



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**

**Caracterización y determinación de los niveles de expresión de  
proteínas de estrés térmico de 70 kDa (HSP70) en esponjas  
marinas antárticas sometidas a condiciones de estrés térmico**

Memoria para optar al Título Profesional de Bioquímico

**Camila Magdalena Osorio Aliaga**

**Directores de Memoria:**

Dr. Marcelo González Aravena  
Dr. César Cárdenas Alarcón  
Laboratorio de Biorecursos Antárticos  
Departamento Científico  
Instituto Antártico Chileno (INACH)

**Profesor Patrocinante:**

Dr. Sergio Álvarez Armijo  
Departamento de Bioquímica y  
Biología Molecular  
Facultad de Ciencias Químicas y  
Farmacéuticas  
Universidad de Chile

**Santiago - Chile**

**2019**

## **AGRADECIMIENTOS**

En el transcurso de este largo proceso, son muchos a quienes debo agradecer su cariño, amistad y apoyo, personas hermosas que me han alentado y aconsejado. Gracias por estar presente, no imaginan lo importante que han sido.

Y a quienes agradezco de manera infinita y dedico completamente este trabajo es a mis padres, Gabriela y Sergio, quienes me han apoyado incondicionalmente toda mi vida.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Biorecursos Antárticos, perteneciente al Instituto Antártico Chileno (INACH), en el marco del proyecto FONDECYT de Iniciación 11150129 liderado por el Dr. César Cárdenas (Investigador Principal) y el co-investigador Dr. Marcelo González, ambos investigadores del Departamento Científico de INACH.



## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL .....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ÍNDICE DE TABLAS.....	V
ÍNDICE DE ANEXOS.....	V
ABREVIATURAS .....	VI
RESUMEN.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 ANTÁRTICA Y CAMBIO CLIMÁTICO .....	1
1.2 PROTEÍNAS INDICADORAS DE ESTRÉS TÉRMICO .....	3
1.3 RESPUESTA A ESTRÉS TÉRMICO EN ORGANISMOS ANTÁRTICOS	10
1.4 SECUENCIACIÓN DE ALTO RENDIMIENTO EN ORGANISMOS NO	
MODELO .....	16
1.5 RESPUESTA A ESTRÉS TÉRMICO EN ESPONJAS .....	18
2. HIPÓTESIS.....	22
3. OBJETIVOS.....	23
3.1. OBJETIVO GENERAL.....	23
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	24
4.1 MATERIALES .....	24
4.1.1 Reactivos e insumos generales.....	24
4.1.2 Equipamiento.....	25
4.1.3 Programas computacionales .....	25
4.2 Análisis del transcriptoma de esponja antártica <i>Isodictya</i> sp. ....	26

4.2.1	Obtención de transcriptomas de esponja antártica <i>Isodictya</i> sp. ....	26
4.2.2	Selección de secuencias HSP70 .....	27
4.2.3	Selección de secuencias para genes de referencia .....	28
4.2.4	Árbol filogenético .....	30
4.2.5	Diseño partidores para RT-qPCR en tiempo real .....	31
4.3	COLECCIÓN DE MUESTRAS Y DISEÑO EXPERIMENTAL .....	31
4.3.1	Área de recolecta.....	31
4.3.2	Colecta y aclimatación de organismos .....	32
4.3.3	Adecuaciones para experimentos de estrés térmico.....	33
4.3.4	Experimento estrés térmico prolongado .....	34
4.3.5	Experimento estrés térmico corto .....	34
4.4	OBTENCIÓN DE MATERIAL GENÉTICO DE ESPONJA ANTÁRTICA	
	<i>Isodictya</i> sp.....	36
4.4.1	Extracción de ARN de esponjas antárticas <i>Isodictya</i> sp. ....	36
4.4.2	Cuantificación de ARN de esponjas antárticas <i>Isodictya</i> sp.....	38
4.4.3	Comprobación de calidad de ARN de esponja antártica <i>Isodictya</i> sp. por electroforesis en gel de agarosa .....	38
4.4.4	Reacción de retrotranscripción de ARN de esponja antártica <i>Isodictya</i> sp. ....	39
4.4.5	RT-qPCR en tiempo real con ADNc de esponja antártica <i>Isodictya</i> sp. .....	39
4.5	MEDICIÓN DE INTEGRIDAD DE ARN DE ESPONJAS ANTÁRTICAS	
	<i>Isodictya</i> sp.....	40
4.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	41
5.	RESULTADOS .....	42
5.1	ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS SELECCIONADAS DE HSP70 .....	42
5.2	CARACTERIZACIÓN DE SECUENCIAS DE HSP70.....	47
5.2.1	Filogenia molecular de las secuencias de HSP70.....	47
5.2.2	Secuencias de HSP70 de la Matriz Citoplasmática.....	49

5.2.4	Secuencia de HSP70 de la Mitocondria .....	54
5.2.5	Compartimentalización de las secuencias de HSP70 .....	56
5.3.1	Expresión diferencial de secuencias de HSP70 durante el estrés térmico .....	58
5.3.2	Partidores de HSP70 para RT-qPCR en tiempo real .....	58
5.3.3	Partidores de genes de referencia para RT-qPCR en tiempo real .....	59
5.3.4	Integridad de los ARN totales de <i>Isodictya</i> sp. ....	61
5.3.5	Efecto de la integridad de los ARN totales de <i>Isodictya</i> sp. en la RT- qPCR en tiempo real .....	63
6.	DISCUSIÓN .....	67
7.	CONCLUSIONES .....	75
8.	REFERENCIAS .....	76

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Mecanismo de expresión de las HSP70 bajo condiciones de estrés no letales .....	6
Figura 2 Mecanismo de acción de las HSP70 ante polipeptidos.....	8
Figura 3 Especies marinas de la península antártica es las que se ha estudiado su respuesta a estrés térmico.....	15
Figura 4 Esponjas Antárticas <i>Isodictya</i> sp. y punto de recolección.....	32
Figura 5. Diseño experimental.....	35
Figura 6 Alineamiento de las seis secuencias de HSP70 extraídas del transcriptoma de <i>Isodictya</i> sp. en el cual se observan las zonas conservadas de las secuencias correspondientes a la familia de las HSP70 .....	44
Figura 7 Predicción estructura secundaria de las secuencias aminoacídicas de HSP70. ....	46
Figura 8 Porcentaje de Identidad e Identidad de las secuencias aminoacídicas extraídas del transcriptoma de <i>Isodictya</i> sp. y secuencias aminoacídicas de HSP70 de esponjas. ....	47
Figura 9 Análisis filogenético molecular con el método Maximum Likelihood entre secuencias constitutivas e inducibles de la familia HSP70. ....	48
Figura 10 Secuencias aminoacídicas de HSP70 de <i>Isodictya</i> sp. de la matriz citoplasmática. ....	50
Figura 11 Secuencias aminoacídicas de HSP70 de <i>Isodictya</i> sp. del retículo endoplásmico.....	53
Figura 12 Secuencia aminoacídica de HSP70 de <i>Isodictya</i> sp. mitocondrial....	55
Figura 13 Relación filogenética entre secuencias de HSP70 asociadas a diferentes compartimentos celulares. ....	57
Figura 14 Verificación de la integridad del ARN de esponjas <i>Isodictya</i> sp. a través de electroforesis en gel de agarosa.....	62



Figura 15 Comparación en RT-qPCR de tiempo real entre ARN degradado y ARN no degradado de <i>Isodictya</i> sp. ....	66
---	----

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Secuencias seleccionadas desde el archivo de abundancia relativa ...	29
Tabla 2 Valores de TPM de los genes de referencia en las condiciones experimentales. ....	30
Tabla 3 Búsqueda por homología con blastx en la plataforma NCBI. ....	42
Tabla 4 Valores de TPM en <i>Isodictya</i> sp. en las distintas condiciones experimentales ....	58
Tabla 5 Partidores secuencias de HSP70. ....	59
Tabla 6 Partidores de las secuencias de genes de referencia. ....	60
Tabla 7 Integridad de ARN en muestras de <i>Isodictya</i> sp. ....	63
Tabla 8 selección de muestras para PCR en tiempo real ....	64

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Nucleótidos y secuencia deducida de aminoácidos de la secuencia citoplasmática <i>Isodictya</i> _545. ....	87
Anexo 2 Nucleótidos y secuencia deducida de aminoácidos de la secuencia citoplasmática <i>Isodictya</i> _022. ....	88
Anexo 3 Nucleótidos y secuencia deducida de aminoácidos de la secuencia citoplasmática <i>Isodictya</i> _949. ....	89
Anexo 4 Nucleótidos y secuencia deducida de aminoácidos de la secuencia del retículo endoplasmático <i>Isodictya</i> _300. ....	90
Anexo 5 Nucleótidos y secuencia deducida de aminoácidos de la secuencia del retículo endoplasmático <i>Isodictya</i> _457. ....	91
Anexo 6 Nucleótidos y secuencia deducida de aminoácidos de la secuencia mitocondrial <i>Isodictya</i> _049 ....	92

## **ABREVIATURAS**

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico

**ADNc:** ADN complementario

**ADP:** del inglés adenosine diphosphate

**ARN:** Ácido Ribonucleico

**ATP:** del inglés adenosine triphosphate

**Ct:** del inglés Cycle threshold

**h:** hora

**HSC:** del inglés Heat Shock Cognate

**HSP:** del inglés Heat Shock Protein

**HSR:** del inglés Heat Shock Response

**HTS:** del inglés High-throughput sequencing

**IPCC:** Intergovernmental Panel on Climate Change

**µL:** microlitro

**min:** minuto

**NBD:** del inglés Nucleotide Binding Domain

**NCBI:** del inglés National Center for Biotechnology Information

**ng:** nanogramos

**ORF:** del inglés Open Reading Frame

**PCR:** Reacción en cadena de polimerasa

**RIN:** del inglés RNA Integrity Number

**RQN:** del inglés RNA Quality Number

**SBD:** del inglés Substrate Binding Domain

**seg:** segundo

**TAE:** del inglés Tris-Acetate-EDTA

**TBE:** del inglés Tris-Borate-EDTA

**TPM:** transcritos por millón

**UTR:** del inglés Untranslated Region

## RESUMEN

Las esponjas son componentes importantes del bentos marino antártico y son vitales para la salud de los ecosistemas. Es así como el incremento de temperatura en el océano austral puede perjudicar la composición y riqueza de estas comunidades bentónicas. Actualmente, son pocos los estudios que analizan la respuesta de las esponjas antárticas ante un eventual incremento de temperatura, y son menos aquellos que estudian su respuesta a nivel molecular a pesar de su potencial informativo.

Con esta perspectiva, se utilizó la esponja antártica *Isodictya* sp. (Demospongiae) para estudiar la respuesta ante estrés térmico. Especímenes de *Isodictya* sp. fueron colectados en la Península Antártica en aguas poco profundas (10m), donde se desarrollan naturalmente a temperaturas que oscilan entre -1,8 °C y 2 °C. Estas fueron expuestas a temperaturas de 3 °C y 6 °C, con el propósito de identificar y caracterizar las proteínas de estrés térmico HSP70 y evaluar su respuesta ante un incremento de temperatura.

Con un análisis del transcriptoma de *Isodictya* sp., fue posible identificar y caracterizar seis secuencias pertenecientes a la familia de las HSP70. Estas secuencias poseen diferentes ubicaciones celulares según las firmas identificadas y análisis filogenéticos. Además, a partir de esta misma aproximación, se evidenció que frente a condiciones de estrés térmico, la abundancia de los transcritos se ve incrementada.

Es así, como los resultados obtenidos en el presente estudio no sólo contribuyen a la comprensión de la maquinaria molecular asociada a la respuesta de estrés térmico en esponjas antárticas, también indicarían que esta especie presentaría adaptaciones para tolerar las condiciones climáticas futuras.

## **ABSTRACT**

Sponges are important components of Antarctic marine benthos and vital for the health of ecosystems. Hence, an increase of temperature in the Southern Ocean can damage the composition and richness of these benthic communities. Currently, there are not so many studies that analyze the response of the Antarctic sponges to an eventual increase in temperature. Moreover, there are fewer studies that show their response at the molecular level despite their informative potential.

With this in mind, we use the Antarctic sponge *Isodictya* sp. (Demospongiae) to study the heat shock response. Specimens of *Isodictya* sp. were collected in the Antarctic Peninsula in shallow waters (10m), where they develop naturally at temperatures ranging between -1,8 °C and 2 °C. These were exposed to temperatures of 3 °C and 6 °C, to identify and characterize the heat shock proteins HSP70 and evaluating their response to an increase in temperature.

With an analysis of the transcriptome of *Isodictya* sp., it was possible to identify and characterize six sequences belonging to the family of HSP70. These sequences have different cellular locations according to the identified signatures and phylogenetic analyzes. Besides, from this same approach, it was evidenced that in front of heat shock conditions the abundance of transcripts be increased.

Therefore, the results obtained in the present study not only contribute to the understanding of the molecular machinery associated with the heat shock response in Antarctic sponges, but they would also indicate that this species would present adaptations to tolerate future climatic conditions.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Antártica y Cambio Climático**

La separación de Antártica y América del sur, que ocurrió entre 41 y 25 millones de años atrás, dio origen a la apertura del Pasaje de Drake y posterior formación de la Corriente Circumpolar Antártica, siendo este un acontecimiento crucial en el aislamiento térmico y biogeográfico del continente antártico (Clarke et al. 2005; Barnes et al. 2006; McClintock et al. 2008; Reguero et al. 2013). La corriente circumpolar antártica junto con el frente polar, han aislado Antártica de aguas cálidas y condiciones atmosféricas templadas, manteniendo por millones de años el continente a temperaturas bajas y estables ( Clarke et al. 2005; Barnes y Conlan 2007; McClintock et al. 2008; Convey et al. 2014). La temperatura del océano que rodea la península antártica varía entre  $-1,8\text{ }^{\circ}\text{C}$  en invierno y un máximo de  $1,7\text{ }^{\circ}\text{C}$  en verano (Clark et al. 2008), condiciones físicas que han conducido a la evolución de una biota distintiva (Barnes et al. 2006; Barnes y Clarke 2011; Convey et al. 2014).

En las últimas décadas, el cambio climático ha impactado los sistemas naturales en todos los continentes y océanos, siendo los arrecifes de coral y los ecosistemas polares altamente vulnerables (IPCC 2014). Los ecosistemas marinos antárticos han presentado variaciones asociadas a un calentamiento significativo de la península antártica desde mediados del siglo veinte, siendo

esta la zona del planeta que ha presentado mayores variaciones (King et al. 2003; Turner et al. 2005; Abram et al. 2013).

Los registros mundiales indican que la temperatura de los océanos se ha incrementado de manera constante entre 1971 y 2010, en un intervalo de 0,09 °C a 0,13 °C por década (IPCC 2014). De la energía almacenada en el sistema climático en este período, el 90 % de la energía acumulada corresponde al calentamiento de los océanos, debido a que el agua puede almacenar y transportar energía en forma de calor (Levitus et al. 2000; IPCC 2014). Es por esto que el papel de los océanos es crítico en la comprensión de la variabilidad del sistema climático en el planeta entero (Levitus et al. 2000).

En la península Antártica, el calentamiento atmosférico se vincula a cambios oceanográficos (Clarke et al. 2007). Se calcula que la temperatura del océano se ha incrementado más del triple, si consideramos el cambio del promedio global (0,31 °C) reportado por Levitus *et al.* (2000). Registros de los últimos 50 años indican que en la península Antártica la temperatura atmosférica ha aumentado 3 °C y la temperatura superficial del mar se ha elevado 1 °C (Meredith y King 2005). Asimismo, en la Bahía Sur de Isla Doumer, se han registrado temperaturas en el mar entre -1,7 °C a 3 °C, valores previstos para 2100 (Cárdenas et al. 2018). Además, el análisis de los posibles escenarios para los años 2046 – 2065, predice un cambio de temperatura entre 0,4 °C a 1,6 °C si se tomaran medidas de mitigación rigurosa y de 1,4 °C a 2,6 °C en un escenario con altas emisiones de gases de efecto invernadero. En ambas proyecciones, las

regiones polares continuarán aumentando su temperatura más rápidamente que la media global (IPCC 2014). En consecuencia, esta situación ha generado interés por comprender los mecanismos que determinan la capacidad de las especies antárticas a adaptarse a las nuevas condiciones ambientales, además de evaluar su éxito de supervivencia en este nuevo escenario.

## **1.2 Proteínas indicadoras de estrés térmico**

Se postula que el incremento de la temperatura puede perturbar fenómenos biológicos estacionales y ciclos de vida dependientes de la estabilidad climática en los ecosistemas en todo el mundo (Peñuelas y Filella 2001). Por lo anterior, se considera una necesidad el comprender la respuesta de los seres vivos ante el estrés térmico, para así predecir el potencial impacto del cambio climático en la biodiversidad del planeta (Clark y Peck 2009).

El estrés térmico, es un tipo de perturbación ambiental relacionada con la variación de temperatura, la cual desencadena una respuesta fisiológica en los seres vivos. En esta respuesta los organismos promueven el despliegue de procesos celulares con el fin de restablecer la homeostasis, por ejemplo, aumentando la síntesis de un conjunto de proteínas llamadas chaperonas, conocidas también como proteínas de estrés térmico o HSP (por sus siglas en inglés Heat Shock Proteins) (Hofmann et al. 2000), proceso denominado como respuesta de estrés térmico o HSR (por sus siglas en inglés Heat Shock Response). Por otra parte, existe un conjunto de estas proteínas que se expresan

de forma abundante y constitutiva en la ausencia de cualquier estrés, siendo éstas esenciales para la viabilidad celular bajo condiciones normales de crecimiento (Gething y Sambrook 1992). Cabe agregar que las HSPs pueden ser inducidas por variados factores estresantes, tales como agentes químicos y físicos, cambios osmóticos, concentraciones extremas de iones, especies reactivas de oxígeno, condiciones de anoxia, entre otros factores que también alteran la homeostasis celular y promueven la expresión de estas proteínas (Feder y Hofmann 1999; Piano et al. 2005). Por lo anterior, y debido a que su expresión es inducida por variadas condiciones estresantes, también se les conoce como proteínas indicadoras de estrés (López-Legentil et al. 2008).

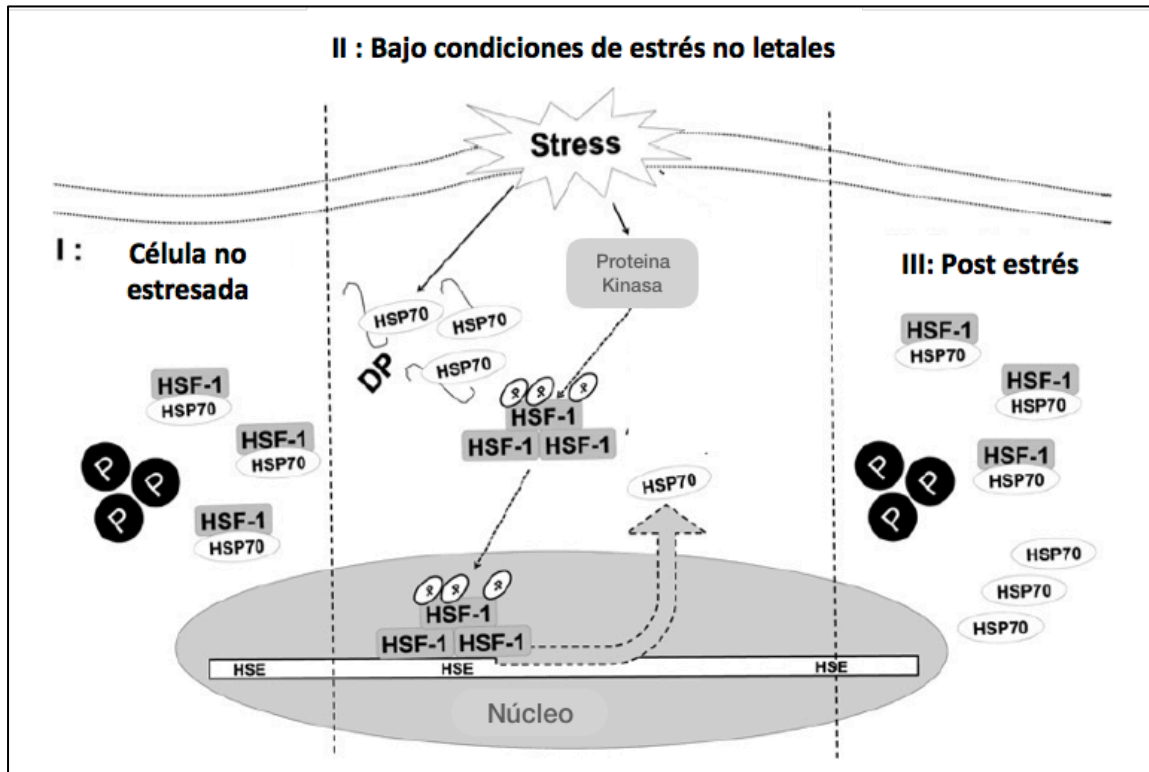
Las HSPs son clasificadas en familias según sus secuencias de homología y peso molecular, de modo que al nombrarlas se expresa su peso molecular en kilo Dalton (kD), así podemos encontrar a las HSP110, HSP100, HSP90, HSP70, HSP40, HSP10 y HSP pequeñas (Feder y Hofmann 1999). Es importante señalar que los genes que codifican para las HSPs (distinguidos en el texto con letras minúsculas, *hsps*) se encuentran en la mayoría de las especies (Feder y Hofmann 1999; Daugaard et al. 2007; Clark et al. 2008).

Particularmente, la proteína de estrés térmico HSP70 es la chaperona más estudiada y está altamente conservada en la evolución. Se considera que es expresada en todos los seres vivos, y ha sido aislada y caracterizada en diversas especies, incluidas varias esponjas marinas (Efremova et al. 2002). Estas proteínas son chaperonas dependientes de ATP que reconocen y modulan el



estado de plegamiento de polipéptidos dentro de las células (Gething y Sambrook 1992), además de procesos como la estabilización de polipéptidos recién sintetizados y su tráfico a través de membranas biológicas; la prevención de la agregación de proteínas; la solubilización de agregados proteicos y su posterior replegamiento, así como en algunos casos donde estas chaperonas pueden facilitar la degradación del polipéptido (Gething y Sambrook 1992; Meimaridou et al. 2009; Mayer 2013; Kityk et al. 2018).

La expresión de genes de HSP70, se produce por la interacción entre HSF1 (del inglés, Heat-Shock Transcription Factor 1) y elementos de respuesta llamados HSEs (del inglés, Heat-Schock Elements), estos últimos son secuencias específicas de ADN ubicadas en la región promotora de los genes de las HSPs. Bajo condiciones no estresantes, el factor de transcripción HSF1, como monómero, se encuentra unido a las HSP70s, manteniéndose retenido en el citoplasma, siendo esta su forma inactiva, pues no puede acceder a la cromatina. Cuando se produce una condición de estrés, como el aumento de temperatura, las HSP70s se unen a las proteínas mal plegadas y se disocian de HSF1, el cual forma un trímero, que una vez fosforilado por quinasas activadas por estrés, se transporta hacia el núcleo y queda en su forma activa para unirse a los HSEs e iniciar la transcripción de las HSP70s (Figura 1) (Morimoto 1998; Krause et al. 2015).

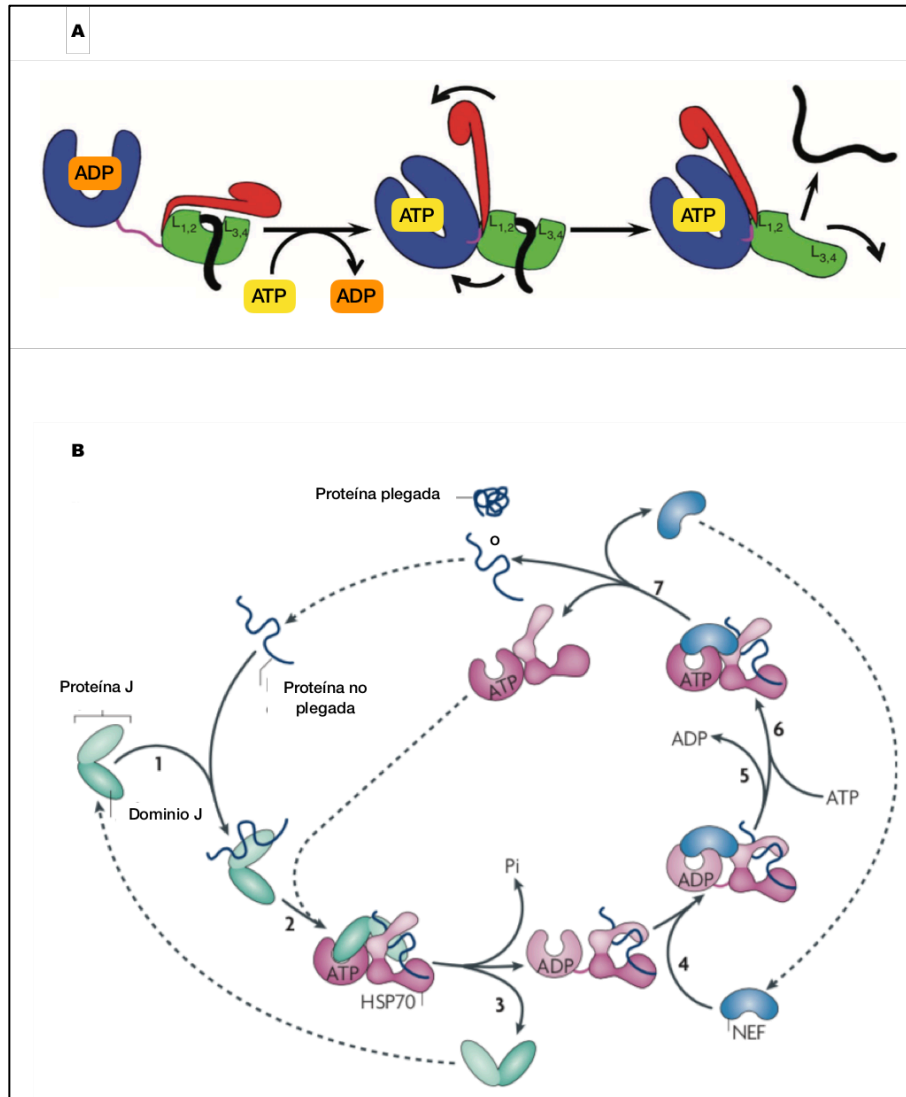


**Figura 1 Mecanismo de expresión de las HSP70 bajo condiciones de estrés no letales** (I) Cuando la célula no se encuentra estresada, el factor de transcripción HSF-1 (heat-shock transcription factor 1) está inactivo en un estado monomérico unido con la HSP70 citosólica. En el esquema, P corresponde a una proteína plegada correctamente. (II) Bajo condiciones de estrés y en la presencia de proteínas denaturalizadas (DP, del inglés denatured proteins), HSP70 libera HSF-1. La fosforilación y trimerización de HSF-1 provoca un aumento en la unión de HSF-1 al DNA, provocando la unión del trímero de HSF-1 a HSEs (heat-shock elements), que inicia la transcripción del ARNm de HSP70. (III) Después de la recuperación del estrés, HSP70 se vuelve a unir a HSF-1 ejerciendo así un efecto inhibitorio sobre la unión de HSF-1 con HSE. En general, la adaptación al estrés se asocia con mayores niveles de HSP70 (Imagen modificada a partir de Krause et al., 2015).

