

UCH-FC
MAG-B
G962
C.1

**Respuesta a bajas temperaturas en dos especies de
artrópodos altoandinos chilenos, *Agathemera crassa*
(Insecta: Phasmatodea: Agathemeridae) y *Euathlus*
condorito (Arachnida: Araneae: Theraphosidae)**

Tesis

**Entregada A La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De:**

Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad De Ciencias

Por

Claudio Andrés Cubillos Pefaur.

Diciembre, 2017

**Director de Tesis Dr: Claudio P. Veloso Iriarte.
Co-Director de Tesis: Ricardo M. Cabrera Paucar.**

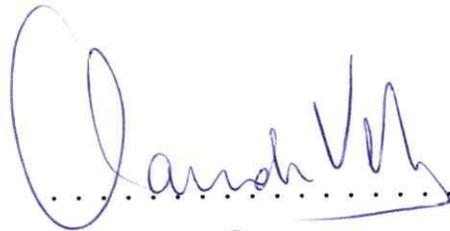
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por el candidato:

Claudio Andrés Cubillos Pefaur

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 21 de Diciembre de 2017

Director de Tesis:
Dr. Claudio Veloso

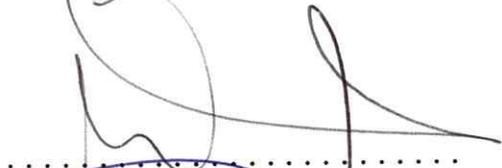


Co-Director de Tesis
Dr. Ricardo Cabrera

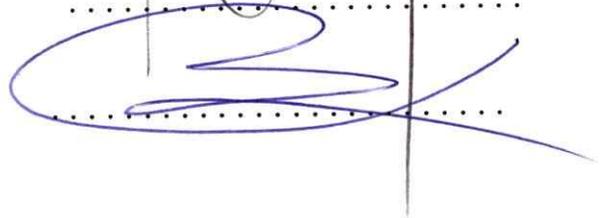


Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Mauricio Canals



Dr. Cristian Villagra



DEDICATORIA

Esta tesis va dedicada con mucho amor a mi madre, Ivonne Pefaur Ossandon. "Viejita, todos los sacrificios tienen su recompensa".

También quiero dedicarla a mi futura esposa, Jessica Ruiz Alvarado, quien me levantó y levanta en los momentos difíciles y me trae de vuelta a la tierra en los momentos de inocente idealismo. Por último le dedico este trabajo a nuestro hijo Baltasar Fidel Cubillos Ruiz, quien sin saberlo, ha cambiado nuestras vidas para siempre.

[Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page]

BIOGRAFÍA



Claudio Cubillos Pefaur nació en Santiago, el 3 de enero de 1990. Realizó su educación básica y media en el colegio Salesiano Camilo Ortuzar Montt, donde sembró algunas dudas acerca de las desigualdades sociales. Esto lo motivó a cursar estudios universitarios de pedagogía, en la Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación (ex Pedagógico). En este lugar se tituló como Profesor de Biología el año 2014 y además agudizó su pensamiento crítico, solo que ya no solo le interesaba indagar sobre la sociedad, también despertó el interés por descubrir las reglas que gobiernan la naturaleza. Es así como ingresa al programa de Magister en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, el año 2015. Actualmente investiga las adaptaciones fisiológicas y bioquímicas de artrópodos tolerantes a bajas temperaturas y se desempeña como profesor de ciencias, tanto en educación superior, como de adultos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es el resultado del esfuerzo de muchas personas que me han brindado apoyo tanto en el ámbito científico, como en el personal. Es por esto que la tarea de agradecerles me resulta ineludible. En primero lugar quiero agradecer a mi director y co-director de tesis, los Drs. Claudio Veloso y Ricardo Cabrera. Que a pesar de sus agitadas vidas académicas, siempre estuvieron disponible para cualquiera de mis dudas, o para alentarme en los momentos difíciles. Además quiero mencionar que motivado por el ejemplar trabajo de ambos, he decidido continuar ligado al maravilloso mundo de la ciencia mediante estudios de doctorado.

También quiero agradecer los comentarios y correcciones de la comisión evaluadora integrada por el Dr. Mauricio Canals y Dr. Cristian Villagra.

Una parte sustancial de esta tesis se la debo a mi compañero de laboratorio y amigo Juan Carlos Cáceres, quien me enseñó pacientemente un montón de técnicas de laboratorio, se dio el tiempo de revisar y criticar las versiones preliminares del manuscrito y con quien compartimos un montón de jornadas de trabajo. Gracias JC.

“Team Conce”, como olvidarlos, Samuel Pérez, Javiera Benavente, Amado Pérez y Carlos González, Compartimos momentos inolvidables que recordare para siempre, espero que podamos mantenernos siempre en contacto a pesar de las distancias.

Finalmente quiero agradecer a mi familia ascendente, Facundo, Ivonne, Flori, Nelson y Felipe, ustedes son mis pilares y especialmente a mi familia descendente, Jessica y Baltasar, ahora ustedes son la luz que ilumina mi camino, les estoy eternamente agradecido.

INDICE

Dedicatoria	iii
Biografía	iv
Agradecimientos	v
Índice de tablas	ix
Índice de figuras	x
Lista de abreviaturas	xi
Resumen	1
Abstract	3
Introducción	5
Hipótesis	12
Objetivo general	13
Objetivos específicos	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
1. Identificación de la estrategia de tolerancia al enfriamiento	14
1.1. Colecta de animales	14
1.2. Determinación del Punto de súper congelamiento (SCP)	15
1.3. Ensayo de sobrevivencia	16
1.4. Análisis estadístico.	17

2. Identificación de sustancias crioprotectoras en la hemolinfa	17
2.1. Captura de y extracción de hemolinfa de los animales	17
2.2. Identificación de crioprotectores de baja masa molecular	18
2.2.1. Glicerol	18
2.2.2. Trehalosa	19
2.2.3. Glucosa	19
2.3. Detección de proteínas anticongelante	20
2.3.1. Comparación estacional del patrón de bandeo en SDS-PAGE.	20
2.3.2. Evaluación de la actividad anticongelante de las proteínas hemolinfáticas	20
RESULTADOS	22
1. Efecto de la estacionalidad sobre el punto de super congelamiento.	22
2. Efecto de la tasa de enfriamiento sobre el punto de super congelamiento	24
3. Identificación de la estrategia de tolerancia al enfriamiento	26
4. Identificación de crioprotectores de baja masa molecular.	27
5. Patrón de bandeo de las proteínas hemlinfáticas en SDS-PAGE.	28
6. Evaluación de la actividad anticongelante mediante nanoparticulas de oro (AuNPs)	30

DISCUSIÓN	34
CONCLUSIÓN	42
BIBLIOGRAFÍA	44
ANEXO	53

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Efecto de la estacionalidad mediante ANCOVA	24
Tabla 2: Efecto de la tasa de enfriamiento mediante ANCOVA	26
Tabla 3: Sustancias crioprotectoras de bajo peso molecular en muestras de hemolinfa de ambas especies	27

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema del sistema cerrado diseñado para enfriar a los animales.	16
Figura 2: Efecto de la estación sobre el SCP de <i>A. crassa</i> y <i>E. condorito</i> .	23
Figura 3: Efecto de la tasa de enfriamiento sobre el SCP de <i>A. crassa</i> y <i>E. condorito</i> .	25
Figura 4: SDS – PAGE al 15% con proteínas de hemolinfa de <i>A. crassa</i> .	28
Figura 5: SDS – PAGE al 15% con proteínas de hemolinfa de <i>E. condorito</i> .	29
Figura 6: Ensayo de inhibición del autoensamblaje de AuNPs, controles negativos.	31
Figura 7: Ensayo de inhibición del autoensamblaje de AuNPs, proteínas hemolinfáticas de <i>A. crassa</i> más AuNPs, antes y después de un ciclo de congelamiento/descongelamiento.	32
Figura 8: Ensayo de inhibición del autoensamblaje de AuNPs, proteínas hemolinfáticas de <i>E. condorito</i> más AuNPs, antes y después de un ciclo de congelamiento/descongelamiento.	33

LISTA DE ABREVIATURAS

SCP	Punto de supercongelamiento
kDa	Kilo dalton
THP	Proteínas de histéresis termal
INAs	Agentes de nucleación de hielo
IBPs	Proteínas de unión a hielo
AFPs	Proteínas anticongelantes
INPs	Proteínas de nucleación
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con Dodecilsulfato sódico
AuNPs	Nanopartículas de oro
IRI	Inhibición de la recristalización de hielo

RESUMEN

Los animales que habitan zonas donde la temperatura puede descender bajo los 0 °C están expuestos a sufrir daños letales debido al congelamiento. Para resistir las condiciones de frío extremo, los ectotermos presentan adaptaciones conductuales, fisiológicas y bioquímicas. En este contexto se han descrito dos grupos de animales tolerantes al frío: a) evasores de congelamiento y b) tolerantes al congelamiento. Los Andes de Chile central 33° 21' 3" S es un área con condiciones de frío extremo, presentando temperaturas bajo los 0 °C en invierno y otoño, sin embargo, se desconocen las estrategias que utiliza su fauna de artrópodos para sobrevivir estas estaciones. El objetivo del presente trabajo es caracterizar las respuestas a las bajas temperaturas a nivel fisiológico y molecular, tanto para *Agathemera crassa* (Insecta: Phasmatodea: Agathemeridae) y *Euathlus condorito* (Arachnida: Araneae: Theraphosidae) y cuáles. Además se evaluará el efecto de la estacionalidad en las respuestas expresadas por ambos animales. Para el estudio se emplearon animales colectados en la zona de Farellones, sobre los 2000m s.n.m, a los cuales se les midió el punto de súper congelamiento (SCP) a dos tasas de enfriamiento diferentes (0,5 °C min⁻¹ y 1 °C min⁻¹). Los resultados indican que las especies presentan distintas estrategias de tolerancia a las bajas temperaturas: *A. crassa* tolera moderadamente el congelamiento, mientras que *E. condorito* es evasor o intolerante al congelamiento.

Estas estrategias pueden explicarse en parte por la presencia de sustancias crioprotectoras de bajo peso molecular, trehalosa, glucosa y glicerol en *A. crassa* y glucosa y glicerol en *E. condorito*. Además, mediante ensayo con nanopartículas de oro, se evaluó la actividad anticongelante de las proteínas purificadas de la hemolinfa. Se concluye que las dos especies presentan proteínas de unión a hielo, las cuales podrían ayudar a resistir las bajas temperaturas extremas. Con respecto a la estacionalidad, no se observaron diferencias significativas entre estaciones de invierno y verano, tanto en la expresión de proteínas, como entre los valores de SCP.

Palabras clave: Tolerancia al enfriamiento, punto de súper congelamiento, proteínas de unión a hielo, evasor de congelamiento, tolerante al congelamiento.

ABSTRACT

Arthropods that inhabit Polar Regions and high mountains have developed strategies to survive events when the temperature reaches below 0 °C by using different physiological, behavioral and biochemical adaptations. Two cold tolerance strategies have been described for arthropods: (1) freeze tolerant organisms which can survive the ice crystal formation and (2) freezing avoidant organisms which prevent the ice crystal formation by supercooling their fluids. Was studied two arthropods from the Andes Mountains in central Chile (2000m s.l.a.) the stick insect *Agathemera crassa* and the tarantula spider *Euathlus condorito* in order to evaluate how they respond to low temperatures in physiological and molecular levels. Was determined the supercooling point (SCP) at a cooling rate of 1 °C min⁻¹ and the subsequent survival for both arthropods, finding that *A. crassa* is a freezing tolerant organism with a SCP of -3.8±1.8 °C and 100% survival while *E. condorito* is a freezing avoidant organism with a SCP of -3.0±1.3 °C and 0% survival. The SCP and survival were not affected by the season in which the organism was collected, however, it was significantly affected by the cooling rate, making the SCP lower in 3,1 °C for *E. condorito* and in 1,2 °C for *A. crassa* at a rate of 0.5 °C min⁻¹. Both species present low molecular weight cryoprotective substances in their hemolymph which could explain their behavior, *A. crassa* presents glucose, glycerol, and

trehalose, while *E. condorito* only presents glucose and glycerol. We analyzed the hemolymph proteins by SDS-PAGE finding no seasonal differences and detected protein antifreeze activity using a gold nanoparticles assay.

