig, 1994; Flaherty et al., 1990; Zhang et al., 2011). Las HSPs se agrupan de acuerdo a su peso molecular, entre ellas se han descrito tres principales familias; la HSP70 (68-63 kDa), la HSP90 (85-90 kDa) y HSPs de bajo peso molecular (16-47 kDa) donde se agrupa a la HSP40 (Basu et al., 2002).

Específicamente, la familia HSP90 está involucrada en la formación de diversos componentes del citoesqueleto, así como la regulación de la respuesta de hormonas esteroides (Oksala et al., 2014; Pan et al., 2000). Por su parte, la HSP70 participa en el plegamiento de las cadenas polipeptídicas nacientes, actúa como una chaperona molecular y media la reparación y degradación de las proteínas alteradas o desnaturalizadas (Basu et al., 2002). La HSP70 necesita de la participación de la co-chaperona HSP40, la cual

estimula la hidrólisis de ATP y facilita la entrega de algunos sustratos (Doyle et al., 2013). Se ha demostrado que estas familias de proteínas son sobre-expresadas en los peces durante el estrés incluyendo el causado por el incremento de temperatura (Deane y Woo, 2005), sin embargo para *S. annulatus* no se cuenta, con investigaciones sobre la expresión de los genes que codifican para estas proteínas en condiciones de estrés térmico u otro factor estresante. En este estudio se evaluó la respuesta al estrés térmico del botete diana a partir de la cuantificación de los niveles de expresión de tres genes de *hsp's* (40, 70 y 90) en diferentes tejidos (músculo, branquia, hígado y cerebro) bajo condiciones óptimas de temperatura (TA: 26 °C) así como la expresión de estos mismos genes bajo condiciones de estrés térmico (condiciones: TCM_{max}-5% y consumo de oxígeno) utilizando tejido branquial.

II. ANTECEDENTES

II.1 *Respuestas fisiológicas al estrés en peces*

De acuerdo a Iwama (1998) el estrés puede definirse como *la respuesta de una célula u organismo frente a cualquier demanda que se le presente, de tal manera que ocasione una extensión de un estado fisiológico más allá del estado normal de reposo*. Con base en esta definición, puede decirse que todos los organismos sometidos a algún nivel de estrés deben tener la capacidad de sobrellevarlo, ya que son precisamente estas respuestas las que determinan si el organismo puede adaptarse y sobrevivir o si, por el contrario, muere (Kaur et al., 2011). Los peces, al igual que otros vertebrados, muestran una respuesta al estrés generalizado que se caracteriza por un aumento en los niveles de hormonas del estrés y cambios fisiológicos consiguientes que influyen en su desempeño y pueden manifestarse a nivel de la población entera. En cuanto a las respuestas al estrés celular, la energía se invierte principalmente en el mantenimiento de la homeostasis y de este mantenimiento dependerá el éxito del organismo (Iwama et al., 1999).

La respuesta al estrés en los peces se ha categorizado en tres etapas: respuesta primaria, secundaria y terciaria. La etapa primaria inicia con una respuesta neuroendocrina-endocrina que forma parte de la respuesta general al estrés en los peces. Principalmente, se genera una liberación rápida de hormonas del estrés, como cortisol y catecolaminas en la sangre (Iwama et al., 1999), pero también se induce la expresión de chaperonas moleculares como las HSPs, que ayudan al plegamiento adecuado de las proteínas, las cuales son primordiales para el mantenimiento de la homeostasis celular (Templeman et al., 2014). Las hormonas de estrés activan una serie de vías metabólicas (respuesta secundaria) que derivan en alteraciones en la química y hematología sanguínea e inducen la producción de glucosa (por medio de gluconeogénesis y glucogenólisis) para ser utilizada como fuente de energía en cerebro, branquias y músculo (Iwama et al., 1999). Las respuestas terciarias al estrés se manifiestan como cambios a nivel del organismo y sus poblaciones (productividad y diversidad) ya que, cuando el estrés se mantiene constante y el organismo no puede enfrentarlo adecuadamente, las fuentes energéticas se centran en la supervivencia y se dejan

de lado aspectos como el crecimiento y la reproducción (Iwama et al., 1999; Sokolova, 2013).

II.2 Influencia de la temperatura en la fisiología de peces

La temperatura es una variable ambiental importante que ejerce un fuerte impacto en la distribución, fisiología, crecimiento y reproducción de los peces (Choi, 2010). El aumento de la temperatura en la capa superior del agua disminuye la disponibilidad de oxígeno disuelto para los peces, acelera su metabolismo, altera la tasa de respiración y aumenta la demanda de oxígeno. Los organismos pueden compensar, hasta cierto nivel, los cambios graduales de temperatura, pero los cambios bruscos alteran la homeostasis, convirtiéndose en un factor estresante (Kaur et al., 2011). Los peces ectotermos mantienen su temperatura corporal casi igual a la del medio externo por lo que la temperatura del agua afecta directamente la regulación de su temperatura corporal interna y optimiza procesos fisiológicos necesarios para la supervivencia (Reyes et al., 2011).

Una manera sencilla de visualizar el efecto de algún factor estresante, incluida la temperatura, en el metabolismo de un organismo es el modelo descrito por Sokolova, (2013). En dicho modelo se indica cómo se da la inversión de la energía (ATP) conforme avanza el nivel de estrés, los niveles de estrés se clasifican en cuatro intervalos *optimum* (sin estrés), *pejus* (estrés moderado), *pessimum* (estrés extremo) y *lethal* (estrés extremo seguido de la muerte del organismo). Para cada uno de éstos intervalos se describe cómo, a medida que el nivel de estrés va en aumento, el organismo comienza a dejar de invertir energía en procesos como actividad, crecimiento y reproducción para centrarse en la supervivencia (mantenimiento). Del mismo modo, al ir aumentando los niveles de estrés, el metabolismo inicialmente aeróbico comienza a modificarse hacia metabolismo anaeróbico (Descripción más detallada se muestra en la Figura 1).

Una respuesta eficaz contra el incremento de temperatura crónica y aguda es la inducción de HSPs (Templeman et al., 2014). Analizando el modelo anterior, se observa que la inducción de HSPs sucede en el intervalo *pejus*, es decir a condiciones de estrés moderado, ya que es precisamente en este intervalo donde se invierte energía adicional para protección ante el estrés (Sokolova, 2013).

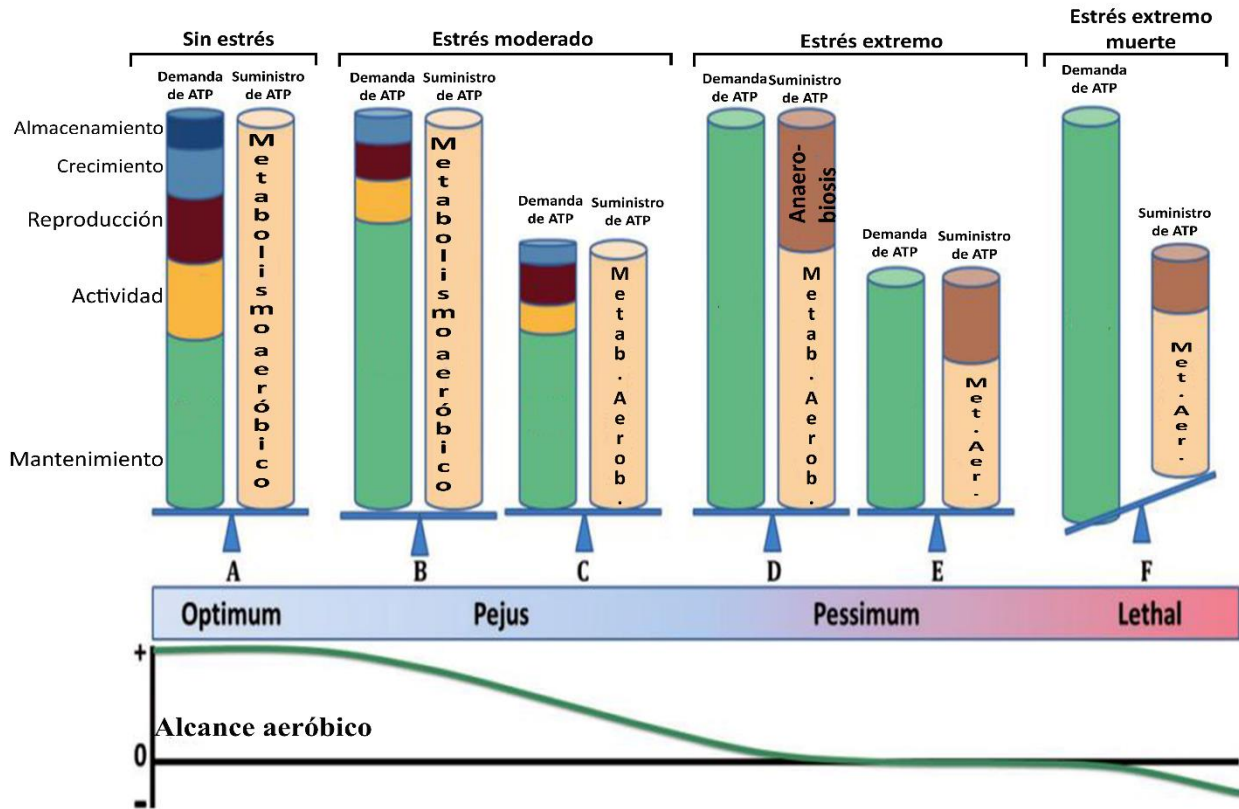


Figura 1. Marco bioenergético para evaluar los impactos del estrés en la fisiología de un organismo. Las funciones que demandan energía se muestran en el lado izquierdo de cada escala. La asignación relativa de energía a diferentes procesos que demandan energía es variable entre especies y etapas de vida, pero el tamaño de las casillas correspondientes no refleja la asignación energética real. El ATP para estos procesos se proporciona mediante el metabolismo aeróbico (color crema) y anaeróbico (color marrón) que se muestra en el lado derecho en cada escala. En el intervalo *optimum* (A), el alcance aeróbico es máximo y el suministro de ATP aeróbico es suficientemente alto para cubrir los costos metabólicos basales e invertir en actividad, crecimiento, reproducción y desarrollo. El exceso de energía se deposita en compuestos de almacenamiento tales como glicógeno o lípidos. Durante el estrés moderado en el rango *pejus*, los costos de mantenimiento aumentan y satisfacen las demandas de energía adicional para la protección contra el estrés y para reparar el daño (B), o (dependiendo del estresor) la asimilación de alimentos y / o la capacidad para el metabolismo aeróbico se deterioran (C) que conduce a una disminución en el alcance aeróbico. El almacenamiento de energía está ausente o reducido en estas condiciones. Durante el estrés extremo en el intervalo de *pessimum*, el aumento progresivo de la demanda de ATP para el mantenimiento y / o el deterioro progresivo del metabolismo aeróbico sobrepasa el suministro de ATP mediante el metabolismo aeróbico (D). El alcance aeróbico desaparece y el metabolismo cambia a anaerobiosis parcial que alimenta los costos esenciales de mantenimiento y apoya el tiempo de supervivencia limitada del organismo. En algunas especies, la supervivencia en el intervalo de *pessimum* puede ser mejorada por una depresión de la tasa metabólica (E) que reduce las tasas de renovación de la energía a expensas del cierre de las funciones exigentes de ATP que no son esenciales para la supervivencia inmediata. Cabe señalar que el equilibrio energético se interrumpe temporalmente durante las transiciones entre los intervalos *optimum*, *pejus* y *pessimum*, pero finalmente se restablece a medida que el organismo se aclimata o climatiza a estas condiciones. En el intervalo *lethal* de las condiciones ambientales (F), el equilibrio de la oferta y la demanda de ATP se interrumpe permanentemente, dando como resultado un alcance aeróbico negativo y la muerte final del organismo; Esto ocurre en presencia o ausencia de parada metabólica. La supervivencia a largo plazo de la población sólo es posible en los intervalos *optimum* y *pejus*, aunque pueden tolerarse transiciones temporales en el intervalo de *pessimum*, siempre que la duración del tiempo que un organismo gaste bajo condiciones *optimum* y *pejus* sea suficiente para permitir el desarrollo, Crecimiento y reproducción (Modificado de Sokolova, (2013); (2012)).

II.3 Proteínas de Choque Térmico (HSPs)

Cuando las células se encuentran sometidas a algún tipo de estrés generalmente responden a este manifestando cambios en la expresión génica, lo que desencadena la regulación de la producción de los niveles en sangre y tejidos de un grupo de proteínas denominadas Proteínas de Choque Térmico (HSPs por sus siglas en inglés) (Roberts et al., 2010).

Las HSPs son a menudo conocidas como proteínas de estrés, debido a que pueden ser inducidas por la temperatura y también por factores oxidantes, toxinas, metales pesados, radicales libres, virus, entre otros factores de estrés (Mahmood et al., 2014; Roberts et al., 2010). Los genes de las HSPs (genes *hsp*s) se encuentran altamente conservados a través de la evolución (Sørensen et al., 2003), por ejemplo, el nivel de identidad de aminoácidos entre todas las proteínas HSP70 procariotas y eucariotas es de aproximadamente el 50% (Parsell y Lindquist, 1993).

Este grupo de proteínas fue descubierto por primera vez en células de la glándula salival de moscas de la fruta *Drosophila busckii* y *D. melanogaster* poco después de un choque de calor (Ritossa, 1962). La función principal de las HSPs es como chaperonas moleculares al ayudar a las células a realizar un correcto plegamiento de proteínas cuando han sido sometidas a algún tipo de estrés, incluyendo el causado por incremento de la temperatura. Además, se ha demostrado que, aunque estas chaperonas ayudan a la célula a protegerse y resistir los efectos adversos del estrés, las *hsp*'s también son esenciales en condiciones normales de crecimiento (Becker y Craig, 1994).

Los chaperones moleculares incluyendo las HSPs intervienen en casi todas las funciones celulares. Debido a ello, pueden encontrarse en muchos de los compartimientos de las células como el citoplasma, mitocondrias y retículo endoplásmico (Doyle et al., 2013) y en condiciones de estrés celular protegen a las células gracias a su capacidad de reconocer polipéptidos nacientes, regiones no estructuradas de proteínas y tramos hidrofóbicos expuestos de aminoácidos. Lo cual les permite sostener, translocar o replegar

proteínas desnaturalizadas por estrés y prevenir así su agregación irreversible con otras proteínas en la célula (Nollen y Morimoto, 2002). Para realizar estas actividades, la mayoría de las HSPs utilizan la unión y/o hidrólisis de ATP como fuente de energía (Clare y Saibil, 2013).

Como se ha mencionado anteriormente, las HSPs se encuentran agrupadas de acuerdo a su peso molecular en kDa, dividiéndose de este modo en varias familias. Dentro de estas destacan tres familias principales: HSP70, HSP90 y HSP40. En la tabla 1 se muestra una descripción más detallada de las funciones de cada una de estas familias, realizada por Parsell y Lindquist (1993), la cual está basada en las observaciones de estudios realizados con tres organismos modelo: la bacteria *Escherichia coli*, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*.

Finalmente, una característica destacable de las HSPs es que la mayoría de sus genes inducibles no contienen intrones, esto evita todo el proceso de empalme alternativo, lo que genera que el ARN mensajero se traduzca rápidamente, formando péptidos y proteínas funcionales solo unos minutos después de la exposición al estrés (Basu et al., 2002; Iwama et al., 1998). En tilapia, por ejemplo, la ausencia de intrones en *hsp70* se relaciona con la preferencia de síntesis en condiciones de estrés celular (Molina et al., 2000). A pesar de que las HSPs tienen una vida media relativamente corta, sus niveles en los organismos se mantienen elevados mucho después de que se elimina el factor estresante (Basu et al., 2002). Debido a esta persistencia, se ha planteado que el aumento en los niveles de las HSPs induce la tolerancia de las células, tejidos y del organismo entero a factores estresantes posteriores, lo cual sugiere la posibilidad de desarrollar estrategias para aumentar la tolerancia al estrés mediante la inducción de la respuesta al estrés celular.

Tabla 1. Descripción de tres de las principales familias de HSPs (*hsp90*, *hsp70* y *hsp40*). Recuperado y modificado de (Parsell y Lindquist, 1993).

Familia proteica	Miembros de la familia	Localización en eucariotas	Funciones en estrés	Otros comentarios
<i>hsp90</i>	<i>hsp82</i> , <i>grp94</i> , HtpG	Citoplasma, RE, núcleo	<ul style="list-style-type: none"> • Esencial para la viabilidad (levadura <i>hsp / c82</i>) • Mayor concentración necesaria para el crecimiento a temperaturas más altas (levadura) 	<ul style="list-style-type: none"> • Dímero • Asociados con inmunofilinas, <i>hsp70</i>, actina, tubulina, receptores de hormonas esteroides, quinasas relacionadas con src • Promueve la actividad de la caseína quinasa II, los receptores de hormonas esteroides, la quinasa v-src; Reprime los receptores y kinasas-src mientras está asociado • Puede tener actividad de acompañamiento general • Actividad ATPasa
<i>hsp70</i>	DnaK, <i>grp78</i> , <i>hsc70</i> , BiP, Kar2, Ssa, Ssb, Ssc	Citoplasma, núcleo, mitocondria, cloroplastos, RE	<ul style="list-style-type: none"> • Chaperona molecular necesaria para el ensamblaje de proteínas, secreción, importación en ER y orgánulos • Proteínas inducibles por calor necesarias para el crecimiento a temperaturas moderadamente altas (levadura, <i>E. coli</i>) • Promueve la supervivencia a temperaturas extremas (levadura, <i>Drosophyla</i>, mamíferos) • Facilita la proteólisis de proteínas anormales (<i>E. coli</i>) • Regula negativamente la síntesis de <i>hsp</i> (<i>E. coli</i>, levadura, <i>Drosophila</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> • Monómero, dímero; Oligomerización de orden superior puede servir para inactivar proteínas • Une proteínas y péptidos desplegados • Coopera con <i>hsp60</i> en el montaje de proteínas mitocondriales y el plegado de sustratos desnaturalizados • Asociación con DnaJ (<i>hsp40</i>) y GrpE influye en la interacción con los sustratos y promueve la hidrólisis del ATP • Asociados con <i>hsp90</i> • Actividad ATPasa
<i>hsp40</i>	Scjl, Ydjl, Sisl, Hdjl, Sec63, ResA	Citoplasma, membranas	<ul style="list-style-type: none"> • Trabaja con <i>hsp70</i> para promover la reactivación de sustratos dañados por el estrés • Facilita la proteólisis de proteínas anormales (<i>E. coli</i>) • Regula negativamente la síntesis de <i>hsp</i> (<i>E. coli</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> • Dímero • Se asocia con otras <i>hsps</i>, incluyendo <i>hsp70</i>, GrpE, <i>hsp90</i> • Se liga a ambos sustratos de proteínas plegados y desplegados • Ayuda a DnaK (<i>hsp70</i>) a unirse varios sustratos

II.4 Niveles de expresión de hsp's en diferentes órganos

Las HSPs se expresan en todos los organismos en condiciones normales (no estresantes). Sin embargo, bajo condiciones de estrés son sobre expresadas, es decir, se genera un número de copias, para estos genes, significativamente mayor al que normalmente se tiene. Son pocos los estudios que han evaluado su expresión comparativa en los diferentes tejidos de un organismo. En estudios realizados en peces, se ha observado que las HSPs se expresan de manera ubicua, tanto en condiciones estresantes como no estresantes. Algunos de estos estudios se resumen en esta sección.

