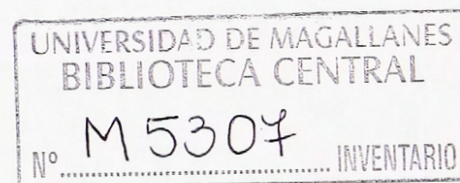


UNIVERSIDAD DE MAGALLANES
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS Y RECURSOS NATURALES

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE
LA METALOTIONEINA EN EL ERIZO ANTÁRTICO**
(Sterechinus neumayeri)



Tania Carolina Figueroa Delgado

Dr. Marcelo González
Director de Tesis

Dra. María Soledad Astorga
Co-Directora de Tesis

2009

30/01/2012
Donación

UNIVERSIDAD DE MAGALLANES
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS Y RECURSOS NATURALES

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE
LA METALOTIONEINA EN EL ERIZO ANTÁRTICO
(*Sterechinus neumayeri*)**

Tania Carolina Figueroa Delgado

Dr. Marcelo González
Director de Tesis

Dra. María Soledad Astorga
Co-Directora de Tesis

2009

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE
LA METALOTIONEINA EN EL ERIZO ANTÁRTICO
(*Sterechinus neumayeri*)**

Por

Departamento de Ciencias y Recursos Naturales

Fecha :

Aprobado Comisión de Calificación

Decano

Tesis entregada como un requerimiento para obtener el título de
Biólogo Marino en la Facultad de Ciencias.

2009

UNIVERSIDAD DE MAGALLANES
FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Ciencias y Recursos Naturales

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE
LA METALOTIONEINA EN EL ERIZO ANTÁRTICO
(*Sterechinus neumayeri*)**

Tesis presentada para optar al Título de Biólogo Marino

Tania Carolina Figueroa Delgado

Punta Arenas, Noviembre 2009

RESUMEN

Los organismos marinos son altamente sensibles a muchos tipos de estrés ambiental y consecuentemente el análisis de sus respuestas moleculares es muy importante para comprender sus mecanismos de adaptación a un medio ambiente contaminado. Este trabajo tiene por objetivo caracterizar la expresión del gen de la metalotioneína en celomocitos del erizo antártico *Sterechinus neumayeri* en respuesta al estrés por metales pesados.

Para esto primeramente se evaluó la relación entre la cantidad de celomocitos totales y células rojas en distintos experimentos de exposición a cloruro de cadmio (CdCl_2), por medio de baño y de inyección directa en la cavidad celómica. En ambos experimentos se observó un aumento en la cantidad de celomocitos, sin embargo solo se obtuvieron diferencias significativas en aquellos organismos estimulados a través de inyección de CdCl_2 a 100 $\mu\text{g/L}$ y 200 $\mu\text{g/L}$. En cuanto a la viabilidad celular esta no se vió afectada de mayor manera en ambas experiencias. Respecto del análisis molecular, los valores de cuantificación semicuantitativa de la expresión de la metalotioneína demostraron ser mucho mayores en aquellos organismos que fueron estimulados a 100 $\mu\text{g/L}$ de CdCl_2 a diferencia de aquellos estimulados a 200 $\mu\text{g/L}$.

Este es el primer reporte en equinodermos donde se caracteriza una metalotioneína desde celomocitos y en una especie antártica como *S. neumayeri*. Las diferentes concentraciones de cadmio ensayadas estimularon o bloquearon la proliferación de los celomocitos dependiendo de la concentración de cadmio que se utilice. La expresión del gen de la metalotioneína en celomocitos de *S. neumayeri* es inductible y puede variar en el tiempo. Las MTs (metalotioneínas) han sido definidas como proteínas multifunción ya que no solo participan en procesos de detoxificación de metales pesados, sino también como secuestradores de especies reactivas de oxígeno. La alta viabilidad obtenida en los celomocitos podría esta asociada a esta capacidad. Finalmente, la expresión de la MT podría ser una buena herramienta como biomarcador ante la contaminación por metales pesados.

ABSTRACT

The marine organisms are highly sensitive to many types of environmental stress. The analysis of their molecular responses is extremely important to understand their adaptation mechanisms in contaminated environments. The aim of this research is to characterize the expression of metallothionein gene in coelomocytes of the antarctic sea urchin *Stereochinus neumayeri* in response to heavy metal stress.

Firstly, the relation between the amount of coelomocytes and red cells was evaluated when sea urchin was exposed to cadmium chloride (CdCl_2) by immersion and a direct injection in the coelomic cavity. In both experiments an increase in the coelomocytes number was observed; however significant differences were seen only in the organisms stimulated with CdCl_2 to 100 $\mu\text{g/L}$ and 200 $\mu\text{g/L}$ through injection. The cellular viability was not affected in any of the experiments. The molecular analysis by RT-PCR semi quantitative quantification showed higher values of metallothionein expression in organisms stimulated with 100 $\mu\text{g/L}$ of CdCl_2 in difference those stimulated to 200 $\mu\text{g/L}$.

This is the first report in echinoderms which characterizes a metallothionein from coelomocytes in a Antarctic sea urchin as *S. neumayeri*. The different cadmium concentrations tested stimulated or blocked the proliferation of coelomocytes depending on the concentration of cadmium used. The expression of the metallothionein gene in coelomocytes of *S. neumayeri* was inducible and could vary over time. The MTs have been identified as multifunctional protein, since not only they were involved in detoxification processes of heavy metals, but also as scavenger of reactive oxygen species. The high viability obtained in coelomocytes could be associated with this ability of metallothionein. Finally, we demonstrated that the expression of MT might be a good tool as a biomarker to heavy metal pollution.

AGRADECIMIENTOS

Fue como una larga historia con un pronto final, un camino recorrido con muchas dificultades y también con muchos triunfos, conociendo gente maravillosa y enfrentando todo aquello que te hace más fuerte, más persona, que te recuerda por lo cual estás luchando y con quien contar cuando crees que vas a desfallecer, hay tantos a quienes agradecer.

En primer lugar quisiera agradecer al Dr Marcelo González jefe del departamento científico (DECIEN) del INACH, quien me dio la oportunidad de integrarme en su proyecto INACH 2008-2010, denominado “Inducción de la respuesta inmune en el erizo antártico *Sterechinus neumayeri* por efecto del estrés térmico y patrones moleculares de patógenos” , desde mi inicio en la institución con mi práctica, así como la realización de mi tesis, muchas gracias por su guía y por querer hacer de mi tesis un trabajo mejor. También quisiera agradecer por la beca que se me otorgó como parte del convenio INACH- FACH- CORREOS DE CHILE, lo cual me permitió viajar al continente antártico y así poder tomar las muestras necesarias para mi trabajo de tesis, así como también conocer ese maravilloso lugar del cual solo tenía conocimientos por libros y fotografías, que hermoso era despertar y tener en frente los magníficos hielos, el silencio, vivir la antártica!, gracias a toda la gente de la Base Frei y en especial a la gente de Base Escudero, me apoyaron mucho, en todo, desde el armado de mis acuarios hasta la toma de muestras!, como no dejar de mencionar al equipo del CEQUA, Carlos Olavarría, Ema NewCombe. César Cárdenas, sin ellos no hubiera tenido erizos, gracias por congelarse un poquito más en esas gélidas aguas para conseguirme esos “bichos” jajajajaa.

También estoy muy agradecida del equipo de trabajo del laboratorio de Biorrecursos, Carla Gimpel y Geraldine Acencio, mis “madres” jajaja, gracias por la buena onda, simpatía y esa confianza para retarme y hacerme ver cuando hacía algo mal jejeje, y por supuesto también a todos los que hacen grato el día a día en

el laboratorio, Caro Pérez, Rocío Urtubia, Eva Ogue, Santiago Pineda, Mauricio Palacios.

Por su puesto no puedo dejar de mencionar a mis amigas queridas!, Fernanda Ovando y Tamara Valle, todavía recuerdo cuando nos conocimos, fue raro, 0 compatibilidad, pero con el tiempo se fue dando un hermoso lazo de amistad, que espero que dure por siempre, gracias por apañarme en todas, desde lo más cuerdo hasta lo más freak!!! LAS QUIERO MUCHISIMO AMIGAS!, son un tesoro para mí, una cajita de sorpresas en mi vida, supimos apoyarnos en todo en estos años, retornos, caer nos juntas y sobre todo salir adelante juntas!!!, sin ustedes no hubiera sido lo mismo, soy afortunada de tenerlas no las cambio por nada.

También quiero agradecer a todos mis compañeros de carrera, yo se que el tiempo y diferentes circunstancias nos han ido separando, pero también sé que todos vamos a pasar por lo mismo, y se agradece ese apoyo que existe dentro de la universidad y todo lo que se luchó por mejorar las condiciones dentro de la carrera, muchísimas gracias por otorgarme invaluable momentos, aunque sea alegrarme el día con alguna talla por ahí o una conversa con cafecito en el casino jajaja.

Muchas gracias también a todos mis profesores, por entregarme las competencias necesarias para poder ser una buena profesional, gracias por sus exigencias, que quizás en el momento no me hacían mucha gracia jajaa, pero ahora valoro mucho.

Por supuesto a los mejores!! *The Dark Group*, este loco grupo, jajaja que ha sido capaz de sacar carcajadas en los momentos más tensos! Jajaja, esas noches de película, la montonera de comida, jugando Nintendo Wii, y esos inolvidables paseos por la noche haciendo cualquier travesura por la ciudad, con nuestras super bandas sonoras como Breaking The Law de Judas Priest, jajaja, muchas gracias a José Luis Días (“Pelao”), Danilo Lobos, Tamara Valle y Fernanda Ovando, los quiero muchísimo cabros!!

Y por supuesto quiero agradecer a mi familia, a mis padres: Sonia y Juan, papitos, los amo demasiado, gracias por estar ahí cada vez que lo necesité sin ustedes este sueño no sería posible, sé de todo el esfuerzo que han puesto para poder darme estudios y eso los hace unos padres maravillosos, gracias a mi hermanita Natalia, mi niñita que está lejos, te amo mucho!, yo sé que estas pasando por todo lo que yo viví en la universidad, te agradezco esa compañía y esas traspasadas por msn jajaa, en las largas horas de estudio dónde nos apoyábamos mutuamente, a mi revoltoso hermanito Hernán, te amo mucho!, gracias por acompañarme en las tonteras que solo tu entiendes jajaja.

Gracias a todos por ayudarme a formar la base para mi vida, esto no es un fin, es sólo el comienzo!!

Tania

ÍNDICE GENERAL

1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	
1.1 Planteamiento	1
1.2 Contaminación antártica	6
1.2.1 Contaminación localizada en ecosistemas marinos costeros antárticos.	9
1.2.2 Contaminantes persistentes en cadenas alimenticias pelágicas y costeras	10
1.3 Genes Biomarcadores y Aplicaciones	11
1.4 Características de las metalotioneínas	14
1.4.1 Metalotioneínas en mamíferos	14
1.4.2 Tioneína	15
1.4.3 Estructura	16
1.5 EXPRESIÓN DE LA METALOTIONEÍNA	17
1.5.1 Regulación de las metalotioneínas	17
1.5.2 Genes de las metalotioneínas	18
1.5.3 Metales inductores	18
1.5.4 Células inmunitarias y metalotioneína	19
2.- OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO	21
3.- METODOLOGÍA	22
3.1 Área de muestreo	22
3.2 Obtención de muestras y estimulación con cloruro de cadmio	23
3.3 Obtención, conteo y determinación de viabilidad de celomocitos	

3.4 Extracción de ARN	25
3.4.1 Cuantificación de ARN	26
3.5 RT-PCR Semicuantitativa	27
3.6 RT-PCR en tiempo real	28
3.7 Purificación del producto de PCR	29
3.8 Análisis y expresión de genes	29
3.9 Análisis estadístico	30
4. <u>RESULTADOS</u>	31
4.1 Análisis celular	31
4.1.1 Conteo de celomocitos	31
4.1.2 Análisis de la expresión de la MT en celomocitos	40
4.2 Cuantificación de la expresión de MT	44
4.3 RT-PCR en tiempo real	45
4.4 Análisis de las secuencia de la MT obtenida desde celomocitos	48
5.- DISCUSIÓN	53
5.1 Proliferación celular	57
5.2 Viabilidad celular y especies reactivas de oxígeno	60
5.3 Expresión de MT en <i>Sterechinus neumayeri</i>	62
5.4 Genes control	64
5.5 Cuantificación por PCR semicuantitativa de la MT en <i>Sterechinus neumayeri</i>	65
6. CONCLUSIONES	67
7. BIBLIOGRAFÍA	68
8. ANEXO	86
8.1 Abreviaturas y siglas	86
8.2 Tablas	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig 1	Secuencia modelo de la metalotioneína para vertebrados, alineamiento para <i>Mus musculus</i>	15
Fig 2	(A) Estructura 3D de la metalotioneína del erizo <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> (Dominio Alfa), (B) Estructura 3D de la metalotioneína del erizo <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> (Dominio Beta)	16
Fig 3	Islas Shetland del Sur, Península Antártica.	22
Fig 4	Esquema del sistema de recirculación utilizado para la mantención de los erizos	23
Fig 5	Cantidad de celomocitos totales a diferentes concentraciones de CdCl ₂ y control en tratamiento de baño.	32
Fig 6	Cantidad de células rojas a diferentes concentraciones de CdCl ₂ y control en tratamiento de baño.	34
Fig 7	Cantidad de células viables a diferentes concentraciones de CdCl ₂ y control en tratamiento de baño.	35
Fig 8	Cantidad de celomocitos totales a diferentes concentraciones de CdCl ₂ y control, en tratamiento de inyección.	37
Fig 9	Cantidad de células rojas a diferentes concentraciones de CdCl ₂ y control, en tratamiento de inyección.	39
Fig 10	Cantidad de células viables a diferentes concentraciones de CdCl ₂ y control en el tratamiento de inyección.	40

Fig 11	Electroforesis de productos RT-PCR de organismos en baño.	41
Fig 12	Electroforesis de productos RT-PCR de organismos por inyección.	42
Fig 13	Comparación entre expresión del gen de la Metalotioneína y el gen control Actina para organismos estimulados por baño.	43
Fig 14	Cuantificación de la expresión de la metalotioneína.	44
Fig 15	(A) Curva de amplificación del gen de MT en PCR tiempo-real para los organismos controles. (B) Curva de amplificación del gen de MT en PCR tiempo-real para organismos estimulados a 100µg/L de CdCl ₂	46
Fig 16	(A) Niveles de expresión del gen de la MT para organismos controles. (B) Niveles de expresión del gen de la MT para organismos estimulados a 100 µg/L de CdCl ₂	47
Fig 17	Secuencia de ácidos nucleicos y aminoácidos correspondientes a la proteína de la metalotioneína en el erizo <i>Sterechinus neumayeri</i> .	48
Fig 18	Árbol filogenético de la metalotioneína para distintas especies.	50
Fig 19	Alineamiento de aminoácidos de la proteína de Metalotioneína para distintas especies.	51
Fig 20	Alineamiento de aminoácidos de la proteína de Metalotioneína para equinodermos.	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Media de concentraciones ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry wt) de Cd y Hg en organismos representativos de la red trófica costera Antártica	11
Tabla 2	Partidores diseñados a partir de la secuencia conocida de la metalotioneína en <i>S. neumayeri</i> caracterizada desde ovocitos.	27
Tabla 3	Parámetros físico-químicos y porcentaje de identidad de diferentes MT de organismos representativos dentro de la escala evolutiva	49
Tabla 4	Análisis de comparaciones múltiples (Newman-Keuls) para celomocitos totales en estimulación en baño de CdCl_2	89
Tabla 5	Análisis de comparaciones múltiples (Newman-Keuls) para células rojas en estimulación por baño de CdCl_2	90
Tabla 6	Análisis de comparaciones múltiples (Newman-Keuls) para celomocitos totales en estimulación por inyección de CdCl_2 .	91
Tabla 7	Prueba de significancia para celomocitos totales en organismos expuestos a CdCl_2	92
Tabla 8	Análisis de comparaciones múltiples (Newman-Keuls) para células rojas por estimulación con inyección de CdCl_2 .	92
Tabla 9	Prueba de significancia para células rojas en organismos estimulados a inyección de CdCl_2	93
Tabla 10	Valores promedios y desviaciones estándar para organismos estimulados con CdCl_2 a través de inyección.	93

Tabla 11	Valores promedios y desviaciones estándar para organismos estimulados con CdCl ₂ a través de baño.	94
Tabla 12	t-test para los valores de cuantificación del gen de la metalotioneína en organismos estimulados por baño, los valores significativos ($P < 0.05$) se indican con rojo.	94

1. INTRODUCCIÓN

1.1 PLANTEAMIENTO

En la actualidad, ¿qué se puede considerar como ambiente prístino? Cuando la humanidad ha avanzado en tecnología haciendo al planeta tierra mucho más vulnerable a los efectos post-desarrollo, las consecuencias del avance de nuevas tecnologías y de la modernización no tiene límites, incluso haciéndose presente en aquellos lugares que consideramos como los más remotos, un claro ejemplo de esto es el continente Antártico considerado con poca intervención humana y “aislado” de los demás continentes, sin embargo influenciado por las actividades antropogénicas, y por aquellos efectos indirectos como el agujero en la capa de ozono (**Troshichev y Gabis, 2005**), asociado al aumento de las temperaturas así como el cambio climático global.

Por lo anteriormente expuesto, es de suma importancia tener un registro de los niveles de contaminación antártica, variaciones a través del tiempo, procedencia y efecto en los distintos ecosistemas presentes, ya que estos no escapan al impacto global y local de las actividades antropogénicas, los derrames de hidrocarburos de petróleo son una forma común de contaminación localizada en regiones frías, causada principalmente por infraestructura en mal estado, error humano, sabotaje o riesgos naturales (**Join UNDP, 2003**) estos derrames se pueden encontrar en muchas fuentes de contaminantes en la Antártica, aire, nieve, suelo y biota, los derrames de hidrocarburos en los suelos pueden resultar en un incremento en la degradación de microbios y un decrecimiento en la diversidad de la comunidad microbial del suelo (**Aislabe et al.,2004**).

Otra fuente de contaminación en la Antártica ha sido el aumento de la intervención humana más específicamente de las estaciones científicas que cada vez producen mucho más desechos y son más difíciles de controlar, un ejemplo es lo que ocurre en Bahía Winter Quarters, esta pequeña bahía adyacente a la base

americana de la Estación McMurdo ha sido severamente impactada (**Lenihan *et al.* 1990**), esta bahía se encuentra al lado del vertedero para las operaciones de esta estación y el sustrato (particularmente en la parte alta de la bahía) se encuentra lleno de una amplia variedad de desechos incluyendo bidones de combustible, vehículos, neumáticos, tuberías y mangueras (**Lenihan, 1992**).

No se puede dejar de mencionar la influencia que poseen los aerosoles atmosféricos en el ambiente antártico ya que estos son una importante fuente de elementos, su composición química es relevante para poder entender los procesos de transporte de contaminantes sobre largas distancias. Los elementos volátiles As, Se, Sb y Hg pueden ser transportados largas distancias en forma gaseosa considerando que Zn, Cd y Pb son solo transportados como materia particulada (**Hayharth y Jones, 1992**). Por otro lado, Ni, As, Se, Cd y Pb son contaminantes originados desde combustible fósil (**Mattigod y Page, 1983; Evangelou, 1998**). Las variaciones en la radiación solar, y la temperatura de la estratòsfera, pueden dañar la densidad del ozono y por lo tanto influenciar las dinámicas de la atmósfera terrestre. De esta manera el constante vórtice circumpolar que rodea la Antártica el que contiene una alta zona de presión bloquea el aire saturado de ozono en la Antártica central, avanzando hacia regiones de latitud media, esto en combinación con la desaparición de la insolación durante la estación de invierno produce un decrecimiento en el ozono total sobre las regiones polares de forma dramática produciéndose el agujero en la capa de ozono (**Troshichev y Gabis, 2005**).

La radiación UV es absorbida por muchas moléculas biológicas causando daño molecular que puede perjudicar funciones biológicas vitales. El daño al ADN en particular es un resultado de la exposición a la UV causando una variedad de lesiones al ADN, así como debilitamiento, mutagénesis y muerte (**Harm, 1980; Mitchell y Karentz, 1993; Friedberg *et al.* 1995; Mitchell, 1996**). La radiación UVA (Radiación ultravioleta tipo A) no es la principal causa del daño al ADN, la radiación UVA se envuelve en reacciones fotoquímicas con agua para generar

especies de oxígeno reactivo (ROS) que pueden causar un significativo daño oxidativo a nivel intra- y extracelular (**Karentz et al., 2004**).

Existen muchas metodologías para determinar la contaminación en los diferentes ecosistemas antárticos, la que se utilice va a depender de la información que se quiera obtener y el tipo de contaminante que se quiera estudiar, de esta manera podemos tener análisis de testigos de hielo para elementos traza (**e.g Alexandrine et al. 2009**), técnicas de limpieza de elementos traza (**Bruland et al. 1979**), dónde a través de diferentes solventes de ultralimpieza se van separando los distintos elementos traza, métodos geoquímicos para discriminar metales en sedimentos (**e.g Rebecca et al. 2006**) y también a través de un registro de los propios organismos afectados por los distintos tipos de contaminantes. Con estos organismos polares se han desarrollado pocos métodos para enfrentar sustancias provenientes de otros continentes por lo tanto es importante poder evaluar los niveles potenciales de toxicidad en las especies antárticas siendo esta una vía para entender el impacto biológico en estos organismos (**Corsolini, 2008**).

Normalmente aquellos organismos que son utilizados como bioindicadores son representativos del ambiente que habitan, poseen una amplia distribución, comportamientos específicos, como ser sésiles, lo que por ejemplo permite determinar con certeza que los contaminantes que los afectan son del sector que habitan, así como también poseen habilidades para bioacumular contaminantes ambientales (**e.g Zhao, 2005**), de esta manera los organismos son utilizados para detectar daños a nivel fisiológico, tanto como en tejidos como a nivel molecular, otorgando de esta manera importantes datos sobre la evolución de los contaminantes en sus hábitats y hasta que punto son capaces de afectarlos.

Los equinodermos se encuentran entre los animales bentónicos más abundantes (**Holm et al. 2008**), comprenden numerosas especies que dominan cuantitativa y cualitativamente el bentos aportando un papel estructurador en este hábitat (**Saier, 2001**) y una alteración de su población podría afectar a toda la comunidad y

amenazar el equilibrio del ecosistema donde viven (**Coteur et al. 2003**), por lo tanto son una buena opción para ser utilizados como organismos bioindicadores.