Las proteínas HSP70s presentan dos regiones principales, dominio ATPasa (NBD, del inglés Nucleotide Binding Domain) y el dominio de unión a sustrato (SBD, del inglés Substrate Binding Domain) unidos por la región hidrofóbica altamente conservada D-[VM]-L-L-L-D-V-[TSA]-P (Torchia et al. 1997; Luan et al. 2010). La región NBD se compone de cuatro subdominios (IA,

IB, IIA y IIB) dispuestos en dos lóbulos, mientras que la región SBD se subdivide en un subdominio de hoja  $\beta$  plegada (SBD $\beta$ ), que contiene el sitio de unión a péptidos y un subdominio  $\alpha$  helicoidal (SBD $\alpha$ ) que funciona como una cubierta (Figura 2a) (Mayer 2013; Kityk et al. 2018).

En el dominio NBD se encuentra el sitio de unión a ATP/GTP con el motivo consenso A-E-[AIS]-Y-L-G-[QKST]-[RSET] (Saraste et al. 1990). Cuando HSP70 se encuentra unida a ATP, tiene una baja afinidad por los polipéptidos, la cual puede aumentar entre 10 a 50 veces, una vez que el ATP es hidrolizado (Kityk et al. 2018). En este proceso las HSP70 requieren de cofactores, que regulan su unión con la proteína mal plegada, como la proteína J (también conocida como HSP40) la cual estimula la actividad ATPasa y el factor de intercambio de nucleótidos (NEF, del inglés Nucleotide Exchange Factor) que provoca la disociación de ADP (Figura 2b) (Kampinga y Craig 2010).



**Figura 2 Mecanismo de acción de las HSP70 ante polipeptidos. A)** La estructura presentada muestra cómo la unión de ATP a NDB (representado en azul) induce la apertura del canal de unión de polipéptido en SBD (en rojo SBD $\alpha$ , en verde SBD $\beta$  y en negro el polipeptido) (Imagen modificada de Qi *et al.*, 2013) **B)** La proteína J se une a la proteína mal plegada a través de su dominio de unión a péptidos (1) donde interactúan con HSP70-ATP a través de su dominio J (2). La proteína mal plegada transitoriamente interactúa con el sitio de unión a péptido “abierto” de HSP70. Esta interacción más la del dominio J, estimulan la hidrólisis de ATP, provocando un cambio conformacional en la HSP70, que cierra la tapa helicoidal (SBD $\alpha$ ) sobre la hendidura y estabiliza la interacción con la proteína mal plegada, liberando la proteína J del complejo (3). Posteriormente, NEF, que tiene una mayor afinidad por HSP70-ADP, se une al complejo (4). Luego ADP se disocia (5) y ATP se une a HSP70 (6). La proteína se libera debido que disminuye la afinidad de esta por HSP70-ATP (7). La unión de ATP a HSP70 se ve favorecida, ya que las concentraciones celulares de ATP suelen ser mucho más altas que las de ADP. Si el estado nativo de la proteína mal plegada no se alcanza con la liberación, la proteína J vuelve a unirse a sus regiones hidrófobas expuestas y el ciclo comienza de nuevo (Imagen modificada de Kampinga y Craig, 2010)

Las HSP70 tienen tres firmas (del inglés signature, que hace referencia a patrones contiguos de aminoácidos de 10-15 residuos de largo) características. Las firmas I-[HD]-L-G-T-T-Y-S y [IV]-F-D-L-G-G-G-T-F-D-V-S-[LI]-L, se ubican en la región NBD, mientras que la tercera firmas, [IV]-V-L-V-G-G-S-T-R-[MI]-P-K-I-Q-[QK], se ubica en la región SBD (Gupta y Singh 1994; Sonoda et al. 2006). En el dominio NBD, también está presente la secuencia nuclear bipartita [KQS]-R-K-H-K-K-D-P-A-D-N-K-[RL], la cual está envuelta en el transporte de la chaperona al núcleo (Shim et al. 2006; Sonoda et al. 2006). Además, se reconocen otros dos sitios que son mucho más variables entre las diferentes formas de HSP70: las secuencias N-K-S-I y N-V-S-A, ambas asociadas a glicosilación (Saraste et al. 1990). Asimismo, se ha descrito un motivo consenso no organelar, R-A-R-F-E-E-L (Tungjitwitayakul et al. 2008).

Según se ha reportado, HSP70 se puede clasificar según su expresión en el organismo. Cuando mantienen sus niveles de expresión constantes, se denominan constitutivas (HSC70, del inglés Heat Shock Cognate) y presentan el motivo G-G-M-P, el cual está implicado en la interacción con proteínas co-chaperonas como la HSP40 (Demand et al. 1998). Por otro lado, aquellas chaperonas que aumentan su expresión en respuesta a un cambio en la homeostasis celular son denominadas inducibles (HSP70) (Clark y Peck 2009), clasificación basada en una respuesta típica ante condiciones de estrés.

También se pueden clasificar las HSP70 según su localización celular. De esta forma hay chaperonas que tienen un patrón de consenso, G-P-[TK]-[VI]-E-

E-[VM]-D, en la zona C-terminal de la proteína. Esta firma interacciona con la co-chaperona HSP40 y está relacionado con actividades de unión al sustrato, además, permite reconocer la localización citoplasmática de esta chaperona (Boorstein et al. 1994; Freeman et al. 1995; Demand et al. 1998). En el retículo endoplasmático (RE) se localiza la proteína GRP78 (del inglés, Glucose-Regulated Protein, 78 kDa). Esta proteína facilita el transporte y posterior plegamiento, de nuevas proteínas sintetizadas dentro del lumen del RE (Daugaard et al. 2007). GRP78 presenta un motivo tetrapéptido en su extremo carboxilo terminal, [KH]-D-E-L, el cual inhibe su transloque del RE (Munro y Pelham 1987; Daugaard et al. 2007; Tang et al. 2016). Del mismo modo, se ha identificado una HSP70 mitocondrial (mtHSP70), también conocida como GRP75 (del inglés, Glucose-Regulated Protein, 75 kDA), que es sintetizada inicialmente en el citoplasma como un polipéptido precursor y posteriormente se localiza dentro de la mitocondria en su forma madura, se caracteriza por poseer dos secuencias de localización mitocondrial conservadas, G-D-A-W-V y Y-S-P-S-Q-I (Mizzen et al. 1989; Tang et al. 2016). Las mtHSP70s interactúan con las proteínas entrantes en el lumen mitocondrial, asistiendo el correcto plegamiento proteico, luego del transporte transmembrana (Kaul et al. 2006; Daugaard et al. 2007).

### **1.3 Respuesta a estrés térmico en organismos antárticos**

Múltiples estudios indican que el aumento de temperatura en el agua potencialmente conducirá a cambios en sistemas biológicos marinos y de agua

dulce, entornos donde el impacto ambiental y sus efectos sobre las especies sería particularmente adverso (IPCC 2007; Cascella et al. 2015).

Investigaciones en la región Antártica demuestran que las condiciones extremas han dado lugar a una fauna estenoterma (que se desarrolla en un intervalo estrecho de temperatura) (Peck, 2002), y se hipotetiza que la evolución de los organismos antárticos a temperaturas bajas y estables pudo permitir la pérdida de características relacionadas con la tolerancia a incrementos de temperatura (Hofmann et al. 2000; Place y Hofmann 2005a).

También se cree que el ineficiente plegamiento de proteínas a bajas temperaturas (Tsai et al. 2002; Somero 2004; Graziano 2014), ha conducido a una HSR alterada en comparación con especies de aguas cálidas, como un mecanismo de adaptación (Place et al. 2004; Peck 2016). Esto se evidencia en que algunos organismos antárticos, por ejemplo, tienen una expresión permanente de HSP70 y presentan una pérdida de la inducción de HSR (Hofmann et al. 2005; Place y Hofmann 2005a; Clark et al. 2008).

En este sentido, es importante dilucidar si la evolución en ambientes estables ha resultado en una adaptación funcional para vivir a bajas temperaturas, como sucede con el aumento de la relación ARN:Proteína en especies antárticas. Esta adaptación que presenta variaciones estacionales les permite una síntesis continua de proteínas a temperaturas cercanas al límite térmico inferior de la traducción de ARN (Fraser et al. 2002a, 2002b). En tal

sentido, es importante comprender cómo las adaptaciones a bajas temperaturas en estos organismos afecta el mecanismo de activación de las HSPs en respuesta al estrés térmico (Place y Hofmann 2005a).

Considerando los planteamientos anteriores, en organismos antárticos se han realizado experimentos que dan información sobre la expresión de la proteína HSP70 en condiciones de estrés térmico, tanto en vertebrados como invertebrados. Los peces nototenoideos antárticos, *Trematomus bernacchii* (Boulenger, 1920) y *Pagothenia borchgrevinki* (Boulenger, 1902) (Suborden, Nototheniodes; Familia Nototheniidae) presentan una expresión constitutiva del gen *hsp70*, expresándose a niveles equivalentes al gen *hsc71*, por lo tanto, hay una pérdida de la HSR al ser expuestos a condiciones de estrés térmico. Sin embargo, el pez antártico *Lycodichthys dearborni* (DeWitt, 1962) (Suborden, Zoarcoidei; Familia, Zoarcidae) perteneciente a un grupo alejado filogenéticamente de la familia Nototheniidae, también expresa constitutivamente el gen *hsp70*, pero mantiene la capacidad de sobre expresar este gen en respuesta a un estrés térmico corto cuando es sometido a las mismas condiciones experimentales que los nototenoideos antárticos (Hofmann et al. 2000; Place y Hofmann 2005a, 2005b).

Otro integrante de la familia Nototheniidae, *Harpagifer antarcticus* (Nybelin, 1947), fue expuesto a 10 °C y 15 °C por 2 h y se evaluaron los niveles de expresión de *hsc70*, *hsp70* y *grp78*. La respuesta ante estas condiciones se resume en una mínima sobreexpresión de todos los genes, donde los niveles de



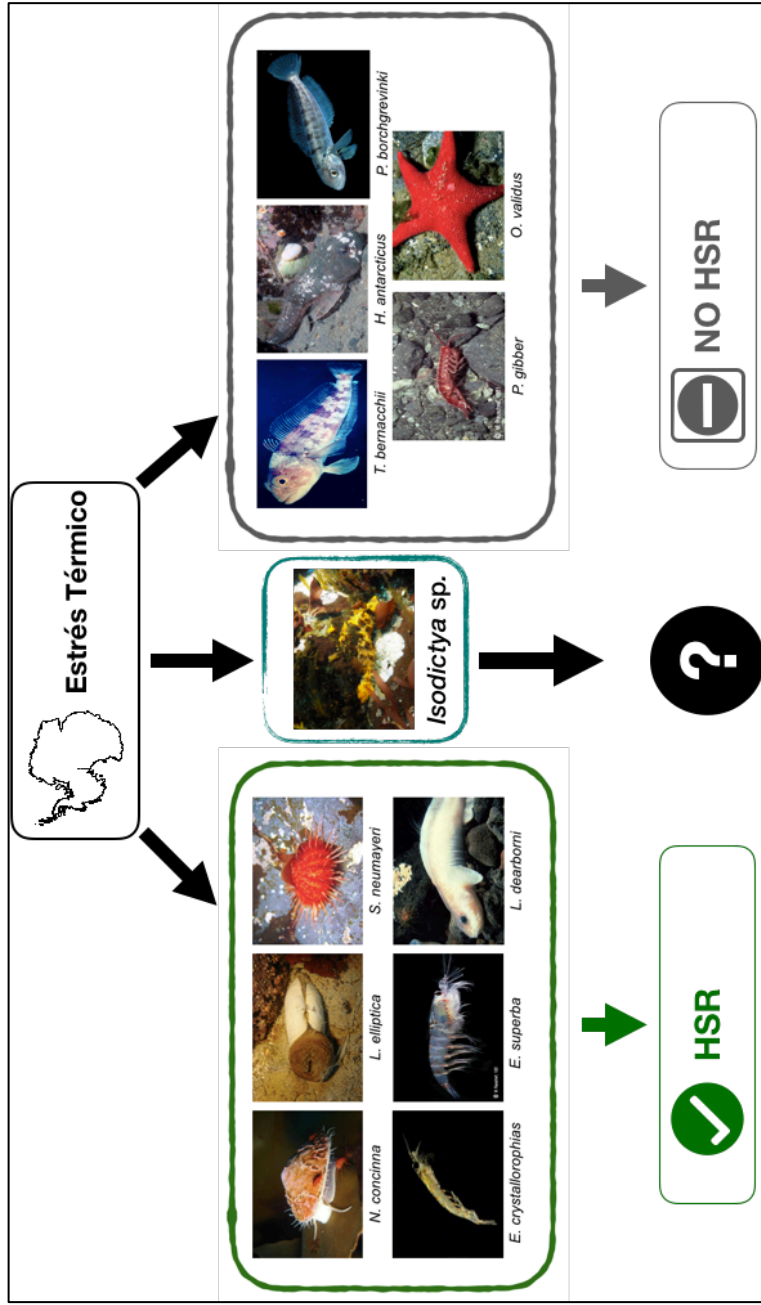
expresión de *hsp70* son constantes, indicando una pérdida de la inducción clásica de este gen (Clark et al. 2008a).

La respuesta a estrés térmico en invertebrados antárticos también presenta un patrón distinto a la respuesta clásica. Cuando los moluscos *Nacella concinna* (Strebel, 1908) (Gastropoda, Nacellidae) y *Laternula elliptica* (King, 1832) (Bivalvia, Laternulidae), fueron expuestos a 10 °C, 15 °C y 20 °C, se observó una expresión constante de *hsp70* y *hsc70*, contrastando con la fuerte sobreexpresión de *grp78* en ambas especies (Clark et al. 2008b). A su vez, cuando la estrella de mar antártica *Odontaster validus* (Koehler, 1906) (Echinodermata, Asteroidea) y el anfípodo antártico *Paraceradocus gibber* (Andres, 1984) (Arthropoda, Malacostraca) fueron estresados térmicamente a 10 °C y 15 °C; ambos no mostraron un aumento en la expresión de genes de *hsp70* (Clark et al. 2008c). Por su parte, en el erizo antártico *Sterechinus neumayeri* (Mortensen, 1942) (Echinodermata, Echinoidea) se registró una sobreexpresión de *grp78* a los 3 °C, pero no a los 5 °C. Además, *hsc70* tuvo una baja expresión comparada con la condición control y no tuvo un incremento significativo en su expresión cuando fue expuesto a ambas temperaturas (González et al. 2016).

En ese mismo sentido, análisis filogenéticos de dos especies de krill de aguas antárticas, *Euphausia superba* (Dana, 1850) y *Euphausia crystallorophias* (Holt y W.M. Tattersall, 1906) (Arthropoda, Malacostraca), permitieron diferenciar la presencia de isoformas constitutivas, citosólicas y mitocondriales de HSP70, evidenciando que los niveles de expresión de las *hsp70* dependen fuertemente

de la isoforma, ante un estrés térmico (3 °C y 6 °C). La respuesta a estrés térmico es distinta entre *E. superba* y *E. crystallorophias*, sugiriendo que la respuesta no solo varía según la isoforma, sino que también hay variaciones interespecíficas. A pesar de haber una respuesta ante el aumento de temperatura en las especies de krill de aguas antárticas, esta respuesta es débil comparada con los cambios observados en especies de regiones templadas (Cascella et al. 2015).

La información previamente expuesta permite sostener que las chaperonas son parte de la adaptación de la maquinaria bioquímica de las células, ante temperaturas bajas y estables, y que los organismos antárticos presentan una respuesta a estrés térmico distinta a la clásica (Figura 3) (Clark et al. 2008b). Sin embargo, esta respuesta en organismos invertebrados sésiles, como las esponjas, aún es desconocido.



**Figura 3** Especies marinas de la península antártica es las que se ha estudiado su respuesta a estrés térmico. En el recuadro verde se agrupan las especies que presentan una respuesta a estrés térmico, mientras que las agrupadas en el recuadro gris son aquellas especies en las que no hay un aumento en la expresión de HSP70 al ser inducidas a condiciones de estrés térmico (Esquema adaptado desde Clark y Peck et al., 2009, imágenes extraídas de internet)

#### 1.4 Secuenciación de alto rendimiento en organismos no modelo

La aparición de la secuenciación de alto rendimiento o HTS (del inglés High-Throughput Sequencing) ha facilitado, entre otras cosas, el análisis de transcriptomas en organismos no modelo (organismos no convencionales en estudios científicos), siendo fundamental para la investigación en las ciencias biológicas (Fonseca et al. 2016). La utilización de la HTS para generar transcriptomas de estos organismos ha aumentado notoriamente, y junto a ellas el desarrollo de herramientas bioinformáticas para el ensamble y análisis de *novo* (Grabherr et al. 2011; Kircher et al. 2011).

La secuenciación del transcriptoma o RNA-Seq (del inglés RNA Sequencing) permite evaluar perfiles de expresión entre tejidos de un mismo individuo y/o distintos individuos que se encuentran en diferentes condiciones ambientales, además de caracterizar aquellos genes expresados (Ekblom y Galindo 2011; Fonseca et al. 2016). Es así como, utilizando la HTS, en dos especies de krill de aguas antárticas, *E. superba* y *E. crystallorophias*, se caracterizaron diferentes isoformas de HSP70 a partir de transcriptomas generados con Roche 454 e Illumina, respectivamente, después de la exposición a estrés térmico (Clark et al. 2011; Cascella et al. 2015; Toullec et al. 2013).

Mientras que en la esponja *Dendrilla antarctica* (Topsent, 1905), dominante en costas poco profundas de la Península Antártica, fue usada la plataforma Illumina. En este estudio, se generaron dos librerías (del inglés library, termino que hace referencia a una colección de secuencias de un determinado

organismo), la primera con RAD-Seq de doble digestión (del inglés, Restriction site Associated DNA Sequencing), en la cual se evaluó la diversidad genética, historial demográfico y conectividad genética a escala regional utilizando SNPs (del inglés, Single Nucleotide Polymorphism) y la segunda con RNA-Seq, donde se midieron los niveles de expresión de genes (Leiva et al. 2019).

Son múltiples los análisis transcriptómicos realizados con HTS en esponjas de otras latitudes. Por ejemplo, para la esponja *Amphimedon queenslandica* (Hooper y Van Soest, 2006) también se ha usado la plataforma Illumina. Esto permitió obtener una mejor precisión del genoma (Srivastava et al. 2010), originalmente obtenida con el método de Sanger (Fernandez-Valverde et al. 2015). Asimismo, con un enfoque evolutivo, se utilizó la plataforma Illumina en ocho especies de esponjas de cuatro clases (Calcarea, Demospongiae, Hexactinellida y Homoscleromorpha) (Riesgo et al. 2014).

Por otro lado, *Haliclona amboinensis* (Lévi, 1961) y *Haliclona tubifera* (George y Wilson, 1919), ambas pertenecientes a la clase Demospongiae que se caracteriza por su adaptabilidad ecológica y plasticidad en respuesta a variados factores ambientales, fueron secuenciadas con la plataforma Illumina y se realizaron análisis comparativos con otras especies de esponjas. Esto mostró que ambas esponjas poseen un repertorio genético que les otorga flexibilidad para vivir en diferentes hábitats (Guzman y Conaco 2016a). Finalmente, para comprender la respuesta a estrés térmico en la esponja *H. tubifera*, se expuso

individuos a temperaturas elevadas y por medio de HTS y una aproximación de *novo* se evidenció una respuesta a estrés térmico (Guzman y Conaco 2016b).

En consecuencia, la HTS ha permitido abordar una amplia gama de preguntas biológicas en organismo no modelos. Gracias a la evolución vertiginosa de sus tecnologías, el tiempo y costo de estos procesos ha disminuido. Asimismo, el desarrollo de nuevas herramientas de análisis ha posibilitado optimizar las aproximaciones que se pueden realizar con los datos generados (Conesa et al. 2016).

### **1.5 Respuesta a estrés térmico en esponjas**

El *phylum* Porifera (Grant, 1836), agrupa a los taxones conocidos como esponjas. Estas son animales sésiles que se encuentran en la mayoría de los ambientes marinos y de agua dulce (Janussen y Downey 2014). Son organismos multicelulares, constituidos por células especializadas que no conforman tejidos u órganos (Van Soest et al. 2012), pero sus esqueletos, relativamente complejos, proporcionan un marco de apoyo para las células (Janussen y Downey 2014).

Las esponjas tienen importantes roles ecológicos, por ejemplo, a través de su proceso de filtración vinculan ambientes pelágicos y bentónicos influenciando el funcionamiento de ambos ecosistemas (Bell 2008). Al ser filtradores masivos y eficientes, son vitales para la salud de los ecosistemas, pues captan y reciclan nutrientes de y hacia la columna de agua. También, en su seno albergan una amplia variedad de microorganismos, con algunos de los cuales generan una

relación simbiote, siendo esta relación, decisiva para el ciclo del nitrógeno y en su rol de productores primarios (Thomas et al. 2016). Además, contribuyen a la sobrevivencia de otros invertebrados e intervienen en ciclos biogeoquímicos (carbonatos) a través de la bio-erosión (Diaz y Rützler 2001; Wulff 2001).

Es de resaltar que las esponjas son consideradas como potenciales bioindicadores de agentes estresantes. En este marco, estudios que integran expresión de genes y agentes estresantes, tales como metales pesados (Wagner et al. 1998; Mahaut et al. 2013), bisfenoles policlorados (Wiens et al. 1998), hidrocarburos aromáticos policíclicos (Batista et al. 2013; Mahaut et al. 2013) y temperaturas extremas (Krasco et al. 1997; Itskovich et al. 2018), entre otros, han revelado que las esponjas marinas tienen una respuesta altamente sensible y específica, siendo organismos claves para monitorear la salud de los ecosistemas en que habitan (Koziol et al. 1997; Efremova et al. 2002; Schroeder et al. 2006 ; López-Legentil et al. 2008; Guzman y Conaco 2016b).

En esponjas endémicas del lago Baikal (Rusia), se han realizado experimentos de estrés térmico con *Baikalospongia intermedia* (Dybowsky, 1880), *Lubomirskia fusifera* (Soukatschoff, 1895) y *Lubomirskia abietina* (Swartschewsky, 1901). Estas viven en aguas con temperaturas que varían entre 6 °C a 8 °C y al ser expuestas a temperaturas de 20 °C y 24 °C, presentaron un aumento en la expresión de proteínas HSP70 (Efremova et al. 2002). La esponja *Lubomirskia baicalensis* (Pallas, 1773), aclimatada a 4 °C, presentó un incremento en la síntesis de HSP70 al ser expuesta a 9 °C y disminuyeron los

niveles de esta proteína cuando fue expuesta a 13 °C, siendo esta temperatura no letal en un período corto de exposición, sin embargo, una exposición prolongada a 13 °C parece provocar la muerte de la esponja (Itskovich et al. 2018).

Asimismo, en *Geodia cydonium* (Linnaeus, 1767), colectadas en costas de Croacia a 25 metros de profundidad y 16 °C, se observó un aumento de la expresión de *hsp70* y *hsp40* al ser tratadas con temperaturas de 23 °C (Koziol et al. 1997). Esponjas del Caribe, como *Xestospongia muta* (Schmidt, 1870), fueron expuestas a 10 °C, 20 °C, 30 °C y 40 °C, con distintos tiempos de incubación, considerando una temperatura control de 28 °C, donde no hubo diferencias significativas en la expresión de *hsp70* a 10 °C y 20 °C, pero a 30 °C y 40 °C se registró alta abundancia de ARNm de *hsp70* y efectos adversos que condujeron a la muerte de la esponja (López-Legendil et al. 2008).

En un estudio realizado en *H. tubifera*, habitante de arrecifes poco profundos en Filipinas (29 °C), se probó estrés térmico agudo a 32 °C y 34 °C durante diferentes tiempos. Este experimento reveló que hay una expresión diferencial de genes involucrados en respuestas de estrés y mecanismos protectores; específicamente se encontró que la expresión relativa de *hsp70* y otros genes de proteínas de plegamiento fueron sobre expresados (Guzman y Conaco 2016b). Por su parte, cuando *Rhopaloeides odorabile* (Thompson, Murphy, Bergquist y Evans, 1987) de la polinesia francesa, fue expuesta a temperaturas de 31 °C y 32 °C, que corresponden a temperaturas entre 4 a 5



grados sobre las condiciones naturales a las que se encuentra normalmente, presentó un aumento en la expresión de *hsp90* y *hsp40*, co-chaperonas de HSP70, indicando una activación del sistema de respuesta a estrés térmico (Pantile y Webster 2011). En consecuencia, todos los datos anteriormente expuestos indican que las esponjas despliegan un mecanismo celular eficiente a nivel molecular para tolerar el incremento de temperatura.

Actualmente no hay estudios que analicen en esponjas antárticas la respuesta de este organismo ante un incremento de temperatura en los mares de esta latitud. Por lo tanto, se desconocen las respuestas que pudieran desplegar estos organismos ante un proceso de estrés térmico. Debemos considerar que en Antártica las esponjas son dominantes del bentos marino. En este ambiente extremo son altamente diversas y llegan a cubrir casi el 55 % de la superficie en algunas locaciones ( Dayton et al. 1974; Cárdenas et al. 2016). Una de las especies más comunes en los arrecifes rocosos de aguas poco profundas alrededor de la Isla Doumer (Península Antártica), es *Isodictya* sp. (Bowerbank, 1864), la cual está expuesta a temperaturas más cálidas durante el verano austral, alcanzando 3 °C entre los 10 a 20 metros de profundidad (Cárdenas et al. 2018).

