



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PATAGONIA
SAN JUAN BOSCO

Facultad de Ciencias Naturales. Sede Puerto Madryn

Tesis para Optar por el Título de Dra. en Cs. Biológicas

Desarrollo neural en modelos embrionarios: El efecto de los Factores Tróficos

Lic. Jimena Pía Fernández

Directora: Dra. Cynthia Tamara Rubilar Panasiuk

Co-Director: Dr. Jorge Marcelo González Aravena

2019

Quiero dedicar esta tesis
a todas esas personas que supieron acompañarme
en todo momento y sin importar las circunstancias.
Sin el consejo y el apoyo incondicional de cada uno de ellos
no hubiera sido posible llegar hasta acá...
¡Gracias por tanto!

Agradecimientos

A todas las personas que de una u otra forma han contribuido en este trabajo y me han acompañado en este gran proceso. La investigación es un trabajo colectivo, y cada persona por más que no lo parezca, aporta de formas muy variadas. ¡Gracias por formar parte de este trabajo!

A mis viejos por ser mi sostén, por apoyarme en todo momento y acompañarme en mis decisiones.

A mis hermanos y familia por acompañarme y entender, por alegrarme cuando estaba triste, por escucharme y alentarme.

A Tamara por aceptarme como becaria, marcando un antes y un después en mi carrera. Gracias por creer en mí, por ayudarme siempre, por alentarme y felicitarme, por ayudarme a crecer, por guiarme, y por hacer posible todo lo que parecía imposible.

A Marcelo por aceptarme y Co-dirigirme, por abrir las puertas de su laboratorio y brindarme todo lo necesario para poder hacer todo lo planificado en mis estadías en Punta Arenas.

A la Dra. Natalia Lausada y a las autoridades del IMBICE el Dr. Mario Ermácora y la Dra. Graciela Baillet. Por ayudarme a superar la adversidad, por creer en mí y ser consecuentes apoyándome en todo momento. Ustedes me dieron la oportunidad de reiniciarme y superarme.

A las autoridades del CESIMAR, por abrirme las puertas de la institución e integrarme como becaria.

A Augusto por aconsejarme, por la gestión universitaria y por ayudarme cumplir esta etapa.

A los integrantes del equipo de equinodermos y a todo el equipo LOBIO: Augusto, Tamara, Lucas, Lucía, Florencia, Elena, Gaspar, Flavio, los Rodrigos, Ximena, las Antos, Fernando, Joanna, Leo, Regina, Juan Pablo, Lei, Ariadna, Lourdes y Erina. Por ser un grupo de trabajo gigante en todas sus dimensiones, por el apoyo, las enseñanzas, los consejos, la gestión, la sinergia, la buena predisposición y la buena onda.

A Alejandro Font por todas las enseñanzas, por la enorme paciencia, por explicarme y enseñarme mil cosas, por ayudarme a alcanzar los objetivos y por la amistad.

A Rodrigo Gonçalves, por ayudarme a construir las herramientas y los artefactos poco convencionales para poder alcanzar los objetivos propuestos.

A Lucia por traerme los erizos, por cuidarme las larvas y por las interminables correcciones bibliográficas.

A Florencia, mi adorable discípula, por comprender, por acompañarme en el tramo final de este trabajo y por el aliento.

A Paulina por la amistad, por alojarme y hacerme sentir como en casa en las dos estadías en Punta Arenas.

A Alejandro, Magda, Vicente y Juana, por la amistad, por las salidas y por los momentos felices compartidos al final del día en las estadías en Punta Arenas.

A mis compañeras del IMBICE Ana María y Mariana, por la amistad, por las incontables horas compartidas, por la complicidad, por el apoyo mutuo, los favores y los consejos.

A mis amigos Yani, Daniel, Nancy, Mari, Cata, Cuti, Tito, Mariana, Joanna, Luciano, Anto por entender, por apoyarme y contenerme cuando lo necesitaba, por sacudirme cuando fue necesario, por alegrarme en los momentos más difíciles, por escucharme y por los momentos compartidos... ustedes son mi cable a tierra.

¡Gracias, gracias, gracias, los quiero!

Tabla de contenidos

Autora: Lic. Jimena Pía Fernández	1
Resumen	9
Abstract	10
Introducción general	11
Los Factores de Crecimiento	
• Factores neurotróficos	
○ Neurotrofinas	
○ Factor Neurotrófico Ciliar (CNTF)	
○ GFLs: Ligandos de la Familia de Factores Neurotróficos Derivados de las Células Gliales	
Los componentes del complejo GFLs-GFR α -RET en la evolución de los metazoos	
Regeneración	
Los equinodermos como un modelo animal estratégico para el estudio de los factores neurotróficos	
Objetivo general	31
Capítulo 1: Cultivo y desarrollo de embriones y larvas de <i>Arbacia dufresnii</i>	33
<u>Introducción del capítulo 1</u>	34
Ciclo reproductivo de los equinoideos	
Desarrollo embrionario y larval	
El equinoideo <i>Arbacia dufresnii</i>	
<u>Materiales y métodos del capítulo 1</u>	51
Optimización de la metodología para el cultivo de embriones y larvas de <i>Arbacia dufresnii</i> :	
▪ Efecto de la concentración de gametas sobre la eficiencia de la fecundación	
▪ Efecto de la temperatura y el origen parental sobre desarrollo embrionario y larval de <i>Arbacia dufresnii</i>	
▪ Elaboración de un protocolo de cultivo de embriones y larvas de <i>Arbacia dufresnii</i>	
Descripción del desarrollo larval y embrionario de <i>Arbacia dufresnii</i>	
<u>Resultados del capítulo 1</u>	59
▪ Efecto de la concentración de las gametas sobre la eficiencia de la fecundación	
▪ Efecto de la temperatura y el origen parental sobre desarrollo embrionario de <i>Arbacia dufresnii</i>	

▪ Efecto de la temperatura y el origen parental sobre el crecimiento larval de <i>A. dufresnii</i>	
▪ Protocolo de cultivo de embriones y larvas de <i>Arbacia dufresnii</i>	
▪ Descripción del desarrollo larval y embrionario de <i>Arbacia dufresnii</i>	
<u>Discusión del capítulo 1</u>	76
<u>Conclusiones del capítulo 1</u>	83
Capítulo 2: Determinación de secuencias génicas de interés en <i>Arbacia dufresnii</i> mediante análisis bioinformático	84
<u>Introducción del capítulo 2</u>	85
El estudio de las secuencias proteicas	
El complejo GFLs/GFR α /RET	
Proteínas de acción apoptótica: Bcl-2 y Bax	
TRPa: Receptor de Potencial Transitorio A	
Syt1: Sinaptotagmina 1	
GFAP: Glial fibrillary acidic protein	
Proteínas constitutivas	
• Actina	
• GAPDH: Gliceraldehído 3-Fosfato Deshidrogenasa	
• RPL8	
• EF1- α 1: Factor de Elongación 1-alfa1	
<u>Materiales y métodos del capítulo 2</u>	106
• 2.1 Genes de interés	
• 2.2 Búsqueda de secuencias en bases de datos públicas	
• 2.3 Análisis y comparación de secuencias	
• 2.4 Selección de secuencias en <i>A. dufresnii</i>	
• 2.5 Análisis de las secuencias nucleotídicas de <i>A. dufresnii</i>	
• 2.6 Diseño de partidores para las secuencias candidatas de <i>A. dufresnii</i>	
<u>Resultados del capítulo 2</u>	118
Genes de interés	
Búsqueda y análisis de secuencias	
• Bcl-2: Supresor de la apoptosis	
• Bax: Activador de la apoptosis	
• TRPa: Receptor de Potencial Transitorio A	
• GFR α : Receptor de la familia de los GFLs	
• Syt-1: Sinaptotagmina 1	
• GFAP: Glial fibrillary acidic protein	
• Actina	
• GAPDH: Gliceraldehído 3-Fosfato Deshidrogenasa	
• RPL8	

<ul style="list-style-type: none"> • EF1-α1: Factor de Elongación 1-alfa1 	
Análisis de las secuencias nucleotídicas de <i>A. dufresnii</i> y diseño de partidores	
<u>Discusión del capítulo 2</u>	138
<u>Conclusiones del capítulo 2</u>	151
Capítulo 3: Desarrollo del sistema nervioso en <i>Arbacia dufresnii</i>	152
<u>Introducción del capítulo 3</u>	153
Origen embriológico del sistema nervioso en metazoos	
La organización del sistema nervioso de los erizos de mar	
Tipos celulares en el sistema nervioso de larvas de equinodermos	
Inmunorreactividad del sistema nervioso de los equinodermos	
<u>Materiales y métodos del capítulo 3</u>	164
<ul style="list-style-type: none"> • 3.1 Generación de larvas • 3.2 Inmunocitoquímica de fluorescencia indirecta • 3.3 Cuantificación de la expresión de génica 	
<u>Resultados del capítulo 3</u>	169
Desarrollo del sistema nervioso de <i>Arbacia dufresnii</i>	
<ul style="list-style-type: none"> • Inmunodetección de Syt1-1 a lo largo de los primeros 14 dpf • Inmunodetección de GFSKLYFamide a lo largo de los primeros 14 dpf • Inmunodetección de GFAP a lo largo de los primeros 14 dpf • Inmunodetección del receptor GFRα durante los primeros 14 dpf 	
Cuantificación de la expresión génica	
<u>Discusión del capítulo 3</u>	197
<u>Conclusiones del capítulo 3</u>	209
Capítulo 4: El efecto de los Factores Neurotróficos en el desarrollo y la regeneración de larvas de <i>Arbacia dufresnii</i>	211
<u>Introducción del capítulo 4</u>	212
Factores Neurotróficos en la filogenia	
GFLs, GFR α y RET en la filogenia	
Importancia del complejo GFLs/GFR α -RET en el Sistema Nervioso Entérico	
La regeneración y los Factores Neurotróficos	
<u>Materiales y métodos del capítulo 4</u>	222
Experimentos de activación e inhibición farmacológica de la vía de los GFLs	
Experimentos de regeneración con exposición farmacológica a activadores de la vía GFLs	
<u>Resultados del capítulo 4</u>	229
Experimentos de activación e inhibición de la vía de los GFLs	
<ul style="list-style-type: none"> • Inmunomarcación de GFRα y Syt1-1 en larvas de <i>A. dufresnii</i> tratadas farmacológicamente 	

<ul style="list-style-type: none"> • Inmunomarcación de GFRα y GFAP en larvas de <i>A. dufresnii</i> tratadas farmacológicamente • Cuantificación y análisis de la expresión génica 	
Experimentos de regeneración con exposición farmacológica a activadores de la vía GFLs	
<ul style="list-style-type: none"> • Expresión de GFRα y 1E11 en larvas de <i>A. dufresnii</i> en regeneración con activación de la vía de los GFLs 	
<u>Discusión del capítulo 4</u>	257
<u>Conclusiones del capítulo 4</u>	280
Discusión general	281
Conclusiones generales	293
Bibliografía	296
Anexo del capítulo 1	330
Anexo del capítulo 2	347
Anexo del capítulo 3	386

Resumen

La señalización intercelular mediada por los factores de crecimiento y/o factores neurotróficos, es crucial para la organización del desarrollo embrionario y larval, del sistema nervioso y de la regeneración. En esta tesis doctoral, se abordaron algunos aspectos de la biología del desarrollo del equinodermo *Arbacia dufresnii*, así como también, la influencia que ejerce la familia de factores neurotróficos GFLs (Glial cell line-derived neurotrophic factors) en estos procesos. Tanto el desarrollo embrionario y larval como el desarrollo del sistema nervioso, concordaron y profundizaron las descripciones previas de esta especie. Se destaca una fuerte herencia maternal en el desarrollo de las progenies de embriones y larvas, se encontró presencia de neuronas peptidérgicas que expresan el neuropéptido GFSKLYFamide, y de células con características de Glía Radial, que expresan GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein). La presencia de estos tipos celulares sólo había sido hallada en equinodermos adultos y evidencia la gran complejidad que tiene el sistema nervioso larval de estos organismos. Se hallaron las secuencias génicas de nueve proteínas de la especie, que podrán ser anotadas en bases de datos génicas contribuyendo a estudios posteriores. El análisis de la expresión de estos genes permitió profundizar en el conocimiento del desarrollo larval, destacándose genes con un perfil de expresión endógeno y otros que sugieren nuevamente que existe una fuerte herencia maternal. El estudio de la regeneración de una porción de tejido en larvas, reveló una rápida recuperación tisular y funcional de la zona afectada, contribuyendo al conocimiento de un fenómeno muy común en equinodermos, pero poco estudiado en larvas por la complejidad que ello implica. La exposición a los ligandos farmacológicos GFLs (GDNF y NRTN), generó importantes respuestas en las larvas de *A. dufresnii*, que fueron registradas tanto en condiciones de cultivo normales como en condiciones de regeneración. Por lo tanto, este trabajo aporta la primer evidencia de los efectos de la activación farmacológica de la familia de factores neurotróficos GFLs de mamíferos sobre invertebrados, y más importante aún, es que se hallaron algunos de los efectos descritos en mamíferos. Adicionalmente, si bien la secuencia nucleotídica de GFR α posee gran divergencia a lo largo de la filogenia, la estructura tridimensional de los sitios de unión a los ligandos GDNF y NRTN y el sitio de reconocimiento del anticuerpo anti-GFR α utilizado, se encuentran conservadas y son capaces de interactuar con los ligandos de mamíferos, en contraposición a lo hallado en organismos más distantes como *D. melanogaster*. Estos resultados refuerzan la utilidad de los equinodermos como modelo animal para estudios de genética molecular, enfocados en la comprensión de los mecanismos moleculares del desarrollo de los Deuterostomados.

Abstract

Intercellular signaling mediated by growth factors and/or neurotrophic factors is crucial for the organization of embryonic and larval development, nervous system and regeneration. Some aspects of the developmental biology of the echinoderm *Arbacia dufresnii* were studied in this work as well as the influence exerted by the family of neurotrophic factors GFLs in these processes. Both the embryonic and larval development and the development of the nervous system were similar to those found in other species. A strong maternal inheritance was found in the development of embryonic and larval progenies. Presence of peptidergic neurons that express GFSKLYFamide, and cells with Radial Glial characteristics, that express GFAP were found in the larval nervous system. Nine gene sequences of proteins were found in *A. dufresnii*, which will be submitted to public sequence databases. The expression analyses of these genes allowed to increase the knowledge of larval development. Some genes presented an endogenous expression while others seem to have a strong maternal inheritance. There was a rapid tissue regeneration and functional recovery after injury. The results contributed to the understanding of a very common phenomenon in echinoderms, but little studied in larvae due to its inherent complexity. Although it was not possible to find the gene sequence of the GFL receptor, the protein was immunodetected. Likewise, exposure to the mammalian GFLs pharmacological ligands (GDNF and NRTN), generated important responses in the larvae of *A. dufresnii*, which were found under both normal culture conditions and regeneration conditions. Therefore, this thesis presents the effects of the activation of the mammalian GFL neurotrophic factors on invertebrates, and more importantly, there found effects described in mammals. In addition, eventhough the GFR α nucleotide sequence has a large divergence throughout the phylogeny, the three-dimensional structure of the GDNF and NRTN ligand binding sites and the anti-GFR α antibody recognition site are preserved and are able to interact with the mammalian ligands. This is contrary to what was found in most distant organisms such as *D. melanogaster*. These results highlithd the use of echinoderms as model for molecular genetics studies, focused on understanding the molecular mechanisms of the development of Deuterostomados.