Key Words: Cold Tolerance, Supercooling point, Ice Binding Proteins, Freeze-tolerante, freeze-avoidant

INTRODUCCIÓN

El estudio de los artrópodos resistentes a las bajas temperaturas se ha desarrollado por más de 60 años (Lee 1991), tiempo durante el cual el marco conceptual y metodológico ha sido objeto de sucesivos debates y modificaciones. Los artrópodos que habitan regiones polares o de alta montaña, donde la temperatura puede descender bajo los 0°C, están expuestos a sufrir daños letales producto del enfriamiento (Lee 2010). A modo general, los animales capaces de sobrevivir el enfriamiento bajo el punto de fusión de sus fluidos corporales, se han denominado "tolerantes al enfriamiento", y dentro de estos se han reconocido dos subgrupos: los animales tolerantes al congelamiento, vale decir, aquellos que sobreviven el enfriamiento mediante la formación controlada de hielo extracelular y los evasores de congelamiento, los cuales sobreviven a temperaturas bajo el punto de fusión aumentando la capacidad de sobreenfriamiento de sus fluidos corporales (Salt 1961; Bale 1993; Lee 2010), estos últimos son llamados intolerantes o evasores de congelamiento.

El vasto trabajo en artrópodos tolerantes al enfriamiento, no solo ha generado una copiosa cantidad de publicaciones referidas a reconocer el tipo de estrategias que usan los animales para soportar las bajas temperaturas (Sinclair 1999; Chown & Nicolson 2004). También se han descrito los mecanismos bioquímicos que subyacen

en cada una de dichas estrategias. Al respecto, se conoce la estructura de proteínas capaces de unirse al hielo y para ellas se han propuesto mecanismos mediante los que pueden iniciar o detener el crecimiento de los cristales de hielo (Hakim *et al.* 2013; Davies 2014; Duman 2015); así como la acción de azúcares capaces de unirse a las membranas celulares y estabilizarlas durante el congelamiento (Rudolph & Crowe 1985; Villarreal *et al.* 2004). Referente a la evolución de ambas estrategias de tolerancia al enfriamiento en artrópodos, a la fecha no se ha observado la tolerancia al congelamiento fuera del taxón Insecta, lo que ha llevado a pensar que la evasión de congelamiento es una característica basal dentro de los linajes de artrópodos y la tolerancia a congelamiento habría surgido posteriormente en distintos órdenes de insectos (Vernon & Vannier 2002; Sinclair *et al.* 2003b). No obstante, la información disponible es aun limitada para confirmar este tipo de hipótesis.

Cuando la temperatura de los fluidos corporales de un organismo desciende por debajo de su punto de fusión, estos entran en un estado metastable denominado sobreenfriamiento y se vuelven vulnerables a la formación de hielo (Ramløv 2000). Al agregarse las moléculas propias del fluido sobreenfriado, se forma un núcleo a partir del cual comienza espontáneamente la cristalización, este fenómeno se denomina nucleación homogénea. Alternativamente, cuando la cristalización comienza a partir de un agente de nucleación exógeno al fluido, el fenómeno recibe el nombre de nucleación heterogénea (Vali 1995). Dichos agentes de nucleación de hielo (INAs) pueden ser de diversa naturaleza molecular, hasta celular (Lee & Costanzo 1998; Wharton *et al.* 2009). Algunos organismos tolerantes al congelamiento sintetizan proteínas capaces de iniciar la formación de cristales de hielo a temperaturas cercanas a 0°C (Wilson & Ramløv 1995; Duman 2001; Duman

2015), otros artrópodos que deben pasar el invierno rodeados de nieve pueden inocular pequeños cristales “semilla” capaces de comenzar la cristalización o incluso ciertas bacterias pueden servir como agentes de nucleación (Lee 1991). En el caso de los artrópodos evasores de congelamiento, las situaciones descritas arriba pueden causar la muerte de los organismos, por lo tanto es imprescindible para su sobrevivencia contar con mecanismos que eviten la nucleación y el subsiguiente crecimiento de los cristales de hielo. Algunas de estas estrategias son la síntesis de polialcoholes, azúcares o proteínas anticongelantes (AFP) (Graether & Sykes 2004)

El enfriamiento de los fluidos corporales puede producir daño en los tejidos debido a la transición de fase en las membranas. Las membranas alteran su equilibrio osmótico y algunas proteínas sensibles a las bajas temperatura pueden disminuir o perder su actividad (Ramløv 2000). Además, el crecimiento de cristales de hielo puede producir daños mecánicos letales a las células. Normalmente los animales presentan diferentes solutos disueltos en sus fluidos, por lo tanto, su punto de fusión generalmente esta alrededor de un grado bajo cero (Salt 1966).

Generalmente, las moléculas crioprotectoras han sido clasificadas en dos grupos: (1) Crioprotectores de bajo peso molecular (Storey 1997) y; (2) proteínas de unión a hielo (Duman 2015).

Los crioprotectores de bajo peso molecular son altamente solubles en soluciones acuosas, no son tóxicos y no reaccionan con otras macromoléculas, aunque estén presentes en altas concentraciones. Además estabilizan el estado nativo de las proteínas contrarrestando el efecto denaturante del frío o congelamiento (Storey & Storey 1988). Se pueden distinguir dos clases de crioprotectores de bajo peso

molecular de acuerdo a la función que estos cumplen: i) crioprotectores coligativos, los cuales afectan el punto de congelamiento dependiendo del número de moléculas involucradas; ii) crioprotectores que estabilizan membranas y proteínas (Ramløv 2000).

Los crioprotectores de bajo peso molecular más comunes son polialcoholes y azúcares. El glicerol es la sustancia más estudiada de estas. En los animales tolerantes al enfriamiento se han detectado en concentraciones que van desde 10 mM – 500mM (Lee 1991). También es común encontrar azúcares como trehalosa y glucosa. Leader & Bedford (1978) y Ramløv *et al.* (1992) detectaron la presencia de trehalosa (14,2 mM) y glucosa (3,6 mM) en el insecto weta *Hemideina maori* (Orthoptera: Anostomatidae). Mientras que Wharton *et al.* (2009) encontraron trehalosa en el rango de 150 – 350 mM en *Celatoblatta quinquemaculata* (Blattodea: Blattidae)

Además de las sustancias crioprotectoras de bajo peso molecular, también es conocida la actividad crioprotectora de sustancias de alto peso molecular de naturaleza proteica. Estas son proteínas antiongelantes (AFPs) o a veces llamadas proteínas de histéresis termal (THP), debido su capacidad de disminuir el punto de congelamiento sin alterar el punto de fusión, gracias a mecanismos no coligativos. Fueron descubiertas primero por DeVries en peces marinos antárticos (DeVries & Wohlschlag 1969; DeVries 1971), como su nombre lo indica, funcionan impidiendo la formación de hielo. Desde entonces, numerosas AFPs han sido identificadas en varios insectos evasores de congelamiento y en otros artrópodos terrestres (Duman *et al.* 2004). Sin embargo, proteínas con menor capacidad anticongelante han sido reportadas en insectos tolerantes a congelamiento, donde ellas no impiden la

formación de hielo, más bien controlan la tasa de crecimiento, i.e., inhibición de la recristalización (IRI), el lugar donde se forman y la estructura de los cristales de hielo (Wharton *et al.* 2009; Storey & Storey 2013). Las AFPs descritas poseen pesos moleculares en el rango de 3,2 y los 32 kDa (Ramløv 2000).

Otras proteínas involucradas en la crioprotección, son las proteínas de nucleación de hielo (INPs), estas inician la formación de cristales de hielo limitando la capacidad de sobreenfriamiento, en animales tolerantes al congelamiento actúan a temperaturas subcero relativamente altas (Wilson & Ramløv 1995). No obstante, INPs también han sido encontradas en artrópodos evasores al congelamiento, donde deben ser removidas o “enmascaradas” por la actividad de AFPs (Duman 2015). Actualmente se utiliza el término “proteínas de unión a hielo” (IBPs) para nombrar a ambas, AFPs y INPs.

Recientemente se ha logrado identificar, purificar y caracterizar IBPs de diferentes especies, lo cual ha evidenciado una amplia diversidad estructural (Ewart *et al.* 1999; Davies 2014), no obstante, todas presentan en su superficie aminoácidos capaces de interactuar con la superficie de los cristales de hielo, de este modo pueden iniciar o detener el crecimiento de los cristales (Jia & Davies 2002; Marshall *et al.* 2002; Graether & Sykes 2004; Storey & Storey 2013; Hakim *et al.* 2013; Davies 2014).

Los ambientes de alta montaña presentan condiciones de temperatura particularmente extremos (Sømme and Block 1991). A medida que aumenta la altitud, la atmósfera se vuelve menos densa, la cantidad de aire capaz de absorber la energía solar disminuye y esto resulta en amplias fluctuaciones térmicas diarias y estacionales (Sømme and Block, 1991; Wharton, 2002). La Cordillera de los Andes no se escapa a la

generalidad de los ambientes de alta montaña y los rangos de temperatura, a nivel del suelo, están entre los -6 y sobre los 50 °C en época de otoño, previo a la densa capa de nieve que cubre el suelo en invierno y la temperatura se mantiene estable a 0 °C (datos no publicados). A pesar de la importancia, tanto a nivel fisiológico y ecológico, que representa comprender como sobreviven los artrópodos a las bajas temperaturas, no existen investigaciones referentes a explicar este tipo de procesos la artropofauna de los Andes Sudamericanos. Este trabajo busca identificar las estrategias de tolerancia al enfriamiento y los mecanismos bioquímicos subyacentes en dos artrópodos de Los Andes de Chile Central: el insecto *Agathemera crassa* (Phasmatodea: Agathemeridae) y la araña *Euathlus condorito* (Araneae: Theraphosidae). Ambas especies habitan sobre los 2400m s.n.m. en la zona de farellones 33° 21' 3" S y deben soportar temperaturas invernales o preinvernales bajo 0°C (Veloso *et al.* 2012; Thienel *et al.* 2015)

Euathlus condorito es una araña del suborden Mygalomorphae, perteneciente a la familia Theraphosidae. En comparación con otras Mygalomorphae es de tamaño pequeño, de unos 27,0 mm de largo (macho) y 44,7 mm (hembra) (Perafán & Pérez-miles 2014). La masa corporal de los adultos oscila entre 6 – 10 g (Veloso *et al.* 2012; Alfaro *et al.* 2013). Es un animal de hábitos nocturnos por lo que durante el día es posible encontrarla bajo las rocas. Su etapa reproductiva es entre diciembre y enero (Veloso *et al.* 2012) (Verano). Referente a la sobrevivencia de arañas en condiciones de frío bajo 0°C, existen algunos trabajos clásicos (Duman 1979; Lee & Baus 1985; Kirchner 1987), No obstante, a nuestro conocimiento no existen publicaciones referidas a la tolerancia al enfriamiento en arañas tarántulas.

Por su parte, *A. crassa* es un insecto perteneciente al orden Phasmatodea, grupo que comparte con los insectos comúnmente conocidos como palotes. Su cuerpo es robusto, con un claro dimorfismo sexual, las hembras son de mayor tamaño que los machos y a diferencia de los machos, su abdomen se agudiza hacia los segmentos terminales (Camousseigh 1995). Posee hábitos nocturnos, durante el día es posible encontrarlo bajo rocas o en lugares cercanos a su fuente de alimento *Acaena splendens* (Thienel *et al.* 2015). En un trabajo reciente (Dennis *et al.* 2014) se reconoce la ausencia de información referente a la tolerancia al enfriamiento en el género *Agathemera* y en Phasmatodea sudamericanos en general. Posteriormente, Dennis *et al.* (2015) reportaron la tolerancia al congelamiento en dos insectos Phasmatodea de Nueva Zelanda.

Hipótesis.

H₀: Las especies estudiadas no son tolerantes al enfriamiento y mueren a temperaturas sobre 0°C.

H₁: La estrategia de tolerancia al congelamiento no ha sido observada en los linajes basales de artrópodos, por lo tanto se cree que la evasión de congelamiento es una característica ancestral dentro del Arthropoda. Además, las especies que se comportan como evasoras de congelamiento, presentan mayores niveles de proteínas anticongelantes y glicerol en estaciones frías. De manera tal que su capacidad de sobre enfriamiento aumenta y así evitan congelarse.

Predicción H₁: *E. condorito* se comportará como evasor de congelamiento y presentará altos niveles de glicerol y AFPs.

H₂: Las especies que se comportan como tolerantes a congelamiento, presentan escasa presencia de proteínas anticongelantes, pero elevados niveles de sustancias crio protectoras de bajo peso molecular, como trehalosa, que protejan sus células de daño por congelamiento.

Predicción H₂: Si *A. crassa* sobrevive las temperaturas bajo 0°C congelando sus fluidos corporales, presentará altos niveles de trehalosa y AFPs que inhiban la recristalización

Objetivo general.

Comprender las respuestas a las bajas temperaturas, tanto a nivel fisiológico como bioquímico en *A. crassa* y *E. condorito*.