Zhang et al. (2011) evaluaron los niveles de expresión de *hsp90* del pargo cabezón (*Lutjanus sanguineus*) después de una infección bacteriana encontrando la mayor expresión en riñón, bazo, timo e hígado y la menor en corazón, mientras que Ni et al. (2014) compararon los niveles de expresión de *hsp70* y *hsp90* en el esturión japonés (*Acipenser schrenckii*), los cuales fueron más altos en hígado, corazón y bazo. En el pez roca coreano (*Sebastes schlegeli*), se registró baja expresión de *hsp70* en el estómago, la grasa y los ciegos pilóricos, mientras que el más alto fue en hígado, branquia y riñón anterior (Mu et al., 2013). En la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) se encontró mayor expresión en branquia, seguido de músculo, piel, corazón y riñón anterior, mientras que los niveles más bajos se registraron en estómago, intestino e hígado (Zhang et al., 2014). En la corvina roja (*Sciaenops ocellatus*), los niveles más altos se obtuvieron en corazón, seguido de bazo e hígado, mientras que el nivel más bajo fue en músculo (Dang et al., 2010). Por último, los niveles de expresión más altos en el neón chino (*Tanichthys albonubes*), fueron en hígado seguido de músculo, intestino y branquias, mientras que los niveles más bajos se obtuvieron en aleta, seguido de ovario, cerebro y ojo (Jing et al., 2013). En conclusión, los resultados de estos estudios muestran que no existe un órgano específico para la síntesis de *hsp's* sino que varía de acuerdo a la especie. En particular, aún no se han realizado estudios que determinen el patrón de expresión de *hsp's* en diferentes tejidos de *S. annulatus*.

II.5 Estudios previos de expresión de hsp's en peces bajo factores de estrés.

La mayoría de datos sobre HSPs en peces se han obtenido a partir de estudios proteómicos y existen pocos estudios de niveles de expresión génica en este taxa (Safari et al., 2014). De todas las familias de HSPs, la HSP70 ha sido la más estudiada. Esta juega un papel clave y puede funcionar como un biomarcador de estrés, ya que refleja el daño celular en las proteínas (Deane y Woo, 2005; Ming et al., 2010), mejora la supervivencia celular y aumenta la tolerancia a los factores de estrés ambiental o daño celular (Ming et al., 2010), el gen *hsp70* es altamente inducido después de una exposición a factores estresantes, particularmente durante un choque térmico agudo (Deane y Woo, 2005).

Los estudios realizados para *hsp70* bajo algún factor estresante abarcan varias especies de peces como la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), donde se detectaron altos niveles causados por intoxicación con deltametrina (Atamanalp y Erdoğan, 2010; Ceyhun et al., 2010). En el neón chino (*Tanichthys albonubes*) incrementaron los niveles de *hsp70* ante diferentes concentraciones de cadmio (Jing et al., 2013). En cuanto a la temperatura como factor estresante, se ha comprobado que *hsp70* se sobreexpresa después de un choque térmico agudo en especies de peces como la dorada amarilla (*Sparus sarba*) (Deane y Woo, 2005), la Carpa de Wuchang (*Megalobrama amblycephala*) (Ming et al., 2010), el pez cabeza de serpiente moteada (*Channa punctata*) (Kaur et al., 2011) y el falso halibut del Japón (*Paralichthys olivaceus*) (Choi, 2010).

La cantidad de estudios sobre *hsp90* en peces se reduce aún más y estos se basan principalmente en análisis proteómicos. En dichos estudios, se evaluó la expresión de este gen bajo diversos factores de estrés. Por ejemplo, para el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) se evaluó la expresión de *hsp90* bajo estrés térmico y osmótico, encontrando una sobreexpresión después de la exposición a los factores estresantes, Los resultados de ese estudio muestran que la expresión de *hsp90* bajo estrés térmico se incrementa 132% en lamelas branquiales y 117% en tejido renal (Pan et al., 2000). Padmini et al. (2008) evaluaron la expresión de este gen en el mújol gris (*Mugil cephalus*) en ambientes naturales, encontrando una mayor expresión en el ambiente contaminado con residuos

industriales en comparación a uno no contaminado. Los estudios en los cuales se ha trabajado expresión génica directamente, y no con la proteína, son aún más escasos, un ejemplo, son los estudios del pez globo (*Takigufu obscurus*), donde la expresión del gen *hsp90* aumentó después de la exposición a amoníaco (Cheng et al., 2015) y a bisfenol-A (BPA) un producto químico que altera el sistema endocrino. El cual es utilizado como un monómero primario en resinas de policarbonato y plásticos (Kim et al., 2013). Otro ejemplo es el estudio del pargo cabezón (*Lutjanus sanguineus*), donde los niveles de expresión de *hsp90* aumentaron significativamente después de una infección bacteriana (Zhang et al., 2011).

Por último, *hsp40* ha sido el gen menos estudiado en peces. Un estudio muestra que, en el falso halibut del Japón (*Paralichthys olivaceus*), el gen *hsp40* se sobreexpresó significativamente después de un tratamiento viral y al exponerlo a un choque térmico (Dong et al., 2006). Actualmente, no existen estudios donde se evalué la expresión de *hsp's* inducidas por estrés térmico u otro factor estresante en *S. annulatus*.

II.6 Aclimatación en peces

La temperatura de aclimatación ejerce un efecto importante en la tolerancia a la temperatura de la mayoría de las especies de peces de América del Norte (Beitinger et al., 2000) y se define como el proceso por el cual se modifica la maquinaria celular al exponer a un organismo a una nueva condición ambiental, permitiendo así enfrentarse exitosamente al nuevo ambiente (Currie et al., 2000). Dicho proceso está relacionado con aspectos fisiológicos del organismo, como las condiciones de temperatura óptima o temperatura preferida, la cual dependerá de la temperatura de aclimatación previa (Muller, 1977).

La respuesta de choque térmico también se ve influenciada por la temperatura de aclimatación del organismo, ya que las temperaturas de aclimatación afectarán los niveles basales de *hsp's* en los peces (Currie et al., 2000; Das et al., 2005; Deane et al., 2007; Prunet et al., 2008; Shi et al., 2015).

II.7 Temperatura Crítica Máxima (TCMax)

El conocer la tolerancia térmica de las especies de peces ha resultado de gran interés para el estudio de la fisiología de peces, así como para la optimización de su cultivo a lo largo del tiempo. Por lo tanto, se han utilizado diversos ensayos, dentro de los cuales el más destacado y empleado por diversos autores se conoce como CTM (Critical Thermal Methodology). Dicho ensayo consiste en estimar la tolerancia térmica, exponiendo a los peces a una tasa constante de aumento o disminución de la temperatura del agua, que sea lo suficientemente lenta para rastrear la temperatura corporal, pero lo suficientemente rápida para prevenir la aclimatación térmica durante el ensayo (Fangue y Bennett, 2003). El ensayo CTM incluye tanto los valores de temperatura críticos máximos (TCMax) como mínimos (TCMin).

Los ensayos de TCMax tienen varias aplicaciones potenciales, por ejemplo, la evaluación de la interacción de temperaturas de estrés en la fisiología de peces (Patra et al., 2007). La determinación de la temperatura crítica máxima TCMax requiere un cambio progresivo de aumento de temperatura (0.1 a 1 °C por minuto) partiendo de la temperatura de aclimatación hasta la exposición de una respuesta de desorganización física. Generalmente, la pérdida de equilibrio del pez es el criterio de valoración para las pruebas de TCMax (Becker y Genoway, 1979).

Existen algunos estudios que determinan la tolerancia térmica de *Sphoeroides annulatus* por medio del ensayo TCM. Reyes et al. (2011) reportan que los valores de TCMax varían de acuerdo a las temperaturas de aclimatación (TAs) en las que a mayor TA, mayor valor de TCmax. Además observaron un aumento de 3.4 °C en la tolerancia térmica a medida que la temperatura de aclimatación se elevó de 19 a 31 °C.

II.8 Consumo de oxígeno y estrés

El consumo de oxígeno y, por ende, el gasto energético que lleva a cabo un organismo bajo cierta condición puede medirse por medio de un equipo denominado respirómetro, el cual está conformado por varias cámaras respirométricas. La medición de la tasa de consumo de oxígeno (OCR por siglas en inglés) en los organismos acuáticos incluyendo los peces, se utiliza como método para evaluar el efecto de factores ambientales, tales como temperatura, salinidad, exposición a contaminantes, intensidad luminosa y oxígeno disuelto. (Reyes et al., 2011). La medición de la OCR se realiza con un sistema de respirómetro semi-abierto como el descrito por Díaz et al. (2007).

La metodología por la cual se mide el consumo de oxígeno y su relación con los cambios de temperatura en peces, se lleva a cabo utilizando los valores previamente calculados de TCMax ajustados al 95% (TCMax-5%), de esta forma se lleva a los organismos lo más cercano a su límite térmico pero sin comprometer su supervivencia. Ya que, si se utilizaran los valores reales de TCMax los organismos se encontrarían en un alto nivel de agotamiento y posiblemente no soportarían el proceso de medición de oxígeno correspondiente a cada TA. Esto debido a que durante la determinación de las TCMax se culminó con la pérdida del equilibrio lo cual es un punto subletal. Es decir, para que los organismos logren sobrevivir deben removerse de forma inmediata y colocarse en su TA previa (Reyes, 2009).

El ajuste antes mencionado, sobre la Temperatura Crítica Máxima, fue determinado por la metodología de Paschke et al. (2017). Actualmente el mismo autor ha recomendado una reducción de un 10% a la TCMax para la medición del consumo de oxígeno. El hecho de que en este trabajo se hayan utilizado los valores de TCMax-5% nos dice que estuvimos más cerca del umbral de tolerancia térmica de los organismos.

La tasa de respiración y su dependencia de la presión parcial de oxígeno están directamente relacionadas con el trabajo metabólico y el flujo de energía de un organismo los cuales a su vez pueden estar involucrados en los mecanismos de control de la

homeostasis (Salvato et al., 2001). Una tasa alta de consumo de oxígeno, implica que el organismo está haciendo uso del metabolismo aeróbico para llevar a cabo sus funciones de forma óptima (menor estrés/o sin estrés), mientras que una tasa metabólica menor indica que el organismo está llegando al límite en cuanto al uso del metabolismo aeróbico y está utilizando también su metabolismo anaeróbico (mayor estrés), en estas condiciones, al organismo le queda cada vez menor cantidad de energía libre para utilizar en aspectos como el crecimiento y la reproducción (Brougher et al., 2005) ya que la mayoría de la energía se centra en la sobrevivencia del organismo.

Los datos sobre el consumo de oxígeno pueden correlacionarse con los niveles de expresión de *hsp's* debido a que ambas variables se encuentran relacionadas con el estrés. Es decir, tasas de consumo de oxígeno menores deben obtener niveles de expresión de *hsp's* mas altos y tasas de consumo de oxígeno mayores obtendrán niveles de expresión de *hsp's* más bajos.

III. JUSTIFICACIÓN

Los peces ofrecen una alternativa y un excelente sistema para investigar los genes de HSPs, ya que, al ser ectotermos, pueden soportar más las variaciones en la temperatura ambiental. La temperatura es un factor importante que influye en aspectos fisiológicos (crecimiento y reproducción) y ecológicos (distribución) de las especies. El botete diana, resulta de interés al ser una especie considerada estuarina que se enfrenta a constantes cambios ambientales y estrés térmico. Por otro lado, al ser una especie de actual relevancia para la acuicultura, conocer aspectos sobre su fisiología es de utilidad para hacer más eficiente su cultivo. La evaluación de *hsp's* ayuda a identificar las condiciones en las que se presentan evidencias de estrés térmico (o cualquier otro factor de interés) que pueden reflejarse posteriormente en deficiencias de crecimiento o incluso calidad de la carne.

Debido a la relevancia de las funciones de las HSPs en la resistencia al estrés (principalmente el correcto plegamiento de proteínas), es importante investigar las características de expresión de los genes de estas proteínas bajo factores estresantes (Ming et al., 2010). En este estudio, se pretende obtener el patrón de expresión de tres genes de *hsp's* 40, 70 y 90, en diferentes tejidos bajo condiciones óptimas. Además se busca evaluar sus niveles de expresión utilizando únicamente tejido branquial, pero, bajo diferentes condiciones de temperatura. La mayoría de los estudios en peces se basan únicamente en el análisis de una HSP: *hsp70*, por lo tanto, es fundamental la evaluación de la expresión de otros genes de estas chaperonas. En este estudio, se examinaron los patrones de expresión de tres genes de estrés (*hsp40*, *hsp70* y *hsp90*), para determinar cómo estos intervienen en la respuesta al estrés térmico y evaluar su potencial como bioindicadores de estrés térmico para *S. annulatus*.

IV. OBJETIVOS

IV.1 Objetivo General

- ❖ Evaluar la respuesta de botete diana *Sphoeroides annulatus* a diferentes condiciones de temperatura utilizando como indicadores de estrés los niveles de expresión de *hsp*'s.

IV.2 Objetivos Particulares

1. Obtener el patrón de expresión de tres genes que codifican para proteínas de estrés (*hsp40*, *hsp70* y *hsp90*) en diferentes tejidos de *S. annulatus* a la temperatura de aclimatación óptima (26° C por García-Villarreal, 2016).
2. Evaluar los niveles de expresión de tres genes que codifican para proteínas de estrés (*hsp40*, *hsp70* y *hsp90*) en branquias de *S. annulatus* bajo diferentes condiciones de temperatura (20, 26 y 32 °C) y tres condiciones experimentales (TAs, TCMax-5% y consumo de oxígeno).
3. Analizar los niveles de expresión génica con respecto a la tolerancia a cambios de temperatura cuando los organismos se expusieron a TCMax-5%.

V. HIPOTESIS

1. Los genes *hsp40*, *hsp70* y *hsp90* se expresan en branquias, músculo, hígado y cerebro de manera diferencial bajo condiciones de temperatura óptima de aclimatación (TA: 26° C).
2. Los genes *hsp40*, *hsp70* y *hsp90* se sobre expresan en los organismos expuestos a estrés térmico como el que se presenta en TCM_{Max} modificada al 5%. Y la mayor expresión se obtiene en los organismos de la TA de 32°C lo cual correspondería a un mayor nivel de estrés térmico.
3. Los altos niveles de expresión de *hsp40*, *hsp70* y *hsp90* se correlacionan con menor tolerancia a altas temperaturas y es factible su uso como bioindicadores de estrés térmico para *S. annulatus* ya que de acuerdo a Sokolova, (2013) a partir de un rango de estrés moderado se obtiene una elevada expresión de HSPs.

VI. METODOLOGÍA

VI.1 Obtención de muestras

Los experimentos se desarrollaron utilizando muestras obtenidas a partir de un bioensayo realizado de enero a marzo del 2015 en el Departamento de Biotecnología Marina del Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (CICESE). El bioensayo consistió en el mantenimiento de los organismos a 26 °C (temperatura óptima) con aireación y recambios de agua oceánica constantes. Los organismos se alimentaron diariamente con trozos de calamar “baby” (*Loligo opalescens*) de acuerdo a lo reportado por García-Villarreal (2016).

La aclimatación de los organismos se realizó a partir de la temperatura óptima (26 °C) con 3 diferentes temperaturas experimentales de aclimatación (TA: 20, 26 y 32 °C) utilizando grupos de 15 organismos. Cabe mencionar que, aunque los bioensayos realizados por Garcia-Villarreal (2016) consistieron en la evaluación de 5 diferentes temperaturas de aclimatación, para el desarrollo de este trabajo se utilizaron únicamente tres de ellas (TA: 20, 26 y 32 °C).

Posteriormente, se realizó un experimento para determinar la temperatura crítica máxima tolerada por los organismos (TCMax), utilizando 10 organismos para cada temperatura de aclimatación. Los peces pasaron un mínimo de 21 días a la temperatura de aclimatación correspondiente y se mantuvieron en ayuno de 24 horas antes de llevar a cabo el experimento. Después, estos fueron colocados en estanques de 50 L con un nivel de agua constante de 10.5 cm, dejándolos en reposo por un periodo de 25 minutos antes del ensayo para evitar estrés por manipulación. Una vez transcurrido el tiempo de reposo, se procedió al aumento de la temperatura de forma gradual (1 °C por minuto). La figura 2 muestra un gráfico con los datos para las evaluaciones de TCMax (García-Villarreal, 2016; Reyes, 2009).