Los organismos marinos toman y acumulan metales traza en sus tejidos blandos en varios órdenes de concentración y magnitud por sobre los niveles ambientales (**Sarkar, 2006**). El continente antártico no está exento de estos metales traza y de metales pesados afectando gravemente las redes tróficas que son relativamente simples produciéndose bioacumulación y biomagnificación en estas (**Moreno et al. 1997**).

Esto se puede evidenciar a través del análisis fisiológico de estos organismos, prestando especial atención a los efectos producidos por los diferentes factores estresantes debido a los cambios de sus ecosistemas, los organismos que presentan determinados procesos vitales que responden a variaciones ambientales de forma medible y pueden ser utilizados como parámetros para avalar estas alteraciones, son denominados organismos bioindicadores.

La metalotioneína es una proteína que ha sido detectada en embriones de erizo de mar y su síntesis de ARNs mensajeros es regulada así como inducida por metales pesados (**Nemer, 1984**). La característica más importante de la metalotioneína es su alto contenido de cisteína, lo que le otorga una función biológica importante al poder asociarse a metales y de esta manera poder alcanzar su estructura terciaria, se considera de esta forma que la metalotioneína juega un rol en el control homeostático de metales esenciales (Cu, Zn) ya que pueden actuar como almacén de metales esenciales que cumplen roles claves en procesos enzimáticos u otras demandas metabólicas (**Brouwer et al. 1989; Viarengo y Nott, 1993; Roesijadi, 1996**). Los metales que no son esenciales como el Cd y Hg son sin embargo capaces de desplazar a los esenciales asociados con la metalotioneína (**Amiard y Cosson, 1997**), (e.g **Cserjesi et al. 1997**). El rango de metales pesados que pueden unirse a la metalotioneína es bastante amplio, sin embargo existen algunos metales que poseen más afinidad con esta proteína que

otros, en una escala de afinidad, los primeros serían el Cu, Cd, Hg, seguidos por el Zn.

Por lo anteriormente expuesto la metalotioneína se encuentra involucrada en la detoxificación de cantidades en exceso de ambos metales tanto esenciales como metales traza no esenciales (**Amiard *et al.* 2006**).

La inducción de la metalotioneína ocurre la mayoría de las veces de forma dramática en respuesta a daño tisular, infección, inflamación y enfermedades neoplásicas, y parece ser que aquí es dónde la metalotioneína puede tener una mayor influencia (**Coyle *et al.* 2002**).

Así como la metalotioneína está involucrada en detoxificación de metales esenciales y no esenciales, también juega un rol importante en la eliminación de los radicales libres de oxígeno, estas especies de oxígeno activo son continuamente producidas en los tejidos por la acción del sistema mitocondrial de transporte de electrones y de la Nicotinamida-Adenina Dinucleótido fosfato reducida (NADPH) en leucocitos y macrófagos, sin embargo varios sistemas de defensa antioxidantes previenen el daño del tejido por los radicales de oxígeno. Este sistema incluye un rango de antioxidantes específicos como la catalasa para el peróxido de hidrógeno, la superóxido dismutasa para el anión superóxido, y la glutatión peroxidasa para el peróxido de hidrógeno y lípidos oxidados, antioxidantes no específicos como el glutatión reducido, la ceruloplasmina, y la transferrina (**Sato y Bremner, 1993**). Sin embargo, no existe mecanismo de defensa específico en contra de los radicales hidroxilos, que es la más potente dentro de las especies de oxígeno reactivo. De esta manera se ha enfocado la atención a la metalotioneína como un radical depurador, debido a la constante velocidad de reacción con radicales hidroxilo *in vitro* la cual es muy alta (**Thornalley y Vasak, 1985**).

Este trabajo abordará por primera vez la expresión de la metalotioneína (MT) en celomocitos del erizo antártico *Sterechinus neumayeri*, estas células están

relacionadas con el sistema inmune, pero además tienen la capacidad de responder a lesiones, invasión de hospedadores y agentes citotóxicos. Esto es muy relevante ya que existen pocas investigaciones que registren los efectos de contaminación en invertebrados marinos adultos (e.g. Equinodermos) (**Matranga, 2000**), de esta manera podríamos utilizar los celomocitos de *S. neumayeri* como biomarcadores de la contaminación por metales pesados en ambientes marinos antárticos.

1.2 CONTAMINACIÓN ANTÁRTICA

El continente antártico toma su posición actual alrededor de 45 millones de años atrás y ha estado aislado de otros continentes desde la separación de la península antártica desde Sudamérica (alrededor de 30 Ma). La abertura y profundización del Paso Drake, lo cual permitió el establecimiento de la Corriente Circumpolar Antártica y los vórtices ciclónicos circumpolares. La Antártica es usualmente percibida como un remoto y hostil lugar con escasa intervención humana. (**Bargagli, 2008**). Desafortunadamente el ambiente antártico ya no es prístino al igual que otras regiones remotas del planeta y no escapa al impacto de las actividades antropogénicas locales y globales (**UNEP, 2002; Bargagli, 2005; Bergstrom et al. 2006**).

Aunque el continente Antártico es percibido como un símbolo de gran vacío, la presencia humana en el Océano Austral y en el continente comenzó a principios de 1900 con la cacería, pesca y exploración, y muchas especies de plantas y animales invasivos han sido deliberadamente introducidos en islas sub-antárticas (**Frenot et al. 2005**)

Aunque las barreras naturales como la circulación oceánica y atmosférica protegen a la Antártica de las aguas desde bajas latitudes y de las masas de aire, existen datos disponibles de concentraciones de metales, pesticidas y otros contaminantes persistentes en el aire, nieve, musgos, líquenes y organismos marinos los cuales muestran que la mayoría de los contaminantes persistentes en

el ambiente antártico son transportados desde otros continentes hacia el Hemisferio Sur desde todas las regiones en la Tierra.

Actualmente los niveles de contaminantes en los organismos antárticos son menores que aquellos encontrados en especies desde otras regiones remotas, a excepción de las concentraciones naturales de Cd y Hg en algunos organismos marinos especialmente en albatros y petreles (**Bargagli, 2008**).

La población crece y el desarrollo industrial en algunas ciudades del Hemisferio Sur está cambiando la tendencia mundial de los contaminantes antropogénicos persistentes y nuevas clases de químicos que han sido detectados en el ambiente antártico. Aunque existe un ingreso limitado de contaminantes antropogénicos desde el Hemisferio Norte hacia la Antártica, los registros de deposición en la nieve Antártica y el hielo durante 1950's y 1960's han revelado la presencia de productos de fisión (^{238}Pu , $^{239+240}\text{Pu}$, ^{241}Am , ^{137}Cs , ^{90}Sr y ^3H) liberados en el Hemisferio Norte (**Koide *et al.* 1979**) los que son reconocidos como pruebas de armas hechas por la U.S a comienzos de los años 50, la U.S.S.R a comienzos de los años 60, la destrucción del satélite SNAP-9A perteneciente en esa época a la U.S, el cual contenía ^{238}Pu y las pruebas hechas por Francia y China a comienzo de los años 60 y 70 , lo cual revelan la persistencia de estos elementos de fusión en el medio ambiente.

El mercurio emitido de las fuentes antropogénicas y naturales ocurre en la atmósfera, mayormente en la forma de gas elemental (Hg^0), el que no tiene un gran tiempo de vida en las regiones templadas y tropicales. Una vez depositada en los ecosistemas acuáticos y terrestres el metal es parcialmente re-emitido hacia el aire, así asumiendo las características de un contaminante global tal como POPs (Contaminantes Orgánicos Persistentes), la persistencia de estos contaminantes industriales tóxicos en los ecosistemas antárticos, está parcialmente asociada con las actividades de las estaciones científicas; sin embargo la principal fuente de contaminantes para este remoto continente es el transporte atmosférico (**Wania, 2003**).

Este metal ahora es conocido como el contaminante mas serio en los ecosistemas polares debido a los eventos de agotamiento de mercurio en primavera, en el Alto Ártico (**Schroeder et al. 1998**), en zonas subantárticas y en la Antártica (**Ebinghaus et al. 2002**), lo cual resulta en una masiva y rápida deposición de mercurio iónico Hg (III) desde la atmósfera, esta deposición de mercurio iónico es debido a la oxidación del mercurio elemental atmosférico Hg (0).

La mayoría de los organismos en el Océano Austral son especies endémicas con características ecofisiológicas únicas resultado de una larga historia evolutiva de aislamiento y la mayoría de las especies en los ecosistemas terrestres alcanzan el límite de su distribución bajo duras condiciones climáticas. Los organismos antárticos pueden ser más afectados y ser más vulnerables a los efectos adversos de contaminantes persistentes que aquellos organismos de otras regiones. Aunque las especies migratorias de aves marinas y mamíferos pueden contribuir con la transferencia de POPs hacia el sur , su transporte hacia el Océano Austral y la Antártica ocurre a través de las vías marina y especialmente atmosférica. (**Bargagli, 2008**).

El drenaje de flujo catabático es compensado por un flujo de aires desde las altas latitudes medias de la tropósfera que transporta vapor de agua, gases y aerosoles a la Antártica. (**Bargagli, 2008**). Gases reactivos y partículas en las masas de aire son parcialmente removidas por tormentas ciclónicas en el lado occidental y estas luego son reemplazadas por evaporación y la ruptura de burbujas de aire en el Océano Austral (**Shaw, 1988**). Durante la estación seca ocurren intensas incineraciones de biomasa en los trópicos, y las imágenes satelitales cada año muestran largas plumas de humo del fuego en los continentes en el Hemisferio Sur. La biomasa que se quema libera vapor de agua, partículas de humo, CO₂, CH₄ y muchos otros gases traza. (**Bargagli, 2008**).

Muchos elementos traza en el aerosol antártico poseen un origen natural (**Arimoto et al. 2008**). Sin embargo, muestras tomadas desde la península antártica, muestran altos factores de enriquecimiento de Cr, Cu, Ni, Pb, V y Zn con respecto a la corteza y la composición del mar, estos han sido usualmente atribuidos a aportes desde la actividad humana en la antártica y/o algo más en el Hemisferio Sur. (e.g., **Planchon et al., 2002; Mishra et al., 2004; Hur et al., 2007**). Los elementos anteriormente mencionados son liberados por la combustión de carbón, aceite y gasolina y por la producción de metales no ferrosos (**Pacyna y Pacyna, 2001**).

Como es el caso de los elementos traza, las concentraciones de POP son más altas en muestras de aire desde la Península Antártica e islas Sub-antárticas que en aquellas desde sitios continentales (**Bargagli, 2005**).

El incremento de la actividad humana en la Antártica, especialmente durante el Año Geofísico Internacional y después del establecimiento de varias estaciones científicas probablemente contribuyó al incremento en los niveles de Pb y otros metales en la nieve antártica. La evidencia de campo del incremento en la acumulación de Hg en organismos criptogámicos está en aumento en la Antártica lo que podría llegar a ser un importante sumidero en el ciclo global del Hg, especialmente en vista de los posibles cambios en la cubierta del hielo marino y en el incremento de las emisiones antropogénicas de Hg en ciudades del Hemisferio Sur (**Bargagli, 2008**).

1.2.1 Contaminación localizada en ecosistemas marinos costeros antárticos.

Los metales traza, los PAHs (Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos) y otros productos de combustión con procesos de incineración, incluyendo PCDDs (Policlorodibenzo-P-Dioxinas) y PCB's (Bifenilos policlorados) se encuentran entre los contaminantes más extendidos encontrados en los ecosistemas marinos costeros dentro de unos pocos cientos de metros alrededor de las estaciones científicas (**UNEP, 2002; Bargagli, 2005; Santos et al. 2005; Negri et al. 2006**).

Los químicos son introducidos en el ambiente marino costero a través de aguas residuales, lixiviados desde vertederos, y la deposición de partículas desde estaciones en actividades y operaciones en los barcos.

Se ha registrado un significativo estrés por parte de las comunidades bentónicas que se encuentran cercanas de los sitios costeros más contaminados (**e.g Lenihan y Oliver, 1995; Conlan et al. 2000; Stark et al. 2003; Thompson et al. 2007**). La respuesta de los organismos hacia la combinación de efectos como contaminantes tóxicos y enriquecimiento orgánico desde la eliminación de aguas residuales usualmente involucra una disminución en la abundancia y la diversidad de la fauna bentónica y un incremento en especies resistentes y oportunistas. Como los cambios en la estructura de la comunidad pueden resultar producto de una toxicidad directa y efectos indirectos de contaminantes; en general, los sedimentos marinos contaminados con hidrocarburos y metales traza exhiben grandes abundancia de poliquetos y gastrópodos que aquellos sedimentos sin contaminar (**Stark et al., 2003**).

1.2.2 Contaminantes persistentes en cadenas alimenticias pelágicas y costeras

Las aguas del Océano Austral poseen distintas características físico-químicas derivadas de su modelo de circulación (alrededor de un continente cubierto por hielo y la carencia de sistema de drenaje de ríos), la distribución estacional del hielo marino, y productividad primaria. Los experimentos de fertilización *in situ* (**e.g. Boyd et al. 2000**) indican que la baja productividad es principalmente debido a la carencia de Fe y Mn y/o como factor limitante el Si. El impacto de metales traza desde fuentes antropogénicas puede ser fuertemente detectada en las aguas del Océano Austral o sedimentos, las concentraciones de Pb en las aguas del Mar de Weddell son aproximadamente la mitad de aquellas concentraciones que habitualmente se miden en otros ambientes oceánicos (**Sañudo-Wilhelmy et al. 2002**). Sin embargo, el componente antropogénico de metales, reflejan la composición isotópica de los aerosoles de otros continentes del Hemisferio Sur (**Alleman et al. 2001**) y ahí está la evidencia que muchas especies de aves

marinas y mamíferos marinos pueden acumular altas concentraciones de elementos potencialmente tóxicos como el Cd y el Hg.

Tabla 1.- Media de concentraciones ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry wt) de Cd y Hg en organismos representativos de la red trófica costera Antártica. **(Obtenida de Bargagli, 2008).**

Region	Organism	Species	Organ	Cd	Hg	References
Windmill Is.	Macroalgae	<i>Himantothallus grandifolius</i>	Thallus	7.5±8.6		Runcie and Riddle (2004)
	Macroalgae	<i>Iridaea cordata</i>	Thallus	3.1±0.4	0.09±0.04	
	Phytoplankton	Pooled across species	Whole	2.1±0.9	0.04±0.01	
	Zooplankton	Pooled across species	Whole	3.4±2.3	0.07±0.03	
	Porifera	Pooled across species	Whole	26.4±14.8	0.08±0.05	
	Holothuroidea	Pooled across species	Whole	7.7±3.8	0.23±0.09	
	Asteroidea	<i>Odontaster validus</i>	Arms	13.6±1.8	0.11±0.06	
	Echinoidea	<i>Sterechinus neumayeri</i>	Soft tissues	13.0±4.8	0.10±0.06	
	Polychaeta	<i>Harmothoe spinosa</i>	Whole	6.8±0.6	0.07±0.02	
	Amphipoda	<i>Paramoera walkeri</i>	Whole	7.2±2.7	0.07±0.03	
Terra Nova Bay	Bivalvia	<i>Adamussium colbecki</i>	Digestive gland	55.7±27	0.35±0.08	Bargagli (2001)
		<i>Neobuccinum eatoni</i>	Digestive gland	227±65	0.24±0.10	
	Fish	<i>Trematomus bernacchii</i>	Liver	9.9±5.8	0.46±0.25	
			Muscle	0.04±0.02	0.83±0.65	
		<i>Chionodraco hamatus</i>	Liver	2.9±0.8	0.19±0.12	
		Muscle	0.03±0.02	0.44±0.31		
	Birds	<i>Pagodroma nivea</i>	Feathers		0.54±0.18	
<i>Pygoscelis adeliae</i>		Feathers		0.82±0.13		
South Shetland Is.	Seals	<i>Leptonychotes weddellii</i>	Liver	3.1±2.1	35±16	Szczer et al. (1993, 1994)
			Muscle	0.03±0.02	1.9±0.7	
			Kidney	25±18	13±8	

1.3 GENES BIOMARCADORES Y APLICACIONES

El término biomarcador ha estado en uso desde 1970's inicialmente en el campo clínico del cáncer y enfermedades cardiovasculares. Según la NHI (*National Institutes of Health*) un biomarcador se define como un indicador cuantitativo de biología definible o proceso patológico que podría ser utilizado como diagnóstico o terapia de control (Lemley, 2007). Los biomarcadores se han utilizado con distintas finalidades como para detectar por ejemplo: la exposición a algún agente dañino, las consecuencias de un estrés, la evolución de ciertas enfermedades y últimamente detectando variaciones fisiológicas en organismos como producto del cambio climático.

Estas variaciones que podemos reconocer pueden ser resultantes de daño celular debido a la exposición de una variedad de factores estresantes. Un cambio en la expresión de genes (es decir, en la síntesis de proteínas) puede producirse a

niveles muy inferiores de los umbrales tóxicos determinados por los bioensayos actualmente utilizados como criterios de valoración, por lo tanto los cambios en la expresión de proteínas pueden ser cuantificados con mayor precisión que los resultados estándar de los bioensayos. (Karouna-Renier y Zehr, 1999). Estas respuestas a nivel molecular pueden servir como indicadores de exposición y los efectos que estos producen (Stegeman *et al.* 1992).

Las aplicaciones de los biomarcadores son muy amplias se pueden utilizar para localizar algún tipo de exposición, las consecuencias de un estrés, la evolución de ciertas enfermedades y últimamente detectando variaciones fisiológicas en organismos como producto del cambio climático y así también han proporcionado a los científicos una visión mucho mas clara de los efectos fisiológicos producidos por los agentes estresantes en los organismos estudiados.

Tras la exposición a estrés medioambiental los organismos han demostrado exhibir una respuesta protectora generalizada conocida por la expresión de las proteínas de estrés térmico (HSP) (Sanders, 1993; Sanders *et al.* 1994). Esta respuesta al estrés, caracterizada por la rápida síntesis de un juego de proteínas, fue primero observado en *Drosophila* en respuesta al severo estrés térmico (Ritossa, 1962). Desde entonces se ha puesto de manifiesto que esta proteína es inducida como resultado de la exposición a una amplia variedad de factores estresantes incluyendo temperaturas elevadas, metales traza, plaguicidas, agentes oxidantes y otros contaminantes (Dyer, 1991; Sanders, 1993). Así como la proteína de estrés térmico existe otra proteína capaz de manifestar respuesta al estrés ambiental, denominada metalotioneína. Las metalotioneínas, poseen bajo peso molecular y se encuentran en una gran cantidad de organismos no relacionados. El nombre de esta proteína deriva del hecho que esta tiene un gran contenido de metales y es rica en cisteínas (Kagi y Schaffer, 1988).

Originalmente la metalotioneína fue identificada como una proteína de bandeo para el cadmio, responsable de la acumulación natural en la corteza renal equina (Margoshes y Vallee, 1957). Sin embargo, se ha utilizado para medir la respuesta

al estrés en otros metales como en Cu, Zn y Hg (**Kagi y Vallee, 1960**). Esta sensibilidad a múltiples factores estresantes indica el potencial de utilidad de esas proteínas como biomarcadores cuantitativos y cualitativos de las condiciones ambientales (**Karouna-Renier y Zehr; 1999**). La inducción de la metalotioneína es producto de una respuesta bioquímica a altas disponibilidades de metales en el ambiente, una característica que es típica de un biomarcador definida por **Depledge (1993) se refiere a:** "Una variación bioquímica, celular, fisiológica o de comportamiento que puede ser medida en tejido, en muestras de fluido corporal o a nivel de organismos completos que proveen evidencia de la exposición y de los efectos de uno o más contaminantes químicos (y/o radiaciones)".

El uso de las metalotioneínas como biomarcadores ha sido validado en muchos estudios *in situ* (**Imber et al. 1987; Couillard et al. 1995; Rasport et al. 1999a,b; Lionetto et al. 2001; Ross et al. 2002; Mourgaud et al. 2002**). Estos resultados son generalmente positivos, en particular cuando el gradiente de contaminación por metales es bastante real (**Amiard et al. 2006**)

Los biomarcadores se utilizan para:

- detectar la presencia de una exposición
- determinar las consecuencias biológicas de la exposición
- detectar los estados iniciales e intermedios de un proceso patológico
- identificar a los individuos sensibles de una población
- fundamentar la decisión de intervenir, tanto a nivel individual como ambiental.

Los análisis químicos solo muestran las concentraciones de contaminantes particulares en el ambiente, mientras que un índice de biomarcador también demuestra su biodisponibilidad, sus efectos combinatorios interactivos considerando los numerosos factores ambientales de la ubicación de dónde se realicen los análisis (**Amiard et al. 2006**)

1.4 CARACTERISTICAS DE LAS METALOTIONEINAS

Estudiando los constituyentes tisulares responsables de la acumulación de Cadmio (Cd) se aisló en 1957 la metalotioneína (MT) renal equina (**Margoshes y Vallee, 1957**). Su posterior caracterización puso de manifiesto que se trataba de un polipéptido de bajo peso molecular, con un alto contenido en cisteínas y sin aminoácidos aromáticos ni histidina. Estas proteínas contienen varios átomos metálicos en su molécula que se encuentran coordinados en dos estructuras en forma de grupos *metal-tiolato* (**Kägi y Vallee, 1960**). Así es como hasta ahora se han descubierto proteínas con características similares, constituyendo así la súper familia de las metalotioneínas. Debido a la amplitud del grupo se ha establecido una clasificación, basándose en homologías de secuencias y criterios filogenéticos que ha subdividido a la superfamilia en varias familias, subfamilias y otras categorías (**Binz y Kägi, 1999; Kojima et al. 1999**).

1.4.1 Metalotioneínas en mamíferos

Se han establecido 15 familias de MTs, la primera de las cuales corresponde a las proteínas aisladas de vertebrados. Las MTs de esta familia, al igual que todas las demás, presentan dos componentes claramente diferenciados en cuanto a su naturaleza química. Poseen un componente polipeptídico y otro metálico. Frecuentemente se utiliza el término tioneína en referencia a la proteína en ausencia de metales.

La familia 1 presenta varias subfamilias de las cuales cuatro pertenecen a las MTs de mamíferos; mMT-I, mMT-II, mMT-III, mMT-IV, en nuestra especie (*Homo sapiens*) se ha aislado la mMT-I.

Las MT-I y MT-II están bien caracterizadas desde el punto de vista bioquímico y han sido ampliamente estudiadas desde su descubrimiento en 1957, aunque no fueron aisladas en el ratón (fig 1) hasta 1975 (Nordberg *et al.* 1975).