## **2. HIPÓTESIS**

Debido a que los organismos antárticos han evolucionado en un ambiente de alta estabilidad climática y bajas temperaturas, se postula la existencia de una pérdida de características relacionadas con la tolerancia a aumentos de temperatura. Es así como varias especies de invertebrados no poseen la capacidad de sobre expresar proteínas de estrés térmico (HSPs). Por esto, la hipótesis del presente estudio es:

- **Lo niveles de expresión de transcritos que codifican para las proteínas de estrés térmico de tipo HSP70, no presentan una inducción en esponja antártica *Isodictya* sp. sometida a estrés térmico.**

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo General**

Evaluar el cambio de expresión de las proteínas de estrés térmico en la esponja antártica *Isodictya* sp. bajo condiciones de estrés térmico agudo.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

**3.2.1.** Identificar y caracterizar secuencias de HSP70 en el transcriptoma de la esponja antártica *Isodictya* sp.

**3.2.2.** Medir la expresión relativa de genes *hsp70* inducibles y constitutivos en esponja antártica *Isodictya* sp. sometidas a estrés térmico (3 °C y 6 °C) mediante RT-qPCR en tiempo real.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Materiales**

#### **4.1.1 Reactivos e insumos generales**

**Agilent Technologies:** 2x Brilliant SYBR<sup>®</sup> Green QPCR Master Mix

**Bioline:** dNTP set 4 x 25 µmol

**Biotium:** GelRed Nucleic Acid Stain 10000X en DMSO

**Fisher Scientific:** Hyclone Hypure<sup>™</sup> Molecular Biology Grade Water

**GIBCO<sup>™</sup>:** 2-Mercaptoetanol

**Invitrogen, Thermo Scientific:** RNA<sup>later</sup><sup>®</sup> Soln., Oligo (dT)<sub>12-18</sub> Primer 25 µg (0.5 µg/µL), Random Hexamers 50µM, M-MLV RT (200 U/µL), 5X First-Strand Buffer, 0.1M DTT, RNaseOUT<sup>™</sup> Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 units/µL)

**Merck:** Cloroformo EMSURE<sup>®</sup>, Etanol LiChrosolv<sup>®</sup>, EDTA Titriplex<sup>®</sup>

**OMEGA bio-tek:** E.Z.N.A<sup>®</sup> Total RNA Kit II

**Rockland, Inc:** Agarosa Seakem<sup>®</sup> LE

**USBiological Life Sciences:** Ácido Bórico

**VWR<sup>™</sup> Life Science:** TRIS Biotechnology

**Winkler:** Acetato de Sodio sol 3M pH 5.2

#### **4.1.2 Equipamiento**

Termociclador Stratagene Mx 3005P (Agilent Technologies), Gabinete AirClean® 600 PCR Workstation (AirClean® Systems), Homogeneizador Precellys Evolution con el sistema Cryolys Evolution (Bertin TECHNOLOGIES), Baño de circulación refrigerado Wisd Wisecircu® WCR-P6 (Daihan Scientific), Enfriador brazo sumergible EK12 (HAAKE®), Mini centrífuga SPROUT (Heathrow Scientific®), Sistema de purificación de agua Zenix UP 900 (Human Corporation), Fuente de poder Gel XL Ultra v-2 (Labnet international, Inc), Termociclador SimpliAmp™ Thermal Cycler (Life technologies™), Centrífuga MPW-351R (MPW Med Instruments), Ultracongelador -80°C VIP™ Series (SANYO), Calefactor acuario HG500w 220v 50-60Hz 500w (SOBO), Lector de microplaca Infinite M200 PRO NanoQuant (TECAN), Congelador -20°C (Whirlpool®).

#### **4.1.3 Programas computacionales**

AmplifX versión 1.7.0 (AmplifX®, Nicolas Jullien), CLC Main Workbench 7.9.1 (CLC bio, QIAGEN®), MEGA7.0.26®, BLAST (NCBI), Oligonucleotide Properties Calculator versión 3.2.7 (Oligo Calc®, WAKibbe), Prism 7 versión 7.0a (GraphPad Software®), Compute pI/Mw (ExPASy), Translate tool (ExPASy), PROSITE (ExPASy), MxPro-Mx3005P v4.10® 2007 (Stratagene), i-control 1.9® 2011 (Tecan Austria GmbH).

## **4.2 Análisis del transcriptoma de esponja antártica *Isodictya* sp.**

### **4.2.1 Obtención de transcriptomas de esponja antártica *Isodictya* sp.**

Los análisis se realizaron a partir de los transcriptomas de esponjas antárticas *Isodictya* sp. (número de acceso PRJNA415418), las cuales corresponden a un experimento de estrés prolongado, donde fueron expuestas a una temperatura control (0 °C) y de estrés térmico agudo (3 °C y 5 °C). La secuenciación para estos transcriptomas fue realizada por MacroGen (Geumcheon-gu, República de Corea del Sur), en la cual se utilizó 1 µg de ARNs totales de cada muestra para producir las librerías de ARN con el *Kit TrueSeq Stranded mRNA* (Illumina). La secuenciación se llevó a cabo en la plataforma Illumina HiSeq 2500 con un largo de lectura de 100 pb *paired-end*.

La calidad de las lecturas obtenidas se verificó con el programa FastQC v0.11.5 y posteriormente se eliminaron las secuencias de ARN ribosomal y de baja calidad con las herramientas SortmeRNA v2.1, Trimmomatic v0.36 y Prinseq v0.20.4. Luego se realizó un nuevo control de calidad con el programa FastQC v0.11.5, para corroborar que las lecturas obtenidas estaban dentro de los parámetros requeridos, para así realizar el ensamble *de novo* por medio de la herramienta bioinformática Trinity v2.4.0.

A partir del ensamble obtenido, se realizó una estimación de la abundancia relativa utilizando el programa RSEM v1.1.17 y la herramienta Bowtie2 v2.2.6.2, de esta forma se obtuvo la matriz de expresión de los transcritos obtenida en las muestras, expresados en transcritos por millón (TPM).

#### **4.2.2 Selección de secuencias HSP70**

La selección de las secuencias se realizó con el programa CLC Main Workbench v.7.9.1. En este programa el transcriptoma de *Isodictia sp.* se usó para crear una base de datos, permitiendo realizar BLAST local con secuencias aminoacídicas de HSP70 de otras especies de esponjas. De cada BLAST se seleccionaron secuencias con porcentajes de identidad superiores a 70%. Luego, en el archivo de abundancia relativa, se analizaron los valores de TPM para las isoformas de cada secuencia, escogiendo aquellas que presentaran valores de TPM mayores a 0. Posteriormente, con la herramienta bioinformática blastx (accesible en la plataforma NCBI), se corroboró que las secuencias seleccionadas pertenecían a la familia de HSP70.

Con el fin de acotar aún más la selección, utilizando la herramienta de traducción ExPasy (Bioinformatics Resource Portal, SIB), se definió el marco de lectura para las secuencias de nucleótidos escogidas y fueron traducidas a proteína, descartando aquellas secuencias que fuesen parciales, realizando una búsqueda por homología con la herramienta bioinformática BLASTp en la plataforma NCBI. Luego, las secuencias seleccionadas fueron alineadas en CLC Main Workbench v.7.9.1, para identificar zonas conservadas y dominios característicos de esta familia de chaperonas.

### **4.2.3 Selección de secuencias para genes de referencia**

Para los genes de referencia, se utilizaron dos criterios de selección exploratorios. El primero consistió en realizar una búsqueda en el archivo de abundancia relativa, considerando los valores de TPM que se mantuvieran relativamente constantes en las distintas condiciones experimentales. Se seleccionaron secuencias con un TPM menor a 100 y secuencias con un TPM mayor a 100, que presentaran baja desviación estándar. Considerando estos filtros, se obtuvieron 21 secuencias (Tabla 1) a las cuales se les realizó un alineamiento por homología con la herramienta blastp y se descartaron aquellas que no se les detectó dominios conservados. De las secuencias restantes, se eligió de cada grupo aquella que tenía la menor desviación estándar (Tabla 1), quedando así con dos secuencias. Para el grupo de un TPM menor a 100 se seleccionó galactosil transferasa, mientras que para el grupo con una TPM mayor a 100 se optó por LRR\_8 (del inglés, Leucine-Rich Repeat).



**Tabla 1 Secuencias seleccionadas desde el archivo de abundancia relativa.** Se presentan los valores de TPM en las distintas condiciones de temperatura y tiempos, con su respectiva desviación estándar (DE)

<b>1&lt;TPM&lt;100</b>							
<b>ID Transcrito</b>	<b>Control</b>	<b>1h 3°C</b>	<b>4h 3°C</b>	<b>1h 5°C</b>	<b>4h 5°C</b>	<b>DE</b>	<b>Familia</b>
TRINITY_DN34893_c0_g1_i2	2,31	2,49	2,6	2,11	2,53	0,198	Superfamilia Sema
TRINITY_DN34233_c4_g1_i10	1,24	1,27	1,3	1,6	1,23	0,154	Superfamilia FA58C
TRINITY_DN31132_c0_g1_i4	1,05	1,2	1,14	1,1	1,09	0,057	Sin dominios conservados
TRINITY_DN35148_c5_g2_i2	1,12	1,4	1,04	1,49	1,26	0,187	Superfamilia zf-H2C2
TRINITY_DN31996_c0_g5_i1	1,15	1,29	1,26	1,54	1,43	0,152	Superfamilia PIN_SF
TRINITY_DN32695_c3_g3_i11	4,82	5,02	4,86	4,55	5,01	0,191	Sin dominios conservados
TRINITY_DN33214_c0_g1_i2	1,54	1,57	1,21	1,66	1,56	0,173	Superfamilia IGFBP
TRINITY_DN33256_c0_g1_i7	1,59	1,41	1,23	1,64	1,44	0,162	Superfamilia Fic
TRINITY_DN31113_c0_g1_i3	2,42	2,06	2,34	2,26	2,29	0,134	<b>Superfamilia Galactosyl_T</b>
<b>TPM&gt;100</b>							
<b>ID Transcrito</b>	<b>Control</b>	<b>1h 3°C</b>	<b>4h 3°C</b>	<b>1h 5°C</b>	<b>4h 5°C</b>	<b>DE</b>	<b>Familia</b>
TRINITY_DN35170_c4_g3_i3	121,88	105,85	139,64	108,31	150,43	19,467	Superfamilia V_ATPase_I
TRINITY_DN33163_c1_g1_i4	174,31	126,53	159,56	159,63	148,27	17,762	Superfamilia PKc
TRINITY_DN33829_c2_g1_i1	159,66	158,13	121,89	150,47	152,48	15,371	Sin dominios conservados
TRINITY_DN29300_c0_g1_i1	169,55	131,45	158,9	154,94	174,89	16,835	Superfamilia P-loop_NTPasa
TRINITY_DN32586_c2_g1_i4	149,14	126,91	143,18	100,82	142,67	19,553	PurA
TRINITY_DN32328_c2_g1_i4	193,71	187,84	209,86	187,98	209,61	11,150	<b>Superfamilia LRR_8</b>
TRINITY_DN32685_c5_g5_i4	171,17	158,56	165,3	126,82	150,75	17,257	Superfamilia Flii
TRINITY_DN34322_c1_g1_i7	151,42	145,67	160,75	129,46	144,2	11,439	No se encontró similitud significativa
TRINITY_DN24294_c0_g1_i1	127,4	153,79	140	107,33	148,95	18,674	Sin dominios conservados
TRINITY_DN29838_c0_g1_i2	142,57	117,92	137,95	114,24	135,75	12,729	Superfamilia SCAMP
TRINITY_DN29648_c0_g1_i10	112,38	149,86	108,06	130,44	108,96	18,058	Superfamilia TBCA
TRINITY_DN30653_c0_g1_i3	113,5	111,96	102,43	136,74	119,57	12,709	Superfamilia bZIP

El segundo criterio de selección consistió en realizar una búsqueda de los genes de referencia utilizados por Shimpi *et al.* (2016) en el transcriptoma de *Isodictya* sp. Para esto se ejecutó un BLAST local en CLC Main Workbench v.7.9.1 con los genes  $\beta$ -actina,  $\beta$ -tubulina, factor de elongación 1- $\alpha$  (EF1- $\alpha$ ), glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH; del inglés, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) y partícula de reconocimiento de señal 54 kDa (SRP54; del inglés, Signal Recognition Particle 54 kDa). A partir de esta búsqueda por homología, se escogieron aquellas secuencias del transcriptoma

que presentaron el mayor porcentaje de identidad para cada gen. Como información adicional, del archivo de abundancia relativa se extrajeron los valores de TPM (Tabla 2) de las secuencias seleccionadas, con el propósito de comparar ambos criterios de selección con los resultados que se obtengan en la RT-qPCR de tiempo real.

**Tabla 2 Valores de TPM de los genes de referencia en las condiciones experimentales.** Se presentan los valores de TPM en las distintas condiciones de temperatura y tiempos para los genes de referencia, con su respectiva desviación estándar (DE)

Gen	ID Transcrito	Control	1h 3°C	4h 3°C	1h 5°C	4h 5°C	DE
<b>β-actina</b>	TRINITY_DN31197_c4_g2_i7	3,62	2,80	9,28	3,22	3,46	2,70
<b>β-tubulina</b>	TRINITY_DN33796_c0_g1_i3	111,56	147,53	227,31	234,64	225,06	56,05
<b>EF1-α</b>	TRINITY_DN31921_c1_g1_i1	757,72	587,86	626,27	695,38	758,56	76,96
<b>GAPDH</b>	TRINITY_DN32213_c0_g1_i1	10,58	3,53	0	0	0	4,60
<b>SRP54</b>	TRINITY_DN33366_c0_g1_i1	15,10	15,04	16,08	12,62	15,92	1,39

Finalmente, las secuencias que fueron seleccionadas con ambos criterios se tradujeron a proteínas en la herramienta ExPasy (Bioinformatics Resource Portal, SIB), a las que se les realizó un alineamiento por homología con blastp en la plataforma de NCBI, para comprobar los porcentajes de identidad de los genes con secuencias de otros organismos ya descritas.

#### 4.2.4 Árbol filogenético

La reconstrucción filogenética se calculó con el software MEGA7, utilizando el método Maximum Likelihood basado en la matriz JTT (Jones et al. 1992; Kumar et al. 2016). El árbol consenso *bootstrap* (50 %) fue inferido desde 1000 réplicas para representar la historia evolutiva de los taxones analizados

(Felsenstein 1985). Los árboles iniciales se obtuvieron automáticamente por medio de la aplicación de los algoritmos Neighbor-Joining y BioNJ en una matriz de distancias por pares estimados utilizando un modelo JTT (Kumar et al. 2016).

El análisis de la filogenia molecular de las isoformas de HSP70 incluyó 33 secuencias de aminoácidos, incluyendo las isoformas de *Isodictya sp.* y secuencias de HSP70 de esponjas marinas de otras latitudes (*G. cydonium*, *A. queenslandica*, *Xetospongia testudinaria* (Lamarck, 1815), *H. amboinensis* y *H. tubifera*). Para el análisis de la relación filogenética entre secuencias de HSP70 asociadas a diferentes compartimentos celulares se utilizaron 20 secuencias de aminoácidos, incluidas las isoformas de *Isodictya sp.*

#### **4.2.5 Diseño partidores para RT-qPCR en tiempo real**

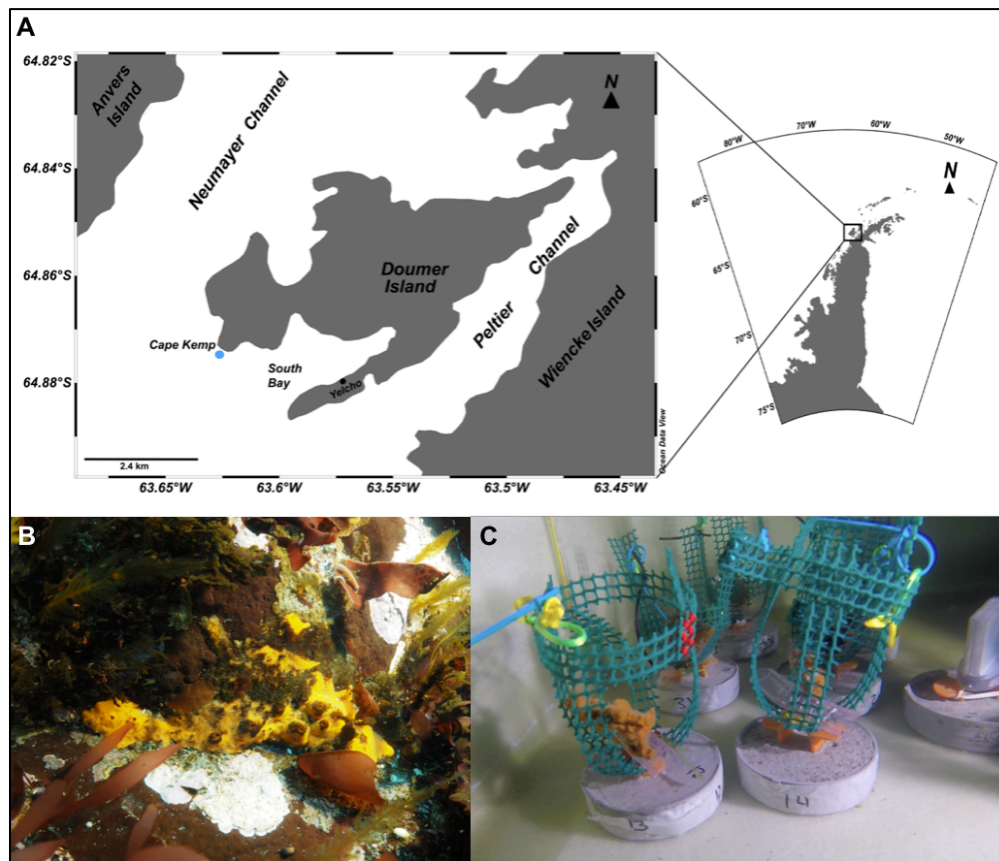
Las secuencias seleccionadas para los genes de *hsp70* y genes de referencia, se ingresaron al software AmplifX (©Nicolas Jullien 2004-2003, v.1.7.0), donde los parámetros para el diseño de partidores se ajustaron a una calidad mínima de 90 y largo de partidore entre 18-22 nucleótidos. En el programa Oligo Calculator versión 3.27 (© Northwestern University, 1997-2015) se verificó que las parejas de partidores no presentaran dimerización ni estructuras secundarias.

### **4.3 Colección de muestras y diseño experimental**

#### **4.3.1 Área de recolecta**

Las muestras de esponjas Antárticas *Isodictya sp.* fueron colectadas por buzos a 10 metros de profundidad en enero de 2018, en el Cabo Kemp de Isla

Doumer, Archipiélago Palmer, Península Antártica ( $64^{\circ}51'58,6''$  S,  $63^{\circ}37'46,7''$  W, Figura 4A).



**Figura 4** Esponjas Antárticas *Isodictya* sp. y punto de recolección **A)** En el punto celeste se indica lugar de recolección de las muestras de esponja *Isodictya* sp. a 10 metros de profundidad en Cabo Kemp de Isla Doumer. **B)** Imagen de *Isodictya* sp. colectada en la Bahía Sur de Isla Doumer a 10 metros de profundidad (Fotografía César Cárdenas). **C)** Esponjas *Isodictya* sp. dispuestas en soportes dentro de tanque de fibra (Fotografía César Cárdenas).

#### 4.3.2 Colecta y aclimatación de organismos

Se recolectaron 36 individuos para llevar a cabo el experimento de estrés térmico prolongado, mientras que para el experimento de estrés térmico agudo fueron empleados 9 individuos (Figura 4B). Todos los especímenes fueron

trasladados al laboratorio húmedo de la Base Chilena Yelcho, en la Bahía Sur, de la Isla Doumer (Figura 4A). Con el fin de permitir la aclimatación a las condiciones de laboratorio, los individuos se dispusieron en soportes previamente enumerados (Figura 4C) y se mantuvieron en un estanque de fibra de vidrio con capacidad para 363 litros. Dicho estanque se mantuvo con agua marina no filtrada a una temperatura cercana a 0 °C (temperatura control), la cual se conservó constante mediante un enfriador con brazo sumergible (HAAKE®).

#### **4.3.3 Adecuaciones para experimentos de estrés térmico**

Se utilizaron temperaturas de 3 °C y 6 °C como condiciones de estrés térmico en ambos experimentos. Para mantener estas temperaturas, se emplearon calefactores para acuarios regulables (SOBO, 500 watts) en estanques de fibra de vidrio de 109 litros. El estanque a 3 °C también contaba con un baño de circulación refrigerado (Wisd WiseCircu®).

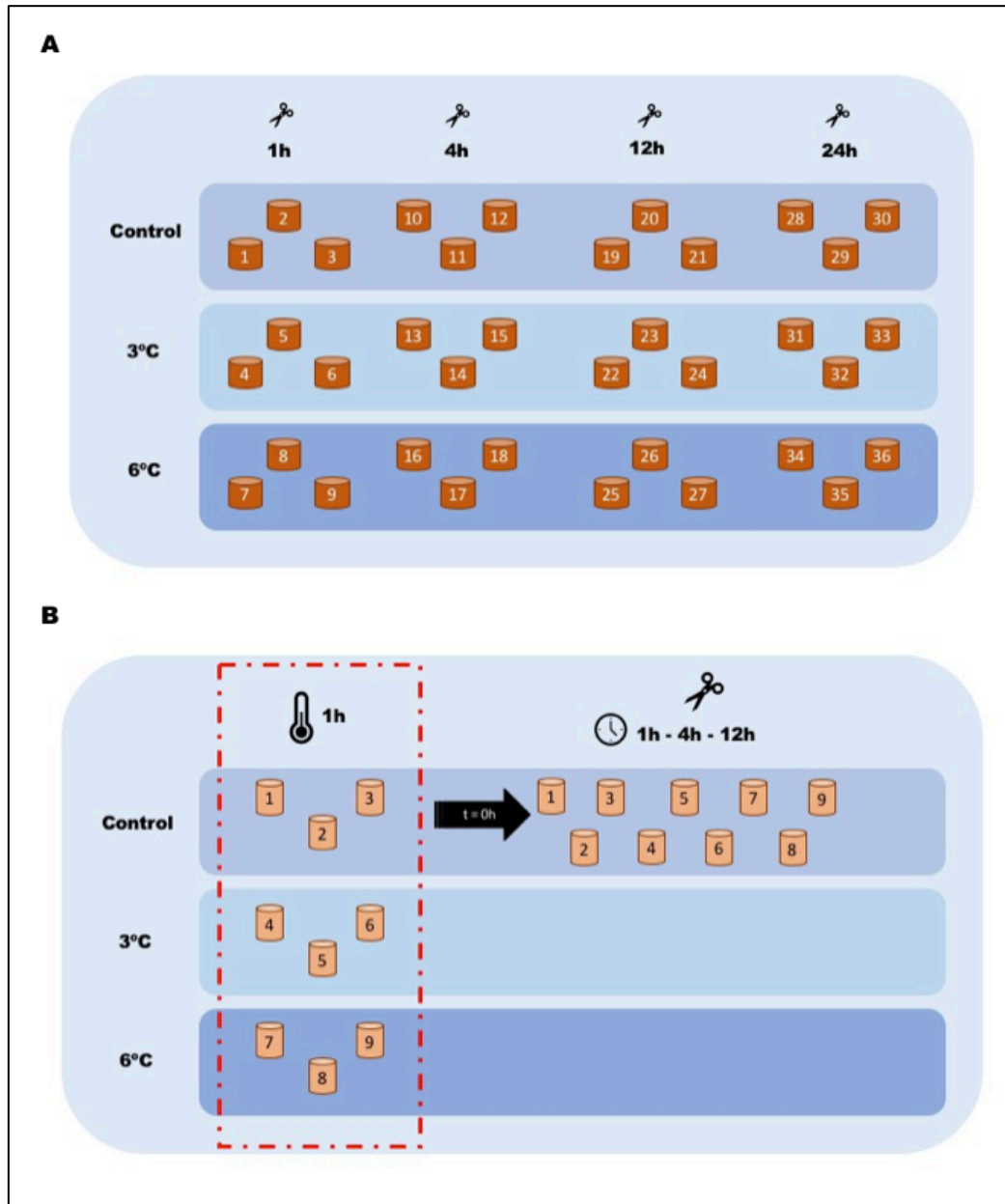
En cada estanque (control, 3 °C y 6 °C) se dispuso un registrador de temperatura (Pendant, Onset Computer Corp) que guardó datos de temperatura y luz cada 15 minutos. Los estanques se mantuvieron cubiertos con una malla de polipropileno tipo Raschel, de color verde y con luz de malla de 2x2 mm.

#### **4.3.4 Experimento estrés térmico prolongado**

Posterior a la aclimatación, 36 individuos correspondientes al experimento de estrés térmico prolongado se distribuyeron en tres grupos de 12 individuos: Control ( $\sim 0,22$  °C), 3 °C ( $\sim 2,97$  °C) y 6 °C ( $\sim 5,83$  °C). Se consideró como tiempo cero, el momento en que se colocó la última esponja en cada grupo. De cada grupo, se tomó un trozo de esponja a las 1, 4, 12 y 24 horas de iniciado el experimento y se utilizaron 3 individuos por grupo para cada tiempo de toma de muestra (Figura 5a). Estas muestras obtenidas se almacenaron en RNA/*ater*<sup>®</sup> (Invitrogen), según las indicaciones del fabricante.

#### **4.3.5 Experimento estrés térmico corto**

Luego de la aclimatación, 6 de los 9 individuos considerados para este experimento, fueron estresados durante 1 hora, a 3 °C y 6 °C. Finalizado el tiempo, las esponjas fueron devueltas al estanque control, a una temperatura de 0 °C ( $\sim 0,03$  °C), considerando como tiempo cero el momento en que estas fueron regresadas al estanque. Se tomaron trozos de esponja a los mismos individuos a las 1, 4 y 12 horas de iniciado el experimento (Figura 5b). Las muestras obtenidas se almacenaron en RNA/*ater*<sup>®</sup> (Invitrogen), según las indicaciones del fabricante.



**Figura 5. Diseño experimental. A)** Experimento de estrés térmico prolongado donde se colectó muestras a las 1 h, 4 h, 12 h y 24 h (n=36) **B)** Experimento de estrés térmico corto en el cual los individuos desde el 4 al 9, luego de ser sometidos a estrés térmico por 1 hora, son regresados al estanque control. Se recolectaron muestras a las 1 h, 4 h y 12 h (n=9).

#### **4.4 Obtención de material genético de esponja antártica *Isodictya* sp.**

##### **4.4.1 Extracción de ARN de esponjas antárticas *Isodictya* sp.**

La extracción de ARN se realizó con E.Z.N.A.<sup>®</sup> Total RNA Kit II, según las especificaciones del fabricante para tejido animal. Con el fin de descongelar las muestras conservadas en RNA/later<sup>™</sup> Soln. (Invitrogen), a -80 °C, se colocaron sobre hielo. Una vez descongelada, en una balanza analítica (RADWAG<sup>®</sup>) se masó entre 0,07 – 0,19 gramos de muestra de esponja sobre papel aluminio estéril. Posteriormente, la muestra masada se introdujo en un tubo de 2 mL con 1 mL de RNA-Solv<sup>®</sup> y 20 µL de 2-mercaptoetanol en su interior para su homogeneización. Se realizaron pruebas con distintos programas de homogeneización en el equipo Precellys Evolution (bertin instruments) con el sistema Cryolys Evolution, seleccionando finalmente el programa *Soft* (5800 rpm, 20 segundos, 0 °C).