Introducción general

El desarrollo de un organismo pluricelular es un fenómeno complejo. Durante la reproducción sexual, la unión de las gametas femenina y masculina da origen al cigoto, que iniciará el proceso de desarrollo embrionario formando a un individuo completo (Gilbert 2000). Sin embargo, en la mayoría de los animales el desarrollo nunca se detiene completamente. A lo largo de la vida, miles de células son reemplazadas diariamente, muchos organismos experimentan la metamorfosis reorganizando casi completamente sus estructuras, y en muchos otros casos los individuos pueden recuperar partes completas de su cuerpo en un fenómeno conocido como regeneración.

En este amplio contexto de la biología del desarrollo surgen grandes interrogantes acerca de cómo se organizan las células de un organismo para llevar a cabo de manera sincronizada estos fenómenos de gran complejidad y precisión.

La señalización intercelular mediada por los *factores de crecimiento* parece ser parte de la respuesta a estos interrogantes. En las últimas décadas, se han encontrado evidencias importantes de que estas moléculas son cruciales para la formación de patrones estructurales durante el desarrollo embrionario, la organización del sistema nervioso y la regeneración (Weiskirchen 2009).

Los factores de crecimiento

Los factores de crecimiento son un grupo heterogéneo de proteínas que regulan varios aspectos de la función celular, incluyendo la supervivencia, la proliferación, la migración y la diferenciación (Byrne y Roberts 2009).

Estas moléculas son el principal medio de comunicación intercelular en los organismos metazoos durante el desarrollo embrionario y la regeneración. Debido a su gran importancia, las mutaciones en alguno de estos factores o en sus receptores pueden ocasionar profundos efectos en el desarrollo de los órganos o de su función fisiológica (Byrne y Roberts 2009; Mina 2014)

Existe una gran diversidad estructural y funcional entre los factores de crecimiento, sin embargo, pueden observarse algunos mecanismos de acción comparables. Estas moléculas actúan en forma paracrina y/o autocrina, es decir, en forma local a las células en donde son producidos. Algunos de los mecanismos descritos que limitan su rango de actividad a las células próximas son: la asociación con componentes de la matriz extracelular, el anclaje a la membrana plasmática, y la activación biológica luego de un clivaje proteolítico (Byrne y Roberts 2009; Mina 2014).

Los factores de crecimiento y sus receptores pueden ser agrupados en familias, de acuerdo a características comunes en su secuencia aminoacídica, y en superfamilias, de acuerdo a plegamientos similares que determinan motivos estructurales compartidos (Heath 2001; Ozkan et al. 2007; Mina 2014).

Muchas familias de factores de crecimiento presentan gran conservación en su secuencia a lo largo de la evolución (Heath 2001; Ozkan et al. 2007; Mina 2014). Se pueden encontrar ortólogos de las familias del factor de crecimiento fibroblástico (FGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF β), tanto en los invertebrados nematodos, equinodermos e insectos, como en los vertebrados superiores como ratones y humanos (Heath 2001; Ozkan et al.

2007; Mina 2014). En los vertebrados superiores, las familias de factores de crecimiento presentan mayor cantidad de miembros que en los invertebrados. Por ejemplo, actualmente hay 22 miembros de la familia de genes FGF en el genoma humano, pero sólo hay un integrante en *Drosophila melanogaster* o en *Caenorhabditis elegans*. Por otra parte, algunas superfamilias de factores de crecimiento como las quemoquinas, cuya acción primaria está relacionada a los eventos de infección e inmunidad, se encuentran en tándem de genes que exhiben una gran divergencia en su secuencia y número de genes entre especies, incluso entre mamíferos cercanos (Heath 2001).

Debido a que en el sistema nervioso adulto de los vertebrados, las neuronas maduras se encuentran en estado post-mitótico y no pueden reiniciar el ciclo celular, los factores de crecimiento no son capaces de estimular la proliferación en dichas células. Por esta razón, en el contexto del sistema nervioso, se hace referencia a los factores de crecimiento como **factores tróficos o neurotróficos** (Friedman 2012).

Factores neurotróficos

El establecimiento de un sistema nervioso funcional requiere de la conexión de las neuronas en un circuito con extremada precisión. Para lograrlo, las dendritas y axones de las neuronas en desarrollo deben extenderse hasta alcanzar las regiones blanco, reconocer a sus células diana y establecer las conexiones sinápticas específicas (Ledda y Paratcha 2016).

A lo largo de este recorrido, un gradiente de señales de corto y largo alcance guían a los procesos axonales y dendríticos hasta establecer dicho contacto con su célula diana. Se ha encontrado evidencia de que las mismas células diana son quienes producen algunas de estas señales tróficas (Hamburger 1934). Asimismo, se ha demostrado que las neuronas del Sistema Nervioso Periférico (SNP) inicialmente se producen en exceso durante el desarrollo embrionario, y luego una gran proporción de las mismas muere por el fenómeno de apoptosis (muerte celular programada)

(Oppenheim 1991). Los **factores neurotróficos**, son secretados en forma limitante y son los responsables de controlar el tamaño de la población neuronal que inerva los tejidos diana (Korsching 1993).

Todos estos factores exhiben similares propiedades bioquímicas. Son proteínas secretadas, de pequeño tamaño y de estructura básica. Son sintetizadas como grandes precursores, que luego son clivados adquiriendo su forma madura, y una vez en el espacio intercelular forman homodímeros adquiriendo sus principales funciones en el desarrollo, la supervivencia y el mantenimiento del Sistema Nervioso Central y Periférico (Loughlin y Fallon 1993).

Los factores neurotróficos incluyen a las **Neurotrofinas**, el **Factor Neurotrófico Ciliar (CNTF)** y los **Ligandos de la Familia de Factores Neurotróficos Derivados de las Células Gliales (GFLs)** (Reichardt 2006; Paratcha y Ledda 2008; Bothwell 2014; Ibáñez y Andressoo 2017).

Neurotrofinas

Las **neurotrofinas** son un grupo de proteínas relacionadas estructuralmente, sus miembros son el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina 3 (NT3) y la neurotrofina 4 (NT4) (Barbacid 1995). Fueron identificadas por primera vez como factores de supervivencia de las neuronas en desarrollo, y en estudios posteriores se describió su acción pleiotrópica dada su participación en una gran variedad de funciones incluyendo el control y orientación del crecimiento axonal, el desarrollo dendrítico y la plasticidad sináptica a través de la activación de su receptor de membrana Tirosina Quinasa (Trk): TrkA, TrkB y TrkC (Barbacid 1995; Reichardt 2006; Mariga et al. 2017) (Figura A).

Las neurotrofinas se sintetizan como precursores o pro-neurotrofinas y son secretadas al espacio intercelular (Lee et al. 2001; Hempstead 2014). En su forma madura, estas moléculas se unen y activan a su receptor Trk específico promoviendo

las acciones clásicas descritas, y en presencia de la proteína p75^{NTR} aumenta la afinidad de esta unión y sus efectos. Por otro lado, las pro-neurotrofinas pueden unirse directamente a p75^{NTR} formando el complejo proteico p75^{NTR}-sortilin, e inducir la muerte celular de las neuronas durante el desarrollo normal y/o en condiciones patológicas (Hempstead 2014).

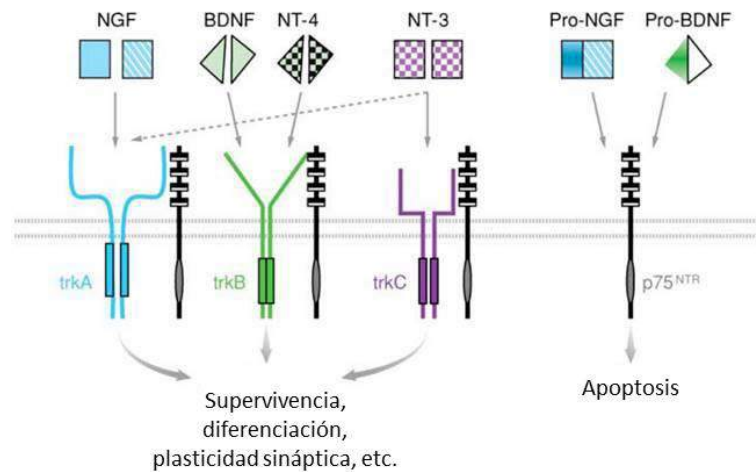


Figura A. Acción de neurotrofinas. Tomado y modificado de Pezet y McMahon (2006).

Factor Neurotrófico Ciliar (CNTF)

CNTF es un factor neurotrófico pluripotente, fue aislado por primera vez en neuronas ciliares de embriones de pollo (Skaper et al. 1984). Este factor tiene potentes efectos en el desarrollo y el mantenimiento del sistema nervioso, induciendo la supervivencia y la diferenciación al estimular la expresión génica en las neuronas sensoriales, simpáticas y motoras. A nivel sistémico, se han registrado efectos importantes sobre el metabolismo y el balance energético, y también sobre la modulación de la actividad de los osteoblastos (Johnson et al. 2014). *CNTF* es considerado un miembro de la familia de las citoquinas y presenta actividades redundantes con el Factor Inhibidor de la Leucemia (LIF), Cardiotrophin-1 y Citoquina símil Cardiotrophin-1 (Pasquin et al. 2015).

El receptor de este factor tiene tres componentes: una subunidad CNTFR α que proporciona un anclaje a la membrana plasmática (fosfatidil inositol glicosilado), y dos subunidades con actividad de señalización gp130 y LIFR β . CNTF se une secuencialmente a CNTFR α , luego a gp130 y por último a LIFR β , activando numerosas cascadas de señalización que determinan la transcripción génica (Davis et al. 1991; Stahl y Yancopoulos 1994) (Figura B).

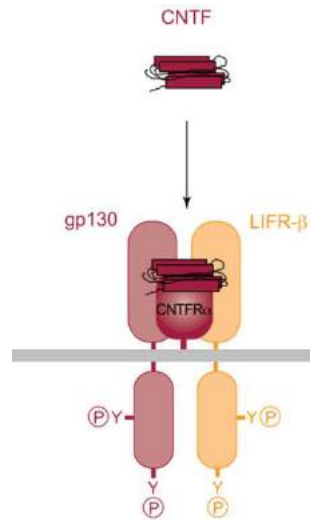


Figura B. CNTF y sus receptores. Tomado de Ibáñez (1998).

GFLs: Ligandos de la Familia de Factores Neurotróficos Derivados de las Células Gliales

La familia de factores neurotróficos **GFLs**, es un pequeño grupo divergente dentro de la superfamilia de los TGF β (Lin et al. 1993; Kingsley 1994). Los GFLs a pesar de presentar baja homología en su secuencia aminoacídica con el resto de la superfamilia, poseen siete residuos de cisteína altamente conservados y ubicados espacialmente en los mismos sitios que otros miembros. Estos residuos les confieren similares motivos estructurales, entre ellos el motivo *Cisteína Knot* asociado a la estabilidad de la proteína y la formación de homodímeros (Eigenbrot y Gerber 1997; Airaksinen y Saarma 2002).

Los miembros de la superfamilia de los TGF β han sido encontrados a lo largo

de toda la filogenia de los metazoos, tanto en vertebrados como en invertebrados y se ha descrito su expresión ubicua y su acción sobre diversos tejidos (Newfeld et al. 1999; Alvarado y Tsonis 2006; Weiss y Attisano 2013). A nivel celular, los TGF β regulan procesos clave como la proliferación, la diferenciación, la organización del citoesqueleto, la adhesión, la migración y la muerte. Asimismo, también contribuyen al mantenimiento y a la inducción de la diferenciación de células madre embrionarias (Pera y Tam 2010), y existen evidencias de su participación durante la regeneración celular (Ramoshebi et al. 2002). Dada esta diversidad de funciones y la importancia de las mismas, los miembros de esta superfamilia, juegan un rol crucial en múltiples procesos del desarrollo embrionario y de la vida adulta de los organismos multicelulares (Weiss y Attisano 2013) (Figura C).

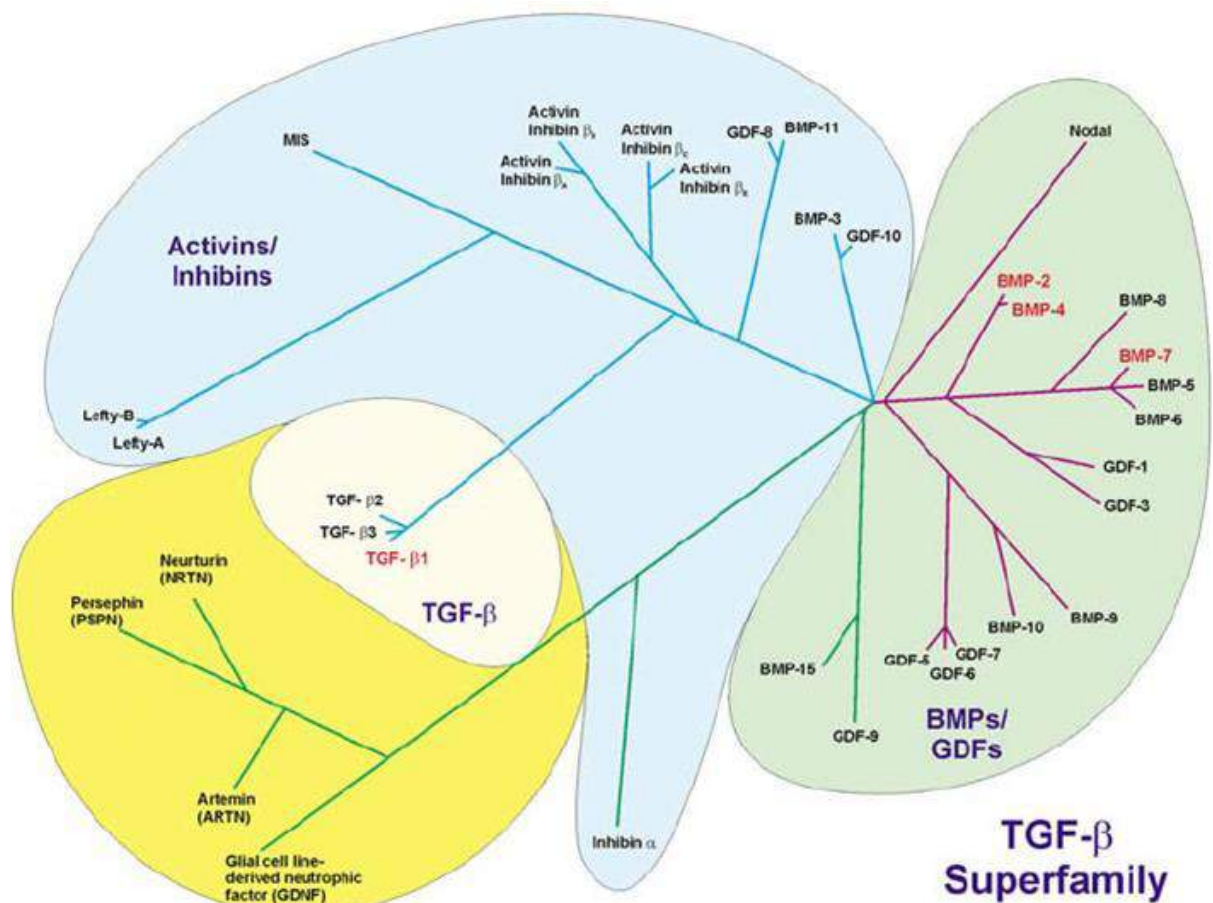


Figura C. Superfamilia TGF- β . Tomado de Weiskirchen et al. (2009).