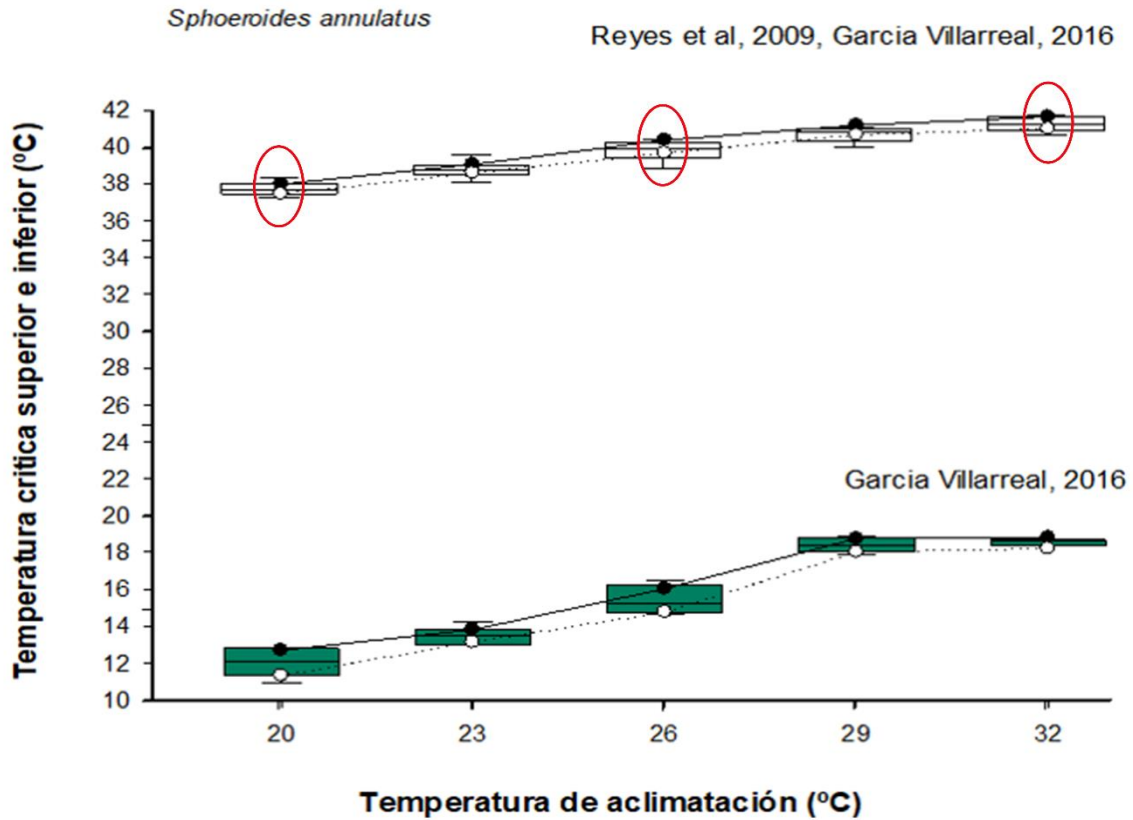


Figura 2. Gráfico de datos para para las evaluaciones de TCMax, círculos en rojo muestran corresponden a las TAs utilizadas en este trabajo (Tomado de García-Villarreal, (2016).

Tabla 2. Condiciones experimentales de TCMax-5% a las que fueron sometidos los peces para la evaluación de la expresión de *hsp*'s en botete diana *Sphoeroides annulatus* (García-Villarreal, 2016).

TA (°C)	TCMax (°C)	TCMax-5% (°C)
20	37.7	36
26	40	38
32	41.3	39

Después de obtener la TC_{max}, se realizó un último ensayo para la determinación del consumo de oxígeno para cada una de las temperaturas de aclimatación. El ensayo consistió en someter a los organismos a la temperatura correspondiente a la TC_{Max}-5% (Tabla 2) y se pasaron a un respirómetro, donde se mantuvieron por cinco minutos, tomando mediciones cada 30s, para determinar el consumo de oxígeno de los organismos en cada temperatura de aclimatación (Figura 3). La figura 4 corresponde al gráfico obtenido por García-Villarreal, (2016) se muestran los resultados de consumo de oxígeno para las diferentes TAs. Finalmente, se realizaron disecciones de los organismos, los cuales fueron previamente anestesiados (2-phenoxyethanol) y se colectaron las muestras para su posterior análisis (Tabla 3). Ver García-Villareal (2016) para más detalles de esta metodología.

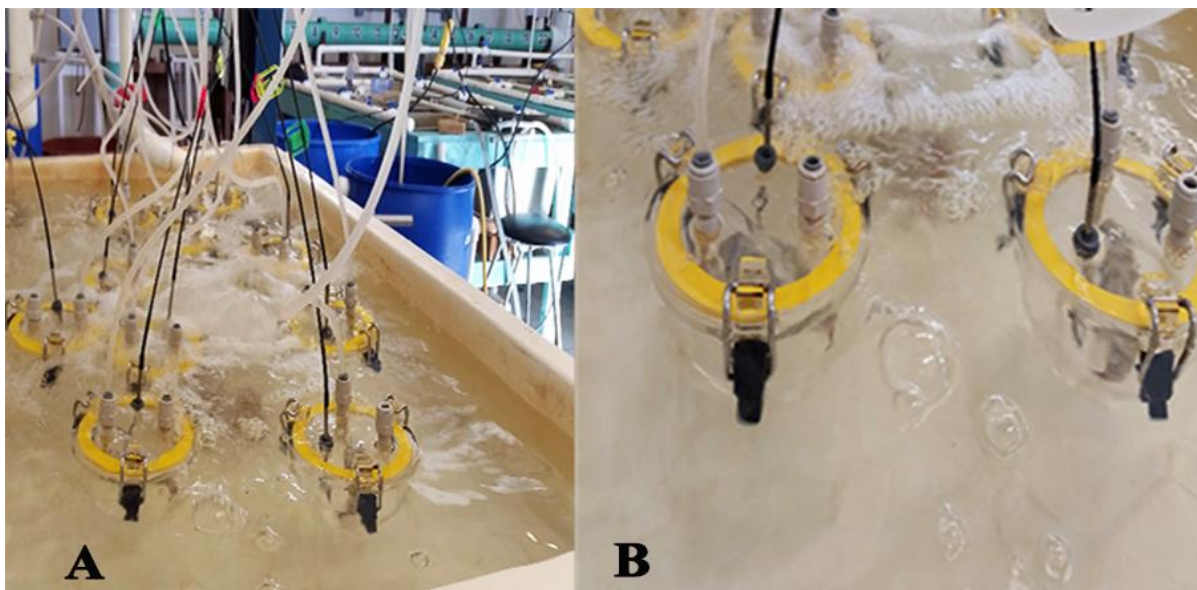


Figura 3. Sistema de respirómetro utilizado durante el bioensayo para determinar el consumo de oxígeno. **A**; respirómetro vista panorámica; **B**: cámaras respirométricas vistas de cerca, cada una de ellas contenía un ejemplar.

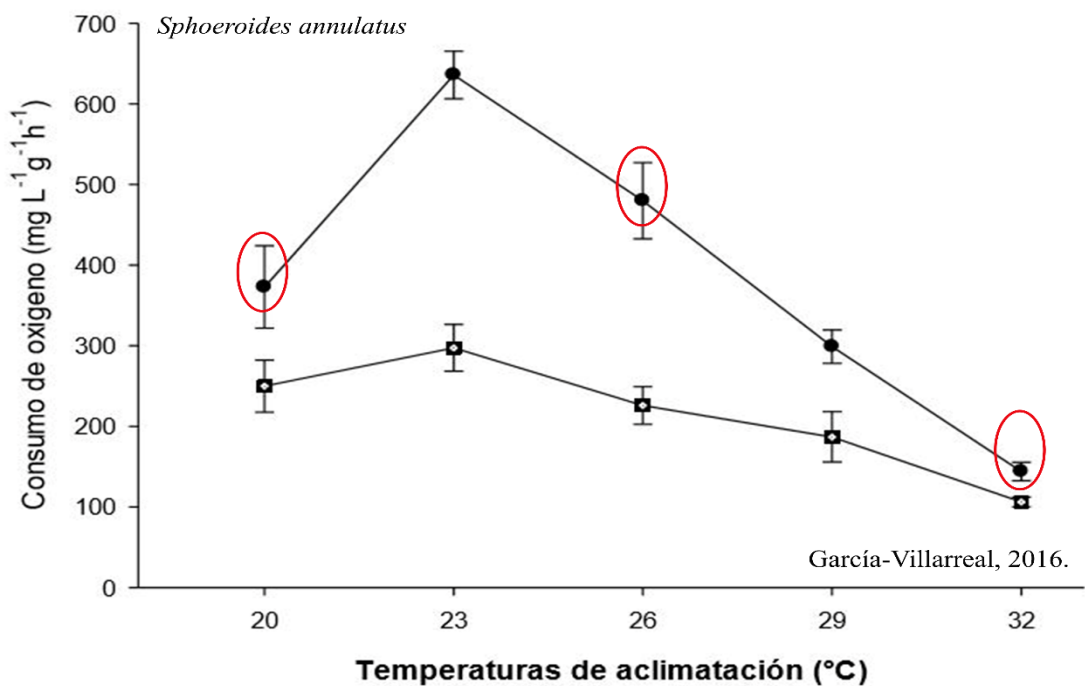


Figura 4. Gráfico de resultados para el consumo de oxígeno en cada temperatura de aclimatación. Círculos en rojo muestran los resultados obtenidos para las TAs utilizadas en este trabajo (Tomado de García-Villarreal, (2016).

Tabla 3. Condiciones a las que fueron tomadas las muestras de tejidos. Se realizaron diferentes tratamientos para la evaluación de *hsp*'s en *S. annulatus* (TA: temperatura de aclimatación; TCmax-5%: temperatura crítica máxima ajustada al 95%).

TA (°C)	Órgano	Control (n)	TCMax (-5%)	Respirómetro (n)	Medio de conservación
20	Branquia	5	5	5	RNA-Later
26	Branquia, hígado, músculo y cerebro	10	5	5	RNA-Later
32	Branquia	5	5	5	RNA-Later

n=número de individuos.

VI.2 Extracción de ARN total

A partir de los tejidos preservados descritos en la tabla 3 se realizaron extracciones de ARN total. Todo el material utilizado para este proceso fue previamente esterilizado y tratado con DEPC (dietil pirocarbonato) el cual es un inhibidor de ARNasas. Este tratamiento es indispensable para evitar la degradación del ARN.

El ARN total de todas las muestras se obtuvo por medio de la técnica de TRI-Reagent (SIGMA). Se cortaron y pesaron 50 mg de tejido de las muestras preservadas (Tabla 3). Cada fragmento se enjuagó en 500 μ L de agua DEPC, se homogeneizó en 500 μ L de TRI Reagent, se centrifugó en frío (4 °C) a 12,000g durante 10 minutos, se recuperó el sobrenadante y se incubó a temperatura ambiente 5 minutos. Además se adicionaron 50 μ L de 1-bromo-3-cloropropano (se agitó vigorosamente por 15s) seguido de una incubación a temperatura ambiente de 3 minutos y centrifugación en frío de 15 minutos a 12,000g. Después, se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo. El ARN total se precipitó con 150 μ L de 2-propanol, se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos y centrifugó en frío por 10 minutos a 12,000g. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se lavó una vez con 500 μ L de etanol al 75%, se centrifugó en frío durante 5 minutos a 12,000g y se eliminó el etanol. El pellet se dejó secar a temperatura ambiente por 5 minutos y se disolvió en 80 μ L de H₂O ppi. Posteriormente, todas las muestras de ARN fueron tratadas con ADNasa I (Invitrogen™) para eliminar cualquier posible contaminación por ADN genómico (protocolo en anexos). Las muestras se almacenaron a -70 °C hasta su uso posterior.

VI.3 Síntesis de ADNc por RT

La síntesis de ADN complementario se realizó siguiendo el protocolo para 1-5 μ L de ARN total SIGMA. El protocolo se compone de dos reacciones. La primera reacción consiste en utilizar 2 μ L de dNTPs (10 mM), 2 μ L de oligodT (0.70 uM), 1000 ng de ARN total y H₂O ppi hasta completar un volumen de reacción de 20 μ L. Esta reacción se incubó a -70 °C por 10 minutos. Después, se añadió la reacción 2, en la cual se agregaron 4 μ L de

M-MLV RT-Buffer (5X) (Promega), 2 μ L de M-MLV RT-Enzima (Promega), 0.6 μ L de inhibidor de RNasa (invitrogen: 30-50 u/ μ l) y 6.7 μ L de H₂O ppi obteniendo un volumen final de 40 μ L. Se incubó a 37 °C por una hora, seguido de otra incubación a 80 °C por 10 minutos para desactivar la enzima. Las muestras se conservaron a -20 °C para su uso posterior en PCR de punto final y PCR en tiempo real.

VI.4 Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final

Se realizó la amplificación de los genes de *hsp40*, *hsp70* y *hsp90* por medio de PCR de punto final. Los cebadores se diseñaron utilizando el programa GENEIOUS v.8.0.1 y se analizaron por medio del programa Vector NTI® v.11.5. (Invitrogen). Se utilizaron cebadores específicos previamente publicados para el gen *hsp40* (Barrón-Vivanco et al., 2005). Se diseñaron cebadores específicos a partir de la secuencia del gen *hsp90* para *S. annulatus* registrada en el Gen-Bank (AY394438.1). Por último, se diseñaron cebadores degenerados por medio de un alineamiento múltiple para lograr amplificar la secuencia parcial de *hsp70* de botete y, a partir de ella, diseñar cebadores específicos para qPCR (Tabla 4).

Tabla 4. Cebadores utilizados para la amplificación de *hsp*'s de *S. annulatus*. Los cebadores marcados con * se utilizaron también para PCR en tiempo real.

Gen	Fragmento (pb)	Cebador F (5'-3')	Cebador R (5'-3')
<i>hsp40</i> * (Barrón-Vivanco et al., 2005)	172	GCCTATTTAAGGAGAGCTCAG TGC	CGCCCAGAACCCTGTAGTAATCT T
<i>hsp70</i>	606	GGCACCACCTACTCCTG	CNCRATBGTCAGGATGG
<i>hsp70</i> *	309	GCCGAAAATCCAGGTAG	CCTCCTCCCAGGTCAAAG
<i>hsp90</i> *	102	CATCAACAACCTGGGCACC	CCCCTCCGAACTGACCG

Una vez obtenidos los cebadores, se realizó la estandarización del PCR de punto final para verificar la amplificación, así como las condiciones de reacción óptimas de cada gen a evaluar. Finalizada la estandarización, se realizaron PCRs de punto final con algunas de las muestras de ADNc y así verificar la síntesis realizada por medio de la retrotranscripción.

Las reacciones de PCR (con un volumen final de 25 μ L) consistieron en 1 μ L del template de cDNA, 10 μ L de Gotaq master-mix (Promega), 1 μ L de cada cebador (10 μ M cada uno) y H₂O ppi (hasta completar volumen final). La amplificación por PCR se realizó en un termociclador eppendorf *Mastercycler*® personal, con los siguientes parámetros: 95 °C por 7 min, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 30s, temperatura de alineamiento (*T_m*) para cada gen (*hsp40*: 59.5 °C, *hsp70*: 49.5 °C y *hsp90*: 55 °C) por 30s, 72 °C por 45s y una elongación final a 72 °C por 10 minutos. Las amplificaciones se corroboraron por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los productos de PCR obtenidos para cada gen se purificaron y enviaron a secuenciar a SEXCEL en San Diego, CA. Las secuencias obtenidas fueron analizadas utilizando el programa GENEIOUS v.8.0.1. La comparación de similitud de nucleótidos para verificar que se tratase del gen deseado se realizó utilizando BLAST en NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). La secuenciación de los genes *hsp40* y *hsp90* se realizó para comprobar el amplicón, mientras que para *hsp70* la secuencia obtenida se sometió a Gen-Bank NCBI y se utilizó para el diseño de cebadores específicos utilizados en PCR en tiempo real.

VI.5 PCR en tiempo real (qPCR)

El paso inicial para el PCR en tiempo real consistió en la estandarización del método, para lograr obtener los parámetros de reacción óptimos de cada uno de los genes a evaluar y confirmar la especificidad de los cebadores utilizados.

El proceso de estandarización consistió en llevar a cabo varias rondas de qPCR. Se comenzó por ajustar la *T_m* hasta encontrar la adecuada para cada uno de los genes evaluados. Se utilizó un gradiente de temperatura para seleccionar aquella que presentara la

mejor amplificación y curva de fusión. Seguido de esto, se ajustó la concentración de cebadores a utilizar para cada uno de los genes. Se realizaron gradientes de concentraciones de cebadores de 2.5 μM a 10 μM , resultando la concentración óptima a 10 μM ya que a concentraciones menores la eficiencia de amplificación disminuía. Después, se determinó el volumen de reacción, comenzando con reacciones de 20 μL y disminuyendo a 15 μL . No se vio afectada la amplificación de ninguno de los genes con esta última, por lo que se decidió utilizar este volumen de reacción y así disminuir la cantidad total de SYBR-Green a utilizar. Finalmente, estandarizamos la cantidad de template (ADNc) por reacción. Se realizaron pruebas de reacciones con 0.5 μL y 1 μL y, como no se afectó la amplificación previamente obtenida, se optó por utilizar 1 μL de template para optimizar la reacción. Una vez estandarizadas las condiciones de reacciones, se procedió con el procesado de las muestras de ADNc.

Las reacciones de PCR en tiempo real se llevaron a cabo en un termociclador iCycler CFX96 de BIORAD. Se utilizaron cebadores específicos para cada gen evaluado (Tabla 4). Se realizaron reacciones con un volumen final de 15 μL , conteniendo 7.5 μL de mezcla de buffer Fast SYBR[®] Green 2x de Applied Biosystems, 0.75 μL de los cebadores sentido y anti sentido para cada gen (10 μM), 5 μL de agua ppi y 1 μL de ADNc molde. Se utilizaron los siguientes parámetros de reacción: 95 °C por 1 minuto, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15s; T_m variable (dependiendo del gen: *hsp40*: 64 °C, *hsp70*: 59.3 °C y *hsp90*: 65.4 °C) por 30s. El perfil térmico utilizado para la curva de disociación fue de 95 °C por 15 s, 60 °C por 1 min y 95 °C por 5s.

La determinación de los niveles de expresión para cada gen evaluado se realizó por medio de una cuantificación absoluta, la cual consiste en la interpolación de los datos del ciclo umbral (C_q: Ciclo umbral, corresponde al ciclo al cual comienza la detección de la fluorescencia en una reacción de qPCR) para cada muestra con los valores de una curva estándar.