Objetivos específicos

- 1) Determinar el punto de súper congelamiento (SCP) para ambas especies.
- 2) Identificar diferencias en las respuestas de congelamiento producto de la estación de captura de los animales y la tasa de enfriamiento.
- 3) Determinar estrategia de evasión o tolerancia al congelamiento en *A. crassa* y *E. condorito*.
- 4) Caracterizar la actividad anti congelante de proteínas en la hemolinfa de ambos modelos de estudio, tanto en animales capturados en otoño tardío/primavera temprana, como en verano.
- 5) Comparar las concentraciones de sustancias crioprotectoras de bajo peso molecular con respecto a las estaciones en las que fueron tomadas las muestras.

MATERIALES Y METODOS

La descripción de los procedimientos se divide en dos secciones "*Identificación de la estrategia de tolerancia al enfriamiento*", que busca resolver los objetivos específicos 1-3 e "*Identificación de sustancias crioprotectoras en la hemolinfa*", está orientada a lograr los objetivos 4 y 5.

1. *Identificación de la estrategia de tolerancia al enfriamiento.*

1.1. Colecta de animales.

Los animales fueron colectados en los Andes de Chile central, en la zona de farellones 33° 21' 3" S, 70° 18' 50" O, luego de la plaza de los pumas por el camino a Valle Nevado. Este sector está por encima del límite arbóreo, encontrándose vegetación herbácea estacional y baja densidad arbustiva. Los rangos de temperatura diarios son amplios y las extremas mínimas a nivel del suelo se observan en otoño tardío, previo a la caída de nieve que cubre el suelo en invierno, cuando la temperatura se estabiliza a 0 °C. En 2016, se capturó: a comienzos de enero (verano), nueve

individuos de *A. crassa* y seis de *E. condorito*; a fines de mayo (otoño tardío), seis individuos de *A. crassa* y seis de *E. condorito*; y a fines de septiembre (inicio de primavera), 17 individuos de *A. crassa* y 14 de *E. condorito*. Todos los animales colectados fueron llevados al laboratorio de Ecofisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, ubicado aproximadamente a 45 km de la zona de muestreo. Los animales se mantuvieron en cajas de plástico y sin alimento para evitar la ingestión de agentes de nucleación. Aquellos individuos colectados en marzo se mantuvieron a temperatura ambiente durante una semana y los colectados en mayo y septiembre a 4°C durante una semana. Para la correcta identificación de los especímenes se utilizaron los trabajos de Camousseigh (1995) y Perafan y Perez-Miles (2014). Revisar detalles de estados de desarrollo, masa y sexo en anexo.

1.2. Determinación del Punto de súper congelamiento (SCP)

El SCP corresponde a la temperatura a la cual se inicia espontáneamente la formación de cristales de hielo (Lee 2010). Este es fácilmente detectable por el incremento en la temperatura corporal, debido a la liberación de calor producido por la cristalización (Sinclair *et al.* 2015)

Para determinar el SCP, se enfrió a los animales en baño térmico Lab Tech modelo LCB-R20 con etilenglicol como líquido refrigerante. Se ensayó con dos tasas de enfriamiento alternativas: 1°C min⁻¹ y 0,5°C min⁻¹ (Salt 1936; Sinclair *et al.* 2015)

Para considerar el efecto de la masa corporal en el cálculo del SCP, se masó a los individuos con balanza electrónica. Luego se inmovilizaron sobre una tablilla de

madera y con una banda elástica se sujetó una termocupla tipo K al dorso del animal (figura 1). Se dispuso una segunda termocupla de similares características para medir la temperatura ambiente del sistema.

Los animales fueron puestos en un sistema cerrado, diseñado con un tubo de acrílico y dos mangueras a través de las cuales se hizo pasar las termocuplas, posteriormente se conectaron a un termómetro datalogging SPER SCIENTIFIC 800024. Se registró la temperatura corporal y ambiente cada un segundo durante 4 horas.

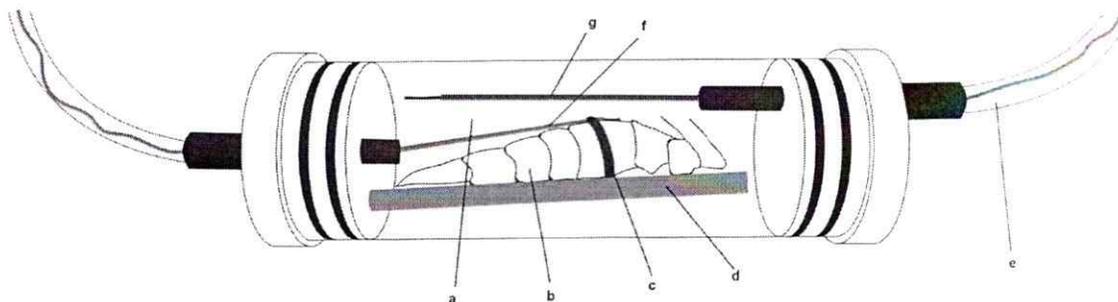


Figura 1: Esquema del sistema cerrado diseñado para enfriar a los animales, a. cámara de enfriamiento; b. cuerpo del animal; c. banda elástica; d. tablilla de inmovilización; e. manguera de paso para termocupla; f. termocupla animal; g. termocupla ambiente.

1.3. Ensayo de sobrevivencia.

Después de ser sometidos a estrés térmico por enfriamiento, los animales fueron descongelados a temperatura ambiente en cajas de plástico con alimento: larvas de *Tenebrio molitor* para *E. condorito*; y ramas frescas de *Acaena splendens* para *A. crassa*. Transcurridos tres días, se evaluó su sobrevivencia según dos criterios.

desplazamiento coordinado y capacidad normal para alimentarse de acuerdo a los protocolos estandarizados en el trabajo de Sinclair *et al.* (2015).

1.4. Análisis estadístico.

Previo a los análisis estadísticos, se ajustó los datos de SCP a una distribución normal mediante el modelo de Johnson (Johnson 1949) en software Minitab 17. Se utilizó el software STATISTICA, Soft Stat 8.0 para realizar análisis de covarianza entre los SCP de los animales. El tamaño corporal juega un rol importante en el SCP (Hahn & Martín 2008). Se asume que animales con mayor tamaño presentan una mayor cantidad de agua y por lo tanto mayor probabilidad de generar eventos de nucleación (Sinclair *et al.* 2015). Por lo tanto, para el análisis se consideró el SCP como variable respuesta, la especie y la estación como variables categóricas y la masa corporal como covariable.

2. *Identificación de sustancias crioprotectoras en la hemolinfa*

2.1. Captura de y extracción de hemolinfa de los animales.

Los animales fueron colectados en los Andes de Chile central, en la zona de farellones 33° 21' 3" S, 70° 18' 50" W. Utilizando una jeringa de 0,5 mL, se extrajo entre 50-200µL de hemolinfa desde el corazón de individuos de *E. condorito*: 5

individuos al comienzo de marzo (verano); 3 a fines de mayo (otoño tardío) y seis a fines de septiembre (comienzo de primavera). En el caso de *A. crassa*, se extrajo entre 10-100 μ L desde los cleritos pleurales de: 6 individuos verano, 3 de otoño tardío y seis al comienzo de la primavera. Las muestras se almacenaron a 0°C en tubos Eppendorf de 1,7mL y se trasladaron al Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, ubicado a aproximadamente 45km de la zona de muestreo.

2.2. Identificación de crioprotectores de baja masa molecular

Se centrifugaron muestras de hemolinfa a 14000 x g durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente, se usaron "ensayos acoplados" con enzimas específicas para cuantificar la concentración de glicerol, trehalosa y glucosa presente en la hemolinfa de animales colectados en marzo y septiembre. Para cada experimento se realizaron tres replicas técnicas.

2.2.1. Glicerol

La concentración de glicerol fue analizada con kit comercial Glycerol GK (Glucokinase format) K-GCROLGK de Megazyme International (Bray, Ireland 2014). Todas las muestras fueron diluidas 50 veces. El ensayo se practicó en microplaca de 96 pocillos siguiendo las instrucciones del fabricante. Para descartar la

presencia de inhibidores de la reacción en la hemolinfa se realizó un control agregando glicerol al finalizar la reacción.

2.2.2. Trehalosa

La concentración de trehalosa fue analizada con el kit comercial Trehalose K-TREH de Megazyme International (Bray, Ireland 2016). Todas las muestras fueron diluidas 10 veces. El ensayo se practicó en microplaca de 96 pocillos siguiendo las instrucciones del fabricante. Para descartar la presencia de posible interferencia en la reacción, se realizó un control agregando trehalosa al finalizar la reacción.

2.2.3. Glucosa

La concentración de glucosa fue analizada con kit comercial D-glucose – HK (HK/G6P-DH Format) Megazyme International (Bray, Ireland 2014). Todas las muestras fueron diluidas 10 veces. El ensayo se practicó en microplaca de 96 pocillos siguiendo las instrucciones del fabricante. Para descartar la presencia de posible interferencia en la reacción, se realizó un control agregando D-glucosa al finalizar la reacción.

2.3. Detección de proteínas anticongelantes

Para eliminar los restos celulares, las muestras de hemolinfa de animales colectados en marzo y septiembre fueron centrifugadas a $14000 \times g$ durante 15 minutos a 4°C

2.3.1. Comparación estacional del patrón de bandeo en SDS-PAGE.

Se preparó geles de poliacrilamida al 15% siguiendo el método de Fling & Gregerson (1986). Se cargó $2\mu\text{L}$ de solución estándar y $20\mu\text{g}$ de proteínas, previamente calculados según el método colorimétrico de Bradford (1976). Se comparó el patrón de bandeo de proteínas hemolinfáticas extraídas de animales colectados en verano, otoño tardío y comienzo de primavera.

2.3.2. Evaluación de la actividad anticongelante de las proteínas hemolinfáticas

Mediante cromatografía de exclusión molecular en columna Hitrap Desalting preempacada con resina Sephadex G-25, se purificó las proteínas hemolinfáticas de ambos modelos, del resto de las moléculas de bajo peso molecular. Dejando las proteínas en Agua nanopura en el mismo paso. Luego las muestras fueron concentradas por ultra centrifugación a $7500 \times g$ en tubos Amicon con poro de membrana 10 kDa .

Para evaluar la actividad anticongelante de los extractos de proteínas purificadas, se ensayó con el método de inhibición del autoensamblaje de nanopartículas de oro (AuNPs) congeladas (Park *et al.* 2013; Mitchell *et al.* 2015). Brevemente, las AuNPs forman agregados al ser congeladas, debido a esto, sufren un cambio irreversible en su coloración, de rojo (descongeladas) a azul (congeladas). Este cambio de color es coherente con los cambios observados en su espectro de absorbancia. Antes del congelamiento, las AuNPs presentan un pico de absorbancia cercano a los 520nm y después de ser congeladas disminuye el pico a los 520nm y aumenta la absorbancia cercana a los 650nm (Albert *et al.* 2009), En presencia de proteínas anticongelante, estas inhiben la recristalización que permite la agregación de las nanopartículas y los cambios de absorbancia asociados al congelamiento.

Se preparó AuNPs con cubierta de ácido mecapto succínico (MSA) como se describe en (Park *et al.* 2013). Para el ensayo se utilizaron distintas concentraciones de proteínas hemolinfáticas de *A. crassa* y *E. condorito*, las cuales fueron agregadas a 100µL de MSA-AuNPs. Posteriormente, se midió el espectro de absorbancia de la solución antes de un ciclo de congelamiento/descongelamiento, en placa de 96 pozillos. El congelamiento se llevó a cabo durante 60 minutos a -20°C y el descongelamiento a 37°C por 10 minutos. La medición del espectro de absorbancia de la solución después del ciclo de congelamiento/descongelamiento se realizó tres veces: inmediatamente después de descongelar, a 30 y 60 minutos después de descongelar.

Se realizaron 3 réplicas técnicas para cada muestra. . Como control negativo se usó BSA (Park *et al.* 2013).

RESULTADOS

1. Efecto de la estacionalidad sobre el punto de super congelamiento.

Nuestros resultados revelan que individuos de *E. condorito* y *A. crassa* enfriados a una tasa constante de $1^{\circ}\text{C min}^{-1}$, se congelan a temperaturas que no difieren significativamente, vale decir, el punto de super congelamiento de ambas especies es el mismo. En promedio el SCP de *E. condorito* es $-3,0^{\circ}\text{C} \pm 1,85$ y el de *A. crassa* a $-3,9^{\circ}\text{C} \pm 1,37$.

Además, no se observaron diferencias significativas entre el SCP de individuos de la misma especie, colectados en distintas estaciones.

La figura 2 muestra los valores de SCP medidos para cada individuo, además del valor promedio y la desviación estándar para cada especie en estaciones de invierno¹ y verano (para detalles de los estados de desarrollo de los animales ver anexo).

¹ Para simplificar las explicaciones, se considera a los animales colectados en mayo y septiembre como animales colectados en invierno.