En mamíferos, la familia de los GFLs está constituida por **GDNF** (Glial cell line-derived neurotrophic factor), **NRTN** (Neurturin), **ARTN** (Artemin) y **PSPN** (Persephin) (Lin et al. 1993; Kotzbauer et al. 1996; Milbrandt et al. 1998; Baloh et al. 1998b). Estas moléculas ejercen sus funciones al unirse a sus receptores de membrana específicos GFR α ¹⁻⁴ (Glial cell line-derived neurotrophic factor Family Receptors alpha), formando los complejos GDNF-GFR α ¹; NRTN-GFR α ²; ARTN-GFR α ³ y PSPN-GFR α ⁴. Posteriormente, estos complejos activan al receptor RET (receptor transmembrana Tirosina Quinasa) o al receptor NCAM (Neural Cell Adhesión Molecule), desencadenando una cascada de señalización intracelular (Li et al. 2005; Ibáñez y Andressoo 2017) (Figura D). Adicionalmente, se han descrito otras dos proteínas GRAL (GDNF Receptor Alpha-Like) y Gas1 (growth arrest specific 1), ambos exhiben dominios homólogos a los de GFR α y son considerados miembros de la familia de receptores GFR α (Heger et al. 2005; Li et al. 2005).

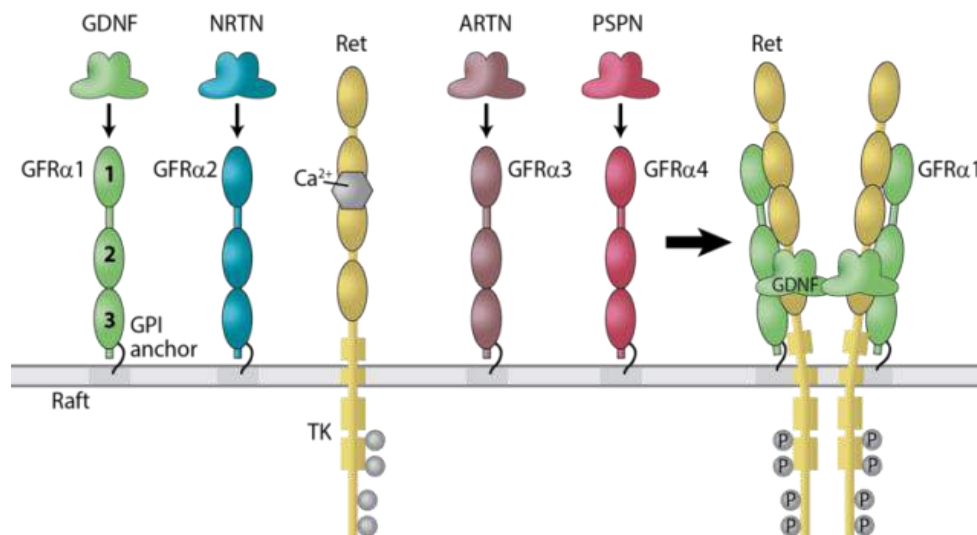


Figura D. Familia GFLs y sus receptores GFR α y RET. Tomado de la pagina web de la Universidad de Helsinki (<https://www.helsinki.fi/en/researchgroups/neurotrophic-factors-and-regeneration/research/signalling-and-receptors-of-gdnf>).

Como consecuencia de la activación de RET por los GFLs, se promueve la expresión de una gran cantidad de genes relacionados a la activación del ciclo celular y a la diferenciación hacia determinados tipos celulares, algunos de estos genes se expresan en forma exclusiva por activación de esta vía de señalización (Luo et al. 2007).

En términos generales, los ligandos GFLs a través de sus acciones, controlan el crecimiento y la supervivencia de subpoblaciones específicas de motoneuronas y de varias otras neuronas periféricas, incluyendo neuronas del Sistema Nervioso Simpático (SNS) y neuronas sensoriales (Baloh et al. 2000; Takahashi 2001; Airaksinen y Saarma 2002; Enomoto 2005). Asimismo, su presencia determina el destino de poblaciones de células madre y progenitoras, y participan en el fenómeno de regeneración tisular (Widenfalk et al. 2001; Lu et al. 2003; Friedman 2012a).

Inicialmente, el ligando GDNF fue descubierto por su habilidad de inducir la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas en el cerebro medio (Lin et al. 1993). Posteriormente, se describió que junto a otras moléculas, participa en el direccionamiento de los procesos axónicos y dendríticos para formar los circuitos neuronales durante el desarrollo del sistema nervioso (Young et al. 2001; Airaksinen y Saarma 2002; Enomoto 2005; Paratcha y Ledda 2008; Nielsen et al. 2009). Además, se han encontrado funciones importantes para GDNF fuera del sistema nervioso, especialmente durante el desarrollo de los riñones y la espermatogénesis (Airaksinen y Saarma 2002; Hellmich et al. 1996).

Algunos estudios realizados en ratones “Knock-out”, es decir, un ratón modificado genéticamente con alguno de sus genes inactivos, han demostrado que NRTN a través de su receptor $GFR\alpha^2$, es necesario durante el desarrollo embrionario tardío en el Sistema Nervioso Parasimpático (SNP) y las neuronas del Sistema Nervioso Entérico (SNE) (Heuckeroth et al. 1999; Rossi et al. 1999, 2000; Baloh et al. 2000). De manera similar, en aves se ha demostrado que NRTN mantiene la innervación craneal de neuronas post-ganglionares parasimpáticas (Hashino et al. 2001).

En ratones deficientes de ARTN o de su receptor $GFR\alpha^3$, se han encontrado perturbaciones en las migraciones de los precursores simpáticos que formarán el Ganglio Superior Cervical (Nishino et al. 1999; Honma et al. 2002). En estos ratones también se observaron defectos en la segmentación y la inervación temprana de los ganglios simpáticos caudales. Por lo tanto, se ha propuesto que ARTN, mediante su receptor $GFR\alpha^3$, actúa como molécula quimioattractante para los precursores simpáticos y las fibras nerviosas en ratones (Honma et al. 2002).

Por último, las funciones de PSPN y su receptor $GFR\alpha^4$, aún no están completamente esclarecidas, aunque según los patrones de expresión conocidos hasta la fecha, no parecen estar conservadas entre los vertebrados. Un ejemplo de esto es la expresión de $GFR\alpha^4$ en motoneuronas de aves, y la ausencia de tanto el receptor $GFR\alpha^4$ como su ligando PSPN en las motoneuronas de mamíferos (Soler et al. 1999). En éstos últimos, se ha descrito la expresión de este complejo predominantemente en células C de la tiroides y parece estar implicada en la regulación de la secreción de calcitonina (Lindahl et al. 2000, 2001).

Los componentes del complejo GFLs-GFR α -RET en la evolución de los metazoos

En las últimas décadas, el desarrollo de las técnicas como el análisis de las secuencias de ADN y ARN han permitido revisar las relaciones filogenéticas entre los metazoos, consolidado algunas relaciones tradicionales y reinterpretando otras (Adoutte et al. 2000). En este escenario, se diferencian dos grandes grupos dentro de Bilateria: los Protostomados, conformados por dos grupos monofiléticos: Lophotrochozoa y Ecdysozoa; y los Deuterostomados, con sólo un grupo monofilético en el que se encuentran los Vertebrados y los Equinodermos, entre otros (Adoutte et al. 2000)(Figura E).

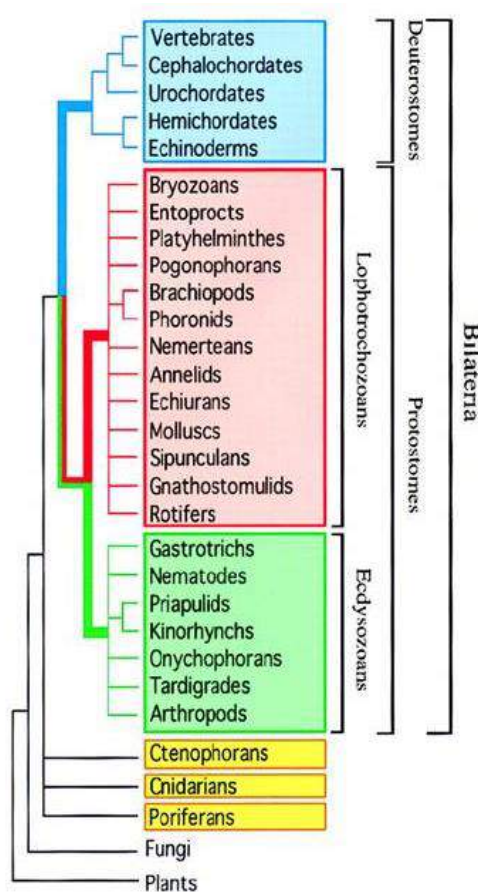


Figura E. Filogenia de los Metazoos basada en análisis moleculares. Tomado de Adoutte et al. (2000).

Los genes ortólogos, son aquellos genes cuyas secuencias se encuentran en diferentes especies y que son altamente similares debido a que se han originado en un ancestro común. Ortólogos de los receptores $GFR\alpha^{1-4}$, GRAL y Gas1 se han hallado en todas las familias de vertebrados desde los peces óseos hasta los mamíferos (Airaksinen et al. 2006; Häntinen et al. 2007), y existen evidencias que sugieren la presencia de estas secuencias en invertebrados deuterostomados como el equinoideo *Strongylocentrotus purpuratus* (Häntinen et al. 2007) y en el cefalocordado *Branchiostoma floridae*. Por otro lado, la identificación de presuntos ortólogos de RET y $GFR\alpha$ en el genoma de algunos protostomados como en nematodos (*C. elegans*) e insectos (*D. melanogaster* y *Apis mellifera*), sugiere un único origen de los genes $GFR\alpha$ y RET y una aparición temprana en la evolución de los organismos bilaterales, previo a la divergencia entre ambos grupos filogenéticos (Airaksinen et al. 2006).

En *D. melanogaster*, el gen D-ret, ortólogo de RET, presenta un dominio tirosina quinasa altamente conservado que puede activar *in vitro* las mismas cascadas intracelulares que la proteína RET de mamíferos (Ras-ERK, Src y Jun Quinasa). Sin embargo, el dominio extracelular se encuentra menos conservado y es incapaz de interactuar con el complejo GDNF/ $GFR\alpha^1$ de mamíferos (Abrescia et al. 2005; Hidalgo et al. 2011). En embriones de *D. melanogaster*, D-ret se expresa en tejidos análogos a los embriones de vertebrados incluyendo los órganos excretores y el Sistema Nervioso Periférico (SNP), sugiriendo roles similares durante el desarrollo (Sugaya et al. 1994; Hahn y Bishop 2001b). Asimismo, trabajos recientes han descrito nuevas funciones para D-ret como regulador del crecimiento dendrítico de las neuronas sensoriales, a través de un mecanismo que requiere de la participación de la integrinas sin involucrar al ligando GDNF (Soba et al. 2015). En base a estas evidencias, se ha postulado que la aparición de los factores neurotróficos y de sus receptores $GFR\alpha$ a lo largo de la evolución podrían considerarse uno de los pre-requisitos para la evolución de los sistemas nerviosos complejos (Jaaro y Fainzilber 2006; Dolan et al. 2007).

De acuerdo a Airaksinen et al. (2006) el primer gen GFL divergió de la familia de los $TGF\beta$, y luego se duplicó en dos ocasiones en el origen de los vertebrados,

dando como resultado los cuatro GFR α s existentes en los vertebrados superiores. Posteriormente, estas proteínas adquirieron funciones en la regulación autonómica y sensorial que les permitió a los organismos portadores, nuevas posibilidades adaptativas y la colonización de nuevos ambientes. La pérdida de los genes para NRTN en ranas y PSPN en pollos y la activación de su receptor específico por otro GFL, sugiere cierta redundancia y promiscuidad ligando-receptor en los primeros tetrápodos. Asimismo, durante la evolución de los vertebrados estas proteínas pudieron haber adquirido roles adicionales en diferentes especies, por ejemplo en el desarrollo y mantenimiento del Sistema Nervioso Central (CNS) (Airaksinen et al. 2006).

La función principal de GDNF y su receptor GFR α^1 en el desarrollo del Sistema Nervioso Entérico (SNE) está conservada desde el pez cebra hasta los seres humanos (Durbec et al. 1996b; Enomoto et al. 1998; Shepherd 2004). El rol de NTRN-GFR α^2 en el desarrollo de las neuronas parasimpáticas se encuentra conservado en pollos y ratones (Hashino et al. 2001). Sin embargo, las funciones de ARTN-GFR α^3 y PSPN-GFR α^4 sólo se conocen con certeza en los mamíferos (Airaksinen et al. 2006).

Siguiendo esta línea, se ha propuesto que la aparición de los complejos GDNF-GFR α^1 ; NRTN-GFR α^2 ; ARTN-GFR α^3 podría estar causalmente relacionada al surgimiento secuencial de los componentes del Sistema Nervioso Autónomo (SNA) durante la evolución de los vertebrados (Taylor et al. 1999). El componente más antiguo del SNA es el SNE (Goodrich et al. 1980) y requiere de la señalización de GDNF; el segundo componente más antiguo, es el nervio vago que pertenece al Sistema Nervioso Parasimpático (SNP) y requiere NTRN; por último, los componentes del Sistema Nervioso Simpático, en especial el ganglio superior cervical (GSC), surgidos posteriormente en la evolución, dependen de ARTN. Esto podría indicar, por ejemplo, que los peces cartilagosos más primitivos, que poseen un SNP desarrollado (nervio vago) y un SNS primitivo (Taylor et al. 1999), poseerían ortólogos para el gen de NTRN pero no para ARTN.

Finalmente, y dado que en todos los vertebrados la señalización de GDNF es

necesaria para la supervivencia y la proliferación de los precursores entéricos durante la migración a lo largo del tubo digestivo, la función más primitiva de los GFLs parece estar relacionada al desarrollo del SNE (Airaksinen et al. 2006).

Los equinodermos carecen de células de la cresta neural y sus derivados pero poseen un sistema nervioso complejo con muchas similitudes al SNE de vertebrados (García-Arrarás et al. 2001). En este contexto es relevante el estudio de la existencia y función de los ortólogos para GFLs, GFR α y RET durante el desarrollo del SN en estos deuterostomados precordados, así como también en otros organismos metazoos como moluscos (protostomados) y cnidarios (Radiata), en donde el sistema nervioso es esencialmente similar al SNE. En caso de hallarse estos genes en equinodermos, representarían el ancestro precordado común GFL y GFR α del cual se originó toda la familia de proteínas presentes en vertebrados (Airaksinen et al. 2006). Además, dada la existencia, tanto en vertebrados como en insectos (*D. melanogaster*), del gen RET se espera que esta proteína esté presente en todos los deuterostomados, incluyendo los más primitivos, como los erizos de mar (Equinodermos) y los anfibios (Cefalocordados).

Regeneración

La regeneración es uno de los fenómenos más complejos ocurridos durante de la vida de un organismo, abarca los procesos de reparación de células, tejidos y órganos e inclusive su crecimiento *de novo* (Alvarado y Tsonis 2006).

Inmediatamente después de que se produce una herida, múltiples vías biológicas se activan y sincronizan para responder. En muchos casos se han observado similitudes entre este proceso y el desarrollo embrionario. Por ejemplo, durante el crecimiento de las extremidades de algunos organismos, se han descrito mecanismos similares formadores del patrón corporal original del organismo (Muneoka y Bryant 1982). Además, algunos genes altamente conservados que se creían exclusivos del desarrollo embrionario, tienen funciones importantes durante la regeneración (Saló y Bagnà 1984; Brockes 1997; Martin 2004).

Este proceso es un fenómeno amplio pero no uniformemente distribuido en el reino animal (Alvarado y Tsonis 2006). En los deuterostomados, inclusive los mamíferos adultos pueden regenerar algunos tejidos como el hígado y músculo hasta cierto grado (Candia Carnevali 2006).