Las curvas estándar para cada gen se realizaron a partir de productos de PCR purificados, los cuales se cuantificaron por medio de un espectrofotómetro Nano-Drop (ND2000) y, a partir de la concentración obtenida, se calculó el número de copias/ μL en cada reacción utilizando la ecuación 1 (Tabla 5). A partir de cada producto de PCR purificado se realizaron diluciones seriadas utilizando un factor de dilución 1:10 para la

curva estándar. El número de copias de cada gen se determinó a partir de los valores m y b de las curvas estándar con la ecuación 2 (Tabla 5).

Tabla 5. Ecuaciones empleadas para obtener el número de copias de cada punto de la curva estándar a partir de los valores de Cq de cada muestra obtenidos en el PCR en tiempo real.

<p>Ecuación 1 No. copias/uL a partir de concentración de ADN</p>	<p>$6.022E10^{23}(\text{moléculas/mol}) \times [\text{ADN}] (\text{g/uL})$ Número de pares de bases X 660 daltones</p>	<p>(Dhanasekaran et al., 2010)</p>
<p>Ecuación 2 No. copias a partir de valores de Cq</p>	<p>No. Copias/$\mu\text{L}=10^{(Cq-b)/m}$</p>	<p>Real-Time PCR Applications Guide. BIO-RAD.</p>

Dónde: Cq= Ciclo umbral (al cual se produce una señal fluorescente detectable); b= punto de intersección con el eje Y; m= pendiente de la recta.

VI.6 Determinación del patrón de expresión de los genes hsp40, hsp70 y hsp90 en diferentes tejidos a temperatura óptima.

Se utilizaron muestras de ADNc de branquia, hígado, músculo y cerebro de *S. annulatus* (n=10) del tratamiento control (TA= 26 °C). Se utilizaron placas de 96 pocillos para cada uno de los genes. Se siguieron las condiciones y parámetros de reacción descritos en el apartado anterior. Después, se realizó el análisis de cada placa, realizando la interpolación con la curva estándar correspondiente para la determinación de la expresión de cada gen en cada uno de los tejidos evaluados.

VI.7 Evaluación de los niveles de expresión de hsp's (40, 70 y 90) bajo condiciones de estrés térmico.

Se utilizaron las muestras de ADNc de branquia de *S. annulatus*, las cuales se obtuvieron de los tratamientos de las temperaturas de aclimatación a 20, 26 y 32 °C. Se evaluaron 15 organismos por cada condición experimental, de los cuales 5 pertenecen a las temperaturas de aclimatación, 5 fueron sometidos a la TCmax-5% correspondiente a cada temperatura de aclimatación y otros 5 fueron evaluados por medio del respirómetro para determinar su consumo de oxígeno. Se utilizó una placa de 96 pozos

para cada uno de los genes utilizando las condiciones y parámetros de reacción descritos en el apartado anterior. Al igual que para la expresión en tejidos, se realizó el análisis de cada placa por medio de la interpolación con la curva estándar y cuantificación absoluta correspondiente para la determinación de la expresión de cada gen en cada una de las condiciones experimentales.

VI.8 Tolerancia al estrés térmico

Se realizó una comparación bibliográfica entre los resultados obtenidos de este trabajo y los estudios previamente realizados sobre tolerancia al estrés en peces con el fin de esclarecer de qué manera se relacionan los niveles de expresión de las *hsp*'s con cambios de temperatura.

VI.9 Análisis estadístico

Se utilizaron pruebas no paramétricas debido a que los datos no presentaron un comportamiento correspondiente a una distribución gaussiana.

Primero, se realizó un ANOVA no paramétrico de una vía, también conocido como prueba Kruskal-Wallis, para determinar si había diferencias entre las muestras. Posteriormente, se realizaron contrastes múltiples utilizando la prueba Wilcoxon para dos muestras independientes, también conocida como prueba de Mann-Whitney, para encontrar en dónde las muestras son diferentes. Para ambas pruebas se utilizó un valor de alfa de 0.05 (intervalo de confianza del 95%).

VII. RESULTADOS

VII.1 Extracciones de ARN total

La calidad de las extracciones de ARN total realizadas a partir de los tejidos conservados (Tabla 3) se comprobó después de haber aplicado el tratamiento con ADNasa. Lo anterior se realizó por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1%, donde se evaluó la presencia de dos bandas correspondientes a una extracción de ARN (subunidades ribosomales 28S y 18S), lo cual indica que el ARN extraído es de buena calidad y que no sufrió degradación durante la extracción y el tratamiento con ADNasa (Figura 5).

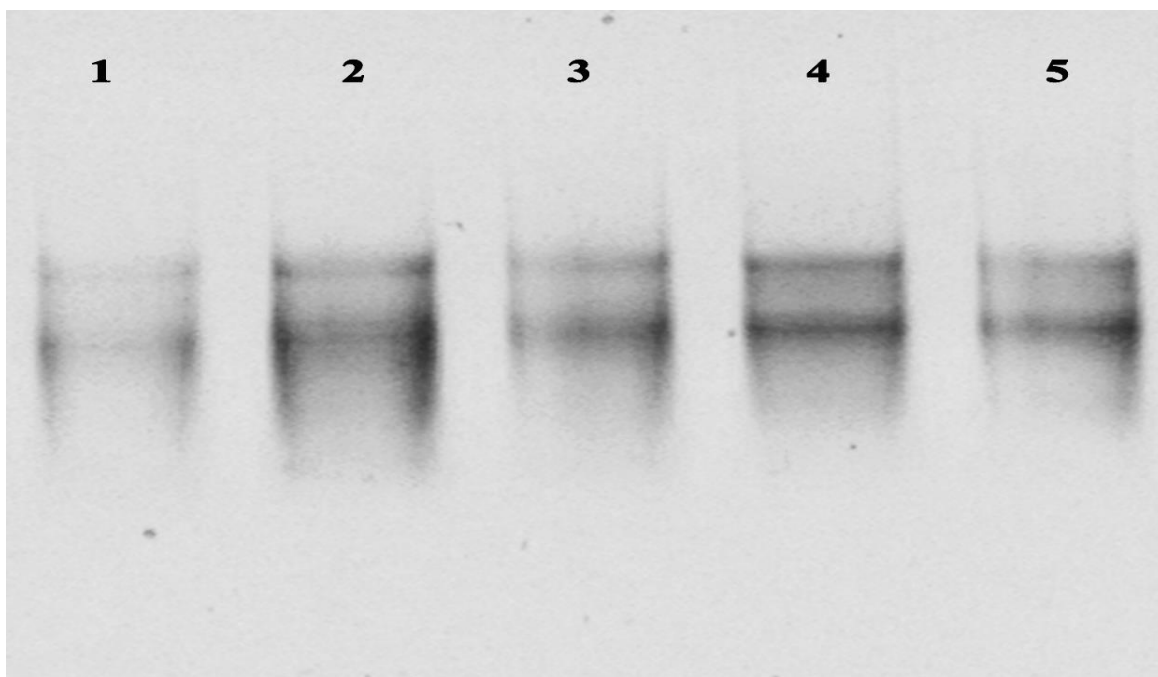


Figura 5. Ejemplo de extracción de ARN. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se cargaron 500 ng del ARN total correspondientes a tejido branquial de la condición experimental TCMax-5% de cinco peces aclimatados a 20 °C. Se observan ambas bandas correspondientes a las subunidades ribosomales y puede constatarse la ausencia de contaminación por ADN genómico. 1-5 indica número de individuo.

VII.2 Amplificación de *hsp*'s por PCR de punto final

La estandarización de las reacciones, así como la verificación de la especificidad de los cebadores fueron favorables, ya que se generó el amplicón esperado para cada gen por medio de una amplificación por PCR de punto final. Lo anterior se comprobó en una electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 6) donde se observó una sola banda del tamaño esperado para cada uno de los genes: *hsp40*-172pb, *hsp70*-309pb y *hsp90*-102pb.

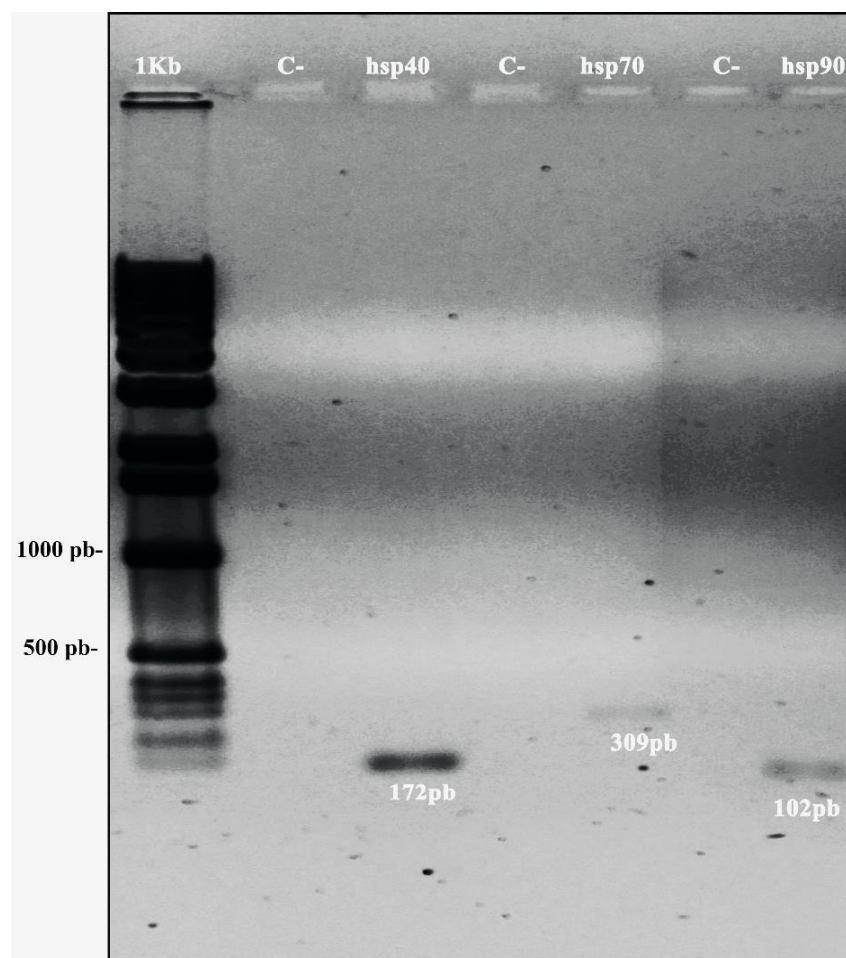


Figura 6. Productos de amplificación de PCR de punto final de *hsp*'s. Electroforesis en gel de agarosa al 1% con productos de PCR correspondientes a cada gen (*hsp40*, *hsp70* y *hsp90*), así como el control negativo para cada uno de ellos. 1Kb (Invitrogen) como marcador de peso molecular.

VII.3 Secuencias parciales obtenidas para cada gen.

Los resultados de la secuenciación obtenidos para cada gen evaluado en el PCR en tiempo real se muestran en la Tabla 6. Como se mencionó anteriormente, la secuenciación de *hsp40* y *hsp90* se realizó únicamente para verificar que los productos de amplificación efectivamente correspondían a ellos a partir de la comparación con secuencias ya publicadas para *S. annulatus*. Por otro lado, no se contaba con secuencias ya publicadas del gen *hsp70* para *S. annulatus*, por lo tanto, la secuenciación sirvió para comprobar la existencia un producto de amplificación y verificar que correspondiera al gen esperado. Se registró la secuencia parcial de *hsp70* de *S. annulatus* obtenida en este estudio en Gen-Bank con el No. de acceso: **KX599338**.

Tabla 6. Secuencias de nucleótidos (nt) parciales obtenidas para cada gen evaluado en qPCR.

Gen	Secuencia obtenida (5'-3')	% similitud con secuencia publicada en Gen-Bank
<i>hsp40</i> (172pb)	TATTTAAGGAGAGCTCAGTGCTACATGGACACGGAGCAGTATGAAGAGGCCGT ACGAGACTATGAGAAAGTTTATCAGACTGAAAAGACGTCAGAGCACAAACACT TGTTGAAGACGGCTCAGCTGGAGCTGAAGAAGAGCAAGAGGAAAGATTACTA CAAGGTTCTGGGCG	No. de acceso <u>AY394434</u> (Barrón-Vivanco et al., 2005). Similitud: 96%
<i>hsp70</i> (503pb)	GACACAGAGAGGCTCATTGGGGATGCAGCAAAGAACCAGGTGGCCTTGAACC CCAACAACACTGTGTTGATGCCAAGAGACTGATTGGAAGAAAGATGGACGAT CCAACCGTTCAAGATGACATGAAACTCTGGCCATTCAAGGTGATTGGAGATGG AGATAAGCCGAAAATCCAGGTAGAATACAAAGGAGAGCAAAGAGCCTTCTACC CCGAGGAGATTTCTCTATGGTTCTGGTGAAGATGAAGGAGGTTGCAGAGGCC TACCTCGGCCAGAAGGTGACCGACGCCGTCGTTACAGTCCCGGCGTACTTCAAC GACTCCCAGAGACAGGCCACCAAGATGCAGGTGTCATCGCTGGATTGAACGT CCTGAGAATTATCAATGAGCCACAGCTGCTGCCATCGCATAACGGTCTGGACAA AAGCCAGTCAGGAGAACGTAACGTCCTGATCTTTGACCTGGGAGGAGGCACCT TTGATGTGTCCATCCTGACCATCGA	No. de acceso: <u>KX599338</u> (este estudio)
<i>hsp90</i> (102pb)	TCAACAACCTGGGCACCATCGCCAAGTCTGGCACCAAGGCCTTCATGGAGGCTT TGCAGGCTGGAGCCGACATCTCCATGATCGGTCAGTTCGGAGTGGGTT	No. de acceso <u>AY394438</u> (Barrón-Vivanco et al., 2005). Similitud: 100%

VII.4 Curvas estándar.

La curva estándar se construyó para cada uno de los genes. Los datos obtenidos fueron los utilizados para llevar a cabo la cuantificación absoluta de la expresión. Los valores para los genes *hsp40* y *hsp90* se encuentran dentro de los rangos establecidos para que el ensayo de cuantificación sea válido (Valor de eficiencia E=90-105%, correlación $R^2 = >0.98$ y un valor de la pendiente $m = -3.2$ a -3.6). Los valores de E y m para el gen *hsp70* cayeron fuera de estos rangos (Tabla 7), aun así se realizó la cuantificación con dicha curva ya que se trata de un gen para el cual no se cuenta con estudios previos en la especie en cuestión y este tipo de valores se han validado para especies no modelo.

Tabla 7. Datos de las curvas estándar obtenidos por qPCR.

Gen	Eficiencia, E (%)	R²	Pendiente (m)	Intersección eje Y (b)
<i>hsp40</i>	93.9	0.990	-3.478	49.898
<i>hsp70</i>	80.3	0.998	-3.907	50.216
<i>hsp90</i>	90	0.996	-3.588	50.933

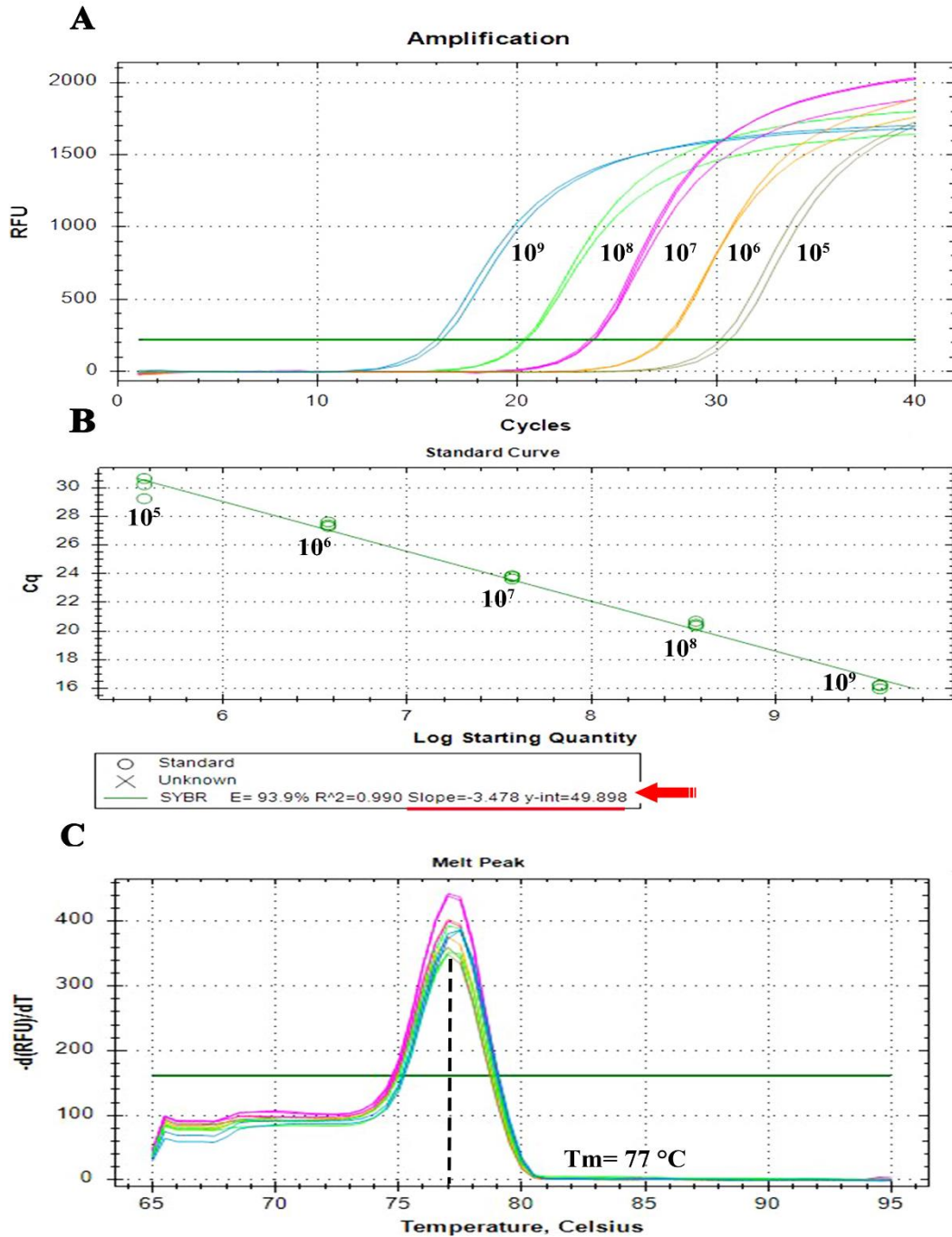


Figura 7. Curva estándar para el gen *hsp40*. **A:** Amplificación lineal de cada punto de la curva ($3.71 \times 10^5 - 3.71 \times 10^9$ No. copias/ μ L); **B:** curva estándar y ecuación de la recta (flecha); **C:** curva de fusión, donde se nota la presencia de un solo pico, por lo tanto un solo producto de amplificación T_m= 77°C.

