

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Ecología Marina**

Niveles de expresión del gen Hsp70 en *Balanophyllia elegans*
(Scleractinia, Dendrophyllidae) a lo largo de un gradiente de
profundidad durante verano e invierno en la Bahía Todos Santos, Baja
California, México

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Adonis Jaquelina Minguier Rodríguez

Ensenada, Baja California, México
2020

Tesis defendida por
Adonis Jaquelina Minguier Rodríguez

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Rafael Andrés Cabral Tena
Codirector de tesis

Dr. Eugenio de Jesús Carpizo Ituarte
Codirector de tesis

Miembros del comité

Dr. Luis Eduardo Calderón Aguilera

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez



Dr. Jorge Adrián Rosales Casián
Coordinador del Posgrado en Ecología Marina

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Adonis Jaquelina Minguier Rodríguez** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestra en Ciencias en Ecología Marina.

Niveles de expresión del gen *Hsp70* en *Balanophyllia elegans* (Scleractinia, Dendrophyllidae) a lo largo de un gradiente de profundidad durante verano e invierno en la Bahía Todos Santos, Baja California, México

Resumen aprobado por:

Dr. Rafael Andrés Cabral Tena

Codirector de tesis

Dr. Eugenio de Jesús Carpizo Ituarte

Codirector de tesis

Las poblaciones y comunidades de corales que habitan en aguas templadas o frías, aunque no forman grandes estructuras arrecifales, representan un papel ecológico análogo a los arrecifes someros tropicales, convirtiéndose en un componente clave para la biodiversidad, y se cree son más sensibles al aumento de la temperatura superficial del mar (TSM). Ante esta situación, es importante conocer la respuesta fisiológica empleada por las especies coralinas para identificar la manera en que la variación ambiental ocasionará cambios en sus poblaciones ante futuros escenarios de cambio climático. Una forma de evaluar la respuesta fisiológica es caracterizando el perfil de expresión de ARN. Durante eventos de estrés ambiental, los corales emplean una respuesta celular mediada por la expresión de genes específicos que desencadenan la producción de ARN mensajero (ARNm) que traducen proteínas de shock térmico (HSP), para evitar o reducir el daño en las células. Como la expresión del ARN responde a la variación ambiental, el uso de métodos moleculares como la cuantificación de ácidos nucleicos (ADN y ARN) y la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o en tiempo real (qPCR), para cuantificar la expresión de genes específicos, nos permiten obtener una aproximación del estado fisiológico de los organismos bajo diferentes condiciones ambientales. Con base en lo anterior, para conocer si la variación de la temperatura observada a lo largo de un perfil de profundidad (3 a 12m) y entre las temporadas de verano e invierno, modifica la respuesta fisiológica del coral de aguas templadas, solitario y azooxantelado, *Balanophyllia elegans*, en este estudio se caracterizó su actividad metabólica mediante la relación ARN/ADN y se cuantificó la expresión relativa del gen *Hsp70*. Los resultados mostraron que existe una variación temporal de la relación ARN/ADN, presentándose una mayor actividad metabólica durante el verano con valores de la relación ARN/ADN de 1.12 a 2.24, mientras que el rango de profundidad evaluado no parecen ser un factor que modifique la actividad metabólica de los corales. Además, se observó que *B. elegans* presentó una mayor expresión del gen *Hsp70* durante el verano en comparación con la temporada de invierno y las muestras control. Al comparar entre profundidades, la mayor expresión de *Hsp70* en *B. elegans* se observó a los seis y nueve metros de profundidad y no a los tres metros como se esperaba. Estos resultados podrían sugerir que los corales experimentan eventos de estrés térmico durante el verano, lo cual también se refleja en una elevada actividad metabólica. Mientras que los resultados observados con respecto al perfil de profundidad sugieren que durante el invierno la variación de los parámetros ambientales, a lo largo del rango de profundidad evaluado no modifica la respuesta fisiológica de *B. elegans*, sin embargo, durante el verano los corales podrían experimentar estrés térmico a los seis y nueve metros y a los tres metros un posible fenómeno de aclimatación.

Palabras clave: *Balanophyllia elegans*, relación ARN/ADN, *Hsp70*, estrés térmico, actividad metabólica

Abstract of the thesis presented by **Adonis Jaquelina Minguer Rodríguez** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Marine Ecology.

Expression level of *Hsp70* gene in *Balanophyllia elegans* (Scleractinia, Dendrophyllidae) along a depth gradient during summer and winter in Todos Santos Bay, Baja California, Mexico.

Abstract approved by:

Dr. Rafael Andrés Cabral Tena

Codirector de tesis

Dr. Eugenio de Jesús Carpizo Ituarte

Codirector de tesis

Coral populations and communities that live in temperate or cold waters, although they do not form large reef structures, play an ecological role analogous to shallow tropical reefs, becoming a key component for biodiversity, this kind of corals are believed to be more sensitive to the increase of the sea surface temperature (SST). Given this situation, it is important recognize the physiological response used by coral species to identify how environmental variation causes changes in their populations in the face of future climate change scenarios. One way to assess the physiological response is by characterizing the RNA expression profile. During environmental stress events, corals employ a cellular response mediated by the expression of specific genes that trigger the production of messenger RNA (mRNA) that translate heat shock proteins (HSP), to prevent or reduce damage to cells. As RNA expression responds to environmental variation, the use of molecular methods to quantify nucleic acid (DNA and RNA) and the quantitative or real-time polymerase chain reaction (qPCR), to quantify the expression of specific genes, allow us to obtain an approximation of the physiological state under different environmental conditions. Based on the above, to know if the observed temperature variation along with a depth profile (3 to 12m) and between the summer and winter seasons, modifies the physiological response of solitary and azooxanthellate coral, *Balanophyllia elegans*, in this study, its metabolic activity was characterized using the RNA / DNA ratio and the expression of the *Hsp70* gene was quantified. The results showed that there is a temporal variation of the RNA / DNA ratio, presenting a higher metabolic activity during the summer with values of the RNA / DNA ratio of 1.12 to 2.24, while the characteristics present in the depth range evaluated do not seem to be a factor that modifies the metabolic activity of corals. Furthermore, it was observed that *B. elegans* had a higher expression of the *Hsp70* gene during the summer compared to the winter season and the control samples. When comparing between depths, the highest expression of *Hsp70* in *B. elegans* was observed at six and nine-meters depth and not at three meters as expected. These results suggest that corals experience heat stress events during the summer, which is reflected in high metabolic activity and *Hsp70* expression. While the observed results regarding the depth profile suggest that during the winter the variation of the environmental parameters, throughout the evaluated depth range does not modify the physiological response of *B. elegans*, however, during the summer the corals could experience thermal stress at six and nine meters and three meters a possible acclimatization phenomenon.

Keywords: *Balanophyllia elegans*, ratio RNA/DNA, *Hsp70*, thermic stress, metabolic activity

Dedicatoria

A mis padres

Mi hermana

Y mis tíos

Gracias por su apoyo y cariño en este largo camino

Agradecimientos

Al **Centro de Investigación Científica de Estudios Superiores de Ensenada (CICESE)** por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría en el posgrado de Ecología Marina.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por la beca **(634497)** otorgada durante el periodo 2017-2019 para poder realizar mis de estudios de maestría.

A los programas de **financiamiento**:

- Investigadores del desierto Sonorense por el apoyo económico otorgado al trabajo: “Respuestas Biológicas y Características Poblacionales de la Anémone Verde Gigante y la Copa de Coral Naranja en Baja California, México”.
- Proyecto F142 CICESE por el financiamiento al trabajo: “Estudio de los procesos ecológicos, resiliencia y variabilidad de ecosistemas costeros”.
- Proyecto “Genes de respuesta al estrés como bioindicadores para evaluar el efecto del cambio global en organismos estructuradores del bentos en el Pacífico Mexicano” (Ciencia Básica-2012, N° 181597) aprobado a Eugenio J. Caprizo Ituarte.

A la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) y en específico al **Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo del Instituto de Investigaciones Oceanográficas (IIO)** por el uso de sus instalaciones para realizar el análisis molecular y en el mantenimiento de los organismos vivos. Así mismo al **M. en C. Marco González** por su apoyo logístico y de mantenimiento de los corales en el laboratorio húmedo.

A mi codirector **Dr. Rafael A. Cabral Tena** por tu gran dedicación y enorme paciencia para guiarme en un tema poco familiar para ambos. Por todo el esfuerzo, recursos y tiempo invertido. Por no perder la confianza, a pesar de todos los contratiempos, de que algún día lo íbamos a lograr. Por las palabras de ánimo y consejos cuando todo parecía no tener arreglo. Por tu amistad.

A mi codirector **Dr. Eugenio J. Carpizo Ituarte** por todos los consejos que me aclaraban y demostraban que el panorama no era tan complicado como yo lo planteaba. Por siempre recibirme con una gran sonrisa y permitirme formar parte de su equipo de trabajo para hacer uso de los laboratorios, material y recursos.

A mis sinodales, **Dr. Luis Eduardo Calderón** y la **Dra. Clara Galindo** por enriquecer este trabajo con sus comentarios finales.

Al **M. en C Alejandro Delgadillo Nuño** por brindarme la confianza de trabajar en este proyecto, por realizar los muestreos de los corales, dedicar tu tiempo y paciencia para enseñarme las técnicas de biología molecular y todos los consejos necesarios para desarrollarlo y culminarlo.

Al **Dr. David Paz** por su colaboración en la recolecta de los corales.

A la **Dra. Laura Liliana López Galindo** y a la **Dra. Claudia Ventura López** por todo su tiempo, dedicación y paciencia para obtener nuevos resultados, por todos los consejos y por aclarar mis dudas en las técnicas de laboratorio y análisis de resultados. Gracias por demostrarme que aun con varios tropiezos es posible encontrar resultados favorables.

Al **laboratorio de Genómica Funcional** por permitirme hacer uso de sus materiales, reactivos y equipos, así como a la **Dra. Edna Sánchez** por su ayuda y consejos.

A mis **profesores del posgrado** por transmitirme sus conocimientos. A **Eli** por todo su apoyo y consejo en cuestiones administrativas del posgrado.

A mis **compañeros del laboratorio de Ecología y Pesquerías de la Zona Costera (EPZC)** por sus comentarios para mejorar este trabajo.

A mis compañeros y amigos de la **generación 2017-2019** del Posgrado en Ecología Marina por hacer de esta una estupenda experiencia.

A **Frida**, por los sabios consejos y cálidas carcajadas, por tu inigualable amistad. A **Hugo** por las deliciosas comidas y palabras de aliento. A ambos por su inmenso apoyo y cariño, los llevo en mi corazón.

A **Karla** porque aún a la distancia siempre estabas para escucharme y hacerme reír.

A **Alexis** por el gran apoyo y paciencia en la parte final de este camino. Por todo el amor y las risas. Por compartir tu esencia, al Pachi y esta inesperada pero hermosa experiencia.

Finalmente, a mi familia. A **mis padres**, por confiar y apoyarme en todo lo que necesitara, sin ustedes no lo hubiera logrado. A **mi hermana y Hippie** por estar siempre al pendiente de mí. A **mis tíos** por su interés y apoyo.

Tabla de contenido

Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	ix
Lista de tablas	x
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Introducción general	1
1.2 Respuesta molecular ante el estrés térmico	2
1.2.1 Hsp 70.....	3
1.2.2 Expresión de <i>Hsp70</i> como indicador de estrés térmico en corales escleractinios	4
1.3 Evaluación de la respuesta celular al estrés	5
1.3.1 Índice ARN/ADN	6
1.3.2 Índice ARN/ADN en corales escleractinios.....	6
1.3.3 Análisis de expresión de genes por medio de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o en tiempo real (qPCR)	8
1.4 Análisis de la respuesta al estrés térmico en corales azooxantelados.....	8
1.4.1 <i>Balanophyllia elegans</i>	10
1.5 Justificación	11
1.6 Hipótesis.....	12
1.7 Objetivos	13
1.7.1 Objetivo general.....	13
1.7.2. Objetivos específicos.....	13
Capítulo 2. Materiales y Métodos.....	14
2.1 Área de estudio	14
2.2 Trabajo de campo.....	14
2.3 Trabajo de laboratorio	15

	viii
2.3.1 Extracción de ácidos nucleicos.....	16
2.3.2 Cuantificación total de ácidos nucleicos	16
2.3.3 Purificación del ARN y obtención de ADNc.....	17
2.3.5 Cuantificación de la expresión génica.....	17
2.4 Análisis estadísticos.....	19
Capítulo 3. Resultados	20
3.1 Relación ARN/ADN	20
3.2 Expresión relativa <i>Hsp70</i>	22
Capítulo 4. Discusión	25
4.1 índice ARN/ADN	25
4.2 Expresión relativa de <i>Hsp70</i>	28
Capítulo 5. Conclusiones	33
Literatura citada	34

Lista de figuras

Figura		Página
1	Ubicación de campo Kennedy dentro de la Bahía Todos Santos, Baja California, México.....	14
2	Concentración promedio de ARN total (\pm EE) en <i>Balanophyllia elegans</i> de los organismos control (Ctrl) y de las diferentes profundidades (3, 6, 9 y 12 m) durante verano e invierno. El eje de la derecha representa la temperatura ($^{\circ}$ C) para cada profundidad	20
3	Relación ARN/ADN promedio (\pm EE) en <i>Balanophyllia elegans</i> de los organismos control (Ctrl) y de las diferentes profundidades de muestreo durante verano e invierno. El eje de la derecha representa la temperatura ($^{\circ}$ C) para cada profundidad.....	21
4	Factor de cambio de la expresión de <i>Hsp70</i> en <i>Balanophyllia elegans</i> de los organismos control (Ctrl) y las temporadas verano e invierno.....	22
5	Factor de cambio de la expresión de <i>Hsp70</i> en <i>Balanophyllia elegans</i> de los organismos control (Ctrl) y en las diferentes profundidades de muestreo (3, 6, 9 y 12 m) durante verano e invierno. El eje de la derecha representa la temperatura ($^{\circ}$ C) para cada profundidad.....	22
6	Expresión relativa promedio (\pm EE) de <i>Balanophyllia elegans</i> de los organismos control (Ctrl) y en las diferentes profundidades de muestreo 3, 6, 9 y 12 m) durante verano e invierno. El eje de la derecha representa la temperatura ($^{\circ}$ C) para cada profundidad.....	23

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Parámetros de los primers utilizados en los ensayos de expresión génica.....	17
2	Concentración promedio (\pm DE) de ARN $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y de la relación ARN/ADN de cada profundidad para las temporadas de invierno (n=5), verano (n=6) y los organismos control (n=4).....	20
3	Valores promedio de expresión relativa (\pm DE) obtenidos a partir del método $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ (Livak y Schmittgen, 2001) de las temporadas las temporadas de invierno (n=5), verano (n=6) y los organismos control (n=4).....	24

Capítulo 1. Introducción

1.1 Introducción general

Los ecosistemas marinos presentan constantes variaciones en los parámetros físicos y químicos del agua como respuesta a diferentes procesos naturales y a la actividad humana (National Research Council, 1994). Dichas variaciones ambientales afectan, en mayor o menor medida, a los organismos que en él habitan, modificando aspectos fisiológicos, ecológicos y evolutivos de sus poblaciones (Sørensen y Loeschcke, 2007).