La aparición heterogénea del proceso de regeneración a lo largo de la filogenia parece ser independiente de la organización y nivel de complejidad de los organismos (Brockes 1997; Ferretti y Géraudie 1998; Thouveny 1998; Candia Carnevali y Bonasoro 2001) y está estrechamente relacionada a la plasticidad histogenética y morfogenética. Estos fenómenos, permiten el reclutamiento de células madre y/o la des-diferenciación de células especializadas, la proliferación celular, la migración, el suministro de factores neurotróficos específicos direccionalizantes y finalmente la expresión o re-expresión de un determinado programa de desarrollo (Weissman 2000; Wadman 2005).

Notablemente las vías de señalización de WNT, BMP/TGF β y FGF, todos pertenecientes a la superfamilia de los TGF β , han sido identificadas repetidamente

durante los procesos de regeneración en distintos modelos animales. Estos factores, actúan no sólo como moduladores de la diferenciación del tejido en regeneración, sino también participando activamente en la inducción de dicha regeneración (Alvarado y Tsonis 2006).

El uso de modelos animales para el estudio de la regeneración permite identificar aspectos importantes en el contexto *in vivo* en el cual las células madre somáticas operan (Alvarado y Tsonis 2006). Los nuevos avances que permiten la experimentación genética en estos modelos animales podrían sentar las bases para la comprensión de la biología de los metazoos y la medicina regenerativa. Por lo tanto, es de gran valor un modelo animal con alta capacidad regenerativa y que comparta características genéticas y del desarrollo con los vertebrados.

Muchos invertebrados son conocidos por su gran capacidad regenerativa (Brookes 1997; Saló y Baguñà 2002). Las estrellas de mar y otros equinodermos poseen una capacidad regenerativa distintiva y, al igual que los vertebrados, son deuterostomados, por lo que además comparten muchas características embriológicas que los diferencian del grupo de los protostomados (Patrino et al. 2001; Vickery et al. 2001; Candia Carnevali 2006).

Uno de los hallazgos más destacables en este campo fue la documentación de la regeneración de una larva de un deuterostomado. En estos experimentos se observó la habilidad de una larva de equinodermo para regenerar todas las estructuras perdidas, tejidos, órganos e incluso realizar una organogénesis completa (Vickery y McClintock 1998).

En todas las clases de equinodermos, la regeneración es un fenómeno fisiológico común tanto en adultos como en estadios larvales, e incluso forma parte del ciclo reproductivo de algunas especies (Vickery y McClintock 1998; Eaves y Palmer 2003; Rubilar et al. 2005, 2015). Estos organismos pueden regenerar sus órganos externos (brazos o apéndices) o internos (gónadas, tubo digestivo) e inclusive el sistema nervioso (Mashanov y García-Arrarás 2011; Mashanov et al. 2005; Thorndyke y Candia Carnevali 2001; Rubilar 2011). Uno de los modelos más estudiados es la

regeneración de los brazos en Crinoideos e intestino de Holotureos (Candia Carnevali y Bonasoro 2001; Mashanov y García-Arrarás 2011).

A pesar de que los procesos de regeneración varían entre las clases de equinodermos, el proceso general puede ser dividido en cuatro etapas (Candia Carnevali 2006; Alvarado y Tsonis 2006):

- 1) La desdiferenciación de células y/o la intervención de células madre;
- 2) La migración y proliferación celular;
- 3) La contribución de factores neurotróficos;
- 4) La aparición de mecanismos de formación de patrones anatómicos.

El sistema nervioso de los equinodermos desempeña un papel crucial en la regeneración dada su capacidad de autorregeneración y su acción como promotor o inductor del resto de los procesos regenerativos (Mashanov et al. 2008, 2015; San Miguel-Ruiz et al. 2009). En especial se destaca su contribución al desarrollo de los componentes del musculo esquelético y la liberación de factores regulatorios (Patruno et al. 2001, 2002; Thorndyke et al. 2001; Candia Carnevali 2006). Se han descrito un gran número de factores neurohumorales de acción paracrina y autocrina que están implicados en la regeneración, entre ellos, neurotransmisores como la dopamina y la serotonina; neuropéptidos como la sustancia P, SALMFamina1 (S1), SALMFamina2 (S2), NDGF (nerve-derived growth factors), y algunos miembros de la superfamilia TGF β como los péptidos BMP, NGF y FGF $_2$ (Thorndyke y Candia Carnevali 2001).

Los equinodermos como un modelo animal estratégico para el estudio de los factores neurotróficos

Los equinodermos son un grupo monofilético de invertebrados marinos y bentónicos. Actualmente, este grupo se divide en cinco clases diferentes: los Crinoideos o lirios de mar, los Asteroideos o estrellas de mar, los Ofiuroideos, los Holoturoideos o pepinos de mar, y los Equinoideos o erizos de mar (Swalla y Smith 2008) (Figura F). Estos organismos presentan simetría pentarradial secundaria, es decir, que los individuos adultos desarrollan una simetría radial formando cinco regiones similares que se disponen alrededor de un disco central (Swalla y Smith 2008).

La reproducción en los equinodermos es externa, es decir, que los individuos sexualmente maduros liberan sus gametas al agua de mar en donde se produce la fecundación. Luego de un corto periodo de tiempo, emergen las larvas de hábitos planctónicos y simetría bilateral. El estadio larval se mantiene por varias semanas hasta que las mismas son competentes y logran asentarse para iniciar el proceso de metamorfosis que las convertirá en individuos juveniles pentarradiales y de hábitos bentónicos (Eckert 1998).

Una de las características más importantes para este modelo animal, es su pertenencia al grupo de los deuterostomados, ya que los posiciona evolutivamente más cerca a los vertebrados que otros grupos de invertebrados (Figura E). Por estas similitudes, los equinodermos han sido utilizados para la experimentación en diversas disciplinas como la embriología, la fisiología, la ecotoxicología, la regeneración de tejidos, etc. (Rubilar y Crespi-Abril 2017).

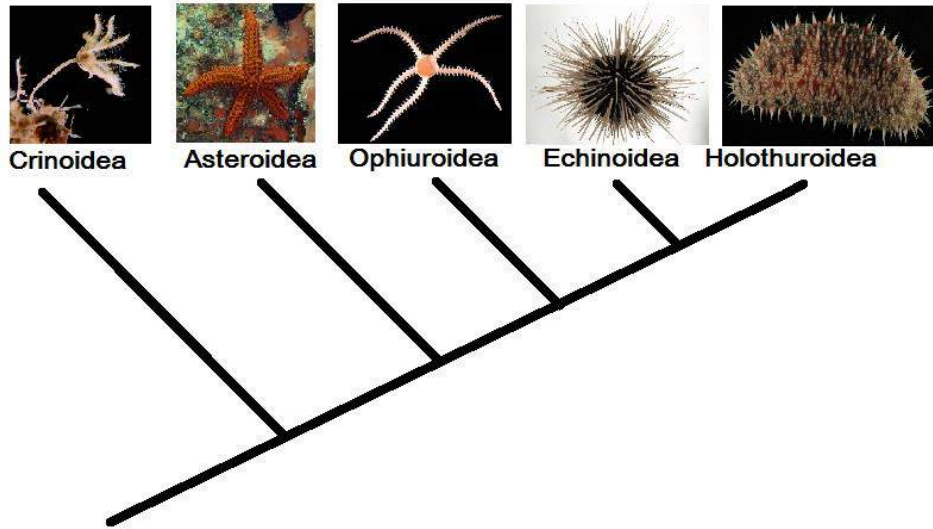


Figura F. Clasificación de equinodermos. Tomado de Alvarado y Solís-Marín (2013).

Los embriones de equinodermos, en especial los provenientes de estrellas de mar y erizos de mar, han sido estudiados por más de 100 años. Un ejemplo clásico son los estudios del proceso de fecundación y desarrollo embrionario que se iniciaron utilizando las gametas de erizos de mar (Metchnikoff 1893). La simplicidad de su desarrollo temprano provee una excelente oportunidad para estudiar mecanismos de especificación celular y morfogénesis. Como resultado de esta larga trayectoria, los equinodermos han contribuido al entendimiento de muchos mecanismos del desarrollo, incluyendo aquellos que regulan la expresión génica, los que determinan el linaje celular específico, y aquellos que regulan los eventos morfogénéticos que dan origen al embrión temprano (McClay 2011).

Asimismo, existen numerosos trabajos que utilizan estos organismos como modelo para estudiar la regeneración de sus tejidos, dado que este proceso se encuentra altamente facilitado en todos los integrantes de esta familia, tanto en adultos como en larvas (Vickery et al. 2001, 2002; Mashanov et al. 2014, 2015; Rubilar et al. 2015). El sistema nervioso de los equinodermos también presenta algunas semejanzas al de los vertebrados. A diferencia de la mayoría de los invertebrados en donde sólo se han descrito a las neuronas como único tipo celular del sistema nervioso, en los equinodermos y al igual que en los vertebrados, se han encontrado

evidencias de dos tipos celulares, las células nerviosas y las células gliales (Mashanov y Zueva 2018). Sin embargo, a diferencia de los mamíferos, el sistema nervioso de los equinodermos es capaz de regenerarse de forma rápida y eficiente luego de una lesión (Mashanov et al. 2008). Esta característica, sumada al fácil acceso al sistema nervioso en los estadíos larvales, los convierte en uno de los modelos animales más prometedores capaz de aportar nuevas ideas sobre la evolución a nivel celular y molecular de los procesos implicados en la reparación neuronal en deuterostomados. En particular, y dado que los TGF β han sido asociados al fenómeno de desarrollo y regeneración del sistema nervioso de equinodermos, es relevante el estudio de la presencia y las posibles funciones de los GFLs, integrantes de esta gran superfamilia. En especial del ligando GDNF, el cual ha sido asociado al desarrollo del Sistema Nervioso Entérico de mamíferos que guarda gran similitud al sistema nervioso de los equinodermos.

Por las razones descriptas, para este trabajo de investigación, se ha elegido como modelo animal para estudiar el efecto de los factores neurotróficos, a larvas de erizos de mar de la especie *Arbacia dufresnii*. Esta especie, además de ser autóctona de la región sudamericana y logísticamente accesible, ha sido estudiada durante varios años por nuestro grupo de investigación. Se han descripto varios aspectos reproductivos y metabólicos de los individuos adultos que sientan las bases para profundizar en el estudio embriológico de su descendencia (Figura G)(Epherra 2010; Epherra et al. 2015a, b; Parra et al. 2015; Mashanov et al. 2016; Rubilar et al. 2016; Zárate et al. 2016).



Figura G. Individuo adulto de *Arbacia dufresnii*. Tomado de Laboratorio de Oceanografía Biológica CESIMAR CCT CENPAT CONICET.

Objetivo general

El objetivo general de este trabajo de tesis es estudiar los efectos que ejerce la familia de factores neurotróficos GFLs en el desarrollo larval y la regeneración del invertebrado deuterostomado *Arbacia dufresnii*.

Capítulo 1:
Cultivo y desarrollo de embriones y
larvas de *Arbacia dufresnii*

Introducción del capítulo 1

Los Equinodermos son un taxón de invertebrados exclusivamente marinos y de hábitos generalmente bentónicos. Estos organismos son extremadamente diversos y pueden hallarse desde las zonas intermareales hasta las profundidades de los océanos de todo el mundo. En los ecosistemas marinos ocupan un rol fundamental y con frecuencia, representan una gran proporción de la biomasa (Hendler et al. 1995; Ruppert et al. 2004; Pérez et al. 2014).

Este taxón se caracteriza por tener un celoma bien desarrollado; un endoesqueleto calcáreo que puede proyectarse hacia afuera en forma de espinas y otros apéndices; un tejido conectivo mutable que permite cambios en la consistencia del cuerpo; y un sistema acuífero, que permite la locomoción, la alimentación y el intercambio gaseoso, conectándose al exterior a través de una placa porosa o madreporito. Asimismo, también se caracterizan por su incapacidad para la osmorregulación y la gran facilidad para la regeneración de sus tejidos (Ruppert et al. 2004; Pérez et al. 2014).

Una de las características más sobresalientes de los equinodermos es su simetría pentarradial secundaria. En los estadios larvales, estos organismos tienen una organización bilateral definida, con una zona anterior que concentra una gran proporción del sistema nervioso además de estructuras sensoriales, y laterales simétricos respecto a su plano sagital (Hinman y Burke 2018). Luego de la metamorfosis, en los juveniles y adultos, la organización de las estructuras adopta una simetría radial pentámera, es decir, con cinco secciones idénticas distribuidas alrededor de un disco central y un eje oral-aboral definido. En la zona oral se ubica la boca que suele estar en contacto con el sustrato y en la zona opuesta o aboral se encuentra el periprocto, donde se ubica el ano, cinco pequeñas placas ocelares y cinco placas genitales con sus gonoporos, siendo una de estas placas la que funciona además como madreporito (Ruppert et al. 2004; Pérez et al. 2014).

Filogenéticamente, los equinodermos son uno de los pocos grupos de invertebrados que pertenecen al clado de los Deuterostomados. Los estudios tradicionales y los recientes avances moleculares concuerdan en que los Deuterostomados constituyen un supertaxón monofilético que incluye a tres filos: los Cordados, los Hemicordados y los Equinodermos. A su vez, los Hemicordados y Equinodermos se agrupan formando el clado de los Ambulacra, que es considerado un grupo hermano al linaje de los Cordados (Figura 1.1) (Turbeville et al. 1994; Swalla y Smith 2008).

Los primeros restos fósiles de equinodermos datan de principios del Cámbrico, hace unos 540 millones de años, y según estos registros hay alrededor de 13000 especies extintas. En la actualidad existen alrededor de 7300 especies, que se agrupan en las cinco clases ya mencionadas: Crinoidea, Asteroidea, Ofiuroidea, Holoturoidea y Equinoidea (Swalla y Smith 2008). Actualmente se conocen alrededor de mil especies de erizos de mar, distribuidas en todos los mares y generalmente en poblaciones con altas densidades de individuos (Kroh y Mooi 2011; Appeltans et al. 2012).

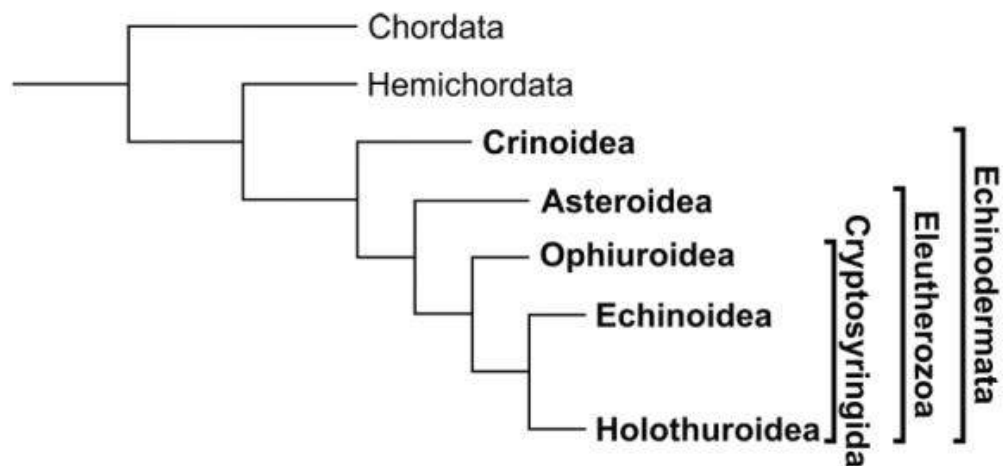


Figura 1.1. Posición filogenética de Echinodermata dentro de Deuterostomia y la clasificación dentro de Echinodermata. Tomado de Mashanov et al. (2016).