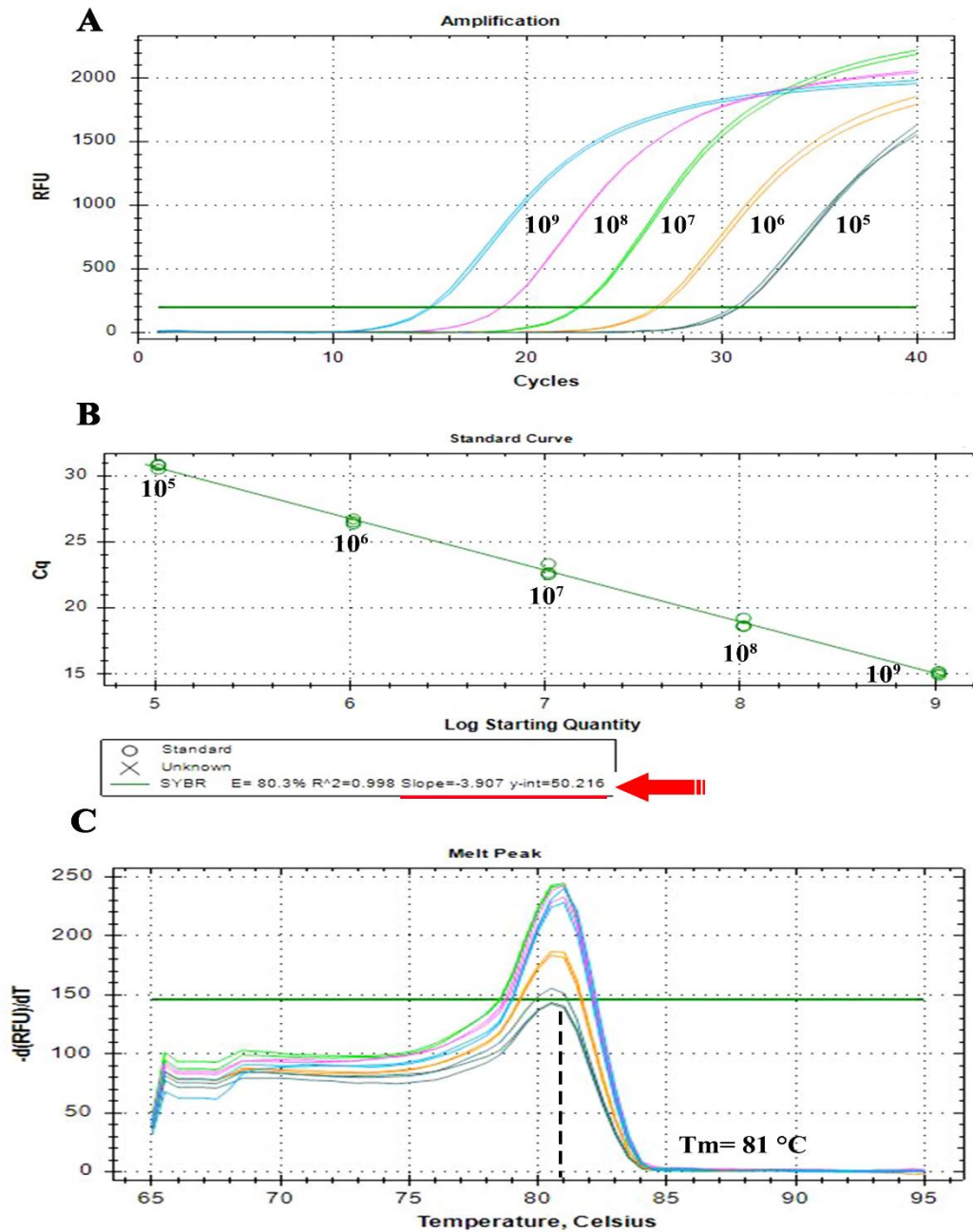


Figura 8. Curva estándar para el gen *hsp70*. **A:** Amplificación lineal de cada punto de la curva ($1.0 \times 10^5 - 1.0 \times 10^9$ No. copias/μL); **B:** curva estándar y ecuación de la recta (flecha); **C:** curva de fusión, donde se nota la presencia de un solo pico, por lo tanto un solo producto de amplificación T_m= 81 °C.

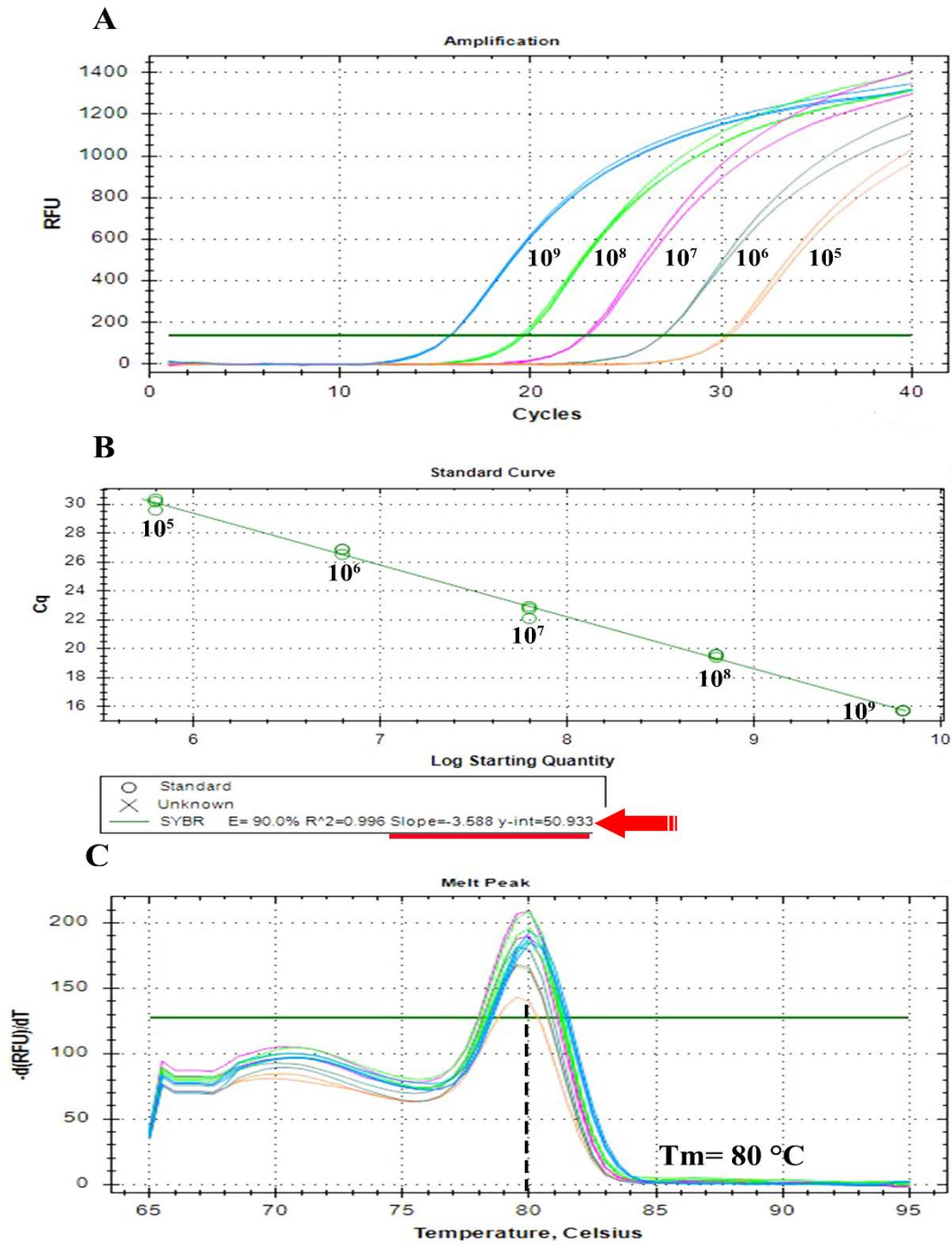


Figura 9. Curva estándar para el gen *hsp90*. **A:** Amplificación lineal de cada punto de la curva ($6.26 \times 10^5 - 6.26 \times 10^9$ No. copias/ μ L); **B:** curva estándar y ecuación de la recta (flecha); **C:** curva de fusión, donde se nota la presencia de un solo pico, por lo tanto un solo producto de amplificación T_m= 80°C.

VII.5 Evaluación de la expresión de hsp's.

Los niveles de expresión de *hsp's* en tejidos fueron más abundantes en cerebro, seguido de músculo, branquia e hígado respectivamente. El gen que obtuvo los niveles de expresión más altos fue *hsp90*, mientras que los niveles más bajos se observaron para *hsp70*. Se encontraron diferencias estadísticas entre los tres genes en tejido del cerebro, expresándose *hsp90* 12% más que *hsp40* y 569% más que *hsp70*. La expresión de *hsp90* en músculo fue estadísticamente mayor que en *hsp70*, expresándose 59% más. Nuevamente se encontraron diferencias significativas entre *hsp90* y *hsp70* para branquias, donde *hsp90* se expresó 56% más que *hsp70*. Finalmente, la expresión de *hsp90* para hígado fue estadísticamente mayor que la expresión de *hsp70*, expresándose 51% más (Figura 10).

El gen que respondió más al estrés térmico fue *hsp90*. No se encontraron diferencias significativas de expresión entre las temperaturas experimentales de aclimatación (20, 26 y 32 °C) para los genes *hsp90* y *hsp70*, pero si en *hsp40*, encontrándose la mayor expresión a 26 °C y la menor a 32 °C, donde *hsp40* se expresó 10% menos que a 26 °C (Figura 11A). Únicamente se encontraron diferencias significativas en TCM_{Max-5%} para *hsp90*. Aquí se observó que la menor expresión fue a 20 °C y la mayor a 32 °C (Figura 11B), mientras que para la condición de consumo de oxígeno se observó un comportamiento inverso, obteniéndose la mayor expresión a 20 °C y la menor a 32 °C donde *hsp90* se expresó 10% menos que a 20 °C (Figura 11C).

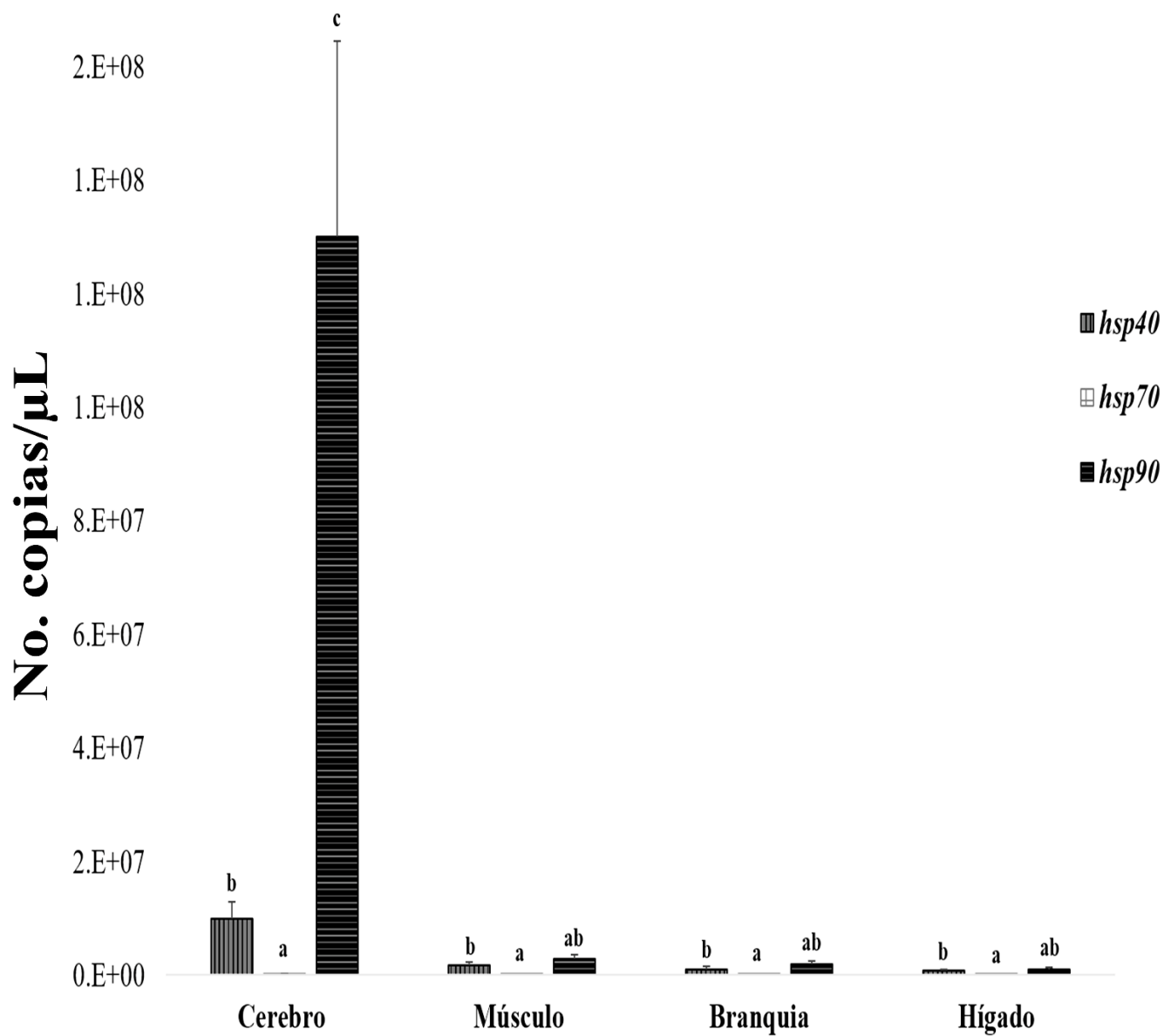


Figura 10. Expresión de *hsp40*, *hsp70* y *hsp90* en diferentes tejidos de *S. annulatus* bajo condiciones de temperatura óptima (TA= 26 °C). Letras diferentes indican diferencias significativas. Se utilizó un valor de $\alpha=0.05$ y $n=10$.

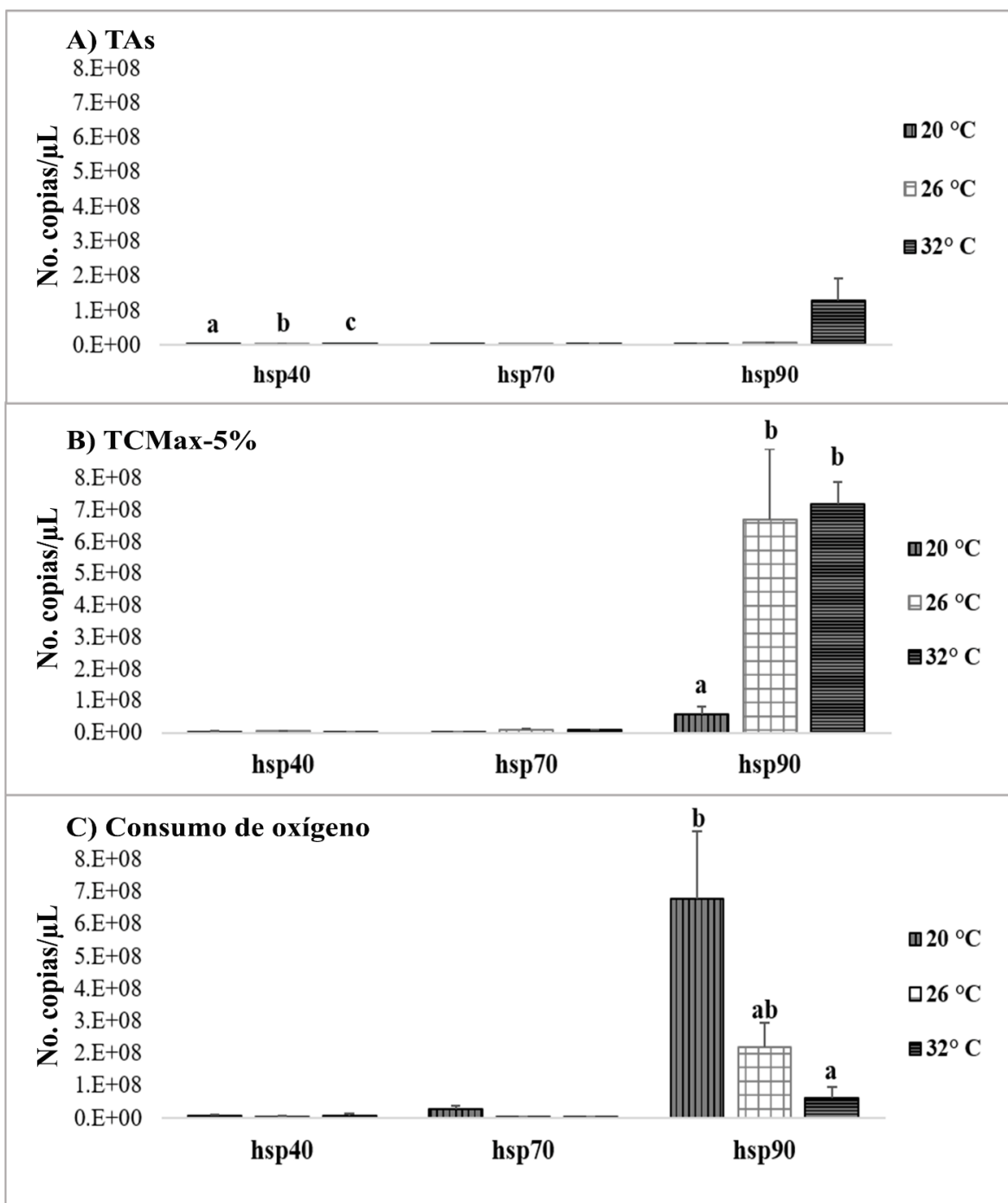


Figura 11. Expresión de *hsp40*, *hsp70* y *hsp90* en branquias de *S. annulatus* aclimatado a diferentes temperaturas (20, 26, 32 °C) y sometido a tres tratamientos, TA: temperatura de aclimatación (A), TCMMax-5%: temperatura crítica máxima ajustada al 95% (B), consumo de oxígeno (C). Letras diferentes indican diferencias significativas. Se utilizó un valor de $\alpha=0.05$ y $n=5$.