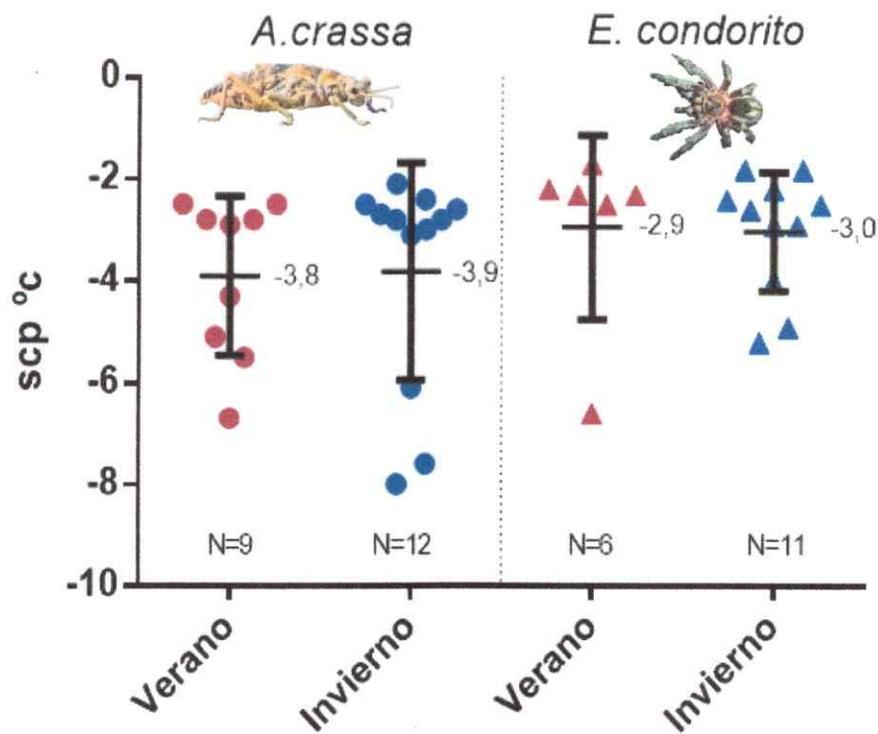


Figura 2: Efecto de la estación sobre el SCP de *A. crassa* y *E. condorito*. Se determinó el SCP para individuos colectados en verano y en invierno de ambas especies. Se indica el valor promedio (valor central) y la desviación estándar. Se indica la cantidad de individuos (N) para cada muestra.

Se realizó un análisis de covarianza considerando como variables categóricas ambas especies y las estaciones. Se usó como covariable la masa corporal medida en gramos. El análisis revela que hay efecto de la masa corporal sobre el SCP de ambas especies. Sin embargo, no hay efecto ni de la masa ni la estación sobre el SCP entre ambas especies (tabla 1).

Efecto	DF	F	P
Intercepto	1	12,89	0,001*
Especies	1	0,83	0,369
Estación	1	0,25	0,614
Masa corporal	1	20,95	<0,001*
Especies x Estación	1	0,01	0,891
Error	30		

Tabla 1: Efecto de la estacionalidad mediante ANCOVA, se utiliza como variable dependiente el SCP, variables categóricas la estación y la especie y como covariable la masa corporal de cada individuo. Se destacan en con * los valores P menores a 0,05.

2. Efecto de la tasa de enfriamiento sobre el punto de super congelamiento

Al someter a individuos de ambas especies a dos tasas constantes de enfriamiento, $1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ y $0,5^{\circ}\text{C min}^{-1}$, el SCP difiere significativamente entre las diferentes tasas de enfriamiento. En promedio los SCP obtenidos son: *A. crassa* $1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ $-3,9^{\circ}\text{C} \pm 1,37$, $0,5^{\circ}\text{C min}^{-1}$: $-5,04 \pm 0,96$; *E. condorito* $1^{\circ}\text{C min}^{-1}$: $-3,0^{\circ}\text{C} \pm 1,85$, $0,5^{\circ}\text{C min}^{-1}$: $-5,04 \pm 0,96$.

No obstante, no se observaron diferencias en el SCP entre individuos de diferente especie.

La figura 3 muestra los valores de SCP medidos para cada individuo, además del valor promedio y la desviación estándar para cada especie en estaciones de invierno² y verano.

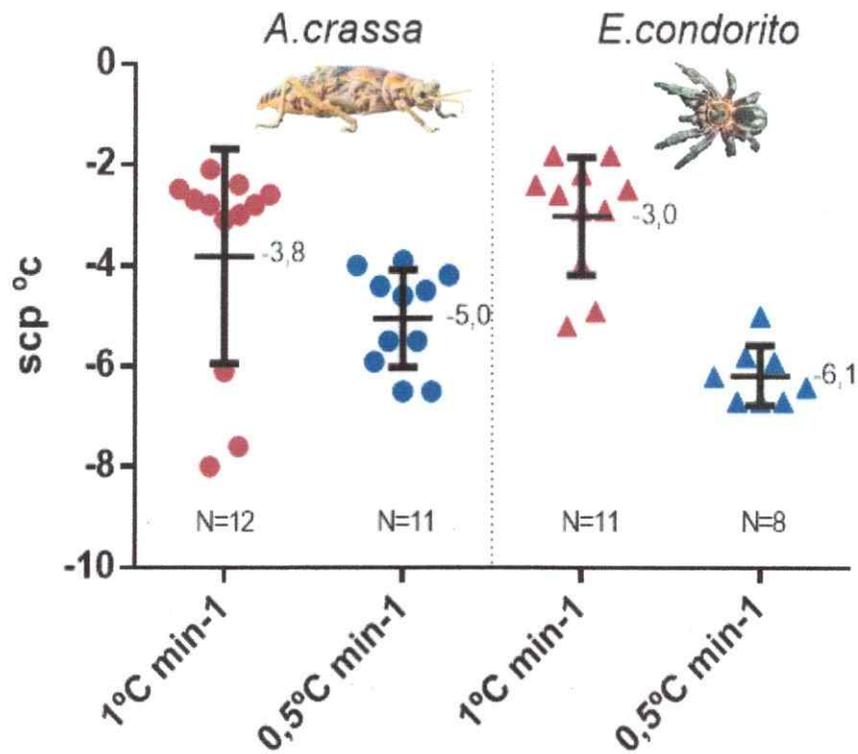


Figura 3: Efecto de la tasa de enfriamiento sobre el SCP de *A. crassa* y *E. condorito*. Se determinó el SCP para individuos enfriados a 1°C min⁻¹ y a 0,5°C min⁻¹. Se indica el valor promedio (valor central) y la desviación estándar. Se indica la cantidad de individuos (N) para cada muestra.

Se realizó análisis de la covarianza considerando como variables categóricas ambas especies y las tasas de enfriamiento. Como covariable se usó la masa corporal medida en gramos. El análisis revela que hay efecto de la masa corporal y la tasa de

² Para simplificar las explicaciones, se considera a los animales colectados en mayo y septiembre como animales colectados en invierno.

enfriamiento sobre el SCP de ambas especies. Sin embargo no hay efecto de las especies sobre el SCP (tabla 2).

Efecto	DF	F	P
Intercepto	1	232,8	<0,001*
Especies	1	0,01	0,89
Tasa de enfriamiento	1	30,95	<0,001*
Masa corporal	1	13,68	<0,001*
Especie x Tasa Enfriamiento	1	10,32	0,002*
Error	51		

Tabla 2: Efecto de la tasa de enfriamiento mediante ANCOVA, se utiliza como variable dependiente el SCP, variables categóricas la tasa de enfriamiento y la especie y como covariable la masa corporal de cada individuo. Se destacan con * los valores P menores a 0,05.

3. Identificación de la estrategia de tolerancia al enfriamiento

Después de ser congelados durante 4 horas, los animales fueron descongelados a temperatura ambiente y se observó durante dos días su capacidad para desplazarse coordinadamente y alimentarse. El 100% de los individuos de *A. crassa* fue capaz de cumplir con las pruebas de locomoción y alimentación, mientras que el 0% de las arañas sobrevivió al tratamiento de congelamiento.

Los resultados indican claramente que *A. crassa* se comporta como tolerante al congelamiento, soportando la formación de cristales de hielo por al menos 4 horas. Mientras que *E. condorito* es un evasor de congelamiento, ya que no resiste la

formación de cristales de hielo. Estos resultados fueron idénticos independiente de la tasa de enfriamiento que se usó para alcanzar el SCP.

4. Identificación de compuestos crioprotectores de baja masa molecular.

Se determinó la concentración de glicerol y glucosa en la hemolinfa de ambas especies, en animales colectados en invierno y verano. Sin embargo, trehalosa solo pudo ser detectada en hemolinfa de individuos de *A. crassa*, indistintamente de la estación de colecta.

La tabla 3 muestra el resumen de las concentraciones (mM) en hemolinfa, de cada uno de los crioprotectores encontrados

Especie	Estación	Trehalosa, mM	n	Glucosa, mM	n	Glicerol, mM	n
<i>A. crassa</i>	Invierno	199,67 ± 64,73	7	35,83 ± 3,49	7	1,03 ± 0,64	5
	Verano	93,01 ± 16,43	8	41,08 ± 8,55	8	1,43 ± 0,84	5
<i>E. condorito</i>	Invierno	nd	5	9,10 ± 0,68	5	3,95 ± 1,29	6
	Verano	nd	5	12,47 ± 0,82	5	2,38 ± 1,64	6

Tabla 3: Sustancias crioprotectoras de bajo peso molecular en muestras de hemolinfa de ambas especies. Las concentraciones fueron determinadas en muestras tomadas de diferentes organismos con 3 réplicas técnicas. Los valores informan concentración ± desviación estándar. nd= fuera del rango de detección del método. *Los promedios difieren significativamente según el test no paramétrico de Mann Whitney.

5. Patrón de bandeo de las proteínas hemolinfáticas en SDS-PAGE.

El patrón de bandeo observado es característico para cada especie (figuras 4 y 5), no obstante se pueden apreciar algunas semejanzas. En ambos geles se puede ver una banda principal alrededor de los 75 kDa. En *E. condorito*, dicha banda se ha identificado como una hemocianina hétero multimérica mediante espectrometría de masas (datos no publicados).

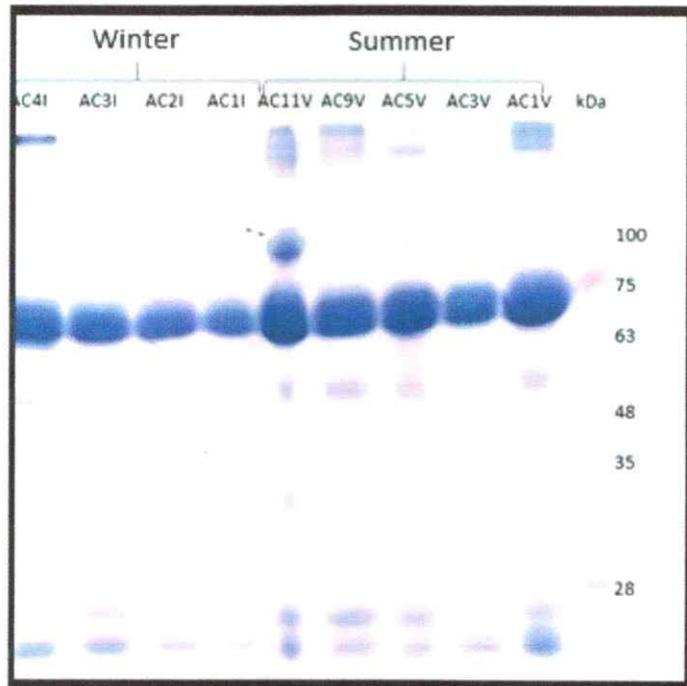


Figura 4: SDS – PAGE al 15% con proteínas de hemolinfa de *A. crassa*. Cada carril contiene 20µg de proteína de la hemolinfa de diferentes individuos, arriba se indica las muestras extraídas de animales colectados en invierno y animales colectados en verano. A la derecha el estándar con los pesos moleculares correspondientes.

No hay antecedentes con respecto a la banda principal observada en los geles de *A. crassa*. Además, en ambos geles se observa la presencia de bandas de alto peso molecular, por sobre la banda principal. Cualitativamente, no se distinguen diferencias entre bandas de invierno y verano.