Ciclo reproductivo de los equinoideos

La reproducción de los erizos de mar es de tipo sexual y los individuos son normalmente gonocóricos, es decir con sexos separados en individuos machos y hembras. Existen algunos individuos hermafroditas, pero su frecuencia es muy baja, generalmente menor a dos por cada mil individuos (Pearse y Cameron 1991). Cada organismo posee cinco gónadas ubicadas en las zonas interambulacrales, las cuales cumplen dos funciones importantes, producen las gametas a partir de las células germinales y acumulan nutrientes en las células somáticas fagocitarias (Walker et al. 2013).

El ciclo reproductivo de los equinoideos está caracterizado por un patrón estacional de desarrollo gamético, seguido por un desove sincronizado (Walker et al. 2013). En la mayoría de las especies de zonas templadas, estos ritmos gametogénicos son anuales, y durante la época de desove existen uno o más eventos de liberación de las gametas (Pearse y Cameron 1991; McClary y Barker 1998). Este ciclo reproductivo se encuentra regulado por una compleja interacción entre factores endógenos y exógenos (Pearse y Cameron 1991; Walker et al. 2013).

Entre los factores endógenos, la cantidad y calidad de alimento determina el estado nutricional de los individuos y esto afecta directamente a su desarrollo gonadal (Ebert 1968; Vadas 1977; Thompson 1983; Keats et al. 1984; Lemire y Himmelman 1996; Walker y Lesser 1998; Rubilar et al. 2016). Los lípidos, las proteínas y los carbohidratos, son las reservas de nutrientes más importantes de los equinodermos (Pearse y Giese 1966; Lawrence y Guille 1982; McClintock y Pearse 1987; McClintock et al. 1990). Las células fagocitarias presentes en las gónadas de los erizos de mar acumulan dichos nutrientes provenientes de la alimentación, y luego éstos son transferidos durante la gametogénesis aportando la energía y los nutrientes necesarios para la formación de las gametas (Walker y Lesser 1998). Debido a que la disponibilidad de alimento varía con las regiones que habitan, en diferentes poblaciones de erizos de mar pueden encontrarse

distintas condiciones nutricionales que se reflejan celular y bioquímicamente en la calidad y cantidad de sus gametas (Epherra et al. 2015a; Harrington et al. 2007; Lawrence 2013; Parra et al. 2015; Rubilar et al. 2016).

Entre los factores exógenos, son de gran importancia el fotoperiodo y la temperatura del agua de mar, ya que en especies de aguas templadas es fundamental coordinar el momento de fecundación con las mayores probabilidades de supervivencia de la descendencia (Mercier y Hamel 2009; Bronstein y Loya 2015). Debido a que la gametogénesis debe iniciarse antes de que las condiciones ambientales sean óptimas para el desarrollo de su descendencia, el fotoperiodo suele actuar como un factor determinante para comenzar la gametogénesis. La disminución de horas de luz en el otoño, suele desencadenar el comienzo de este proceso en los erizos de mar de agua templada (Pearse y Walker 1986; Pearse et al. 1986). Por otro lado, la temperatura del agua de mar determina las tasas de los procesos biológicos, modificando la velocidad de las reacciones químicas en todos los ciclos de la vida.

Las gametas

Los espermatozoides maduros poseen las tres estructuras clásicas: la cabeza, la zona media y la cola (Figura 1.2a). En la cabeza se encuentra el material genético haploide y es la única zona que ingresa al óvulo durante la fecundación; la zona media, es rica en mitocondrias y proporciona la energía para la movilidad; y la cola es la estructura más larga, y está compuesta por un filamento axial que genera el movimiento del espermatozoide. En el equinoideo *Arbacia punctulata* los espermatozoides completos miden alrededor de 49 μm , de los cuales 45 μm pertenecen a la cola (Harvey y Anderson 1943). El esperma en la suspensión concentrada en que es expulsado por los gonoporos se encuentra inicialmente inmóvil, y al entrar en contacto con el agua de mar, se activa y comienza a moverse vigorosamente. Esta actividad se mantiene durante un corto periodo de tiempo en el cual el espermatozoide deberá nadar hasta encontrarse con el óvulo y fertilizarlo. Por esta razón, para las fecundaciones *in vitro*, el esperma debe recolectarse en seco, es

decir sin entrar en contacto con el agua de mar, y conservarse en frío, para preservarlo de la activación prematura hasta su utilización (Lillie 1915; Hayashi 1946; Levitan et al. 1991).

Los óvulos maduros son esféricos y uniformes en tamaño, poseen un núcleo haploide, pequeño y claro que generalmente ocupa una posición excéntrica (Czihak 1975). Ambas divisiones meióticas se completan dentro de los ovarios, por lo que incluso dentro de la gónada madura las gametas femeninas se consideran óvulos (Hoadley 1934; Czihak 1975). En el citoplasma se encuentran gránulos nutritivos de vitelo que están uniformemente distribuidos, otros gránulos de mayor tamaño compuestos por el pigmento rojo equinocroma, un derivado de la vitamina K (McClendon 1912; Cannan 1927) y gránulos corticales que tienen una importante función durante la fecundación. Externamente, la membrana plasmática se encuentra recubierta por una capa vitelina y una matriz extracelular o envoltura gelatinosa (Figura 1.2b).

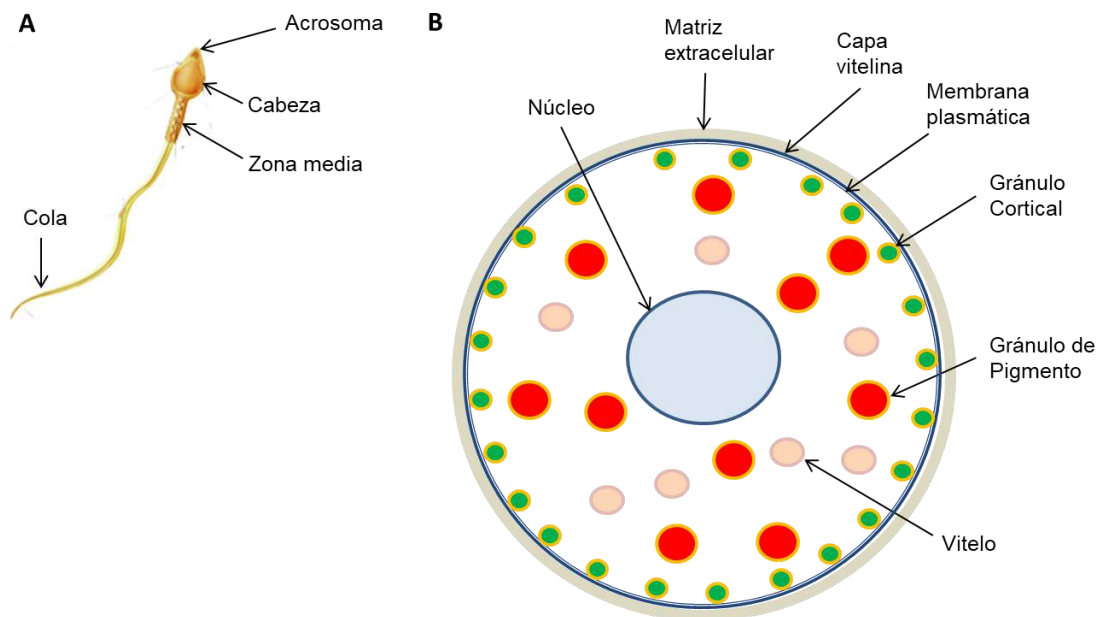


Figura 1.2. A) Espermatozoide. B) Óvulo.

La fecundación

Durante la fecundación, las gametas femenina y masculina de naturaleza haploide se fusionan para dar lugar a una única célula diploide, conocida como cigoto, que a partir de ese momento comienza su desarrollo para convertirse en un embrión.

En los equinodermos la fecundación es externa, las gametas se liberan al medio acuoso en donde ocurre el reconocimiento y la fusión. Se ha reportado que la liberación de espermatozoides estimula a las hembras de la misma especie a desovar permitiendo la sincronización del desove y la fecundación (Reuter y Levitan 2010).

El ingreso del espermatozoide al óvulo produce una serie de cambios profundos en la organización del óvulo que garantizan la fecundación y la viabilidad del cigoto resultante. Al alcanzar la superficie del óvulo, el espermatozoide inicia la reacción acrosomal, liberando enzimas hidrolíticas sobre la matriz extracelular del óvulo. Estas enzimas digieren los componentes de la matriz permitiendo al espermatozoide acceder a la membrana vitelina. Una vez alcanzada esta membrana, el espermatozoide y el óvulo se reconocen mediante proteínas específicas presentes tanto en el proceso acrosomal como en la membrana vitelina del óvulo. Este mecanismo de reconocimiento es de crucial importancia en los organismos con fecundación externa, dado que tanto óvulos como espermatozoides pueden encontrarse en el medio con gametas de otras especies (Eddy y Shapiro 1979).

Esta unión mediada por las proteínas de reconocimiento, permite al espermatozoide fusionarse con el óvulo, formando el **cono de fecundación**. Inmediatamente después de este evento, el óvulo experimenta dos reacciones que previenen que espermatozoides adicionales puedan fusionarse con el mismo. La primera reacción de bloqueo es rápida y de corta duración, y consiste en un ingreso de iones Na^+ que cambia la polaridad eléctrica de la membrana del óvulo y evita temporalmente que un segundo espermatozoide pueda fusionarse (Lillie 1915; Harvey y Anderson 1943; Lennarz y Vacquier 1982).

Mientras permanece este efecto protector, un segundo mecanismo más lento

pero de larga duración comienza a desarrollarse. Desde los reservorios intracelulares se liberan iones de Ca^{2+} en el citoplasma del óvulo. Este aumento en la concentración de Ca^{2+} citoplasmática activa al óvulo metabólicamente, a la vez que desencadena la fusión de los gránulos corticales con la membrana plasmática del mismo, fenómeno que se conoce como reacción cortical. La liberación del contenido de los gránulos en el espacio extracelular, altera la estructura de la membrana vitelina que se eleva rápidamente desde la superficie del óvulo formando el espacio perivitelino. Esta membrana sufre además una serie de cambios estructurales y como consecuencia de ello se endurece y se engrosa, pasando a llamarse **membrana de fecundación**. En la superficie del óvulo, la membrana plasmática sufre una serie de modificaciones dependientes de Ca^{2+} y pasa a llamarse membrana hialina. Esta última, envuelve al cigoto y más tarde, mantiene unidos a los blastómeros del embrión (Lillie 1915; Harvey y Anderson 1943; Lennarz y Vacquier 1982) (Figura 1.3).

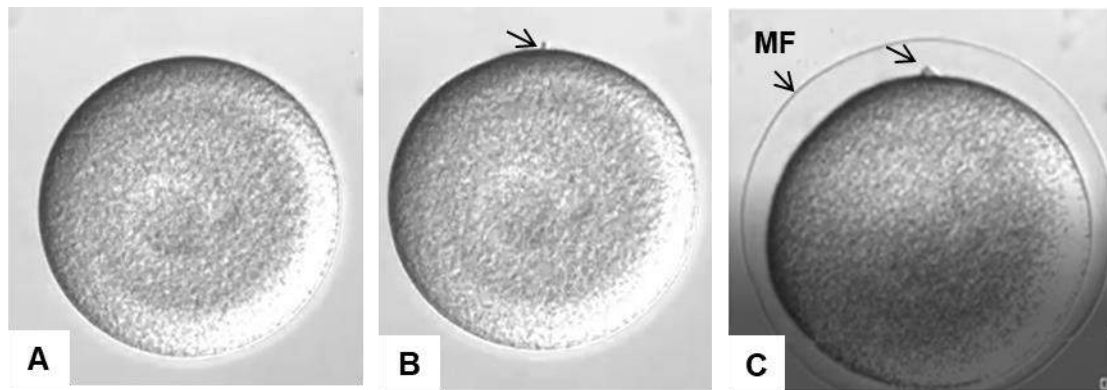


Figura 1.3. Fecundación. A) Óvulo sin fecundar. B) Óvulo recién fecundado. Observe la formación del cono de fecundación (flecha). C) Formación de la membrana de fecundación (MF), observe como persiste el cono de fecundación (flecha derecha). Tomado de Terasaki (2013).

Poliespermia

El fenómeno de poliespermia se observa cuando más de un espermatozoide logra penetrar en el óvulo antes de que ocurran los eventos de bloqueo. Este suceso da como resultado un cigoto con un desbalance en el contenido genético, que ocasiona el desarrollo de un embrión anormal e inviable (Morgan 1982; Wong y Wessel 2004).

Existen una serie de variables que pueden afectar el proceso de la fecundación. Bajo condiciones experimentales, la concentración de esperma, el tiempo de exposición de las gametas y el envejecimiento de las mismas son factores determinantes para el éxito de la fecundación (Rahman et al. 2001, 2016; Meidel y Yund 2001). Por ejemplo, se ha determinado que durante la fecundación, la concentración de óvulos no afecta significativamente la aparición de la poliespermia (Levitan et al. 1991; Rahman et al. 2001). Sin embargo, la exposición de los óvulos a altas concentraciones de esperma produce un aumento en la aparición de este fenómeno (Morgan 1982). Por otra parte, otras condiciones de cultivo como la salinidad y la calidad del agua de mar, demostraron ser factores determinantes en *Paracentrotus lividus* y *Lytechinus pictus* (Jonczyk et al. 2001; Carballeira et al. 2011).

Desarrollo embrionario y larval

Los embriones de equinodermos, en especial los provenientes de estrellas y erizos de mar, han sido estudiados por más de 170 años. Como resultado de esta larga trayectoria, los equinodermos han contribuido al entendimiento de muchos mecanismos del desarrollo embrionario (Rubilar y Crespi-Abril 2017). Un ejemplo clásico son los estudios de la fecundación y el desarrollo embrionario que se iniciaron utilizando las gametas de erizos de mar (Metchnikoff 1893). Posteriormente, la descripción de la morfología y la bioquímica de los estadios tempranos del desarrollo (Williams y Anderson 1975), y actualmente este modelo animal es frecuentemente utilizado para estudios de genética molecular (Hinman y Burke 2018). Estos nuevos análisis se centran en el estudio de los mecanismos de expresión génica que determinan territorios específicos en el cigoto, y regulan los eventos morfogenéticos del embrión temprano (McClay 2011).

Las razones por las que estos organismos han sido el modelo embriológico por excelencia son múltiples. El desarrollo temprano entre los equinodermos y los vertebrados tiene muchas características en común, dado que ambos pertenecen al clado de los Deuterostomados. Son organismos fáciles de conseguir ya que habitan en casi todas las costas marinas. La inducción del desove es sencilla y se obtiene una gran cantidad de óvulos, los cuales pueden ser fertilizados inmediatamente luego del desove ya que han completado la meiosis en los ovarios de las hembras. La fecundación es un proceso simple. El desarrollo embrionario normalmente es satisfactorio, sincrónico y necesita de pocos cuidados para su mantenimiento. Los óvulos son capaces de absorber un gran número de químicos, lo que los hace un modelo interesante para estudios farmacológicos. Además, son de pequeño tamaño y poseen poco vitelo lo que representa en ocasiones una ventaja en comparación con otros modelos utilizados en embriología, como los óvulos de anfibios y aves (Hinegardner 1969).

Desarrollo embrionario

Luego de la fecundación, en el cigoto quedan determinadas dos regiones bien definidas: el polo animal y el polo vegetal, ubicadas en ambos extremos de un eje axial (Angerer y Angerer 2000) (Figura 1.4 A). El desarrollo embrionario comienza con la segmentación del cigoto que en los equinodermos sigue un patrón holoblástico radial. La membrana hialina mantiene a los blastómeros unidos a medida que las divisiones ocurren (Giudice 1986; Gilbert 2000).