El homogeneizado se dejó a temperatura ambiente por 5 min y luego se agregó 200 µL de cloroformo, dejándolo nuevamente a temperatura ambiente por 3 min. Continuando con el protocolo, se centrifugó a 13000 x g por 15 min a 4 °C, con el fin de separar la fase acuosa de la orgánica. Una vez finalizada la separación, la fase acuosa (~500 µL) fue trasvasada a un tubo para centrifuga de 1,5 mL, al cual se le agregó un volumen igual de etanol al 70 %. A un tubo de colecta de 2 mL se insertó una mini columna HiBind<sup>®</sup>RNA, a la cual se le transfirió 700 µL de muestra y se centrifugó a 10000 x g durante 1 min a temperatura



ambiente, para después descartar la solución filtrada. La centrifugación se repitió hasta que el volumen total de la muestra fue filtrado.

Luego se continuó con el protocolo de digestión con DNasa I. Previamente se preparó una solución stock de DNasa I, considerando para cada columna HiBind®RNA 73,5 µL de E.Z.N.A® *Buffer* de Digestión DNasa I y 1,5 µL de DNasa I libre de RNasa.

Se insertó la mini columna HiBind® RNA a un tubo colector de 2 mL y se adicionó 250 µL de *Buffer* I de lavado, el cual se centrifugó a 10000 x g por 1 min. Una vez centrifugada la solución, se descartó el filtrado y se reutilizó el tubo de colecta. Se agregó en el centro de la membrana de la mini columna HiBind® RNA 75 µL de la mezcla de digestión de DNasa I, y se dejó a temperatura ambiente por 15 minutos. Luego se adicionó 250 µL el *Buffer* I de lavado y se dejó a temperatura ambiente por 2 min, y centrifugó a 10000 x g por 1 min. El filtrado fue descartado y se reutilizó el tubo de colecta.

Posteriormente, se adicionó 500 µL de *Buffer* II de lavado, y se centrifugó a 10000 x g por 1 min, siendo descartado el filtrado, este procedimiento fue realizado dos veces. Luego se centrifugó a 13000 x g por 2 min con la finalidad de secar completamente la mini columna HiBind® RNA. La mini columna se dispuso en tubo centrífugo de 1,5 mL, y en el centro de la membrana se adicionaron 70 µL de agua grado biología molecular (HyClone™) libre de nucleasas, dejando a temperatura ambiente por 1 min y se centrifugó a 13000 x

g por 2 min. La columna se puso en un nuevo tubo centrifugo de 1,5 mL con el fin de realizar una segunda elución con 40  $\mu$ L de agua. Ambas eluciones se almacenaron por separado a -80 °C.

#### **4.4.2 Cuantificación de ARN de esponjas antárticas *Isodictya* sp.**

La cuantificación de ARN se realizó mediante espectrofotometría en el equipo Infinite<sup>®</sup> M200 PRO TECAN. En el software Tecan i-control<sup>®</sup> 2011 (Tecan Austria GmbH), se seleccionó la opción de cuantificación de ácidos nucleicos, opción ARN. En primer lugar, se agregaron 2  $\mu$ L de agua grado biología molecular (HyClone<sup>™</sup>) sobre los pocillos del NanoQuant Plate<sup>™</sup> con la finalidad de realizar el blanco. Posteriormente, por duplicado, se cargaron 2  $\mu$ L de las muestras y se realizó la lectura de absorbancia a 260/280 nm.

#### **4.4.3 Comprobación de calidad de ARN de esponja antártica *Isodictya* sp. por electroforesis en gel de agarosa**

Se utilizaron geles de agarosa al 2 % (p/v), en algunos casos se prepararon geles en *buffer* de corrida TBE 1X (Tris Base, Ácido Bórico, 0,5 M EDTA pH 8,0) y otros en *buffer* de corrida TAE 1X (Tris Base, Ácido Acético, 0,5 M EDTA pH 8,3). Un gramo de agarosa se disolvió en 50 mL de *buffer* de corrida y se aplicó temperatura hasta observar una solución homogénea. Posteriormente se adicionó GelRed<sup>®</sup> (1%) a la solución y se vertió sobre el soporte, dejando que gelificara a temperatura ambiente. Luego de esto se introdujo en la cámara de electroforesis horizontal que contenía *buffer* de corrida y se utilizó 70 Volts para

correr lo geles, variando el tiempo de corrida según el marcador de peso molecular utilizado.

#### **4.4.4 Reacción de retrotranscripción de ARN de esponja antártica *Isodictya* sp.**

La síntesis de ADNc se realizó a partir de 400 ng de ARN totales, siguiendo el protocolo de M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). En tubos de microcentrífuga, libres de nucleasas, se adicionó 1  $\mu$ L de Oligo (dT) (Invitrogen), 1  $\mu$ L de Hexámeros Aleatorios (Invitrogen), 1  $\mu$ L de dNTPs 10 mM (bioline) y el volumen necesario para 400 ng de ARN total, completando un volumen final de 12  $\mu$ L con agua estéril libre de nucleasas (HyClone™). Esta mezcla se calentó a 65 °C por 5 min y se dejó sobre hielo. El contenido de los tubos se colectó con una breve centrifugación y adicionó 4  $\mu$ L de 5X First-Strand Buffer (Invitrogen), 2  $\mu$ L 0,1 M DTT (Invitrogen), 1  $\mu$ L RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 U/ $\mu$ L) (Invitrogen). Suavemente se mezcló el contenido de los tubos e incubó a 37 °C por 2 minutos. Luego se agregó 1  $\mu$ L (200 U) de M-MLV RT (Invitrogen) y se mezcló por pipeteo suavemente, para ser incubada por 10 min a 25 °C, posteriormente por 50 min a 37 °C y para inactivar la reacción con temperatura, esta mezcla se dejó a 70 °C por 15 min. Finalizado el proceso de retrotranscripción, el ADNc se almacenó a -20 °C hasta su uso.

#### **4.4.5 RT-qPCR en tiempo real con ADNc de esponja antártica *Isodictya* sp.**

Se utilizaron 2  $\mu$ L de ADNc (diluido 1:5) para amplificar en el termociclador Stratagene Mx3005p (Agilent Technologies), utilizando partidores específicos

para los genes de interés. En cada reacción de PCR se utilizó 10 µL de Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies), 7 µL de agua estéril libre de nucleasas (HyClone™) y 0,5 µL de cada partidor a una concentración de 10 µM (*forward* y *reverse*), obteniendo así un volumen final de 20 µL para cada reacción.

El perfil de temperatura utilizado para todos los transcritos consistió en un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C por 10 min, seguido de cuarenta ciclos de amplificación que consistieron en una desnaturalización a 95 °C por 15 seg, apareamiento a 60 °C por 15 seg y extensión a 72 °C por 15 seg.

El análisis de los resultados de la RT-qPCR en tiempo real se realizó con el software MxPro-Mx3005p© 2007 (v4.10 Build 389 Schema 85).

#### **4.5 Medición de integridad de ARN de esponjas antárticas *Isodictya* sp.**

Se precipitó el ARN de esponjas para ser enviado a Autral-omics (Universidad Austral, Valdivia), con la finalidad de analizar la integridad del ARN en el equipo Fragment Analyzer (Agilent Technologies).

La precipitación de ARN se realizó adicionando 0,1 volúmenes de Acetato de Sodio 3 M y 2,5 volúmenes de Etanol al 100 %, homogeneizando suavemente con la micropipeta, solución que se dejó a -20 °C toda la noche. Las muestras se dispusieron en hielo seco y fueron enviadas a Autral-omics (Universidad Austral, Valdivia). Manteniendo la cadena de frío, las muestras fueron centrifugadas por 15 min a 12000 x g y se removió el sobrenadante. Se lavaron con 2,5 volúmenes

de Etanol al 70 %, se centrifugaron nuevamente a 12000 x g durante 2 min y se removió el etanol. El pellet se dejó secando con el tubo abierto por 1 h a temperatura ambiente (Walker y Lorsch 2013). Finalmente, el ARN se disolvió en agua y fue analizado en el equipo Fragment Analyzer (Agilent Technologies), método electroforético para definir la integridad del ARN, que entrega como resultado un electroferograma al igual que el equipo Bioanalyzer (Agilent Technologies). El análisis de este electroferograma, determina una puntuación que refleja la integridad del ARN, siendo la puntuación más común el número de integridad del ARN, RIN (del inglés, RNA Integrity Number), del equipo Bioanalyzer (Agilent Technologies), que va desde 1 a 10, donde 1 indica ARN totalmente degradado y 10 un ARN intacto, siendo la puntuación análoga para el equipo Fragment Analyzer (Agilent Technologies) el número de calidad de ARN, RQN (del inglés, RNA Quality Number) (Björkman et al. 2016)

#### **4.6 Análisis estadístico**

El análisis estadístico se ejecutó en el software *GraphPad Prism* versión 7.0a. La distribución normal de los datos se verificó con la prueba de normalidad Shapiro-Wilk. Para el análisis de los datos se utilizó la prueba t no pareada utilizando un valor  $p < 0,05$  para las diferencias estadísticamente significativas.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Análisis de las secuencias seleccionadas de HSP70

Las seis secuencias seleccionadas de *Isodictya* sp. presentaron sobre un 70 % de identidad con proteínas HSP70 de distintos *phylum* (Tabla 3). Para facilitar su diferenciación, en el presente trabajo se asignaron nuevos nombres a las secuencias. Estos comienzan con la especie de la esponja estudiada, seguido por los tres últimos dígitos del *cluster* del ID del transcrito, por ejemplo, TRINITY\_DN24300\_c0\_g1\_i1 fue nombrada como *Isodictya\_300*.

**TABLA 3** Búsqueda por homología con blastx en la plataforma NCBI. En la primera columna el nombre asignado a las secuencias extraídas del transcriptoma de esponja antártica *Isodictya* sp.

Secuencia	Descripción	Phylum	E-value	Identidad	Cobertura	Número de acceso
<b>Isodictya_300</b>	hypothetical protein THAOC [ <i>Thalassiosira oceanica</i> ]	Ochrophyta	0,0	93,89 %	92 %	EJK63068.1
<b>Isodictya_949</b>	heat shock protein 70 B2-like [ <i>Mizuhopecten yessoensis</i> ]	Mollusca	0,0	74,07 %	76 %	XP_021370483.1
<b>Isodictya_457</b>	heat shock protein 70 [ <i>Hymeniacidon</i> sp. HC-2011]	Porifera	0,0	87,48 %	81 %	AEH16639.1
<b>Isodictya_049</b>	stress-70 protein mitochondrial-like [ <i>Acanthaster planci</i> ]	Echinodermata	0,0	76,80 %	82 %	XP_022086616.1
<b>Isodictya_022</b>	heat shock protein 70 [ <i>Thalassiosira pseudonana</i> CCMP1335]	Ochrophyta	0,0	91,84 %	90 %	XP_002291508.1
<b>Isodictya_545</b>	heat shock cognate protein isoform B [ <i>Patagioenas fasciata monilis</i> ]	Chordata	0,0	85,32 %	84 %	OPJ68124.1

Al realizar el alineamiento de las secuencias de HSP70 obtenidas de *Isodictya* sp. y de esponjas de otras latitudes, reveló zonas altamente conservadas en las secuencias aminoacídicas (Figura 6). Es así como, las seis secuencias presentan dos regiones principales, dominio ATPasa (NBD) y el dominio de unión al sustrato (SBD), unidos por la región hidrofóbica altamente conservada D-V-L-L-L-D-V-[TSA]-P (Luan et al. 2010; Torchia et al. 1997). También, para todas las secuencias en el dominio NBD está presente el sitio de unión a ATP/GTP con el motivo consenso A-E-[AIS]-Y-L-G-[QKST]-[RSET] (Saraste et al. 1990). En cinco de las seis secuencias se identificaron las tres firmas características de la familia de HSP70. La primera firma de esta familia, ausente en *Isodictya\_022*, corresponde a la secuencia consenso [IV]-D-L-G-T-[ST]-x-[SC], mientras que la segunda firma tiene como secuencia consenso [LIVMF]-[LIVMFY]-[DN]-[LIVMFS]-G-[GSH]-[GS]-[AST]-x(3)-[ST]-[LIVM]-[LIVMFC]. Por último, la tercera firma presente en las secuencias seleccionadas tiene la secuencia consenso [IV]-[IV]-L-V-G-G-[SM]-T-R-[IM]-P-[RK]-[IV]-Q-[AKQ] (Figura 7) (Sonoda et al. 2006).

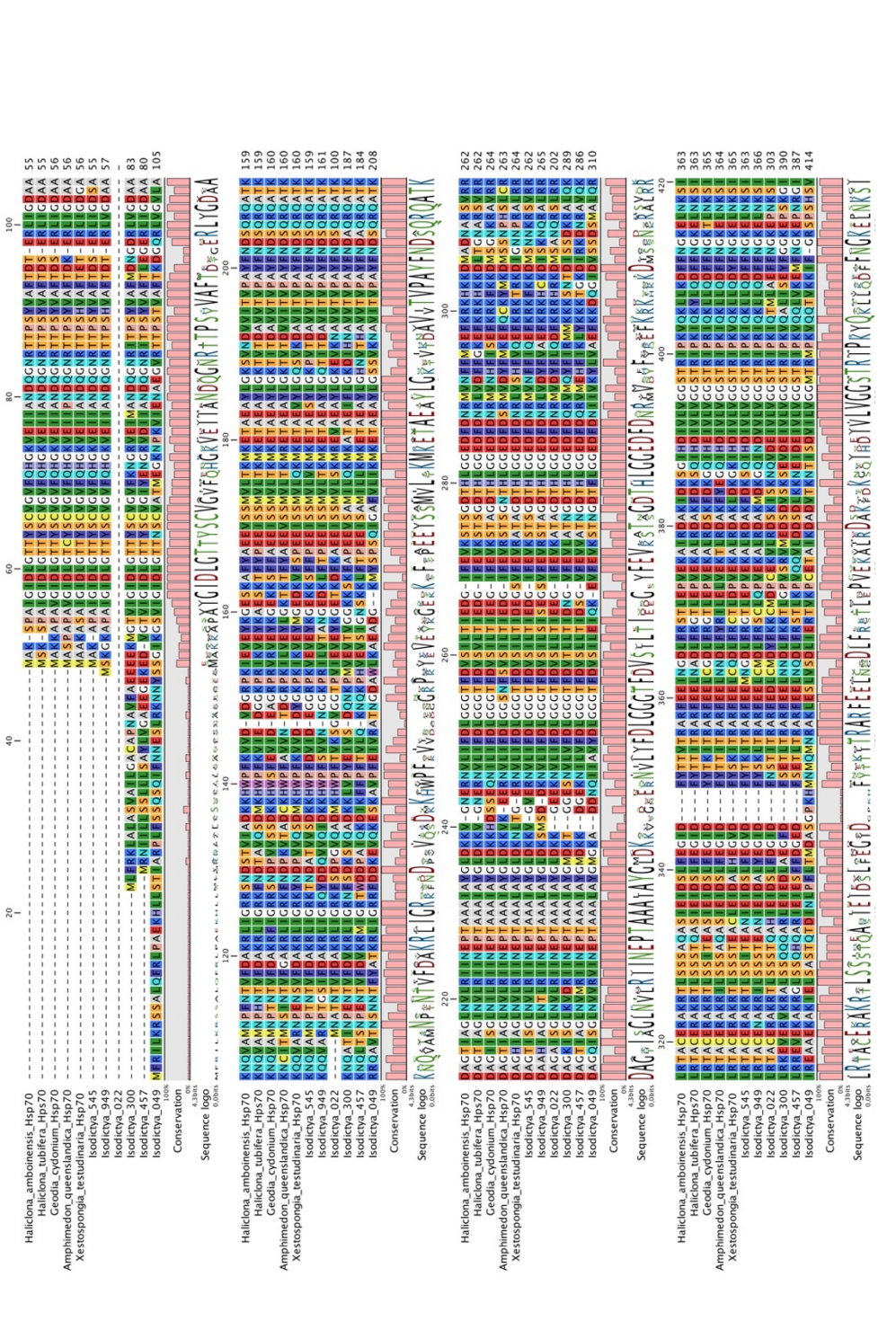


Figura 6 Alineamiento de las seis secuencias de HSP70 extraídas del transcriptoma de *Isodictya* sp. en el cual se observan las zonas conservadas de las secuencias correspondientes a la familia de las HSP70. El alineamiento se realizó con secuencias de HSP70 de *Geodia cydonium* (CAA64441.1), *Amphimedon queenslandica* (XP\_011404208.1), *Haliclona tubifera*, *Xestospongia testudinaria*. Alineamiento realizado con el software CLC Main Workbench 7.9.1 con los parámetros predeterminados del programa.



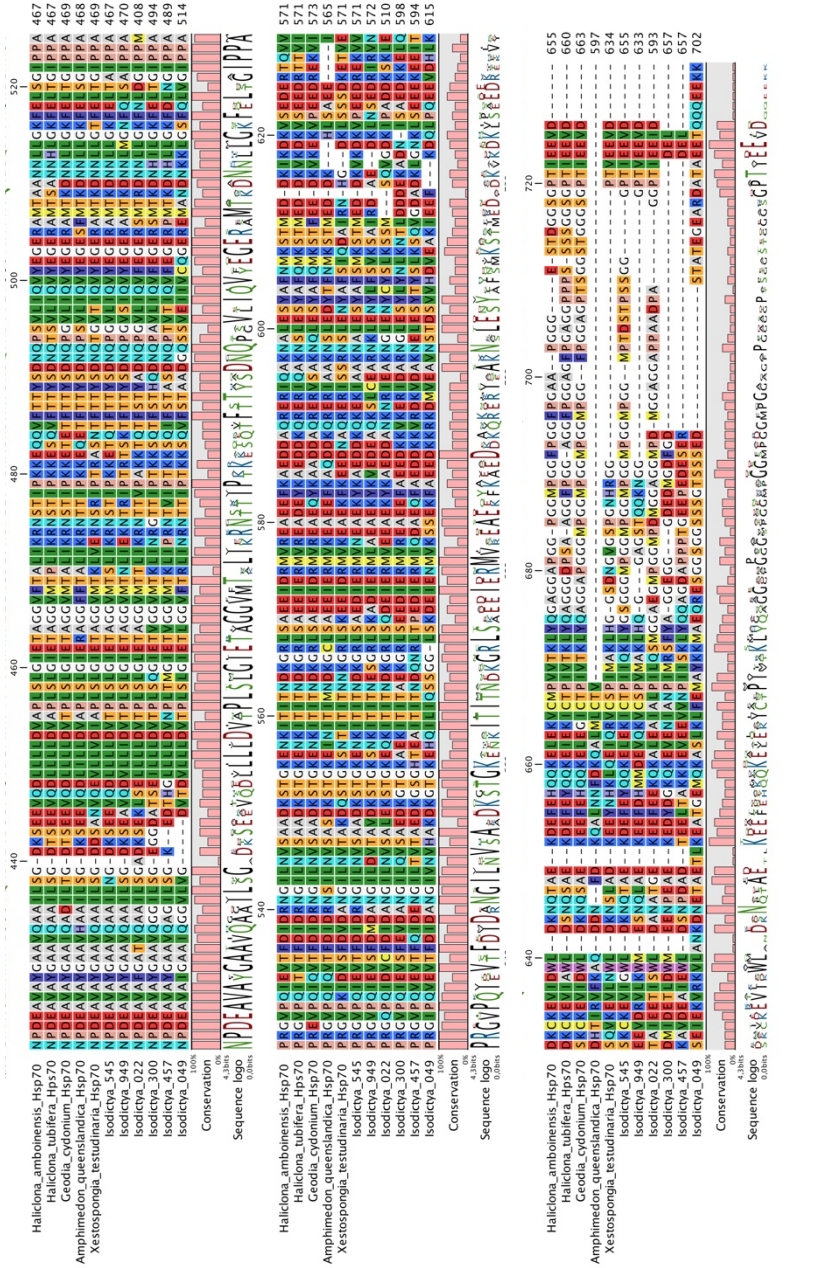
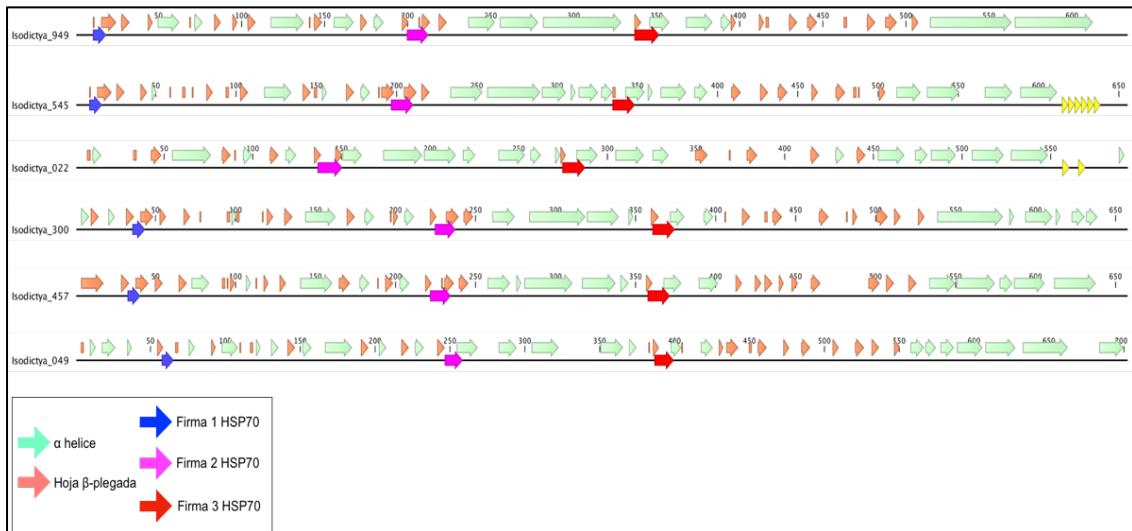


Figura 6. Continuación.



**Figura 7 Predicción estructura secundaria de las secuencias aminoacídicas de HSP70.** En verde las estructuras  $\alpha$  hélice y en naranja las estructuras  $\beta$  plegadas, mientras que en azul, rosado y rojo se representan las firmas características de la familia de HSP70. En amarillo la secuencia tetrapéptido GGMP.

Al revisar los porcentajes de identidad entre las secuencias del alineamiento (Figura 8), *Isodictya\_545* presenta 86,12 % de identidad con *G. cydonium*, mientras que con las otras cuatro secuencias de esponja presenta valores mayores al 69 %. Por su parte, *Isodictya\_949* tiene un 75,63 % de identidad con *X. testudinaria* y sobre el 62 % de identidad con el resto de las secuencias aminoacídicas de esponjas. En el caso de *Isodictya\_022*, presenta un 61,14 % de identidad con *H. tubifera*. Por otro lado, *Isodictya\_049* tiene un 41,68 % con *X. testudinaria* y *H. ambionensis* presenta un 55,20 % con *Isodictya\_457* y un 54,24 % con *Isodictya\_300*. Los porcentajes de identidad entre las secuencias extraídas del transcriptoma varían entre 38,31 % y 68,74 %.

		Porcentaje de Identidad										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Haliclona_amboinensis_Hsp70	1		85.93	81.48	71.99	69.35	83.84	66.67	60.33	54.24	55.20	41.52
Haliclona_tubifera_Hps70	2	568		82.26	70.09	69.43	84.16	66.92	61.14	53.91	55.15	40.82
Geodia_cydonium_Hsp70	3	541	547		66.97	68.83	86.12	67.37	61.02	52.82	53.99	40.60
Amphimedon_queenslandica_Hsp70	4	473	464	444		63.31	69.10	62.30	53.95	51.06	51.21	39.02
Xestospongia_testudinaria_Hsp70	5	457	461	457	402		70.67	75.63	55.54	54.19	54.27	41.68
Isodictya_545	6	555	558	571	454	465		68.74	63.33	54.97	55.72	41.21
Isodictya_949	7	440	445	448	395	481	453		54.55	53.06	52.99	42.52
Isodictya_022	8	400	406	407	355	366	418	360		49.56	46.99	37.31
Isodictya_300	9	371	372	365	337	362	376	355	339		64.65	41.60
Isodictya_457	10	377	380	372	339	362	380	354	320	428		41.85
Isodictya_049	11	301	298	296	279	298	300	304	272	297	298	
		Identidad										

**Figura 8 Porcentaje de Identidad e Identidad de las secuencias aminoacídicas extraídas del transcriptoma de *Isodictya* sp. y secuencias aminoacídicas de HSP70 de esponjas.** En la esquina superior derecha se muestran los porcentajes de identidad y en la esquina inferior izquierda los valores de identidad.

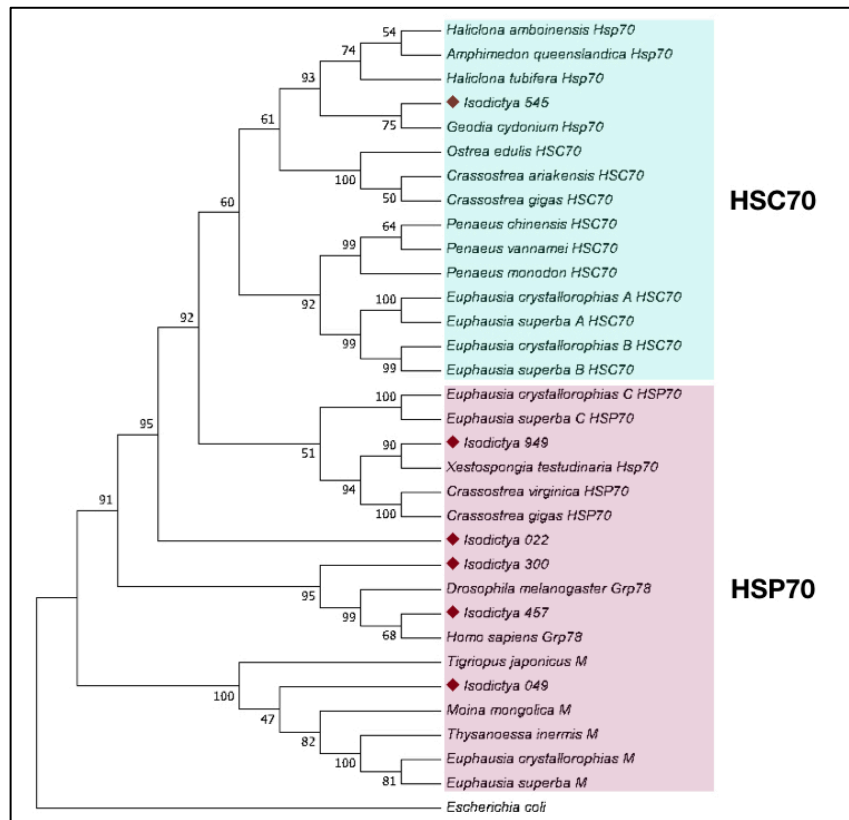
## 5.2 Caracterización de secuencias de HSP70

### 5.2.1 Filogenia molecular de las secuencias de HSP70

La relación filogenética, basada en las secuencias de HSP70 y HSC70, muestra que las secuencias de *Isodictya* sp., y otras 33 secuencias, generan un árbol en el que se agrupa a la secuencia *Isodictya\_545* dentro de un clado que contiene a las secuencias constitutivas o HSC70. En el mismo árbol, las secuencias restantes de *Isodictya* sp. (*Isodictya\_949*, *Isodictya\_022*, *Isodictya\_300*, *Isodictya\_457* e *Isodictya\_049*) se dispusieron en ramas diferentes, pero todas dentro de las secuencias proteicas inducibles o HSP70 (Figura 9).