Los organismos marinos están adaptados a tolerar cambios en el ambiente en cierto rango de fluctuación (rango de tolerancia), sin embargo, cuando la fluctuación de alguna de las variables ambientales sobrepasa su límite de tolerancia, se considera que están experimentando un evento de estrés ambiental (Bollmann *et al.*, 2010). Para afrontar eventos de estrés ambiental, los organismos emplean diferentes mecanismos de respuesta, por ejemplo, modifican su comportamiento o migran hacia entornos que presentan condiciones ambientales más favorables. En otras ocasiones, los organismos modifican su fenotipo para aclimatarse a las nuevas condiciones ambientales (plasticidad fenotípica) y finalmente, pueden adaptarse a su nuevo entorno a través del cambio genético (Evans y Hofmann, 2012).

El tipo de mecanismo empleado por los seres vivos ante un evento de estrés ambiental depende de la duración y magnitud del estrés y de las características propias de cada ser vivo (National Research Council, 1994). En general, cuando el estrés ambiental al que es sometido un organismo es agudo, se emplea una respuesta de tipo celular, un proceso complejo que dirige cambios en el estado y desempeño fisiológico de los organismos. La respuesta celular al estrés es un proceso mediado a través de la expresión de genes específicos que desencadenan la producción de ácidos ribonucleicos, principalmente ARN mensajero (ARNm) que, al ser traducido, da paso a la formación de diferentes productos como proteínas chaperonas, antioxidantes y enzimas que evitan o reducen los efectos del estrés ambiental sobre las estructuras y moléculas importantes en diversos procesos metabólicos (Sørensen y Loeschcke, 2007; Zehr *et al.*, 2009; Kenkel *et al.*, 2014).

Actualmente, las variaciones en las condiciones ambientales de los ecosistemas marinos son abruptas y ocurren con mayor frecuencia debido a, entre otros factores, el efecto de la acumulación de dióxido de carbono (CO₂) en la atmósfera, siendo una de sus principales consecuencias el incremento de la temperatura superficial del mar (TSM; Pinzón *et al.*, 2015).

El incremento en la TSM es considerado como uno de los principales factores de estrés ambiental sobre la biodiversidad marina y provoca alteraciones en diferentes procesos biológicos y ecológicos (Hoegh-Guldberg y Bruno, 2010; Poli *et al.*, 2017). Específicamente para las comunidades coralinas, el estrés térmico es una de las principales causas de mortalidad al generar eventos de blanqueamiento o comprometer la tasa metabólica y la eficiencia de procesos como la calcificación, reproducción, y la respuesta al estrés (Poli *et al.*, 2017).

La mayoría de las comunidades coralinas, viven cerca de sus límites superiores de tolerancia térmica y suelen experimentar eventos de estrés térmico por el aumento de un grado centígrado de la TSM por encima del promedio máximo de verano (Robbart *et al.*, 2004; Lough *et al.*, 2018). Esta situación provoca que las comunidades coralinas estén expuestas a un estrés ambiental de mayor magnitud y duración que, se hipotetiza, supera la velocidad de su capacidad adaptativa (Poli *et al.*, 2017).

Ante la situación anterior, conocer la respuesta fisiológica de los corales ante eventos de estrés térmico, nos permitirá identificar como la variación de los factores ambientales modifica los procesos ecológicos de las especies y los cambios en sus poblaciones ante futuros escenarios de cambio climático (Clark y Peck, 2009; Clark *et al.*, 2018).

1.2 Respuesta molecular ante el estrés térmico

La exposición a eventos de estrés térmico en los organismos marinos puede desencadenar daños en estructuras, macromoléculas y procesos celulares (Kültz, 2003). Por ejemplo, las proteínas comienzan a desnaturalizarse, lo que induce en la mayoría de los eucariontes incluidos los corales, una respuesta celular al estrés denominada “heat shock response” (respuesta de choque térmico) como mecanismo para evitar o reparar los daños en el organismo. Durante esta respuesta, se induce la producción de proteínas denominadas proteínas de estrés o proteínas de shock térmico (HSP, por sus siglas en inglés) (Lindquist, 1986; Hofmann y Somero, 1995; Mayfield *et al.*, 2011).

Las HSP funcionan como chaperonas moleculares, es decir, que interactúan con otras proteínas para mantener sus funciones y estructura habituales durante eventos de estrés (Feder y Hofmann, 1999). Por lo tanto, su función principal es proteger, reparar y señalar proteínas que deben ser degradadas y evitar

la agregación de complejos citotóxicos con el propósito de mantener estables estructuras celulares y procesos metabólicos (Hofmann y Somero, 1995; Robbart *et al.*, 2004; Kültz, 2005).

La respuesta celular al estrés por medio de la inducción de las HSP es un proceso evolutivamente conservado, por lo cual se encuentran presentes en todos los taxa, desde bacterias hasta mamíferos (Hofmann, 2009). La expresión de las HSP no solo es desencadenada por el incremento en la temperatura ambiental, factores estresantes como inanición, presencia de metales pesados, hipoxia, cambios en el pH, radiación UV y presencia de toxinas también inducen su producción (Sharp *et al.*, 1997; Place *et al.*, 2004).

Las HSP se clasifican en familias de acuerdo con su peso molecular en kiloDaltons y, de manera particular, la respuesta ante eventos de estrés térmico y la termotolerancia de una gran diversidad de especies biológicas se ha relacionado con una mayor expresión fisiológica de la familia HSP de 70 kDa, comúnmente llamadas Hsp70 (Poli *et al.*, 2017).

1.2.1 Hsp 70

Las Hsp70 son la familia de HSP evolutivamente más conservadas y la más ampliamente estudiada como mediadores moleculares de aclimatación ambiental y de la respuesta ante el estrés térmico (Hoffmann, 2005). Su producción es inducida por activación de genes específicos que a su vez desencadenan una alta producción del ARNm que codifica la traducción de la proteína Hsp70 durante y después de la exposición a eventos de estrés (Mayfield *et al.*, 2011).

Durante estados de estrés celular, las Hsp70 ayudan a las proteínas mal plegadas a recuperar su estructura original y regulan la eliminación de proteínas degradadas, evitando así, la formación de agregados citotóxicos (Clark y Peck, 2009). Aunque, se ha observado una mayor inducción y concentración de Hsp70 en las células durante eventos de estrés, en estados celulares normales, las Hsp70 se encuentran presentes para ayudar en el plegamiento habitual de las proteínas y su transporte a diferentes compartimentos celulares (Feder y Hofmann, 1999).

Las Hsp70 son la familia de HSPs que presentan una mayor sensibilidad a la variación en la temperatura (Kregel, 2002), debido a esta característica, el estudio de la expresión de la proteína y los genes *Hsp70* en organismos marinos, principalmente organismos invertebrados bénticos y peces, ha permitido conocer y

determinar el rango de temperatura en el cual se induce una respuesta de estrés en condiciones naturales y experimentales (Place *et al.*, 2008).

1.2.2 Expresión de *Hsp70* como indicador de estrés térmico en corales escleractinios

En corales escleractinios, la expresión de *Hsp70* ha sido identificada como mecanismo de primera respuesta ante eventos estrés ambiental, principalmente estrés térmico, y como mediador de los procesos de aclimatación y termotolerancia (Franzellitti *et al.*, 2018). Por esta razón, tanto el análisis y cuantificación de la concentración de las *Hsp70*, así como, el análisis de la expresión de los genes que las traducen, han sido establecidos en numerosos estudios como bioindicadores de una condición de estrés en estos organismos (Cziesielski *et al.*, 2019).

Se ha observado que la expresión tanto de las proteínas como de los genes, *Hsp70*, muestran patrones de comportamiento que responden de manera coordinada a las fluctuaciones ambientales, por ejemplo, Seveso *et al.* (2018) observaron que los niveles de la proteína *Hsp70* en las especies *Echinopora lamellosa*, *Acropora tenuis* y *Porites lobata*, en condiciones naturales, se mantuvieron elevados cuando los corales fueron expuestos a la temperatura más alta en el día y disminuyeron significativamente durante la noche cuando la temperatura disminuía. Además, al comparar los niveles de las proteínas entre las tres especies de estudio, se encontraron diferencias significativas bajo las mismas condiciones de muestreo, concluyendo que existe una modulación específica de la expresión de *Hsp70* para cada especie de coral.

En condiciones experimentales, se ha observado que ocurre una regulación positiva de los genes *Hsp70* en *Acropora millepora* (Császár *et al.* 2009), en larvas de *A. millepora* (Rodríguez-Lanetty *et al.*, 2009) *Orbicella annularis* (Carpenter *et al.*, 2010), *Acropora aspera* (Leggat *et al.*, 2011), *Acropora hyacinthus* (Barshis *et al.*, 2013), *Porites astreoides* (Kenkel *et al.*, 2014), *Stylophora pistillata*, *Acropora eurystoma*, *Porites sp.*(Maor-Landaw y Levy, 2016), *Pocillopra damicornis* (Brener-Raffalli *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018) después de someterlos a periodos de estrés térmico agudo. Sin embargo, también se ha observado la ausencia de expresión diferencial de los genes *Hsp70* después de someter a las colonias de coral a temperaturas elevadas, por ejemplo, Desalvo *et al.* (2008) en *Orbicella faveolata*, Voolstra *et al.* (2009) en embriones de *Orbicella faveolata*, Mayfield *et al.* (2011) en *Seriatopora hystrix*, Bellantuono *et al.* (2012) y Granados-Cifuentes *et al.* (2013) en *Acropora Mellipora*, fenómeno posiblemente relacionado con la

termotolerancia de los organismos, la cual se considera está relacionada con un alto nivel de expresión basal o constitutiva de *Hsp70*.

Un estudio particular que compara la expresión del gen *Hsp70* tanto en condiciones naturales como en condiciones experimentales es el realizado por Poli *et al.* (2017), en este estudio, se compara la expresión de *Hsp70* en colonias de coral *Pocillopora verrucosa* recolectadas a lo largo de un perfil de profundidad. Se observó que la expresión del gen *Hsp70* responde a la variación con el perfil de profundidad, presentando mayor expresión en corales recolectados a 3 m de profundidad en comparación con los valores de expresión en los corales recolectados a 12 m. En condiciones experimentales, al someter a las colonias de coral a condiciones de 31°C durante el día con reducciones de temperatura a 28°C durante la noche por 7 días, se observó que los corales recolectados a los 12m eran sensibles al estrés térmico al sobreexpresar transcritos de *Hsp70* mientras que los corales recolectados a 3 m no mostraban cambios significativos en la expresión del gen *Hsp70*. Concluyen que las condiciones del hábitat modulan los patrones de transcripción de los genes *Hsp70* e influyen en mecanismos de termotolerancia.

1.3 Evaluación de la respuesta celular al estrés

Los perfiles de expresión del ARN de cada individuo y/o población evolucionan en respuesta a características diferenciales de su entorno, por lo que es posible correlacionar dichas respuestas con la variación ambiental y así identificar fenotipos moleculares que facilitan la adaptación a entornos altamente variables (Kenkel y Matz, 2016).

El uso de métodos moleculares basados en la cuantificación de ácidos nucleicos (ARN y ADN), así como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para cuantificar la expresión de genes, se han convertido en una herramienta importante (Chícharo y Chícharo, 2008) para establecer biomarcadores moleculares de estrés ambiental a nivel celular (Bromage *et al.*, 2009). Estas herramientas, la cuantificación de ácidos nucleicos y la PCR, nos permiten evaluar el estado fisiológico de los organismos convirtiéndose en una fuente de información sobre los mecanismos que actúan en la resiliencia de los organismos (Franzellitti *et al.*, 2018).

1.3.1 Índice ARN/ADN

La relación ARN/ADN es comúnmente utilizada para evaluar el estado metabólico de los organismos (Meesters *et al.*, 2002). Se basa en el hecho de que la concentración de ADN por célula es fija, siendo indicativo del número de células o del crecimiento por proliferación celular; mientras que la concentración de ARN varía debido al aumento en la demanda fisiológica del organismo por la activación de diferentes procesos metabólicos (Chícharo y Chícharo, 2008).

Debido a que el ARN es un componente esencial en la síntesis de proteínas (principales productos para el mantenimiento estructural y metabólico de la célula) su concentración en las células a menudo refleja la tasa metabólica de los organismos en diferentes condiciones ambientales y ontogénicas (Meesters *et al.*, 2002; Buckley y Szmant, 2004). Un individuo en crecimiento con disponibilidad de alimento y metabólicamente activo, debería presentar una relación ARN/ADN relativamente alta en comparación con un individuo metabólicamente inactivo (Foley *et al.*, 2016).

Con base en lo anterior, valores altos de la relación ARN/ADN, indican períodos en los que el metabolismo requiere de una mayor producción de proteínas, por ejemplo, en aquellos asociados al crecimiento, diferenciación celular o bien, como respuesta a eventos de estrés ambiental (Buckley y Szmant, 2004).

1.3.2 Índice ARN/ADN en corales escleractinios

Se ha observado que los valores de la relación ARN/ADN en corales escleractinios varían de acuerdo con las características del ambiente, por lo cual, ha sido utilizada como una herramienta para monitorear la actividad metabólica de las comunidades coralinas en diferentes condiciones ambientales (Gates y Edmund, 1999; Meesters *et al.*, 2002).