VII.6 Posible isoforma de hsp90

Al realizar la evaluación de la expresión de *hsp*'s en los diferentes tejidos analizados (músculo, branquia, hígado y cerebro), se llevó a cabo el análisis de la curva de fusión, el cual se utiliza para identificar diferentes productos de reacción, incluyendo productos no específicos.

Dicho análisis consiste en, una vez finalizada la reacción de amplificación, generar una curva de fusión aumentando la temperatura en pequeños incrementos y monitorizando la señal fluorescente en cada paso. Conforme el ADN de doble cadena (ADNs) se desnaturaliza la fluorescencia disminuye. En este proceso, se utiliza la primera derivada del cambio en la fluorescencia como una función de la temperatura, generando así un pico característico de la temperatura de fusión del amplicón (T_m , la temperatura a la que se separan el 50% de los pares de bases de un dúplex de ADN), que lo distingue de otros productos como dímeros de cebadores u otros productos inespecíficos los cuales se funden a diferentes temperaturas.

Los resultados del análisis de las curvas de fusión mostraron que *hsp40* y *hsp70* efectivamente generan un solo pico y sus T_m s son iguales entre los tejidos evaluados. Sin embargo, las muestras correspondientes a músculo para *hsp90* generaron una curva de disociación diferente ($T_m = 82\text{ }^{\circ}\text{C}$) a la generada por los otros tres tejidos evaluados ($80\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Figura 12). Cabe recordar que el pico de dicha curva de disociación indica la especificidad de la amplificación, un único pico indica amplificación específica del producto de interés mientras que más de un pico indica que se están generando amplificaciones inespecíficas. Estos resultados podrían asociarse a una isoforma de *hsp90* para músculo en *S. annulatus*.

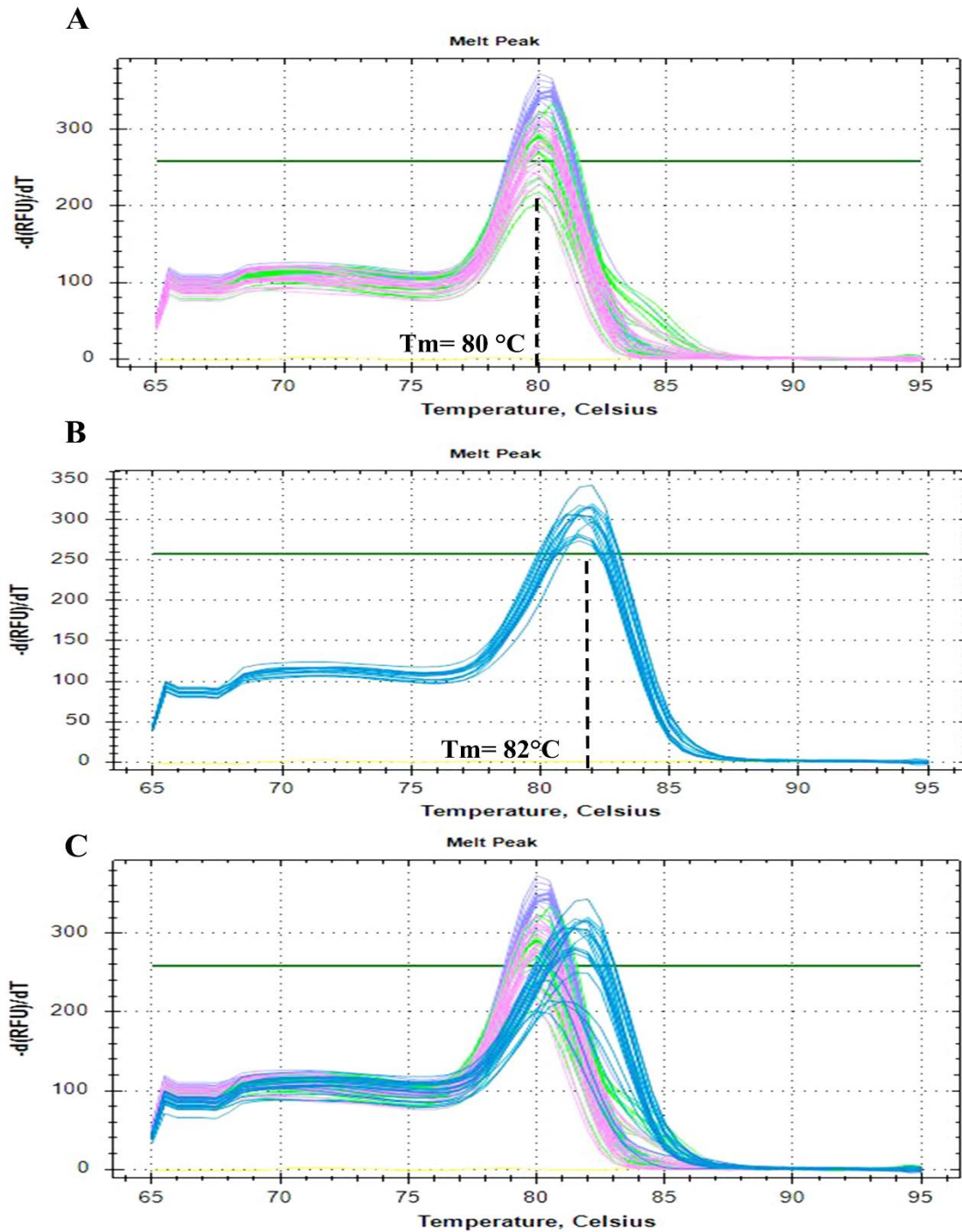


Figura 12. Curvas de disociación obtenidas para *hsp90* a partir de las muestras de ADNc de tejidos de *S. annulatus*. **A:** curvas de disociación de branquia, hígado y cerebro ($T_m=80^\circ\text{C}$); **B:** curva de disociación de músculo ($T_m=82^\circ\text{C}$); **C:** curvas de disociación de todos los tejidos evaluados, se observa que la curva para músculo se encuentra desplazada a la derecha: $T_m= 80^\circ\text{C} + 2^\circ\text{C}$.

VII.7 Tolerancia al estrés térmico.

Comúnmente, se correlaciona la inducción de *hsp*'s por estrés térmico con una tolerancia posterior al calor extremo (Feder y Hofmann, 1999; Parsell y Lindquist, 1993; Somero, 1995) y esta tolerancia se relaciona con una capacidad que permite a los individuos sobrevivir en temperaturas elevadas bajo estímulos de estrés agudo o letal (Oksala et al., 2014). Se ha observado que la mayoría de los organismos, en cierto momento, responden al estrés térmico induciendo la producción de *hsp*'s, sin embargo, la temperatura a las cuales se da la inducción difiere entre ellos. La temperatura a la cual se da la respuesta a dicho estrés dependerá del organismo de estudio y su ecología (Dietz y Somero, 1992; Narum et al., 2013; Parsell y Lindquist, 1993). Por ejemplo, peces para los que su temperatura óptima es de 28 °C tendrán una temperatura de inducción de *hsp*'s más elevada que especies de peces cuyas temperaturas óptimas sean de 14°C.

Un ejemplo sobre la correlación de la inducción de la expresión de *hsp*'s con la termo-tolerancia en peces es el estudio de Sung et al. (2014) en la carpa común (*Cyprinus carpio*). En el estudio reporta que los organismos sometidos a estrés térmico, seguido de un proceso de recuperación y nuevamente sometidos a un choque de calor agudo, adquieren tolerancia al estrés causado por el calor, dicha tolerancia se ve reflejada primero, en el aumento de la sobrevivencia de los organismos (aumento de 20-40%) y segundo, en la sobreexpresión de genes que codifican para proteínas de choque térmico. Otro ejemplo, es el trabajo realizado por Newton et al. (2012) para la perca gigante (*Lates calcarifer*) donde los peces fueron previamente aclimatados a 28 °C (temperatura óptima reportada para la especie) por tres semanas, seguido de una exposición a 36 °C por un periodo de una hora, regresando a 28 °C y tomando las muestras a las dos semanas. Se evaluó la expresión de *hsp70* y *hsp90* y se observó que los niveles basales (condición control, organismos aclimatados a 28 °C) para *hsp70* fueron menores en comparación con los niveles en peces aclimatados a 28 °C después de dos semanas de haber sido sometidos al choque de calor (no se encontraron diferencias para *hsp90*). Dicho aumento en los niveles basales de *hsp70*

después de haber pasado por un choque térmico podría relacionarse con una mayor tolerancia al estrés por parte de los organismos a choques térmicos posteriores.

El presente trabajo es el primero para la especie *S. annulatus* donde se evalúan los niveles de expresión de *hsp*'s bajo condiciones de estrés térmico. Los resultados obtenidos muestran que el patrón de expresión de *hsp*'s varía en el tiempo. Al analizar las gráficas de la figura 11, se constata que cuando se evaluaron los niveles de *hsp*'s para cada temperatura de aclimatación a mayor TA mayores niveles de expresión de *hsp*'s. Al someter a los organismos al shock térmico (TCMax-5%) dicho patrón se mantuvo y se observó una sobreexpresión. Minutos después del shock térmico, en la condición de consumo de oxígeno, el patrón de expresión se invirtió y a TAs más bajas niveles de expresión más altos. Cabe mencionar que esta variación en el patrón de expresión ocurrió en tan solo unos minutos.

Si comparamos estos niveles de expresión con los resultados para consumo de oxígeno obtenidos por García-Villarreal, (2016) vemos que el consumo de oxígeno disminuyó conforme mayor fue la TCMax (Figura 3), lo cual reafirma el hecho de que a mayor TCMax corresponden niveles mayores de estrés.

VIII. DISCUSIÓN

Los resultados de las extracciones de ARN total fueron de buena calidad, lo cual es necesario para realizar la evaluación de la expresión de *hsp*'s por medio de PCR en tiempo real, ya que permite que las muestras sean comparables unas con otras. Cuando la calidad del ARN es variables entre las muestras se corre el riesgo de que la cantidad de ARN utilizado para la síntesis de ADNc no sea equivalente en todas las muestras. Además, es importante comprobar la especificidad de los cebadores antes de comenzar con los ensayos de qPCR, con ello se evita acarrear problemas de amplificaciones inespecíficas y facilita la corrección o cambio de cebadores antes de avanzar en los análisis. Por otro lado, se llevó a cabo la estandarización del qPCR, con lo que se constató que el dedicar tiempo a este proceso ayuda a utilizar las condiciones y volúmenes de reacción adecuadas para la amplificación de cada uno de los genes. Lo que evita el uso incensario tanto de reactivos como de template, los cuales en ocasiones son el limitante.

El patrón de expresión de *hsp*'s en los diferentes tejidos evaluados mostró una mayor expresión en cerebro, seguido de músculo, branquia e hígado respectivamente. Este patrón de expresión (órganos con mayor o menor expresión de *hsp*'s) puede variar de acuerdo a la especie y al factor de estrés infringido, por lo tanto, se infiere que el patrón obtenido en este estudio es específico para *S. annulatus*. Además, se sabe que la respuesta de choque térmico genera una expresión específica de *hsp*'s en los tejidos de diversas especies de peces (Currie et al., 2000). Cui et al. (2011) reportaron el siguiente patrón de expresión para *hsp70* en *Epinephelus coioides* en células sanguíneas > bazo > branquia > timo > músculo, mientras que para *Sciaenops ocellatus* el patrón obtenido fue en corazón > bazo > hígado > cerebro > sangre > riñón > branquia > músculo (Dang et al., 2010). Otros autores (Dong et al., 2006; Liu et al., 2015; Mu et al., 2013; Ni et al., 2014) también encontraron un patrón específico para la especie que evaluaron.

Ahora bien, el hecho de que el órgano con una sobreexpresión mayor fue el cerebro puede asociarse a la función del órgano en sí. El cerebro es el órgano principal para el correcto funcionamiento de un organismo, al encargarse de enviar todas las señales de respuesta ante condiciones adversas. En los organismos ectotermos, como es el caso de los peces, se ha visto que el cerebro puede percibir pequeñas variaciones de temperatura y regular la aclimatación térmica (Das et al., 2005). Es sabido además, que en peces es precisamente la región de la cabeza, y no la parte posterior del cuerpo, la que detecta la temperatura durante un proceso de aclimatación y es, por lo tanto, en donde se integra la experiencia térmica para posteriormente ser expresada por medio del comportamiento (Muller, 1977).

Por otra parte, se observó que el gen con una mayor expresión en todos los tejidos evaluados fue *hsp90*, lo cual indica que, para la especie de estudio y bajo condiciones no estresantes, este gen es más abundante en comparación a *hsp70* y *hsp40*. El gen *hsp90* está relacionado con la recepción de hormonas esteroides (Oksala et al., 2014; Pan et al., 2000). La producción de este tipo de hormonas forma parte de la respuesta primaria al estrés en peces (Iwama et al., 1999). Además, se ha reportado que *hsp90* es una de las proteínas chaperonas celulares más abundantes en las células, llegando a representar aproximadamente del 1-2% de las proteínas totales en células no estresadas aumentando este porcentaje a 4-6% de las proteínas totales bajo condiciones de estrés (Goetz et al., 2003).

En el presente estudio, se evaluaron tres condiciones experimentales: TAs, TCMax-5% y consumo de oxígeno, para evaluar la expresión de *hsp*'s en tejido branquial bajo condiciones estresantes. La primera condición nos permite evaluar el efecto de la temperatura de aclimatación en la expresión génica. En este estudio, únicamente se encontraron diferencias estadísticas para las TAs correspondientes a *hsp40* y no se encontraron diferencias significativas para *hsp90* y *hsp70*. El gen *hsp40* funciona como cochaperona de *hsp70* estimulando la síntesis de ATP y facilitando la entrega de algunos sustratos (Doyle et al., 2013). Por lo que, su abundancia pudiese relacionarse con su disponibilidad para *hsp70* en caso de requerirse.

Por otra parte, la condición de TCM_{ax}-5% reveló que, la respuesta que se genera después de un choque térmico, está influenciada por la temperatura de aclimatación previa. Ya que, al aplicar el choque de calor, peces aclimatados a temperaturas más altas obtuvieron niveles de expresión mayores. Este resultado indica que fueron estos peces los que respondieron de forma inmediata al incremento de temperatura. Mientras que peces aclimatados a temperaturas más bajas tardaron más en sobreexpresar sus niveles de *hsp*'s y presentaron niveles más altos de expresión minutos después de haber sido sometidos al estrés térmico (condición: consumo de oxígeno). Estudios previos reportan que la expresión de *hsp*'s se ve influenciada por la temperatura de aclimatación. Y tiempo después del choque térmico, observaron que, a temperaturas de aclimatación bajas se obtuvieron los niveles de expresión más altos y los niveles de expresión más bajos correspondieron a las TAs más altas (Currie et al., 2000; Das et al., 2005; Deane y Woo, 2005; Shi et al., 2015).

Lo anterior podría relacionarse con el trabajo de Johnson y Kelsch (1998), quienes mencionan que especies que experimentan cambios de temperatura a largo plazo como es el caso de las especies de zonas templadas, tienen el tiempo necesario para realizar cambios metabólicos que darán lugar a cambios sustanciales en las temperaturas o rangos de tolerancia. Mientras que especies que experimentan sus mayores cambios de temperatura a corto plazo, como sucede con las especies tropicales, deben tener un amplio rango de tolerancia que les permita sobrevivir a cambios de temperatura relativamente rápidos que no permitan la aclimatación. Otro ejemplo sobre esta relación, es el estudio realizado por Currie et al. (2000) con la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). En dicho estudio, se encontró que la plasticidad que existe en la detección de estrés térmico es indicación de que la historia térmica del animal debe considerarse cuando se usa el ARNm de *hsp*'s como signo de estrés inicial y que posiblemente esto deba extenderse a otras especies de peces.

Al igual que en la evaluación de la expresión de *hsp*'s en tejidos, el gen *hsp90* presentó la mayor expresión para las condiciones experimentales en tejido branquial. Este resultado es inesperado, ya que en la mayoría de los estudios de este tipo en peces, el gen que presenta los mayores niveles de expresión bajo condiciones de estrés es *hsp70*. Por el contrario, en este estudio, el gen *hsp70* es el que obtuvo los niveles más bajos de expresión después del estrés térmico. En un estudio realizado con el bacalao común (*Gadus morhua*)

se asocia un bajo nivel de expresión de *hsp70* después de un choque térmico al hecho de que los niveles constitutivos de este gen son lo suficientemente altos como para cubrir las variaciones potencialmente dañinas de la temperatura dentro del rango fisiológico (Zakhartsev et al., 2005). Lo anterior podría haber ocurrido también para *S. annulatus*. Otro aspecto que pudo influir en los niveles de expresión obtenidos para este gen es el tiempo de exposición al factor estresante, por ejemplo, se ha observado que en larvas de la carpa *Cirrhinus mrigala* hay un incremento de 20 veces en la expresión de *hsp70* después de 30 minutos de haberlas transferido de 23 a 37 °C (Das et al., 2005).