Destacan dos secuencias, *Isodictya\_300* e *Isodictya\_457* por asociarse a secuencias Grp78 de *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830) y *Homo sapiens*

(Linnaeus, 1758), mientras que *Isodictya\_049* queda junto a secuencias de HSP70 mitocondriales.



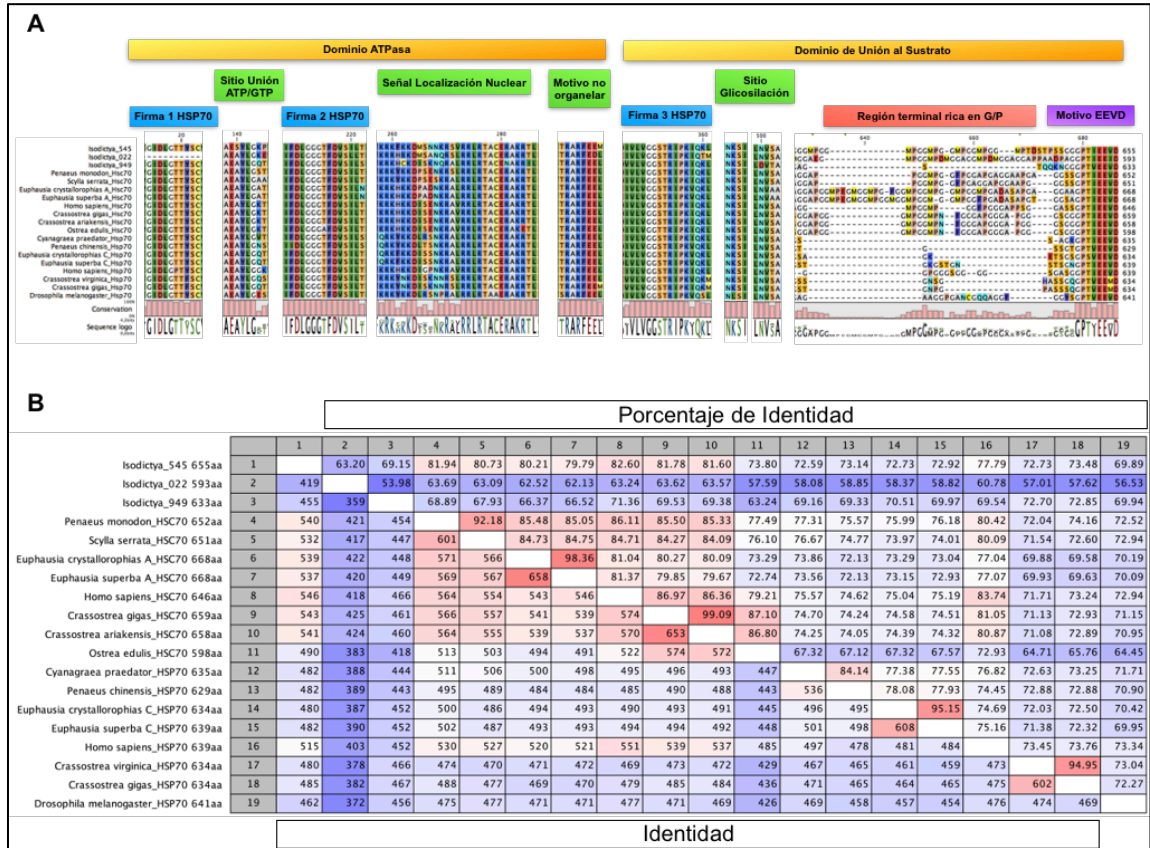
**Figura 9 Análisis filogenético molecular con el método Maximum Likelihood entre secuencias constitutivas e inducibles de la familia HSP70.** El árbol de consenso (bootstrap consensus tree) fue inferido desde 1000 réplicas. Se identifican con un rombo las isoformas de HSP70 de *Isodictya* sp. Los números de acceso de las secuencias utilizadas son: *O. edulis* CAC83684.1; *C. ariakensis* AAO41703.1; *C. gigas* HC70 AAD31042.1; *P. chinensis* AAW71958.1; *P. vannamei* ABP01681.1; *P. monodon* AAQ05768.1; *E. crystallorophias* A AIR72265.1; *E. superba* A AIR72270.1; *E. crystallorophias* B AIR72266.1; *E. superba* B AIR72271.1; *E. crystallorophias* C AIR72268.1; *E. superba* C AIR72273.1; *C. virginica* CAB89802.1; *C. gigas* HSP70 BAD15286.1; *D. melanogaster* NP\_511132.2; *H. sapiens* NP\_005338.1; *T. japonicus* ACAO3523.1; *M. mongolica* ADA79523.1; *T. inermis* AQL57191.1; *E. crystallorophias* M AIR72269.1; *E. superba* M AIR72274.1; *E. coli* WP\_000367861.1.

### 5.2.2 Secuencias de HSP70 de la Matriz Citoplasmática

Desde el transcriptoma de *Isodictya* sp. se recuperaron tres secuencias de localización citoplasmática, que presentan el patrón consenso característico de las HSP70 citosólica G-P-[TK]-[VI]-E-E-[VM]-D (Figura 10a) (Piano et al. 2005; Luan et al. 2010; Cascella et al. 2015). Además, *Isodictya\_545* e *Isodictya\_022* contienen el motivo tetrapéptido G-G-M-P, el cual está presente seis veces en la primera secuencia y solo dos en la segunda. También están presentes en las tres secuencias los sitios de glicosilación N-K-S-I y N-V-S-A, además de la secuencia nuclear bipartita [KQS]-R-K-H-K-K-D-P-A-D-N-K-[RL]. Igualmente, el motivo consenso no organelar R-A-R-F-E-[ED]-L está presente solo en *Isodictya\_022* e *Isodictya\_949*.

Cuando se analiza el porcentaje de identidad de las secuencias de *Isodictya* sp. con respecto a secuencias constitutivas e inducibles de HSP70 (Figura 10b), se sugiere que *Isodictya\_545* es una secuencia constitutiva ya que presenta altos porcentajes de identidad con dichas secuencias. Con HSC70 de *H. sapiens* tiene un 82,60 % de identidad y 81,94 % de identidad con el crustáceo *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798). En el caso de *Isodictya\_949* presenta con la proteína inducible de *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) un 72,85 % de identidad y a la vez tienen un 71,36 % de Identidad con HSC70 de *H. sapiens*. Para *Isodictya\_022*, se observan valores que varían entre 56,53 % y 63,69 % de identidad. Siendo el valor más alto con la secuencia constitutivas de *P. monodon*

con un 63,69 % de identidad y con la secuencia inducible de *H. sapiens* tiene un 60,78 % de identidad.



**Figura 10** Secuencias aminoacídicas de HSP70 de *Isodictya* sp. de la matriz citoplasmática. **A)** Alineamiento de las tres isoformas de *Isodictya* sp. con secuencia de HSP70 de la matriz citoplasmática de otros organismos. En la imagen se muestran los motivos conservados. **B)** Porcentaje de identidad e identidad entre *Isodictya*\_545, *Isodictya*\_022, *Isodictya*\_949 y secuencias de HSP70 constitutivas e inducibles de otros organismos. Los números de acceso de las secuencias utilizadas son los siguientes: *P. monodon* HSC70 AAQ05768.1; *S. serrata* HSC70 AFI61333.1; *E. crystallorophias* A HSC70 AIR72265.1; *E. superba* A HSC70 AIR72270.1; *H. sapiens* HSC70 NP\_006588.1; *C. gigas* HSC70 AAD31042.1; *C. ariakensis* HSC70 AA041703.1; *O. edulis* HSC70 CAC83684; *C. praedator* HSP70 CAL68989.1; *P. chinensis* HSP70 ACN38704.1; *E. crystallorophias* C HSP70 AIR72268.1; *E. superba* C HSP70 AIR72273.1; *H. sapiens* HSP70 AAH36107.1; *C. virginica* HSP70 CAB89802.1; *C. gigas* HSP70 BAD15286.1; *D. melanogaster* HSP70 NP\_731716.1.

La secuencia *Isodictya*\_545 (Anexo 1) tiene un largo de 2277 pb, incluyendo un marco de lectura abierto (ORF, del inglés Open Reading Frame)

de 1974 pb, 184 pb de la región no traducida 5'UTR (del inglés, Untranslated Region) y 122 pb de la región 3'UTR con la señal de poliadenilación AATAAA y el tallo poly(A). El ORF codifica una proteína de 657 aminoácidos (aa) con una masa molecular calculada de 72,69 kDa y un punto isoeléctrico (pI) teórico de 4,75. Al realizar un blastp con la secuencia aminoacídica deducida, la mayor identidad (85,44 %) se obtuvo con la proteína HSC de 71 kDa del pez *Anabarrilius graham* (Regan, 1908) (ROK74130.1).

La secuencia Isodictya\_022 (Anexo 2) presenta un largo total de 1905 pb incluyendo 80 pb correspondientes a 5'UTR y 44 pb a 3'UTR. Su ORF tiene 1782 pb que codifica una proteína de 593 aa de 64,59 kDa con un pI igual a 4,94. Su secuencia proteica deducida tiene el mayor porcentaje de identidad (90,76 %) con una HSP70 de la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin, 1897) (XP\_0021277351.1), al realizar un blastp en el NCBI.

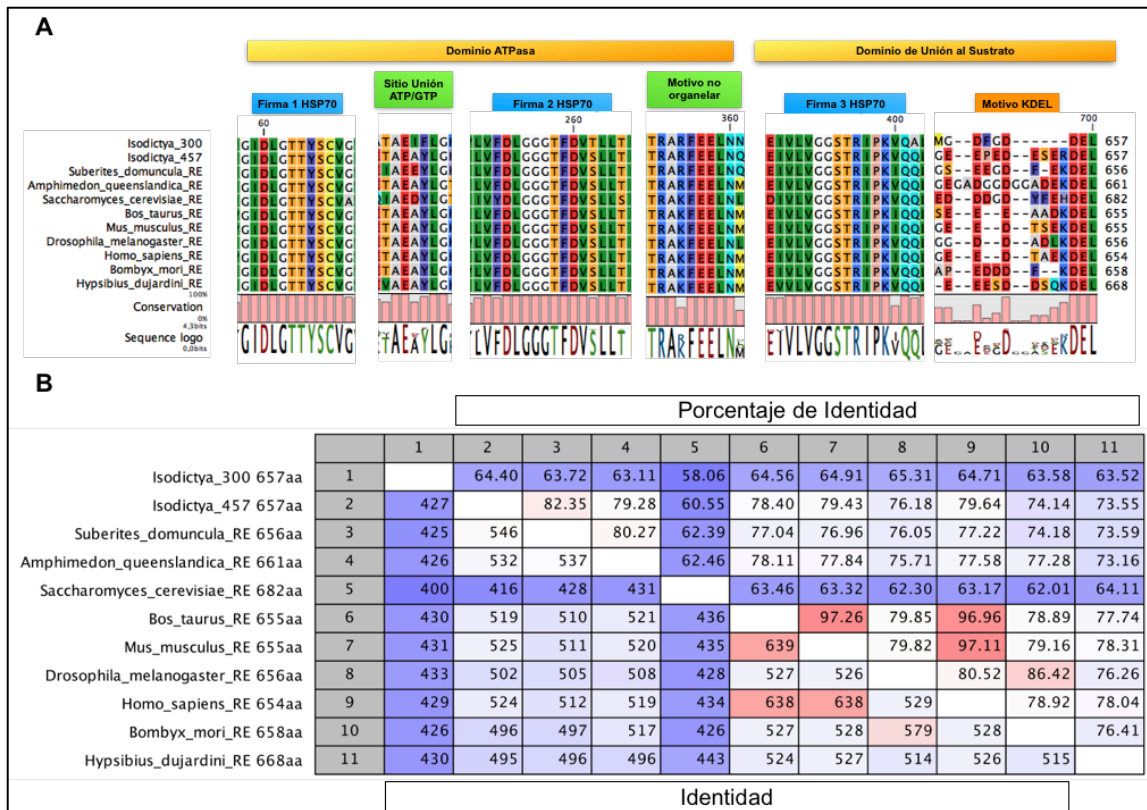
El tamaño total de la secuencia Isodictya\_949 (Anexo 3) es de 2490 pb y contiene un ORF de 1902 pb, la región 5'UTR se constituye por 65 pb y la región 3'UTR por 532 pb con la señal de poliadenilación AATAAA. El ORF codifica una proteína de 633 aa con una masa molecular calculada de 69,60 kDa y su pI es 5,24. Esta secuencia proteica presenta el mayor porcentaje de identidad con un 74,07 % al realizar blastp, con la HSP70 B2-like de *Mizuhopecten yessoensis* (Jay, 1857) (XP\_0021370483.1).

### 5.2.3 Secuencias de HSP70 del Retículo Endoplásmico

En el transcrito de *Isodictya* sp. se identificaron dos secuencias, Isodictya\_300 e Isodictya\_457, con la señal de retención del retículo endoplásmico [KH]-D-E-L en el dominio C-terminal (Munro y Pelham 1987; Daugaard et al. 2007) (Figura 11a). Ambas secuencias también presentan el motivo consenso no organelar R-A-R-F-E-[ED]-L.

Al comparar ambas secuencias con proteínas del retículo endoplásmico de otros organismos (Figura 11b), se obtiene para Isodictya\_300 un 65,31 % de identidad con *D. melanogaster* y 64,91 % de identidad con el ratón *Mus musculus* (Linnaeus, 1758). Isodictya\_457 presenta para *H. sapiens* un 79,64 % de identidad y un 82,35 % de identidad con la HSP70 del retículo endoplásmico de la esponja *Suberites domuncula* (Olivi, 1792).





**Figura 11** Secuencias aminoacídicas de HSP70 de *Isodictya* sp. del retículo endoplásmico. **A)** Alineamiento de las dos isoformas de *Isodictya* sp. con secuencia de HSP70 del retículo endoplásmico de otros organismos. En la imagen se muestran los motivos conservados de las secuencias. **B)** Porcentaje de identidad e identidad entre *Isodictya*\_300, *Isodictya*\_457 y secuencias de HSP70 del retículo endoplásmico presentes en otros organismos. Los números de acceso de las secuencias utilizadas son los siguientes: *S. domuncula* CAA70695.1; *A. queenslandica* XP\_003385959.1; *S. cerevisiae* AAA34714.1; *B. taurus* NP\_001068616.1; *M. musculus* NP\_001156906.1; *D. melanogaster* NP\_511132.2; *H. sapiens* NP\_005338.1; *B. mori* AGA84579.1; *H. dujardini* OQV12150.1.

El largo total de la secuencia *Isodictya*\_300 (Anexo 4) es de 2066 pb con 55 pb correspondientes a la región 5' UTR y 38 pb en la región 3' UTR, que contiene la señal de poliadenilación AATAAA. El marco abierto de lectura de 1974 pb codifica una proteína de 657 aa con una masa molecular calculada de 71,91 kDa y un pI de 4,67. Al realizar un blastp, la secuencia proteica con mayor

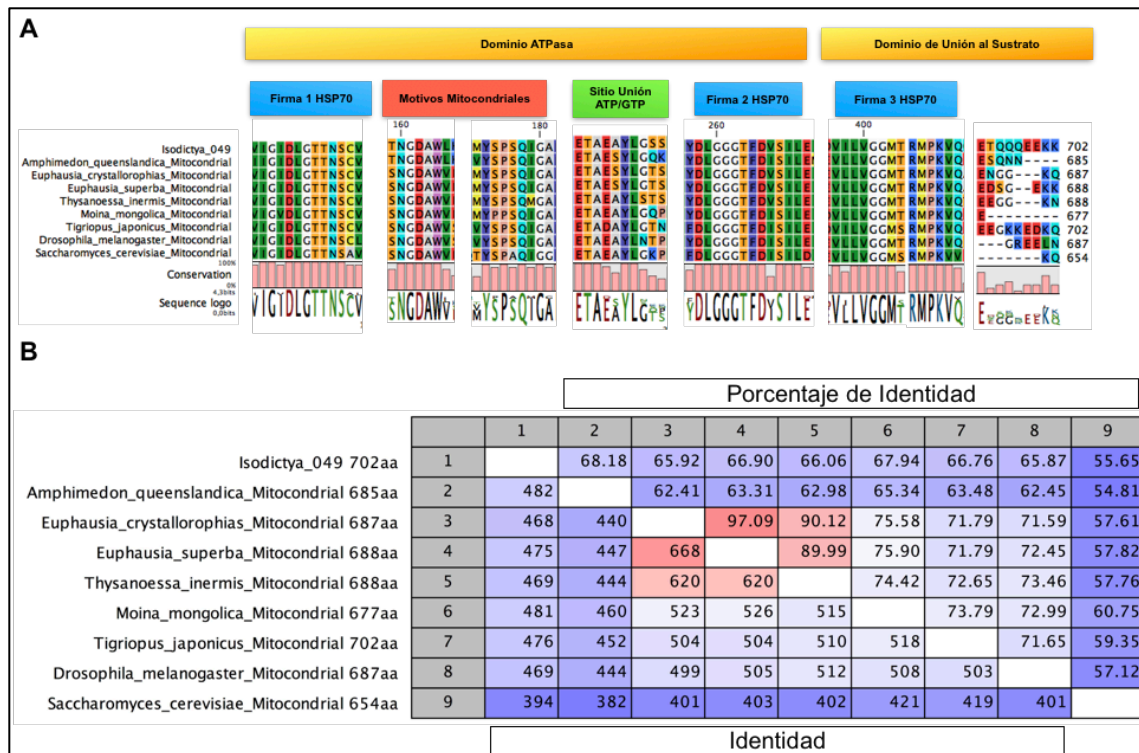
porcentaje de identidad es la HSP70 de la diatomea *Thalassiosira pseudinana* (Cleve, 1873) (XP\_002288567.1) con un 93,18 %.

La secuencia Isodictya\_457 (Anexo 5) tienen un largo total de 2277 pb, 122 pb en el extremo 5' UTR y 122 pb en la región 3' UTR, donde está presente la señal AATAAA de poliadenilación. El ORF de la secuencia es de 1974 pb que codifica una secuencia proteica de 657 aa. La masa molecular calculada para esta proteína es de 72,69 kDa y su pI es 4,75. Esta tiene un 84,30 % de identidad con la HSP70 de la esponja *Hymeniacidon* sp. (Boerbank, 1858) (AEH16639.1), siendo esta la secuencia con mayor identidad.

#### **5.2.4 Secuencia de HSP70 de la Mitochondria**

De las seis secuencias identificadas como parte de la familia de HSP70, solo una tiene localización mitocondrial. La secuencia Isodictya\_049 presenta dos motivos asociados a HSP70 mitocondriales: G-D-A-W-V y Y-S-P-S-Q-I (Tang et al. 2016), al alinearla con otras proteínas localizadas en la mitocondria, ambos motivos son altamente conservados (Figura 12a).

Al comparar Isodictya\_049 con secuencias mitocondriales de otros organismos presenta más de un 55 % de identidad con estas (Figura 12b). Con secuencias de crustáceos tiene entre un 65,92 % y 67,94 % de identidad, mientras que con la HSP70 descrita como mitocondrial para la esponja *A. queenslandica* presenta un 68,18 % de identidad.



**Figura 12 Secuencia aminoacídica de HSP70 de *Isodictya* sp. mitocondrial.** **A)** Alineamiento de *Isodictya* sp. con secuencia de HSP70 mitocondriales de otros organismos. En la imagen se destacan los motivos conservados. **B)** Porcentaje de identidad e identidad entre *Isodictya\_049* y secuencias de HSP70 mitocondriales presentes en otros organismos. Los números de acceso de las secuencias utilizadas son los siguientes: *A. queenslandica* XP\_019852429.1; *E. crystallorophias* AIR72269.1; *E. superba* AIR72274.1; *T. inermis* AQL57191.1; *M. mongolica* ADA79523.1; *T. japonicus* ACA03523.1; *D. melanogaster* AAA28628.1; *S. cerevisiae* AAA63792.1.

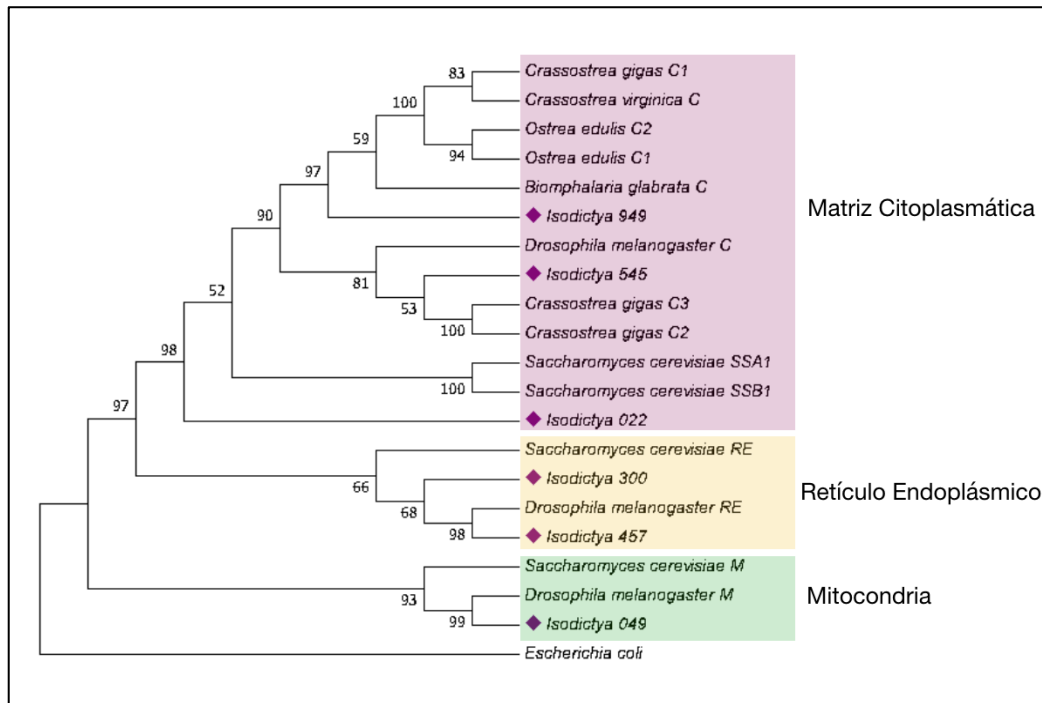
El largo total de la secuencia *Isodictya\_049* es de 2274 pb (Anexo 6) y su ORF es de 2109 pb, la región 5' UTR se constituye de 34 pb y 3' UTR por 132 pb con la señal de poliadenilación AATAAA. El ORF codifica una proteína de 702 aa, con una masa molecular calculada de 76,25 kDa y un pI de 5.46. Esta secuencia proteica, al realizar una búsqueda por homología con la herramienta bioinformática blastp en NCBI, presenta el mayor porcentaje de identidad

(76,68 %) con una HSP70 de la estrella de mar *Acanthaster planci* (Linnaeus, 1758) (XP\_022086616.1).

### **5.2.5 Compartimentalización de las secuencias de HSP70**

La relación filogenética, basada en las seis secuencias caracterizadas como HSP70 de *Isodictya* sp. y secuencias de otros organismos específicas de la matriz citoplasmática, retículo endoplásmico y mitocondria, permitió verificar filogenéticamente la localización intracelular de estas chaperonas.

El árbol generado por dichas secuencias es congruente con los análisis individuales de cada HSP70 de esponja. En el clado de las secuencias citoplasmáticas se agrupan *Isodictya\_949*, *Isodictya\_545* e *Isodictya\_022*. Las secuencias *Isodictya\_300* e *Isodcitya\_457* se ubican junto a las secuencias del retículo endoplásmico. Finalmente, *Isodictya\_049* se agrupa en el clado junto las secuencias mitocondriales (Figura 13).



**Figura 13 Relación filogenética entre secuencias de HSP70 asociadas a diferentes compartimentos celulares.** El árbol se construyó utilizando el método Maximum Likelihood (n=1000) en MEGA7. Con rombos se indican las isoformas de HSP70 de *Isodictya sp.* Los números de acceso para las secuencias utilizadas son: *O. edulis* C1, AAM46635.11; *O. edulis* C2, AAM46634.1; *C. virginica* C, CAB89802.1; *C. gigas* C1, BAD15286.1; *C. gigas* C2, AAD31042; *C. gigas* C3, CAC83009.1; *B. glabrata* C, AAB95297.1; *S. cerevisiae* SSB1, CAA31393.1; *S. cerevisiae* SSA1, P10591.4; *S. cerevisiae* RE, AAA34714.1; *S. cerevisiae* M, AAA63792.1; *D. melanogaster* RE, AAA28626.1; *D. melanogaster* M, AAA28628.1; *D. melanogaster* C AAB59186.1.

### 5.3 Expresión de genes en esponjas antárticas *Isodictya* sp.

#### 5.3.1 Expresión diferencial de secuencias de HSP70 durante el estrés térmico

A partir de la matriz de expresión obtenida del transcriptoma de *Isodictya* sp. se filtraron los valores de TPM para cada secuencia caracterizada en el presente estudio (Tabla 4). Al comparar la condición control con las condiciones de 3 °C y 5 °C, se observó que en la condición experimental de 4 h a 5 °C se registran los TPM más altos en las secuencias citoplasmáticas *Isodictya*\_545 e *Isodictya*\_022 y la secuencia localizada en el retículo endoplásmico, *Isodictya*\_300. Mientras que para la secuencia de ubicación citoplasmática *Isodictya*\_949, la secuencia del retículo endoplásmico *Isodictya*\_457 y la HSP70 mitocondrial *Isodictya*\_049, presentan el mayor valor de TPM cuando fueron expuestas a 3 °C por 4 h.

Tabla 4 Valores de TPM en *Isodictya* sp. en las distintas condiciones experimentales

Secuencia	Control	1 h 3°C	4 h 3°C	1 h 5°C	4 h 5°C
<i>Isodictya</i> _545	18251	82565	93526	91360	102034
<i>Isodictya</i> _949	2,41	1238,43	2609,46	1516,21	1717,18
<i>Isodictya</i> _022	0,03	0,1	0,12	0,15	0,31
<i>Isodictya</i> _300	2	22	19	31	97
<i>Isodictya</i> _457	127,51	123,65	177,37	110,31	99,18
<i>Isodictya</i> _049	21,49	29,76	42,37	18,19	29,76

#### 5.3.2 Partidores de HSP70 para RT-qPCR en tiempo real

Para las secuencias seleccionadas de HSP70 de *Isodictya* sp. se diseñaron parejas de partidores para la RT-qPCR en tiempo real. Las secuencias

de los partidores y los tamaños de los amplicones correspondientes son presentadas en la Tabla 5. Con el fin de seleccionar las condiciones térmicas óptimas para las parejas de partidores, se realizó una PCR con gradiente de temperatura.