De acuerdo a lo reportado por Buckley y Szmant (2004) en *Orbicella annularis* y Hinrichs *et al.*, (2013) en *Acropora digitifera* y *Acropora spicifera*, la relación ARN/ADN presenta cambios asociados a la variación estacional de la temperatura. Los autores observaron valores bajos de la relación ARN/ADN durante la temporada que presentó temperaturas altas, asociando este resultado con un posible efecto negativo de la temperatura sobre la asociación simbiótica entre el coral y las microalgas (zooxantelas) causando blanqueamiento en las colonias lo que tiene como consecuencia una disminución en las tasas de alimentación autotrófica y por lo tanto en el metabolismo del coral. Mientras que, en las temporadas

donde la temperatura es menor, se observó un incremento de los valores de la relación, resultado posiblemente asociado a que en dichas temperaturas se presentaban las condiciones óptimas para el crecimiento de los corales.

El aumento de la profundidad también influye en la variación de la relación ARN/ADN de las colonias de coral, Bak y Meesters (2000) y Meesters *et al.* (2002) en la Bahía de Banten, Indonesia y Buckley y Szmant (2004) en el arrecife de Florida, reportan que, en el género *Porites*, el valor de la relación ARN/ADN disminuye conforme la profundidad aumenta, debido a que al reducirse la cantidad de luz en el medio, disminuye la actividad fotosintética del simbiote (*Symbiodinium*), indicando que la energía aportada por el simbiote hacia el coral no es suficiente por lo que deben disminuir sus tasas metabólicas.

Relacionado también con la reducción de la luz, Meester *et al.* (2002) evaluaron el comportamiento de la relación ARN/ADN en sitios con baja y alta turbidez. Los investigadores observaron que los valores de la relación disminuyen cuando los corales se encuentran en zonas con turbidez; sin embargo, en zonas donde las condiciones de turbidez eran mayores y se presentaba con una mayor constancia la relación ARN/ADN se mantiene similar al de los corales en zonas en los que no se presenta turbidez, concluyendo que este comportamiento puede ser reflejo de la adaptación a las dichas condiciones.

Además, Buckley y Szmant (2004) al comparar los valores del índice ARN/ADN con otras especies cercanas; los investigadores observaron valores más altos en la especie *Montastraea cavernosa* en comparación con *O. annularis* y *O. faveolata* recolectadas en el mismo sitio y temporada. Con lo anterior, concluyen que la relación ARN/DNA además de responder a las variaciones ambientales, también es diferentes entre especies habitando en las mismas condiciones ambientales.

Finalmente, en eventos de estrés, Hauri *et al.* (2010) reportan que, en condiciones de laboratorio, los valores de la relación ARN/ADN en *Acropora millepora* aumentaron cuando las colonias fueron expuestas a una simulación de condiciones de estrés originadas por macroalgas, mientras que Harithsa *et al.* (2005) para *Porites lutea* y *Acropora formosa* en el Archipiélago Lakshadweep, India, asocian una elevada relación ARN/DNA con eventos de blanqueamiento provocada por aumento de la temperatura. En ambos casos se sugiere que el incremento en la relación ARN/ADN se origina por un aumento en el metabolismo para tratar de contrarrestar o evitar los efectos del estrés.

1.3.3 Análisis de expresión de genes por medio de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o en tiempo real (qPCR)

El perfil de expresión de genes y en particular la transcriptómica (estudio del conjunto de ARNs que existen en la célula) se han convertido en herramientas útiles para la investigación fisiológica, proporcionando una visión completa de los cambios moleculares que ocurren cuando los organismos experimentan estrés ambiental (Evans y Hofmann, 2012). La cuantificación en la expresión de genes mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o en tiempo real (qPCR por sus siglas en inglés), nos permite identificar y cuantificar genes específicos y su nivel de expresión en un organismo en diferentes condiciones ambientales (Roth, 2002).

La qPCR permite la cuantificación sensitiva, específica y reproducible de ácidos nucleicos al combinar la amplificación y la detección de estos en un solo paso. Dicho proceso se lleva a cabo mediante la correlación del producto de la PCR en cada uno de los ciclos con la intensidad de una señal fluorescente (Arya *et al.*, 2005). Debido a lo anterior, se ha convertido en una de las pruebas de detección rápida y confiable para medir la expresión de genes (Kuang *et al.*, 2018).

La información obtenida de la cuantificación de genes es relevante para el estudio y monitoreo de la respuesta fisiológica de los seres vivos ante diversos estímulos (Heid *et al.*, 1996) ya que, la modulación del mecanismo de expresión de genes ha resultado ser una de las piezas centrales en la adaptación celular ante los cambios ambientales a corto y largo plazo (López-Maury *et al.*, 2009). De esta forma, los niveles de expresión de genes y proteínas son parámetros potencialmente útiles para comprender qué procesos celulares se ven afectados durante los eventos de estrés ambiental. De tal forma que los genes y macromoléculas identificados, podrían funcionar como biomarcadores moleculares para evaluar el estado fisiológico de los organismos (Downs *et al.*, 2005). Y finalmente puede ser empleada para comprender diversos procesos ecológicos desde interacciones intra e interespecíficas, hasta los mecanismos de tolerancia y aclimatación fisiológica, así como la detección de enfermedades en especies comercialmente importantes (Place *et al.*, 2008).

1.4 Análisis de la respuesta al estrés térmico en corales azooxantelados.

La mayoría de los estudios realizados en la caracterización de la actividad metabólica y de expresión de genes ante el aumento de la TSM se han realizado en corales formadores de arrecifes (zooxantelados) que

generalmente habitan aguas tropicales, sin embargo, recientemente ha surgido el interés por estudiar las poblaciones y comunidades de corales que habitan en aguas templadas o frías, debido a que en regiones como el Atlántico y Pacífico Norte, aunque no forman grandes estructuras arrecifales, representan un papel ecológico análogo a los arrecifes someros tropicales, convirtiéndose en un componente clave para la biodiversidad en estas regiones (Reyes-Bonilla y Cruz-Piñón 2000).

Dentro del grupo de corales de aguas frías o templadas podemos encontrar a los corales ahermatípicos o azooxantelados, los cuales se caracterizan por no presentar asociación simbiótica estricta con las microalgas denominadas zooxantelas (Stanley, 1988; Reyes-Bonilla y Cruz-Piñón 2000). Debido a que los resultados de los efectos de cambios ambientales sobre los corales formadores de arrecifes es un tema complejo por la estrecha relación existente entre el metabolismo del coral con su simbiote; los corales azooxantelados son considerados como buen modelo biológico de estudio pues presentan la ventaja de que al carecer de zooxantelas, los efectos de los cambios ambientales y las condiciones de estrés pueden ser mejor discernidos evitando efectos confusos provenientes de procesos simbióticos y de la fotosíntesis (Movilla *et al.*, 2016). Además, dentro de estudios moleculares se evita la confusión de caracteres homólogos del huésped y el simbiote (Mayfield *et al.*, 2011).

Existen pocos trabajos en los que se caracteriza la respuesta a cambios ambientales en corales azooxantelados. Referente a la evaluación de la actividad metabólica en condiciones de estrés térmico, se puede considerar el trabajo de Movilla *et al.* (2016), en el cual se evaluó el efecto de la reducción del pH y el aumento de la temperatura en el agua sobre la tasa de calcificación, la microdensidad y posidad del esqueleto, así como el contenido bioquímico en los tejidos (materia orgánica, lípidos y proteínas) de los corales azooxantelados *Astroides calycularis* y *Leptopsammia pruvoti*. En este estudio se observó que para *A. calycularis* no se observaron diferencias en los parámetros evaluados, mientras que *L. pruvoti* si presento una reducción significativa tanto en lo tasa de calcificación y el contenido bioquímico de su tejido, posiblemente como efecto de las condiciones de estrés al que fue sometido.

Mientras que para la caracterización de la expresión de genes en corales azooxantelados, Franzelliti *et al.*, (2018) comparan la expresión de *Hsp70 in situ* y los perfiles de expresión después de una exposición a estrés térmico entre varias especies de coral (*Astroides calycularis*, *Balanophyllia europaea*, *Caryophyllia inornata*, *Cladocora caespitosa*, y *Leptopsammia pruvotiestas*) que presentan diferentes modos de crecimiento (solitario y colonial) y estrategias tróficas (zooxantelado y azooxantelato); los autores observaron que los niveles de *Hsp70 in situ* fueron más altos en las especies de corales zooxantelados en comparación con los corales azooxantelados. Además, después de ser sometidos al periodo experimental

de estrés térmico, se observó variación entre los valores de expresión de *Hsp70* con respecto a las formas de crecimiento (colonial y solitarios) y la expresión en corales zooxantelados continuaba siendo mayor en comparación a la expresión de los corales azooxantelados.

1.4.1 *Balanophyllia elegans*

El coral solitario *B. elegans* forma parte de la comunidad de corales de aguas templadas del Pacífico Norte, es una especie de coral escleractinio solitario y azooxantelado, es decir, que presenta un pólipo único y carece de microalgas simbióticas fotosintéticas. Presenta un tipo de alimentación heterótrofa consumiendo zooplancton o materia orgánica disuelta o particulada; aunque puede sobrevivir durante meses sin alimentarse (Crook *et al.*, 2013). *B. elegans* construye un exoesqueleto de carbonato de calcio y su crecimiento máximo llega a presentar un diámetro promedio de 10 mm (Bruno, 1996).

B. elegans habita en substratos rocosos de aguas templadas a lo largo de la costa oeste de América del Norte, distribuyéndose desde el sur de Alaska hasta las costas de Baja California. *B. elegans* habita en las zonas intermareal y submareal hasta aproximadamente 300 m o 500 m de profundidad (Crook *et al.*, 2013), las mayores abundancias suelen encontrarse entre los 12 y 20 m de profundidad comenzando a descender considerablemente a partir de los 25 m (Hellberg, 1994).

Para este organismo de estudio (*B. elegans*), son escasos los estudios que caractericen sus patrones de respuesta desde una perspectiva molecular ante los cambios ambientales. Griffiths *et al.* (2019) compararon la respuesta fisiológica y transcriptómica de dos poblaciones de *B. elegans* recolectados de ambientes que presentaban diferentes condiciones de pH provocadas por eventos de surgencia. Los investigadores observaron que los corales que experimentan eventos de surgencia constantes mantuvieron la misma tasa de respiración, contenido de proteínas y lípidos al ser sometidos a ambientes con pH reducido. En contraste, los corales provenientes del sitio con pocos eventos de surgencia redujeron las tasas de respiración, el contenido de proteínas y lípidos; lo que sugiere que han agotado sus reservas de energía como consecuencia del estrés provocado la reducción del pH.

Además, Griffiths *et al.* (2019) observaron que los corales provenientes del sitio con eventos frecuentes de surgencia presentaron una regulación positiva de los genes que participan en la unión de iones de calcio y el transporte de iones, muy probablemente relacionados con la homeostasis y el mantenimiento del pH

durante el proceso de calcificación. Mientras que, los corales recolectados en sitios con escasos eventos de surgencia regularon genes de respuesta al estrés por exposición a valores de pH bajos.

Los estudios fisiológicos y moleculares en los organismos son una herramienta útil para determinar si actualmente las especies viven cerca de sus límites de tolerancia ante las variaciones ambientales, determinar mediante qué tipo de respuestas establecen esos límites y como difieren en sus capacidades de aclimatación y para modificar su tolerancia (Somero, 2010).

Con base en lo anterior, si consideramos el metabolismo y estado fisiológicos de los organismos desde una perspectiva molecular, los resultados obtenidos son considerados como información valiosa y útil para vincular la fisiología del organismo con las condiciones climáticas a gran escala (Kenkel *et al.*, 2014). Por ello, la capacidad de perfilar los patrones de expresión del ARN en diferentes condiciones ambientales nos permitirá ampliar el entendimiento de diversos procesos ecológicos por medio de la identificación de los mecanismos de tolerancia y aclimatación fisiológica antes posibles escenarios de cambio climático (Place *et al.*, 2008).

De acuerdo con lo anterior, el objetivo de este estudio es cuantificar y contrastar, por medio del índice ARN/ADN y la expresión de *Hsp70*, la actividad metabólica de *Balanophyllia elegans* durante las temporadas de verano e invierno en distintas profundidades con la finalidad de obtener una primera aproximación del comportamiento fisiológico de este organismo bajo condiciones naturales.

1.5 Justificación

Las comunidades de corales que habitan en aguas templadas o frías como en las regiones del Océano Atlántico y Pacífico Norte, representan un papel ecológico análogo a los arrecifes someros tropicales, lo que los convierte en componente clave para la biodiversidad en estas regiones. Actualmente, estas comunidades de corales de aguas templadas se encuentran en riesgo por el aumento de la temperatura superficial del mar provocando una alta mortalidad para las comunidades coralinas debido a eventos de estrés térmico.

Es importante entonces, caracterizar los patrones de respuesta fisiológica en comunidades coralinas con características similares a *B. elegans* con el objetivo de ampliar el entendimiento de los procesos

ecológicos de estas comunidades desde una perspectiva de tolerancia y aclimatación fisiológica ante posibles escenarios de cambio climático.

1.6 Hipótesis

En los ecosistemas marinos, el efecto de la radiación solar y el aumento de la TSM por efecto del cambio climático provocan que las capas superficiales de agua presenten una mayor temperatura en comparación con las capas más profundas. De acuerdo con lo anterior, los corales que se encuentren en zonas de menor profundidad podrían estar experimentando eventos constantes de estrés térmico.

Si consideramos que los perfiles de expresión del ARN representan una medida aproximada de la actividad metabólica de los organismos, suponemos que:

- Los valores de la concentración de ARN total y la relación ARN/ADN serán mayores en los individuos que habitan en sitios poco profundos (3m), en comparación con valores de ARN total y la relación ARN/ADN en los individuos recolectados a profundidades mayores (6, 9 y 12 m).
- Los valores de la concentración de ARN total y la relación ARN/ADN serán mayores en los individuos recolectados durante la temporada de verano, en comparación con los niveles de expresión de los individuos recolectados en invierno.

Lo anterior solo nos arrojaría una aproximación del estado metabólico de los corales, por ello, evaluar la expresión de *Hsp70* nos permitiría identificar si se trata de una respuesta al estrés térmico, en este caso suponemos que:

- Los niveles de expresión del gen *Hsp70* en *B. elegans* serán mayores a profundidades menores (3m) en comparación con los niveles de expresión a una profundidad mayor (6, 9 y 12m)
- Los niveles de expresión del gen *Hsp70* en *B. elegans* serán mayores en la temporada de verano, en comparación con los niveles de expresión en la temporada de invierno.