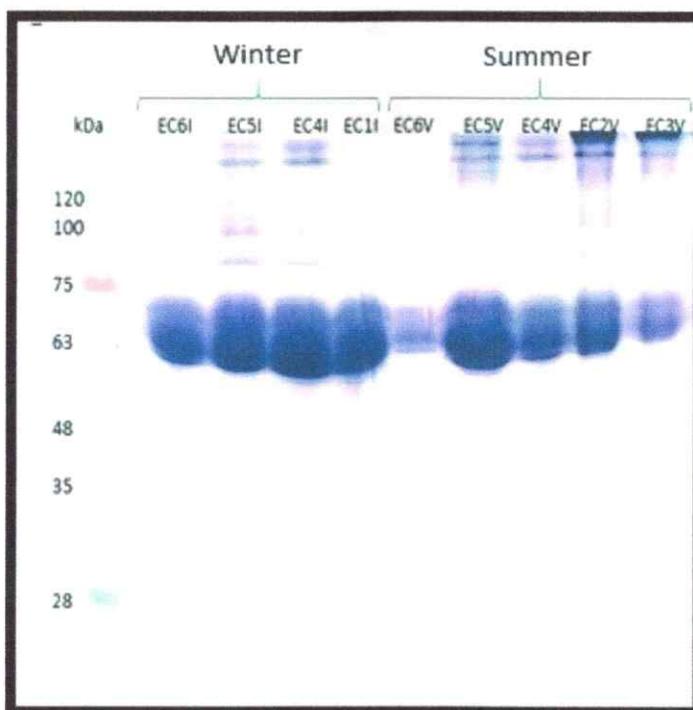


Figura 5: SDS – PAGE al 15% con proteínas de hemolinfa de *E. codorito*. Cada carril contiene 20µg de proteína de la hemolinfa de diferentes individuos, arriba se indica las muestras extraídas de animales colectados en invierno y animales colectados en verano. A la izquierda el estándar con los pesos moleculares correspondientes.

Otro resultado que se puede observar a partir de los geles es que solo en *A. crassa* hay bandas de bajo peso molecular, entre los 28 y los 17 kDa. No se observan diferencias entre las bandas procedentes de muestras de invierno y verano.

6. Evaluación de la actividad anticongelante mediante nanoparticulas de oro (AuNPs)

Se consideró tres indicadores en el ensayo de AuNPs más proteínas hemolinfáticas purificadas: 1) cambio de color de la solución, de rojo a azul; 2) cambios en el espectro de absorbancia antes y después de un ciclo de congelamiento/descongelamiento; 3) relación de absorbancia 520nm/650nm después de un ciclo de congelamiento/descongelamiento.

Al observar el color de las muestras se observa que este permanece rojo después del ciclo de congelamiento/descongelamiento (figuras 6-8).

Con respecto al espectro de absorbancia antes y después de un ciclo de congelamiento/descongelamiento, este disminuye en unidades de absorbancia, sin embargo se mantiene el patrón con un pick alrededor de los 520nm (ver figuras 5-7).

Al calcular la razón de absorbancia 520nm/650nm después de congelar. Se observa, en el caso de las proteínas de *A. crassa*, que el cociente aumenta a medida que aumenta la concentración de proteínas. No se observa dicho aumento en las muestras provenientes de *E. condorito* al aumentar la concentración de proteínas (figuras 6-8).

No se observó cambios en el espectro de absorbancia medido a diferentes tiempos después del ciclo de congelamiento/descongelamiento.

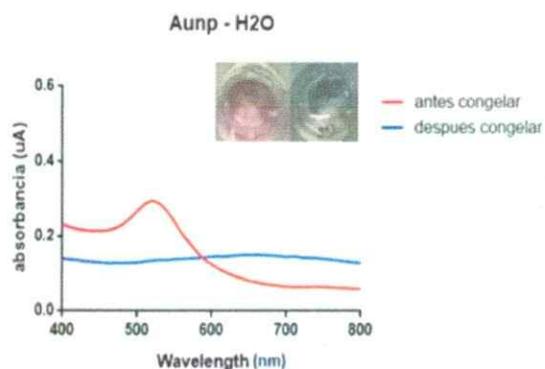
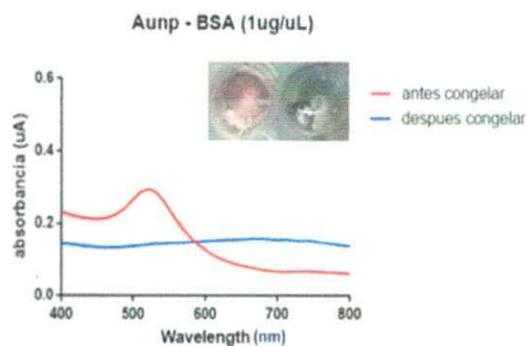
A**B**

Figura 6: Ensayo de inhibición del autoensamblaje de AuNPs, controles negativos. A) Espectro de absorbancia y fotos de solución de AuNPs más albúmina de serobovino (BSA) antes y después de un ciclo de congelación/descongelación. Se distingue el cambio en el patrón de absorbancia y el cambio de color de rojo a azul; B) Espectro de absorbancia y fotos de solución de AuNPs, antes y después de un ciclo de congelación/descongelación. Se distingue el cambio en el patrón de absorbancia y el cambio de color de rojo a azul.

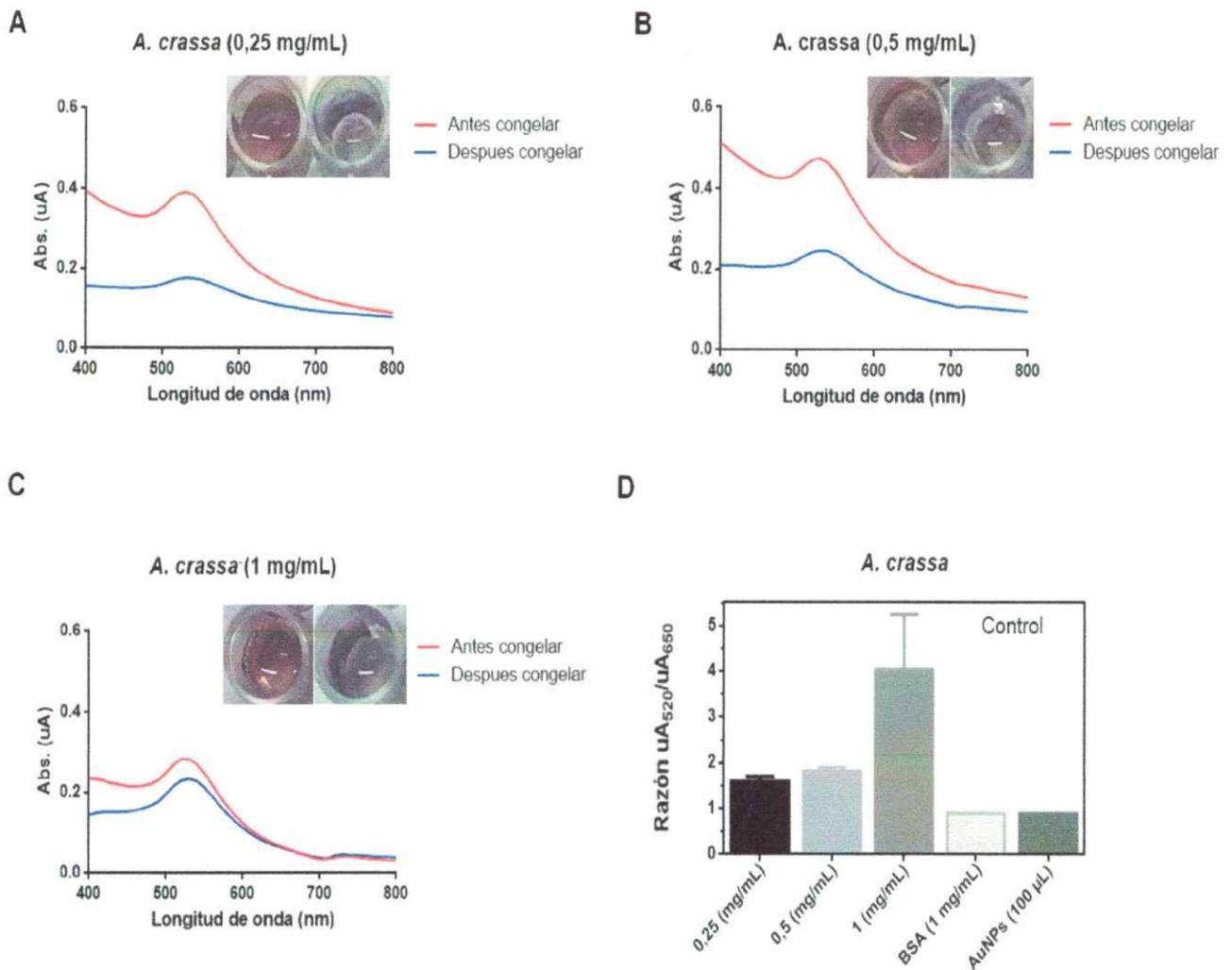


Figura 7: Ensayo de inhibición del autoensamblaje de AuNPs, proteínas hemolinfáticas de *A. crassa* más AuNPs, antes y después de un ciclo de congelamiento/descongelamiento. A) Espectro de absorbancia solución 0,25mg/mL; B) espectro de absorbancia solución 0,5mg/mL; C) espectro de absorbancia solución 1mg/mL; D) gráfico de barras de los valores del cociente uA_{520}/uA_{650} , después de un ciclo de congelamiento/descongelamiento, a la derecha se ven los valores de los controles negativos, BSA y AuNPs.

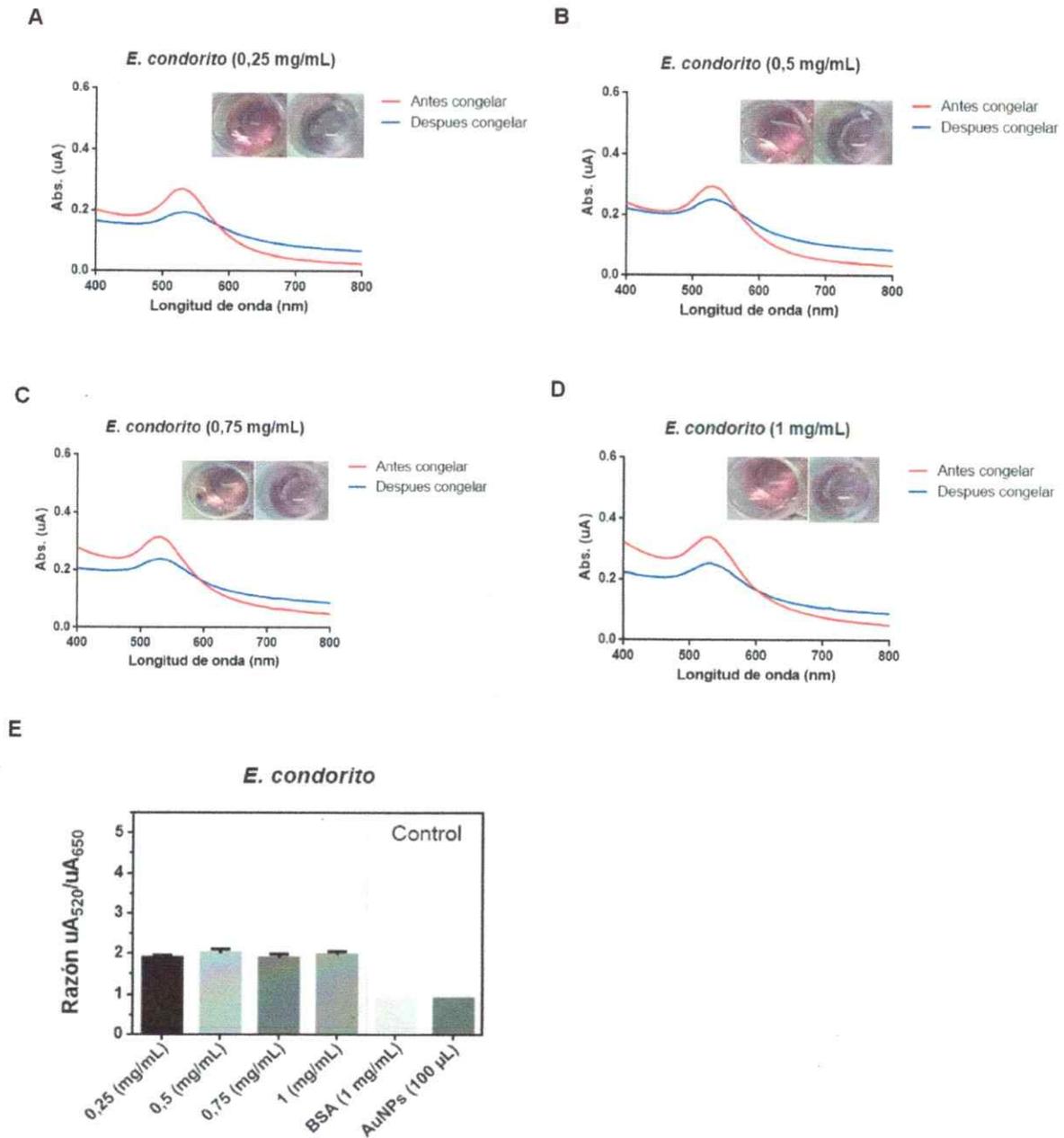


Figura 8: Ensayo de inhibición del autoensamblaje de AuNPs, proteínas hemolinfáticas de *E. condorito* más AuNPs, antes y después de un ciclo de congelamiento/descongelamiento. A) Espectro de absorbancia solución 0,25mg/mL; B) espectro de absorbancia solución 0,5mg/mL; C) espectro de absorbancia 0,75mg/mL; D) espectro de absorbancia solución 1mg/mL; E) gráfico de barras de los valores del cociente uA_{520}/uA_{650} , después de un ciclo de congelamiento/descongelamiento, a la derecha se ven los valores de los controles negativos, BSA y AuNPs.