**Tabla 5 Partidores secuencias de HSP70.** Partidores (5'-3') diseñados para las secuencias de HSP70. Se indican partidores con sentido *forward* (Fw) y sentido *Reverse* (Rv).

Secuencia	Partidor	Amplicón
<b>Isodictya_949</b>	qlsod_HSP_949_Fw TCCGAAGGGTCAGTGTGGAA	173 pb
	qlsod_HSP_949_Rv TTCTCGCAGGCTGCCTAAG	
<b>Isodictya_457</b>	qlsod_HSP_457_Fw TTCTCGCAGGCTGCCTAAG	213 pb
	qlsod_HSP_457_Rv GTCATGACACCTCCCACAGT	
<b>Isodictya_049</b>	qlsod_HSP_049_Fw TTGACCTCGGCACAACCAAC	201 pb
	qlsod_HSP_049_Rv CAATCAGACGCTTTGTGGCAT	
<b>Isodictya_300</b>	qlsod_HSP_300_Fw CGCCGTTCTCATCCAGGTATTT	208 pb
	qlsod_HSP_300_Rv TCTCGGCAGTGATGGTGATCTT	
<b>Isodictya_022</b>	qlsod_HSP_022_Fw CTGCGAGAAGGTGTTGAGGGAT	212 pb
	qlsod_HSP_022_Rv TTTGTCCGCTCCCGAAAGGAT	
<b>Isodictya_545</b>	qlsod_HSP_545_Fw TCCTGACGAGGCTGTGGCTTAT	224 pb
	qlsod_HSP_545_Rv GCACACCTGGTTGGTTGTCAGA	
	qlsod_HSP_545_Fw2 TGACAAGGGTCGTCTCAGTG	222 pb
	qlsod_HSP_545_Rv2 CCGATGACTTCCTTGCAATTT	

### 5.3.3 Partidores de genes de referencia para RT-qPCR en tiempo real

Se diseñaron los partidores para la RT-qPCR en tiempo real de las secuencias seleccionadas como genes de referencia. Para tres de las ocho parejas de partidores se les calculó la eficiencia Tabla 6.

**Tabla 6 Partidores de las secuencias de genes de referencia.** Partidores (5'-3') diseñados para las secuencias de HSP70. Se indican partidores con sentido *Forward* (Fw) y sentido *Reverse* (Rv).

Gen	Partidor	Amplicón	Eficiencia	Rsq	Pendiente
<b>GAPDH</b>	qlsod_GAPDH_Fw AGGCAAAGGATGGGAAACTGGT	157 pb	102,9 %	0,999	-3,255
	qlsod_GAPDH_Rv TTTATGTGAGCCGTGGCCTTGT				
<b>Factor de Elongación 1-<math>\alpha</math></b>	qlsod_EF1a_Fw AGCGGGGTGACCTTGTTTGAA	118 pb	-	-	-
	qlsod_EF1a_Rv GCACTGTCCCGATACCTCCAAT				
<b><math>\beta</math>-tubulina</b>	qlsodB-tub1_Fw CGTGAAGACAGCTGTTTGTGAC	173 pb	-	-	-
	qlsodB-tub1_Rv TCTCATCCATGCCTTCTCTGT				
<b>Galactosil Transferasa</b>	qlsod_Galac_Fw GATACTTGGCTTGGTGAGACA	170 pb	-	-	-
	qlsod_Galac_Rv TCTAGTTCCACTCCTGCTTTG				
<b>LRR8</b>	qlsod_LRR8_Fw AAAGAGGTGCCTTCTGTGGT	189 pb	108,8 %	0,977	-3,127
	qlsod_LRR8_Rv GTCTAGAGCCGTGAGCTGA				
<b><math>\beta</math>-actina</b>	qlsod_Act_Fw ATCCGCTGGTGTCCACGAA	160 pb	-	-	-
	qlsod_Act_Rv GGATGGAGCAAGGGAAGTGA				
<b>SRP54</b>	qlsod_SRP54_Fw TGCACCAAGCTTGCCTCTTAC	183 pb	-	-	-
	qlsod_SRP54_Rv CTTATCCACCCCTTCTGTGCT				
	qlsod_SRP54_Fw TGCACCAAGCTTGCCTCTTAC	115 pb	102,3 %	0,997	-3,269
	qlsod_SRP54_Rv2 GAGCTTTAGTGGCGTTCTGCTT				

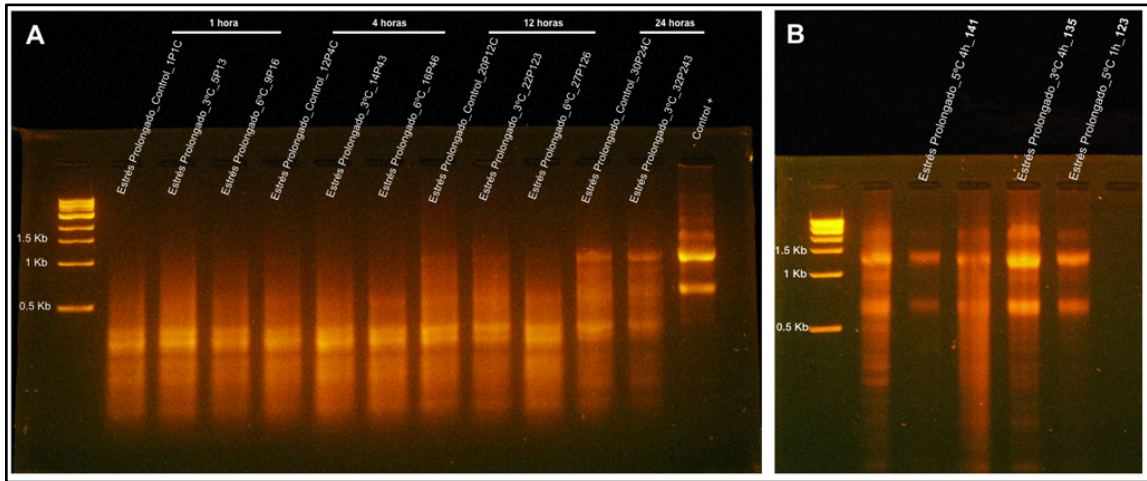
Es así como la curva estándar realizada con la pareja de partidores para LRR8 presentó un Rsq de 0,977, pendiente de -3,127 y 108,8 % de eficiencia. En el caso de la pareja de partidores para GAPDH presentó un Rsq de 0,999, la pendiente de -3,255 y la eficiencia de 102,9 %. Finalmente, la curva estándar para la pareja de partidores de SRP54 obtuvo un Rsq de 0,997, pendiente de -3,269 y 102,3 % de eficiencia.



#### **5.3.4 Integridad de los ARN totales de *Isodictya* sp.**

La pureza de los ARN totales de *Isodictya* sp., correspondiente a las muestras de experimento de estrés térmico prolongado y estrés térmico agudo, fue verificada por medio de la razón  $A_{260}/A_{280}$  (260 y 280 nm) que se mantuvo en un rango de 2,0 a 2,2, valores que se consideran aceptables para indicar que el ARN no está contaminado (Riesgo et al. 2012). Luego, se corroboró la integridad del ARN en geles de agarosa (Figura 14a), donde se observaron bandas menores a 0,5 Kb y en la mayoría de las muestras no se observaron bandas de ARN ribosomal 18S y 28S. Aunque en algunas muestras se aprecian bandas tenues que podrían corresponder a 18S y 28S, en ninguna de estas muestras se ven ambas bandas a la vez, por lo que no presentan un patrón característico de ARN íntegro (Imbeaud et al. 2005; Skrypina et al. 2003), como se observa en el control positivo en la Figura 14a. Esto sugiere que el ARN de esponja obtenido, se encontraba parcialmente degradado.

Paralelamente, con muestras de ARN íntegro de *Isodictya* sp. correspondientes a experimentos de estrés prolongado realizados en 2017 que tienen un RIN mayor a 8,0 (Tabla 7) (Björkman et al. 2016), se realizó un gel de agarosa en el cual se observaron las bandas de ARN ribosomal 18S y 28S, ejemplificando cómo se debe ver ARN íntegro para la especie *Isodictya* (Figura 14b).



**Figura 14 Verificación de la integridad del ARN de esponjas *Isodictya* sp. a través de electroforesis en gel de agarosa** **A)** Gel de agarosa (2%) con muestras del experimento de estrés térmico prolongado. En cada carril se cargó 1 µg de ARN y el marcador de peso de molecular utilizado fue de 1 Kb. Como control positivo se utilizó ARN de *Stereochinus neumayeri*. Se realizó una electroforesis a 70 Volts por 57 minutos buffer de corrida TAE 1X. **B)** Gel de agarosa (2%) en el cual se cargó 1 µg de ARN de Esponja *Isodictya* sp. del experimento de estrés prolongado realizado en 2017. En la imagen se rotulan aquellas muestras que tienen un RIN conocido (mayor a 8). El marcador de peso molecular utilizado es de 1 Kb y se llevó a cabo una electroforesis por 80 minutos a 70 Volts en buffer de corrida TBE 1X.

Para confirmar la degradación de ARN, se analizaron muestras aleatorias en el equipo Fragment Analyzer para así saber la calidad de las muestras según sus valores de RQN (Tabla 7), los cuales fueron menores a 5,0, confirmando la degradación del ARN (Fleige et al. 2006; Björkman et al. 2016).

**Tabla 7 Integridad de ARN en muestras de *Isodictya* sp.**

Muestra	Experimento	Temperatura	Tiempo	Año	Integridad ARN
123	Estrés Prolongado	5 °C	1h	2017	8,4 (RIN)
135	Estrés Prolongado	3 °C	4h	2017	8,5 (RIN)
141	Estrés Prolongado	5 °C	4h	2017	8,3 (RIN)
2P1C	Estrés Prolongado	Control	1h	2018	1,2 (RQN)
10P4C	Estrés Prolongado	Control	4h	2018	2,8 (RQN)
30P24C	Estrés Prolongado	Control	1d	2018	3,1 (RQN)
24P123	Estrés Prolongado	3 °C	12h	2018	2,9 (RQN)
6P13	Estrés Prolongado	3 °C	1h	2018	1,5 (RQN)
33P243	Estrés Prolongado	3 °C	1d	2018	1,4 (RQN)
15P43	Estrés Prolongado	3 °C	4h	2018	3,2 (RQN)
18P46	Estrés Prolongado	6 °C	4h	2018	1,4 (RQN)

### **5.3.5 Efecto de la integridad de los ARN totales de *Isodictya* sp. en la RT-qPCR en tiempo real**

Se ha reportado que la degradación de ARN afecta el rendimiento de la RT-qPCR en tiempo real. De hecho ARN con valores de RIN entre 5 y 8 se considera como un templado poco óptimo para obtener valores confiables en la expresión relativa de genes (Fleige et al. 2006).

Debido a esto, se realizó una selección de muestras para poder comparar en genes constitutivos (LRR8, SRP54 y GAPDH) la variación de valores en la RT-qPCR en tiempo real entre ARN no degradado (RIN > 8,0) y ARN degradado (RQN < 5,0), con ARNs recuperados desde esponjas sometidas a condiciones similares en experimentos de estrés térmico prolongado en los años 2017 y 2018 (Tabla 8). Se efectuó la RT-qPCR en tiempo real utilizando 3 muestras de 2017 y 9 muestras de 2018, para los tres genes constitutivos.

**Tabla 8 Selección de muestras para la RT-qPCR en tiempo real**

Año	Muestra	Tiempo	Temperatura	Experimento
2017	123	1h	5°C	Estrés Prolongado
	135	4h	3°C	
	141	4h	5°C	
2018	7P16	1h	6°C	Estrés Prolongado
	8P16			
	9P16			
	13P43	4h	3°C	Estrés Prolongado
	14P43			
	15P43			
	16P46	4h	6°C	Estrés Prolongado
	17P46			
18P46				

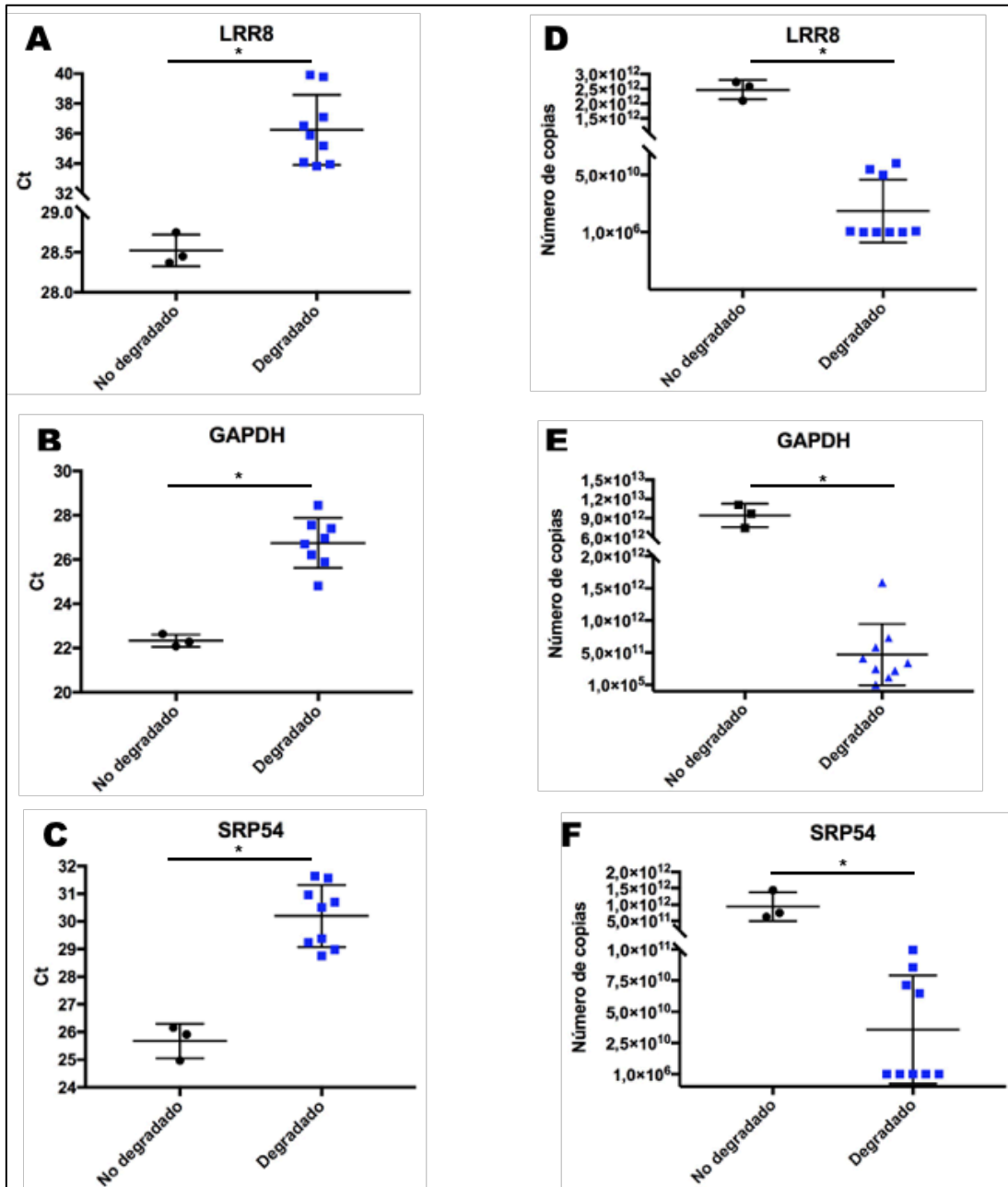
Los datos de Ct y número de copias de ADN obtenidos a partir de la RT-qPCR en tiempo real presentaron una distribución normal. Por lo tanto, se utilizó la prueba t no pareada para datos paramétricos con el fin de evaluar diferencias significativas entre ambas condiciones. En los tres genes evaluados, al comparar las condiciones de ARN no degradado (muestras de 2017) y ARN degradado (muestras de 2018), tanto los datos de Ct como el de número de copias de ADN, presentaron una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) (Figura 15).

Para el gen constitutivo LRR8, sus Ct promediaron  $28,52 (\pm 0,2)$  para las muestras de 2017 y  $36,25 (\pm 2,3)$  para las muestras de 2018 (Figura 15A). El número de copias de ADN para este gen tuvo un promedio de  $2,47 \times 10^{10} (\pm 3,3 \times 10^{11})$  para muestras de ARN no degradado siendo significativamente mayor

( $p < 0,05$ ) en comparación con las muestras de ARN degradado, que presentó  $1,85 \times 10^{10}$  ( $\pm 2,75 \times 10^{10}$ ) copias de ADN (Figura 15D).

Mientras que para el gen constitutivo GAPDH, el promedio de los Ct para las muestras de ARN no degradado es de 22,34 ( $\pm 0,2$ ) y para las muestras de ARN degradado es de 26,75 ( $\pm 1,1$ ) (Figura 15B). Las muestras de 2017 promedian  $9,44 \times 10^{12}$  ( $\pm 1,82 \times 10^{12}$ ) número de copias de ADN, siendo mayor significativamente ( $p < 0,05$ ) con respecto a  $4,69 \times 10^{11}$  ( $\pm 4,76 \times 10^{11}$ ) número de copias de ADN en las muestras de 2018 (Figura 15E).

Finalmente, para el gen constitutivo SRP54 los Ct promediaron 25,68 ( $\pm 0,6$ ) para las muestras de 2017 y 30,19 ( $\pm 1,1$ ) para las muestras de 2018 (Figura 15C). Los valores para los números de copias de ADN para las muestras de 2017 fue un promedio de  $9,37 \times 10^{11}$  ( $\pm 4,4 \times 10^{11}$ ) y para las muestras de 2018 es de  $3,57 \times 10^{10}$  ( $\pm 4,34 \times 10^{10}$ ) copias de ADN, siendo significativamente mayor los valores de las muestras de ARN no degradado ( $p < 0,05$ ) (Figura 15F).



**Figura 15** Comparación en RT-qPCR de tiempo real entre ARN degradado y ARN no degradado de *Isodictya* sp. En la RT-qPCR de tiempo real se evaluaron los genes constitutivos LRR8, GAPDH y SRP54 con muestras de *Isodictya* sp. correspondientes al experimento de EP de 2017 (ARN no degradado) (n=3) y 2018 (ARN degradado) (n=9). (A-C) Comparación del número de ciclos de RT-qPCR entre muestras provenientes de ARN no degradado y ARN degradado. (D-F) Comparación del número de copias entre muestras provenientes de ARN no degradado y ARN degradado. Con asterisco (\*) se indica diferencia significativa  $P < 0,05$ .

## 6. DISCUSIÓN

Estudios en esponjas en otras latitudes indican que estas pueden tolerar altas temperaturas y revelan una sorprendente complejidad en su respuesta. Sin embargo, el potencial genético de este grupo está poco estudiado (Guzman y Conaco 2016b). Este primer análisis del efecto del incremento de temperatura en la esponja antártica *Isodictya* sp. se enfocó en identificar las HSP70, que fue uno de los primeros genes estudiados en esponjas de bajas latitudes y demostró estar involucrado en la adaptación de estos organismos al estrés térmico (Aguilar-Camacho y McCormack 2017).

En el transcriptoma de *Isodictya* sp. se identificaron seis secuencias con dominios y firma características de la familia de HSP70 (Daugaard et al. 2007; Luan et al. 2010). El porcentaje de identidad de estas con otras secuencias de HSP70 descritas para esponjas de otras latitudes se calculó entre un 39 % y 86 % de identidad (Figura 8), siendo los valores más bajos los de la secuencia de HSP70 caracterizada como mitocondrial (*Isodictya\_049*). Esta misma secuencia presentó un bajo porcentaje de identidad con las secuencias de HSP70 citoplasmáticas y del retículo endoplásmico (de 37,31 % a 42,85 % de identidad) de la misma especie. En contraste, se calculó un 68,18 % de identidad con la HSP70 mitocondrial de la esponja de aguas templadas *A. queenslandica* (Figura 12b).

En lo que se refiere a las secuencias de localización citoplasmáticas *Isodictya\_545*, *Isodictya\_949* e *Isodictya\_022*, éstas presentaron valores de

identidad superiores al 53 % con las secuencias de HSP70 de las esponjas *H. amboinensis*, *H. tubifera*, *G. cydonium*, *A. queenslandica* y *X. testudinaria*, con las que comparten el motivo de locación citoplasmática, G-P-[TK]-[VI]-E-E-[VM]-D (Piano et al. 2005; Luan et al. 2010; Cascella et al. 2015). Además, en el árbol del análisis filogenético entre secuencias constitutivas e inducibles de la familia HSP70 (Figura 9), *Isodictya\_545* se agrupó con cuatro de las cinco secuencias correspondientes a HSP70 de esponjas.

Los alineamientos de las secuencias de HSP70 de las esponjas ya antes mencionadas, junto a las de otros organismos y secuencias de *Isodictya* sp., muestran que las firmas características de la familia de las HSP70 (Luan et al. 2010) son altamente conservadas y se encuentran presentes en las HSP70 de *Isodictya* sp., a excepción de la secuencia citoplasmática *Isodictya\_022*, que no presenta una de las tres firmas características de esta familia de chaperonas ([IV]-D-L-G-T-[ST]-x-[SC]). Con respecto a este punto en particular, se ha reportado que el langostino gigante de agua dulce, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879), en su HSP70 inducible (AY466497) encontraron sólo dos firmas características de la familia de las HSP70 (Liu et al., 2004), como sucede con la secuencia *Isodictya\_022*. Al respecto, sugieren que la delección del extremo N-terminal en la HSP70 inducible puede tener un significado importante en la evolución, teoría que en el caso de *Isodictya\_022*, se podría sustentar al observar el árbol del análisis filogenético molecular entre secuencias constitutivas e inducibles de la familia HSP70 (Figura 9), donde dicha secuencia queda



agrupada junto las HSP70, pero en una rama separada de las otras HSP70. Asimismo, un estudio sobre la divergencia de los genes de la familia de HSP90 en genoma humano (Chen et al. 2005), reportan secuencias de HSP90 que carecen de firmas características de esta familia y proponen que estos genes son probablemente pseudogenes, producidos por una duplicación desigual o por un evento de transposición. De todos modos, los avances científicos indican que es necesario mayor investigación para comprender el mecanismo de estos eventos.

Es interesante resaltar que las secuencias *Isodictya\_022* e *Isodictya\_545*, poseen el motivo tetrapéptido G-G-M-P en el extremo C-terminal, el cual está implicado en la interacción con proteínas co-chaperonas (Demand 1998) y se caracteriza por estar presente en las formas constitutivas ( Fuertes et al. 2004; Cascella et al. 2015). Sin embargo, a diferencia de *Isodictya\_545*, la secuencia *Isodictya\_022* se agrupó con las HSP70 en el análisis filogenético (Figura 9). Ambas secuencias difieren en el número de repeticiones del motivo, lo cual podría explicar que se hayan agrupado de forma distinta, pero la caracterización de HSP70 en dos especies de Krill de aguas antárticas, *E. superba* y *E. crystallophias* indican lo contrario. En dicho estudio filogenético, se analizaron las secuencias de ambas especies de krill con HSP70 y HSC70 de otros organismos utilizando el método Bayesian Inference y Maximum Likelihood, en donde aquellas isoformas de krill que se agruparon junto a las constitutivas presentan el motivo G-G-M-P entre una a seis veces en sus secuencias (Cascella et al. 2015).

A los transcriptomas obtenidos de las distintas condiciones experimentales, se analizaron los valores de TPM correspondientes a la abundancia relativa de cada secuencia obtenida. Las seis secuencias caracterizadas como HSP70 presentaron variaciones en sus valores de TPM con respecto a la condición control (Tabla 4). Para *Isodictya\_949*, caracterizada como inducible, aumentan los valores de TPM en comparación con la condición control, siendo esta una respuesta esperada para chaperonas inducibles (Feder y Hofmann 1999). Una tendencia similar, pero no tan notoria, presentó la HSP70 del retículo endoplásmico (*Isodictya\_300*), la HSP70 mitocondrial (*Isodictya\_049*) y la HSP70 citoplasmática (*Isodictya\_022*). Cabe destacar que esta última secuencia a pesar de haber presentado valores de TPM cercanos a cero, se encuentra presente en todas las condiciones experimentales. La secuencia caracterizada como constitutiva, *Isodictya\_545*, en la condición control tiene los valores más altos de TPM en comparación con las otras secuencias y es expresada entre 4,5 a 5,5 veces más en las condiciones de 3 °C y 5 °C con respecto a la condición control, siendo este perfil de expresión contrario al descrito para HSC70, las que se caracterizan por estar en bajos niveles en células no estresadas y ser ligeramente inducibles por calor (Lindquist y Craig 1988; Kiang y Tsokos 1998).

Con referencia al resultado anterior, es importante tener en consideración que el estrés en ambientes extremos resulta para los organismos que lo experimentan, en una expresión crónica de los genes *hsp70* y/o *hsc70*. Por lo

tanto, la plasticidad de la expresión de HSP puede haber evolucionado para responder a las condiciones de temperatura ecológicamente relevantes en diferentes latitudes (Chen et al. 2018). Un ejemplo de esto son el pez antártico *H. antarcticus* y los moluscos *N. concinna* y *L. elliptica*, que al ser expuestos a condiciones de estrés térmico sus niveles de expresión de *hsp70* son constantes, indicando una pérdida de la inducción clásica de este gen (Clark et al. 2008a, 2008b). De igual manera, dos especies de Krill de aguas antárticas, *E. superba* y *E. crystallorophias*, presentan una respuesta débil comparada con la observada en regiones templadas (Casella et al. 2015).

De todos modos, hay que tener en consideración que los valores de TPM es una estimación de la representación de cada transcrito con respecto al número de lecturas obtenidas en cada librería, cuya técnica tiene una cobertura variable para cada transcrito. Esto último conduce a un sesgo en los valores obtenidos en el análisis (Conesa et al. 2016), por lo que es necesario corroborar a través de RT-qPCR en tiempo real si la tendencia de expresión de estos genes concuerda con los resultados del análisis transcriptómico.

Al respecto del ARN extraído de las muestras del experimento de estrés térmico prolongado y estrés térmico corto del año 2018, los geles de agarosa no presentaron bandas ribosomales y sólo algunas exhibieron bandas tenues de 28S y 18S (Figura 14a). Este patrón de bandeo difiere con lo que se considera convencionalmente como ARN intacto, en el cual las bandas ribosomales 28S y

18S deben tener una razón cercana a 2:1, respectivamente (Skrypina et al. 2003; Imbeaud et al. 2005).

Electroforesis de geles de agarosa con muestras ambientales de esponjas recolectadas en los años 2017-2018 y muestras de esponja *Isodictya* sp. sometidas a un incremento de temperatura en el año 2017 (resultados no presentados), mostraron una clara relación entre la cantidad de muestra de esponja preservada y el patrón de bandeo del ARN extraído de estas. De tal manera que aquellas con menor cantidad de material en el tubo presentaron un patrón de bandas definido en el gel de agarosa según se espera para ARN íntegro, mientras que el ARN extraído de muestras con mayor cantidad de material no presenta bandas ribosomales definidas.