Los primeros tres clivajes dividen al embrión en ocho blastómeros de igual tamaño. Los planos de la primera y segunda división son meridionales, mientras que la tercera división es ecuatorial (Figura 1.4 B-D). En el cuarto clivaje, los cuatro blastómeros del polo animal se dividen meridionalmente, originando ocho blastómeros iguales, mientras que los cuatro blastómeros vegetales se dividen ecuatorialmente y en forma desigual, dando lugar a cuatro macrómeros de gran tamaño y cuatro pequeños micrómeros ubicados en el polo vegetal (Giudice 1986; Gilbert 2000) (Figura 1.4 E).

Luego del quinto y sexto clivaje, el embrión queda formado por sesenta y cuatro blastómeros y se encuentra en el estadio **Mórula**, que presenta una estructura compacta de células (Figura 1.4 F-G). Los blastómeros cercanos al polo animal se denominan an1 y an2. En la región central y vegetal del embrión se encuentran Veg1, Veg2 y los micrómeros. Posteriormente, los blastómeros an1, an2 y Veg1 formarán el ectodermo, los blastómeros Veg2 formarán el endodermo y los micrómeros formarán los componentes mesodérmicos, principalmente las estructuras esqueléticas (Giudice 1986; Gilbert 2000) (Figura 1.4 G).

A medida que las sucesivas segmentaciones ocurren, una cavidad central comienza a formarse. Inicialmente es imperceptible, pero luego del estadio de mórula comienza a aumentar su tamaño hasta ocupar el centro del embrión. Esta cavidad central se denomina blastocele y cuando se hace perceptible determina el estadio de **Blástula** del embrión (Figura 1.4 H). Las blástulas desarrollan cilios en su superficie y adquieren movilidad dentro de su membrana de fecundación (Figura 1.4 I). Unas

horas más tarde, se produce la eclosión de los embriones gracias a la acción de una enzima embrionaria que degrada dicha membrana. En el polo animal se desarrolla un largo cilio que les permite nadar libremente. En estadíos avanzados de la blástula, las células del polo animal se engrosan y forman el plato apical. En el polo vegetal, las paredes de la blástula se aplanan y las células de los micrómeros migran hacia el interior de la cavidad para formar un mesénquima rudimentario que luego dará origen al esqueleto (Gilbert 2000) (Figura 1.4 J).

Horas más tarde, comienza la **Gastrulación** que dará como resultado a un embrión con las tres capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo (Figura 1.5 A). El proceso se inicia cuando las células del polo vegetal se invaginan formando un hueco o Blastoporo, y se organizan dentro del blastocele formando un tubo ciego o Arquenterón (Figura 1.5 B). El blastoporo se convertirá en el ano del organismo, una característica distintiva de todos los organismos Deuterostomados. El arquenterón se elongará dirigido por las células mesenquimales que se encuentran en el blastocele, y alcanzará un extremo del embrión abriendo la cavidad ciega y transformándose en el primordio del tubo digestivo de la larva. Posteriormente, el arquenterón presentará dos constricciones que lo dividirán en las regiones de esófago, estómago e intestino (Gilbert 2000; Rahman et al. 2012) (Figura 1.5 C).

A partir de este momento, el organismo pasa por un corto periodo de **larva Prisma o Plánula**, en donde comienza a elongarse en el eje anteroposterior, aparece una banda ciliar que rodea el perímetro del mismo y de la zona oral y el sentido del movimiento natatorio cambia (Gilbert 2000).

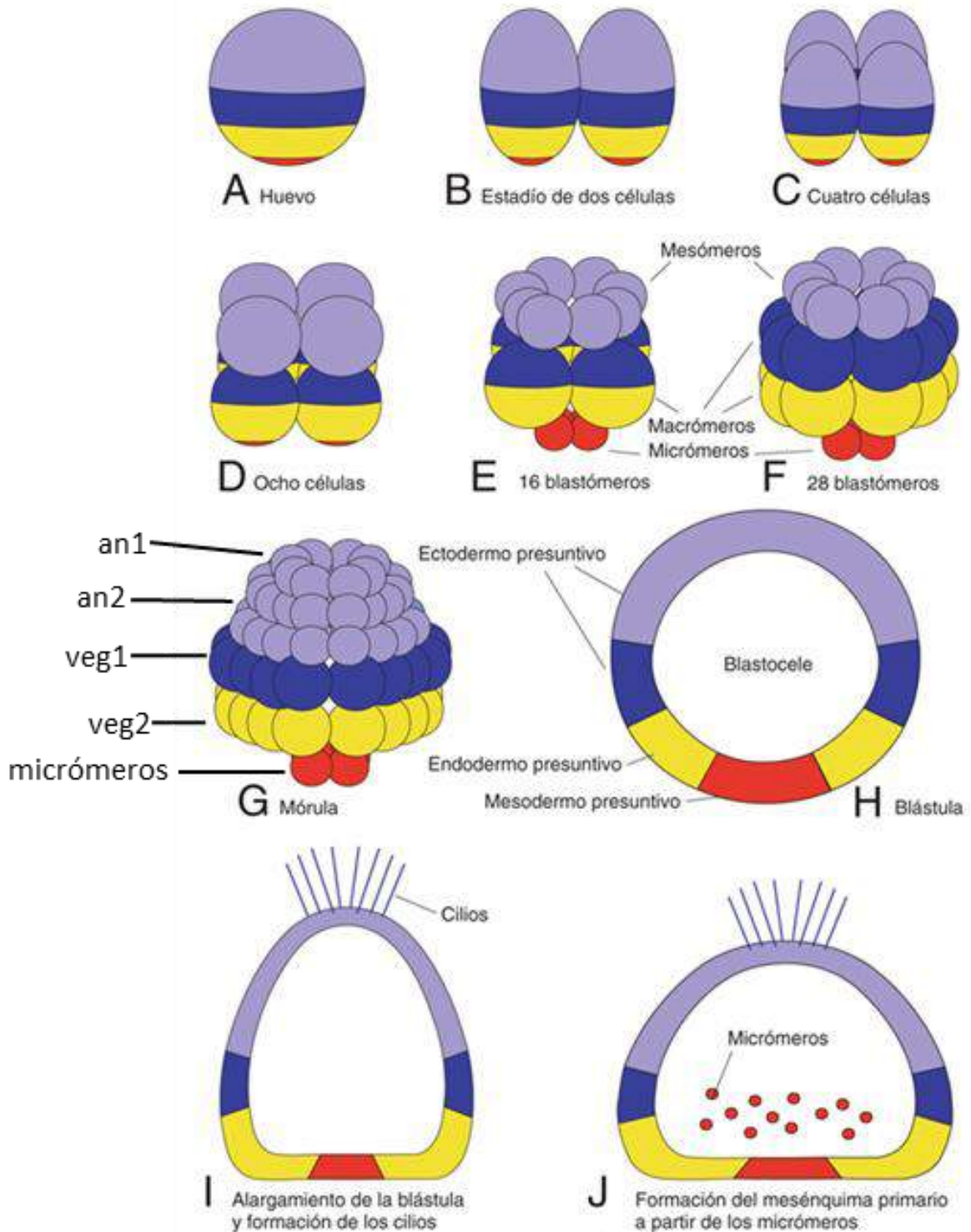


Figura 1.4. Desarrollo embrionario temprano del erizo de mar. Observe la delimitación del Polo Animal (PA) y el Polo Vegetal (PV). Tomado de Paniagua et al. (2017).

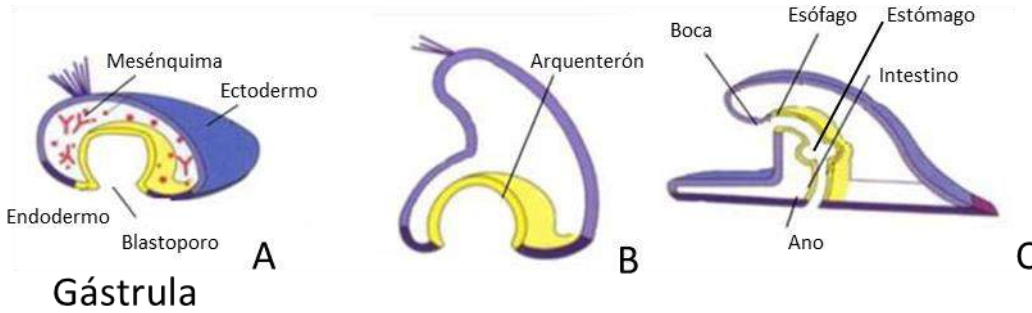


Figura 1.5. Desarrollo embrionario tardío. Tomado y modificado de Paniagua et al. (2017).

Desarrollo larval

Pocas horas más tarde, la larva entra en el estadio de **larva Pluteus**. Durante este estadio, el plato apical crece hacia la zona ventral, formando el lóbulo oral que incluye al estomodeo y la parte anterior del esófago (Williams y Anderson 1975; Giudice 1986). Aparecen dos pequeñas protuberancias que se elongan desde la zona ventral y darán origen a los brazos post-orales. Posteriormente, desde la zona dorsal se desarrolla el segundo par de brazos o brazos pre-orales. Simultáneamente se desarrollan las espículas que se extienden a lo largo de los brazos post-orales, pre-orales, dorsalmente atravesando al cuerpo y ventralmente, formando el esqueleto de la larva. Cada espícula está formada por tres o cuatro varillas de esqueleto unidas por barras transversales (Williams y Anderson 1975; Giudice 1986).

La larva continúa elongándose en dirección anteroposterior. En la zona posterior las espículas post-orales se unen en forma de punta o extremo apical. El tubo digestivo formado por la boca, el esófago, y el estómago, adquiere forma de la letra Jota. El estómago se expande adoptando forma esférica y ocupando gran parte del cuerpo de la larva pluteus, y se desarrollan los músculos que controlan los movimientos del tubo digestivo (Williams y Anderson 1975; Giudice 1986) (Figura 1.6).

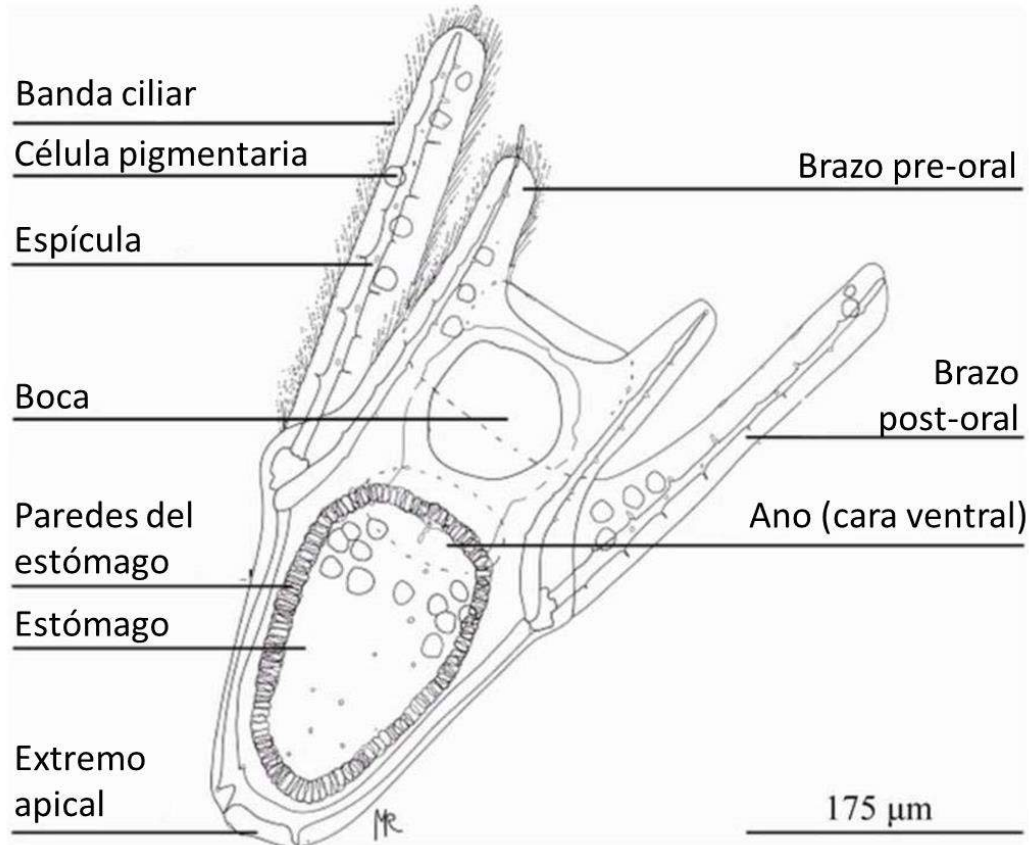


Figura 1.6. Esquema de la larva pluteus de 4 brazos. Tomado y modificado de Rock et al. (2011).

De esta manera, el desarrollo de la larva pluteus implica grandes cambios en la forma del ectodermo, el crecimiento del esqueleto, la subdivisión del tubo digestivo y la diferenciación a múltiples tipos celulares. La larva pluteus posee locomoción y se alimenta de fitoplancton (Rahman et al. 2012).

Este estadio se continúa por varias semanas, en las cuales la larva pluteus desarrolla entre ocho y diez brazos y acumula suficiente energía para la siguiente etapa del desarrollo, la **Metamorfosis**. Durante este último proceso, la larva se transforma en un individuo juvenil (Williams y Anderson 1975) (Figura 1.7).

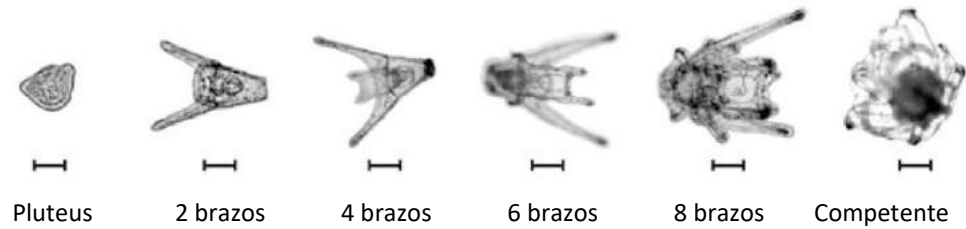


Figura 1.7. Desarrollo larval del erizo de mar. Barra de escala 100 μm . Tomado de Buitrago y Lodeiros Seijo (2005).

El desarrollo embrionario y larval de los erizos de mar es altamente dependiente del estado nutricional de sus progenitores (George et al. 1990, 2001; George 1996; Repolho et al. 2011). Es decir, que las reservas nutricionales obtenidas por la hembra durante el desarrollo de los óvulos (Brooks y Wessel 2003), y las condiciones ambientales del agua de mar en donde habita (Bressan et al. 1995; Sewell y Young 1999; Denny et al. 2002; Carballeira et al. 2011), entre otros factores, determinan las probabilidades de supervivencia de su descendencia.

*El equinoideo *Arbacia dufresnii**

El erizo de mar *Arbacia dufresnii* (Blainville, 1825), es un equinoideo abundante en el Mar Argentino y el Chileno, y es la única especie del género *Arbacia* que habita ambas costas de Sudamérica (Lessios et al. 2012). Se distribuye desde la desembocadura del Río de la Plata, Argentina (35° S) hasta Puerto Montt, Chile (42° S), incluyendo la Antártida e islas Malvinas (Bernasconi 1966). Ocupa un rango de profundidades que va desde los 0 a los 315 m (Brogger et al. 2013), y regularmente se lo encuentra en zonas de sedimentos gruesos y substratos duros. Este equinoideo es primariamente carnívoro, y modifica su presa en función del hábitat que ocupa (Penchaszadeh y Lawrence 1998; Penchaszadeh et al. 2004). Existen también poblaciones herbívoras como las que habitan en las costas de la isla de Chiloé, Chile (Newcombe y Cárdenas 2012). En el Golfo Nuevo, Chubut, Patagonia argentina, los individuos de *A. dufresnii* pueden encontrarse ocupando suelos mixtos de arena y grava, así como también asociados a el alga *Macrocystis* sp., en donde comparten su hábitat con el erizo de mar *Pseudechinus magellanicus* (Bigatti et al. 2004; Penchaszadeh et al. 2004; Marzinelli et al. 2006).