Por otro lado, la respuesta de sobreexpresión del gen *hsp40* después del estrés térmico fue baja, tanto que no se obtuvieron diferencias significativas. Actualmente, los trabajos en peces donde se evalúa la expresión de este gen bajo condiciones de estrés, son casi nulos. En uno de los trabajos al respecto, con el falso halibut del Japón (*Paralichthys olivaceus*) se determinó que se necesita por lo menos una hora después de haberse aplicado el estrés para que el gen comience a aumentar sus niveles de expresión (Dong et al., 2006). Por esta razón, es posible que el bajo nivel de expresión del gen *hsp40* observado en este estudio se deba al tiempo de respuesta, ya que la toma de muestras fue inmediata al choque térmico y aproximadamente cinco minutos después de este.

La sobreexpresión obtenida para *hsp90* en tejido branquial bajo condiciones de estrés térmico fue inesperada. Se esperaba que *hsp70* fuera el gen con mayor sobreexpresión ya que estudios previos han demostrado que los niveles más altos de expresión en condiciones estresantes se obtienen con *hsp70* en comparación con *hsp90*. Tal es el caso del salmón (*Salmo salar*) en el estudio realizado por Pan et al. (2000). A pesar de esto, se ha visto que la expresión de estos genes varía enormemente entre las distintas especies de peces, por lo que un resultado como este puede deberse simplemente a aspectos relacionados con la fisiología y ecología de *S. annulatus*.

Por otra parte, se obtuvieron diferencias en la curva de fusión para las muestras correspondientes a músculo al evaluar el patrón de expresión de *hsp90* en tejidos. Esto nos lleva a sospechar la posible presencia de una isoforma de *hsp90* en el tejido muscular que no está siendo diferenciada por los cebadores diseñados. Se han reportado dos isoformas citosólicas de *hsp90* en humanos, *hsp90 α* y *hsp90 β* , las cuales están fuertemente

relacionadas, ambas inducibles en condiciones estresantes y aun no se han determinado diferencias en cuanto a las actividades que estas chaperonas llevan a cabo (Goetz et al., 2003). Estas isoformas también han sido registradas en peces. La isoforma *hsp90β* fue identificada y caracterizada en algunas especies de peces como el pargo cabezón (*Lutjanus sanguineus*) (Zhang et al., 2011) y el salmón (*Salmo salar*) (Pan et al., 2000), mientras que la isoforma *hsp90α* se ha estudiado en especies como la lisa (*Mugil cephalus*) (Padmini et al., 2008) y en el pez gato (*Clarias batrachus*) (Mohindra et al., 2015).

Finalmente, en cuanto a la relación de los niveles de expresión de *hsp*'s con el estrés térmico, en base a los resultados, los organismos mantienen niveles de estrés más bajos a temperaturas de aclimatación menores (20 y 26) que a TAs más elevadas (32°), lo cual concuerda con lo reportado por Das et al. (2005). Por ende, mantener a *S. annulatus* a temperaturas de aclimatación arriba de los 30 °C implicaría mayores niveles de estrés ya que como constatamos se dio de forma inmediata una sobreexpresión de *hsp*'s después de aplicar el choque térmico. Además, los niveles basales para las temperaturas de aclimatación más elevadas fueron mayores y los consumos de oxígeno menores se obtuvieron a la TA más alta (32 °C). El mantener a los organismos en el menor estrés térmico posible ayuda al óptimo crecimiento de los mismos, ya que cuando un individuo se encuentra en condiciones de estrés prolongadas deja de invertir energía en aspectos como crecimiento y reproducción y se centra únicamente en su supervivencia ante el factor estresante (Iwama et al., 1999; Sokolova, 2013). Por lo que se recomienda mantener al botete diana a temperaturas de aclimatación más bajas (intermedio entre 20 y 26°C, posiblemente 24 °C) ya que al hacer una comparación entre niveles de estrés y consumo de oxígeno vemos que los valores óptimos se encuentran dentro de este intervalo de temperatura.

IX. CONCLUSIONES

Los genes de *hsp40*, *hsp70* y *hsp90* se expresaron de forma diferencial en los tejidos evaluados del botete diana, *Sphoeroides annulatus*. Además, el patrón de expresión obtenido para estos genes en los diferentes tejidos bajo condiciones óptimas de temperatura es específico para la especie. El órgano con niveles más altos de expresión de *hsp*'s al comparar los tejidos evaluados fue el cerebro.

Bajo condiciones de estrés térmico, los genes *hsp70* y *hsp40* mantuvieron una expresión constante en tejido branquial de botete diana, mientras que el gen *hsp90* fue el más sensible al estrés térmico, manifestando los niveles de expresión más altos inmediatamente después de aplicar el choque por temperatura (TCMax-5%). Se determinó que la expresión de *hsp*'s fue influenciada por la aclimatación previa de los organismos. Así mismo, los niveles de expresión de *hsp*'s variaron con el tiempo de exposición al estrés térmico. Por ello, es necesario evaluar la expresión de estos genes en una serie de tiempo más larga (mínimo de 30 minutos hasta algunas horas) y con muestreos programados, para tener una visión más amplia y así poder determinar el tiempo que toma llegar al pico máximo de expresión de estos genes después de haberse aplicado el choque térmico en la especie de interés.

Los niveles de expresión de *hsp70* y *hsp40* no pueden utilizarse como bioindicadores de estrés en *S. annulatus*, ya que sus niveles de expresión se mantuvieron constantes bajo las condiciones experimentales. Por su parte, el gen *hsp90* podría tener potencial para utilizarse como indicador del estrés térmico en el botete diana, sin embargo es necesario realizar estudios que complementen y amplíen la información obtenida mediante el presente trabajo, donde se evalúen tiempos de exposición al estrés más prolongados y con muestreos programados en el intervalo de tiempo establecido. Además, la información brindada por *hsp90* podría complementarse con otros indicadores como lo es el nivel de cortisol en sangre.

Por otra parte, se determinó la presencia de una posible isoforma de *hsp90* en músculo de *S. annulatus*. Por ende, es necesario el desarrollo de trabajos posteriores que permitan identificar y caracterizar de forma adecuada esta posible isoforma.

El presente trabajo es la primera aproximación a la correlación de los niveles de expresión de *hsp*'s con una tolerancia al estrés térmico en *Spherooides annulatus*. Los resultados mostraron que existe cierta relación ya que los niveles más altos de expresión de *hsp*'s, después del choque térmico, se obtuvieron para las TCM_{Max-5%} mayores, lo cual sugiere niveles de estrés más elevados a estas temperaturas. Lo anterior se refuerza al comparar los niveles de expresión con los consumos de oxígeno reportados por García-Villarreal. (2016) donde se observa que a mayor TCM_{Max-5%} menor tasa de oxígeno (Figura 3) y esto equivale a mayor nivel de estrés en los organismos. A pesar de ello, creemos que se necesita de ensayos que permitan evaluar los niveles de expresión de estos genes en una serie de tiempo más larga que incluya tiempos bien definidos de exposición al estrés térmico (en trabajos previos generalmente se utilizan 30 minutos y 1 hora), así como tiempos de recuperación (mínimo de 8 horas y hasta días o semanas) antes de la toma de muestras, para poder determinar si se obtiene una tolerancia mejorada al incremento de temperatura. En este estudio el tiempo de exposición al estrés térmico fue inmediato (TCM_{Max-5%}) y aproximadamente cinco minutos después (condición: consumo de oxígeno). Además, resulta interesante la inclusión de más temperaturas de aclimatación como por ejemplo 24°C y 30°C.

X. ANEXOS

X.1 Lista de abreviaciones

Abreviación	Significado
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
HSPs	Proteínas de Shock Térmico
<i>hsp o hsp's</i>	Genes de proteínas de shock térmico
pb	Pares de bases
qPCR	PCR en tiempo real
RT	Retrotranscripción
TAs	Temperaturas de aclimatación
TCMax	Temperatura crítica máxima
TCMax-5%	Temperatura crítica máxima al 95%
RER	Retículo endoplasmático rugoso
ADNds	ADN de doble cadena
BPA	Bisfenol A
nt	nucleótidos

X.2 Extracción ARN TRI-Reagent (SIGMA)

1. Cortar y pesar 50 mg de tejido.
2. Homogeneizar con 500 µl de TRI-Reagent.
3. Centrifugar a 12000Xg por 10 minutos A 4 °C.
4. Recuperar sobrenadante en un tubo nuevo.
5. Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.
6. Añadir 50 µl de 1-Bromo-3-Cloropropano y agitar vigorosamente por 15 segundos.
7. Incubar 2 minutos a temperatura ambiente (2-15 min.).
8. Centrifugar a 12000g por 15 minutos a 4 °C.
9. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo.
10. Añadir 150 µl de 2-propanol y mezclar por inversión.
11. Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.
12. Centrifugar a 12000g por 10 minutos a 4 °C (se formará pellet).
13. Eliminar el sobrenadante.
14. Lavar el pellet en 500 µl de etanol al 75% y mezclar por inversión.
15. Centrifugar a 12000g 5 minutos a 4 °C y decantar el sobrenadante.
16. Dejar secar el pellet a temperatura ambiente de 5-10 minutos.
17. Disolver en 80 µl de H₂Oppi.

X.3 Tratamiento con ADNasa

-Usar tubos para PCR de 0.5 ml.

- Usar 50 μ l de ARN sin importar la concentración, si no hay suficiente completar el volumen con H₂O ppi.

1. A los 50 μ l de ARN añadir 5 μ l de buffer DNasa.
2. Añadir 1 μ l de DNasa (2U por μ l, para concentración final de 2U en 50 μ l).
3. Incubar a 37 °C por 30 minutos.
4. Hielo de 2-5 minutos.
5. Incubar a 65 °C por 10 minutos
6. Hielo.
7. 5 μ l (1/10 de volúmen) de NaAc 3M pH 5.2. Centrifugar brevemente.
8. 2 μ l de glicógeno (10 mg/ml).
9. 175 μ l (2.5 volúmenes) de etanol al 100% (-20 °C).
10. Incubar 1 hora a -20 °C o 15 minutos a -80 °C.
11. Centrifugar a 12000g por 30 minutos a 4 °C.
12. Decantar sobrenadante sin perder el pellet.
13. Añadir 400 μ l de etanol al 75% (-20 °C).
14. Centrifugar a 12000g por 5 minutos a 4 °C.
15. Decantar sobrenadante sin perder el pellet.
16. Secar 5 minutos a temperatura ambiente.
17. Resuspender el pellet en 30 μ l de H₂O ppi.
18. Conservar a -70 °C.

-Verificar en gel de agarosa al 1%.

X.4 Retrotranscripción (RT)

-Para un volumen final de 40 μ l.

Reacción 1	
dNTPs (10mM)	2 μ l
Oligo dT (0.7 μ M)	2 μ l
ARN templado	1000 ng (5 μ l)
H ₂ Oppi	11 μ l
Volumen Total	20 μ l

-Agitar suavemente y centrifugar rápidamente.

-Incubar a -70 °C 10 min poner en hielo y continuar en frío.

-A cada tubo con la reacción uno añadir la reacción 2 (20 μ l).

Reacción 2	
RT-Buffer 5X	8 μ l
RT-Enzima	2 μ l
RNasa out (invitrogen)	0.6 μ l
H ₂ Oppi	9.4 μ l
Volumen Final	40 μ l

-Incubar a 37 °C 1h

-Incubar a 80 °C 10 min

-Conservar a -20 °C

X.5 Purificación de productos PCR

1. Ajustar el volumen a 50 μ l con agua ppi
2. Añadir 2.8 μ l de glicógeno
3. Vortex
4. Agregar 7 μ l de NaAc 3M pH 5.2
5. Vortex
6. Añadir 175 μ l de etanol al 100% (guardado previamente a -20 °C)
7. Vortex
8. Incubar 16 minutos a -80 °C
9. Centrifugar a 12000g por 30 minutos (4 °C)
10. Eliminar el alcohol por decantado
11. Lavar en 400 μ l de etanol al 70%
12. Dar vortex leve (No disolver, solo lavar la pastilla)
13. Centrifugar a 12000g por 5 minutos a 4 °C
14. Secar pellet a temperatura ambiente por 5 minutos
15. Eluir en 20 μ l de H₂O ppi
16. Almacenar a -20 °C

X.6 Concentraciones de ARN total (después del tratamiento con ADNasa)

Tabla 1.- Resultados de la cuantificación de las concentraciones de ARN total de las muestras de tejidos de *S. annulatus* bajo condiciones control obtenidos por la cuantificación en Nano-Drop (ND2000), para todas las muestras evaluadas en PCR en tiempo real.

Muestra	[ng/uL]	260/280
1M	94.3	1.98
2M	122.5	1.99
3M	99.7	2.01
4M	105.7	1.99
5M	131.9	1.95
6M	217.1	1.98
7M	142.3	1.95
8M	160.6	2
9M	165.1	1.98
10M	209.6	2.06
1B	371.8	2.01
2B	57.9	1.96
3B	583.3	2.02
4B	530.2	2.01
5B	559.2	2.04
6B	686.8	2.03
7B	814.6	2.06
8B	690.3	2.1
9B	1447.1	2.11
10B	1631.3	2.12
1H	1398.7	2.05
2H	1828.8	2.03
3H	708.1	2.04
4H	721.7	2.01
5H	1049.1	2.04
6H	1563	2.05
7H	1810.3	2.04
8H	1586	2.07
9H	1546.8	2.08
10H	1622	2.06
1C	550.7	2.03
2C	287.6	2.02
3C	287	2.01
4C	755	2.02
5C	11.3	2.09

6C	450.9	1.99
7C	582.3	2.03
8C	201.3	1.99
9C	18.8	1.98
10C	476.6	2.02

Tabla 2.- Resultados de la cuantificación de las concentraciones de ARN total de las muestras de tejido branquial de *S. annulatus* en las diferentes condiciones experimentales obtenidas las muestras fueron evaluadas por PCR en tiempo real.

Muestra	[ng/uL]	260/280
20C1	604.9	1.98
20C2	1162.2	2.08
20C3	633.2	1.97
20C4	707	2.01
20C5	536.5	2.01
20MX1	819.7	2.02
20MX2	689.1	1.99
20MX3	980.9	2.06
20MX4	806.6	2.02
20MX5	598	1.99
20R1	762.3	1.99
20R2	368.7	1.95
20R3	657.2	1.98
20R4	458.1	1.95
20R5	311.9	1.93
26C1	752.1	2.03
26C2	570.8	1.99
26C3	590.5	2.01
26C4	486.9	1.96
26C5	665.6	2.01
26MX1	844.8	2.03
26MX2	1581.4	2.12
26MX3	943	2.06
26MX4	634	2.01
26MX5	754	2.02
26R1	183.4	1.99
26R2	438.7	1.96
26R3	154.7	1.93

26R4	197.3	1.94
26R5	511.3	1.98
32C1	530.2	1.99
32C2	394.6	1.94
32C3	121	1.91
32C4	639.5	1.99
32C5	819.2	2.04
32MX1	481.5	1.97
32MX2	930.5	2.03
32MX3	754.3	1.92
32MX4	1122.8	2.07
32R1	1968.9	2.15
32R2	528.2	1.98
32R3	1156.4	2.08
32R4	1021.9	2.05

XI. LITERATURA CITADA

- Atamanalp, M., y Erdoğan, O. (2010). Alterations of HSP70 gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to deltamethrin. *TÜBİTAK*, 34(4), 359–363. <http://doi.org/10.3906/vet-0808-7>
- Barrón-Vivanco, B., Duncan, N. J., García-Aguilar, N., Gutiérrez, J., y García-Gasca, a. (2005). Effect of LHRHa on the expression of stress-related molecules in the ovary of wild caught *Sphoeroides annulatus* held in captivity. *Journal of Fish Biology*, 67(2), 582–588. <http://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2005.00737.x>
- Basu, N., Todgham, A. E., Ackerman, P. A., Bibeau, M. R., Nakano, K., Schulte, P. M., y Iwama, G. K. (2002). Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene*, 295(2), 173–183. [http://doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)00687-X](http://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)00687-X)
- Becker, C. D., y Genoway, R. G. (1979). Evaluation of the critical thermal maximum for determining thermal tolerance of freshwater fish. *Environmental Biology of Fishes*, 4(3), 245–256. <http://doi.org/10.1007/BF00005481>
- Becker, J., y Craig, E. a. (1994). Heat-shock proteins as molecular chaperones. *European journal of biochemistry / FEBS*, 219(1–2), 11–23. <http://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb19910.x>
- Beitinger, T., Bennett, W., y McCauley, R. (2000). Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature. *Environmental Biology of Fishes*, 58, 237–275. <http://doi.org/10.1023/A:1007676325825>
- Brougher, D. S., Douglass, L. W., y Jr., J. H. S. (2005). Comparative Oxygen Consumption and Metabolism of Striped Bass *Morone saxatilis* and its Hybrid *M. chrysops* ♀ x *M. saxatilis* ♂. *Journal of the World Aquaculture Society*, 36(4), 521–529. <http://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2005.tb00400.x>
- Ceyhun, S. B., Sentürk, M., Ekinci, D., Erdoğan, O., Ciltas, A., y Kocaman, E. M. (2010). Deltamethrin attenuates antioxidant defense system and induces the expression of heat shock protein 70 in rainbow trout. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology and pharmacology : CBP*, 152(2), 215–23. <http://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.04.008>
- Chávez Sánchez, M. C., Álvarez-Lajonchère, L., Abdo De La Parra, M. I., y García Aguilar, N. (2008). Advances in the culture of the Mexican bullseye puffer fish *Sphoeroides annulatus*, Jenyns (1842). *Aquaculture Research*, 39(7), 718–730. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01924.x>
- Cheng, C.-H., Yang, F.-F., Ling, R.-Z., Liao, S.-A., Miao, Y.-T., Ye, C.-X., y Wang, A.-L. (2015). Effects of ammonia exposure on apoptosis, oxidative stress and immune response in pufferfish (*Takifugu obscurus*). *Aquatic toxicology (Amsterdam)*,