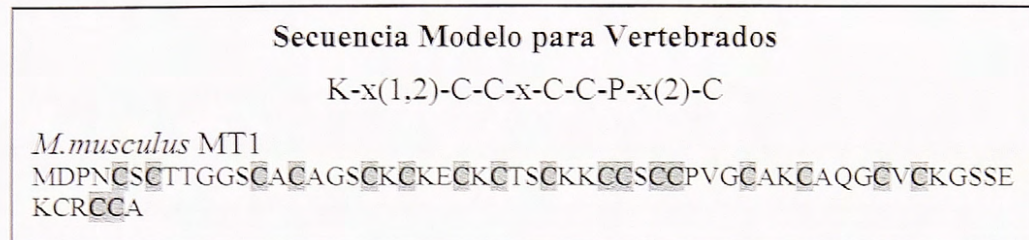


Fig 1.- Secuencia modelo de la metalotioneína para vertebrados, alineamiento para *Mus musculus* (ratón común). (<http://expasy.org/cgi-bin/lists?metallo.txt>). Las cisteínas involucradas se encuentran resaltadas con gris.

1.4.2 Tioneína

Tioneína es el nombre que recibe la MT sin metales. Como en todas las proteínas, sus propiedades vienen determinadas, en gran medida por su secuencia de aminoácidos, que en este caso está compuesta entre 61 y 68 unidades. El rasgo más destacable de la secuencia aminoacídica de las MTs de mamífero es la gran proporción de cisteínas (Cys), en concreto 20 por molécula. Estas cisteínas se agrupan en secuencias del tipo Cys-X-Cys, Cys- Cys y Cys-X-Y- Cys, donde X e Y son aminoácidos diferentes de la cisteína. Los aminoácidos conservados (Cys, Arg, Lys) son los responsables de la unión a metales, especialmente las cisteínas (Chernaik y Huang, 1991; Cismowski y Huang, 1991; Cismowski *et al.* 1991; Chang *et al.* 1998), aunque las lisinas y argininas también podrían intervenir (Cody y Huang, 1994; Pan *et al.* 1994).

En cuanto al contenido metálico, existe una amplia variedad de metales que puede unirse a las metalotioneínas. La afinidad dependerá del elemento metálico. En condiciones fisiológicas las MTs suelen coordinar Zinc (Zn) y/o Cobre (Cu).

Sin embargo estos pueden ser desplazados por otros metales pesados del medio como Cadmio (Cd) o Mercurio (Hg).

En una escala, la afinidad sería la siguiente: Zn (II) < Plomo (Pb) (II) < Cd (II) < Cu (I), Plata (Ag), Hg (II), Bismuto (Bi) (II) (Kägi y Kojima, 1978).

La unión a metales es reversible de manera que bajo determinadas condiciones, como un descenso del pH o variaciones en el estado redox, se pueden desplazar los átomos metálicos de la molécula de MT obteniendo así la apoproteína.

1.4.3 Estructura

La estructura se encuentra condicionada por su secuencia de aminoácidos y sobre esta puede influir la unión con cofactores. En el caso de las MTs, los metales pueden jugar un papel muy importante en la adquisición de la estructura terciaria correcta (Fig 2 A y B).

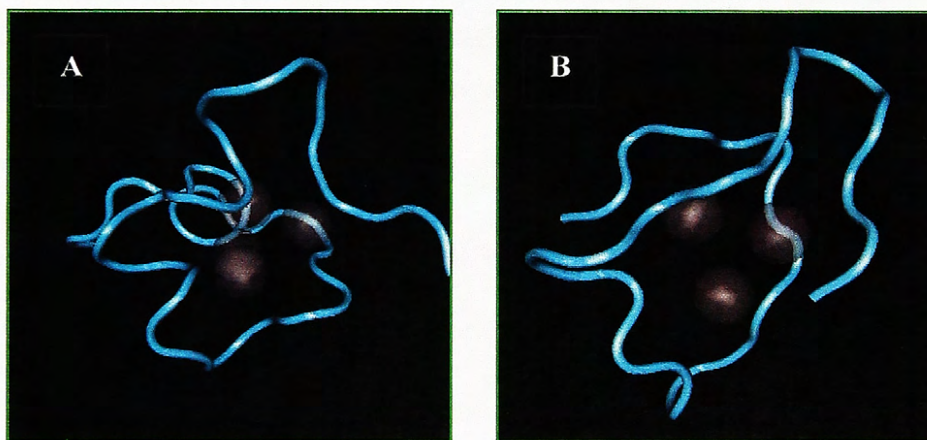


Fig 2.- (A) Estructura 3D de la metalotioneína del erizo *Strongylocentrotus purpuratus* (Dominio Alfa) (Riek *et al*, 1999). La cual contiene cuatro iones de metales coordinados a través de 11 enlaces metal-tiolato. (B) Estructura 3D de la metalotioneína del erizo *Strongylocentrotus purpuratus* (Dominio Beta) (Riek *et al*, 1999). La cual contiene tres iones de metales coordinados a través de 9 enlaces metal-tiolato.

El elemento clave para la unión de estos metales es la cisteína que en situación fisiológica se encuentra reducida y se coordina con los átomos metálicos. Se ha apreciado la presencia de dos grupos diferenciados en los cuales cada átomo metálico divalente esta coordinado con cuatro cisteínas. El grupo más cercano al extremo N-terminal es capaz de coordinar 3 átomos metálicos mientras que el más cercano al C-terminal une 4 átomos. Cada uno de estos grupos se encuentra localizado en un dominio globular denominado dominio β y α respectivamente. Cada dominio está totalmente separado del otro y se unen entre si por un bucle flexible (Winge y Miklossy, 1982).

Así pues, las MTs están formadas por dos dominios prácticamente idénticos con un centro metálico alrededor del cual se estructura la cadena polipeptídica en forma de giros helicoidales hacia la derecha en el caso del dominio beta y a la izquierda en el caso de alfa (Schultze *et al.* 1988; Kägi, 1993). Las MTs poseen una gran flexibilidad y son capaces de aceptar átomos de diferentes tamaños, esto es debido a que no posee un alto grado de estructuración por la carencia de estructuras secundarias rígidas (Messerle *et al.* 1990 Messerle *et al.* 1992). Son proteínas que pueden variar su contenido metálico y en cierto grado su estructura.

1.5 EXPRESIÓN DE METALOTIONEINA

1.5.1 Regulación de las MTs

La concentración final de una proteína puede ser regulada de muchas maneras. El primer mecanismo de control es la regulación de la expresión del gen que codifica para la determinada proteína. Esto se puede llevar mediante modificaciones locales de la cromatina o actuando a través del promotor del gen. Ambos mecanismos están influenciados por la localización del gen en el genoma y por la estructura del promotor. Así para poder entender la regulación de las MTs se deben conocer sus genes.

1.5.2 Genes de MTs

Existen genes funcionales que normalmente se encuentran agrupados en un mismo cromosoma y en algunas especies también encontramos genes no funcionales dispersos por el genoma. Estos últimos pueden ser de dos tipos diferentes:

- i) Aquellos que tiene estructura de intrones y exones pero que debido a la presencia de mutaciones no pueden producir ningún tipo de proteínas.
- ii) Pseudogenes sin estructura de intrones y exones que probablemente provienen de mensajeros procesados que han sufrido transcripción reversa y posteriormente el producto se ha insertado en el genoma (**Katrin y Richard, 1982; Palmiter, 1987**).

1.5.3 Metales inductores

Los metales de transición son los inductores más potentes de las MT-I y II. La primera vez que se observaron cambios en las cantidades tisulares de estas proteínas fue tras la administración de Cd (**Piscator, 1964**). Posteriormente se descubrieron otros inductores metálicos como Zn, Cu, Cobalto (Co), Bi, Ag, Hg, Niquel (Ni) y Pb.

Algunos metales como el Zn y el Cu pueden modular la expresión de las MT-I y II a través de las cantidades presentes en la dieta (**Richards y Cousins, 1976; Menard et al. 1981; Bremner y Morrison, 1986**). Los resultados no siempre son iguales para todos los metales y existen diferencias en la respuesta de cada órgano.

1.5.4 Células inmunitarias y Metalotioneína.

El erizo de mar al igual que la mayoría de los invertebrados posee un sistema inmune innato, donde los celomocitos son las células claves en cuanto a la respuesta inmune innata actuando como los principales efectores inmunitarios, como mediadores primarios del rechazo de aloinjertos. Los celomocitos median la respuesta inmune a través de la fagocitosis y encapsulación de partículas extrañas, en conjunto con la liberación por degranulación de moléculas antimicrobianas (**Smith *et al.*, 2006**).

En los equinodermos la clasificación de los celomocitos está basada esencialmente en criterios morfológicos (**Gross *et al.*, 2000**), distinguiéndose corrientemente cuatro categorías, fagocitos células vibrátiles, células esferoidales rojas y esferoidales decoloradas. Se ha demostrado que estos celomocitos activan su maquinaria de reacción en respuesta a diferentes tipos de estrés físico y químico, como la temperatura, la exposición a metales pesados o a la radiación UV (**Matranga *et al.* 2000, 2002, 2005, 2006**). Es así como se ha evidenciado la modificación del número de celomocitos producto de condiciones de contaminación, aumentando un tipo de celomocitos conocido como células rojas esferoidales. Los celomocitos son considerados los efectores del sistema inmune de erizo, reaccionando con modificaciones en su motilidad, pero la presencia de altas cantidades de células rojas son un claro indicador de contaminación o estrés, por esa misma razón los fluidos celómicos de los animales que han sido sometidos a algún tipo de estrés o contaminación son de color rojo, probablemente debido a la lisis o degranulación de estas células rojas esferoidales (**Matranga *et al.* 2000**).

Así también las metalotioneínas podrían proteger al ADN frente al daño oxidativo o intervenir en procesos de transferencia de metales, en el proceso de regulación de las metalotioneínas (**Troncoso, 2000**) De cualquier manera tanto las MTs citoplasmáticas como las nucleares podrían intervenir indirectamente en procesos de proliferación y diferenciación (**Cherian *et al.* 1999**), también poseen defensas frente a los radicales libres que pueden incrementarse durante situaciones

de estrés oxidativo en un intento por equilibrar la situación o ponerse en marcha otra serie de mecanismos de emergencia. Estos pueden ser defensas adicionales, mecanismos de reparación o pueden iniciar procesos como la apoptosis para evitar daños mayores al organismo completo **(Sato y Bremner, 1993)**.

Anteriormente los niveles de metalotioneína habían sido determinados en ovocitos de dos especies de erizos, en el erizo del mediterráneo *Sphaerechinus granularis* y el erizo antártico *Sterechinus neumayeri*, **(Scudiero et al. 1997)**. Sin embargo este trabajo trata sobre el análisis de los niveles de expresión de metalotioneína pero en celomocitos los cuales son células inmuno-competentes **(Pinsino et al. 2008)**, reconocidas como efectoras del sistema inmune del erizo por su capacidad de responder a lesiones, agentes citotóxicos, etc. **(Matranga, 1996; Matranga et al. 2005)**, estos celomocitos son las células claves en cuanto a la respuesta inmune innata, actuando como los principales efectores inmunitarios, como mediadores del rechazo de aloinjertos. Los celomocitos median la respuesta inmune a través de la fagocitosis y encapsulación de partículas extrañas, en conjunto con la liberación por degranulación de moléculas antimicrobianas **(Smith et al. 2006)**. Se ha detectado que durante la gastrulación de las células pigmentarias y después de su diferenciación, son capaces de sintetizar la molécula denominada como Equinocromo A presente en las células esferoidales rojas las cuales presentan actividad antibacteriana **(Castelani et al. 2003)**.

El aumento celular puede ser cuantificado, siendo directamente proporcional con el nivel de estrés al cual se somete el organismo. También a nivel molecular se puede determinar la expresión del gen de la metalotioneína, el cual se encuentra directamente relacionado con la proliferación celular y con el estrés al cual ha sido sometido el erizo.

2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO

El objetivo general de esta investigación es caracterizar la expresión del gen de la metalotioneína en celomocitos del erizo antártico *Sterechinus neumayeri* en respuesta al estrés por metales pesados.

Objetivos específicos:

- a) Analizar la expresión de la metalotioneína en el erizo antártico ante un estrés por CdCl₂ a diferentes concentraciones. (100 µg/L y 200 µg/L)

- b) Relacionar este estrés con una posible variación en el número de celomocitos circulantes y su viabilidad celular.

- c) Poder utilizar los celomocitos de *S. neumayeri* como un biomarcador ante la contaminación por metales pesados.

Hipótesis:

El cadmio es un importante estresor en ambientes acuáticos debido a que persiste en la naturaleza y es bioacumulado en los organismos. El erizo antártico *S. neumayeri* frente a concentraciones elevadas de Cd activaría mecanismos de detoxificación en el cual los celomocitos serían claves en este proceso. El siguiente trabajo plantea que producto de un estrés por CdCl₂ se generará un aumento en el número de celomocitos circulantes, y por lo tanto en la expresión de la metalotioneína, la cual puede ser utilizada como biomarcador de contaminación ambiental para metales pesados.

3. METODOLOGÍA

3.1 ÁREA DE MUESTREO

Las muestras fueron obtenidas en Bahía Maxwell ($62^{\circ} 15' S$, $58^{\circ} 55' W$) la cual se encuentra localizada en la Isla Rey Jorge (Fig 3), perteneciente a las Islas Shetland del Sur, Península Antártica.

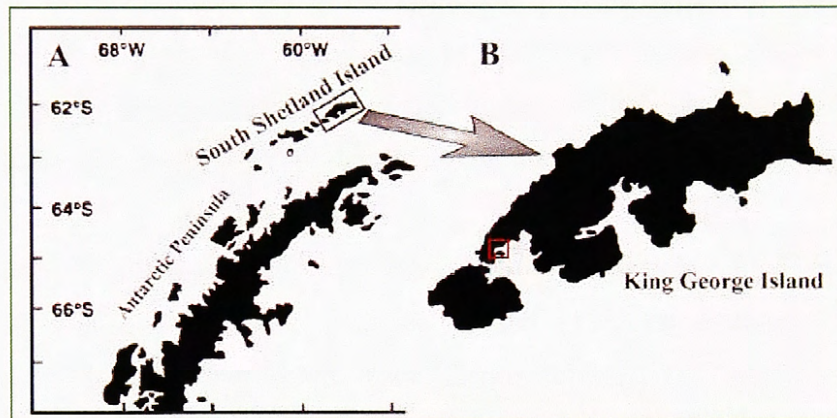


Fig 3.- Islas Shetland del Sur, Península Antártica, el lugar de muestreo se encuentra marcado en rojo correspondiente a la Bahía Maxwell en la Isla Rey Jorge.

Las islas Shetland del Sur se caracterizan por presentar clima Polar. Las temperaturas medias en la temporada estival rara vez sobrepasan los 0° C, mientras que en invierno son de -12° C.

3.2 OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y ESTIMULACIÓN CON CLORURO DE CADMIO.

Las muestras fueron colectadas por buceo autónomo en un rango de 4-10 mt de profundidad. Los erizos se extrajeron de su ambiente natural y se dispusieron en un acuario a 1°C, con circulación por bomba, primeramente se pusieron aquellos erizos que se utilizaron como control, posteriormente aquellos erizos estimulados a 100 µg/L y por último aquellos estimulados a 200 µg/L.

El acuario utilizado poseía una capacidad aproximadamente de 30 L el cual se encontraba equipado con una pequeña bomba (1) , un aireador (2) con su respectivo motor (3), una sonda para enfriar (chiller) (4) que mantenía una temperatura fría adecuada y un termómetro para ir controlándola (Fig 4).

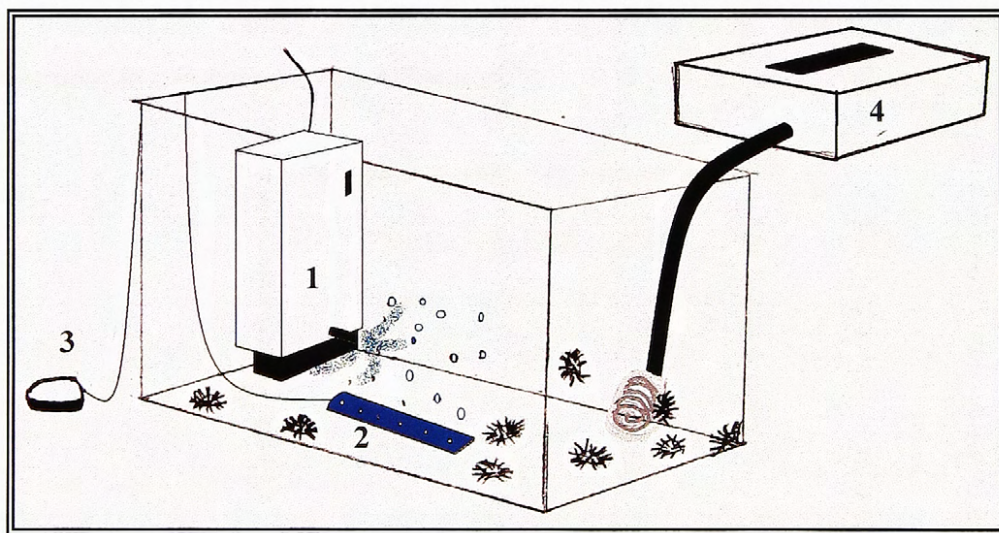


Fig. 4.-Esquema del sistema de recirculación utilizado para la mantención de los erizos a una temperatura de 1°C, los erizos luego de ser extraídos de su ambiente natural eran dispuestos inmediatamente en este acuario dónde se mantenían con alimento (algas) hasta su estimación con CdCl₂.

Para cada estimulación se utilizaron 6 erizos de igual tamaño, la estimulación se realizó con CdCl_2 el cual fue aplicado en forma de solución en el acuario de 30 litros y por estimulación directa a través de inyección dentro de la cavidad celómica (Viarengo *et al.* 1999) con un tiempo de mantención máxima de 24 horas.

3.3 OBTENCIÓN, CONTEO Y DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD DE CELOMOCITOS.

El líquido celómico fue obtenido con una jeringa a través de la membrana peristomal según método Plytycz y Selgelid (1993), los celomocitos se obtuvieron a través de centrifugación a 8°C , el conteo se realizó a través de microscopio en una cámara de Neubauer, para realizar el dicho conteo se tomaron en cuenta las cuatros esquinas y el centro del cuadrículado para los celomocitos totales, y para determinar las cantidades de células rojas solo se tomó en cuenta el cuadro cuadrículado de en medio.

Las cantidades totales de celomocitos, células rojas y viabilidad celular se determinaron con las siguientes fórmulas:

\emptyset Células rojas / 0,5 x 1000
\emptyset Celomocitos totales x 50000
\emptyset Células viables x 50000

Fuente: <http://www.animal.ufl.edu/hansen/Protocols/hemacytometer.htm>.

Para determinar la viabilidad celular se les agregó una alícuota de Trypan Blue para teñir selectivamente aquellas células muertas., las cuales posteriormente también fueron contadas. Se distinguieron como células muertas aquellas que tomaron coloración azul por el ingreso del colorante debido a la disfuncionalidad de la membrana celular.

3.4 EXTRACCIÓN DE ARN

Para poder obtener el ARN de los celomocitos desde el fluido celómico, este fue centrifugado a (4000 rpm) de esta manera fue separado del componente celular. La extracción de ARN se realizó utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen®) según protocolo del fabricante, basado en la extracción fenólica, donde el homogeneizado celular fue desprotoneizado y así liberado de aquellos componentes que no sean hidrosolubles mediante una separación de fases con distinta solubilidad (Hernández *et al.* 1995).

Para obtener el ARN se agregó 200 µl/L cloroformo, posteriormente se centrifugó dónde se pudieron distinguir claramente dos fases, además de fenol se le agregó cloroformo el cual tiene la capacidad de eliminar ARNasas, así como de disolver lípidos y proteínas. El ADN es selectivamente retenido en la fase orgánica e interfase, dejando el ARN en la fase acuosa, el ARN se va purificando cada vez más a través de la utilización de etanol e isopropanol. Por lo que la fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo donde se le agregó alcohol isopropílico, se agitó suavemente y se llevó a centrifugación en frío (8°C) obteniendo cada vez un producto más puro.

Para finalizar la fase de extracción el precipitado de ARN fue lavado con etanol, centrifugado (7500 rpm por 5 min) en frío (8°C) y agitado suavemente, posteriormente se centrifugó y se le extrajo el etanol, por ultimo se dejó secar a temperatura ambiente y se le añadió 60 µl de agua estéril y es almacenado a -80°C para su cuantificación.

Todo el procedimiento fue realizado utilizando guantes de látex, puntas con filtro y tubos libres de ARNasas.

3.4.1 Cuantificación de ARN

La cuantificación se llevó a cabo en un espectrofotómetro (UV-1603; UV-Visible Spectrophotometer Shimadzu) el cual midió la cantidad de luz absorbida por las muestras a una longitud de onda de 260 y 280 nm. Las muestras se dispusieron en unas cubetas de plástico (cubetas UV desechables (BRAND), 500 μ l), una de las cubetas se utilizó como control o blanco con 100 μ l de agua ultra pura y la otra cubeta contenía el ARN (90 μ l de agua ultra pura más 10 μ l de ARN), una vez obtenidos los valores de absorción a 260 y 280 nm se calcula R, el cual nos indicó la calidad de los ARN.

$$R = A_{260}/A_{280}$$

$$\text{F.D (Factor de dilución)} = (\mu\text{l ARN} + 90 \mu\text{l H}_2\text{O}) / 10 \mu\text{l ARN}$$

$$A_{260} \times 40 \times \text{f.d} = (\mu\text{g/ml})/1000 = \mu\text{g/ul.}$$

Se consideró un ARN de buena calidad cuando el R era igual o superior a 1,8. Si la calidad del ARN era la adecuada se procedió a realizar una retro-transcripción para obtener el ADN complementario que fue utilizado en la reacción de la polimerasa en cadena (PCR).

3.5 RT-PCR SEMICUANTITATIVA

Una vez que el ARN fue extraído, fue necesario obtener el ADN complementario (ADNc) el cual sirvió de sustrato para poder realizar la PCR (Polimerase Chain Reaction) a través de una enzima proveniente de un retrovirus.

La transcriptasa inversa (RT) (Invitrogen ®) se utilizó como molde de una molécula de ARN a la cual se le unirá un pequeño fragmento de ADN como cebador (Oligo-dT) (Invitrogen ®).