DISCUSIÓN

Uno de los resultados fundamentales de este trabajo revela que *A. crassa*, perteneciente al orden Phasmatoidea, podría tolerar el congelamiento durante todo el año y mantiene la misma temperatura de congelamiento. Por otra parte, la araña *E. condorito*, evade la formación de cristales de hielo mediante el súperenfriamiento (o sobreenfriamiento) de sus fluidos corporales. Su capacidad de sobre enfriamiento se mantiene constante durante todo el año. Si bien la estrategia de tolerancia al enfriamiento se mantiene invariable en ambas especies, a pesar de las estaciones y la tasa de enfriamiento. Al modificar este último factor, la capacidad de sobreenfriarse varió significativamente. Cuando los animales fueron expuestos a tasas de enfriamiento lentas, aumentó su capacidad de sobreenfriamiento, disminuyendo el SCP promedio, 1,1 °C en *A. crassa* y 3,1 °C en *E. condorito*. Es importante mencionar que la tasa de enfriamiento de Farellones es considerablemente menor (~ 0,01 °C) a las tasas utilizadas en los experimentos de farellones. Este resultado puede ser fundamental para la sobrevivencia de *E. condorito* en su hábitat, ya que si la tendencia a aumentar la capacidad de sobreenfriarse cuando disminuye la tasa de enfriamiento se mantiene en el campo, la estrategia de evasión del congelamiento se vería favorecida.

A pesar de que ciertos aspectos conductuales como la búsqueda de microhábitats que sirvan como refugio ante las bajas temperaturas, podrían resultar de vital importancia en la sobrevivencia de los animales evasores de congelamiento (Kirchner 1987). Los resultados indican que *E. codorito* presenta la capacidad de sobreenfriarse, probablemente debido a los crioprotectores detectados en su hemolinfa.

Por otra parte, gracias al abultado número de trabajos que tienen por objetivo comprender la tolerancia a las bajas temperaturas en artrópodos, ha sido posible desarrollar hipótesis de carácter macrofisiológicas. Estudios recientes (Sinclair *et al.* 2003b; Sinclair & Chown 2005) han reconocido el predominio de la tolerancia al congelamiento en animales del Hemisferio Sur y la evasión al congelamiento en animales del Hemisferio Norte. Este patrón encuentra sustento en las características climáticas propias de cada hemisferio. Mientras el Hemisferio Sur presenta inviernos con temperaturas relativamente altas (cercasas a los 0°C), en el Hemisferio Norte el efecto de la estacionalidad es mucho más fuerte (Addo-Bediako *et al.* 2000; Chown *et al.* 2004). Además, debido a las oscilaciones climáticas provocadas por el fenómeno de El Niño, es común observar en el Hemisferio Sur, eventos climáticos impredecibles, como lluvias o nevadas de corta duración, en estaciones cálidas (Bonan 2016).

Aunque la hipótesis de “*los hemisferios*” resulta interesante, carece de datos experimentales para los artrópodos del Hemisferio Sur (Sinclair *et al.* 2003b) y esta no considera animales procedentes del cono sur de Sudamérica (Sinclair & Chown 2005).

Una segunda hipótesis general, de carácter evolutivo. Plantea que la evasión del congelamiento es una estrategia basal dentro del linaje de los artrópodos, y la tolerancia al congelamiento habría evolucionado posterior y de manera convergente en algunos grupos de artrópodos (Vernon & Vannier 2002; Sinclair *et al.* 2003b). Esta hipótesis se basa en evidencia experimental. Todos los artrópodos primitivos estudiados: arañas, escorpiones, ácaros, crustáceos. Son evasores de congelamiento (Duman 1979; Kirchner 1987; Lee & Baust 1985; Sinclair *et al.* 2003b; Duman *et al.* 2004; Vanin & Turchetto 2007).

A pesar de que el objetivo de este trabajo no es evaluar la validez de las hipótesis de “los hemisferios” ni “evolutiva”. Los resultados obtenidos son coherentes con las predicciones implícitas de ambas. *E. condorito*, artrópodo perteneciente a un clado basal del Phylum, se comporta como evasor de congelamiento y *A. crassa* insecto del hemisferio sur, propenso a experimentar temperaturas bajas de manera impredecible en estaciones cálidas, puede tolerar el congelamiento tanto en invierno como en verano.

Desde una perspectiva ecológica, la distinción de grados de tolerancia al congelamiento (Sinclair 1999), podría estar relacionada a las condiciones climáticas del hábitat. Especies que habitan regiones con temperaturas invernales altas (cerca de los 0°C), no necesitan soportar temperaturas subcero extremas (Sinclair *et al.* 2003a). Este sería el caso de nuestros modelos de estudios, donde las temperaturas más bajas registradas en sus microhábitat llega a -6°C (datos no publicados). Por otra parte, las especies que se encuentran activas en verano y deben soportar descensos repentinos de temperatura, corren serios riesgos de congelarse. Debido a su alimentación, existen altas probabilidades de que haya agentes de

nucleación en su estómago que favorezcan el congelamiento (Sinclair *et al.* 2003a). La Cordillera de los Andes presenta al menos un descenso de temperatura considerable en verano. Nuestros resultados indican que la estacionalidad no afecta ni el SCP ni la capacidad de tolerar el frío de nuestros modelos de estudio. *A. crassa* es moderadamente tolerante al congelamiento, con un SCP que no varía por efecto de la estación y *E. condorito* es evasor del congelamiento durante todo el año y la estación tampoco afecta su SCP. (Sinclair *et al.* 2003).

El SCP de *A. crassa* es de $-3,9^{\circ}\text{C}$ cuando se enfría a $1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ y -5°C cuando se enfría a $0,5^{\circ}\text{C min}^{-1}$. En ambos casos los animales fueron capaces de sobrevivir al congelamiento. Estas respuestas frente a las bajas temperaturas son semejantes a las observadas en insectos de Nueva Zelanda. Ambas especies *Hemideina maori* (Orthoptera: Anostomatidae) y *Celatoblatta quinquemaculata* (Blattodea: Blattidae) resisten congelamiento moderado de sus fluidos corporales (Ramlov *et al.* 1992; Wharton *et al.* 2009; Wharton 2011). *H. maori* tiene un SCP promedio de $-4,1 \pm 1,35^{\circ}\text{C}$ al ser enfriado a $0,4^{\circ}\text{C min}^{-1}$ (Ramlov *et al.* 1992) y *C. quinquemaculata* $-5,4 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ al ser enfriado a $1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ (Block *et al.* 1998). Además, un estudio reciente (Dennis *et al.* 2015), reconoce la tolerancia al congelamiento en dos insectos del orden Phasmatodea de Nueva Zelanda. Ambos *Niveaphasma annulata* (Diapheromeridae) y *Tectarchus salebrosus* (Diapheromeridae), al ser enfriados a $0,25^{\circ}\text{C min}^{-1}$, tienen SCP $-4,3$ y $-4,4$ respectivamente.

Dadas las semejanzas halladas en los insectos mencionados en el párrafo anterior, resulta interesante pensar que pueden existir patrones de distribución de las estrategias de tolerancia al enfriamiento a escala macrofisiológica (Chown *et al.* 2004; Chown & Sinclair 2010). No obstante es necesario aumentar la cantidad de

especies estudiadas en el Hemisferio Sur, especialmente el desconocido continente Sudamericano y su fauna de insectos tolerantes a las bajas temperaturas. Este trabajo es fundamental en este sentido, ya que es pionero en comprender el fenómeno de la tolerancia al enfriamiento en artrópodos de la Cordillera de los Andes. También es necesario reconocer los mecanismos que expliquen el funcionamiento de los organismos, en condiciones de estrés por enfriamiento. En este sentido, estudios bioquímicos han aportado gran cantidad de información acerca de los componentes moleculares y como estos pueden explicar el fenómeno de la tolerancia al enfriamiento (Davies 2014; Xu *et al.* 2016; Olijve *et al.* 2016).

Se ha descrito que los crioprotectores de bajo peso molecular como glicerol, trehalosa y glucosa actúan disminuyendo el punto de congelamiento de manera coligativa (Salt 1959; Ramløv 2000) o regulan el flujo osmótico a través de la membrana celular cuando estas son expuestas a bajas temperaturas (Crowe *et al.* 1984; Rudolph & Crowe 1985; Villarreal *et al.* 2004). En este trabajo se han observado diferencias considerables de trehalosa y glucosa en la hemolinfa de ambos modelos de estudio (tabla 3). *A. crassa* presenta altas concentraciones de trehalosa tanto en invierno como en verano, mientras que no se detectó trehalosa en la hemolinfa de *E. condorito*. Al congelarse los fluidos corporales, aumenta la desecación y aumentan las presiones osmóticas, la trehalosa podría estar funcionando como agente estabilizante en *A. crassa*,

Además, al comparar las concentraciones de estos azúcares, con las de otras especies documentadas en la literatura, tenemos que: *A. crassa* presenta niveles elevados de Trehalosa (199,67mM inv. Y 93,01mM ver.) Y glucosa (76,91mM). Estas concentraciones son semejantes a las reportadas para otras especies moderadamente

tolerantes a congelamiento del hemisferio sur, incluyendo, *Hemideina thoracica* (Bedford 1977), *H. maori* (Neufeld & Leader 1998) y *C. quinquemaculata* (Wharton *et al.* 2009).

Con respecto a *E. condorito*, solo se detectó la presencia de glucosa (9,10mM en invierno y 12,47mM en verano) en niveles superiores a los reportados para otras tarántulas, por ejemplo, (0,36mM) *Hexathele hochstetteri* (Bedford 1977), (0,7mM) *Eurypelma californicum* (Schartau & Leidescher 1983), (0,97mM) *Gramostola rosae* y (1mM) *Theraphosa blonda* (Zachariah *et al.* 2007). En ninguna de estas arañas se ha estudiado la tolerancia a las bajas temperaturas. Este podría ser un aspecto interesante de revisar, considerando las diferencias en los niveles de glucosa con *E. condorito*.

Aunque son muchos los trabajos que han cuantificado la concentración de glicerol en insectos (ver revisiones Salt 1959; Lee 1991), no son muchos los datos referentes a la cantidad de glicerol en la hemolinfa de arañas resistentes a las bajas temperaturas (Kirchner & Kestler 1969; Duman 1979a). En este trabajo se reportan concentraciones de glicerol de 1,20mM para *A. crassa* y 3,2mM de glicerol para *E. condorito*. En ambos casos estas concentraciones son menores a las reportadas para otras especies resistentes a las bajas temperaturas (Duman 1979a; Lee 1991), por lo tanto, es posible que el glicerol no cumpla un rol fundamental en la crioprotección de estos organismos.

Además de los polialcoholes y azúcares, también existen proteínas de unión a hielo (IBP), que aportan protección a los artrópodos tolerantes a bajas temperaturas (Duman 2015). El análisis del patrón de bandeado por SDS-PAGE, indica que *A.*

crassa presenta proteínas de bajo peso molecular, que coinciden con el rango esperado para las AFPs (Ramløv 2000). No se observan proteínas de bajo peso molecular en los geles de *E. condorito*.

Mediante la técnica, recientemente desarrollada, de inhibición del autoensamblaje de AuNPs (Park *et al.* 2013). Se detectó en la hemolinfa de ambas especies, proteínas capaces de inhibir la aglomeración de AuNPs después de un ciclo de congelamiento/descongelamiento. Estos resultados no nos permiten identificar específicamente, cual proteína es responsable de inhibir la recristalización, pero al comparar el efecto de las proteínas hemolinfáticas con el control negativo BSA, es posible concluir que se inhibe el auto ensamblaje de las AuNPs al agregar las proteínas hemolinfáticas.