Sobre la base de los resultados anteriores, la preservación de muestras de esponja es fundamental para evitar la degradación del ARN, que puede ser ocasionada por factores mecánicos, químicos, pH extremo o ribonucleasas (Björkman et al. 2016). En consecuencia, la elección de un método de almacenamiento debe considerar el tiempo de traslado y que la cadena de frío se mantenga, aún más en muestras de organismos antárticos donde el almacenamiento considerado como frío para especies de otras latitudes, es menos efectivo para la mantención de estos tejidos (Hillyard y Clark 2012).

Para las muestras de esponja se utilizó la solución de estabilización *RNAlater*<sup>®</sup>, que permite mayor flexibilidad en el almacenamiento y transporte de

muestras, aún cuando se ha reportado en equinodermos y esponjas que esta solución estabilizadora disminuye el rendimiento en la extracción de ARN y se obtienen para éste valores variables de RIN, entre 5,6 a 9,0, rango aceptable para la HTS ( Simister et al. 2011; Riesgo et al. 2012; Pérez-Portela y Riesgo 2013). Además, es importante recalcar que la proporción entre la cantidad de muestra y el volumen de RNA<sup>later</sup><sup>®</sup> es clave para preservar de forma óptima el tejido de esponja.

Como la técnica de RT-qPCR en tiempo real considera el análisis de regiones más pequeñas de ARN, el rango de calidad requerido de ARN para esta técnica es más amplio, por este motivo se analizaron algunas muestras de *Isodictya* sp. en el equipo Fragment Analyzer (Agilent Technologies) con la finalidad de corroborar el grado de degradación del ARN. Los valores de RQN obtenidos para estas muestras (Tabla 7), inferiores a lo que ya se considera como un ARN parcialmente degradado ( $5 < RIN < 8$ ), están fuera de rango para realizar una RT-qPCR en tiempo real (Imbeaud et al. 2005; Fleige et al. 2006).

Con la finalidad de probar esto, se realizó una RT-qPCR en tiempo real con muestras degradadas (experimento 2018) y muestras no degradadas (experimento 2017). Es así como se evidenció que la relación entre la calidad de ARN y los Ct obtenidos para cada gen, fue inversamente proporcional (Figura 15a-c), donde se comprueba que un ARN con un alto RIN (RQN) presenta valores de Ct más bajos que un ARN con menor RQN (RIN), como ya se ha reportado en tejidos y líneas celulares de bovino (Fleige y Pfaffl 2006). Además, en los

valores de Ct correspondientes al ARN degradado, se observó mayor desviación estándar en comparación a los ARN íntegros, como se ha señalado en estudios previos (Fleige et al. 2006).

Finalmente, otro parámetro analizado fue el número de copias para cada gen de referencia (Figura 15d-f), donde hubo diferencias de un orden de magnitud entre los valores de ARN degradado y ARN íntegro de esponja. Estos resultados mostraron una relación directamente proporcional entre calidad y número de copias, de modo que un ARN con alto RIN (RQN) tiene mayor número de copias. Esto se debe a que un ARN degradado puede tener fragmentadas las secuencias nucleotídicas que deben ser reconocidas por los partidores específicos para cada gen, como consecuencia de esto disminuye el número de copias del templado (Fleige et al. 2006).

## 7. CONCLUSIONES

- I. En el transcriptoma de la esponja antártica *Isodictya sp.* se identificaron y caracterizaron seis secuencias de HSP70, de las cuales tres se localizan en la matriz citoplasmática, dos en el retículo endoplásmico y una en la mitocondria.
- II. La esponja antártica *Isodictya sp.* posee una adecuación molecular a condiciones de aumento de temperatura por medio de la expresión de HSP70, lo cual se evidencia con el aumento de la cantidad relativa de los transcritos de ARN de cinco de las secuencias caracterizadas como HSP70 en su transcriptoma.

Futuros trabajos deben considerar la validación de estos resultados tanto a nivel de expresión de genes por medio de RT-qPCR en tiempo real, como estudios a nivel de proteínas y su maquinaria transduccional.

## 8. REFERENCIAS

- Abram, Nerilie J., Robert Mulvaney, Eric W. Wolff, Jack Triest, Sepp Kipfstuhl, Luke D. Trusel, Françoise Vimeux, Louise Fleet, y Carol Arrowsmith. 2013. "Acceleration of snow melt in an Antarctic Peninsula ice core during the twentieth century". *Nature Geoscience* 6(5):404–11.
- Aguilar-camacho, Jose Maria y Grace P. McCormack. 2017. "Climate Change, Ocean Acidification and Sponges".
- Barnes, D. K. A., D. A. Hodgson, P. Convey, C. S. Allen, y A. Clarke. 2006. "Incursion and excursion of Antarctic biota: Past, present and future". *Global Ecology and Biogeography* 15(2):121–42.
- Barnes, David K. A. y Andrew Clarke. 2011. "Antarctic marine biology". *Current Biology* 21(12):R451–57.
- Barnes, David K. A. y Kathleen E. Conlan. 2007. "Disturbance, colonization and development of Antarctic benthic communities". *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 362(1477):11–38.
- Batista, Daniela, Karla Tellini, Adriana H. Nudi, Thaís P. Massone, Arthur de L. Scofield, y Angela de L. R. Wagener. 2013. "Marine sponges as bioindicators of oil and combustion derived PAH in coastal waters". *Marine Environmental Research* 92:234–43.
- Bell, James J. 2008. "The functional roles of marine sponges". *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 79(3):341–53.
- Björkman, J., D. Švec, E. Lott, M. Kubista, y R. Sjöback. 2016. "Differential amplicons (δAmp)-a new molecular method to assess RNA integrity". *Biomolecular Detection and Quantification* 6:4–12.
- Boorstein, William R., Thomas Ziegelhoffer, y Elizabeth A. Craig. 1994. "of Molecular Evolution Molecular Evolution of the HSP70 Multigene Family". 1–17.
- Cárdenas, César A., Marcelo González-Aravena, y Pamela A. Santibañez. 2018. "The importance of local settings: within-year variability in seawater temperature at South Bay, Western Antarctic Peninsula". *PeerJ* 6:e4289.
- Cascella, Kévin, Didier Jollivet, Claire Papot, Nelly Léger, Erwan Corre, Juliette Ravaux, Melody S. Clark, y Jean Yves Toullec. 2015. "Diversification, evolution and sub-functionalization of 70kDa heat-shock proteins in two sister species of antarctic krill: Differences in thermal habitats, responses and implications under climate change". *PLoS ONE* 10(4).



- Chen, Bin, William H. Piel, Liming Gui, Elspeth Bruford, y Antónia Monteiro. 2005. "The HSP90 family of genes in the human genome: Insights into their divergence and evolution". *Genomics* 86(6):627–37.
- Chen, Bing, Martin E. Feder, y Le Kang. 2018. "Evolution of heat-shock protein expression underlying adaptive responses to environmental stress". *Molecular Ecology* 27(15):3040–54.
- Cárdenas, César A., Emma M. Newcombe, Eduardo Hajdu, Marcelo Gonzalez-Aravena, Shane W. Geange, y James J. Bell. 2016. "Sponge richness on algae-dominated rocky reefs in the western Antarctic Peninsula and the Magellan Strait". *Polar Research* 35(2016).
- Clark, Melody S., Keiron P.P. Fraser, Gavin Burns, y Lloyd S. Peck. 2008. "The HSP70 heat shock response in the Antarctic fish *Harpagifer antarcticus*". *Polar Biology* 31(2):171–80.
- Clark, Melody S., Keiron P. P. Fraser, y Lloyd S. Peck. 2008. "Antarctic marine molluscs do have an HSP70 heat shock response". *Cell Stress and Chaperones* 13(1):39–49.
- Clark, Melody S., Keiron P.P. Fraser, y Lloyd S. Peck. 2008. "Lack of an HSP70 heat shock response in two Antarctic marine invertebrates". *Polar Biology* 31(9):1059–65.
- Clark, Melody S. y Lloyd S. Peck. 2009. "HSP70 heat shock proteins and environmental stress in Antarctic marine organisms: A mini-review". *Marine Genomics* 2(1):11–18.
- Clark, Melody S., Michael A. S. Thorne, Jean Yves Toullec, Yan Meng, Le Luo Guan, Lloyd S. Peck, y Stephen Moore. 2011. "Antarctic krill 454 pyrosequencing reveals chaperone and stress transcriptome". *PLoS ONE* 6(1):1–17.
- Clarke, Andrew, David K. A. Barnes, y Dominic A. Hodgson. 2005. "How isolated is Antarctica?" *Trends in Ecology and Evolution* 20(1):1–3.
- Clarke, Andrew, Eugene J. Murphy, Michael P. Meredith, John C. King, Lloyd S. Peck, David K. A. Barnes, y Raymond C. Smith. 2007. "Climate change and the marine ecosystem of the western Antarctic Peninsula". *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 362(1477):149–66.
- Conesa, Ana, Pedro Madrigal, Sonia Tarazona, David Gomez-Cabrero, Alejandra Cervera, Andrew McPherson, Michal Wojciech Szcześniak, Daniel J. Gaffney, Laura L. Elo, Xuegong Zhang, y Ali Mortazavi. 2016. "A survey of best practices for RNA-seq data analysis". *Genome Biology* 17(1):1–19.

- Convey, Peter, Steven L. Chown, Andrew Clarke, David K. A. Barnes, Stef Bokhorst, Vonda Cummings, Hugh W. Ducklow, Francesco Frati, T. G. Alla. Green, Shulamit Gordon, Huw J. Griffiths, Clive Howard-Williams, Ad H. L. Huiskes, Johanna Laybourn-Parry, W. Berry Lyons, Andrew McMinn, Simon A. Morley, Lloyd S. Peck, Antonio Quesada, Sharon A. Robinson, Stefano Schiaparelli, y Diana H. Wall. 2014. "The spatial structure of antarctic biodiversity". *Ecological Monographs* 84(2):203–44.
- Daugaard, Mads, Mikkel Rohde, y Marja Jäätelä. 2007. "The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions". *FEBS Letters* 581(19):3702–10.
- Dayton, Paul K., Gordon A. Robilliard, Robert T. Paine, y Linnea B. Dayton. 1974. "Biological Accommodation in the Benthic Community at McMurdo Sound , Antarctica". *Ecological Society of America Stable* 44(Ecol. Monogr.):105–28.
- Demand, J., J. Lüders, y J. Höhfeld. 1998. "The carboxy-terminal domain of Hsc70 provides binding sites for a distinct set of chaperone cofactors." *Molecular and cellular biology* 18(4):2023–28.
- Diaz, Maria C. y Klaus Rützler. 2001. "Sponges: An essential component of Caribbean coral reefs". *Bulletin of Marine Science* 69(2):535–46.
- Efremova, Sofia M., Boris A. Margulis, Irina V. Guzhova, Valeria B. Itskovich, Stephanie Lauenroth, Werner E. G. Müller, y Heinz C. Schröder. 2002. "Heat shock protein Hsp70 expression and DNA damage in Baikalian sponges exposed to model pollutants and wastewater from Baikalsk Pulp and Paper Plant". *Aquatic Toxicology* 57(4):267–80.
- Eklom, R. y J. Galindo. 2011. "Applications of next generation sequencing in molecular ecology of non-model organisms". *Heredity* 107(1):1–15.
- Feder, M. E. y G. E. Hofmann. 1999. "Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology". *Annu.Rev.Physiol.* 61:243-82.:243–82.
- Felsenstein Joseph. 1985. "Confidence Limits on Phylogenies: an Approach Using the Bootstrap; Confidence Limits on Phylogenies: an Approach Using the Bootstrap". *Evolution* 39(4):783–91.
- Fernandez-Valverde, Selene L., Andrew D. Calcino, y Bernard M. Degnan. 2015. "Deep developmental transcriptome sequencing uncovers numerous new genes and enhances gene annotation in the sponge *Amphimedon queenslandica*". *BMC Genomics* 16(1):1–11.
- Fleige, Simone y Michael W. Pfaffl. 2006. "RNA integrity and the effect on the

- real-time qRT-PCR performance". *Molecular Aspects of Medicine* 27(2–3):126–39.
- Fleige, Simone, Vanessa Walf, Silvia Huch, Christian Prgomet, Julia Sehm, y Michael W. Pfaffl. 2006. "Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR". *Biotechnology Letters* 28(19):1601–13.
- Fonseca, Rute R., Anders Albrechtsen, Gonçalo Espregueira Themudo, Jazmín Ramos-Madrigal, Jonas Andreas Sibbesen, Lasse Maretty, M. Lisandra Zepeda-Mendoza, Paula F. Campos, Rasmus Heller, y Ricardo J. Pereira. 2016. "Next-generation biology: Sequencing and data analysis approaches for non-model organisms". *Marine Genomics* 30:3–13.
- Fraser, K. P. P., A. Clarke, y L. S. Peck. 2002. "Low-temperature protein metabolism: Seasonal changes in protein synthesis and RNA dynamics in the Antarctic limpet *Nacella concinna* Strebel 1908". *Journal of Experimental Biology* 205(19):3077–86.
- Fraser, K. P. P., Andrew Clarke, y Lloyd S. Peck. 2002. "Feast and famine in Antarctica: Seasonal physiology in the limpet *Nacella concinna*". *Marine Ecology Progress Series* 242:169–77.
- Fuertes, Miguel Angel, José Manuel Pérez, Manuel Soto, Margarita Menéndez, y Carlos Alonso. 2004. "Thermodynamic stability of the C-terminal domain of the human inducible heat shock protein 70". *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1699(1–2):45–56.
- Gething, Mary-Jane y Joseph Sambrook. 1992. "Protein folding in the cell". *Nature* 355:710–13.
- González, Karina, Juan Gaitán-Espitia, Alejandro Font, César A. Cárdenas, y Marcelo González-Aravena. 2016. "Expression pattern of heat shock proteins during acute thermal stress in the Antarctic sea urchin, *Sterechinus neumayeri*". *Revista Chilena de Historia Natural* 89:1–9.
- Grabherr, Manfred G., Brian J. Haas, Moran Yassour, Joshua Z. Levin, Dawn A. Thompson, Ido Amit, Xian Adiconis, Lin Fan, Raktima Raychowdhury, Qiandong Zeng, Zehua Chen, Evan Mauceli, Nir Hacohen, Andreas Gnirke, Nicholas Rhind, Federica di Palma, Bruce W. Birren, Chad Nusbaum, Kerstin Lindblad-Toh, Nir Friedman, y Aviv Regev. 2011. "Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome." *Nature biotechnology* 29(7):644–52.
- Graziano, Giuseppe. 2014. "On the mechanism of cold denaturation". *Physical Chemistry Chemical Physics* 16(39):21755–67.

- Gupta, Radhey S. y B. Singh. 1994. "Phylogenetic analysis of 70 kD heat shock protein sequences suggest a chimeric origin for the eukaryotic cell nucleus". *Current Biology* 4(12):1104–14.
- Guzman, Christine y Cecilia Conaco. 2016a. "Comparative transcriptome analysis reveals insights into the streamlined genomes of haplosclerid demosponges". *Scientific Reports* 6(January):1–10.
- Guzman, Christine y Cecilia Conaco. 2016b. "Gene expression dynamics accompanying the sponge thermal stress response". *PLoS ONE* 11(10):1–15.
- Hillyard, Guy y Melody S. Clark. 2012. "RNA preservation of Antarctic marine invertebrates". *Polar Biology* 35(4):633–36.
- Hofmann, G. E., B. a Buckley, S. Airaksinen, J. E. Keen, y G. N. Somero. 2000. "Heat-shock protein expression is absent in the antarctic fish *Trematomus bernacchii* (family Nototheniidae)." *The Journal of experimental biology* 203(Pt 15):2331–39.
- Hofmann, Gretchen E., Susan G. Lund, Sean P. Place, y Allison C. Whitmer. 2005. "Some like it hot, some like it cold: The heat shock response is found in New Zealand but not Antarctic notothenioid fishes". *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 316(1):79–89.
- Imbeaud, Sandrine, Esther Graudens, Virginie Boulanger, Xavier Barlet, Patrick Zaborski, Eric Eveno, Odilo Mueller, Andreas Schroeder, y Charles Auffray. 2005. "Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces". *Nucleic Acids Research* 33(6):1–12.
- IPCC. 2007. "Climate Change 2007 : Synthesis report: An Assessment of the Intergovernmental Panel on Climate Change". 446(November):12–17.
- IPCC. 2014. "*Climate Change 2014: Synthesis Report*. Contribution of working Groups I, II, III to the fifth assesment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change". *Climate Change 2014* (151 pp).
- Itskovich, V. B., A. M. Shigarova, O. Y. Glyzina, O. V. Kaluzhnaya, y G. B. Borovskii. 2018. "Heat shock protein 70 (Hsp70) response to elevated temperatures in the endemic Baikal sponge *Lubomirskia baicalensis*". *Ecological Indicators* 88(May 2017):1–7.
- Janussen, Dorte y Rachel Downey. 2014. Chapter 5.5 Porifera. In: De Broyer C., Koubbi P., Griffiths H. J., Raymond B., Udekem d'Acoz C., d', et al. (eds.). *Biogeographic atlas of the Southern Ocean*. Scientific Committee on

- Antarctic Research, Cambridge, pp. 94-102.
- Jones, David T., William R. Taylor, y Janet M. Thornton. 1992. "The rapid generation of mutation data matrices". *Bioinformatics* 8(3):275–82.
- Kampinga, Harm H. y Elizabeth A. Craig. 2010. "The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity". *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11(8):579–92.
- Kaul, Sunil, Custer Deocaris, Sunil Kaul, y Renu Wadhwa. 2006. "On the brotherhood of mitochondrial chaperones, mortalin/mtHsp70 and Hsp60". *Cell Stress & Chaperones* 11(2006):116–28.
- Kiang, Juliann G. y George C. Tsokos. 1998. "Heat Shock Protein 70 kDa: Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology". 80(2):183–201.
- King, J. C., J. Turner, G. J. Marshall, W. M. Connolley, y T. a. Lachlan-Cope. 2003. "Antarctic Peninsula climate variability and its causes as revealed by analysis of instrumental records". *Antarctic Peninsula Climate Variability: Historical and Paleoenvironmental Perspectives* 79:17–30.
- Kircher, Martin, Patricia Heyn, y Janet Kelso. 2011. "Addressing challenges in the production and analysis of illumina sequencing data". *BMC Genomics* 12.
- Kityk, Roman, Jürgen Kopp, y Matthias P. Mayer. 2018. "Molecular Mechanism of J-Domain-Triggered ATP Hydrolysis by Hsp70 Chaperones". *Molecular Cell* 69(2):227-237.e4.
- Koziol, Claudia, Renato Batel, Emel Arinc, Heinz C. Schröder, y Werner E. G. Müller. 1997. "Expression of the potential biomarker heat shock protein 70 and its regulator, the metazoan DnaJ homolog, by temperature stress in the sponge *Geodia cydonium*". *Marine Ecology Progress Series* 154(Nrc 1989):261–68.
- Krasco, Anatoli, Ute Scheffer, Claudia Koziol, Zeev Pancer, Renato Batel, Farid Badria, y Werner E. G. Müller. 1997. "Diagnosis of sublethal stress in the marine sponge *Geodia cydonium*: application of the 70 kDa heat-shock protein and a novel biomarker, the Rab GDP dissociation inhibitor, as probes". *Science* 37:157–68.
- Krause, Mauricio, Patricia Martins Bock, Hilton Kenji Takahashi, Paulo Ivo Homem De Bittencourt, y Philip Newsholme. 2015. "The regulatory roles of NADPH oxidase, intra- and extra-cellular HSP70 in pancreatic islet function, dysfunction and diabetes". *Clinical Science* 128(11):789–803.
- Kumar, Sudhir, Glen Stecher, y Koichiro Tamura. 2016. "MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets." *Molecular*

*biology and evolution* 33(7):1870–74.

- Laursen, Jeffrey R., Hong Di Liu, Xiao Jun Wu, y Timothy P. Yoshino. 1997. “Heat-Shock Response in a Molluscan Cell Line: Characterization of the Response and Cloning of an Inducible HSP70 cDNA”. *Journal of Invertebrate Pathology* 70(3):226–33.
- Lawver, Lawrence A. y Lisa M. Gahagan. 2003. “Evolution of cenozoic seaways in the circum-antarctic region”. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 198(1–2):11–37.
- Leiva, Carlos, Sergi Taboada, Nathan J. Kenny, David Combosch, Gonzalo Giribet, Thibaut Jombart, y Ana Riesgo. 2019. “Population substructure and signals of divergent adaptive selection despite admixture in the sponge *Dendrilla antarctica* from shallow waters surrounding the Antarctic Peninsula”. *Molecular Ecology* (January):mec.15135.
- Levitus, S., J. Antonov, T. Boyer, y C. Stephens. 2000. “Warming of the World Ocean”. *Science* 287(5461):2225–29.
- Lindquist, S. y E. A. Craig. 1988. “The heat -shock proteins”. *Annual Review of Genetics* 22:631–77.
- López-Legentil, Susanna, Bongkeun Song, Steven E. McMurray, y Joseph R. Pawlik. 2008. “Bleaching and stress in coral reef ecosystems: hsp70 expression by the giant barrel sponge *Xestospongia muta*”. *Molecular Ecology* 17(7):1840–49.
- Luan, Wei, Fuhua Li, Jiquan Zhang, Rong Wen, Yutao Li, y Jianhai Xiang. 2010. “Identification of a novel inducible cytosolic Hsp70 gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* and comparison of its expression with the cognate Hsc70 under different stresses”. *Cell Stress and Chaperones* 15(1):83–93.
- Mahaut, Marie Laure, Olivier Basuyaux, Estelle Baudinière, Claire Chataignier, Julien Pain, y Christelle Caplat. 2013. “The porifera *Hymeniacidon perlevis* (Montagu, 1818) as a bioindicator for water quality monitoring”. *Environmental Science and Pollution Research* 20(5):2984–92.
- Mayer, Matthias P. 2013. “Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism”. *Trends in Biochemical Sciences* 38(10):507–14.
- McClintock, J., H. Ducklow, y W. Fraser. 2008. “Ecological Responses to Climate Change on the Antarctic Peninsula: Warming threatens a rich but delicate biological community”. *American Scientist* 96(4):302.
- Meimaridou, Eirini, Sakina B. Gooljar, y J. Paul Chapple. 2009. “From hatching to

- dispatching: The multiple cellular roles of the Hsp70 molecular chaperone machinery". *Journal of Molecular Endocrinology* 42(1):1–9.
- Meredith, Michael P. y John C. King. 2005. "Rapid climate change in the ocean west of the Antarctic Peninsula during the second half of the 20th century". *Geophysical Research Letters* 32(19):1–5.
- Mizzen, L. A., C. Chang, J. I. Garrels, y W. J. Welch. 1989. "Identification, characterization, and purification of two mammalian stress proteins present in mitochondria, grp 75, a member of the hsp 70 family and hsp 58, a homolog of the bacterial groEL protein". *Journal of Biological Chemistry* 264(34):20664–75.
- Morimoto, R. I. 1998. "Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators". *Genes & Development* 12(24):3788–96.
- Munro, Sean y Hugh R. B. Pelham. 1987. "A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins". *Cell* 48(5):899–907.
- Pantile, Raffaella y Nicole Webster. 2011. "Strict thermal threshold identified by quantitative PCR in the sponge *Rhopaloeides odorabile*". *Marine Ecology Progress Series* 431(Bell 2008):97–105.
- Peck, Lloyd S. 2002. "Ecophysiology of Antarctic marine ectotherms: Limits to life". *Polar Biology* 25(1):31–40.
- Peck, Lloyd S. 2016. "A Cold Limit to Adaptation in the Sea". *Trends in Ecology and Evolution* 31(1):13–26.
- Peñuelas, J. y I. Filella. 2001. "Phenology: Responses to a warming world". *Science* 294(5543):793–95.
- Pérez-Portela, Rocío y Ana Riesgo. 2013. "Optimizing preservation protocols to extract high-quality RNA from different tissues of echinoderms for next-generation sequencing". *Molecular Ecology Resources* 13(5):884–89.
- Piano, Annamaria, Silvia Franzellitti, Fausto Tinti, y Elena Fabbri. 2005. "Sequencing and expression pattern of inducible heat shock gene products in the European flat oyster, *Ostrea edulis*". *Gene* 361(1–2):119–26.
- Place, Sean P y Gretchen E. Hofmann. 2005. "Comparison of Hsc70 orthologs from polar and temperate notothenioid fishes: differences in prevention of aggregation and refolding of denatured proteins." *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 288(5):R1195-202.

- Place, Sean P. y Gretchen E. Hofmann. 2005. "Constitutive expression of a stress-inducible heat shock protein gene, hsp70, in phylogenetically distant Antarctic fish". *Polar Biology* 28(4):261–67.
- Place, Sean P., Mackenzie L. Zippay, y Gretchen E. Hofmann. 2004. "Constitutive roles for inducible genes: evidence for the alteration in expression of the inducible *hsp70* gene in Antarctic notothenioid fishes". *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 287(2):R429–36.
- Reguero, Marcelo, Francisco Goin, Carolina Acosta Hospitaleche, Tania Dutra, y Sergio Marensi. 2013. *Late Cretaceous/Paleogene West Antarctica Terrestrial Biota and its Intercontinental Affinities*.
- Riesgo, Ana, Nathan Farrar, Pamela J. Windsor, Gonzalo Giribet, y Sally P. Leys. 2014. "The analysis of eight transcriptomes from all poriferan classes reveals surprising genetic complexity in sponges". *Molecular Biology and Evolution* 31(5):1102–20.
- Riesgo, Ana, Alicia R. Pérez-Porro, Susana Carmona, Sally P. Leys, y Gonzalo Giribet. 2012. "Optimization of preservation and storage time of sponge tissues to obtain quality mRNA for next-generation sequencing". *Molecular Ecology Resources* 12(2):312–22.
- Saraste, Matti, Peter R. Sibbald, y Alfred Wittinghofer. 1990. "The P-loop a common motif in ATP- and GTP- binding proteins". *Elsevier Science Publishers* 11(Trends Biochem):430–34.
- Schroeder, Andreas, Odilo Mueller, Susanne Stocker, Ruediger Salowsky, Michael Leiber, Marcus Gassmann, Samar Lightfoot, Wolfram Menzel, Martin Granzow, y Thomas Ragg. 2006. "The RIN: An RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements". *BMC Molecular Biology* 7:1–14.
- Shim, Jae Kyoung, Duck Oung Jung, Jae Woo Park, Dong Woo Kim, Dae Myung Ha, y Kyeong Yeoll Lee. 2006. "Molecular cloning of the heat-shock cognate 70 (Hsc70) gene from the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*, and its expression in response to heat shock and starvation". *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology* 145(3–4):288–95.
- Shimpi, Gaurav G., Sergio Vargas, y Gert Wörheide. 2016. "Evaluation and validation of reference genes for qPCR analysis to study climate change-induced stresses in *Sinularia cf. cruciata* (Octocorallia: Alcyonidae)". *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 483:42–52.