La transcripción reversa se realizó utilizando 1µg de ARN total de cada muestra junto con la enzima transcriptasa reversa MuLV (Applied Biosystem ®). Esto se introdujo en tubos de PCR para disponerlos en el termociclador (Eppendorf ® Mastercycle personal, capacidad 25 tubos) el programa que se utilizó constó de los siguientes ciclos: 65°C por 5 minutos, 37°C por 59 minutos y 72° C por 15 minutos.

Tabla 2.- Partidores diseñados a partir de la secuencia conocida de la metalotioneína en *S. neumayeri* caracterizada desde ovocitos (Scudiero *et al.* 1997).

Gen	Sentido	Secuencia 5'-3'	Tamaño	
			amplicón (pb)	Tm (C°)
Metalotioneína	Forward	CACCATGCCTGATGTCAAGT	292	60
	Reverse	TGTCTGGCTTGGAGCATGTTG		61

Con ambos partidores (Sintetizadas por Invitrogen®) se amplificó todo el marco de lectura para la proteína.

Para la PCR el volumen de reacción fue de 25 μ l. Este volumen incluía el mix de amplificación y 1 μ l de ARN total, las condiciones de amplificación del termociclador consistieron en 30 ciclos a, 94°C 10 min, 94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min, 72°C 7 min.

El producto resultante de esta PCR se cargó en un gel de agarosa a 1.5% y fue visualizado con bromuro de etidio en un transiluminador a UV.

Luego de obtener las fotos de los geles, de los erizos estresados con CdCl₂, se cuantificó la expresión de la MT, a través del software ImageJ v 1.41. Se realizó un triplicado de la MT, posteriormente los datos fueron graficados a través del software SigmaPlot v 8.0.

3.6.- RT-PCR EN TIEMPO REAL

Para las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron diluciones 1/10 de cada una de las muestras de los grupos control y experimental. Estas reacciones fueron realizadas en un volumen final de 25 μ l, agregando los mismos partidores usados en la PCR semicuantitativa y agregando una solución lista para su uso denominada SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Las condiciones de amplificación del termociclador 7500 de Applied Biosystems, consistieron en 40 ciclos a, 94°C 10 min, 94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min. Los resultados fueron finalmente analizados por el uso del programa 7500 versión 2.0.1.

3.7 PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR

Para poder obtener la secuencia, los productos de RT-PCR se purificaron según protocolo Spin Prep PCR Clean-Up Kit (Novagen ®) el cual consiste en transferir la reacción de PCR a un tubo de centrifuga (1,5 ml), posteriormente se le añadió el buffer de unión (la cantidad es 400 µl per. 100 µl de reacción de PCR, llevándose a vórtex, posteriormente se utilizo un tubo con filtro en un tubo receptor de 2 ml dónde se recibió el filtrado a centrifugación ($\geq 10000 \times g$ por 1 min.), se desechó el fluido y el filtro se colocó dentro de otro tubo receptor de 2 ml añadiéndole 400 µl de Spin Prep Bind Buffer A, se llevo a centrifuga ($\geq 10000 \times g$ por 1 min.), se retiró el filtro y se desechó el lavado, nuevamente se coloca el filtro en un tubo receptor de 2 ml dónde se le agregaron 500 µl de buffer de lavado, se centrifugó nuevamente ($\geq 10000 \times g$ por 1 min.), se removió el filtro, se desecho el lavado, y se volvió a centrifugar por 2 min. para remover todo residuo del buffer de lavado, por último se transfirió el tubo con filtro a un tubo receptor del eluido de 1,5 ml, se pipeteó 50 µl de agua ultra pura precalentada (70°C) agregándose a al nuevo tubo a través del filtro, se incubó por 3 min. a temperatura ambiente. Inmediatamente se centrifugó por 1 min. y se colectó el producto PCR eluido.

3.8 ANÁLISIS EXPRESIÓN DE GENES

El producto amplificado desde los celomocitos se secuenció mediante el protocolo de secuenciación en el laboratorio del Servicio Agrícola Ganadero (SAG) en Punta Arenas. Para confirmar la secuencia se realizaron una búsqueda de homologías con el algoritmo de BLAST en el sitio Web NCBI (<http://www.ncbi.gov/blast>). Las secuencias nucleotídicas fueron traducidas virtualmente a través del servidor ExpASY (<http://www.expasy.org/>). Los alineamientos se realizaron con las secuencias proteicas conocidas de la metalotioneína en diferentes organismos de distintos reinos, contrastándolas con las de *Sterechinus neumayeri* con el software CLUSTALX. y posteriormente los

árboles filogenéticos fueron realizados con el software MEGA 4.1 (www.megasoftware.net/mega41).

La cuantificación de la expresión de genes fue realizada con el software ImageJ v 1.41, (<http://imagej.software.informer.com/1.4/>) se calculó el promedio acuerdo a los píxeles de la imagen utilizando una escalada de valores de grises dentro de la selección representado en Unidades Arbitrarias (UA), para diferencias significativas se utilizo t-test.

3.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos para celomocitos totales, células rojas y cuantificación génica fueron realizados con el software STATISTICA 7.0, utilizando ensayo de ANOVA (Análisis Wizard) , un valor de $p < 0,05$ fue considerado como significativo, cómo análisis de comparaciones posteriores (post hoc) se utilizó el ensayo Newman-Keuls.

4. RESULTADOS

4.1 ANÁLISIS CELULAR

4.1.1 Conteo de celomocitos:

- Evaluación de la inducción de la MT por baño de cloruro de Cadmio.

La cantidad de celomocitos totales en los organismos controles después de 6 horas de estimulación fue de un promedio de $6.925 \pm 0.907 \times 10^6$ células/ml, mientras que para los organismos expuestos a $100 \mu\text{g/L}$ de CdCl_2 el promedio de celomocitos totales fue de $5.858 \pm 0.280 \times 10^6$ células/ml por lo tanto se evidenció un descenso en el número de estos. Por el contrario, para aquellos organismos expuestos a $200 \mu\text{g/L}$ de CdCl_2 el promedio fue de $9.800 \pm 1.897 \times 10^6$, registrándose un aumento en comparación a los organismos controles y con los expuestos a $100 \mu\text{g/L}$ de CdCl_2 (Fig. 5).

Después de las 12 horas, los organismos controles mantuvieron aproximadamente su cantidad inicial de celomocitos totales con un promedio de $6.783 \pm 0.514 \times 10^6$ células/ml, observándose un ligero aumento en aquellos organismos expuestos a $100 \mu\text{g/L}$ de CdCl_2 con un promedio de $7.441 \pm 0.712 \times 10^6$ células/ml y un aumento más notable en aquellos organismos expuestos a $200 \mu\text{g/L}$ de CdCl_2 con un promedio de $9.890 \pm 2.078 \times 10^6$ células/ml (Fig. 5).

Ya pasadas las 24 horas los organismos controles siguieron manteniendo aproximadamente su cantidad inicial de celomocitos totales con un promedio de $7.541 \pm 0.376 \times 10^6$ células/ml, sin embargo se registró un mayor aumento en la cantidad de celomocitos totales en aquellos organismos expuestos a $100 \mu\text{g/L}$ de CdCl_2 con promedio de $9.825 \pm 1.955 \times 10^6$ células/ml, para los organismos expuestos a $200 \mu\text{g/L}$ de CdCl_2 la cantidad de celomocitos totales varío de manera

no significativa con respecto a las demás horas, con un promedio de $10.233 \pm 1.353 \times 10^6$ células/ml (Fig. 5).

La cantidad de celomocitos totales no exhibió una variación significativa en el tiempo en los organismos controles, sin embargo en los organismos estimulados a $100 \mu\text{g/L}$ se observó un aumento gradual post-inducción similar al obtenido para $200 \mu\text{g/L}$ después de 24 horas. Si bien, se logra apreciar una respuesta rápida al aumento del número de celomocitos totales frente a una mayor concentración de CdCl_2 ($200 \mu\text{g/L}$), esta no fue significativa ($P > 0.05$).

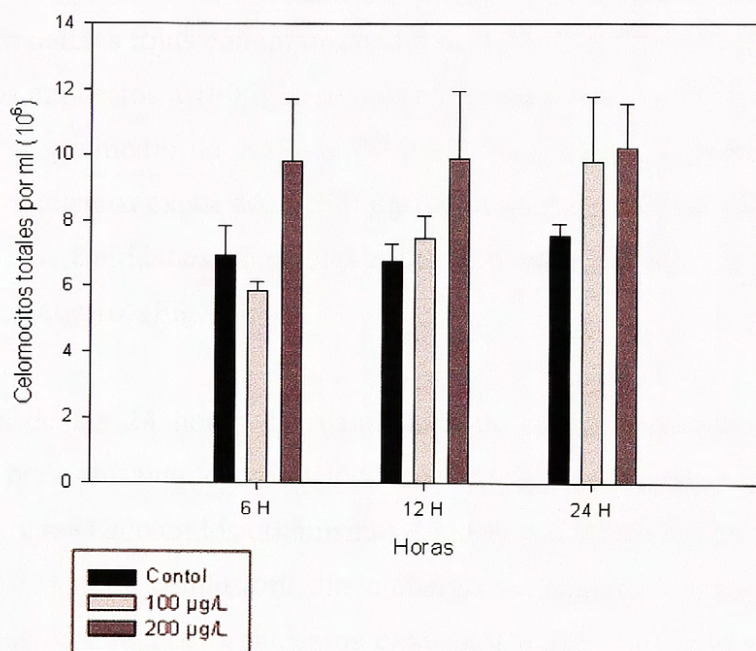


Fig. 5.- Variación de la cantidad de celomocitos totales a diferentes concentraciones de CdCl_2 durante el tratamiento por baño. Si bien se aprecia una tendencia al aumento en los erizos sometidos a las dos concentraciones de CdCl_2 , esta no fue significativa ($P > 0.05$).

Lo mismo ocurrió con las células rojas, que también revelaron su particular participación en la respuesta inmunitaria en *Stereochinus neumayeri*, la Fig. 6 muestra que después de las 6 horas la cantidad de células rojas en los organismos controles tuvo un promedio de $1.063 \pm 0.194 \times 10^5$ células/ml, para aquellos organismos expuestos a $100 \mu\text{g/L}$ existió un aumento en la cantidad de células rojas con un promedio de $1.653 \pm 0.161 \times 10^5$ células/ml y posteriormente un descenso en aquellos organismos expuestos a $200 \mu\text{g/L}$ con un promedio de $1.570 \pm 0.208 \times 10^5$ células/ml.

Luego de las 12 horas, los organismos controles exhibieron un aumento en la cantidad de células rojas con un promedio de $1.730 \pm 0.208 \times 10^5$ células/ml, en los organismos expuestos a $100 \mu\text{g/L}$ se observó un descenso en la cantidad de células rojas con un promedio de $1.380 \pm 0.244 \times 10^5$ células/ml, lo mismo ocurrió para aquellos organismos expuestos a $200 \mu\text{g/L}$ con un promedio de $1.313 \pm 0.211 \times 10^5$ células/ml, las cantidades de células rojas para cada tratamiento fueron menores que el grupo control (Fig. 6).

Después de las 24 horas, las cantidades de células rojas en los organismos controles presentó una disminución, con un promedio de $1.570 \pm 0.359 \times 10^5$ células/ml, y más aún en los organismos expuestos a $100 \mu\text{g/L}$ con un promedio de $0.883 \pm 0.251 \times 10^5$ células/ml, sin embargo se registró la mayor cantidad de células rojas en aquellos organismos expuestos a $200 \mu\text{g/L}$ con un promedio de $2.003 \pm 0.598 \times 10^5$ células/ml (Fig. 6).

Si bien la Fig. 6 refleja notables variaciones en la cantidad de células rojas para los distintos tratamientos a diferentes horas, no se encontraron diferencia significativa entre ellas ($P > 0.05$). Sin embargo, a $100 \mu\text{g/L}$ se aprecia una tendencia a la disminución progresiva de estas células, mientras que a $200 \mu\text{g/L}$ al final de la estimulación a las 24 horas se observó un aumento en el número de estas.

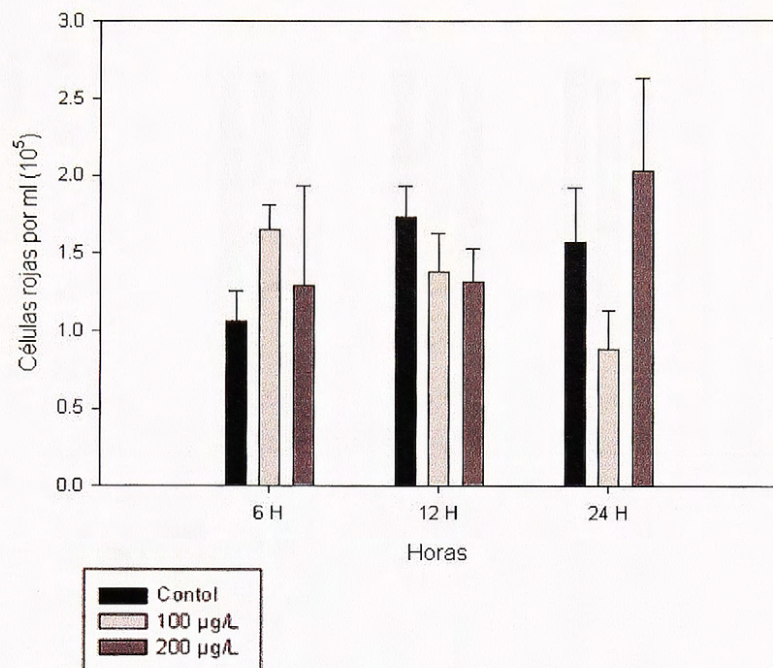


Fig 6.- Variación de la cantidad de células rojas a diferentes concentraciones de CdCl_2 durante el tratamiento por baño. Si bien se aprecia una tendencia al aumento en los erizos sometidos a $200\mu\text{g/L}$ de CdCl_2 , esta no fue significativa ($P>0.05$).

Se pudo observar que el porcentaje de viabilidad celular entre tratamientos no fue significativo $P > 0.05$ (Fig. 7), los organismos controles son aquellos que presentan más viabilidad celular sin embargo no difieren mucho de los otros tratamientos, la viabilidad solo disminuye un poco cuando los organismos son sometidos a $100\mu\text{g/L}$ con un promedio de 95.931% y $200\mu\text{g/L}$ con un promedio de 94.714% .

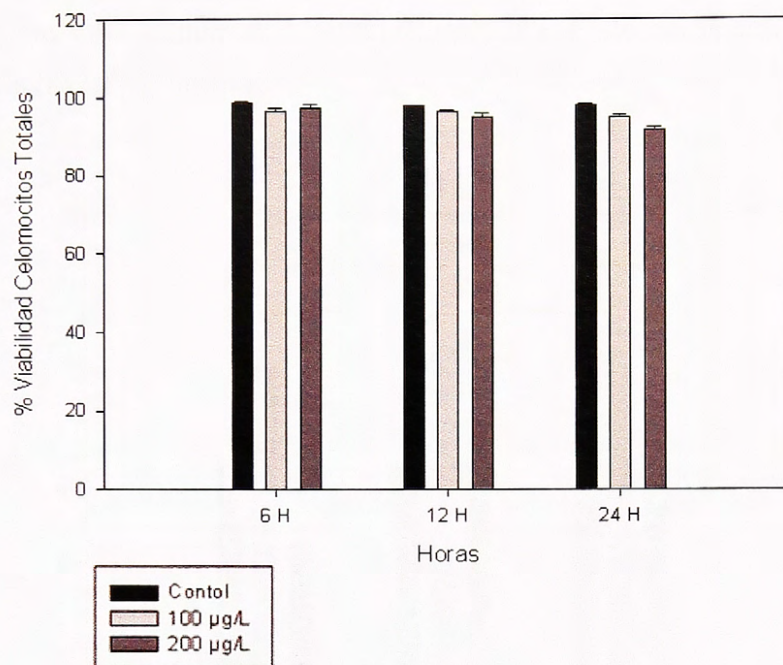


Fig 7.- Cantidad de células viables a diferentes concentraciones de CdCl₂ y control en tratamiento de baño. Se puede observar como la viabilidad celular no se ve afectada en gran medida cuando los organismos son estimulados a 100 µg/L y 200 µg/L de CdCl₂.

- **Inducción por inyección en la cavidad celómica de CdCl₂**

Anteriormente se evaluó el efecto de la estimulación con CdCl₂ en el medio dónde se mantenían los erizos. En esta segunda experiencia sin embargo se quiso observar que ocurría con las mismas concentraciones de CdCl₂ pero inyectadas directamente dentro de la cavidad celómica de *S.neumayeri* para tener la certeza de la inducción del gen de la MT por parte de los celomocitos.

La Fig. 8 muestra que después de las 6 horas, los organismos controles presentan un promedio de $6.925 \pm 0.907 \times 10^6$ células/ml de celomocitos totales, esta cantidad aumentó para aquellos organismos expuestos a 100µg/L de CdCl₂ con un promedio de $9.620 \pm 1.246 \times 10^6$ células/ml, pero sin ser significativa ($P > 0.05$), por el contrario se observó un descenso en la cantidad de celomocitos totales a una exposición de 200 µg/L de CdCl₂ con un promedio de $4.530 \pm 1.078 \times 10^6$ células/ml, lo cual estuvo por debajo de la cantidad de

aquellos organismos expuestos a $100\mu\text{g/L}$ de CdCl_2 a 24 horas con promedio de $10.680 \pm 0.878 \times 10^6$ células/ml.

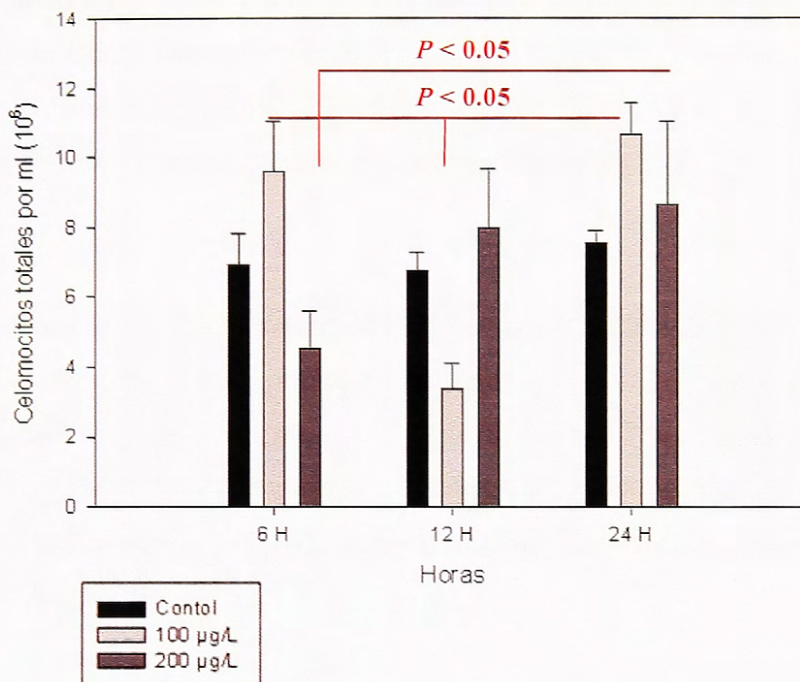


Fig 8.- Variación de la cantidad de celomocitos totales a diferentes concentraciones de CdCl_2 durante el tratamiento por inyección. Se puede apreciar que existió un rápido aumento en la cantidad de celomocitos luego de las 6 horas de exposición a $100\mu\text{g/L}$ y como estas aumentaron de forma más gradual en aquellos organismos estimulados a $200\mu\text{g/L}$.

La cantidad de células rojas para los organismos controles pasadas las 6 horas fue de un promedio de $1.996 \pm 0.963 \times 10^5$ células/ml, mientras que los organismos expuestos a $100\mu\text{g/L}$ de CdCl_2 exhibieron un gran aumento en la cantidad de células rojas con un promedio de $1.660 \pm 0.384 \times 10^5$ células/ml, sin embargo aquellos organismos expuestos a $200\mu\text{g/L}$ mostraron un descenso con un promedio de $0.680 \pm 0.239 \times 10^5$ células/ml, debajo del grupo control y aquellos expuestos a $100\mu\text{g/L}$ de CdCl_2 (Fig. 9).

Luego de las 12 horas, los organismos controles exhibieron un notable aumento en la cantidad de células rojas con un promedio de $0.540 \pm 0.097 \times 10^5$ células/ml, sin embargo en aquellos organismos expuestos $100 \mu\text{g/L}$ se observó un descenso con un promedio de $0.984 \pm 0.064 \times 10^5$ células/ml al igual que aquellos expuestos a $200 \mu\text{g/L}$ de CdCl_2 con un promedio de $0.592 \pm 0.057 \times 10^5$ células/ml dónde se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) con los organismos expuestos a $100 \mu\text{g/L}$ a 6 horas y los organismos controles después de las 12 horas ($P < 0.05$) (Fig. 9).

Después de las 24 horas la cantidad de células rojas tiende a descender en los organismos controles con un promedio de $0.540 \pm 0.125 \times 10^5$ células/ml, no así en los organismos expuestos a $100 \mu\text{g/L}$ de CdCl_2 dónde el promedio es de $1.184 \pm 0.236 \times 10^5$ células/ml, lo que sugiere un aumento con respecto a las 12 horas, los organismos expuestos a $200 \mu\text{g/L}$ poseen un leve aumento con un promedio de $0.744 \pm 0.136 \times 10^5$ (Fig. 9).

Según la Fig. 9 existe diferencia en las cantidades de células rojas entre los tratamientos según ANOVA, con un $P < 0.05$.

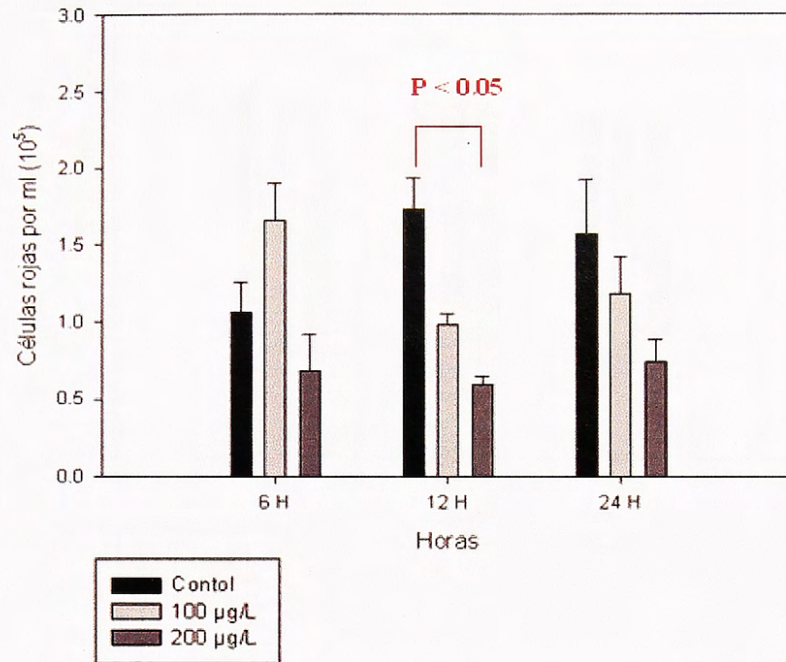


Fig 9.- Cantidad de células rojas a diferentes concentraciones de CdCl₂ y control en tratamiento de inyección. Los erizos presentaron en general un aumento en el tiempo en el número de células rojas, en el caso de los erizos inyectados con 100 µg/L solo se apreció un aumento a las primeras 6 horas para disminuir posteriormente, en el caso de los erizos de 200 µg/L no se apreció una inducción en el número de células rojas en el tiempo.