1.7 Objetivos

1.7.1 Objetivo general

Caracterizar la actividad metabólica del coral solitario *Balanophyllia elegans* de cuatro profundidades diferentes en condiciones naturales mediante la relación ARN/ADN y la cuantificación del gen *Hsp70* durante las temporadas de verano e invierno en la Bahía de Todos Santos, Baja California, México.

1.7.2. Objetivos específicos

- Cuantificar la concentración total de ácidos nucleicos (ARN y ADN) y obtener la relación ARN/ADN en los individuos del coral solitario, *Balanophyllia elegans*, recolectados a 3, 6, 9 y 12 metros de profundidad en condiciones naturales.
- Determinar si existen diferencias entre la concentración total de ácido ribonucleico (ARN) y la relación ARN/ADN entre las diferentes profundidades y entre las temporadas de verano e invierno.
- Cuantificar la expresión relativa del gen *Hsp70* en los corales solitarios, *Balanophyllia elegans*, recolectados bajo condiciones naturales a 3, 6, 9 y 12 metros de profundidad.
- Determinar si existen diferencias entre los niveles de expresión del gen *Hsp70* en los corales de *Balanophyllia elegans* entre las diferentes profundidades y entre las temporadas de verano e invierno.

Capítulo 2. Materiales y Métodos

2.1 Área de estudio

Campo Kennedy (Bahía Todos Santos)

Campo Kennedy es una localidad dentro de la península de Punta Banda ($31^{\circ} 42' 30''$ N y $116^{\circ} 41' 30''$ O), la cual forma parte de la Bahía Todos Santos en Baja California, México (Figura 1).

La Bahía Todos Santos, establece comunicación con el Océano Pacífico y se le considera como una bahía pequeña con superficie ~ 230 km² (Espinosa-Carreón *et al.*, 2001) de pendiente suave y con profundidades de hasta 50 m (Larrañaga, 2013).

La zona donde se ubica la bahía, abarca una zona de transición biogeográfica entre las aguas templadas de la Corriente de California y las aguas subtropicales del sur por lo que muchas especies encuentran sus límites de distribución norte o sur en esta región (Beas-Luna y Ladah, 2013); sin embargo, existe una primordial influencia de la Corriente de California, por lo que se caracteriza por presentar agua con baja temperatura (12 a 22 °C), baja salinidad (33.3 a 33.7 ups), una alta concentración de oxígeno disuelto Y valores de densidad entre los 24.5 y 25.5 kg/m³ (Lynn y Simpson 1987; Larrañaga, 2013). Además, es una zona altamente productiva durante primavera y verano debido a la presencia de surgencias intensas (Ladah y Zertuche , 2004).

2.2 Trabajo de campo

En total, se recolectaron 33 individuos de *B. elegans* durante dos muestreos correspondientes a las temporadas de invierno (15 individuos) y verano (18 individuos) del año 2018 en cada profundidad (3, 6, 9 y 12 m). Cada individuo fue preservado por separado en 1mL de TRIzol™ Reagent (Ambion) y se transportaron al laboratorio donde fueron congelados a -80°C hasta su procesamiento.

Además, se registró la temperatura del agua *in situ* en cada profundidad en la cual se recolectaron los individuos de *B. elegans* utilizando un termógrafo (HOBO® data logger).

Para tener muestras control en condiciones de temperatura conocidas y poder hacer comparaciones entre la relación ARN/ADN y la expresión del gen *Hsp70*, se mantuvieron organismos vivos en laboratorio en condiciones constantes de temperatura (17°C), alimentados tres veces a la semana con alimento vivo (*Artemia salina*) y recambios completos de agua una vez por semana.

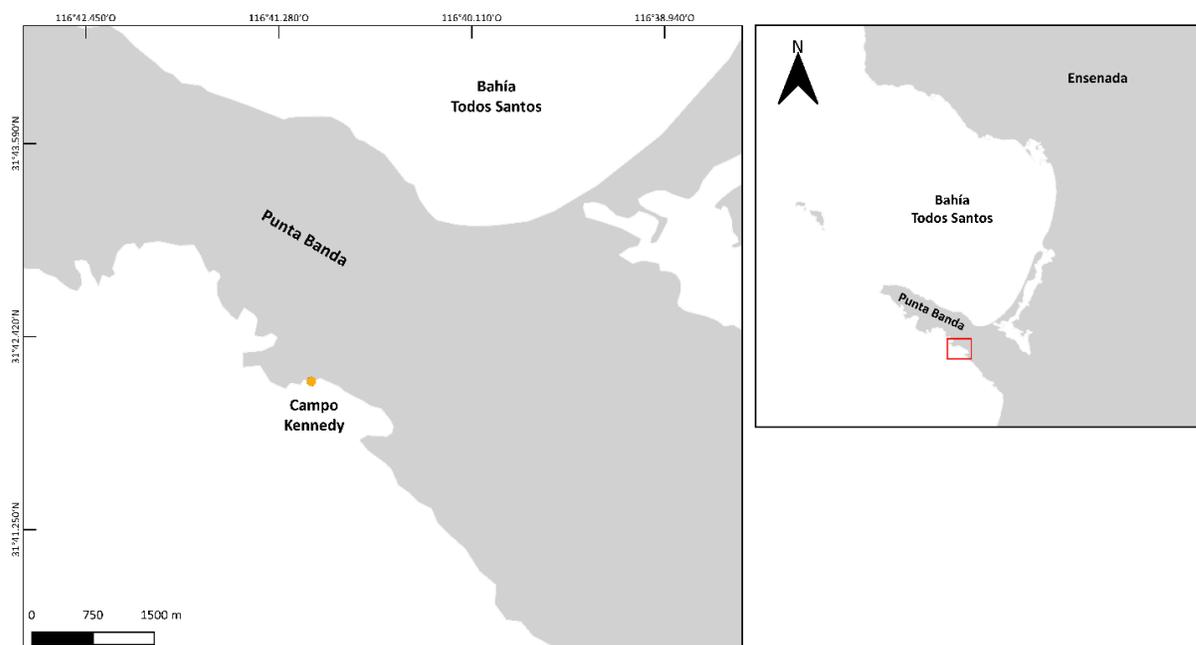


Figura 1. Ubicación de campo Kennedy dentro de la Bahía Todos Santos, Baja California, México.

2.3 Trabajo de laboratorio

Para obtener la relación ARN/ADN y estimar los niveles de expresión del gen *hsp70* se realizó la estandarización de un protocolo, el cual contempló desde la extracción de los ácidos nucleicos (ARN y ADN) hasta la cuantificación de la expresión de genes por medio de PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR).

2.3.1 Extracción de ácidos nucleicos

ARN

La extracción del ARN se realizó a partir de 25 a 30 mg de tejido homogeneizado por medio de pistilos de plástico en 500µL de TRIzol™ Reagent (Ambion) y se siguió el protocolo de extracción de acuerdo con las recomendaciones del fabricante con las siguientes modificaciones:

- Durante la precipitación del ARN con isopropanol, se incubaron las muestras a -20°C durante toda la noche.
- El lavado del pellet de ARN precipitado se realizó por triplicado.

El ARN obtenido se resuspendió en 50 µL agua estéril libre de nucleasas, se cuantificó la concentración obtenida utilizando un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific®) y la calidad se evaluó mediante de electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

ADN

La extracción del ADN se realizó a partir de la interfase fenol-cloroformo obtenida de la extracción del arn de acuerdo con el protocolo de extracción del fabricante. El ADN obtenido se resuspendió en 100 µL agua estéril libre de nucleasas y se cuantificó la concentración obtenida utilizando un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific®).

2.3.2 Cuantificación total de ácidos nucleicos

A partir de la concentración de los ácidos nucleicos extraídos (ARN y ADN) medida mediante el espectrofotómetro NanoDrop™, se determinó la concentración total de ARN y ADN. Para ello, se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{ARN ó ADN (total)} = \frac{\mu\text{g(totales)}}{\text{peso(mg)}} \quad (1)$$

Dónde:

µg (totales) = concentración de ácidos nucleicos en µg/µL obtenidos en la cuantificación multiplicado por el volumen en µL en el que fueron resuspendidos

peso (mg) = peso inicial del tejido utilizado

Posteriormente, para el cálculo de la relación ARN/ADN de cada muestra, se utilizó la siguiente ecuación utilizando los valores de ARN y ADN total obtenidos anteriormente:

$$\frac{ARN}{ADN} = \frac{ARN \frac{\mu g}{mg}}{ADN \frac{\mu g}{mg}} \quad (2)$$

2.3.3 Purificación del ARN y obtención de ADNc

Para eliminar cualquier resto de ADN genómico, el ARN obtenido se purificó por medio de un tratamiento con DNasa I (RNase Free, Ambion) y fue almacenado a -80°C. Para corroborar que el tratamiento con DNasa fue efectivo se realizó un PCR punto final con los primers del gen 18s y se verificó por medio de electroforesis en gel 2%. Posteriormente, utilizando 600ng de ARN tratado con la DNasa, se llevó a cabo la síntesis de ADNc con el kit de retrotranscripción High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Life Technologies CA), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

2.3.5 Cuantificación de la expresión génica

A partir de esta técnica de cuantificación de genes, existen dos métodos para analizar los datos obtenidos, la cuantificación absoluta y la cuantificación relativa. Para fines de este estudio se utilizó la cuantificación relativa, método en el cual se describen los cambios de la expresión del gen blanco con relación a uno o varios genes de referencia (Livak y Schmittgen, 2001).

Obtención de los genes de referencia y el gen blanco

Para la cuantificación de la expresión relativa de *Hsp70*, se seleccionó como gen de referencia el gen ribosomal 18S. Este gen es comúnmente utilizado para la normalización de los datos de expresión del gen blanco ya que al estar relacionado con funciones celulares básicas como la síntesis de proteínas se espera se exprese de manera constitutiva y estable en diferentes condiciones fisiológicas. Además, hasta el momento, para *B. elegans* es el único gen secuenciado parcialmente que puede ser utilizado para este tipo de ensayos.

Los primers del gen 18S (Tabla 1) fueron diseñados por medio del programa en línea Primer3 versión (0.4.0) a partir de la secuencia parcial del gen ribosomal 18S de *B. elegans* registrada en el Gen Bank (U52973.1). Mientras que los primers del gen *Hsp70* (Tabla 1) se obtuvieron a partir de los primers diseñados y reportados por Franzelliti *et al.* (2018).

Por medio de ensayos de PCR punto final con ambos primers (18S y *Hsp70*), se estandarizó la temperatura y concentración óptimas de amplificación y se corroboró que la síntesis de ADNc fuera correcta. Se estableció un gradiente de temperatura de 58°C a 66°C de acuerdo con las condiciones de amplificación (Tabla 1) en un termociclador Verity Thermal Cycler (Applied Biosystems, Life Technologies C.A). La temperatura de alineamiento (60°C para *Hsp70* y 62°C para 18S) y concentración adecuadas (100nM para cada par de primers), fueron elegidas por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Tabla 1. Parámetros de los primers utilizados en los ensayos de expresión génica

Primer	Secuencia	Tamaño del amplicón	Tm °C
18sL	CGTCGTGCTGGGATAGATC	106	60.04
18sR	TGTGTACAAAGGGCAGGGAC		59.89
hsp70F	CTTTCCTCCGAGATAGTCTTCAG	107	62
hsp70R	TCGCGTACAGGTTGGTAAAG		62

Ensayos de expresión

Se utilizó el ADNc obtenido de la retotranscripción para realizar ensayos de expresión de genes por medio qPCR. Cada reacción contenía un volumen final de 20 μL que contenían 6.3 μL de SYBr Green PCR master Mix, 0.2 μL de cada primer, 8.3 μL de agua y 5 μL (100ng) de ADNc. Los ensayos se llevaron a cabo en las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial de 95°C durante 10 minutos, 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y un minuto a 60°C para *hsp70* y 62°C para 18S con una curva de disociación de 95°C durante 15 segundos, 60°C por un minuto y finalmente 95°C durante 15 segundos.

Finalmente, a partir del método $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ propuesto por Livak y Schmittgen en 2001, usando la expresión de 18S como gen de referencia y los datos de expresión de los organismos control (Ctrl) para la normalización de los datos de expresión del gen blanco *Hsp70*. Es pertinente resaltar que, por la variación observada en los datos de expresión, estos fueron tratados de dos formas; por lo que obtuvimos por una parte una serie de resultados relativos y resultados comparables estadísticamente.

2.4 Análisis estadísticos

Para los datos obtenidos a partir de la relación ARN/ADN, se comprobaron los supuestos de normalidad (Prueba Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas (Prueba de Bartlett). De acuerdo con los resultados, se realizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis para determinar si existían diferencias significativas entre profundidades y temporadas de muestreo.

Mientras que los datos obtenidos de la cuantificación relativa de la expresión de *Hsp70* a partir del método $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ fueron transformados a Log_{10} para obtener que los datos cumplieran con los supuestos de normalidad y homocedasticidad de varianzas para realizar un ANOVA de una vía con la finalidad de determinar si existían diferencias significativas entre profundidades y temporadas de muestreo.

Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante la plataforma RStudio (*version 1.2.5019*© 2009-2019).

Capítulo 3. Resultados

3.1 Relación ARN/ADN

La concentración de ARN total ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) fue mayor en los organismos recolectados en verano en comparación con los organismos recolectados en invierno y con los que se mantuvieron en condiciones de laboratorio (Tabla 2). En cada temporada, al comparar entre profundidades, no se observó un patrón definido en las concentraciones de ARN (Figura 2). Durante el invierno, la mayor concentración de ARN se registró a los tres metros de profundidad con $0.49\pm 0.12 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, mientras que, durante el verano, la mayor concentración mayor se registró a los 9 metros con $1.40\pm 0.40 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Tabla 2).

La prueba estadística no paramétrica Kruskal-Wallis mostró diferencias estadísticamente significativas entre temporadas de muestreo ($\chi^2 = 21.102$, $df = 2$, $p < 0.001$) pero no entre profundidades ($\chi^2 = 0.087$, $df = 2$, $p = 0.95$). Siendo las concentraciones de ARN de verano diferentes de las de invierno ($p < 0.001$) y de las muestras control ($p = 0.004$).