En los últimos años, *A. dufresnii* ha sido objeto de varios estudios científicos. En la costa de la Patagonia argentina, se han realizado estudios sobre aspectos generales de la dieta (Penchaszadeh y Lawrence 1998), abundancia (Zaixso y Lizarralde 2000; Brogger et al. 2013), ciclo reproductivo (Brogger 2005; Brogger et al. 2010; Epherra et al. 2015a), composición gonadal (Díaz de Vivar et al. 2011; Latorre et al. 2012; Zárate et al. 2016), y su relación con el alga *Undaria pinnatifida* (Teso et al. 2009; Castro et al. 2013; Epherra, 2016). En las costas chilenas, se han realizado estudios sobre dieta del erizo en bancos de algas (Newcombe et al. 2012) y su distribución (Larrain et al. 1999).

La gametogénesis de *A. dufresnii* ocurre durante el otoño y el invierno (Brogger et al. 2010; Epherra et al. 2015a) en donde se registran las temperaturas más bajas del mar y el fotoperiodo más corto; y luego se produce un desove prolongado durante la primavera y el verano, que se correlaciona con un aumento en el fotoperiodo y

también en la temperatura del mar. Estos eventos coinciden con los florecimientos de fitoplancton de primavera y verano en el Golfo Nuevo (Esteves et al. 1981, 1992). Desde el comienzo del desove hasta el final puede observarse un incremento paulatino de la temperatura desde los 12°C al finalizar el invierno hasta los 17°C al finalizar el verano (Rivas et al. 2016).

En investigaciones previas, se ha descripto parcialmente el desarrollo embrionario y larval de *Arbacia dufresnii* en condiciones de cultivo (Bernasconi 1942, Brogger 2005). En estos trabajos, se encontró una velocidad de desarrollo similar al cultivar los organismos a altas temperaturas (entre 26 y 30 °C) (Bernasconi 1942, Brogger 2005). Sin embargo, en ambos casos los organismos detuvieron su desarrollo en estadios tempranos, presentaron signos importantes de estrés, como por ejemplo el deterioro de los tejidos y el esqueleto expuesto en la región de los brazos posteriores y posteriormente murieron, muy posiblemente porque la elevada temperatura del medio fue letal para los mismos. Adicionalmente, al cultivar los organismos a temperaturas menores (entre 11 y 13 °C) (Brogger 2005), se pudieron obtener organismos hasta el estadio de larva pluteus de cuatro brazos. Sin embargo, luego de los primeros cinco días de cultivo, nuevamente los organismos detuvieron su desarrollo y posteriormente murieron mostrando signos de estrés, en este caso posiblemente por la falta de esterilidad del agua de mar utilizada.

Debido a que el modelo animal utilizado en este trabajo de tesis son las larvas de *A. dufresnii*, es de crucial importancia profundizar en el conocimiento de su desarrollo, así como también, conocer las condiciones de cultivo en laboratorio que permitan obtener organismos saludables, es decir, con una buena supervivencia y vitalidad, y sin signos de estrés aparentes. Por lo tanto, el objetivo específico de este capítulo de tesis será describir en detalle el desarrollo embrionario y larval de *A. dufresnii* y desarrollar un protocolo de cultivo en laboratorio que permita obtener larvas saludables.

Materiales y métodos del capítulo 1

Optimización de la metodología para el cultivo de embriones y larvas de *Arbacia dufresnii*

Como punto de partida, se realizó la puesta a punto de la metodología para la obtención de embriones y larvas saludables, tomando como referencia trabajos de otros autores (Ettensohn et al. 2004; Strathmann 2014; Ettensohn 2017), y adaptando estas consideraciones a las condiciones de acuario y a la población de *Arbacia dufresnii* que habita en el Golfo Nuevo, Argentina.

Se utilizaron individuos adultos progenitores de *A. dufresnii* recolectados en las cercanías de Punta Cuevas, en el Golfo Nuevo, Provincia del Chubut mediante buceo subacuático, durante la temporada de desove que abarca las estaciones de primavera y verano. Los individuos fueron aclimatados a las condiciones de acuario por 24 h, se induce el desove de hembras y machos a partir de una inyección, a través de la membrana peristomial, de aproximadamente 0.5 ml de KCl 0.5 M.

Efecto de la concentración de gametas sobre la eficiencia de la fecundación

Dado que experimentalmente la concentración óptima de esperma por volumen de líquido y/o por cantidad de óvulos varía según la especie utilizada y según la bibliografía consultada, se optimizó la eficiencia de la fecundación en la población de *A. dufresnii* del Golfo Nuevo con respecto a las concentraciones de gametas.

Para ello, se indujo el desove de tres hembras y tres machos recolectados en el mes de febrero. Las gametas femeninas se mezclaron en un único recipiente, y se cuantificó por triplicado bajo lupa binocular y en cámara de Sedgewick Rafter. Las

gametas masculinas se recogieron en seco, es decir, sin permitir que entren en contacto con el agua de mar, se colocaron en un único recipiente, y se conservaron en frío hasta su utilización. La fecundación se realizó bajo condiciones controladas y a una temperatura de 17°C, similar a la temperatura hallada en el medio natural en la misma fecha.

Se realizaron fecundaciones en 100 ml de agua de mar, combinando 3 concentraciones de óvulos con 3 concentraciones de esperma (v/v: volumen de esperma seco en volumen de agua de mar):

Óvulos:	1: 500.000
	2: 50.000
	3: 5.000
Esperma:	A: 1:1000 v/v
	B: 1:4000 v/v
	C: 1:100.000 v/v

Transcurridos 30 minutos, se tomaron alícuotas de los 9 tratamientos y se observaron en microscopio de campo claro Leica DM5200 a 10X. Se consideraron óvulos fecundados a los que presentaron una membrana de fecundación visible y/o un cono de fecundación. Los óvulos dañados y los que no formaron dicha membrana se consideraron no fecundados. El porcentaje de fecundación se calculó según la fórmula:

$$\% \text{ Fecundación} = (\text{Óvulos fecundados} / \text{óvulos totales}) * 100$$

Efecto de la temperatura y el origen parental sobre desarrollo embrionario y larval de *Arbacia dufresnii*

Dado que la especie utilizada tiene un periodo de desove prolongado durante la primavera y el verano, se analizó la temperatura óptima para el desarrollo embrionario y larval utilizando dos temperaturas correspondientes a las halladas en el medio natural en las estaciones de desove. Adicionalmente, y debido a que el estado nutricional de hembras determina la calidad de sus gametas, se analizó el efecto parental, evaluando por separado el desarrollo embrionario y larval de las progenies de cada hembra.

Se indujo el desove de cuatro hembras maduras y los óvulos de cada una se dividieron en dos tratamientos de temperatura (12°C y 17°C), formando ocho grupos experimentales. Se fecundaron según la proporción óptima hallada en la sección 1.1.

Se cuantificó el porcentaje de fecundación, el porcentaje de embriones de cada estadio del desarrollo de cada progenie, en cada temperatura, entre las 0.5 h y 48 h post-fecundación (hpf) y se determinó la supervivencia embrionaria durante las primeras 12 h. Se midió el crecimiento larval para cada uno de los tratamientos, utilizando como indicadores la longitud del cuerpo (LC) y la longitud total de la larva (LT) entre los 2 y 22 días post-fecundación (dpf) (Figura 1.8).

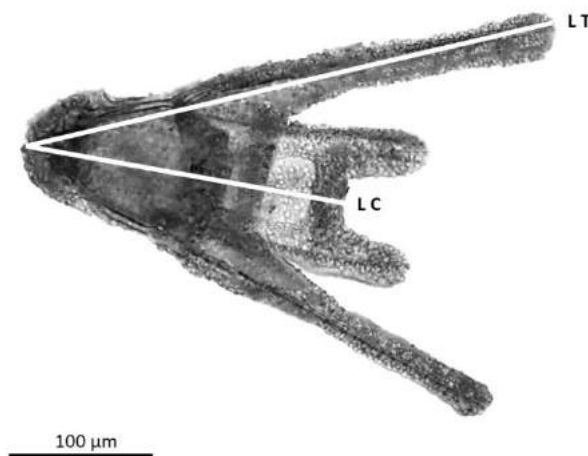


Figura 1.8. Mediciones realizadas en las larvas de *Arbacia dufresnii*. LT: Longitud total, LC: Longitud del cuerpo.

Selección del análisis estadístico de los datos

Para analizar las diferencias de fecundación y supervivencia de los embriones entre los tratamientos se realizó un análisis de la varianza de una vía, previo a corroborar los supuestos de normalidad y homocedacia (Zar 1984).

Para analizar el efecto de la temperatura y el efecto parental en el desarrollo embrionario y larval de *A. dufresnii*, se aplicaron Modelos Lineales Generalizados (GLM) (McCullagh 1984). Estos modelos se utilizan cuando se analiza la relación entre una variable y los factores que la determinan, y son una extensión de los modelos lineales que permiten utilizar distribuciones no normales de los errores (Binomiales, Poisson, Gamma, Gaussiana, entre otras) y varianzas no constantes. Debido a que en este tipo de análisis no existe un único modelo válido, sino que existen varios modelos plausibles que puedan ajustarse a los datos, parte del análisis es la correcta selección del modelo.

En primera instancia se realizó una exploración de datos gráfica para comprender la relación entre la variable respuesta y cada una de las variables explicatorias. Luego, para comprobar el ajuste a los datos, se observó la cantidad de varianza explicada por el modelo, la desviación (D2), la cual nos da una idea de la variabilidad de los datos. Posteriormente se construyeron los modelos, desde el más simple sin ningún factor, hasta el más complejo que incluye la interacción entre los factores. Los modelos fueron analizados y finalmente se seleccionó el mejor, basado en tres criterios:

1. Criterio de información de Akaike (AIC del inglés Akaike Information Criterion):

Este índice evalúa tanto el ajuste del modelo a los datos como la complejidad del mismo. Cuanto más pequeño es el valor del AIC mejor es el ajuste. Este índice es muy útil para comparar modelos similares con distintos grados de complejidad o modelos iguales (mismas variables). Sólo los modelos que mostraron una diferencia menor o igual a dos con respecto al modelo de menor AIC se tuvieron en cuenta para los siguientes pasos del análisis.

2. Análisis de los residuos:

Los residuos son las diferencias entre los valores estimados por el modelo y los valores observados. Se analizaron los gráficos de residuos observados frente a residuos estimados. Estos pueden indicar falta de linealidad, heterocedasticidad (varianza no constante) y valores atípicos. También se realizaron gráficos de normalidad (q-q plot) de los residuos, que permiten contrastar la normalidad (simetría) de la distribución de los residuos. Se realizaron gráficos de residuos frente a variables explicativas, que permiten identificar si la falta de linealidad o la heterocedasticidad es debida a alguna variable explicativa.

3. Principio de parsimonia:

Se aplica este principio para seleccionar un modelo, de manera que el elegido debe ser tan simple como sea posible, es decir, que no debe contener parámetros o niveles de un factor que sean redundantes. El análisis de los tres principios se realizó utilizando el software libre R (R Core Team 2014)

Modelos Lineales Generalizados (GLM)

Para analizar el **desarrollo embrionario** de *A. dufresnii*, se estudió la abundancia de cada estadio embrionario en relación a los factores: tiempo, temperatura y progenie, y se construyeron 11 modelos, cada uno con su hipótesis nula:

- ✓ H1: la abundancia es independiente de todos los factores.
- ✓ H2: la abundancia es dependiente del factor tiempo.
- ✓ H3: la abundancia es dependiente del factor progenie.
- ✓ H4: la abundancia es dependiente del factor temperatura.
- ✓ H5: la abundancia es dependiente del factor temperatura y progenie de forma aditiva.
- ✓ H6: la abundancia es dependiente del factor tiempo y temperatura de forma aditiva.
- ✓ H7: la abundancia es dependiente del factor tiempo y progenie de forma

aditiva.

- ✓ H8: la abundancia es dependiente de la interacción de los factores temperatura y progenie.
- ✓ H9: la abundancia es dependiente de la interacción de los factores tiempo y temperatura.
- ✓ H10: la abundancia es dependiente de la interacción de los factores tiempo y progenie.
- ✓ H10: la abundancia es dependiente de la interacción de los factores tiempo, temperatura y progenie.
- ✓ H11: la abundancia es dependiente de los factores tiempo, temperatura y progenie.

Para analizar el **crecimiento larval** en relación a los factores: tiempo, temperatura y progenie, se construyeron 12 modelos analizando la longitud del cuerpo de la larva (LC) y 12 modelos analizando la longitud total de la larva (LT), cada uno con su hipótesis nula:

- ✓ H1: el largo es independiente de todos los factores
- ✓ H2: el largo es dependiente del factor tiempo
- ✓ H3: el largo es dependiente del factor progenie
- ✓ H4: el largo es dependiente del factor temperatura
- ✓ H5: el largo es dependiente del factor temperatura y progenie de forma aditiva
- ✓ H6: el largo es dependiente del factor tiempo y temperatura de forma aditiva
- ✓ H7: el largo es dependiente del factor tiempo y progenie de forma aditiva
- ✓ H8: el largo es dependiente de la interacción de los factores temperatura y progenie
- ✓ H9: el largo es dependiente de la interacción de los factores tiempo y temperatura
- ✓ H10: el largo es dependiente de la interacción de los factores tiempo y progenie
- ✓ H10: el largo es dependiente de la interacción de los factores tiempo,

temperatura y progenie

- ✓ H11: el largo es dependiente de los factores tiempo, temperatura y progenie
- ✓ H12: el largo es dependiente de la interacción de los factores tiempo, temperatura y progenie

La presencia de aditividad indica que los factores actúan en forma conjunta pero independiente. En cambio, la interacción indica dependencia de los factores.

Elaboración de un protocolo de cultivo de embriones y larvas de *Arbacia dufresnii*

A partir de los resultados obtenidos en las secciones 1.1 y 1.2, y las consideraciones técnicas que mejor se ajustaron a la especie de estudio (Ettensohn et al. 2004; Strathmann 2014; Ettensohn 2017), se elaboró un protocolo de cultivo para estos organismos que será utilizado en todo este trabajo de tesis.

Descripción del desarrollo larval y embrionario de *Arbacia dufresnii*

A partir del protocolo de cultivo elaborado, se realizó una fecundación y se describió el desarrollo embrionario y larval de *A. dufresnii* durante los primeros 22 dpf.

Se tomaron alícuotas desde el comienzo del desarrollo hasta el día 22, cuando la larva comienza a ser competente. Se fotografiaron *in vivo* en un microscopio de campo claro *Leica DM5200 a 20X*, el cual tiene adicionado un módulo con cámara digital y software Leica, que permite la obtención y edición de fotografías.

Puesto que a partir del estadio de blástula, estos organismos desarrollan cilios y se encuentran nadando, para tomar las fotografías se utilizó una superficie cubierta por gel de agarosa en PBS al 5%. Esta superficie permite la inmovilización de los

organismos temporalmente y sin comprometer su supervivencia, ya que no es tóxica, y al mismo tiempo mantiene hidratados a los organismos. Además, permite el paso de la luz del microscopio obteniendo imágenes de muy buena calidad (Figura 1.9)



Figura 1.9. Porta objeto con gel de agarosa con 5% $MgCl_2$, que tiene propiedades anestésicas, para inmovilizar y fotografiar *in vivo* a las larvas.