La viabilidad de los celomocitos al igual que el experimento anterior no fue afectada de gran manera por la inyección de CdCl₂, los organismos controles nuevamente son aquellos que presentaron más viabilidad celular sin diferir demasiado de los tratamientos. A 100µg/L se exhibió un promedio de 89.794% y a 200µg/L se exhibió un promedio de 91.630 % (Fig 10).

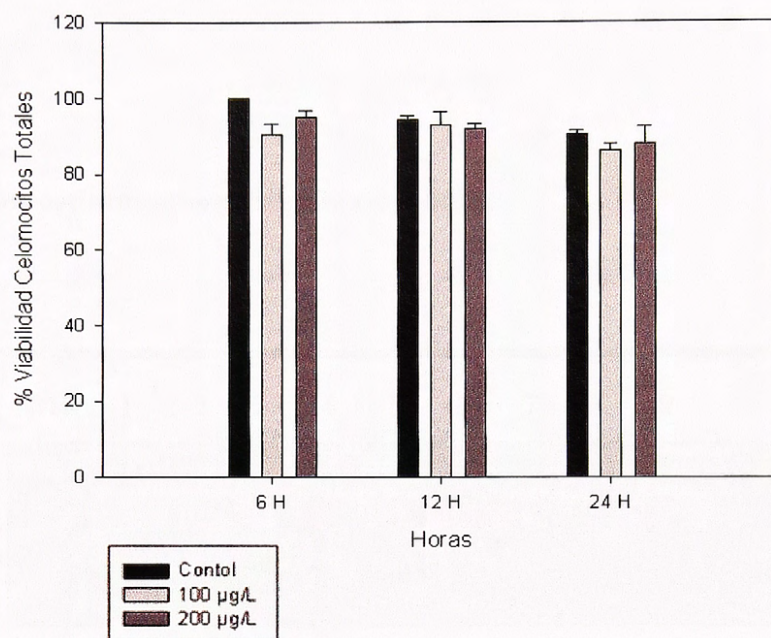


Fig 10.- Cantidad de células viables a diferentes concentraciones de CdCl₂ y control en el tratamiento de inyección.

4.1.2 Análisis de la expresión de la MT en celomocitos.

Se puede observar que existió una mayor expresión del gen de la MT en aquellos organismos estimulados a 200µg/L, en aquellos organismos estimulados a 100µg/L se evidencia la máxima expresión inmediatamente a las 6 horas, y como descende esta a las 12 horas, para luego aumentar su expresión de manera más leve a las 24 horas (Fig 11).

Organismos estimulados por baño de CdCl₂

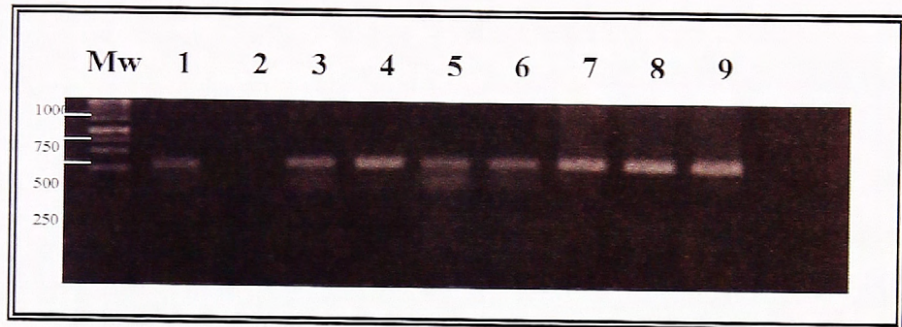


Fig 11.- Electroforesis de productos RT-PCR. Los productos fueron analizados en un gel de agarosa al 1,5% teñido con bromuro de etidio. Los productos 1,2 y 3 de RT-PCR corresponden a organismos control a 6, 12 y 24 horas respectivamente, los productos 4,5 y 6 de RT-PCR corresponden a organismos estimulados con 100µg/L de CdCl₂ y productos 7,8 y 9 para organismos estimulados con 200µg/L de CdCl₂. Mw (marcador de peso).

Organismos estimulados por inyección de CdCl₂

Se puede observar que la expresión del gen de la MT en los organismos controles mostró un leve aumento en las tres diferentes horas a las que fueron expuestas los organismos, esta expresión aumentó en aquellos organismos estimulados a 100µg/L, para luego disminuir la intensidad de expresión en aquellos que fueron estimulados a 200µg/L (Fig 12).

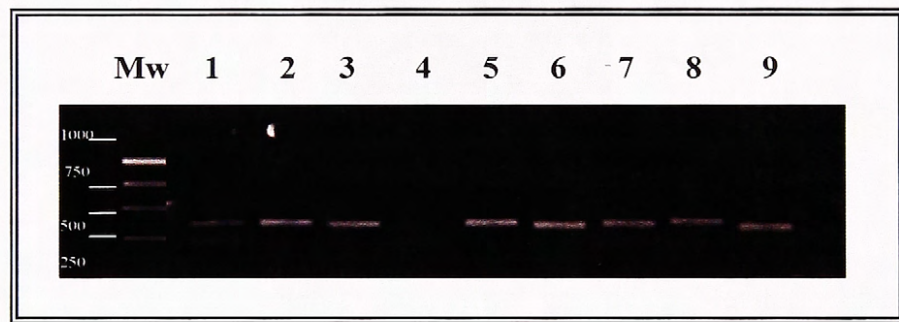


Fig 12.- Electroforesis de productos RT-PCR. Los productos con SYBR Gold fueron analizados en un gel de agarosa al 1%.

Los productos 1,2 y 3 de RT-PCR corresponden a organismos control a 6, 12 y 24 horas respectivamente, los productos 4,5 y 6 de RT-PCR corresponden a organismos estimulados con 100µg/L de CdCl₂ y los productos 7,8 y 9 corresponden a organismos estimulados con 200µg/L de CdCl₂. Mw (marcador de peso).

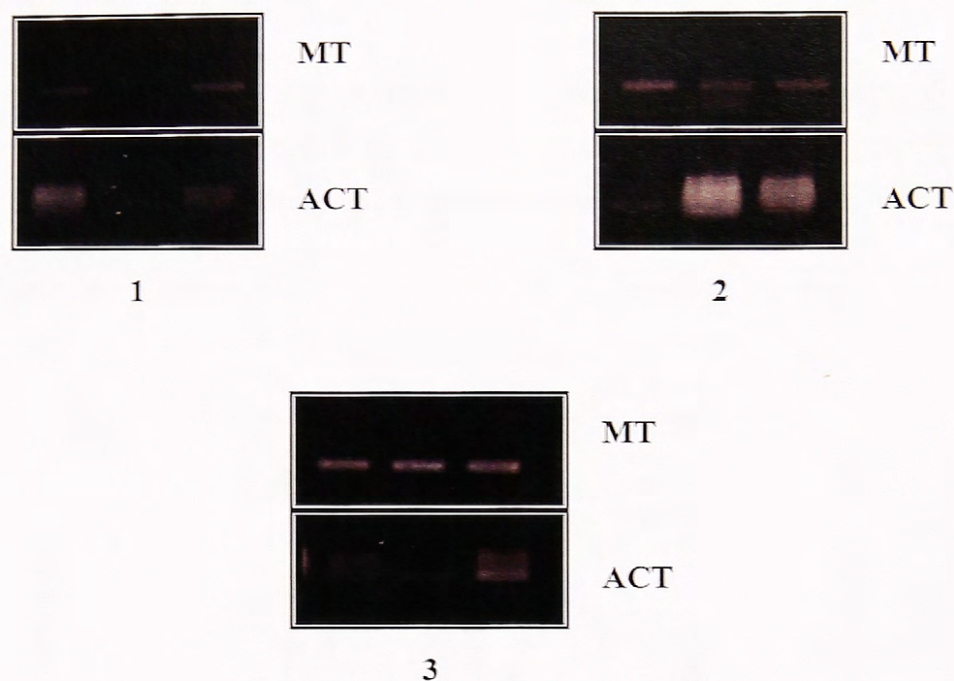


Fig 13.- Comparación entre expresión del gen de la Metalotioneína y el gen control Actina para organismos estimulados por baño.

Electroforesis de productos PCR con el gen de la Metalotioneína y el gen control Actina. (1) representa aquellos organismos control a 6, 12 y 24 horas respectivamente, (2) organismos estimulados a 100 µg/L a 6, 12 y 24 hrs, (3) organismos estimulados a 200 µg/L a 6, 12 y 24 horas

Como gen control para comparar los resultados por baño, se utilizó la actina, se observa en las fotografías de los geles, la amplificación de la metalotioneína en la parte superior, en dónde la banda se ve definida para los tratamientos de estimulación por baño, pero sin embargo en la expresión de la actina no se logra distinguir una banda más definida, ni en los organismos controles así como en los estimulados a distintas concentraciones, esto puede sugerir que la actina no es un buen gen control para *S. neumayeri* (Fig 13).

4.2 CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MT

Por medio del uso del software Imagen v 1.4, utilizando los píxeles de la imagen y basándose en una escala de grises se calcularon los valores promedios de la expresión de la metalotioneína, graficándose posteriormente en unidades arbitrarias (UA) (Fig 14).

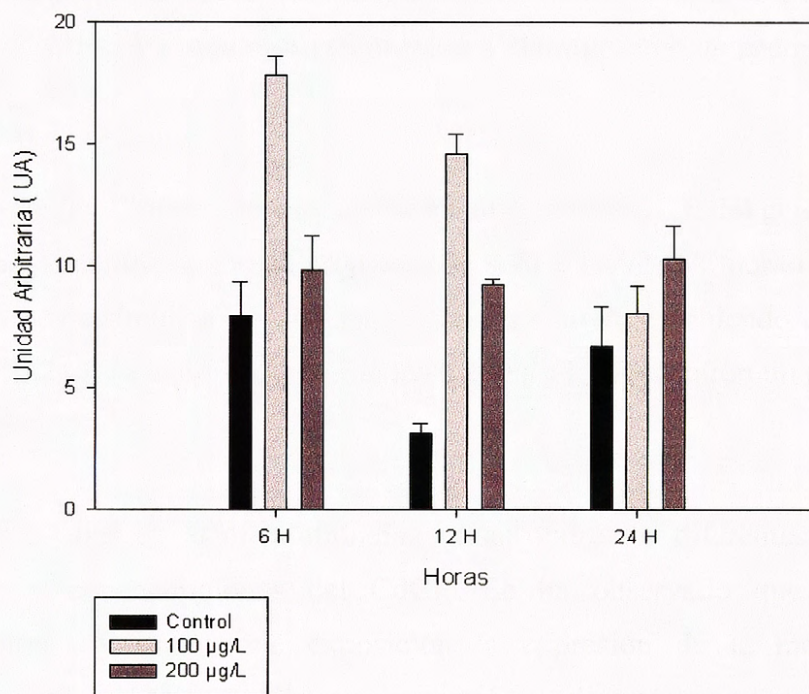


Fig 14.- Cuantificación de la expresión de la metalotioneína (Utilizando el software Imagen v 1.4) a diferentes concentraciones de CdCl₂ y horas para organismos estimulados por baño.

La expresión de MT aumenta a 6 y 12 horas para disminuir a 24 horas. La expresión se consideraron significativas cuando $P < 0.05$.

El gen de la metalotioneína comenzó a aumentar su expresión cuando el organismo se sometió a altas concentraciones de CdCl₂, exhibiendo un aumento máximo luego de 6 horas de estimulación a 100 µg/L con un promedio de 17.85 ± 0.745 UA, posteriormente se observó una declinación en la expresión del gen a una concentración de 200 µg/L con un promedio de 9.82 ± 1.425 UA.

Luego de las 12 horas de exposición, se observó un descenso en la expresión para los organismos controles exhibiendo un promedio de 3.15 ± 0.369 UA, así también para los organismos que fueron expuestos a 100 µg/L con un promedio de 14.58 ± 0.821 UA y aquellos estimulados a 200 µg/L con un promedio de 9.24 ± 0.266 UA.

Después de las 12 horas de exposición a CdCl₂ la expresión del gen aumentó en los organismos controles con un promedio de 6.70 ± 1.692 UA, por el contrario en los organismos estimulados a 100 µg/L esta disminuyó, exhibiendo un promedio de 8.05 ± 1.124 UA, aquellos estimulados a 200 µg/L presentaron un promedio de 10.29 ± 1.395 UA.

Los niveles de la metalotioneína varían entre los diferentes tiempos de exposición y concentraciones del CdCl₂. Se ha observado que a mayores concentraciones y tiempo de exposición la expresión de la metalotioneína disminuye (200 µg/L) y que la mayor expresión se detectó inmediatamente luego de las primeras 6 horas de exposición (100 µg/L).

4.3.- RT-PCR EN TIEMPO REAL

Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron con un volumen final de 25 µl, se utilizaron los mismos partidores que en la PCR semicuantitativa. Según la Fig. 15 (A), el gráfico de amplificación del gen de la MT en PCR tiempo real para los organismos controles, mostró un C_T (Ciclo umbral "Cycle threshold") similar para las distintas horas, luego de las 6 horas de mantención se observó un C_T promedio de 19.08 ciclos, ya pasadas las 12 horas se obtuvo un C_T promedio de 18.83 ciclos y posterior a las 24 horas un C_T promedio de 19.09 ciclos.

Por lo que los organismos controles no mostraron modificación en la expresión de la MT. Por el contrario según, la Fig. 15 (B), los organismos estimulados a 100 $\mu\text{g/L}$ a 6 , 12 y 24 horas, obtuvieron distintos C_T , la primera curva de amplificación que se evidenció fue la de organismos luego de las 6 horas de exposición a CdCl_2 , con un C_T promedio de 15.106 ciclos, que indica que el gen de la MT aumento su expresión, posteriormente se observó la curva de amplificación de los organismos luego de las 12 horas de exposición con un C_T promedio de 18.33 ciclos y finalmente la curva de amplificación de aquellos organismos expuestos luego de 24 horas con un C_T promedio de 21.02 ciclos. Por lo cual el nivel de expresión del gen de la MT muestra una caída respecto de los organismos control.

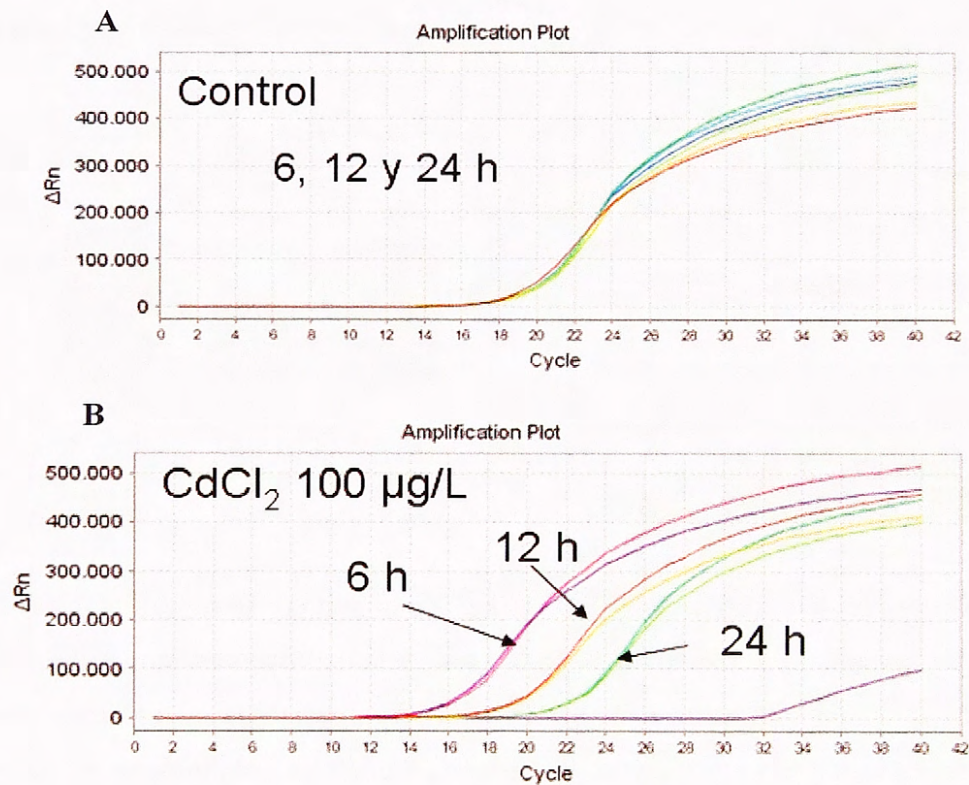


Fig 15.- (A) Curva de amplificación del gen de MT en PCR tiempo-real para los organismos controles a 6, 12 y 24 horas en el experimento de baño. (B) Curva de amplificación del gen de MT en PCR tiempo-real para organismos estimulados a 100 $\mu\text{g/L}$ de CdCl_2 a 6, 12 y 24 horas en experimento de baño.

Los valores de transcripción del gen de la MT que fueron medidos por comparación directa de los valores C_T , se graficaron para visualizar mejor la eficiencia de amplificación para los organismos controles y aquellos estimulados a $100 \mu\text{g/L}$ de CdCl_2 .

La Fig. 16 (A) muestra los C_T del gen de la MT en organismos controles, se observó un C_T relativamente bajo, lo cual indicaría una baja transcripción de ARN. En organismos estimulados a $100 \mu\text{g/L}$ de CdCl_2 muestra grandes diferencias en los C_T a las distintas horas, los organismos expuestos 6 horas son los que presentan el menor C_T por lo tanto una mayor expresión del gen, seguidos por los correspondientes a 12 horas en el cual el C_T es similar al de los organismos control y 24 horas alcanzando un C_T entre 21 y 22 ciclos, que evidenciaría una baja respecto de los organismos control, que indicaría una menor transcripción.

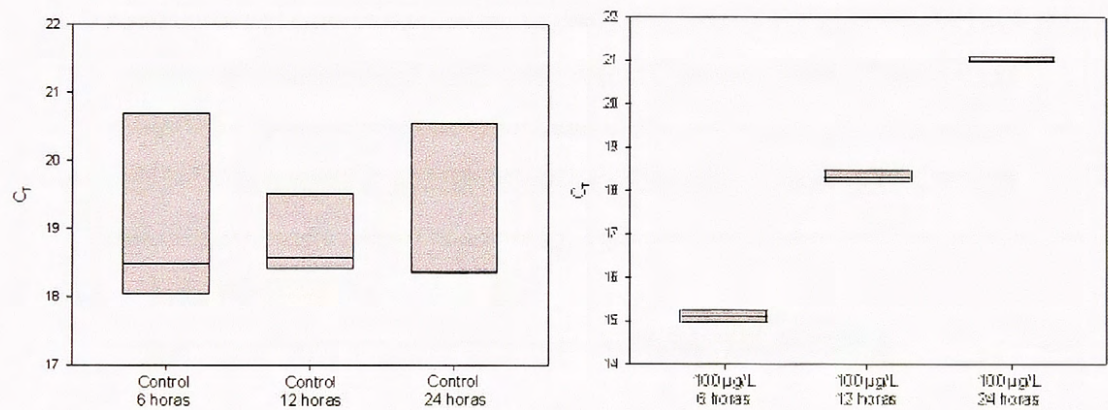


Fig 16.- (A) Niveles de expresión del gen de la MT para organismos controles a 6, 12 y 24 horas respectivamente indicando sus respectivos ciclos dónde la fluorescencia cruza el umbral. (B) Niveles de expresión del gen de la MT para organismos estimulados a $100 \mu\text{g/L}$ de CdCl_2 a 6, 12 y 24 horas, indicando sus respectivos ciclos dónde la fluorescencia cruza el umbral.

Tabla 3.- Parámetros físico-químicos y porcentaje de identidad de diferentes MT de organismos representativos dentro de la escala evolutiva. Número de aminoácidos (N° aa), peso molecular (Mw), punto isoeléctrico (pI) y porcentaje de identidad (% identidad).

MT	N° aa	Mw	pI	% identidad
<i>Drosophila melanogaster</i>	40	3853,4	8,06	32,81
<i>Caenorhabditis elegans</i>	75	8090,2	7,79	32,89
<i>Metaphire posthuma</i>	84	8363,6	8,20	40,23
<i>Amyntas aspergillus</i>	77	7661,7	7,77	35,90
<i>Mytilus edulis</i>	71	6917,1	7,79	33,33
<i>Crassostrea gigas</i>	86	8901,4	8,26	32,58
<i>Laternula elliptica</i>	72	7074,1	7,73	37,84
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	64	6444,5	6,06	90,62
<i>Sterechinus neumayeri</i>	64	6428,5	7,25	-
<i>Paracentrotus lividus</i>	66	6595,6	6,02	69,70
<i>Lytechinus pictus</i>	67	6753,9	7,27	70,59
<i>Salmo salar</i>	59	5914,9	8,07	35,38
<i>Mus musculus</i>	61	6018,1	8,38	30,88
<i>Pan troglodytes</i>	39	3786,4	7,37	29,69
<i>Homo sapiens</i>	61	6014,1	8,38	32,35

Considerando la Fig. 17 y la tabla 3 de los organismos representativos dentro de la escala evolutiva, se puede observar que el organismo que tiene un mayor porcentaje de identidad con *S. neumayeri* es *Strongylocentrotus purpuratus* con 90,62 % de similaridad, esto es debido a que poseen una misma cantidad de aminoácidos (64) para la secuencia de la metalotioneína, pero sin embargo varían en su punto isoeléctrico (6.06), además ambos son invertebrados marinos que pertenecen a la familia de los equinodermos.

Quien tuvo un menor porcentaje de afinidad con *S.neumayeri* fue *Pan troglodytes* con un 29,69% de similaridad, esto debido a que es un vertebrado, mamífero, que posee otro tipo de arreglo modelo para esta proteína, además de contener menos aminoácidos (39 aa) y poseer un punto isoeléctrico diferente.