Con respecto a la relación ARN/ADN, los valores promedio obtenidos en la temporada de verano fueron mayores en comparación con los valores en invierno y similares al valor promedio de los organismos en condiciones de laboratorio (Tabla 2). Al comparar entre profundidades de cada temporada, durante el invierno se observó que el valor de la relación ARN/ADN incrementa conforme la profundidad aumentó (Figura 3). Durante el verano, no se observó un patrón claro de comportamiento entre profundidades, el valor mayor de la relación ARN/ADN (2.24 ± 0.69) fue encontrado a los seis metros de profundidad (Tabla 2).

A partir de la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis se observaron diferencias estadísticamente significativas entre temporadas de muestreo ($\chi^2 = 18.91$, $df = 2$, $p < 0.001$) pero no entre profundidades ($\chi^2 = 0.72$, $df = 2$, $p = 0.95$). Siendo la relación ARN/ADN de la temporada de invierno diferente de la relación obtenida en el verano ($p < 0.001$) y de la relación de los organismos control ($p < 0.02$).

Tabla 2. Concentración promedio (\pm DE) de ARN $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y de la relación ARN/ADN de cada profundidad para las temporadas de invierno(n=5), verano (n=6) y los organismos control (n=4).

	ARN ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)			ARN/ADN		
	Invierno	Verano	Control	Invierno	Verano	Control
Profundidad	0.51 \pm 0.10			1.65 \pm 1.28		
3m	0.49 \pm 0.12	1.26 \pm 0.68		0.20 \pm 0.16	1.69 \pm 0.88	
6m	0.41 \pm 0.11	1.34 \pm 0.64		0.41 \pm 0.32	2.24 \pm 0.69	
9m	0.42 \pm 0.07	1.40 \pm 0.40		0.56 \pm 0.40	1.86 \pm 1.01	
12m		1.31 \pm 0.51			1.12 \pm 0.68	

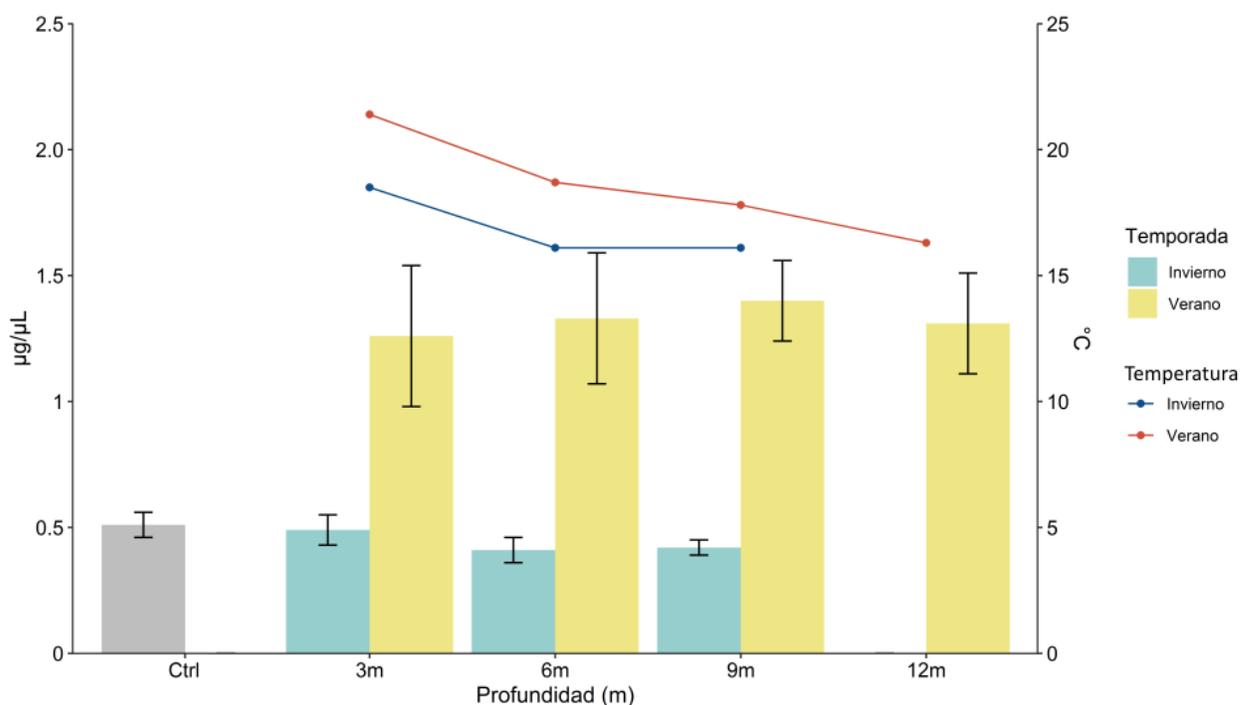


Figura 2. Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) promedio de ARN total (\pm EE) de *Balanophyllia elegans* de la muestra control (Ctrl) y de las diferentes profundidades (3, 6, 9 y 12 m) durante verano e invierno. El eje de derecha corresponde a la temperatura ($^{\circ}\text{C}$) registrada para cada profundidad.

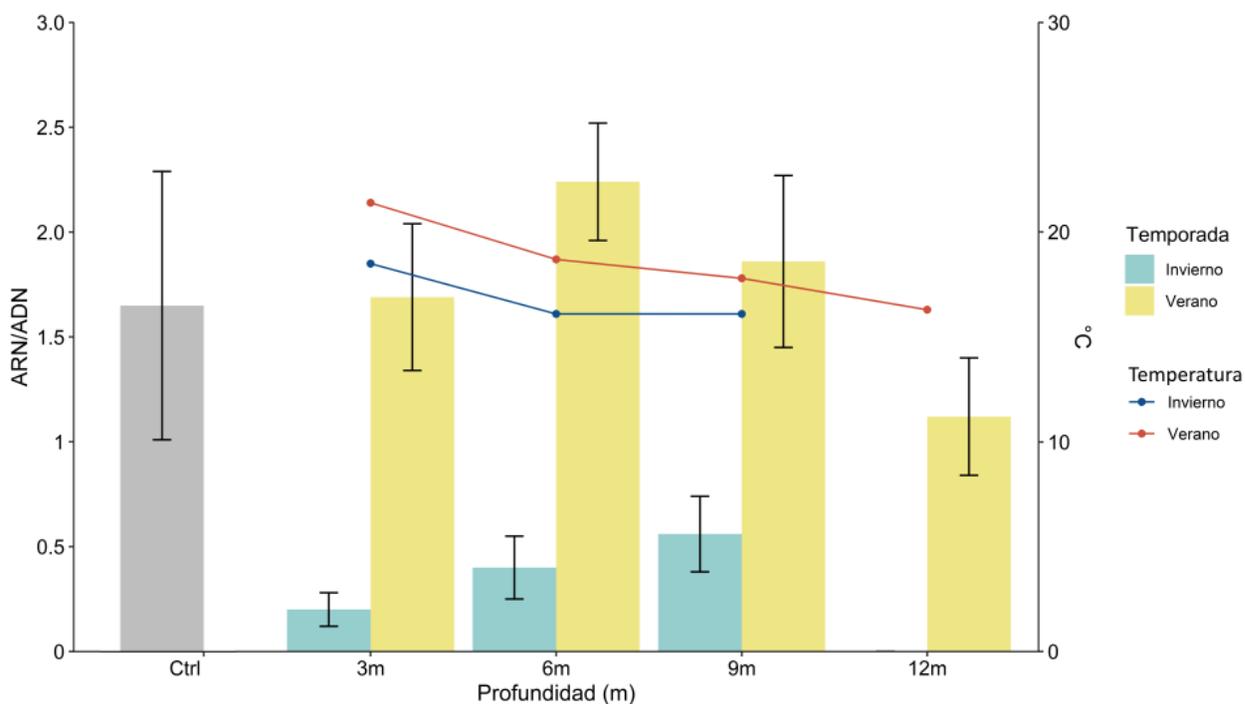


Figura 3. Relación ARN/ADN promedio (\pm EE) de *Balanophyllia elegans*, en las diferentes profundidades de muestreo (3, 6, 9 y 12 m) durante verano e invierno. El eje de la derecha corresponde a la temperatura ($^{\circ}$ C) para cada profundidad.

3.2 Expresión relativa *Hsp70*

De acuerdo con los resultados obtenidos, en ambas formas de procesar los datos, se observó que existe un incremento de la expresión de *Hsp70* durante el verano (Figura 4, Figura 6). Con respecto a la comparación entre profundidades, los resultados indicaron que para el invierno el valor máximo de expresión se encontró a los 9m de profundidad, mientras que para la temporada de verano el valor máximo de expresión se encontró a los 6m (Figura 5).

Aunque se observa que durante la temporada de verano se presentó una mayor expresión de *Hsp70* con respecto a la temporada de invierno y los organismos control (Tabla 3, Figura 6); por medio de la prueba estadística ANOVA (de una vía) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre temporadas de muestreo ($gl=2$ $F=2.8$, $p=0.07$) ni entre profundidades ($gl=2$ $F=4.7$, $p=0.06$).

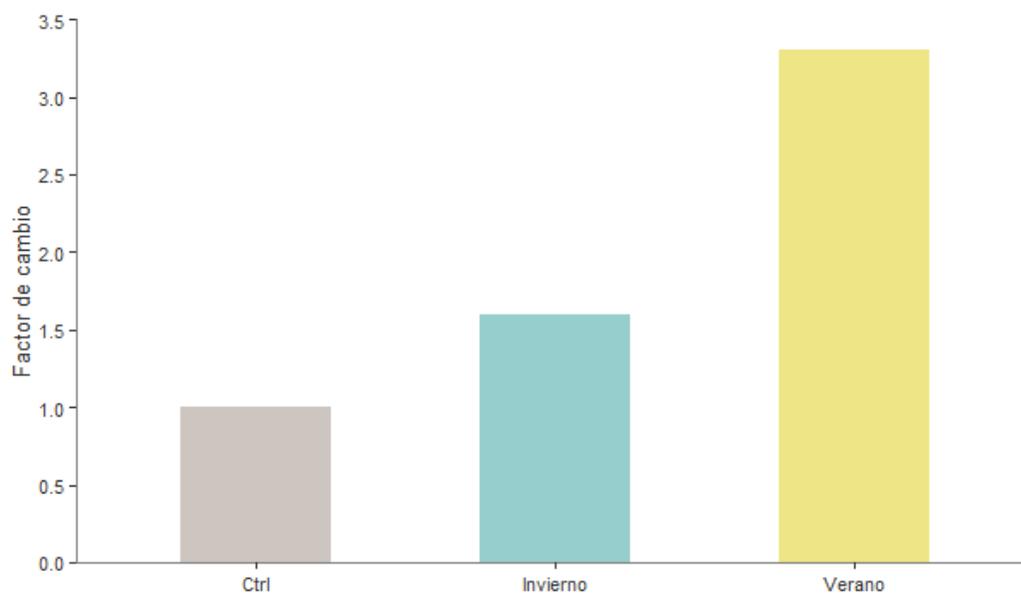


Figura 4. Factor de cambio obtenida en *Balanophyllia elegans* de los organismos control (Ctrl) y de los organismos recolectados durante las temporadas verano e invierno.

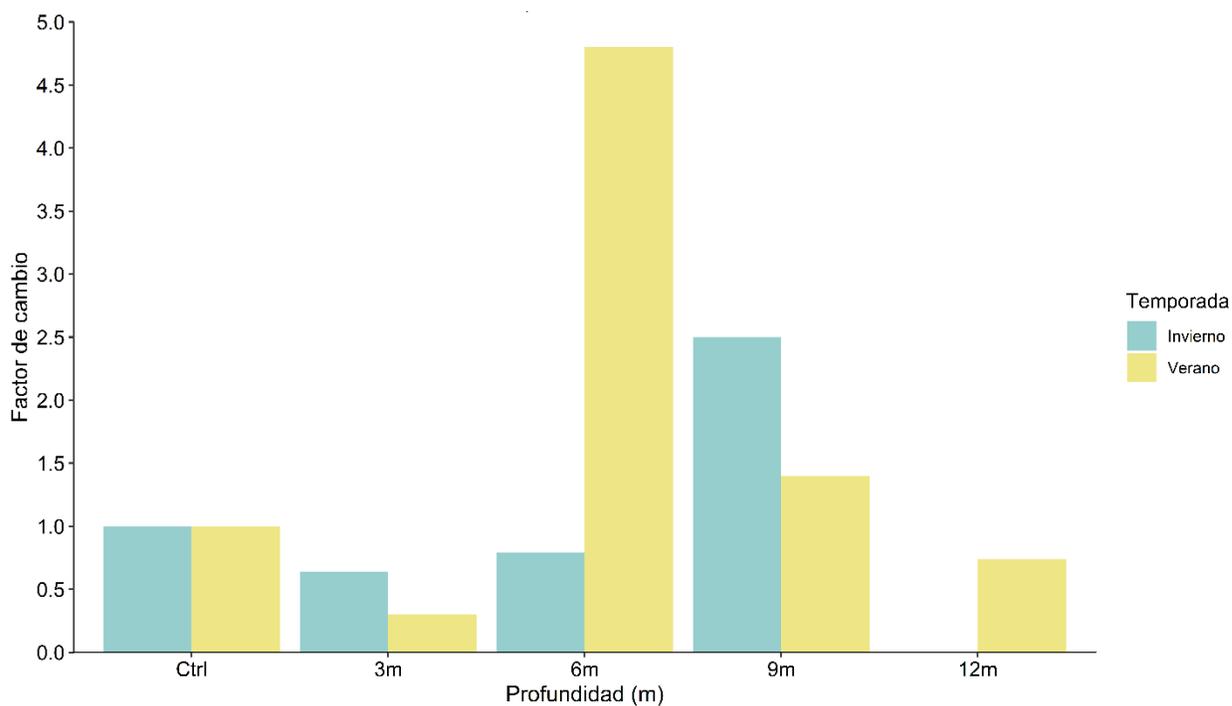


Figura 5. Factor de cambio en *Balanophyllia elegans* de los organismos control (Ctrl) y los organismos recolectado en las diferentes profundidades de muestreo (3, 6, 9 y 12 m) durante verano e invierno.

Tabla 3. Valores promedio de expresión relativa (\pm DE) obtenidos a partir del método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001) de las temporadas de invierno (n=5), verano (n=6) y los organismos control (n=4).