- Netherlands), 164, 61–71. <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.04.004>
- Choi, C. Y. (2010). Environmental stress-related gene expression and blood physiological responses in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) exposed to osmotic and thermal stress. *Animal Cells and Systems*, 14(1), 17–23. <http://doi.org/10.1080/19768351003764940>
- Chulanetra, M., Sookrung, N., Srimanote, P., Indrawattana, N., Thanongsaksrikul, J., Sakolvaree, Y., Chongsa-Nguan, M., Kurazono, H., y Chaicumpa, W. (2011). Toxic marine puffer fish in Thailand seas and tetrodotoxin they contained. *Toxins*, 3(10), 1249–1262. <http://doi.org/10.3390/toxins3101249>
- Clare, D. K., y Saibil, H. R. (2013). ATP-driven molecular chaperone machines. *Biopolymers*, 99(11), 846–859. <http://doi.org/10.1002/bip.22361>
- Cui, M., Zhang, Q. Z., Yao, Z. J., y Zhang, Z. H. (2011). Molecular cloning and expression analysis of heat-shock protein 70 in orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* following heat shock and *Vibrio alginolyticus* challenge. *Journal of Fish Biology*, 79(2), 486–501. <http://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2011.03045.x>
- Currie, S., Moyes, C. D., y Tufts, B. L. (2000). The effects of heat shock and acclimation temperature on hsp70 and hsp30 mRNA expression in rainbow trout: in vivo and in vitro comparisons. *Journal of Fish Biology*, 56(2), 398–408. <http://doi.org/10.1006/jfbi.1999.1166>
- Dang, W., Hu, Y., Zhang, M., y Sun, L. (2010). Identification and molecular analysis of a stress-inducible Hsp70 from *Sciaenops ocellatus*. *Fish and shellfish immunology*, 29(4), 600–7. <http://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.06.001>
- Das, P., Gupta, A., y Manna, S. K. (2005). Heat shock protein 70 expression in different tissues of *Cirrhinus mrigala* (Ham.) following heat stress. *Aquaculture Research*, 36(6), 525–529. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01214.x>
- Deane, E. E., y Woo, N. Y. S. (2005). Cloning and characterization of the hsp70 multigene family from silver sea bream: Modulated gene expression between warm and cold temperature acclimation. *Biochemical and biophysical research communications*, 330(3), 776–83. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.03.039>
- Deane, E. E., Zhou, L., y Woo, N. Y. S. (2007). Effects of mitogenic hormones on HSP70 expression in a silver sea bream fibroblast cell line and a primary macrophage preparation. *General and comparative endocrinology*, 152(2–3), 183–8. <http://doi.org/10.1016/j.ygcen.2006.12.020>
- Dhanasekaran, S., Doherty, T. M., y Kenneth, J. (2010). Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification. *Journal of Immunological Methods*, 354(1–2), 34–39. <http://doi.org/10.1016/j.jim.2010.01.004>
- Díaz, F., Re, A. D., González, R. A., Sánchez, L. N., Leyva, G., y Valenzuela, F. (2007). Temperature preference and oxygen consumption of the largemouth bass *Micropterus salmoides* (Lacépède) acclimated to different temperatures. *Aquaculture Research*, 38(13), 1387–1394. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01817.x>
- Dietz, T. J., y Somero, G. N. (1992). The threshold induction temperature of the 90-kDa heat shock protein is subject to acclimatization in eurythermal goby fishes (genus

- Gillichthys*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(8), 3389–3393. <http://doi.org/10.1073/pnas.89.8.3389>
- Dong, C.-W., Zhang, Y.-B., Zhang, Q.-Y., y Gui, J.-F. (2006). Differential expression of three *Paralichthys olivaceus* Hsp40 genes in responses to virus infection and heat shock. *Fish and shellfish immunology*, 21(2), 146–58. <http://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.11.002>
- Doyle, S. M., Genest, O., y Wickner, S. (2013). Protein rescue from aggregates by powerful molecular chaperone machines. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 14(10), 617–29. <http://doi.org/10.1038/nrm3660>
- Fangue, N. A., y Bennett, W. A. (2003). Thermal tolerance responses of laboratory acclimated and seasonally acclimatized Atlantic stingray, *Dasyatis sabina*. *Copeia*, 2003(2), 315–325. [http://doi.org/10.1643/0045-8511\(2003\)003\[0315:TTROLA\]2.0.CO;2](http://doi.org/10.1643/0045-8511(2003)003[0315:TTROLA]2.0.CO;2)
- FAO, 1995. Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca - Pacífico Centro- Oriental., Organización de las Naciones Unidas Para la Agricultura y la Alimentación, Roma.
- Feder, M. E., y Hofmann, G. E. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology*, 61:243-82., 243–282. <http://doi.org/10.1146/annurev.physiol.61.1.243>
- Flaherty KM, DeLuca-Flaherty C, M. D. (1990). Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature*, 346(16), 623–628. [http://doi.org/10.1016/0021-9797\(80\)90501-9](http://doi.org/10.1016/0021-9797(80)90501-9)
- García-Villarreal, R. A. (2016). Termotolerancia y campo de actividad metabólico del botete diana (*Sphoeroides annulatus*, Jenyns 1842) (*Teleostei: Tetraodontidae*). Tesis de maestria. CICESE.
- Goetz, M. P., Toft, D. O., Ames, M. M., y Erlichman, C. (2003). The Hsp90 chaperone complex as a novel target for cancer therapy. *Annals of Oncology*, 90(14), 1169–1176. <http://doi.org/10.1093/annonc/mdg316>
- Iwama, G. K. (1998). Stress in Fish. *Annals of the New York Academy of Science*, 851, 304–310. <http://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09005.x>
- Iwama, G. K., Thomas, P. T., Forsyth, R. B., y Vijayan, M. M. (1998). Heat shock protein expression in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 56. <http://doi.org/10.1023/A:1008812500650>
- Iwama, G. K., Vijayan, M. M., Forsyth, R. B., y Ackerman, P. a. (1999). Heat Shock Proteins and Physiological Stress in Fish. *Integrative and Comparative Biology*, 39(6), 901–909. <http://doi.org/10.1093/icb/39.6.901>
- Jing, J., Liu, H., Chen, H., Hu, S., Xiao, K., y Ma, X. (2013). Acute effect of copper and cadmium exposure on the expression of heat shock protein 70 in the *Cyprinidae* fish *Tanichthys albonubes*. *Chemosphere*, 91(8), 1113–22. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.014>
- Johnson, J. A., y Kelsch, S. W. (1998). Effects of evolutionary thermal environment on temperature-preference relationships in fishes. *Environmental Biology of Fishes*.

<http://doi.org/10.1023/A:1007425215669>

- Kaur, M., Atif, F., Ansari, R. A., Ahmad, F., y Raisuddin, S. (2011). The interactive effect of elevated temperature on deltamethrin-induced biochemical stress responses in *Channa punctata* Bloch. *Chemico-biological interactions*, 193(3), 216–24. <http://doi.org/10.1016/j.cbi.2011.06.011>
- Kim, J. H., Jeon, H. J., Baek, J. M., Han, K. N., y Dahms, H. U. (2013). EDCs-induced glucocorticoid receptor related genes expression of the river pufferfish, *Takifugu obscurus*. *Aquaculture Research*, 44(6), 985–994. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2012.03104.x>
- Liu, Q., Huang, S., Deng, C., Xiong, L., Gao, X., Chen, Y., Niu, C., y Liu, Y. (2015). Molecular characterization of heat–shock protein 90 gene and its expression in *Gobiocypris rarus* juveniles exposed to pentachlorophenol. *Fish Physiology and Biochemistry*, 41(5), 1279–1291. <http://doi.org/10.1007/s10695-015-0085-2>
- Mahmood, K., Jadoon, S., Mahmood, Q., Irshad, M., y Hussain, J. (2014). Synergistic effects of toxic elements on heat shock proteins. *BioMed Research International*, 2014. <http://doi.org/10.1155/2014/564136>
- Ming, J., Xie, J., Xu, P., Liu, W., Ge, X., Liu, B., He, Y., Cheng, Y., Zhou, Q., y Pan, L. (2010). Molecular cloning and expression of two HSP70 genes in the Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala* Yih). *Fish and shellfish immunology*, 28(3), 407–18. <http://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.11.018>
- Mohindra, V., Tripathi, R. K., Yadav, P., Singh, R. K., y Lal, K. K. (2015). Hypoxia induced altered expression of heat shock protein genes (Hsc71, Hsp90 α and Hsp10) in Indian Catfish, *Clarias batrachus* (Linnaeus, 1758) under oxidative stress. *Molecular Biology Reports*, 42(7), 1197–1209. <http://doi.org/10.1007/s11033-015-3855-0>
- Molina, A., Biemar, F., Müller, F., Iyengar, A., Prunet, P., Maclean, N., Martial, J., y Muller, M. (2000). Cloning and expression analysis of an inducible HSP70 gene from tilapia fish. *FEBS Letters*, 474(1), 5–10. [http://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01538-6](http://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01538-6)
- Mu, W., Wen, H., Li, J., y He, F. (2013). Cloning and expression analysis of a HSP70 gene from Korean rockfish (*Sebastes schlegeli*). *Fish and shellfish immunology*, 35(4), 1111–21. <http://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.07.022>
- Muller, R. (1977). Temperature selection of goldfish (*Carassius auratus* L.) and brook trout (*Salvelinus fontinalis mitch.*) after heterogeneous temperature acclimation. *Thermal Biology*, 2(1972), 5–7. [http://doi.org/10.1016/0306-4565\(77\)90003-1](http://doi.org/10.1016/0306-4565(77)90003-1)
- Narum, S. R., Campbell, N. R., Meyer, K. A., Miller, M. R., y Hardy, R. W. (2013). Thermal adaptation and acclimation of ectotherms from differing aquatic climates. *Molecular Ecology*, 22(11), 3090–3097. <http://doi.org/10.1111/mec.12240>
- National Center for Biotechnology Information (NCBI) [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] – [cited 2017 July 27]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Newton, J. R., De Santis, C., y Jerry, D. R. (2012). The gene expression response of the catadromous perciform barramundi *Lates calcarifer* to an acute heat stress. *Journal of*

- Fish Biology*, 81(1), 81–93. <http://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2012.03310.x>
- Ni, M., Wen, H., Li, J., Chi, M., Ren, Y., Song, Z., y Ding, H. (2014). Two HSPs gene from juvenile Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*): cloning, characterization and expression pattern to crowding and hypoxia stress. *Fish Physiology and Biochemistry*, 40(6), 1801–1816. <http://doi.org/10.1007/s10695-014-9969-9>
- Nollen, E. a a, y Morimoto, R. I. (2002). Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing “heat shock” proteins. *Journal of cell science*, 115(Pt 14), 2809–2816.
- Nuñez-Vazquez, E. J., Garcia-Ortega, A., Campa-Cordova, A. I., Abdo De La Parra, I., Ibarra-Martinez, L., Heredia-Tapia, A., y Ochoa, J. L. (2012). Toxicity of cultured bullseye puffer fish *Sphoeroides annulatus*. *Marine Drugs*, 10(2), 329–339. <http://doi.org/10.3390/md10020329>
- Oksala, N. K. J., Ekmekçi, F. G., Özsoy, E., Kirankaya, Ş., Kokkola, T., Emecen, G., Lappalainen, J., Kaarniranta, K., y Atalay, M. (2014). Natural thermal adaptation increases heat shock protein levels and decreases oxidative stress. *Redox Biology*, 3, 25–28. <http://doi.org/10.1016/j.redox.2014.10.003>
- Padmini, E., Usha Rani, M., y Vijaya Geetha, B. (2008). Differential HSP90a expression in fish hepatocytes from polluted estuary during summer. *Fisheries Science*, 74(5), 1118–1126. <http://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2008.01631.x>
- Pan, F., Zarate, J. M., Tremblay, G. C., y Bradley, T. M. (2000). Cloning and characterization of salmon hsp90 cDNA: Upregulation by thermal and hyperosmotic stress. *Journal of Experimental Zoology*, 287(3), 199–212. [http://doi.org/10.1002/1097-010X\(20000801\)287:3<199::AID-JEZ2>3.0.CO;2-3](http://doi.org/10.1002/1097-010X(20000801)287:3<199::AID-JEZ2>3.0.CO;2-3)
- Parsell, D. A., y Lindquist, S. (1993). The Function of Heat-Shock Proteins in Stress Tolerance: Degradation and Reactivation of Damaged Proteins. *Annual Review of Genetics*, 27(1), 437–496. <http://doi.org/10.1146/annurev.ge.27.120193.002253>
- Paschke, K., Agüero, J., Gebauer, P., Díaz, F., Mascaró, M., López, E., Sánchez-Tapia, I., Caamal-Monsreal, C., Tremblay, N., Pörtner, H., y Rosas, C. (2017). Estimating the aerobic scope for metabolic activity in aquatic ectotherms: a novel approach. *En revisión*.
- Patra, R. W., Chapman, J. C., Lim, R. P., y Gehrke, P. C. (2007). The effects of three organic chemicals on the upper thermal tolerances of four freshwater fishes. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC*, 26(7), 1454–9. <http://doi.org/10.1897/06-156R1.1>
- Prodocimo, V., y Freire, C. a. (2004). Estuarine pufferfishes (*Sphoeroides testudineus* and *S. greeleyi*) submitted to sea water dilution during ebb tide: A field experiment. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 37(October 2014), 1–5. <http://doi.org/10.1080/10236240310001603765>
- Prunet, P., Cairns, M. T., Winberg, S., y Pottinger, T. G. (2008). Functional genomics of stress responses in fish. *NERC Open Research Archive*, 16. <http://doi.org/10.1080/10641260802341838>
- Reyes, I. (2009). Temperatura preferida, termotolerancia y consumo de oxígeno en

- juveniles de botete diana (*Sphoeroides annulatus*, Jenyns 1842). Tesis de maestria. CICESE.
- Reyes, I., Díaz, F., Re, A. D., y Pérez, J. (2011). Behavioral thermoregulation, temperature tolerance and oxygen consumption in the Mexican bullseye puffer fish, *Sphoeroides annulatus* Jenyns (1842), acclimated to different temperatures. *Journal of Thermal Biology*, 36(3), 200–205. <http://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2011.03.003>
- Ritossa, F. (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*, 18(12), 571–573. <http://doi.org/10.1007/BF02172188>
- Roberts, R. J., Agius, C., Saliba, C., Bossier, P., y Sung, Y. Y. (2010). Heat shock proteins (chaperones) in fish and shellfish and their potential role in relation to fish health: A review. *Journal of Fish Diseases*, 33(10), 789–801. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2010.01183.x>
- Safari, R., Shabani, A., Ramezanpour, S., Imanpour, M. R., y Rezvani, S. (2014). Alternations of heat shock proteins (hsp 70) gene expression in liver and gill of Persian sturgeon (*Acipenser persicus* Borodin , 1987) exposed to cadmium chloride. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 13(4), 979–997.
- Salvato, B., Cuomo, V., Di Muro, P., y Beltramini, M. (2001). Effects of environmental parameters on the oxygen consumption of four marine invertebrates: A comparative factorial study. *Marine Biology*, 138(4), 659–668. <http://doi.org/10.1007/s002270000501>
- Shi, G. C., Dong, X. H., Chen, G., Tan, B. P., Yang, Q. H., Chi, S. Y., y Liu, H. Y. (2015). Physiological responses and HSP70 mRNA expression of GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under cold stress. *Aquaculture Research*, 46(3), 658–668. <http://doi.org/10.1111/are.12212>
- Sokolova, I. M. (2013). Energy-limited tolerance to stress as a conceptual framework to integrate the effects of multiple stressors. *Integrative and Comparative Biology*, 53(4), 597–608. <http://doi.org/10.1093/icb/ict028>
- Sokolova, I. M., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G., y Sukhotin, A. A. (2012). Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Marine Environmental Research*, 79, 1–15. <http://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.04.003>
- Somero, G. N. (1995). Proteins and Temperature. *Annual Review of Physiology*, 43–68. <http://doi.org/doi:10.1146/annurev.ph.57.030195.000355>
- Sørensen, J. G., Kristensen, T. N., y Loeschcke, V. (2003). The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters*, 6(11), 1025–1037. <http://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2003.00528.x>
- Sung, Y. Y., Liew, H. J., Bolong, A. M. A., Wahid, M. E. A., y MacRae, T. H. (2014). The induction of Hsp70 synthesis by non-lethal heat shock confers thermotolerance and resistance to lethal ammonia stress in the common carp, *Cyprinus carpio* (Linn). *Aquaculture Research*, 45(10), 1706–1712. <http://doi.org/10.1111/are.12116>
- Tang, C.-H., Leu, M.-Y., Shao, K., Hwang, L.-Y., y Chang, W.-B. (2014). Short-term effects of thermal stress on the responses of branchial protein quality control and

- osmoregulation in a reef-associated fish, *Chromis viridis*. *Zoological Studies*, 53(1), 21. <http://doi.org/10.1186/s40555-014-0021-7>
- Templeman, N. M., LeBlanc, S., Perry, S. F., y Currie, S. (2014). Linking physiological and cellular responses to thermal stress: β -adrenergic blockade reduces the heat shock response in fish. *Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology*, 184(6), 719–28. <http://doi.org/10.1007/s00360-014-0831-2>
- Tkáčavá, J., y Angelovičova, M. (2012). Heat Shock Proteins (HSPs): a Review. *Scientific papers: Animal Science and Biotechnologies*, 45(1), 349–353.
- Zakhartsev, M., De Wachter, B., Johansen, T., Portner, H. O., y Blust, R. (2005). Hsp70 is not a sensitive indicator of thermal limitation in *Gadus morhua*. *Journal of Fish Biology*, 67(3), 767–778. <http://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2005.00778.x>
- Zhang, L., Sun, C., Ye, X., Zou, S., Lu, M., Liu, Z., y Tian, Y. (2014). Characterization of four heat-shock protein genes from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and demonstration of the inducible transcriptional activity of Hsp70 promoter. *Fish Physiology and Biochemistry*, 40(1), 221–233. <http://doi.org/10.1007/s10695-013-9838-y>
- Zhang, X. Z., Dai, L. P., Wu, Z. H., Jian, J. C., y Lu, Y. S. (2011). Expression pattern of heat shock protein 90 gene of humphead snapper *Lutjanus sanguineus* during pathogenic *Vibrio harveyi* stress. *Journal of Fish Biology*, 79(1), 178–193. <http://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2011.03012.x>