El árbol filogenético deja mucho más en claro la afinidad que posee *S. neumayeri* con *S. purpuratus*, y como difiere con otros invertebrados marinos de su misma familia como *P. lividus* y *L. pictus*, esta diferencia corresponde principalmente a la distinta cantidad de aminoácidos en la secuencia la metalotioneína para estas distintas especies (Fig 18)

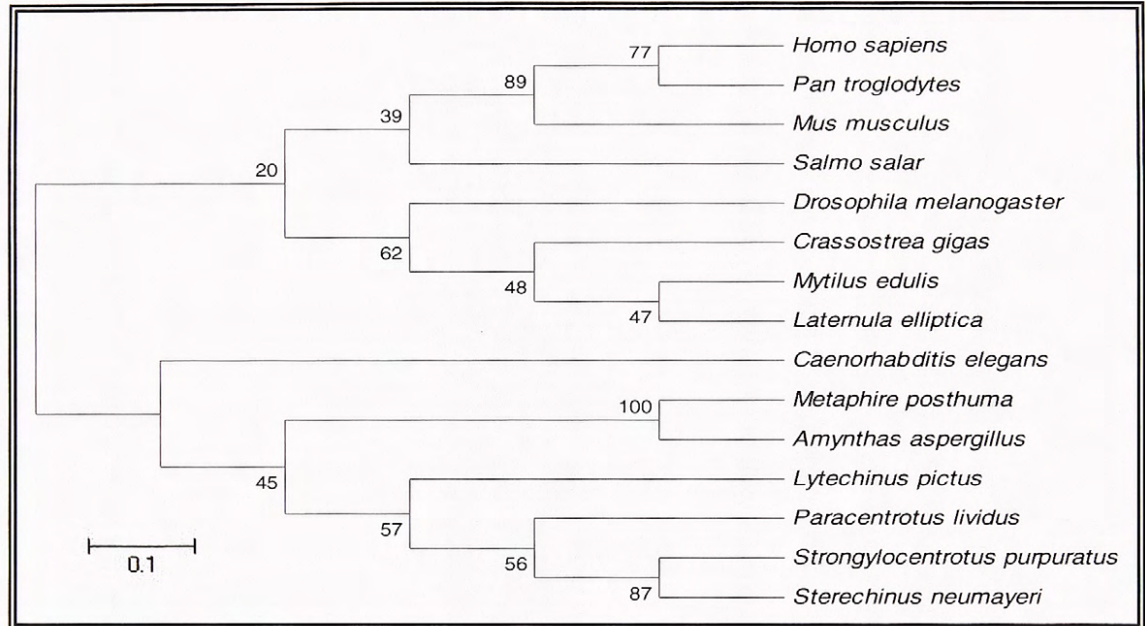


Fig. 18.- Árbol filogenético (Neighbor-Joining) inferido de los códigos de la secuencia de nucleótidos de MT. La distancia relacionada a la secuencia de aa del nematodo *Caenorhabditis elegans* (NM_0722954) fue utilizado como grupo externo. “outgroup”. Los números sobre cada intersección indican el porcentaje de similitud entre especies. *Homo sapiens* (NM 175617), *Pan troglodytes* (XM_001144465), *Mus musculus* (NM_013602), *Salmo salar* (NM_001141338), *Drosophila melanogaster* (NM_07957), *Crassostrea gigas* (B7ZDQ4), *Mytilus edulis* (P80252), *Laternula elliptica* (Q0PHS7), *Metaphire posthuma* (COIN14), *Amynthus aspergillus* (C1IE33), *Lytechinus pictus* (O02033), *Paracentrotus lividus* (Q966Z5), *Strongylocentrotus purpuratus* (P04734-1), *Sterechinus neumayeri* (P55953). Los números en los nodos son un indicador del nivel de confianza (dado como un porcentaje) por las ramas determinado a través del análisis de 1000 réplicas. La barra de escalas indica una distancia de evolución de 0,1 aa.

Se eligieron 6 especies representativas para observar aquellos aminoácidos conservados en cada secuencia proteica de estos diferentes organismos a través de un alineamiento.

```

Homo sapiens      -MDPACSCATGG-SCTTCAGSCKCKECKCTSCRKSCCS-CP-----VGCA-KCAQGCVCK-GASEKCS--C-CA 61
Mus musculus     -MDPACSCSTGG-SCTCTSSCACKNCKCTSCRKSCCS-CP-----VGCS-KCAQGCVCK-GAADRCT--C-CA 61
Salmo salar      -MDP-CDCSKTG-RCSCGGLCKCTNCGCAT--KSCCS-CP-----TGCS-KCASGCVCKEGKTCDS--C-CQ 59
Mytilus edulis   -MPGACNCTETN-VCIICGTGCSGKCCRCGDACKCASGGCSGCKVVCKCSGTCACGCCT-GPMCKCESECSCK 71
Sterechinus neumayeri
Strongylocentrotus purpuratus
MPDVACVCCKEGKECACFGQDCCKTGECCKDGTCCGICTN-----AACK--CADGCRCGSGCSCTEG-NCAC 64
MPDVACVCCKEGKECACFGQDCCKTGECCKDGTCCGICTN-----AACK--CANGCRCGSGCSCTEG-NCAC 64

```

Fig 19.- Alineamiento de aminoácidos de la proteína de Metalotioneína. El alineamiento fue realizado con Clustal W2 online <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html> . Los aminoácidos (Cisteínas) encerrados en rojo son aquellos compartidos en todas las proteínas y se encuentran involucradas en la asociación a metales y la captura de radicales oxidantes. Los números de accesos de las secuencias utilizadas en este alineamiento son: *Homo sapiens* (NM 175617), *Mus musculus* (NM_013602), *Salmo salar* (NM_001141338), *Mytilus edulis* (P80252), *Strongylocentrotus purpuratus* (P04734-1), *Sterechinus neumayeri* (P55953).

Se eligieron 4 especies representativas de erizos para observar aquellos aminoácidos conservados en cada secuencia proteica, a través de un alineamiento.

```

Sterechinus neumayeri      MP--DVKCVCCKEGKECACFGQDCCKTGECCKDGT--CCGICTNAACKCANGCKCGSGCSCTEGNCAC 64
Strongylocentrotus purpuratus MP--DVKCVCCKEGKECACKGKECCITGECCKDGT--CCGKCTNAACKCADGCKCGSGCSCTEGNCAC 64
Paracentrotus lividus      MP--DTKCVCCQDGKQCPACAGQECCITGKCKDGA SVCCGTCSNAACKCTGGCKCEGGCQCTEGNCTC 66
Lytechinus pictus         MPGPDVKCFCCRDGKECACGGGECCTITGKCKEGDRTCCGKCSNAACKCADGCKCEGAC-ATMGNCTC 67

```

Fig 20.- Alineamiento de aminoácidos de la proteína de Metalotioneína. El alineamiento fue realizado con Clustal W2 online <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>. Los aminoácidos (Cisteínas) encerrados en rojo son aquellos compartidos en todas las proteínas y se encuentran involucradas en la asociación a metales y la captura de radicales oxidantes. Los números de accesos de las secuencias utilizadas en este alineamiento son: *Sterechinus neumayeri* (P55953), *Strongylocentrotus purpuratus* (P04734-1), *Paracentrotus lividus* (Q96625), *Lytechinus pictus* (O02033).

Según la figura 19 y 20 correspondiente a los alineamientos, en toda la secuencia de la metalotioneína para los distintos organismos comparados se observó un aminoácido conservado, la cisteína, si bien esta se presenta en todos los organismos alineados, puede poseer distintos arreglos, como X-Cys-X-Cys, donde X es cualquier otro aminoácido distinto de cisteína, o también se presenta como, X-Cys-Y-Cys, donde X e Y corresponden a distintos aminoácidos, también se pueden encontrar dos cisteínas juntas Cys-Cys.

5.- DISCUSIÓN

El Cd es un elemento tóxico para la célula y afecta varios de sus componentes, causando la inhibición de transporte de aminoácidos, de Na^+/K^+ - ATPasas y alteraciones en el metabolismo mitocondrial. Para protegerse de posibles daños del Cd los celomocitos generarían mecanismos para acumular este metal y así evitar sus efectos adversos. Esto concuerda con las experiencias realizadas donde la viabilidad celular no se vio afectada de manera significativa Fig. 7 y 10, y se evidenció un mecanismo de defensa a nivel molecular, donde el gen de la metalotioneína se expresó por sobre niveles basales Fig 14.

La metalotioneína es una proteína ubicua, de bajo peso molecular, rico en cisteínas y una alta afinidad por los metales. Inicialmente fueron descubiertas en constituyentes titulares responsables de la acumulación natural de Cd, pero el Cd es solo algunos de los metales que inducen la expresión de esta proteína la cual se cree juega un rol general en el metabolismo y detoxificación de un número de metales trazas esenciales y no esenciales.

La secuencia de ADNc en el gen de MT en *S. neumayeri*, exhibió un tamaño completo de 292 pb que codifican para una proteína de 64 aminoácidos con 20 residuos de cisteína. Usualmente las MT de los vertebrados exhiben entre 61-62 residuos de aminoácidos, menos que *S. neumayeri* que posee 64. Torres *et al* (1997) sugiere que las metalotioneínas de cadenas más largas probablemente indican una mayor eficiencia en asociarse a metales pesados, ya que las MT más grandes contienen más residuos de cisteína las cuales que están involucradas en la

captura de iones metálicos, la MT de *S.neumayeri* contendría una alta cantidad de cisteína (31.25%) por lo cual podría ser más eficiente en la captura de Cd, esta en comparación a otros equinodermos (Fig 20) particularmente erizos, revela el alto grado de conservación en cuanto a la posición de las cisteínas.

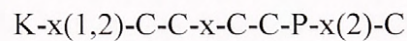
Históricamente la metalotioneína fue aislada de la corteza renal equina (**Kägi y Vallee, 1960**), el cual fue caracterizado de la siguiente manera: peso molecular 6000-7000; alto contenido metálico, composición aminoacídica característica (alto contenido de cisteínas) , sin aminoácidos aromáticos, distribución única de cisteína en la secuencia aminoacídica, sin embargo la metalotioneína a sido reportada que se encuentra a través de todo el reino animal así como en plantas, varios microorganismos eucariotas también algunos vertebrados representativos de otras clases y de casi todas los fila de invertebrados excepto en celenterados.

La Tabla 3, posee algunos de los organismos representativos de cada phylum que poseen similitudes con la secuencia proteica de la metalotioneína con *Sterechinus neumayeri*, en esta tabla se puede observar el número de aminoácidos de la proteína para cada organismo, así como su peso molecular, punto isoeléctrico y porcentaje de identidad, el organismo que posee más % de identidad con *Sterechinus neumayeri* es *Strongylocentrotus purpuratus* con un 90.62 % , esto es debido a que ambos pertenecen a la familia de los equinodermos siguiendo una secuencia modelo en la configuración proteica de la metalotioneína, para la familia de los erizos (Equinoidea) dónde la MT posee 64-67 residuos de proteína, los miembros de esta familia son reconocidos por una secuencia modelo de arreglos de cisteínas:

P-D-x-K-C-[V,F]-C-C-x(5)-C-x-C-x(4)-C-C-x(4)-C-C-x(4,6)-C-C

Localizada cerca del extremo amino terminal, la secuencia proteica está dividida en dos dominios estructurales, cada uno con 9 y 11 cisteínas vinculados a 3 y 4 iones bivalentes, respectivamente.

También se puede observar en la tabla 3 que *Pan triglodytes* es el que menos porcentaje de similitud posee debido a que la secuencia modelo para este organismo cae en los vertebrados, teniendo una alta variación en la cantidad de aminoácidos



A diferencia de los humanos, la MT en animales es mucho más abundante en el tejido parenquimático, pero su ocurrencia y biosíntesis ha sido documentada en muchos tejidos y tipos de células, como en este caso los celomocitos.

Estas diferencias entre los organismos de la tabla 3 se pueden ver reflejados en el árbol filogenético Fig. 18, pero así como existen diferencias en la cantidad de aminoácidos, también poseen similitudes, las metalotioneínas de organismos eucariotas, procariotas y también de plantas se asemejan a las formas de los mamíferos por su contenido de cisteínas y por la ocurrencia de estructuras de grupos metal-tiolato (**Kägi y Kojima, 1987**).

Además de las diferencias bioquímicas también existen aquellas puramente físicas y químicas, es conocido que la molécula de MT posee un peso molecular de 6000 Da o menos, sin embargo en un gel de filtración, en mamíferos y crustáceos, las MT han eluido a una posición correspondiente a una proteína globular de 10000 Da, esta discrepancia ha sido atribuida a su forma no-globular. Este aparente tamaño molecular depende fuertemente de la concentración de sales. (**Rauser, 1987; Grill, 1987**).

Todas estas diferencias que se encuentran en la proteína entre distintas especies es debido a la mutación de la MT y a la distribución de los dominios altamente conservados, por lo mismo tienen diferentes grados de separación en la escala evolutiva, además de la diferenciación de la proteína, ya que en base a sus características estructurales, las MT fueron clasificadas en tres clases (**Fowler et al.1987**), la clase I corresponde a polipéptidos con la ubicación de los residuos de cisteína en forma similar a las MT descritas en el riñón del caballo, a la cual pertenece el bivalvo *Mytilus edulis* (**MacKay et al. 1990**) con un 33.33 % de similaridad y una cantidad de 71 aa (tabla 3), la clase II corresponden a polipéptidos con la ubicación de los restos de cisteína en forma ligeramente similar a las MT descritas en el riñón del caballo, a esta clase pertenece el erizo *Strongylocentrotus purpuratus* (**Nemer et al. 1985; Wikinson y Nemer, 1987**) el cual arrojó un 90.62% de similaridad con la secuencia proteica del *S. neumayeri*.(tabla 3) y a la misma clase que pertenece la secuencia de *S. neumayeri*. Los organismos pertenecientes a la clase III son polipéptidos atípicos metal-tiolados con síntesis no asociada directamente con genes estructurales, estos han sido identificados en algas, levaduras y plantas superiores las cuales no se incluyeron en el análisis de similaridad.

Se puede observar en la Fig. 19 donde están dispuestas las distintas especies que se eligieron para ver las similitudes de la proteína a nivel genómico como existen sitios conservados de cisteína entre las distintas especies, pero también se conoce que existen genes que son específicamente de vertebrados pero han sido encontrados en erizos marinos (deuterostomados-específicos), otros han sido identificados en erizos de mar pero no en el linaje de los cordados, lo que sugiere que existe una pérdida de estos genes en los vertebrados y que la expresión de algunas familia de genes ocurren aparentemente de forma independiente en erizos de mar y vertebrados (**Sea Urchin Genome Sequencing Consortium, et al. 2006**)

Las diferencias ocurridas en el alineamiento de aminoácidos de la proteína entre las distintas especies de erizos utilizadas en la Fig. 20 (Equinodermata) se pueden deber a la cantidad, tipos de tejidos o células donde se encuentra, son altamente variables, reflejando lo que puede ser diferencia en años, estado de desarrollo, tipo de dieta, y algún otro factor no conocido aún. (Cousins y Coppen, 1987).

En el contexto de la evolución genómica, la distribución de los dominios conservados de proteína y motivos dentro de la secuencia provee una visión de expansión y contracción de la familia de genes, así como una idea en los cambios en la función de la proteína., la metalotioneína se considera como un completo modelo conservado desde el aminoácido n°2 hasta el n°64, los que se encuentran involucrados en la respuesta inmune innata en la asociación con metales pesados y la detoxificación de radicales de oxígeno.

Las figuras 19 y 20 reflejan la alta cantidad de cisteínas conservadas, esta abundancia de cisteínas y su arreglo Cys-Cys, Cys-X-Cys y Cys-X-Y-Cys, dónde X e Y son residuos de otros aminoácidos para unirse a los iones de metales. Las posiciones de los aminoácidos básicos Lys y Arg en la secuencia de MT de todos los vertebrados e invertebrados, sugieren que también juega un rol importante en la formación de complejos de metales (Nemer *et al.* 1985)

5.1 Proliferación celular

Algunos animales son más sensibles a particulares tipos de estrés, mientras que otros pueden enfrentarse a grandes fluctuaciones en sus condiciones ambientales, por lo tanto hasta cierto punto existen sistemas que ayudan a mantener las funciones corporales y la homeostasis a un nivel normal (Holm *et al.* 2008), los celomocitos que son considerados los efectores de la inmunidad en el erizo de mar han aportado a mantener este equilibrio homeostático en el erizo *Sterechinus*

neumayeri como lo demuestran las diferentes gráficas que revelan un aumento en las cantidad de estos.

La fig. 5 muestra un aumento en la cantidad de celomocitos totales en aquellos organismos a los cuales se les ha inducido el estrés por CdCl₂ por baño si bien este aumento no fue significativo ($P < 0.05$) este aumento es atribuible a que estas células dentro de los equinodermos se encuentran directamente relacionadas con la respuesta al estrés por metales pesados. Estos celomocitos son extremadamente sensibles a cualquier daño fisiológico y son capaces de responder a invasión de hospedadores, agentes citotóxicos, etc. (Matranga, 1996; Matranga *et al.* 2005) y por lo mismo son capaces de reaccionar detectando al Cd como un agente que rompe la homeostasis del individuo.

Lo mismo ocurrió con las células rojas (Fig 6) que tampoco presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la experiencia de estimulación por baño, si bien igual existió un aumento, esta proliferación celular es atribuible la sensibilidad y protección de la homeostasis del organismo. Se desconoce el rol específico de estas células en cuanto a si son capaces de expresar la MT, futuros estudios podrían caracterizar la expresión de la MT en estas células.

En ambos experimentos, aquellos erizos estimulados directamente a través de inyección con CdCl₂ y aquellos estimulados con CdCl₂ en medio se observan diferencias en la cantidad de celomocitos, no solo entre las distintas condiciones, sino también entre los individuos de la misma especie, esto es debido a que la proporción de cada tipo de célula puede variar no solo entre especies sino también entre individuos de la misma especie de acuerdo a su tamaño y condiciones fisiológicas (Matranga *et al.* 2000), para esta experiencia se utilizaron erizos de igual tamaño, sin embargo se desconocen las condiciones fisiológicas de cada uno de los individuos.

Así como Smith *et al.* (1995) muestra que las células rojas en el erizo de mar son quimiotáticamente atraídas hacia las bacterias y que su equinocromo desgranulado posee efectos bactericidas, también la fig. 6 y 9 muestran el particular aumento respecto del número que poseen las células rojas en comparación a las demás células esféricas involucradas con el sistema inmune del erizo, estas células corresponden a un tipo de celomocitos llamados células esféricas dentro de las cuales también se encuentran las incoloras, ambas son ameboides y similares en tamaño (**Matranga *et al.* 2006**), este aumento de células rojas es debido a que estas contienen equinocromo A una naftoquinona que les otorga el color rojo característico de estas células lo que además se ha visto reflejado en el fluido celómico de aquellos individuos que han sido estimulados con CdCl₂ el cual ha tomado una coloración más rojiza, confirmando de esta manera el aumento de estas células rojas.

Las células rojas no son las únicas en reaccionar en cantidad ante la administración de CdCl₂, pero sin embargo han sido consideradas como la principal población celular en ser afectadas por estrés como contaminación y exposición a agua de mar cálida o fría (**Matranga *et al.* 2000**).

Aunque en ambos experimentos se pudo observar un aumento en la cantidad de celomocitos totales y células rojas, sólo aquellos organismos estimulados directamente con CdCl₂ dentro de la cavidad celómica presentaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos a distintas horas, esto se debe a que aunque las células puedan detectar al Cd como agente estresante, por el hecho de encontrarse en el medio, toma mucho más tiempo que 24 horas de exposición para producir una respuesta celular significativa, por lo tanto las diferencias significativas pueden encontrarse pasados los 7 días de exposición (**Viarengo *et al.* 1999**).

Como se mencionó anteriormente, se evidenció un aumento significativo en la cantidad de celomocitos totales como respuesta a la inyección de CdCl₂ dentro de la cavidad celómica, el origen de estas nuevos celomocitos podrían tener como fuente el epitelio celómico el cual ha sido sugerido como el origen más probable de celomocitos en equinodermos (**Muñoz-Capuli *et al.* 2005**), pero así también se sugieren otros tejidos hematopoyéticos que podrían aportar a este aumento en la cantidad de celomocitos, como el órgano axial y los cuerpos de Tiedemann, dónde en ellos se ha estudiado la respuesta mitótica (**Holm *et al.* 2008**) y se ha visto reflejado en un incremento en el número de celomocitos totales circulantes con una mayor proliferación celular y posterior diferenciación en celomocitos circulantes con actividad inmune.

5.2 Viabilidad celular y especies reactivas de oxígeno.

En cuanto a los resultados sobre la viabilidad celular, a contrario de lo que se esperaba, no existió un mayor descenso en la cantidad de celomocitos totales ni en células rojas, por lo tanto el daño en la membrana celular causado por el efecto tóxico del cloruro de cadmio sólo se registro en algunos celomocitos, los que permitieron el ingreso de este colorante al citoplasma (método de exclusión del colorante).

Lo que se esperaba en este caso era un mayor descenso en la viabilidad celular debido a una apoptosis, el cual es un proceso importante del normal desarrollo y podría jugar un rol crítico en la eliminación de células que son anormales o en este caso que han sido dañadas (**Ju., 2005**). Este particular proceso tiene que ver con la regulación de la respuesta inmune, ya que una vez que la respuesta inmune ha sido activada y la eliminación del agente estresante o en este caso la disminución del daño a partir de la administración del CdCl₂ ha ocurrido, el sistema inmune debe retornar a su estado basal de reposo (homeostasis), por la finalización de las señales de estimulación (**Guerrero., 2007**).