Profundidad	Expresión relativa		
	Invierno	Verano	Control
3m	1.04 \pm 0.87	0.94 \pm 1.44	0.53 \pm 0.13
6m	0.71 \pm 0.52	9.61 \pm 7.67	0.59 \pm 0.28
9m	2.84 \pm 2.57	9.92 \pm 3.36	
12m		0.75 \pm 0.72	

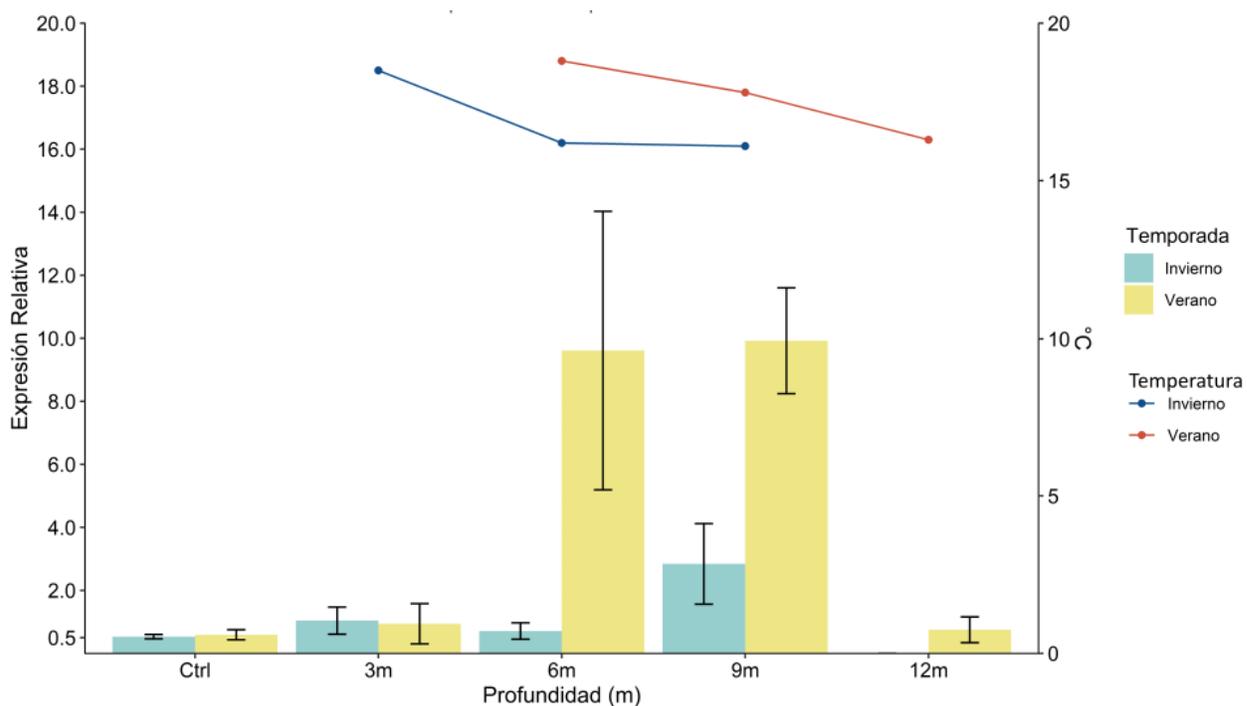


Figura 6. Expresión relativa promedio (\pm EE) en *Balanophyllia elegans* de la muestra control (Ctrl) y en las diferentes profundidades de muestreo 3, 6, 9 y 12 m durante verano e invierno. El eje de la derecha representa la temperatura ($^{\circ}$ C) para cada profundidad.

Capítulo 4. Discusión

Caracterizar la condición fisiológica de *B. elegans* en su entorno natural nos ayudará a comprender el impacto que las variaciones ambientales tienen sobre sus poblaciones. En este estudio, la manera de caracterizar la condición fisiológica se realizó a través del uso de bioindicadores, componentes bioquímicos clave en las rutas metabólicas asociadas con el estrés fisiológico (Dahlhoff, 2004), por medio de métodos como la relación ARN/ADN y la cuantificación de la expresión de genes, en este caso *Hsp70*. Ambos métodos, aplicados adecuadamente, han sido utilizados con éxito en diversos estudios ecológicos, a partir de los cuales, se ha determinado la influencia relativa de factores bióticos y abióticos en la distribución, abundancia e interacción de las especies marinas (Dahlhoff, 2004).

Aunque existen diversos factores de variación ambiental que pueden generar modificaciones en los niveles de concentración del ARN y, por lo tanto, de los resultados obtenidos por medio de los métodos antes mencionados, en este trabajo solo tomamos en cuenta el posible efecto de la variación de la temperatura del agua con respecto a la profundidad y a la temporada de muestreo en el coral *B. elegans*.

4.1 índice ARN/ADN

Los resultados obtenidos a partir de la relación ARN/ADN para caracterizar la actividad metabólica de *B. elegans* en su entorno natural, sugieren que los corales presentan variaciones temporales de la actividad metabólica, siendo mayor durante el verano (ARN/ADN= 1.12 a 2.24) y en los organismos control (Ctrl) en comparación con la temporada de invierno (ARN/ADN= 0.20 a 0.56).

De acuerdo a lo reportado por Chícharo y Chícharo (2008) este aumento en la actividad metabólica puede indicar la presencia de condiciones ambientales favorables durante el verano que mantienen activo y estable el metabolismo de *B. elegans*. Ladah y Zertuche (2004) reportaron que el área de estudio durante las temporadas de primavera y verano es altamente productiva debido a la presencia de surgencias intensas, este fenómeno podría favorecer el metabolismo de *B. elegans* debido a que su forma de alimentación es completamente heterótrofa por lo que depende de la abundancia de zooplancton o moléculas orgánicas disueltas para adquirir nutrientes y energía (Crook *et al.*, 2013).

Asociado a un estado metabólico activo, procesos como el crecimiento, desarrollo y la reproducción también se ven favorecidos. Para *B. elegans* se ha reportado presenta una reproducción de tipo gonocórica, es decir que presenta sexos separados; en los machos la maduración de los gametos ocurre aproximadamente a partir de la mitad de la temporada de verano y la liberación de los espermias ocurre durante el otoño. Mientras que en las hembras se presentan ovocitos maduros todo el año, la fertilización es interna y la liberación de las plánulas se lleva a cabo durante el otoño hasta principios de invierno (Fadlallah y Pearse, 1982). Los procesos reproductivos antes mencionados podrían causar incremento en la actividad metabólica de *B. elegans* durante el verano y por lo tanto originar variaciones en la concentración de ARN en las células.

Por otro lado, si asociamos los resultados obtenidos de la relación ARN/ADN con la variación de la temperatura, se observó que, existe un incremento de la actividad metabólica en *B. elegans* durante la temporada en la cual se registraron temperaturas elevadas. La temperatura registrada a lo largo del perfil de profundidad durante el verano es ~ 2 a 3°C mayor en comparación con el invierno. Este resultado presenta un comportamiento inverso al reportado por Buckley y Szmant (2004) y Hinrichs *et al.* (2013) en *Orbicella annularis*, *Acropora digitifera* y *Acropora spicifera*; en estas especies de coral el aumento de la temperatura del agua provoca un efecto negativo en la asociación simbiótica entre el coral y las zooxantelas lo que influye en la disminución de la energía aportada por el proceso de fotosíntesis al metabolismo del coral. Sin embargo, *B. elegans* al ser un coral azooxantelado, suponemos su energía no se ve comprometida durante las primeras etapas de estrés térmico, por lo tanto, es capaz de activar una respuesta para contrarrestar los efectos del originados por estrés térmico, lo cual se ve reflejado en el aumento de la concentración de ARN y por lo tanto de los valores de la relación ARN/ADN.

De acuerdo a lo anterior, durante el verano, el aumento de la actividad metabólica en *B. elegans* podría ser ocasionada por la activación de la respuesta celular al estrés térmico, en la cual se sintetizan las HSP necesarias para evitar y reparar el daño celular; dicho proceso contribuye a la modificación de la concentración de ARN en los organismos, debido a que el ARNm que codifica dichas proteínas, se produce típicamente en cantidades elevadas después de la exposición al estrés (Mayfield, 2012). Este aumento de la actividad metabólica en temperaturas elevadas concuerda con lo reportado por Harithsa *et al.* (2005) en colonias de *Porites lutea* y *Acropora Formosa* parcialmente blanqueadas, en las cuales se observaron valores altos de la relación ARN/ADN en comparación con colonias sanas, concluyendo que el incremento del ARN en los tejidos es reflejo de la síntesis de proteínas de estrés.

Respecto a los bajos valores de la relación ARN/ADN obtenidos en invierno, este resultado puede ser efecto de la reducción de las tasas de algunos procesos metabólicos debido a la disminución de la temperatura para esta temporada (Hinrichs *et al.*, 2013).

A lo largo del perfil de profundidad evaluado (3 a 12m), los valores de la relación ARN/ADN en *B. elegans* no presentan una clara asociación con la disminución de la temperatura en las capas de agua más profundas. Para otros corales escleractinios se ha reportado una correlación negativa de la relación ARN/ADN con la profundidad, por ejemplo en *Porites astreoides* se registró una relación ARN/ADN mayor a 4.0 en los organismos recolectados a 3 m de profundidad, mientras que los corales recolectados entre los 10 y 20 m el valor de la relación ARN/ADN fue menor a 4.0 (Buckley y Szmant, 2004). De manera similar, Bak y Meesters (2000) y Meesters *et al.* (2002) observaron que en corales habitando en un gradiente de profundidad de 0 a 20m, se observaron valores de la relación ARN/ADN > 0.60 a profundidades mayores y de ARN/ADN \geq 1.00 a menor profundidad.

En los estudios anteriores (Buckley y Szmant, 2004; Bak y Meesters, 2000 y Meesters *et al.* 2002), los resultados obtenidos fueron asociados a la disminución de la incidencia de la luz en las capas más profundas de agua, lo que ejerce un efecto negativo en el metabolismo de los corales al afectar el proceso de fotosíntesis de *Symbiodinium*. Sin embargo, en corales azooxantelados como *B. elegans*, la intensidad lumínica puede no ser tan importante, ya que su forma de alimentación es heterótrofa, por lo que, de existir una variación de la actividad metabólica con respecto a la profundidad, ésta podría estar determinada por otros factores, por ejemplo, la variación de la disponibilidad de alimento y nutrientes, variaciones en el pH, salinidad y oxígeno disuelto.

La ausencia de diferencias significativas entre los valores de la relación ARN/ADN han sido asociados a fenómenos de aclimatación y adaptación a las condiciones ambientales. La tolerancia adquirida en los corales a las condiciones constantemente variables permitió que no existiera un efecto negativo en su actividad metabólica, como fue reportado por Meester *et al.* (2002) en colonias del género *Porites* habitando en sitios que presentaban periodos constantes de alta turbidez.

Desafortunadamente, hasta ahora no existen estudios en los cuales se evaluó la relación ARN/ADN en corales azooxantelados con los cuales hacer comparaciones. Pero los resultados obtenidos para *B. elegans* sugieren que, dentro del rango de profundidad evaluado, las características ambientales, en este caso la variación observada de la temperatura no es suficiente para ocasionar algún efecto significativo en la

actividad metabólica de *B. elegans*; o de manera similar a los corales del género *Porites* se esté observando corales tolerantes a la variación de la temperatura a lo largo del perfil de profundidad evaluado.

Finalmente, aunque se ha demostrado que los valores de la relación ARN/ADN muestran de manera cuantitativa la condición metabólica de los organismos, hay que tener cuidado al interpretar los resultados obtenidos, ya que existen múltiples fuentes de variación que se deben tomar en cuenta al momento de analizar los resultados obtenidos entre especies y condiciones ambientales, principalmente durante la recolección de los organismos, la obtención y almacenamiento del ARN, y los procesos ontogénicos de los organismos en los que se evalúa (Esteves *et al.*, 2000; Foley *et al.*, 2016)

4.2 Expresión relativa de *Hsp70*

Los resultados obtenidos a partir de la cuantificación relativa de *Hsp70* en *B. elegans* sugieren que durante la temporada de verano se presentó un posible efecto sobre el incremento de su expresión, en comparación con la expresión del gen en los organismos control y durante el invierno. Respecto a la variación observada en el perfil de profundidad, se observó una mayor expresión de *Hsp70* a los seis y nueve metros de profundidad y no a los tres metros como se esperaba. A partir de estos resultados, es difícil asegurar que se presenta una variación real en *B. elegans* debido a que no se obtuvieron diferencias significativas entre temporadas ni entre profundidades.

Se ha observado que aumentos graduales de la temperatura superficial del agua provocan alteraciones significativas en el rendimiento metabólico de varios invertebrados marinos, específicamente para corales, sólo es necesario el incremento de un grado centígrado por encima de la media máxima de verano para someter a los organismos a un evento de estrés térmico (Leggat *et al.*, 2011; Kühnhold *et al.*, 2019). Dado lo anterior, es posible que durante el verano *B. elegans* experimente estrés térmico, ya que, en esta temporada se registró un aumento de temperatura de ~2 a 3°C con respecto a las temperaturas registradas durante el invierno (Figura 6).

En otros corales azooxantelados, también se ha observado la expresión de *Hsp70* asociado a un incremento de la temperatura, por ejemplo, Franzellitti *et al.* (2018) reportaron que, en condiciones naturales (*in situ*) los corales *Astroides calycularis*, *Caryophyllia inornata*, y *Leptopsammia pruvoti* (azooxantelados solitarios y coloniales) presentaron la expresión de *Hsp70*. Y que, después de someter a

estos organismos a periodos de estrés térmico, observaron que las especies *C. inornata* y *A. calycularis* mostraban una alta expresión de *Hsp70* durante las cero y dos horas de ser sometidos al estrés térmico y aun después del periodo de recuperación (24 h), presentando valores de expresión absoluta de 2.5 a 3 y 3 a 3.5 veces más expresión, respectivamente, en comparación con los organismos control aclimatados en condiciones de laboratorio; mientras que para *L. pruvoti* se observó un ligero incremento en la expresión a las 2h de exposición al estrés de alrededor 1 a 1.5 más expresión con respecto al control.

Franzellitti *et al.*, (2018) también contrastaron la expresión de los corales azooxantelados con la expresión de corales zooxantelados, *Cladocora caespitosa* y *Balanophyllia elegans*, los cuales mostraron una expresión de *Hsp70 in situ* más alta que los azooxantelaos, sugiriendo que la simbiosis con *Symbiodinium* posiblemente hace más susceptibles a los corales a los efectos del estrés térmico en ambas condiciones, *in situ* y de laboratorio.