No obstante, es importante ser cauto con la interpretación de los resultados, ya que existe la posibilidad de interferencia por interacciones no específicas entre las AuNPs y las proteínas (Sharma & Deswal 2014). Por lo tanto sería importante corroborar estos resultados con metodologías más específicas, por ejemplo medir la histéresis térmica de la hemolinfa un osmómetro de nanolitros

Contrariamente a la hipótesis pensada en un comienzo, o sea, animales evasores de congelamiento presentan altos niveles AFP (Duman 1977). Los modelos aquí estudiados responden con dos estrategias alternativas y ambos tienen proteínas con actividad anticongelante en la hemolinfa. Este resultado es coherente con la creciente evidencia, que demostró que las AFPs se hayan en ambos, evasores y tolerantes al congelamiento (Duman 1979b; Duman 2001). En artrópodos evasores de congelamiento, como *E. condorito*, las AFP se adhieren a la superficie de los

cristales de hielo e impiden su crecimiento (inhibición de la recristalización). Además, estas pueden enmascarar el efecto letal de posibles agentes de nucleación de hielo (Graether & Sykes 2004). Por otra parte, en animales tolerantes a congelamiento, como *A. crassa*, las AFP controlan la tasa de crecimiento de los cristales de hielo, normalmente formados a temperaturas subcero relativamente altas (< -10°C), gracias a la acción de agentes de nucleación endógenos (Proteínas de nucleación) o exógenos (alimento ingerido, bacterias o cristales inoculados a través de la cutícula) (Storey & Storey 2013).

Finalmente, cabe mencionar las aplicaciones prácticas que surgen a partir del conocimiento de la biología de los artrópodos a bajas temperaturas. En este sentido, se han propuesto protocolos para criopreservar embriones de distintos insectos (Wang *et al.* 2000; Leopold *et al.* 2001) donde se remarca el uso de la trehalosa como crioprotector, y la importancia de la tasa de enfriamiento en el éxito de los tratamientos (Fahy 1995). El conocimiento de la biología a bajas temperaturas de artrópodos plaga, es útil para manejar su efecto negativo en la agricultura, mediante el uso de tecnologías que los lleven a condiciones térmicas letales (Bale 1991; Bale 2010). Por último, se ha propuesto el uso de proteínas anticongelantes, como posibles aditivos en los alimentos (Ustun & Turhan 2015), esta es una industria en desarrollo con desafíos y oportunidades interesantes. En la medida que más conozcamos acerca de la biología a bajas temperaturas, mejor tecnología podrá ser desarrollada para dar solución a problemas de interés social.

CONCLUSIÓN

Este estudio revela que dos artrópodos de los Andes de Chile central, responden con estrategias alternativas a las bajas temperaturas. *E. condorito* evita congelarse mediante el sobreenfriamiento de sus fluidos corporales y *A. crassa* soporta el congelamiento (a temperaturas no menores a -10°C) de sus fluidos corporales. Además, estas estrategias no se ven afectadas ni por las estaciones ni la tasa de enfriamiento. No obstante, la tasa de enfriamiento afecta significativamente la capacidad de sobreenfriamiento en ambas especies.

El SCP de *A. crassa* es de $-3,9^{\circ}\text{C}$ cuando se enfría a $1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ y -5°C cuando se enfría a $0,5^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Mientras que *E. condorito* presenta un SCP de -3 a una tasa de enfriamiento de $1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ y -6°C al enfriarse a $0,5^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Por lo tanto, ante un enfriamiento rápido, los animales presentan menor capacidad de sobreenfriamiento y frente a un enfriamiento lento, los animales aumentan su capacidad de sobreenfriamiento. Esta respuesta frente a la tasa de enfriamiento podría ser fundamental en la sobrevivencia de *E. condorito*.

Además se identificó sustancias crioprotectoras de alto y bajo peso molecular en la hemolinfa de ambas especies. Coherentemente con las respuestas estacionales ante el

enfriamiento, las concentraciones de crioprotectores no variaron significativamente en individuos de invierno y verano, pero si entre especies.

Dentro de las sustancias crioprotectoras de bajo peso molecular estudiadas, solo se observó altas concentraciones de trehalosa en *A. crassa*, sobre 100mM. Concentraciones de glucosa elevadas fueron halladas en ambas especies. Mientras que el glicerol fue detectado en ambas especies, pero en concentraciones bajas en comparación a las halladas en otras especies tolerantes al enfriamiento.

Con respecto a las sustancias crioprotectoras de naturaleza proteica, se observó diferencias en el patrón de bandeo por SDS-PAGE entre ambas especies. Solo *A. crassa* presenta proteínas de bajo peso molecular, las cuales están dentro del rango de pesos moleculares descritos para proteínas anticongelantes. Adicionalmente, se observó actividad anticongelante en las proteínas hemolinfáticas de ambas especies.

BIBLIOGRAFÍA

- Addo-Bediako, A., Chown, S.L. & Gaston, K.J., 2000. Thermal tolerance, climatic variability and latitude. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 267(1445), pp. 739–745.
- Albert, G.C., Roumeliotis, M. & Carson, J.J.L., 2009. The effect of temperature and freeze – thaw processes on gold nanorods. *Nanotechnology*, 20(505502), pp. 1–6.
- Alfaro, C., Figueroa, D.P., Torres, H., Veloso, C., Venegas, F., Canals, L. & Canals, M., 2013. Effect of thermal acclimation on preferred temperatures in two mygalomorph spiders inhabiting contrasting habitats. *Physiological Entomology*, 38(1), pp. 20–25.
- Bale, J.S., 1991. Implications of Cold Hardiness for Pest Management. In Lee R.E. & Denlinger, D.L. (Eds.). *Insects at Low Temperature*. Boston, MA: Springer US, pp. 461–498.
- Bale, J.S., 1993. Classes of Insect Cold Hardiness. *Functional Ecology*, 7, pp. 751–753.
- Bale, J.S., 2002. Insects and low temperatures: from molecular biology to distributions and abundance. *Philosophical Transaction of the Royal Society of London B*, 357, pp. 849–862.
- Bale, J.S., 2010. Implications of cold-tolerance for pest management. In Denlinger, D.L. & Lee, R.E. (Eds.). *Low Temperature Biology of Insects*. Cambridge University Press, pp. 342–374.

- Bedford, J.J., 1977. The carbohydrate levels of insect haemolymph. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology*, 57(1), pp.83–86.
- Block, W., Wharton, D. & Sinclair, B., 1998. Cold tolerance of a New Zealand alpine cockroach, *Celatoblatta quinque-maculata* (Diptera, Blattellidae). *Physiological Entomology*, 23, pp.1–6.
- Bonan, G., 2016. *Ecological climatology, concepts and applications*, chapter 7. Cambridge University Press, pp. 103–115.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, pp.248–254.
- Chown, S.L., Sinclair, B.J., Leinaas, H.P. & Gaston, P.J., 2004. Hemispheric asymmetries in biodiversity - A serious matter for ecology. *PLoS Biology*, 2(11), pp. 1701-1107.
- Chown, S.L., Gaston, K.J. & Robinson, D., 2004. Macrophysiology: large-scale patterns in physiological traits and their ecological implications. *Functional Ecology*, 18(2), pp.159–167.
- Chown, S.L. & Nicolson, S.W., 2004. *Insect Physiological Ecology mechanisms and patterns*, chapter 5. Oxford University Press, pp. 115–150.
- Chown, S.L. & Sinclair, B.J., 2010. The macrophysiology of insect cold-hardiness. In Denlinger, D.L. & Lee, R.E. (Eds.). *Low Temperature Biology of Insects*. Cambridge University Press, pp. 191–293.
- Crowe, J.H., Crowe, L.M. & Chapman, D., 1984. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science*, 223(4637), pp. 701–703.
- Davies, P.L., 2014. Ice-binding proteins: a remarkable diversity of structures for stopping and starting ice growth. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(11), pp. 548–555.

- Dennis, A.B., Dunning L.T., Dennis, C.J., Sinclair B.J. & Buckley T.R., 2014. Overwintering in New Zealand stick insects. *New Zealand Entomologist*, 37(1) pp.37-41.
- Dennis, A.B., Dunning L.T., Sinclair, B.J., & Buckley, T.R., 2015. Parallel molecular routes to cold adaptation in eight genera of New Zealand stick insects. *Nature Scientific Reports* 5, 13965.
- DeVries, A.L. & Wohlschlag, D.E., 1969. Freezing resistance in some Antarctic fishes. *Science*, 163(3871), pp. 1073-1075.
- DeVries, A.L., 1971. Glycoproteins as biological antifreeze agents in Antarctic fishes. *Science* 172, pp.1152-1155.
- Duman, J.G., 1977. The role of macromolecular antifreeze in the darkling beetle, *Meracantha contracta*. *Journal of comparative physiology*, 115(2), pp.279-286.
- Duman, J.G., 1979a. Subzero temperature tolerance in spiders: The role of thermal-hysteresis-factors. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical*, 352, pp. 347-352.
- Duman, J.G., 1979b. Thermal-hysteresis-factors in overwintering insects. *Journal of Insect Physiology*, 25(10), pp. 805-810.
- Duman, J.G., 2001. Antifreeze and Ice Nucleator Proteins in Terrestrial Arthropods. *Annual Review of Physiology*, 63(1), pp. 327-357.
- Duman, J.G., Bennett, V., Sformo, T., Hochstrasser, R. & Barnes, B.M., 2004. Antifreeze proteins in Alaskan insects and spiders. *Journal of Insect Physiology*, 50(4), pp. 259-266.
- Duman, J.G., 2015. Animal ice-binding (antifreeze) proteins and glycolipids: an overview with emphasis on physiological function. *Journal of Experimental Biology*, 218(12), pp. 1846-1855.

- Ewart, K.V., Lin, Q. & Hew, C.L., 1999. Structure, function and evolution of antifreeze proteins. *55*, pp. 271–283.
- Fahy, G.M., 1995. Role of Nucleation in Cryopreservation. In Lee, R.E., Gareth, J.W. & Gusta, L.V. (Eds.). *Biological Ice Nucleation and Its Applications*. pp. 315–337.
- Fling, S.P. & Gregerson, D.S., 1986. Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Analytical biochemistry*, *155*(1), pp.83–88.
- Graether, S.P. & Sykes, B.D., 2004. Cold survival in freeze-intolerant insects. The structure and function of β -helical antifreeze proteins. *European Journal of Biochemistry*, *329*(6), pp. 3285–3296.
- Hahn, D.A., Martin, A.R. & Porter, S.D., 2008. Body Size, but Not Cooling Rate, Affects Supercooling Points in the Red Imported Fire Ant, *Solenopsis invicta*. *Environmental Entomology*, *37*(5) pp. 1074–1080
- Hakim, A., Nguyen, J.B., Basu, B., Zhu, D.F., Thakral, D., Davies, P.L., Isaac, F.J., Modis, Y. & Meng, W., 2013. Crystal Structure of an Insect Antifreeze Protein and Its Implications for Ice Binding. *Journal of Biological Biochemistry*, *288*(17), pp. 12295–12304.
- Jia, Z. & Davies, P.L., 2002. Antifreeze proteins: an unusual receptor – ligand interaction. *Trends in Biochemical Sciences*, *27*, pp. 101–106.
- Johnson, N.L., 1949. Systems of Frequency Curves Generated by Methods of Translation. *Biometrika*, *36*(1), pp.149–176.
- Kirchner, W & Kestler, P., 1969. Untersuchungen zur Kälteresistenz der Schilfradspinne *Araneus cornutus* (Araneidae). *Journal of Insect Physiology*, *15*(1), pp.41–53.
- Kirchner, W., 1987. Behavioural and Physiological Adaptations to Cold. In Nentwig, W. (Ed.). *Ecophysiology of Spiders*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 66–77.

- Lee, R.E. & Baust, J.G., 1985. Low temperature acclimation in the desert spider, *Agelenopsis aperta* (Araneae: Agelenidae). *The Journal of Arachnology*, 13, pp. 129–136.
- Lee, R.E., 1991. Principles of insect low temperature tolerance. In Lee, R.E. & Denlinger, L.E. (Eds.). *Insects at Low Temperature*. Boston, Springer US, pp. 17–46.
- Lee, R.E. & Costanzo, J.P., 1998. Biological ice nucleation and ice distribution in cold-hardy ectothermic animals. *Annual Review of Physiology*, 60, pp.55–72.
- Lee, R.E., 2010. A primer on insect cold-tolerance. In Denlinger, D.L. & Lee, R.E., (Eds.). *Low Temperature Biology of Insects*, Cambridge University Press, pp.3–34.
- Leopold, R.A. Wang, W.B., Berkebile, D.R. & Freeman, T.P., 2001. Cryopreservation of embryos of the New World screwworm *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Annals of the Entomological Society of America*, 94(5), pp.695–701.
- Marshalla, C.B., Daley, M.E., Graham, L.A., Sykes, B.D. & Davies, P.L., 2002. Identification of the ice-binding face of antifreeze protein from *Tenebrio molitor*. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 529, pp. 261–267
- Mitchell, D.E., Congdon, T., Rodger, A. & Gibson, M.I., 2015. Gold Nanoparticle Aggregation as a probe of antifreeze (glyco) protein-inspired ice recrystallization inhibition and identification of new IRI active macromolecules. *Nature Scientific Reports*, 5, 15716;
- Neufeld, D.S. & Leader, L.P., 1998. Freezing survival by isolated Malpighian tubules of the New Zealand alpine weta *Hemideina maori*. *The Journal of experimental biology*, 201(1998), pp.227–236.
- Olijve, L.C., Meister, K., DeVries, A.L., Duman, J.G., Guo, S., Bakker, H.J. & Voets, I.K., 2016. Blocking rapid ice crystal growth through nonbasal plane adsorption of antifreeze proteins. *PNAS*, 113(14), pp. 3740–3745
- Park, J., Lee, J.H., Gwak, Y., Kim, H.J., Jin, E. & Kim, Y., 2013. Biosensors and Bioelectronics Frozen assembly of gold nanoparticles for rapid analysis of antifreeze protein activity. *Biosensors and Bioelectronic*, 41 pp. 752–757.