Sin embargo, este débil daño celular podría ser atribuible al rol antioxidante de la metalotioneína, ya que así como esta se encuentra involucrada en la detoxificación de metales esenciales y no esenciales. Además la MT también juega un rol en la eliminación de radicales libres de oxígeno, estas especies de oxígeno activo son continuamente producidas en los tejidos por la acción del sistema de transporte de electrón mitocondrial y de Nicotinamida-Adenina Dinucleótido fosfato reducida (NADPH) en leucocitos y macrófagos. Sin embargo varios sistemas de defensa antioxidantes previenen el daño del tejido por los radicales de oxígeno. Este sistema incluye un rango de antioxidantes específicos como la catalasa para el peróxido de hidrógeno, la superóxido dismutasa para el anión superóxido, y la glutatión peroxidasa para el peróxido de hidrógeno y lípidos oxidados, antioxidantes no específicos como el glutatión reducido, la ceruloplasmina, y la transferrina (**Sato y Bremner, 1993**). Sin embargo, no existe mecanismo de defensa específico en contra de los radicales hidroxilos, que es la más potente dentro de las especies de oxígeno reactivo. De esta manera se ha enfocado la atención a la metalotioneína como un depurador de radicales, debido a la constante velocidad de reacción con radicales hidroxilo *in vitro* la cual es muy alta (**Thornalley y Vasak, 1985**). El mecanismo que utilizan las metalotioneínas para capturar radicales libres de oxígeno no ha sido bien determinado, aunque Thornalley y Vasak (1985) sugieren que los residuos de cisteína particularmente los grupos tiolato de las metalotioneínas son los principales blancos para la reacción de los radicales hidroxilos con proteínas, los cuales poseen múltiples sitios de “ataque” hacia los radicales hidroxilos. Por otra parte, Thomas *et al* (1986) argumentan que el principal mecanismo de protección de la metalotioneína contra estos radicales hidroxilo es la liberación de Zn el cual es subsecuentemente tomado por la membrana protegiéndolas de la peroxidación lipídica y por lo tanto estabilizando las membranas e impidiendo que afecte las diferentes funciones celulares.

5.3 Expresión de MT en *Sterechinus neumayeri*

En paralelo a los análisis de celomocitos se demostró que existe una inducción de la MT debido a la estimulación con CdCl₂, esto es debido a que MT tiene una directa relación con la respuesta de detoxificación en el erizo *S. neumayeri*, así como se describe también en *S. purpuratus* (Nemer *et al.* 1984) a diferencia que para *S. purpuratus* se describe en ovocitos y en *S. neumayeri* se ha experimentado sobre los celomocitos.

Esta estimulación con CdCl₂ aumentó la expresión del gen de MT en *S. neumayeri* cuando los erizos fueron expuestos al CdCl₂ por estimulación directa a través de una inyección, (Fig 11) y por el baño (Fig 12) dónde todas las bandas amplificaron un producto de 292 pares de bases, la variación que existe entre estas bandas corresponde al grado de intensidad de la expresión del gen de la metalotioneína, la intensidad va en aumento desde los organismos control, 100 µg/L y 200 µg/L con variaciones entre las distintas horas de estimulación.

Podría esperarse que los organismos control no tuvieran ningún tipo de amplificación del gen de la MT por no estar estimulados con CdCl₂, sin embargo el hecho de sacarlos de su ambiente natural, disponerlos en un espacio reducido, la poca disponibilidad de alimento y su manipulación, son condiciones de estrés que llevan a que expresen la MT, aunque su expresión sea mucho más específica con estrés por metales pesados, pero por estar relacionada con el sistema inmunitario de todas maneras se induce su expresión de manera más baja.

Esta exposición a CdCl₂ puede inducir la transcripción de la metalotioneína, proteína que se une a metales pesados y está involucrada con la regulación y detoxificación de estos metales pesados, en este caso con CdCl₂, por lo tanto el nivel de inducción del gen podría proveer una medida de exposición a este metal pesado (Karin, 1987; Hamer 1986).

También existe evidencia que la exposición a CdCl_2 incrementa la producción de especies de oxígeno reactivo (ROS) promoviendo el estrés oxidativo, donde la sobre expresión de la MT podría proteger a las células del estrés oxidativo y no solo a través de la dinámica de asociación o liberación de metales, sino que también actuando como capturador de radicales libres y metabolitos reactivos de oxígeno (**Viarengo et al. 2000**).

De esta manera nos podemos dar cuenta que las funciones biológicas de los metales y su paso a través de las células y los organismos se encuentran invariablemente relacionados a la existencia de macromoléculas específicas relacionadas con metales. (**Valle, 1960**). Una ventaja de utilizar la MT como un indicador de exposición a metales biodisponibles, cae en su potencial para reflejar una respuesta integrada. (**Evans et al., 2000**).

Se puede distinguir una importante diferencia entre los diferentes experimentos realizados (baño e inyección) al observar las fig 11 y 12, donde se nota que aquellas bandas que corresponden a inducción directa por inyección se encuentran ligeramente desplazadas unas sobre otras, en comparación con aquellas bandas que corresponden a una inducción menos directa por baño.

Esto puede ser debido a que el CdCl_2 tiene un efecto mucho más directo en *S. neumayeri*, siendo necesaria la activación de isoformas de MT, para poder detoxificar y regular el efecto dañino de este metal pesado. Sin embargo, para poder dilucidar esto son necesarios más estudios bioquímicos y moleculares de esta variación.

En contraste con muchas proteínas la cantidad de MT no decrece con la exposición al metal, al contrario, el metal induce la síntesis de MT, proporcionando un mecanismo protector contra la toxicidad de metales, se conoce que la acumulación de metales pesados produce la inducción de MT y eventualmente la detoxificación (**Bebianno y Langston., 1991**) también esta

asociado con la capacidad de asociarse con estos metales y por lo tanto incrementar su resistencia a la toxicidad de estos (*Amiard et al.2006*) .

5.4 Genes control

La actina, especialmente actina β , junto con gliceraldeído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), tubulina, ciclofilina, factor de elongación 1- α , ubiquitina, unidad ribosomal 18S, son expresadas constitutivamente y están involucradas en las funciones básicas requeridas para la mantención celular (*Ruan y Lai., 2007*).

Por lo tanto para poder contrastar los resultados de la expresión de la MT en *S. neumayeri*, se utilizó como gen control la actina, ya que este gen ha sido altamente conservado entre especies a través de la evolución y está presente en todas las células eucariotas (*Vandekerckhove y Weber, 1978*), además de ser comúnmente utilizado como control interno endógeno para normalizar los estudios de expresión de genes (*Sturzenbaum et al, 2001*), debido a que posee los niveles de expresión más estables comparado con otros controles internos (*Biederman y Cortes., 2004*). Sin embargo, la expresión de este gen control presentó variaciones, lo que es claro indicador de que la Actina como gen control no sirve para *Sterechinus neumayeri*.

La Actina se encuentra directamente relacionada con las funciones fisiológicas celulares como la motilidad, los cambios de forma de la célula durante en ciclo celular, organización del citoplasma, interacciones celulares, adhesión molecular y transporte intracelular (*Smith,1998; Moustakas,1998*), y en este caso con la proliferación celular , la cual varía mucho dentro de las distintas concentraciones de CdCl₂ (Fig 13).

Estudios han demostrado variantes en la expresión de actina- β a nivel de ARNm. De esta manera se sugiere que actina- β ciertamente no satisface los requerimientos básicos para su aplicación como gen de control interno ya que su expresión cambia en respuesta los estímulos químicos, durante el crecimiento-diferenciación y en estado de enfermedad (Ruan y Lai., 2007), en este caso con la introducción de CdCl₂.

5.5 Cuantificación por PCR semicuantitativa de la MT en *Sterechinus neumayeri*

Los organismos controles, presentan el mayor aumento de expresión a las 6 hrs. debido al brusco cambio desde su ambiente natural al acuario. Esta elevada expresión que muestran los organismos controles sin la administración de CdCl₂, es debido al estrés oxidativo propio del metabolismo normal que se produce en el organismo, y que en condiciones de estrés aumenta lo que puede resultar en un daño en la estructura celular.

Para los organismos que fueron estimulados con CdCl₂ 100 μ g/L y 200 μ g/L la expresión de MT es muchísimo mayor debido a la unión de iones de Cd a la proteína sin el metal (Tiolato), junto con el estrés oxidativo.

Si se observa la fig 14 a una mayor escala en general se puede observar un aumento de la expresión en aquellos organismos a estimulados a 100 μ g/L, y un descenso en aquellos estimulados a 200 μ g/L lo cual indica un método de regulación en la expresión del gen de la MT para volver a su estado basal.

Para afianzar más estos resultados semicuantitativos si comparamos las figuras de la pcr en tiempo real (Fig 15) A y B se puede observar como existió una clara inducción del gen de la metalotioneína en aquellos organismos estimulados a 100 $\mu\text{g/L}$ en comparación con los organismos controles, lo mismo demuestra la grafica (Fig 16) A y B donde se notan de mejor manera como los organismos controles poseen similares C_T en comparación con aquellos organismos estimulados donde los C_T varían de sobremanera entre las distintas horas de estimulación.

Este aumento en la expresión de la MT podría ser una herramienta fundamental para utilizar esta proteína como un biomarcador específico en respuesta a los metales, considerando la habilidad que poseen muchos invertebrados en acumular metales pesados tóxicos.

6.- CONCLUSIONES

La metalotioneína es una proteína que claramente es inducible por el estrés a CdCl_2 , y su expresión aumenta por este mismo. Sin embargo la inducción es variable intraespecíficamente e interespecíficamente por varias razones tanto ambientales o fisiológicas. Posee una directa relación con el aumento en la cantidad de celomocitos, más específicamente con las células rojas que tienen que ver con su pigmento antibacterial denominado equinocromo A.

También posee un rol protector contra el estrés oxidativo debido a los radicales libres de oxígeno producidos por la exposición al CdCl_2 permitiendo de esta manera que la viabilidad celular no se vea mayormente afectada.

Se rectifica entonces como lo mencionan otros autores que la MT posee un rol protector contra la toxicidad a Cd, a través de su asociación con motivos conservados de cisteína que se mantienen a través de la evolución en los diferentes organismos.

Las funciones de la MT dependerán de las características de las especies y requerimientos de los órganos y tejidos además del tipo de metalotioneína para cada filum.

Según los datos en el aumento de celomocitos y en la expresión de la MT, sugieren que esta proteína puede ser un potencial biomarcador de contaminación ambiental ya que podría ser un sistema temprano de alerta

7.- BIBLIOGRAFÍA

- Alexandrine, M., V. Gaspari, C. Boutron, C. Barbante, P. Gabrielli, P. Cescon, G. Cozzi, C. Ferrari, A. Dommergue, K. Rosman, S. Hong, S. So Hur. Climate-related variations in crustal trace elements in Dome C (East Antarctica) ice during the past 672 Kyr. *Climatic Change*, 92: 191-211pp.
- Alleman, L.Y., T.M. Curch, P. Ganguli, A.J. Vèron, B. Hamelin, A.R. Flegal. 2001. Role of oceanic circulation on contaminant lead distribution in the South Atlantic. *Deep-Sea Res*: 48: 2855-76.
- Amiard, J.C., R.P. Cosson. 1997. Les métallothionéines. In: Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F. (Eds.), *Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects Fondamentaux*. Masson, Paris, pp. 53-66.
- Amiard, J.C., C. Amiard-Triquet, S. Barka, J. Pellerin, P.S. Rainbow. 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology* . 160-202 pp.
- Aislabie, L.Y.,M.R. Balks, J.M. Foght, E.J. Waterhouse. 2004. Hydrocarbon spills on Antarctic soils: effects and managment. *Environ Sci Technol*; 38:1265-74.
- Bargagli, R. 2005. *Antarctic Ecosystems: Environmental Contamination, Climate Change, and Human Impact*. Berlin: Springer. Verlag. 394 pp.
- Bargagli, R. 2008. Environmental contamination in Antarctic ecosystems. *Sci Total Environ*. Doi: 10.1016/j.scitotenv.06.062.

- Bergstrom, D. M., P. Convey and A. Huiskes. 2006. Trends in Antarctic Terrestrial and Limnetic Ecosystems. Dordrecht: Springer. 2006. 369 pp.
- Beulter, B. 2004. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol.*40:845-859.
- Biederman, J., P.Cortes. 2004 . Validation of internal control genes for gene expresion analysis in diabetic glomerulosclerosis. *Kidney Int;* 66: 2308-14.
- Boyd, P.W., A. Watson, C.S. Law, E. Abraham, T. Trull, R. Murdoch. 2000. A mesoescale phytoplankton bloom in the polar Southern Ocean stimulated by iron fertilization. *Nature;* 407: 695-702.
- Brouwer, M., D.R. Winge, W.R.Gray. 1989. Structural and functional diversity of copper-metallothioneins from the american lobster *Homarus americanus*. *J. Inorg. Biochem.* 35, 289-303.
- Bruland, K.W., R.P. Franks, G.A. Knauer, J.H. Martin. 1979. Sampling and analytical methods for the determination of copper, cadmium, zinc and nickel at the nanogram per liter level in seawater. *Anal. Chim. Acta* 105, 233-245 pp.
- Castellani, C., J.P. Rast and E.H. Davidson. 2003. Insolation of pigment cell specific genes in the sea urchin embryo by differential macroarray screening. *Development.*130:4587-4596.

- Carroll, M.C. 1998. The Role of complement and complement receptors induction and regulation of immunity. *Annu Rev Immunol.*16: 545-68. Evidence for cytotoxicity, and links to effects at higher levels of biological organization. *Can.J.Fish. Aquat.Sci.*52, 715-763.
- Cherian, L., J. Chacko, C. Goodman AND C.S. Robertson. 1999. Cerebral hemodynamic effects of phenylphrine and L-arginine after cortical impact injury. *Crit. Case Med.* 27: 2512-2517.
- Clow, L.A., D.A. Raftos, P.S. Gross and L.C. Smith. 2004. The sea urchin complement homologue, PdC3, functions as an opsonin. *J Exp Biol.* 207 : 2147-2155.
- Coffaro, K., R. Hinegardner. 1977. *Immune* response in the sea urchin *Lytechinus pictus*. *Science* 197: 1389-1390.
- Coffaro, K.1979. Memory and specificity in the sea urchin *Lytechinus pictus*. Doctoral Dissertation, University of California.
- Coffaro, K.1980. Memory and specificity in the sea urchin *Lytechinus pictus*. Elsevier/North Holland Biomedical Press, New York, USA.
- Conlan, K., G. Rau, G. McFeters, R. Kvitek. 2000. Influence of McMurdo Station sewage on Antarctic marine benthos: evidence from stable isotopes, bacteria, and biotic indices. In: Davison W, Howard-Williams C, Broady P, editors. *Antarctic Ecosystems: Models for Wider Ecological Understanding* Christchurch: Caxton Press.p.315-8.

- Coteur, G[†], P[†].Gosselin, P. Wantier, Y. Chambost-Manciet, B. Danis, Ph. Pernet, M. Warnau, I, Ph. Dubois. 2003. Echinoderms as Bioindicators, Bioassays, and Impact Assessment Tools of Sediment-Associated Metals and PCBs in the North Sea. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 45, 190–202 pp.
- Couillard, Y., P. Campbell, A. Tessier, J. Pellerin-Massicotte, J. Auclair. 1995. Field transplantation of a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*, across a metal contamination gradient. II. Metallothionein response to Cd and Zn exposure, Corsolini, S. 2008. Industrial contaminants in Antarctic biota. *Journal of Chromatography A*, 1216;598-612.
- Couillard, Y., P.G.C. Campbell, A. Tessier, J. Pellerin-Massicotte, J.C. Auclair. 1995. Field transplantation of a fresh water bivalve, *Pyganodon grandis*, across a metal contamination gradient. II. Metallothionein response to Cd and Zn exposure, evidence for cytotoxicity, and links to effects at higher levels of biological organization. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52, 715-763.
- Cousins, R.J y D.E. Coppen. 1987. MetallothioneinII. *Experientia Supplementum*. Vol 52. Birkhäuser Verlag Basel. pp 545-553.
- Coyle, P., J.C. Philcox, L.C. Carey, A.M. Rofe. 2002. Metallothionein: The multipurpose protein. *Cellular and Molecular Life Sciences, Cell. Mol. Life. Sci.* 59. 627-647.
- Cserjesi. P., H. Fang, B.P. Brandhorst. 1997. Metallothionein Gene Expression in Embryos of the Sea Urchin *Lytechinus pictus* . *Molecular Reproduction and Development.* 47:39-46.

- Depledge, M.H., 1993. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In: Fossi, M.C, C. Leonzio (Eds), Non-destructive Biomarkers in Vertebrates. Lewis Publishers, Boca Raton, pp.261-285.
- Dyer, S. D., 1991. Evaluation of the efficacy of the stress protein response as a biochemical water quality monitoring method. University of North Texas, Denton, TX.
- Ebinghaus, R., H. Kock, C. Temme, W. Einax, A. Richter, P. Burrows. 2002. Antarctic springertime depletion of atmospheric mercury. Environ Sci Technol; 36: 1238-44.
- Evangelou, V.P. 1998. Environmental Soil and Water Chemistry: Principles and Applications, Wiley, New York. 564 pp.
- Evans, C.W., J.M. Hills and J. M.J .Dickson. 2000. Heavy metal pollution in Antarctica: a molecular ecotoxicological approach to exposure assesment. Journal of Fish Biology 57 (Supplement A), 8-19.
- Fahad, M and M. Aatif. 2008. The footprints of cancer development: Cancer biomarkers. Cancer Treatment Reviews. 193-200.
- Fowler, B., C. Hilderbrand, Y. Kojima, M.Webb. 1987. Nomenclature of metallothionein. Experimentia. 52: 19-61.
- Frenot, Y., S.I. Chown, J. Whinam, P.M. Selkirk, P. Convey, M. Skotnicki.2005. Biological invasions in the Antarctic extent, impacts and implications. Biol. Rev; 80:45-72.

- Friedberg, E.C., G.C. Walker, W. Siede. 1995. DNA repair and mutagenesis. American Society of Microbiology Press, Washington D.C.
- Grill, E. 1987. Metallothionein II. *Experientia Supplementum*. Vol 52. Birkhäuser Verlag Basel. Pp. 317-322.
- Gross, P.S., W.Z. Al-Sharif, L.A. Clow and L.C. Smith. 1999. Echinoderm immunity and the evolution of the complement system. *Dev Comp Immunol*. 23:429-442.
- Gross, P.S., L.A. Clow and L.C. Smith. 2000. SpC3, the complement homologue from the purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*, is expressed in two subpopulations of the phagocytic coelomocytes. *Immunogenetics*.51: 1034-1044.
- Guerrero, J. 2007. Introducción a la inmunología general. *Gastr Latinoam*. Vol18, N°2: 113-116.
- Hammer, D.H. 1986. Metallothionein. *Ann Rev Biochem* 55: 913-951.
- Harm, W. 1980. Biological effects of ultraviolet radiation. Cambridge University Press, Cambridge.
- Hayharth, P.M y K.C. Jones. 1992. Atmospheric deposition of metals to agricultural surfaces, in: Domy, C.A. (ed) *Biogeochemistry of Trace Metals*, Lewis Publishers, Boca Raton, USA, 249-276 pp.

- Koide, M., E Goldberg, M. Herron, C. Langway. 1979. Deposition history of artificial radionuclides in the Ross ice Shelf, Antarctica. *Earth Planet Sci Lett*; 44:205-23.
- Holm, K., B. Henroth, M. Thorndyke. 2008. Coelomocyte numbers and expression of HSP70 in wounded sea stars during hypoxia. *Cell Tissue Res.* 334; 319-325.
- Hur, S., X. Cunde, S. Hong, C. Barbante, P. Gabrielli, K. Lee . 2007. Seasonal patterns of a heavy metal deposition to the snow on Lambert Glacier basin, East Antarctica. *Atmos Environ*; 41:8567-78.
- Imber, B.E., J.A.J. Thompson, S. Ward. 1987. Metal-binding protein in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: assessment of the protein as a biochemical, environment indicator. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 38, 707-714.
- Joint UNDP/ World Bank Energy Sector Management Assistance Programme. Norway. Vol.2006.
- Kägi, J.H.R. y B.L Vallee. 1960. Metallothionein: a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. *J Biol Chem*, 235, 3460-3465.
- Kägi, J.H.R. y Y. Kojima. 1987. Chemistry and Biochemistry of Metallothionein. *Experientia Supplementum* Vol.52. Metallothionein II. Birkhäuser Verlag Basel.
- Karentz, D., J. Bosh, D.D. Mitchell. 2004. Limited effects of Antarctic ozone depletion on sea urchin development. *Marine Biology*, 145: 277-292 pp.

- Lemley, K. 2007. An introduction to biomarkers: applications to chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol.* 22:1849–1859
- Lenihan, H.S., J.S.Oliver, J.Oakden, M.D. Stephenson. 1990. Intense and localised benthic marine pollution around McMurdo Station, Antarctica. *Marine Pollution Bulletin* 21, 422-430.
- Lenihan, H.S. 1992. Benthic marine pollution around McMurdo Station, Antarctica: A summary of findings. *Marine Pollution Bulletin* 25, 318-323.
- Lenihan, H., S. Oliver. 1995. Anthropogenic and natural disturbance to main benthic communities in Antarctica. *Ecol Appl.* 5:311-26.
- Lionetto, M.G., M.E. Giordano, R. Caricato, M.F. Pascariello, L. Marinosci, T. Schettino. 2001. Biomonitoring of heavy contamination along the Salento coast (Italy) by metallothioneine evaluation in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus*. *Aquat. Conserv. Mar. Freshwater Ecosyst.* 11,305-572.
- Margoshes, M. and Vallee, B.L. 1957. Cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 4813]4.
- Matranga, V. 1996. Molecular aspects of immune reactions in Echinodermata. In: Müller WEG, Rinkevich B, editors. *Cell Biol Toxicol. Invertebrate immunology.* Prog Mol Subcell Biol Series. Berlin Heidelberg New York: Springer; p. 235–47.
- Matranga, V., G. Toia, R. Bonaventura, W. Müller. 2000. Cellular and biochemical responses to environmental and experimentally induced stress in sea urchin coelomocytes. *Cell Stress & Chaperones;* 5:158–65.

- Matranga, V., R. Bonaventura, G. Di Bella. 2002. Hsp70 as a stress marker of sea urchin coelomocytes in short term cultures. *Cell Mol Biol* .48:345–59.
- Matranga, V., A. Pinsino, M. Celi, A. Natoli, R. Bonaventura, H. Schröder. 2005 Monitoring chemical and physical stress using sea urchin immune cells. In: Matranga V, editor. *Echinodermata*. Berlin, Heidelberg: Springer. p. 85–110.
- Matranga, V., A. Pinsino, M. Celi, G. Di Bella, A. Natoli. 2006. Impacts of UV-B radiation on short term cultures of sea urchin coelomocytes. *Mar Biol*. 149:25–34.
- McKay, E., J. Overnell, B. Dunbar, I. Davidson, P. Hunziker, J. Kagi, J. Forthergill. 1990. Polymorphism of cadmium-induced mussel metallothionein. *Experientia*. 46: A36.
- Matsushita, M. 1996. The lectin pathway of the complement system. *Microbiol Immunol*.40:887-893.
- Mattigod, S.E and A.I. Page. 1983. Assessment of metal pollution in soils, in: Thornton, I, (ed), *Applied Environmental Geochemistry*, Academic Press, Geology Series, 355-394 pp.
- Mishra, V., K. Kim, S. Hong, K. Lee. 2004. Aerosol composition and its sources at the King Sejong Station, Antarctic Peninsula. *Atmos Environ*; 38:4069-84.