- Simister, Rachel L., Susanne Schmitt, y Michael W. Taylor. 2011. "Evaluating methods for the preservation and extraction of DNA and RNA for analysis of microbial communities in marine sponges". *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 397(1):38–43.
- Skrypina, Natalia A., Angelica V. Timofeeva, George L. Khaspekov, Larissa P. Savochkina, y Robert Sh Beabealashvili. 2003. "Total RNA suitable for molecular biology analysis". *Journal of Biotechnology* 105(1–2):1–9.
- Van Soest, Rob W. M., Nicole Boury-Esnault, Jean Vacelet, Martin Dohrmann, Dirk Erpenbeck, Nicole J. de Voogd, Nadiezhda Santodomingo, Bart Vanhoorne, Michelle Kelly, y John N. A. Hooper. 2012. "Global diversity of sponges (Porifera)". *PLoS ONE* 7(4).
- Somero, George N. 2004. "Adaptation of enzymes to temperature: Searching for basic 'strategies'". *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology* 139(3 SPEC.ISS.):321–33.
- Sonoda, Shoji, Katsue Fukumoto, Yohei Izumi, Hideya Yoshida, y Hisaaki Tsumuki. 2006. "Cloning of Heat Shock Protein Genes (hsp90 and hsc70) and Their Expression During Larval Diapause and Cold Tolerance Acquisition in the Rice Stem Borer, *Chilo suppressalis* Walker". *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 63:36–47.
- Srivastava, Mansi, Oleg Simakov, Jarrod Chapman, Bryony Fahey, Marie E. A. Gauthier, Therese Mitros, Gemma S. Richards, Cecilia Conaco, Michael Dacre, Uffe Hellsten, Claire Larroux, Nicholas H. Putnam, Mario Stanke, Maja Adamska, Aaron Darling, Sandie M. Degnan, Todd H. Oakley, David C. Plachetzki, Yufeng Zhai, Marcin Adamski, Andrew Calcino, Scott F. Cummins, David M. Goodstein, Christina Harris, Daniel J. Jackson, Sally P. Leys, Shengqiang Shu, Ben J. Woodcroft, Michel Vervoort, Kenneth S. Kosik, Gerard Manning, Bernard M. Degnan, y Daniel S. Rokhsar. 2010. "The *Amphimedon queenslandica* genome and the evolution of animal complexity". *Nature* 466(7307):720–26.
- Tang, Ting, Anmin Yu, Ping Li, Hong Yang, Gaojing Liu, y Li Liu. 2016. "Sequence analysis of the Hsp70 family in moss and evaluation of their functions in abiotic stress responses". *Scientific Reports* 6(August):1–14.
- Thomas, Torsten, Lucas Moitinho-Silva, Miguel Lurgi, Johannes R. Björk, Cole Easson, Carmen Astudillo-García, Julie B. Olson, Patrick M. Erwin, Susanna López-Legentil, Heidi Luter, Andia Chaves-Fonnegra, Rodrigo Costa, Peter J. Schupp, Laura Steindler, Dirk Erpenbeck, Jack Gilbert, Rob Knight, Gail Ackermann, Jose Victor Lopez, Michael W. Taylor, Robert W. Thacker, Jose M. Montoya, Ute Hentschel, y Nicole S. Webster. 2016. "Diversity, structure

- and convergent evolution of the global sponge microbiome”. *Nature Communications* 7(May).
- Torchia, Joseph, David W. Rose, Juan Inostroza, Yasutomi Kamei, Stefan Westin, Christopher K. Glass, y Michael G. Rosenfeld. 1997. “The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear- receptor function”. *Nature* 387(6634):677–84.
- Toullec, Jean Yves, Erwan Corre, Benoît Bernay, Michael A. S. Thorne, Kévin Cascella, Céline Ollivaux, Joël Henry, y Melody S. Clark. 2013. “Transcriptome and Peptidome Characterisation of the Main Neuropeptides and Peptidic Hormones of a Euphausiid: The Ice Krill, Euphausia crystallorophias”. *PLoS ONE* 8(8).
- Tsai, Chung Jung, Jacob V. Maizel, y Ruth Nussinov. 2002. “The hydrophobic effect: A new insight from cold denaturation and a two-state water structure”. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 37(2):55–69.
- Tungjitwitayakul, Jatuporn, Nujira Tatun, Tippawan Singtripop, y Sho Sakurai. 2008. “Characteristic Expression of Three Heat Shock-Responsive Genes During Larval Diapause in the Bamboo Borer *Omphisa fuscidentalis*”. *Zoological Science* 25(3):321–33.
- Turner, John, Steve R. Colwell, Gareth J. Marshall, Tom A. Lachlan-Cope, Andrew M. Carleton, Phil D. Jones, Victor Lagun, Phil A. Reid, y Svetlana lagovkina. 2005. “Antarctic climate change during the last 50 years”. *International Journal of Climatology* 25(3):279–94.
- Wagner, C., R. Steffen, C. Koziol, R. Batel, M. Lacorn, H. Steinhart, T. Simat, y W. E. G. Müller. 1998. “Apoptosis in marine sponges: A biomarker for environmental stress (cadmium and bacteria)”. *Marine Biology* 131(3):411–21.
- Walker, Sarah E. y Jon Lorsch. 2013. *RNA purification - Precipitation methods*. Vol. 530. 1ª ed. Elsevier Inc.
- Wiens, Matthias, Claudia Koziol, Hamdy M. A. Hassanein, Renato Batel, Heinz C. Schröder, y Werner E. G. Müller. 1998. “Induction of gene expression of the chaperones 14-3-3 and HSP70 by PCB 118 (2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl) in the marine sponge *Geodia cydonium*: Novel biomarkers for polychlorinated biphenyls”. *Marine Ecology Progress Series* 165:247–57.
- Wulff, Janie L. 2001. “Assessing and monitoring coral reef sponges: why and how?” *Bulletin of Marine Science* 69(2):831–46.

## 9. ANEXOS

```

aaaaagtaaatgggatgatcctattggctgctgtaagttccaaaccgaaactcttagata
attcgacctggtgataaacgctttataaaactgtaaacagtaacagtaacattctctcat
actcttactcagcagctctgtagcagaaaaataaagtgctaaagctccagcaatt
                                N A K A P A I
ggtatagatctcggaaccactactcctgtgctgctctccagcagggaaagtagag
G I D L G T T Y S C V G V F O H G K V E
attattgcaaatgaccagggaaacagaaacactcaggttaacgctcctcactgacagc
I A N D O G N R I T P S Y V A F T D S
gagcgtttgattggagactctggaagaacagtggeactgaaccagcaataaccgga
E R L I G D S A K N Q V A M N P T N T V
ttcgatgcaaaagctttgattggccgcaaaacgaacgctcactgtggttagcgcaaaa
F D A K R L I G R K K T N D A T V V S D K
aagcactggcccttggatgctgagcagggaggtgcccataagtgaggctgagatc
K H W P P F D V I D E G G R F K V E V E Y
aaagagagaaaaagctttctccagagaaactctcttctggttctggtgaagatg
K G E K K S F F P E E I S S M V L V K M
aaggagactgctgagctcactctgtaaacccgttacagatgagtgctgctgctcct
K E T A E S Y L E K F V T D A V V T V P
gcttactcaacgattccacagcgtcaggctaccaagaatgctgtacaatctccggtctg
A Y F N D S Q R O A T K D A G T I S G L
aatgtctctgatacatcaacagccactgagctgctgcttctggtctgagataag
N V L R I T N E P T A A A I A Y S L D K
aagttgagctgagcgttaagtactcattttgatctgggtggggcacatttgatgtt
K V G V E R N V L I F D L G G G T F D V
tccatttaaccatcagaagatggaattttcgagtgaaatctacatcaggtgacactcat
I I L T I E D S I F E V K S T S G D T H
ttgggggagaggactttgataacagaatggtcaactctcattcaagaggttcaaaaga
L G G E D F D N R M V N F F I Q E F K R
aaattcaagaagatagagcaacaagaagactctgtgagcgtctccgactgctgctg
K F K K D M S N N K R S V L R T A C
gagagagctagagaaactgtctctatccagaaacaaactgaaacagatctctctc
E R A K R T L S S I T E A N I E I D S L
ttggaggtgtgactttacagaagatcactcgtgctgctttgaggaatgaatgga
F E G V D F Y T K I T R A R F E E M N G
gatctctcagaggtcactcgaaccagtgagagagcactcagagatgcaagttgac
D L F R G T L E P V E K A L R D A K F D
aaatcacagattcacgatatcgttctggtaggagatccactcgtatttccataaatccaa
K S Q I H D I V L V G G S T R I P K I Q
aagcttctcagagacttctcaacgggaaggaactaaacaaatccatcaatctcagcag
K L L Q D D F N S K E L N E S I N P D E
gctgtgcttggggcagctgtccaagcagcattttgaacggagcaagagtagaaga
A V A Y G A A V Q A A I L N G D K S E E
gtccaagatctctctcctctgctgtagcaccacttccctggtatcagagcggctggt
V Q L D L L L D V T F L S L S I E T A S
ggtgtgagactctctgatcaagaaacttaccattccaagaaggagactcagacc
G V M T S L I K R N S T I P K K E T Q T
ttcaccactattctgacaaccaaccaggtgctgctgacaaatgtaacagaggtgaact
F T T Y S D N Q P G V L I Q V Y E G E R
gcaatgacaaagatacaaatattagggaggtttgaggtgacatctctccagca
A M T K D N N L L G K F E L T A I P P A
cctgaggtgacccaataagaagctcatttgcgatcagatgcaatggcactcctaat
P R G V P Q I E V T F D I D R N G I L N
gtctctgctgagcaaaagcactggcaagagataagatcaccatcactaatgacaag
V S A A D K S T S K E N K I T I T N D K
ggtcgtctcagtgagagcattgacagatggtgaaatgaaagcaaaatacaaaagca
G R L S A E D I E R M V N E A E K Y K A
gaggagcaaaacagaaagaaatggagcaagatgcaactgagaggtatgcttc
E D D K Q R E K I A A K N A L E S Y A F
tctatgagagcactatgagagcagataaagtgaaagcaaaatctcgaagaagacaga
S M K S T M E D D K V K D K V P E E D R
gagaaggtcgtcagtaaatgcaagagctcagctggtgagcaaaaaacaaacagct
E K V V S K C K E V I G W L D K N Q T A
gagaagagcaggtttgaaacaaacaaagaaactggaagaatctgtacaccatcatt
E K D E F E Y Q Q K E L E K I C T P I I
cagaattgtatggtctgagagtgatgctggtggtatgcccaggtggtatgcccgt
Q K L Y G S G G M F G G M P G G M F G
ggtatcctggtgagtgcccggggaagtcacatgcttattcgaagctttggaggt
G M P G G M P G G M P T D S T P S S G G
ggaccaccatagaggaagtagactaaatattcattgacttatttatttgggttgg
G P T I E E V D -
cattattataatgatttattcttagaccactaaaaaaattatttta

```

**ANEXO 1 Nucleótidos y secuencia deducida de aminoácidos de la secuencia citoplasmática *Isodictya\_545*.** El codón de inicio ATG y el codón de término TAA están en naranja. Las firmas de la familia de HSP70 están en azul. El sitio de unión ATP/GTP señalado con rosado mientras que la señal de localización citoplasmática está en rojo. En fucsia los sitios de glicosilación y en morado la región de unión del dominio NBD y SBD. El tetrapéptido GGMP se encuentra coloreado con verde.





```

ctctgctaaaaaggaagaatatttttactccaacctaaacaacaattacaccatggttg
ttccggaattagctcttgccctcagttgccattttgggcgcctgcgcgcccaatgccctc
FRKLLAALASVAI L G A C A P N A V
ttcgccgaaggaggagaagatgggaaccgctcattggtatcgatcttgaaccacctac
FAEEEEKMGTVIG I D L G T T Y
tcgtgctcgggtattcaaaaacggcgggtgaaattatggcaacgacagggtaac
S C V G V F E N S R V E I M A N D Q S N
cgtattactccctcttaagttgctctcatggacaacggcgatcgcttctgcggagatgcc
R I T P S Y V A F M D N G D R L V G D A
gctaagaatcaggccaccatcaacctgagaacaccgctctcgacgtgaagcgtctttatc
A K N Q A T I N P E N T V F D V K R L I
ggccgtaactctcggacaagagtccaagctgataaagaagctcgtcccttacgaaatc
G R N F S D K S V Q A D K K L V F Y E I
gtgtcggaccagaacacccatgctcggctcactcgttggaggaagaagcgaatctc
V S D Q N K P M V E Y T V G S K F S K F
gctcccgagggtctccgccatgatttgcagaagatgaagccaccgagatcttc
A P E E V S A M I L Q K M K A T A E I F
cttggaaagatcccaacgctgtcaccgctccctactccaacgacgccag
L G K D I H N A V V T V P A Y F N D A Q
cgtcaggtaccagagatccggaasaattcgggactcaaggtcgatcgatcatcaat
R Q A T K D A G K I S G L K V D R I E N
gagcctaccgctgcccatcgctcactggaagaacccggagagaatccaatgctc
E P T A A A I A Y G M D K T G G E S N V
ctcgtctcgatcttggagtggaacctcgatgcaccctcttaccatcgataacgggt
L V F D L G G G T F D V T L L T I D N G
gtgttcgaggtccttcccacaacggagataccctcttggaggagaagattcgatcag
V F E V L A T N G D T H L G G E D F D Q
cgtgtcagcagctctcctcgtatcgatgaagaagaagcaaccgcatcagcaggt
R V M Q V E T G I S G L K V D R I E N
gataagcgtcgctccagaagcttgaaggaggtgagcgtgcaagcgcgcctcttcg
D K R A L Q K L R K E V E R V K R A L S
tcgcagcagcagcctcttgagatgagaccctcgcgaggatcgattctctgaa
S Q Q Q A R L E I E D L A E G F D F S E
actctaccgctcgtctcggagggtgaacaatgatctttcaagaagactcttggaa
T L T K A R F E E L N N D L F K R T L G
ccctctcagcgtgagtgaggtctctcgttctggaagtcggaggtggaatggtt
P V S R V M E D S D V S K S E V D E L V
cttgtggaggtcactcgatctcctaaggttcaggcactcatttccgaatacttggc
L V G G S T R I P K V Q A L I S E Y F G
ggaaaggcctcgaaggaatcaaccgctgagcgtcgtcgcctacggtgctgcccgtg
G K E P S K G I N P D E A V A Y G A A V
cagggaggtattcttcggagggaggtgagccaccaggaattctctctctgat
Q S D I S D A T S E I L L L D
gtgaccgcttcccaggaattgagactgttggaggaggtatgaccaagctcacaac
V T P L S Q G I E T V G G V M T K L I N
agaggtaccaccatcccaacaagaatcgcaaacatttcccaccaccaggaaccaaa
R G T T I P T K K S Q T F S T H Q D N Q
cccgcgctctcaccaggtatttggaggagcgcataatgactaaggacaaccacatt
P A V L I Q V F E G E R S M T K D N H I
cttggaaagttcagcttactggaatccccccggaccccgaggtcccccaatgag
L G K F E L T G I M P A P R G V P Q I E
gtttcgttcgaggtcgatcccaacggtattctcgaatctcgtcggagcaagggaaacc
V S F E V D A N G I L Q V S A E D K G T
ggaaaggctgagaagatcaccatcactcgcgagaagggcgtcttctgaggaggacatt
G K A E K I T I T A E K G R L S E E D I
gagcgcaggtcagagagcggaggaattcgcgcgagggagcaagaaggtcaagagaga
E R M V R E A E E F A E E D K K V K E R
atcgatgcacaacggcctcgagcttacccttcaacttgaagaacacccttgatgat
I D A R N G L E S Y L Y N L K N T L D D
gacgagaagcggataaacatctcagctgaggacaagaaggagctccaagacatgattgac
D E K A D N I S A E D K K E L Q D M I D
gagacccttgactggatggaggagaaccgggaagcggagaaggagattacgatggaag
E T L D W M E E N P E A E K E D Y D G K
caaaagggtcagaaacattgccaaccatcagcgtatcttctcgcgtcggagaa
Q K E V E N I A N P I M R S F Y A G S E
ggtggcggagcagagataggggactcggagatgatgctgaaacttttactttt
G G G D E D M G D F G D D E L -
ataacttttttagaagaacggcctg

```

**ANEXO 4 Nucleótidos y secuencia deducida de aminoácidos de la secuencia del retículo endoplasmático Isodictya\_300.** El codón de inicio ATG y el codón de término TAA en naranja. Las firmas de la familia de HSP70 marcadas en azul. El sitio de unión ATP/GTP señalado con rosado mientras que la señal de retención en el retículo endoplasmático se encuentra en rojo. En morado la región de unión del dominio NBD y SBD. La señal consenso no organelar en verde.

```

gaccaatgaagctttccaccattcaggtgggtgtggtctgtggtgacatggaccaatga
gattgctccaccatccccggaatagaagtgagctggcagttgtatataaaaaata
actggaagaaccattcattatattgagaagaggaacattaagcaggaatagaga
ATGgagaatataatattttagctctctctctactgagcgctcctcctgggtgagaa
R R H I L L S S L L S S Y L V G A E
gaaggggaaagaggtgtgaaacagttattggcattgacttaggactactctct
E G E K E D V G T V I G I D L G T T Y S
tgtgtgtatctatgaaatggaactgtggtgatcatcgcaacgccaaggaacaga
C V S I Y E N R V D I I A N D Q G N R
attacccatctatgtgctctctctctgagagagcgctctgtaggagatgctct
I T P S Y V A F T L E G E R L I G D A A
aagaaccagctcaccagtaaccagagaactgctcttgatgcaagctatgatagg
K N Q L T S N P E N T V F D V K R M I G
agagctgggagcaccctgcaatcaaaagacatcaaatctctccattctgctct
S T W D D P A I Q K D I K F F P F T V L
cagaagaaccagaaccgcatgtgaaagtgattggcaattcaagaagctcttact
Q K N Q K P H V E V S I G N S K K L F T
ccggaagattagtgagatattgctgaagatgaagagacagagagcttacttg
P E E I S A M I L L K M K E T A E A Y L
ggtcacaatgctactgctgtgttactgctctctctcttattcaacgatgctcagcg
G H N V T H A V V T V P A Y F N D A Q R
caggtaccagagatgctgttacaattgacagccttaagtcatgagatcatcaatgaa
D A E K D A G T I A G L N V M R I T N E
ccaacgctgcagctattgcttattgcatggacaaaaagcggagaaaaaattctt
P T A A A I A Y G M D K K D G E K N I L
gtttttgactctgggtgtacatttgatgtctctctcactatagacaggtgtg
F D L G G G T F D V S L L T I D S G V
tttgaagtgtagactactaaagagacactctggaggggagagctttgatacagct
F E V V A T N G D T H L G G S E D F D Q R
gtaatggaacccttataagcttacaagaagaagactgggaagatacgcgaagac
V M E H F I K L Y K K K T G K D I R K D
aacctgctgttcagagctaaagctgaagtggaaggaagcaagagaggggtgagttcc
N R A V Q K L R R E V E K A K E G L S S
cagcatcaggcagctatagagatagaactctctctcagtggaagactttctgaaact
Q H Q A R I E I E S F F D G E D F S E T
ttgacaagcagcttttgaagaacttaacagggatctctctcctctacattaaaacca
L T R A E F E L N Q D L F R S T L K P
gttcaacaggtttggtagactctgtttgaaaaagaatgaatgacgaatgtgtta
V Q Q V L D D S D L K K N E I D E I V L
gtgggtgggtccactcgcattccaaagtacaacagctggggaagaaatgtcaatgt
V S G F K V Q D L K E M F N G
aaagaaccaaacaggtatcaacctgtagagctgtggcctatggtgcagcctccag
K E P N R G I N P D E A V A Y G A A V Q
gcagcactctgagtgtaagaagacactcatgactcctcctgttgatgtaaccca
A G T L S G K E D T H G L L L L D V N F
ctccactgggtagagactgtggaggtgctcagcaaaagctcctcctcgtgaaact
L T M G I E T V G G V M T K L I P R N T
gtcactactaagaatccccagatattcctcactgctcagacaaccagcccactgtc
V I P T K K S Q I F S T A S D N Q P T V
accatccaggtttgaaagggagagacagatgaccaaaagcaaccattctcggggaag
T I Q V F E G E R P M T K D N H L L G K
ttgacctgaatggatccctcctgctcccaggggtgactcctcaagtggaagtcacattc
F D L N G I P P A P R G V P Q V E V T F
cagattgtagaagtggaactcctgactgactgctgagatgaagggagtgccacacc
Q I D E N S I L T V T A E D K G S G H T
gagccatcactactaaccagcagaaccgctcactcctgagatagcagaagaatg
E A I T I T N D Q N R L T P E D I E R M
atacaagatgcagagcagtttctgagatgacaagaaggtcagagacaaggtggatgcc
I Q D A E Q F A E D D K K V R D K V D A
aagaagcaactagaagatcacactcctcagagcccaagctggagatgctgacaag
K N E L E S Y T Y S L K S Q V G D A D K
ctaggcaataaactacagaggaagagaagaagattactaaagctgtggatgaagca
L G N K L S E E E K E E I T K A V D E A
atagagtgctgtagactcctgactgagatgagactgactgccaagaagaag
T E W L D S N P D A D T E E L T A E K K
gaagtggaagaagttgcaacccaatcatatcaaacctcaccagcaagcagagatgcc
E V E E V V N P I I S K L Y Q Q A G D A
cccccaccaggggagccagaggaatcagaagagcagagttataaTaagag
P P P T G E E P E D E S E R D E Y L
atatacataatgqcaaaacatgctagggatatttattagttcattcccttcaacag
ctattattattatgacataaaatttggctagcaccatattcggaatatttgg

```

**ANEXO 5 Nucleótidos y secuencia deducida de aminoácidos de la secuencia del retículo endoplasmático Isodictya\_457.** El codón de inicio ATG y el codón de término TAA en naranja. Las firmas de la familia de HSP70 marcadas en azul. El sitio de unión ATP/GTP señalado con rosado mientras que la señal de retención en el retículo endoplasmático se encuentra en rojo. En morado la región de unión del dominio NBD y SBD. La señal consenso no organelar en verde.

```

gctacgtacacgtggcctaacactatctaaaagatgctcagcatttgaasagaagctca
M F R I L K R S S
gcattgcagtttagactgcagcagagaaacacctgctccaacaatagcaagacctctg
A L O F R L P A E K H L L S T I A R P L
ttctcttccaatcagatatttaaatgagagctcaggaagaacaattcagagctct
F S S Q S Q T F W N E S L R K N Y S S
ggcatcaagggctctggtatgactcggcacaaccaactctgtgtggctacc
S I K G S V I G I D L G T T N S C V A T
atggaagaaagaccctaaagtcattgaaatgcagagggcgaagaccacacctct
M E G K N P K V I E N A E G V R T T F S
aagtagcattcaaaagcagcagagatggtcggatttcggcgaagacagggg
T V A F P K D G Q R L V G V L A R R Q A
gtcactaattcaataacgctttatgccaaaagcctctgattgtagagctttgac
V T N S N N T F Y A T K R L I G R R F D
gacaggaagtcagaaagagtcacaaagcagtcctttgaaattgctcggcgacacat
D K E V Q K E S K A V P F E I V R A T N
ggcgtatgctgtgaaagcagcagagtggaataatgctccctcagcagcagcagc
G D A W L K A E A D G K M Y S P S Q I G
gcttctgtgataaagtgaaagcagcagagcagcatttagaagctctgtgaa
A F V L I K M K E T A E A Y L G S S V K
aatgctgtatcacggcagcagcatttcaatgattcagagacagcagcagcagcagc
N A V I E V F A Y F N D S Q R Q A T K D
gctggacagattctgttttaaatggtgagagtaaatgaaccagcagcagcagcagc
A G Q I S G L N V V R V I N E P T A A A
ctggcttacggcagtggttaagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
L A Y G M G K A D D N O I I A V Y D L G
ggagggcctgtgcttccattctcgaatacagaaggggctgttgaggtcaagtc
G G T F D V S I L E I Q K E V F E V E S
scaaatggagactcttttagggaggaagccttgacacacattgtaaaatccctc
T N G D T F L G G E D F D N I I V K Y L
gtagcggagttcaaaaagatcaagggatagatgttcttagtcagcagcagcagcagc
V A E F R K D Q G I D V S S D S M A L Q
agaatcagagagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
R I R E A A E K A K I E L S A S T O T D
attaatctctcttcaacaatggatgctcctggcctcaacaacatgaacatgcaaatg
I N L P F F L T M D A S G P K H M N M Q M
aacagagcaaaatagaatctcctgtagtattgattgagagacagcagcagcagcagc
N R A K L E S L V S D L I E R T V K P C
gagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
E T A I K D A D V T K N T I S D V I L V
ggagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
G G M T R M P K V Q Q T V K K I F G R S
cctagcattctgcaatcctgtaggagctgtgctatcggggctgcaatccaagcagc
F S H S V N P F D E A V A I G A I Q G
gtgctagttggtgtagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
V L V G D V T D V L L L D V T P L S L G
atcagacacctaggggctgttccaccagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
I E T L G G V F T R L I N R N T T I F T
aagaagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
K K S Q V F S T A A D G Q S S V E I I V
gtcagggagagagaaatggctaacgacacaaagaaactggaagttccagcagctt
C O G E R E M A N D N K K L G S F Q L V
ggtatccctccaagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
S I P P A P R G I P Q V E V T F D I D A
aatgcatagtaaatgctgcaagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
N G I V N V H A K D K G T G K E H Q I L
attcagtcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
I Q S S G G L S K D E I E N M V K S S E
aagtcgctgagggatagaagagagagagatggtggggctgtaactcaacagcagc
K F A E E D R K R R D M V E A V N S T D
agtgctcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
S V V H D V E A K I E E F K D Q L P Q E
gagtgatcattgaaatcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
E V D H L K S E I E K V R K V L A N K D
aacgagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
N E T A E T L K E A T G E M Q K A S L K
ctattgaaatggcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
L F E M A Y K K M A E Q R E S G G S G G
agcagtagtgtagtctgtagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
S S S G T S S S E D S T A T E G E A R D
gcaacagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
A T A E E T Q Q Q E E K K Aaaactttccaatgggat
tatatttctgcttttaatttctgctcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
tataccgtatttttttagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc

```

**ANEXO 6 Nucleótidos y secuencia deducida de aminoácidos de la secuencia mitocondrial *Isodictya\_049*.** El codón de inicio ATG y el codón de término TAA en naranja. Las firmas de la familia de HSP70 marcadas en azul. El sitio de unión ATP/GTP señalado con rosado. En morado la región de unión del dominio NBD y SBD.