Perafán, C. & Pérez-miles, F., 2014. The Andean tarantulas *Euathlus* Ausserer , 1875, *Paraphysa* Simon, 1892 and *Phrixotrichus* Simon, 1889 (Araneae: Theraphosidae): phylogenetic analysis , genera redefinition and new species descriptions. *Journal of Natural History*, 48: 39-40, pp. 2389-2418

Ramløv, H., Bedford, J. & Leader, J., 1992. Freezing tolerance of the New Zealand alpine weta, *Hemideina maori* Hutton [Orthoptera; Stenopelmatidae]. *Journal of Thermal Biology*, 17(1), pp. 51-54.

Ramløv, H., 2000. Aspects of natural cold tolerance in ectothermic animals. *Human reproduction* (Oxford, England), 15(5), pp. 26-46.

Rudolph, A.S. & Crowe, J.H., 1985. Membrane stabilization during freezing: The role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. *Cryobiology*, 22(4), pp.367-377.

Salt, R.W., 1936. Studies on the Freezing Process in Insects Studies on the Freezing Process in Insects. *Technical Bulletin of Division of Entomology and Economic Zoology*, 116.

Salt, R.W., 1959. Role of glycerol in the cold-hardening of *Bracon cephi* (Gahan). *Canadian Journal of Zoology*, 37(107), pp.59-69.

Salt, R.W., 1961. Principles of insect cold-hardiness. *Annual Review of Entomology*, 6(34), pp.55-74.

Salt, R.W., 1966. Factors influencing nucleation in supercooled insects. *Canadian Journal of Zoology*, 44(1), pp.117-133.

Schartau, W. & Leidescher, T., 1983. Composition of the hemolymph of the tarantula *Eurypelma californicum*. *Journal of Comparative Physiology B*, 152(1), pp.73-77.

Sharma, B. & Deswal, R., 2014. Antifreeze proteins in plants: An overview with an insight into the detection techniques including nanobiotechnology. *Journal of Proteins and Proteomics*, 5(August), pp.89-107.

Sinclair, B.J., 1999. Insect cold tolerance, how many kind of frozen. *European Journal of Entomology*, 96(157), pp. 157–164.

Sinclair, B.J., Vernon, P., Klok, C.J. & Chown, S.L., 2003a. Insects at low temperatures: an ecological perspective. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(5), pp. 257–262.

Sinclair, B.J., Addo-Bediako, A. & Chown, S.L., 2003b. Climatic variability and the evolution of insect freeze tolerance. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 78(2), pp. 181–195.

Sinclair, B. & Chown, S.L., 2005. Climatic variability and hemispheric differences in insect cold tolerance : support from southern Africa. *Functional Ecology*, 19, pp.214–221.

Sinclair, B.J., Alvarado, L.E. & Ferguson, L.V., 2015. An invitation to measure insect cold tolerance : Methods, approaches, and work flow. *Journal of Thermal Biology*, 53, pp. 180–197.

Storey, K.B. & Storey, J.M., 1988. Freeze tolerance in animals. *Physiological Reviews*, 68(1), pp. 27–84.

Storey, K.B., 1997. Organic Solutes in Freezing Tolerance. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 117(3), pp. 319–326.

Storey, K.B. & Storey, J.M., 2013. Molecular Biology of Freezing Tolerance. *Comprehensive Physiology*, 3, pp. 1283–1308.

Thienel, M., Canals, M., Bozinovic, F. & Veloso, C., 2015. The effects of temperature on the gas exchange cycle in *Agathemera crassa*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 183, pp.126–130.

Ustun, N.S. & Turhan, S., 2015. Antifreeze proteins: characteristics, function, mechanism of action, sources and application to foods. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6), pp.3189–3197.

Vanin, S. & Turchetto, M., 2007. Winter activity of spiders and pseudoscorpions in the South-Eastern Alps (Italy). *Italian Journal of Zoology*, 74, pp.31–38.

Veloso, C., Luhr, D., Marfull, R., Torres-Contreras, H., Figueroa, D., Sabat, P. & Canals, M., 2012. Characterization of the thermal micro-environment of *Paraphysa parvula* Pocock

1903 (Araneae: Theraphosidae), a spider from the Chilean. *Journal of Arachnology*, 40(1), pp.34–38.

Vernon, P. & Vannier, G., 2002. Evolution of freezing susceptibility and freezing tolerance in terrestrial arthropods. *Comptes rendus biologiques*, 325(12), pp.1185–1190.

Villarreal, M.A., Díaz S.B., Disalvo, E.A. & Montich, G.G., 2004. Molecular dynamics simulation study of the interaction of trehalose with lipid membranes. *Langmuir*, 20(18), pp.7844–7851.

Wang, W.B., Leopold, R.A., Nelson, D.R. & Freeman, T.P., 2000. Cryopreservation of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) Embryos. *Cryobiology*, 41(2), pp.153–166.

Wharton, D.A., 2011. Cold tolerance of New Zealand alpine insects. *Journal of Insect Physiology*, 57(8), pp.1090–1095.

Wharton, D.A., Pow, B., Kristensen, M., Ramløv, H. & Marshall, C.J., 2009. Ice-active proteins and cryoprotectants from the New Zealand alpine cockroach, *Celatoblatta quinquemaculata*. *Journal of Insect Physiology*, 55(1), pp.27–31.

Wilson, P. & Ramlov, H., 1995. Hemolymph ice nucleating proteins from the New Zealand alpine weta *Hemideina maori* (Orthoptera, Stenopelmatidae). *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, 112(3), pp.535–542.

Xu, Y., Bäumer, A., Meister, K., Bischak, C.G., DeVries, A.L. & Leitner, D.M., 2016. Protein-water dynamics in antifreeze protein III activity. *Chemical Physics Letters*, 647, pp.1-6.

Zachariah T.T., Mitchell M.A., Guichard, M.G., and Singh, R.S., 2007. Hemolymph biochemistry reference ranges for wild- caught goliath birdeater spiders (*Theraphosa blondi*) and chilean rose spiders (*Grammostola rosea*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 38(2), pp. 245-251.

ANEXO

n	Especie	Estación	Tasa enfriamiento (°C min-1)	masa (g)	Sexo	Desarrollo	SCP (°C)
1	<i>A. crassa</i>	Verano	1	7,18	Hembra	Adulto	-5,1
2	<i>A. crassa</i>	Verano	1	7,24	Hembra	Adulto	-4,3
3	<i>A. crassa</i>	Verano	1	3,4	Macho	Adulto	-5,5
4	<i>A. crassa</i>	Verano	1	2,8	Macho	nd	-6,7
5	<i>A. crassa</i>	Verano	1	7,17	Hembra	Adulto	-2,5
6	<i>A. crassa</i>	Verano	1	6,58	Hembra	Juvenil	-2,5
7	<i>A. crassa</i>	Verano	1	6,58	Hembra	Juvenil	-2,8
8	<i>A. crassa</i>	Verano	1	3,15	Macho	Adulto	-2,8
9	<i>A. crassa</i>	Verano	1	3,23	Hembra	Juvenil	-2,9
10	<i>A. crassa</i>	Invierno	1	3,37	Macho	Adulto	-2,5
11	<i>A. crassa</i>	Invierno	1	2,9	Macho	Adulto	-2,8
12	<i>A. crassa</i>	Invierno	1	2,93	Macho	Adulto	-3,1
13	<i>A. crassa</i>	Invierno	1	1,2	Macho	Juvenil	-6,1
14	<i>A. crassa</i>	Invierno	1	0,63	nd	Juvenil	-7,6
15	<i>A. crassa</i>	Invierno	1	0,66	nd	Juvenil	-8
16	<i>A. crassa</i>	Invierno	1	6,84	Hembra	Adulto	-2,1
17	<i>A. crassa</i>	Invierno	1	6,91	Hembra	Adulto	-2,6
18	<i>A. crassa</i>	Invierno	1	3,04	Macho	Adulto	-3
19	<i>A. crassa</i>	Invierno	1	6,28	Hembra	Juvenil	-2,4
20	<i>A. crassa</i>	Invierno	1	1,98	Macho	Juvenil	-2,7
21	<i>A. crassa</i>	Invierno	1	2,21	Macho	Juvenil	-2,8
22	<i>A. crassa</i>	Invierno	0,5	5,41	Hembra	Juvenil	-3,9
23	<i>A. crassa</i>	Invierno	0,5	3,62	Hembra	Juvenil	-6,5
24	<i>A. crassa</i>	Invierno	0,5	3,1	Macho	Adulto	-6,5
25	<i>A. crassa</i>	Invierno	0,5	4,16	Hembra	Juvenil	-5,9
26	<i>A. crassa</i>	Invierno	0,5	2,63	Macho	Juvenil	-4
27	<i>A. crassa</i>	Invierno	0,5	2,7	Macho	Adulto	-4,6
28	<i>A. crassa</i>	Invierno	0,5	2,6	Macho	Juvenil	-4,4
29	<i>A. crassa</i>	Invierno	0,5	2,67	Hembra	Juvenil	-5,5
30	<i>A. crassa</i>	Invierno	0,5	3,17	Hembra	Juvenil	-4,2
31	<i>A. crassa</i>	Invierno	0,5	2,8	Macho	Adulto	-4,5
32	<i>A. crassa</i>	Invierno	0,5	2,6	Hembra	Juvenil	-5,5
1	<i>E. condodrito</i>	Verano	1	6,39	Hembra	Adulto	-2,2
2	<i>E. condodrito</i>	Verano	1	1,69	nd	Juvenil	-6,6

3	<i>E. condodrito</i>	Verano	1	3,19	nd	Juvenil	-2,3
4	<i>E. condodrito</i>	Verano	1	4,28	Hembra	Adulto	-2,5
5	<i>E. condodrito</i>	Verano	1	3,5	Macho	Juvenil	-2,3
6	<i>E. condodrito</i>	Verano	1	2,73	Macho	Juvenil	-1,7
7	<i>E. condodrito</i>	Invierno	1	2,17	nd	Juvenil	-2,6
8	<i>E. condodrito</i>	Invierno	1	0,87	nd	Juvenil	-4
9	<i>E. condodrito</i>	Invierno	1	0,79	nd	Juvenil	-5,2
10	<i>E. condodrito</i>	Invierno	1	0,68	nd	Juvenil	-2,4
11	<i>E. condodrito</i>	Invierno	1	0,67	nd	Juvenil	-2,9
12	<i>E. condodrito</i>	Invierno	1	1,23	nd	Juvenil	-4,9
13	<i>E. condodrito</i>	Invierno	1	5,46	Hembra	Adulto	-1,8
14	<i>E. condodrito</i>	Invierno	1	2,82	nd	Juvenil	-2,5
15	<i>E. condodrito</i>	Invierno	1	4,89	nd	Juvenil	-1,8
16	<i>E. condodrito</i>	Invierno	1	5,37	Hembra	Adulto	-2,2
17	<i>E. condodrito</i>	Invierno	1	2,18	nd	Juvenil	-2,9
18	<i>E. condorito</i>	Invierno	0,5	5,34	Hembra	Adulto	-6,4
19	<i>E. condorito</i>	Invierno	0,5	4,91	Hembra	Adulto	-6,7
20	<i>E. condorito</i>	Invierno	0,5	4,38	Hembra	Adulto	-6,7
21	<i>E. condorito</i>	Invierno	0,5	3,39	nd	Juvenil	-5,8
22	<i>E. condorito</i>	Invierno	0,5	2,2	nd	Juvenil	-5
23	<i>E. condorito</i>	Invierno	0,5	1,76	nd	Juvenil	-6,2
24	<i>E. condorito</i>	Invierno	0,5	1,12	nd	Juvenil	-6,7
25	<i>E. condorito</i>	Invierno	0,5	0,89	nd	Juvenil	-5,9

Resumen del material estudiado: Se muestra el número total de especímenes utilizados para las mediciones de SCP, tasas de enfriamiento, estaciones de colecta, masa corporal, sexo y estado de desarrollo. nd = no determinado.