La expresión de *Hsp70* ante el estrés térmico, es considerada como una respuesta inmediata (Parsell y Lindquist, 1993) que incluso presenta patrones diarios de variación como mecanismo de protección al estrés celular producido por los incrementos de luz y temperatura a lo largo del día (Seveso *et al.*, 2018). Entonces, es posible que el incremento de la expresión de *Hsp70* observada en *B. elegans* corresponda simplemente a la variación diaria de la temperatura, como lo reportado por Seveso *et al.*, (2018) en *Echinopora lamellosa*, *Acropora tenuis* y *Porites lobata*. Debemos considerar que las mediciones de temperatura *in situ* registradas en este estudio corresponden al momento en el que los corales fueron recolectados en campo, no tenemos un registro de la variación de temperatura en ambas temporadas de muestreo ni de la variación a lo largo del día; por lo que carecemos de información para concluir que realmente durante toda la temporada de verano *B. elegans* experimenta estrés térmico.

Con respecto al perfil de profundidad evaluado, la expresión de *Hsp70* en *B. elegans* no muestra una clara asociación con la variación de la temperatura entre las capas superficiales y profundas de agua. Los valores de expresión más altos se observaron a los seis y nueve metros de profundidad y no a los tres metros como se esperaba.

Los niveles bajos de expresión pueden ser resultado del efecto del periodo de exposición al estrés térmico. De acuerdo con Theodorakis *et al.* (1999) en los organismos que están sometidos continuamente a condiciones estresantes, la vida media del ARNm disminuye y se degrada con mayor facilidad. Aunque se ha demostrado que el ARNm de *Hsp70* es más estable en condiciones estresantes como estrategia para mantener una mayor concentración de proteínas traducidas (Mayfield *et al.*, 2011), el aumento en la

degradación de ARNm de *Hsp70* también contribuye a limitar la expresión de este gen para evitar el posible efecto citotóxico por la elevada concentración de estas proteínas (Theodorakis *et al.*, 1999). De acuerdo con lo anterior, es posible que, en las poblaciones de *B. elegans* a los tres metros de profundidad se encuentren bajo constante condiciones de estrés térmico y la expresión de *Hsp70* disminuya después de un prolongado tiempo de exposición por la degradación del ARNm.

Por otro lado, la baja expresión de *Hsp70* también podría ser resultado de la aclimatación de los corales a condiciones constantes de estrés térmico, es decir, ampliaron su rango de tolerancia. Poli *et al.* (2017) reportaron que, aunque la expresión de *Hsp70* en *Pocillopora verrucosa* es mayor en los corales recolectados a los 3 m en comparación con los corales de 12 m, al someter a los corales a estrés térmico observaron que los corales recolectados a 3 m mostraron perfiles de expresión sin cambios o con regulación negativa (≥ 1 más expresión), mientras que los corales que se recolectaron a los 12m mostraron sobreexpresiones (2 a 2.5 veces más expresión) aproximadamente a partir del tercer día de exposición.

De acuerdo con lo anterior, la población de *B. elegans* que habita a los tres metros de profundidad muestra una potencial plasticidad fenotípica con respecto a los cambios de temperatura. Poli *et al.*, (2017) sugieren que, en los entornos con constantes variaciones de los parámetros ambientales, dentro de los límites de las ventanas de tolerancia fisiológica de las especies, el aumento en la constancia con la que se emplea una respuesta de estrés en los organismos proporciona una mayor resistencia a las especies ante factores ambientales estresantes más agudos.

Es posible que en el sitio de muestreo a los tres metros de profundidad, los corales estén expuestos a constantes fluctuaciones de temperatura ocasionadas por el cambio de la incidencia lumínica o cambios de marea que inducen un proceso de aclimatación o adaptación al estrés térmico (Palumbi, 2011). Mientras que los corales que se encuentran en el rango de seis a nueve metros de profundidad son sensibles al aumento de la temperatura durante el verano desencadenando una mayor expresión de *Hsp70*.

Diferentes respuestas tanto fisiológica como transcriptómica entre poblaciones *B. elegans* ante una condición de estrés también ha sido observada por Griffiths *et al.*, (2019), quienes reportan que en condiciones experimentales de pH bajo, los corales que habitaban un sitio con pocos eventos de surgencia mostraron cambios fisiológicos y mayor cantidad de genes expresados mientras que los corales que habitaban en sitios con frecuentes eventos de surgencia no mostraron cambios fisiológicos y la cantidad

de genes expresado fue menor. Sugiriendo que estas poblaciones pueden no ser igualmente tolerantes a condiciones de bajo pH.

La poca o nula expresión de *Hsp70* como resultado de procesos de aclimatación y adaptación, se ha observado en corales como *Acropora hyacinthus* (Barshis *et al.*, 2013) y *Pocillopora damicornis* (Brener-Raffalli *et al.*, 2018), en los cuales se observó que en las poblaciones provenientes de hábitats con variaciones constantes de temperatura los genes de *Hsp70* exhibían una expresión reducida después de someter a los corales a estrés térmico, concluyendo que posiblemente los corales presentaban altos niveles basales de *Hsp70* en sus células.

La elevada concentración basal de *Hsp70* en las células, es producto de un alto nivel de expresión constitutiva, es decir, que presenta niveles de expresión constante en todas las células como mecanismo primario de tolerancia térmica a altas temperaturas. La expresión constitutiva de ARNm es un mecanismo de defensa común en organismos intermareales que habitan zonas que presentan condiciones de estrés térmico constante. Este mecanismo les permite traducir rápidamente grandes cantidades de las proteínas necesarias en respuesta a los rápidos y constantes cambios de temperatura (Mayfield *et al.*, 2011; Clark *et al.*, 2018). Por lo tanto, las especies más tolerantes al aumento de la temperatura tienen niveles constitutivos más altos de *Hsp70*, característica que les permite estar mejor preparadas para enfrentar eventos de estrés térmico agudos (Tomanek, 2014).

En este estudio, al comparar los resultados obtenidos de la cuantificación relativa de la expresión de *Hsp70* para *B. elegans* con los obtenidos a través de la relación ARN/ADN, se observó que ambos presentan un comportamiento similar, se presenta poca expresión/actividad metabólica a los tres metros e incrementan conforme la profundidad aumenta alcanzando valores máximos a los seis y nueve metros de profundidad; siendo durante el verano donde se observa una mayor actividad metabólica y expresión de *Hsp70* en comparación al invierno. Sin embargo, no podemos atribuirle dichas variaciones únicamente a la temperatura, pues aunque comúnmente la expresión de *Hsp70* se ha asociado como primera respuesta para evitar daño celular por estrés térmico (Kregel 2002), hay que considerar que la expresión de este gen puede ser desencadenada por otros factores de estrés, como por ejemplo, las variaciones en el pH, salinidad, condiciones de anoxia, radiación UV, altas concentraciones de metales pesados, toxinas y otros contaminantes (Dahlhoff, 2004).

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, es aconsejable que en próximos estudios *in situ* se lleve a cabo el monitoreo de las variaciones tanto temporal como diaria de la temperatura del agua,

además de considerar otros parámetros ambientales, con la finalidad de poder caracterizar las condiciones ambientales en las que *B. elegans* habita y poder identificar posibles factores de variación que ocasionen el aumento o reducción de la actividad metabólica, así como en la activación de respuestas al estrés.

Además, sería importante considerar realizar experimentos de estrés térmico con la finalidad de definir los límites de tolerancia térmica de las poblaciones *B. elegans* que habitan a lo largo del perfil de profundidad evaluado. Ya que la temperatura a la cual los organismos comienzan a presentar una respuesta celular ante el estrés varía con respecto a cada organismo y a las características espaciales y temporales del sitio en el que habita el organismo o población (Parssel y Lindquist, 1993; Halpin *et al.*, 2002).

También, considerando que la expresión de *Hsp70* es una de las primeras respuestas ante el estrés térmico y que, en periodos prolongados de exposición al estrés la concentración tanto de los genes como de las proteínas *Hsp70* en los organismos disminuye y comienzan a aparecer severos daños en procesos y estructuras celulares (Poli *et al.* 2017). Sería recomendable evaluar los patrones de expresión de otros genes cuya expresión se vea afectada por efecto de estrés térmico, lo cual nos permitirá tener una mayor evidencia que respalden que los corales efectivamente se encuentren en condiciones de estrés térmico durante el periodo de muestreo.

Se ha observado en otros corales escleractinios que genes relacionados con la producción de proteínas de shock térmico como *Hsp90*, *Hsp60*, *Hsp16* también muestran un aumento en su expresión durante eventos de estrés térmico. Genes relacionados a procesos metabólicos como aquellos involucrados en la calcificación como transportadores de calcio y bicarbonatos (*Cacna1s*, *SLC26*), a la regulación en la transducción de la señal de calcio en la célula (*Calmodulina CaM*) muestran una regulación negativa después de un evento de estrés térmico y un aumento en la expresión de genes de estrés oxidativo como superóxido dismutasa (*SoD*, *MnSoD*) o glutatión peroxidasa (*Gpx1*) (Louis *et al.*, 2017).

Finalmente, el trabajo de investigación realizado en esta tesis forma parte de las primeras aproximaciones del estado fisiológico de *B. elegans* en condiciones naturales las cuales aportan nueva información en el campo de estudio de los corales azooxantelados del Pacífico mexicano. La información obtenida, nos permite establecer un punto de partida para definir si el gen *Hsp70* funciona como un marcador molecular de estrés ambiental o plasticidad fisiológica en este coral y en corales con características similares. Lo cual contribuye a formular nuevas preguntas de investigación y predicciones de las respuestas fisiológicas de los corales azooxantelados ante escenarios de cambio climático.

Capítulo 5. Conclusiones

Relación ARN/ADN

Existe una variación temporal de la actividad metabólica en *B. elegans*. Durante el verano se observa una actividad metabólica significativamente mayor a la observada en la temporada de invierno. Este aumento de la actividad metabólica observado puede estar asociado con el incremento de la temperatura del agua durante el verano, indicando que los corales posiblemente estén generando una respuesta contra el estrés térmico.

Aunque es posible asociar una mayor actividad metabólica con el incremento de la temperatura, debemos de considerar la posibilidad de que, durante el verano se presentan condiciones ambientales que favorezcan procesos metabólicos como la reproducción, el crecimiento y el desarrollo en los corales.

La profundidad no resultó ser un factor determinante que ocasione cambios en la relación ARN/ADN ya que, en ambas temporadas, no se observa una variación evidente o un patrón definido de los valores obtenidos a lo largo del perfil de profundidad.

Expresión de Hsp70

Aparentemente, la expresión de *Hsp70* en *B. elegans* es mayor durante el verano lo cual respalda los resultados obtenidos a partir de la relación ARN/ADN. Durante el verano los corales podrían estar experimentando estrés térmico.

Con respecto a la profundidad, la mayor expresión de *Hsp70* en *B. elegans* se observó en profundidades mayores y no a los 3m como se esperaba. Es posible que los corales que habitan en los tres metros de profundidad presenten un rango tolerancia más amplio por encontrarse en una zona que presenta constantes fluctuaciones de temperatura, mientras que, los corales a mayor profundidad (6 y 9m) son más sensibles a la variación de temperatura por encontrarse en una zona más homogénea en cuanto a las variaciones de temperatura.

Literatura citada

- Arya, M., Shergill, I., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., Patel, H. 2005. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 5(2), 209–219.
- Bak, R., Meesters, E. 2002. Acclimatization/adaptation of coral reefs in a marginal environment. En: *Proceedings 9th International Coral Reef Symposium*, Bali, Indonesia, 23-27.
- Barshis, D., Ladner, J., Oliver, T., Seneca, F., Traylor-Knowles, N., Palumbi, S. 2013. Genomic basis for coral resilience to climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(4), 1387–1392.
- Beas-Lunaa R. y Ladah L. 2014. Latitudinal, seasonal, and small-scale spatial differences of the giant kelp, *Macrocystis pyrifera*, and an herbivore at their southern range limit in the northern hemisphere. *Botanica Marina* 2014; 57(2): 73–83.
- Bellantuono, A., Granados-Cifuentes, C., Miller, D., Hoegh-Guldberg, O., Rodriguez-Lanetty, M. 2012. Coral Thermal Tolerance: Tuning Gene Expression to Resist Thermal Stress. *PLoS ONE*, 7(11), 1–14.
- Bollmann M., Bosch T., Colijn F., Ebinghaus R., Froese R., Güssow K, Khalilian S., Krastel S., Körtzinger A., Langenbuch M. , Latif M. , Matthiessen B., Melzner F., Oschlies A., Petersen S. , Proelß A. , Quaas M. , Reichenbach J. , Requate T. , Reusch T. , Rosenstiel P. , Schmidt J. , Schrottke K. , Sichelschmidt H. , Siebert U. , Soltwedel R. , Sommer U. , Stattegger K. , Sterr H. , Sturm R. ,Treude T., Vafeidis A. , Van Bernem C. , Van Beusekom J. , Voss R. , Visbeck M. , Wahl M. , Wallmann K. y Weinberger F. 2010. Capítulo 5: Climate change impacts on marine ecosystems. En: Schröder T. (Eds.), *World Ocean Review. Living with the oceans*. Maribus: Hamburg. (pp. 102-117).
- Brener-Raffalli, K., Vidal-Dupirol, J., Adjeroud, M., Rey, O., Romans, P., Bonhomme, F., Pratlong, M., Haguenaer, A., Pillot, R., Feuillassier, L., Claereboudt, M., Magalon, H., Gelin, P., Pontarotti, P., Aurelle, D., Mitta, G., Toulza, E. 2018. Gene expression plasticity and frontloading promote thermotolerance in Pocilloporid corals. *bioRxiv*. doi:10.1101/398602
- Bromage, E., Carpenter, L., Kaattari, S., Patterson, M. 2009. Quantification of coral heat shock proteins from individual coral polyps. *Marine Ecology Progress Series*, 376, 123–132.
- Bruno, J., Witman, J. 1996. Defense mechanisms of scleractinian cup corals against overgrowth by colonial invertebrates. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 207(1-2), 229–241.
- Buckley, B., Szmant, A. 2004. RNA/DNA ratios as indicators of metabolic activity in four species of Caribbean reef-building corals. *Marine Ecology Progress Series*, 282, 143–149.
- Carpenter, L., Patterson, M., Bromage, E. 2010. Water flow influences the spatiotemporal distribution of heat shock protein 70 within colonies of the scleractinian coral *Montastrea annularis* (Ellis and