- Mitchell, D.L and D. Karentz. 1993. The induction and repair of DNA photodamage in the environment. In: Young AR, Björn LO, Moan J, Nultsh W (eds). Environmental UV photobiology. Plenum, New York, 345-377 pp.
- Mitchell, D.L. 1996. Ultraviolet radiation damage to DNA. In: Meyers RA (ed). Encyclopedia of molecular biology and molecular medicine. Chernow, New York, 149-164 pp.
- Moreno, J., M. Gerpe, V. Moreno, C. Vodopivec. 1997. Heavy metals in Antarctic organisms. Polar Biol. 17: 13-140.
- Mourgaud, Y., E. Martinez, A. Geffard, B. Andral, J.Y. Stanisière, J.C. Amiard. 2002. Metallothionein concentration in the mussel *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of response to metal contamination: validation in the field. Biomarkers 7 (6), 479-490.
- Mourtakas, A., P.A. Theodoropoulos, A. Gravanis, D. Haussinger, C. Stournaras. 1998. The cytoskeleton in cell volume regulation. Contrib. Nephrol. Basel Karger 1998, 123:121-34.
- Muñoz-Chapuli, R., R. Carmona, J. Guadix, D. Macias, J. Pérez-Pomares. 2005. The origin of the endothelial cells: an evo-devo approach for the invertebrate /vertebrate transition of the circulatory system. Evol. Dev. 7, 351-358.
- Negri, A., K. Burns, S. Boyle, D. Brinkman, N. Webster. 2006. Contamination in sediments, bivalves and sponges of McMurdo Sound, Antarctica. Environ Pollut; 143: 456-67.

- Nemer, M., E.C. Travagiri, E. Rodinelli and J. D'Alonzo. 1984. Developmental regulation, induction, and embryonic tissue specificity of sea urchin metallothionein gene expression. . Dev. Biol. 102, 471-482.
- Pacyna, M., E. Pacyna. 2001. An assessment of global and regional emissions of trace metals to the atmosphere from anthropogenic sources worldwide. Environ Rev; 9:269-98.
- Petrovic, S., B. Ozretic, M.Krajnovic-Ozretic, D. Bobinac. 2001. Lysosomal membrana stability and metallothionein in digestive gland of mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lam) as biomarkers in a field study. Mar. Pollut. Bull. 42(12), 1373-1378.
- Planchon, F., C. Bountron, C. Barbante, G. Cozzi, V.Gaspari, E.Wolff. 2002 Changes in heavy metals in Antarctic snow from Coast Lands since mid-19th to the late-20th century. Earth Planet Sci Lett; 200:207-22.
- Plytycz, B. and R. Seljelid. 1993. Bacterial clearance by the sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. Dev. Comp.Immunol. 17: 283-289.
- Raspor, B., J.Pavicic, S. Kozar, Z. Kwokal, M. Paic, N. Odzak, I, Ujevic, Z. Kjakovic. 1999a. Assessment of metal exposure of marine edible mussels by means of a biomarker.In:Klaasen, C. (Ed), Metallothionein IV. Birkhäuser, Basel,pp.629-632.
- Raspor, B., M.Erk, J.Pavicic S. Kozar, Z. Kwokal, M. Paic, N. Odzak, I, Ujevic, Z. Kjakovic. 1999b. Metallothionein as Biomarker of Mussel Exposure to Heavy Metals. Marine Pollution, IAEA-RECDOC-1094. IAEA, Vienna, pp.151-156.

- Rast, P.J., L.C Smith, M. Loza-Coll, T. Hibino, and G.W. Litman. 2006. Genomic insights into the immune system of the sea urchin. *Science*. 314-952-956.
- Rauser, W.E. 1987. Metallothionein II. *Experientia Supplementum*. Vol 52. Birkhäuser Verlag Basel. Pp 307-308.
- Riek, R., B. Prêcheur, Y.Wang, E.A.Mackay, G. Wider, P. Güntert, A. Liu, J.H. Kägi, K.Wüthrich. 1999. NMR structure of the sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) metallothionein MTA. Institut für Molekularbiologie und Biophysik, Eidgenössische Technische Hochschule-Hönggerberg, Zürich, CH-8093, Switzerland. 13;291(2):417-28.
- Ritossa, F. M., 1962. A new puffing pattern induced by heat shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18: 571–573.
- Rodriguez-Ortega, M.J., J. Alhama, V. Funes, A. Romero-Ruiz, A. Rodriguez-Ariza, J. Lopez-Barca. 2002. Biochemical biomarkers of pollution in the clam *Chamaelea gallina* from south-Spanish littoral. *Environ. Toxicol. Chem.* 21,542-549.
- Roesijadi, G. 1996. Metallothionein and its role in toxic metal regulation. *Comp. Biochem. Physiol. C* 113 (2), 117-123.
- Ross, K., N. Cooper, J.R. Bidwell, J. Elder. 2002. Genetic diversity and metal tolerance on two marine species. A comparison between populations from contaminated and reference sites. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 671-679.
- Russo et al, 2003. Stress to cadmium monitored by metallothionein gene induction in *Paracentrotus lividus* embryos.

- Saier, B. 2001. Direct and indirect effects of seastars *Asterias rubens* on mussel beds (*Mytilus edulis*) in the Wadden Sea. *J Sea Res* 46:29–42 pp.
- Sanders, B.M. 1993. Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 23: 49–75.
- Sanders, B. M., L. S. Martin, P. A. Nakagawa, D. A. Hunter & S. Miller. 1994. Specific cross-reactivity of antibodies raised against two major stress proteins, stress 70 and chaperonin 60, in diverse species. *Environ. Toxicol. Chem.* 13: 1241–1249.
- Santos, I., E. Silva-Filho, C. Schaefer, M. Albuquerque-Filho, L. Campos. 2005. Heavy metal contamination in coastal sediments and soils near the Brazilian Antarctic Station, King George Island. *Mar Pollut Bull*; 50:185-94.
- Sañudo-Wilhelmy. S., K.A.Olsen, J.M.Scelfo, T.D. Foster, A.R. Flegal. 2002. Trace metal distributions off the Antarctic Peninsula in the Weddell Sea. *Mar Chem*; 77:157-70.
- Sato, M., I. Bremner. 1993. Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radical Biol Med* 1993; 14_325-337.
- Sarkar, A. 2006. Biomarkers of marine pollution and bioremediation. *Ecotoxicology.* 15.331-332.
- Schroeder, W., K. Anlauf, L. Barrie, L.A Steffen, D. Schneeberger. 1998. Arctic springtime depletion of mercury. *Nature*; 394: 331-2.
- Schmit, A., M.N. Hall. 1998. Signalin to the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 14:305-38.

- Scudiero et al. 1997. PCR amplification and cloning of metallothionein complementary DNAs in temperate and Antarctic sea urchin characterized by a large difference in egg metallothionein content.
- Sea Urchin Genome Sequencing Consortium, 2006. The Genome of the Sea Urchin *Strongylocentrotus purpuratus* . Science 314, 914.
- Shaw, G. 1988. Antarctic aerosol: a review. Rev Geophys; 26:89-112.
- Shimada, J.C., L. Porto-Neto, M. Dauriz, B. Machado. 2002. Phagocytosis in vitro and in vivo in the Antarctic sea urchin *Stereocinus neumayeri* at 0°C. Polar Biol. 25: 891-897.
- Smith, L., E. Davidson. 1992. The echinoid immune system and the phylogenetic occurrence of immune mechanism in deuterostomes. Immunol. Today 13:256-362.
- Smith, L.C., E.H. Davidson. 1994. The echinoderm immune system: characters shared with vertebrate immune systems, and characters arising later in deuterostome phylogeny. In: Beck G. Cooper EL. Habicht GS. Marchalonis JJ (eds) Primordial immunity: foundations for the vertebrate immune system. Ann NY Acad Sci 712:213-226.
- Smith, L.C., R.R. Britten, E.H. Davidson. 1995. Lipopolysaccharide activates the sea urchin immune system. Dev Comp Immunol 19:217-224.
- Smith, L.C., J. Rast, V. Brockton, D. Terwillier, S. Nair, K. Buckley, A. Majeske. 2006. The sea urchin immune system. Invertebrate Survival Journal. 3:25-39.

- Smith, L.C., J.P. Rast, V. Brockton, D.P Terwilliger, S.V. Nair, K.M. Buckley and A.J. Majeske. 2006. The sea urchin immune system. *Invertebrate Survival Journal*. 3: 25-39.
- Stark, J., I. Snape, J. Riddle. 2003. The effects of petroleum hydrocarbon and heavy metal contamination of marine sediments on recruitment on Antarctic soft-bottom assemblages: a field experimental investigation. *Exp Mar Biol Ecol*. 283;21-50.
- Stegeman, J., M. R. Brouwer, T. Di Giulio, L. Forlin, B. A. Fowler, B. M. Sanders & P. A. Van Veld. 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In Huggett R. J., R. A. Kimerle, P. M. Mehrle Jr. & H. L. Bergman (eds), *Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers, Inc., Ann Arbor (MI): 235–335.
- Sturzenbaum, S.R., P. Kille. 2001. Control genes in quantitative molecular biological techniques: the variability of invariance. *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol*; 130:281-9.
- Thomas, J., G. Bachowski, A. Girotti. 1986. Inhibition of cell membrane lipid peroxidation by cadmium and zinc metallothionein. *Biochem. Biophys. Acta* 884; 448-461.
- Thompson, B., P. Goldsworthy, I. Snape, S. Stark. 2007. Contamination effects by a “conventional” and “biodegradable” lubricant oil on infauna recruitment to Antarctic sediments: a field experiment. *Exp Mar Biol*. 340;213-26.
- Thornalley, P.J., M. Vasak. 1985. Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. *Kinetics and*

mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. Biochim. Biophys. Acta 827:36-44.

- Torres, E., A. Cid, P. Hidalgo, C. Herrero, J. Abalde. 1997. Long Caín class III metallothioneins as a mechanism of cadmium tolerance in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Bohlin. Aquat. Toxicol.* 39,231-246.
- Troncoso, J. 2000. Regulación de las metalotioneínas durante el estrés y la inflamación, y su influencia durante la respuesta inflamatoria. Universitat Autònoma de Barcelona. España.
- Troshichev, O y I. Gabis. 2005. Effects of solar UV irradiation on dynamics of ozone hole in Antarctica. *Journal of Atmospheric and Solar-Terrestrial Physics* 67. 93-104.
- UNEP (United Nations Environmental Programme).2002. Regionally based assessment of persistent toxic substances-Antarctica regional report.Geneva.
- Vandekerckhove, J., K.Weber. 1978. At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide.*J Mol Biol.* 126: 783-802.
- Viarengo, A., J.A. Nott. 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. C* 104 (3), 355-372.
- Viarengo, A.,M.Burlando, M. Cavalletto, B.Marchi, E.Ponzano,J.Blasco. 1999. Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis* . *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* . 277: 1612-1619.

- Viarengo, A., B. Burlando, N. Ceratto, I. Panfoli. 2000. Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cell. Mol. Biol.* 46, 407-417.
- Wania, F. 2003. Global fractionation and cold condensation of low volatility organochlorine compounds in polar regions. *Environ. Sci. Technol.* 37; 1344.
- Zhao, X., M.Zheng, L Liang, Q. Zhang, Y, Wang, G. Jiang. 2005. Assessment of PCBs and PCDD/Fs Along the Chinese Bohai Sea Coastline Using Mollusks as Bioindicators. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 49, 178–185 pp.

8.- ANEXO

8.1 ABREVIATURAS Y SIGLAS

ACT: Actina

ADN: Ácido desoxirribunucleico

ADNc: ADN complementario

Arg: arginina

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNsas: Ribonucleasas

ARNm: ARN mensajero

As: arsénico

BLAST: Siglas en inglés de *Basic Local Aligment and Search Tool* = Alineamiento local básico y búsqueda de herramientas

°C: Grado centígrado

CdCl₂: cloruro de cadmio

Cd: cadmio

CH₄: metano

CO₂: dióxido de carbono

Cr: cromo

C_T: ciclo umbral

Cys: cisteína

pb: pares de bases

PCDD: Policlorodibenzo-P-Dioxinas

PCB: Bifenilos policlorados

PCR: Siglas en inglés de *Polymerase Chain Reaction* = Reacción en cadena de la Polimerasa

pI: punto isoeléctrico

POP: Contaminantes Orgánicos Persistentes

ROS: Especies reactivas de oxígeno

rpm: Revoluciones por minuto

RT: Siglas en inglés de *Reverse Transcription* = Transcripción Reversa

SAG. Servicio Agrícola y Ganadero

Sb: antimonio

Se: selenio

Si: silicio

µg: Microgramo

µl: Microlitro

UV: Ultravioleta

UVA: radiación ultravioleta tipo A

Tabla 4.- Análisis de comparaciones múltiples (Newman-Keuls) para celomocitos totales en estimulación en baño de CdCl₂

Tratamiento	Horas	Control 6 horas 6.9250	Control 12 horas 6.7833	Control 24 horas 7.5417	100 µg/lt 6 horas 5.8583	100 µg/lt 12 horas 7.4417	100 µg/lt 24 horas 9.8250	200 µg/lt 6 horas 9.8000	200 µg/lt 12 horas 9.8900	200 µg/lt 24 horas 10.233
Control	6		0.937723	0.937543	0.824920	0.775591	0.498675	0.390892	0.572967	0.530890
Control	12	0.937723		0.974609	0.610060	0.929151	0.545794	0.459111	0.603158	0.547576
Control	24	0.937543	0.974609		0.881727	0.956058	0.420425	0.216389	0.565151	0.571085
100 µg/lt	6	0.824920	0.610060	0.881727		0.815482	0.314614	0.263256	0.349308	0.293954
100 µg/lt	12	0.775591	0.929151	0.956058	0.815482		0.553067	0.397349	0.655895	0.634282
100 µg/lt	24	0.498675	0.545794	0.420425	0.314614	0.553067		0.989090	0.971471	0.972135
200 µg/lt	6	0.390892	0.459111	0.216389	0.263256	0.397349	0.989090		0.998703	0.995084
200 µg/lt	12	0.572967	0.603158	0.565151	0.349308	0.655895	0.971471	0.998703		0.849734
200 µg/lt	24	0.530890	0.547576	0.571085	0.293954	0.634282	0.972135	0.995084	0.849734	

Tabla 5.- Análisis de comparaciones múltiples (Newman-Keuls) para células rojas en estimulación por baño de CdCl₂

Tratamiento	Horas	Control 6 horas 1.0633	Control 12 horas 1.7300	Control 24 horas 1.5700	100 µg/lit 6 horas 1.6533	100 µg/lit 12 horas 1.3800	100 µg/lit 24 horas .88333	200 µg/lit 6 horas 1.2933	200 µg/lit 12 horas 1.3133	200 µg/lit 24 horas 2.0333
Control	6		0.845574	0.857332	0.854991	0.925092	0.726130	0.654566	0.876588	0.557885
Control	12	0.845574		0.947435	0.881369	0.902090	0.712712	0.955013	0.924307	0.555432
Control	24	0.857332	0.947435		0.871143	0.711593	0.758457	0.948281	0.870387	0.800870
100 µg/lit	6	0.854991	0.881369	0.871143		0.854391	0.738354	0.954286	0.909340	0.738557
100 µg/lit	12	0.925092	0.902090	0.711593	0.854391		0.865913	0.984318	0.896773	0.704673
100 µg/lit	24	0.726130	0.712712	0.758457	0.738354	0.865913		0.703039	0.833991	0.391139
200 µg/lit	6	0.654566	0.955013	0.948281	0.954286	0.984318	0.703039		0.969038	0.771983
200 µg/lit	12	0.876588	0.924307	0.870387	0.909340	0.896773	0.833991	0.969038		0.720565
200 µg/lit	24	0.557885	0.555432	0.800870	0.738557	0.704673	0.391139	0.771983	0.720565	

Tabla 6.- Análisis de comparaciones múltiples (Newman-Keuls) para celomocitos totales en estimulación por inyección de CdCl₂.

Tratamiento	Hora	Control 6 horas 6.9250	Control 12 horas 6.7833	Control 24 horas 7.5417	100 µg/lt 6 horas 9.6200	100 µg/lt 12 horas 3.3900	100 µg/lt 24 horas 10.680	200 µg/lt 6 horas 4.5300	200 µg/lt 12 horas 8.0000	200 µg/lt 24 horas 8.6600
Control	6		0.932168	0.710957	0.486708	0.158410	0.229159	0.325748	0.792983	0.721025
Control	12	0.932168		0.890646	0.528783	0.112808	0.242986	0.180298	0.881728	0.786356
Control	24	0.710957	0.890646		0.594222	0.108233	0.334116	0.277872	0.782940	0.778103
100 µg/lt	6	0.486708	0.528783	0.594222		0.011486	0.524803	0.053126	0.593109	0.564455
100 µg/lt	12	0.158410	0.112808	0.108233	0.011486		0.002386	0.494183	0.080280	0.040820
100 µg/lt	24	0.229159	0.242986	0.334116	0.524803	0.002386		0.013094	0.377996	0.446886
200 µg/lt	6	0.325748	0.180298	0.277872	0.053126	0.494183	0.013094		0.240089	0.148775
200 µg/lt	12	0.792983	0.881728	0.782940	0.593109	0.080280	0.377996	0.240089		0.691692
200 µg/lt	24	0.721025	0.786356	0.778103	0.564455	0.040820	0.446886	0.148775	0.691692	

Tabla 7.- Prueba de significancia para celomocitos totales en organismos expuestos a CdCl₂.

	SS	MS	p
Intercept	2572.457	2572.457	0.000000
Tratamiento	6.978	3.489	0.620304
Hora	69.395	34.698	0.013607
Tratamiento*Hora	142.636	35.659	0.002551
Error	281.482	7.217	

Tabla 8.- Análisis de comparaciones múltiples (Newman-Keuls) para células rojas por estimulación con inyección de CdCl₂.

Tratamiento	Hora	Control 6 horas 1.0633	Control 12 horas 1.7300	Control 24 horas 1.5700	100 µg/lt 6 horas 1.6600	100 µg/lt 12 horas .98400	100 µg/lt 24 horas 1.1840	200 µg/lt 6 horas .68000	200 µg/lt 12 horas .59200	200 µg/lt 24 horas .74400
Control	6		0.285364	0.293056	0.293698	0.813288	0.719497	0.661544	0.622884	0.607636
Control	12	0.285364		0.881257	0.834922	0.244564	0.370163	0.056686	0.036219	0.071213
Control	24	0.293056	0.881257		0.788764	0.308931	0.254116	0.104970	0.075228	0.116905
100 µg/lt	6	0.293698	0.834922	0.788764		0.272421	0.336971	0.074207	0.049806	0.088615
100 µg/lt	12	0.813288	0.244564	0.308931	0.272421		0.821092	0.636285	0.645591	0.476066
100 µg/lt	24	0.719497	0.370163	0.254116	0.336971	0.821092		0.561442	0.492717	0.556359
200 µg/lt	6	0.661544	0.056686	0.104970	0.074207	0.636285	0.561442		0.793347	0.848889
200 µg/lt	12	0.622884	0.036219	0.075228	0.049806	0.645591	0.492717	0.793347		0.892150
200 µg/lt	24	0.607636	0.071213	0.116905	0.088615	0.476066	0.556359	0.848889	0.892150	

Tabla 9.- Prueba de significancia para células rojas en organismos estimulados a inyección de CdCl₂.

	SS	MS	p
Intercept	61.28803	61.28803	0.000000
Tratamiento	5.33292	2.66646	0.000586
Hora	0.03253	0.01626	0.946303
Tratamiento*Hora	2.68365	0.67091	0.078013
Error	11.47657	0.29427	

Tabla 10.- Valores promedios y desviaciones estándar para organismos estimulados con CdCl₂ a través de inyección.

	Estimulación por CdCl ₂ a través de inyección			
	Células Rojas		Celomocitos Totales	
	Promedio (10 ⁵)	SD	Promedio (10 ⁶)	SD
Control 6 hrs	1.996	0.963	4.880	1.727
Control 12 hrs	0.540	0.097	7.580	1.223
Control 24 hrs	0.540	0.125	10.910	0.826
100 µg/L 6 hrs	1.660	0.385	9.620	1.246
100 µg/L 12 hrs	0.984	0.064	3.390	0.721
100 µg/L 24 hrs	1.184	0.237	10.680	0.878
200 µg/L 6 hrs	0.680	0.240	4.530	1.078
200 µg/L 12 hrs	0.592	0.057	8.000	1.688
200 µg/L 24 hrs	0.744	0.137	8.660	2.384

Tabla 11.- Valores promedios y desviaciones estándar para organismos estimulados con CdCl₂ a través de baño.

	Estimulación por CdCl ₂ en baño			
	Células Rojas		Celomocitos Totales	
	Promedio (10 ⁵)	SD	Promedio (10 ⁶)	SD
Control 6 hrs	1.063	0.194	6.925	0.907
Control 12 hrs	1.730	0.208	6.783	0.514
Control 24 hrs	1.570	0.360	7.542	0.376
100 µg/L 6 hrs	1.653	0.161	5.858	0.281
100 µg/L 12 hrs	1.380	0.244	7.442	0.713
100 µg/L 24 hrs	0.883	0.251	9.825	1.955
200 µg/L 6 hrs	1.293	0.641	9.800	1.897
200 µg/L 12 hrs	1.313	0.211	9.890	2.078
200 µg/L 24 hrs	2.033	0.598	10.233	1.354

Tabla 12.- t-test para los valores de cuantificación del gen de la metalotioneína en organismos estimulados por baño, los valores significativos (P < 0.05) se indican con rojo.

Tratamiento	cuantificación de la expresión del gen de MT (t-test)				
	Mean	Mean	t-value	df	P
control 6 horas vs 100 µg/L	7.972	17.85167	-6.2168	4	0.003408
control 6 horas vs 200 µg/L	7.972	9.821333	-0.924524	4	0.407539
control 12 horas vs 100 µg/L	3.15	14.58167	-12.6932	4	0.000222
control 12 horas vs 200 µg/L	3.15	9.238	-13.3664	4	0.000181
control 24 horas vs 100 µg/L	6.7	8.045	-0.662046	4	0.544137
control 24 horas vs 200 µg/L	6.7	10.28633	-1.635	4	0.177388