- Solander, 1786) following heat stress: Implications for coral bleaching. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 387(1–2), 52–59.
- Chícharo, M., Chícharo, L. 2008. RNA:DNA ratio and other nucleic acid derived indices in marine ecology. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(8), 1453–1471.
- Clark, M., Peck, L. 2009. HSP70 heat shock proteins and environmental stress in Antarctic marine organisms: A mini-review. *Marine Genomics*, 2(1), 11–18.
- Clark, M., Thorne, M., King, M., Hipperson, H., Hoffman, J., Peck, L. 2018. Life in the intertidal: Cellular responses, methylation and epigenetics. *Functional Ecology*, 32(8), 1982–1994.
- Crook, E., Cooper, H., Potts, D., Lambert, T., Paytan, A. 2013. Impacts of food availability and pCO₂ on planulation, juvenile survival, and calcification of the azooxanthellate scleractinian coral *Balanophyllia elegans*. *Biogeosciences*, 10(11), 7599–7608.
- Császár, N., Seneca, F., Van Oppen, M. 2009. Variation in antioxidant gene expression in the scleractinian coral *Acropora millepora* under laboratory thermal stress. *Marine Ecology Progress Series*, 392, 93–102.
- Cziesielski, M., Schmidt-Roach, S., Aranda, M. 2019. The past, present, and future of coral heat stress studies. *Ecology and Evolution*, 9(17), 10055–10066.
- Dahlhoff, E. 2004. Biochemical Indicators of Stress and Metabolism: Applications for Marine Ecological Studies. *Annual Review of Physiology*, 66(1), 183–207.
- Desalvo, M., Voolstra, C., Sunagawa, S., Schwarz, J., Stillman, J., Coffroth, M., Szmant, A., Medina, M. 2008. Differential gene expression during thermal stress and bleaching in the Caribbean coral *Montastraea faveolata*. *Molecular Ecology*, 17(17), 3952–3971.
- Esteves, E., Chícharo, M., Pina, T., Coelho, M., Andrade, J. 2000. Comparison of RNA/DNA ratios obtained with two methods for nucleic acid quantification in gobiid larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 245(1), 43–55. doi:10.1016/S0022-0981(99)00150-1
- Espinosa-Carreón T., Gaxiola C., Robles P., Nájera M. 2001. Temperatura, salinidad, nutrientes y clorofila α en aguas costeras de la ensenada del sur de California *Ciencias Marinas*, 3(27): 397-422.
- Evans, T., Hofmann, G. E. 2012. Defining the limits of physiological plasticity: How gene expression can assess and predict the consequences of ocean change. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1596), 1733–1745.
- Fadlallah, Y., Pearse, J. 1982. Sexual reproduction in solitary corals: Overlapping oogenic and brooding cycles, and benthic planulas in *Balanophyllia elegans*. *Marine Biology*, 71(3), 223–231.
- Feder, M., Hofmann, G. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and Ecological Physiology. *Annual Review of Physiology*, 61(1), 243–282.

- Foley, C., Bradley, D., Höök, T. 2016. A review and assessment of the potential use of RNA:DNA ratios to assess the condition of entrained fish larvae. *Ecological Indicators*, 60, 346–357.
- Franzellitti, S., Airi, V., Calbucci, D., Caroselli, E., Prada, F., Voolstra, C. R., Mass, T., Falini, G., Fabbri, E., Goffredo, S. 2018. Transcriptional response of the heat shock gene *hsp70* aligns with differences in stress susceptibility of shallow-water corals from the Mediterranean Sea. *Marine Environmental Research*, 140, 444–454.
- Gates, R., Eomund, P. 1999. The physiological mechanisms of acclimatization in tropical reef corals. *American Zoologist*, 39(1), 30–43. doi:10.1093/icb/39.1.30
- Granados-Cifuentes, C., Bellantuono, A., Ridgway, T., Hoegh-Guldberg, O., Rodriguez-Lanetty, M. 2013. High natural gene expression variation in the reef-building coral *Acropora millepora*: Potential for acclimative and adaptive plasticity. *BMC Genomics*, 14(1). doi:10.1186/1471-2164-14-228.
- Griffiths, J., Pan, T., Kelly, M. 2019. Differential responses to ocean acidification between populations of *Balanophyllia elegans* corals from high and low upwelling environments. *Molecular Ecology*, 28(11), 2715–2730. doi:10.1111/mec.15050
- Harithsa, S., Raghukumar, C., Dalal, S. G. 2005. Stress response of two coral species in the Kavaratti atoll of the Lakshadweep Archipelago, India. *Coral Reefs*, 24(3), 463–474.
- Halpin, P., Sorte C., Hofmann, G., Menge, B. (2002). Patterns of Variation in Levels of Hsp70 in Natural Rocky Shore Populations from Microscales to Mesoscales. *Integrative and Comparative Biology*, 42(4), 815–824.
- Hauri, C., Fabricius, K., Schaffelke, B., Humphrey, C. 2010. Chemical and physical environmental conditions underneath mat- and canopy-forming macroalgae, and their effects on understory corals. *PLoS ONE*, 5(9), 1–9.
- Hellberg M. 1994. Relationships between inferred levels of gene Flow and geographic distance in a philopatric coral, *Balanophyllia elegans*. *Evolution* 48(6), 1829–1854.
- Hinrichs, S., Patten, N. L., Feng, M., Strickland, D., Waite, A. M. 2013. Which Environmental Factors Predict Seasonal Variation in the Coral Health of *Acropora digitifera* and *Acropora spicifera* at Ningaloo Reef. *PLOS ONE*, 8(4).
- Hoegh-Guldberg, O., Bruno, J. 2010. The impact of climate change on the world's marine ecosystems. *Science*, 328(5985), 1523–1528.
- Hofmann, G. 2005. Patterns of Hsp gene expression in ectothermin marine organisms on small to large biogeographic scales. *Integrative and Compatitive Biology*. (45), 247–255.
- Hofmann, G. 2009. Ecologically Relevant Variation in Induction and Function of Heat Shock Proteins in Marine Organisms. *American Zoologist*. 39(6), 889–900.

- Hofmann G., Somero. 1995. Evidence for protein damage at environmental temperatures: seasonal changes in levels of ubiquitin conjugates and hsp70 in the intertidal mussel *Mytilus trossulus*. *The Journal of experimental biology*, 198(7), 1509–1518.
- Kenkel, C., Sheridan, C., Leal, M., Bhagooli, R., Castillo, K. D., Kurata, N., Mcginty, E., Goulet, T. L., Matz, M. 2014. Diagnostic gene expression biomarkers of coral thermal stress. *Molecular Ecology Resources*, 14(4), 667–678.
- Kenkel, C., Matz, M. 2016. Coral adaptation to a variable environment. *Nature*.1(3), 1–6.
- Kregel, K. 2002. Heat shock proteins: Modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *Journal of Applied Physiology* (92), 2177-2186.
- Kuang J., Yan X., Genders A., Granata C., Bishop D. (2018) An overview of technical considerations when using quantitative real-time PCR analysis of gene expression in human exercise research. *PLoS ONE* 13(5): e0196438. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196438>
- Kühnhold, H., Steinmann, N., Huang, Y., Indriana, L., Meyer, A., Kunzmann, A. 2019. Temperature-induced aerobic scope and Hsp70 expression in the sea cucumber *Holothuria scabra*. *PLOS ONE*, 14(3), 1–16.
- Kültz, D. 2003. Evolution of the cellular stress proteome: From monophyletic origin to ubiquitous function. *Journal of Experimental Biology*, 206(18), 3119–3124.
- Kültz, D. 2005. Molecular and Evolutionary Basis of the Cellular Stress Response. *Annual Review of Physiology*, 67(1), 225–257.
- Ladah, L., Zertuche González, J. (2004). Giant kelp (*Macrocystis pyrifera*) survival in deep water (25-40m) during El Niño of 1997-1998 in Baja California, Mexico. *Botánica Marina*, 47, 367-372.
- Leggat, W., Seneca, F., Wasmund, K., Ukani, L., Yellowlees, D., Ainsworth, T. D. 2011. Differential responses of the coral host and their algal symbiont to thermal stress. *PLOS ONE*, 6(10): e26687. doi:10.1371/journal.pone.0026687.
- Lindquist, S. 1986. The Heat-Shock Response. *Annual Reviews of Biochemistry*. (55), 1151- 1191.
- Livak, K., Schmittgen, T. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*. 25, 402-408.
- López-Maury, L., Marguerat, S., Bähler, J. 2009. Tuning gene expression to changing environments: From rapid responses to evolutionary adaptation. *Nature: Reviews Genetics*. 10(1), 583-59368.
- Lough, J. M., Anderson, K. D., Hughes, T. P. 2018. Increasing thermal stress for tropical coral reefs: 1871-2017. *Scientific Reports*, 8(1), 1–8. doi:10.1038/s41598-018-24530-9
- Louis, Y., Bhagooli R., Kenkel C., Baker A., Dyal S. 2017. Gene expression biomarkers of heat stress in scleractinian corals: Promises and limitations. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 191, 63-97.

- Maor-Landaw, K., Levy, O. 2016. Gene expression profiles during short-term heat stress; branching vs. massive Scleractinian corals of the Red Sea. *PeerJ*, 4, e1814. doi:10.7717/peerj.1814
- Mayfield, A., Wang, L., Tang, P., Fan, T., Hsiao, Y., Tsai, C., Chen, C. 2011. Assessing the impacts of experimentally elevated temperature on the biological composition and molecular chaperone gene expression of a reef coral. *PLoS ONE*, 6(10), e26529. doi:10.1371/journal.pone.0026529.
- Meesters, E. H., Nieuwland, G., Duineveld, G. C. A., Kok, A., Bak, R. P. M. 2002. RNA/DNA ratios of scleractinian corals suggest acclimatisation/adaptation in relation to light gradients and turbidity regimes. *Marine Ecology Progress Series*, 227. 233–239. doi:10.3354/meps227233
- Movilla, J., Calvo, E., Coma, R., Serrano, E., López-Sanz, À., Pelejero, C. 2016. Annual response of two Mediterranean azooxanthellate temperate corals to low-pH and high-temperature conditions. *Marine Biology*, 163(6), 1–14.
- Palumbi, O. 2011. Do fluctuating temperature environments elevate coral thermal tolerance?. *Coral Reefs*. 30(2). 429–440.
- Parsell, D., Lindquist S. 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annual Review of Genetics*, 27(1). 437-496.
- Pinzón, J., Kamel, B., Burge, C., Harvell, C., Medina, M., Weil, E., Mydlarz, L. D. 2015. Whole transcriptome analysis reveals changes in expression of immune-related genes during and after bleaching in a reef-building coral. *Royal Society Open Science*, 2(4). <http://dx.doi.org/10.1098/rsos.140214>
- Place, S., Zippay, M., Hofmann, E. 2004. Constitutive roles for inducible genes: Evidence for the alteration in expression of the inducible hsp70 gene in Antarctic notothenioid fishes. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 287(2). 429-436.
- Place, S., Donnell, M. J. O., Hofmann, G. E. 2008. Gene expression in the intertidal mussel *Mytilus californianus*: physiological response to environmental factors on a biogeographic scale. *Marine Ecology Progress*. 356, 1–14.
- Poli, D., Fabbri, E., Goffredo, S., Airi, V., Franzellitti, S. 2017. Physiological plasticity related to zonation affects hsp70 expression in the reef-building coral *Pocillopora verrucosa*. *PLoS ONE*. e0171456. doi:10.1371/journal.pone.0171456.
- Reyes-Bonilla H, Cruz-Piñón G. 2000. Biogeography of the ahermatypic corals (scleractinia) of the mexican pacific. *Ciencias Marinas*, 26(3): 511–531.
- Robbart, M. L., Peckol, P., Scordilis, S. P., Curran, H. A., Brown-Saracino, J. 2004. Population recovery and differential heat shock protein expression for the corals *Agaricia agaricites* and *A. tenuifolia* in Belize. *Marine Ecology Progress Series*, 283. 151–160.
- Rodriguez-Lanetty, M., Harii, S., Hoegh-Guldberg, O. 2009. Early molecular responses of coral larvae to hyperthermal stress. *Molecular Ecology*, 18(24), 5101–5114.

- Roth, C. 2002. Quantifying gene expression. *Current Issues in Molecular Biology*, 4(3), 93–100.
- Seveso, D., Montano, S., Maggioni, D., Pedretti, F., Orlandi, I., Galli, P., Vai, M. 2018. Diel modulation of Hsp70 and Hsp60 in corals living in a shallow reef. *Coral Reefs*, 37(3), 801–806.
- Sharp, A., Brown, E., Miller, D. 1997. Heat Shock Protein (HSP70) expression in the tropical reef coral *Goniopora djiboutiensis*. *Journal of Thermal Biology*. 22(1). 11-19.
- Somero, G. 2010. The physiology of climate change: how potential for acclimatization and genetic adaptation will determine “winners” and “loser”. *Journal of Experimental Biology*. (213), 912- 920.
- Sørensen, J., Loeschcke, V. 2007a. Studying stress responses in the post-genomic era: Its ecological and evolutionary role. *Journal of Biosciences*, 32(3), 447–456.
- Stanley, G., Cairns, S. 1988. Constructional Azooxanthellate Coral Communities: An Overview with Implication for the Fossil Record. *PALAIOS*. (203). 243-242.
- Tomanek, L. 2014. Proteomics to study adaptations in marine organisms to environmental stress. *Journal of Proteomics*, 105, 92–106.
- Theodorakis N., Drujan D., De Maio A. 1999. Thermotolerant cells show an attenuated expression of Hsp70 after heat shock. *The Journal of Biological Chemistry*. 472 (17), 12081-12086.
- Voolstra, C., Schnetzer, J., Peshkin, L., Randall, C., Szmant, A., Medina, M. 2009. Effects of temperature on gene expression in embryos of the coral *Montastraea faveolata*. *BMC Genomics*, 10, 1–9.
- Zehr, J. P., Hewson, I., Moisander, P. 2009. Molecular biology techniques and applications for ocean sensing. *Ocean Science*, 5(2), 101–113.
- Zhang, Y., Zhou, Z., Wang, L., Huang, B. 2018. Transcriptome, expression, and activity analyses reveal a vital heat shock protein 70 in the stress response of stony coral *Pocillopora damicornis*. *Cell Stress and Chaperones*, 23(4), 711–721.