Resultados del capítulo 1

Efecto de la concentración de las gametas sobre la eficiencia de la fecundación

Los resultados obtenidos respecto al porcentaje de fecundación en cada combinación de óvulos y espermatozoides, junto a la observación del desarrollo embrionario al cabo de 3 h, permitió elegir la mejor combinación posible que garantice una fecundación eficiente (Tabla 1.1).

En los tratamientos con mayor cantidad de óvulos A1, B1 y C1 (500.000 óvulos/100 ml), los porcentajes de fecundación fueron los más bajos y luego de 3 h, se observó una gran cantidad de óvulos en degradación, embriones asincrónicos y/o con desarrollo anormal. En los tratamientos con concentraciones intermedias de óvulos A2, B2 y C2 (50.000 óvulos/100ml) se obtuvieron porcentajes muy altos de fecundación, incluso con la concentración más baja de esperma. Sin embargo, la observación del desarrollo mostró embriones normales sólo en el tratamiento con baja concentración de esperma (1:100.000), y embriones anormales y asincrónicos en los otros dos casos. En los tratamientos con baja cantidad de óvulos A3, B3 y C3 (5.000 óvulos/100 ml), los porcentajes de fecundación fueron altos en todas las condiciones. Al cabo de 3 h, pudieron observarse embriones sincrónicos en gran proporción en los estadios de cuatro y ocho células. En especial en el tratamiento con baja concentración de esperma se observó gran cantidad de organismos normales, y en los tratamientos con las concentraciones alta y media de esperma se encontraron también embriones con desarrollo anormal y células apoptóticas.

Por lo tanto, en las concentraciones alta y media de esperma utilizadas (1:1000 y 1:4000), se observó un alto porcentaje de fecundación, pero también una gran proporción de eventos de poliespermia, que puede evidenciarse por la gran cantidad de embriones con desarrollo anormal. Asimismo, en los tratamientos con las concentraciones alta y media de óvulos, se observó gran cantidad de células en

degradación, asincronía en el desarrollo embrionario y una coloración ámbar presente en el medio líquido, posiblemente por la gran cantidad de sustancias metabólicas disueltas en el medio.

El tratamiento con la menor concentración de esperma (1:100.000) y la menor cantidad de óvulos (5.000 óvulos/100 ml), mostró los mayores porcentajes de fecundación junto a las mayores proporciones de embriones normales y sincrónicos, siendo éste último la mejor combinación hallada para este ensayo.

Tabla 1.1. Efecto de la concentración de gametas sobre el porcentaje y calidad de la fecundación en *A. dufresnii*.

Concentración Esperma	Cantidad de Óvulos		
	1: 500.000 óvulos /100ml	2: 50.000 óvulos/100ml	3: 5.000 óvulos/100ml
A= 1:1000 v/v	A1 = 69% Embriones anormales y asincrónicos, Células en degradación Coloración ámbar	A2= 98% Embriones anormales y asincrónicos Coloración ámbar	A3= 100% Embriones normales y anormales
	B= 1:4000 v/v	B1= 32.9% Embriones anormales y asincrónicos Células en degradación Coloración ámbar	B2= 98.4% Embriones anormales y asincrónicos Coloración ámbar
C= 1:100.000 v/v		C1= 18.9% Embriones asincrónicos, Células en degradación Coloración ámbar	C2=99.7% Embriones normales y anormales Embriones asincrónicos

*Efecto de la temperatura y el origen parental sobre desarrollo embrionario de *Arbacia dufresnii**

En ambas temperaturas se registraron porcentajes de fecundación similares (ANOVA, $p=0,6782$) (Tabla 1.2) y de supervivencia (ANOVA, $p=0,9497$) (Tabla 1.3).

Tabla 1.2. Porcentaje de fecundación en diferentes temperaturas.

Tratamiento	% Fecundación
Total	77,26 ± 26,02
12°C	73 ± 22,45
17°C	81,53 ± 31,06

Tabla 1.3. Supervivencia de embriones durante las primeras 12 h en diferentes temperaturas.

Tratamiento	Supervivencia
12°C	0,859 ± 0,047
17°C	0,879 ± 0,041

La inspección de los datos por temperatura muestra que la abundancia de cada estadio embrionario varía en función de este factor. Existe una asincronía del desarrollo entre ambas temperaturas que se refleja en la dispersión y la abundancia (Tabla 1.4).

Tabla 1.4. Porcentajes de abundancia de estadios embrionarios en función del tiempo en horas a dos temperaturas diferentes (12 y 17°C) en *Arbacia dufresnii*.

Hs	Temperatura °C	Membrana de fecundación	2 células	4 células	>4 células	Mórula	Blástula	Gástrula	Larva Prisma	Larva Pluteus de 2 brazos
0,5	17	93								
	12	88								
2	17	20	59	11						
	12	55	35							
3	17	9	32	39	16					
	12	45	40	4						
4	17	5	3	12	70					
	12	33	42	10	5					
6	17	4			84					
	12	8	14	36	28					
12	17	3			5	77	1			
	12	4		7	43	34	13			
24	17					15	53			
	12			23	38	38				
30	17				10	57	44			
	12				31	54	2			
48	17				9	24	4	6	15	
	12				16	42	18			

De todos los modelos analizados se seleccionó el modelo que responde a la hipótesis 11: la abundancia de cada estadio embrionario es dependiente de los factores tiempo, temperatura y progenie (Tabla 1.5). A pesar de que el modelo que responde a la hipótesis 7 (Anexo, Figuras 1.15 y 1.16) es el que tiene un valor menor de Akaike, un análisis detallado de los residuos permite seleccionar el Modelo 11 (Anexo, Figuras 1.17 y 1.18). De esa forma, tanto el tiempo, como la temperatura y la progenie tienen un efecto en el desarrollo de *A. dufresnii* de forma aditiva (Tabla 1.6).

Tabla 1.5: Modelos propuestos para analizar las variables del desarrollo embrionario de *A. dufresnii*. Resaltado en negrita se observan los modelos con el mejor ajuste a los datos según el Criterio de información de Akaike (AIC).

	Modelo	Akaike
H1	Nulo	1257,17
H2	Tiempo	1257,04
H3	Progenie	1258,25
H4	Temperatura	1259,16
H5	Temperatura + progenie	1257,25
H6	Temperatura + tiempo	1258,02
H7	Tiempo + progenie	1254,64
H8	Temperatura x tiempo	1258,59
H9	Temperatura x progenie	1272,47
H10	Tiempo x progenie	1265,17
H11	Temperatura + tiempo + progenie	1256,63
H12	Temperatura x tiempo x progenie	1268,77

Tabla 1.6. Parámetros del modelo seleccionado Temperatura + tiempo + progenie. Donde “***”= 0, “**”= 0,001, “*”= 0,01, “.”= 0,05. Datos obtenidos mediante un análisis de GLM. Se observa significancia en la temperatura de 17°C y la progenie.

Coeficientes	Estimado	Error Estándar	Valor t	Pr(> t)	
Intercepto	30,6972	5,1489	5,962	0,227	
Temperatura 17°	-0,4643	4,6101	-0,101	0,0199	**
Tiempo	-0,2366	0,1483	-1,595	0,1131	
Progenie	13,022	5,69	2,289	0,0237	*

*Efecto de la temperatura y el origen parental sobre el crecimiento larval de *A. dufresnii**

Análisis de longitud total de la larva (LT)

La inspección de los datos de crecimiento larval muestra que las larvas en ambas temperaturas presentan una tendencia similar, sin embargo, a medida que los días pasan, las larvas con el tratamiento a mayor temperatura desarrollan una longitud mayor (Tabla 1.7, Figura 1.10).

De todos los modelos analizados se seleccionó el modelo que responde a la hipótesis 12: la longitud total de la larva es dependiente de la interacción de los factores tiempo, temperatura y origen de la progenie (Tabla 1.8). A pesar de que los modelos que responden a la hipótesis 8 (Anexo. Figuras 1.19 y 1.20) y 9 (Anexo. Figuras 1.21 y 1.22) presentaron valores casi similares de Akaike, éstos son una simplificación del Modelo 12 (Anexo. Figuras 1.23 y 1.24). Y aunque siguiendo el criterio de parsimonia se debería elegir un modelo más simple, al analizar

detalladamente los residuos es prácticamente imposible encontrar diferencias. Por lo tanto, se eligió el modelo de menor índice Akaike que además incluye a los otros dos modelos. De esa forma, tanto el tiempo, como la temperatura y el origen de la progenie tienen un efecto en la longitud total de las larvas de *A. dufresnii*. Este efecto es generado por una interacción entre los tres factores, de los cuales la temperatura y el origen de la progenie son significativos (Tabla 1.9).

Tabla 1.7: Longitud total (LT; en μm) en larvas de *A. dufresnii* registrado en función del tiempo en días a dos temperaturas diferentes (12 y 17°C).

Día	Estadío	LT 17°C		LT 12°C	
2	Pluteus 2-brazos	100	± 25	59	± 7
3	Pluteus 2-brazos	154	± 32	92	± 20
4	Pluteus 2-brazos	218	± 16	135	± 22
7	Pluteus 4-brazos	217	± 15	207	± 30
10	Pluteus 4-brazos	224	± 22	204	± 19
13	Pluteus 6-brazos	215	± 20	187	± 31
16	Pluteus 6-brazos	198	± 34	251	± 56
19	Pluteus 6-brazos	232	± 89	194	± 50
>22	Pluteus 8-brazos	272	± 142	203	± 51

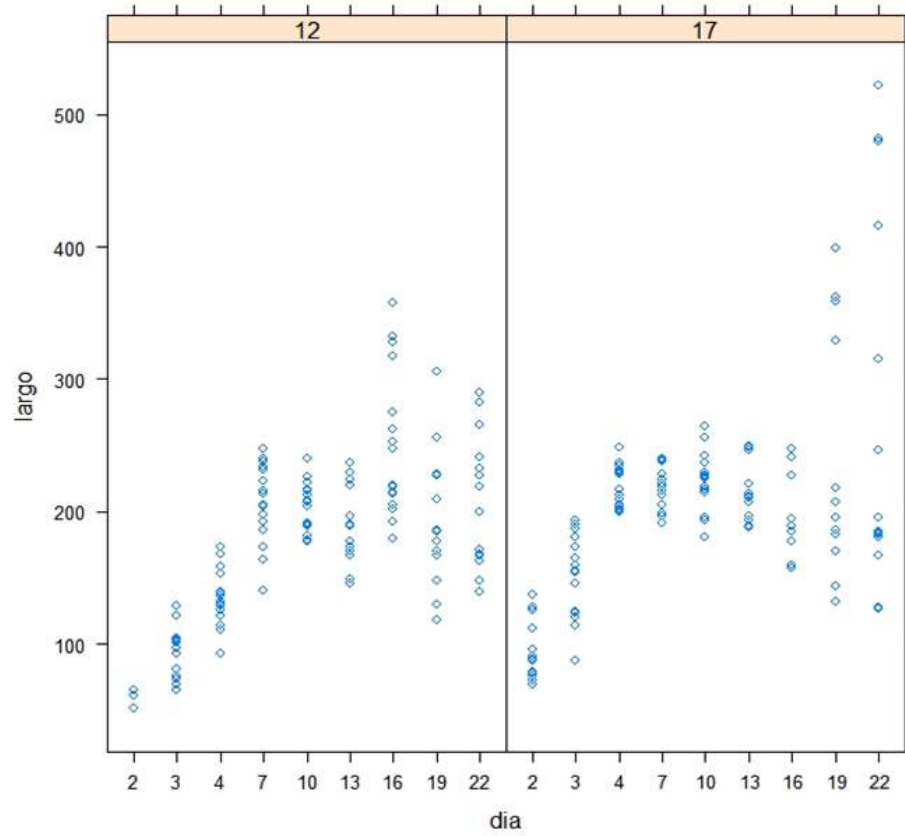


Figura 1.10. Dispersion de la longitud total de las larvas registrada en función del tiempo en días a dos temperaturas diferentes (12 y 17°C).

Tabla 1.8. Modelos propuestos para analizar las variables de la longitud total de las larvas de *A. dufresnii*. Resaltado en negrita se observan los modelos con el mejor ajuste a los datos según el criterio de información de Akaike (AIC).

	Modelo	Akaike
H1	Nulo	2872,23
H2	Tiempo	2699,38
H3	Progenie	2840,82
H4	Temperatura	2851,32
H5	Temperatura + progenie	2851,32
H6	Temperatura + tiempo	2674,15
H7	Tiempo + progenie	2699,38
H8	Temperatura x tiempo	2616,86
H9	Temperatura x progenie	2616,86
H10	Tiempo x progenie	2851,32
H11	Temperatura + tiempo + progenie	2617,98
H12	Temperatura x tiempo x progenie	2616,85

Tabla 1.9. Parámetros del modelo seleccionado: Temperatura + tiempo + progenie. Donde “***”= 0, “**”= 0,001, “*”= 0,01, “.”= 0,05. Datos obtenidos mediante un análisis de GLM. Se observa significancia en la temperatura de 17°C, en el tiempo y en el origen de la progenie.

Coeficientes	Estimado	Error Estándar	Valor t	Pr(> t)	
Intercepto	0,00711	0,0002678	26,56	<0,00001	
Temperatura 17°	-0,001801	0,0002897	-6,218	<0,00001	***
Tiempo	-0,009237	0,001174	-7,9	<0,00001	***
Progenie	-0,013	0,000347	-3,263	0,00126	**

Análisis de la longitud del cuerpo (LC) larval

El análisis de los datos de la longitud del cuerpo de la larva en relación a la temperatura y el origen de la progenie muestra que las larvas en ambas temperaturas tienen una tendencia similar. Sin embargo, a medida que los días pasan, las larvas mantenidas a mayor temperatura desarrollan cuerpos más largos, aunque este crecimiento no es tan notorio como en el caso de la longitud total de la larva (Tabla 1.10, Figura 1.11).

De todos los modelos analizados se seleccionó el modelo que responde a la hipótesis 12: la longitud del cuerpo es dependiente de la interacción de los factores tiempo, temperatura y origen de la progenie (Tabla 1.11). A pesar de que los modelos que responden a las hipótesis 8 (Anexo. Figuras 1.25 y 1.26) y 9 (Anexo. Figuras 1.27 y 1.28) presentaron prácticamente iguales índices de Akaike, éstos son una simplificación del Modelo 12 (Anexo. Figuras 1.29 y 1.30). A pesar de que bajo el criterio de parsimonia se debería elegir el modelo más simple, al analizar detalladamente los residuos es prácticamente imposible encontrar diferencias. Por lo tanto, se eligió el modelo de menor Akaike que incluye a los otros dos modelos. De esa forma, tanto el **tiempo**, como la **temperatura** y el **origen de la progenie** tienen un efecto en la longitud del cuerpo de las larvas de *A. dufresnii*. Este efecto es generado por una interacción entre los tres factores, de los cuales la temperatura y el origen de la progenie tienen efectos significativos (Tabla 1.12).

Tabla 1.10: Longitud del cuerpo (LC; en μm) de la larva de *A. dufresnii* registrado en función del tiempo en días a dos temperaturas diferentes (12 y 17°C).

Día	Estadío	LC a 17°C		LC a 12°C	
2	Pluteus 2-brazos	81	± 7	67	± 6
3	Pluteus 2-brazos	99	± 11	84	± 7
4	Pluteus 2-brazos	118	± 6	92	± 7
7	Pluteus 4-brazos	122	± 12	119	± 13
10	Pluteus 4-brazos	133	± 18	118	± 14
13	Pluteus 6-brazos	125	± 20	113	± 18
16	Pluteus 6-brazos	110	± 20	142	± 28
19	Pluteus 6-brazos	142	± 41	117	± 28
>22	Pluteus 8-brazos	152	± 47	117	± 27

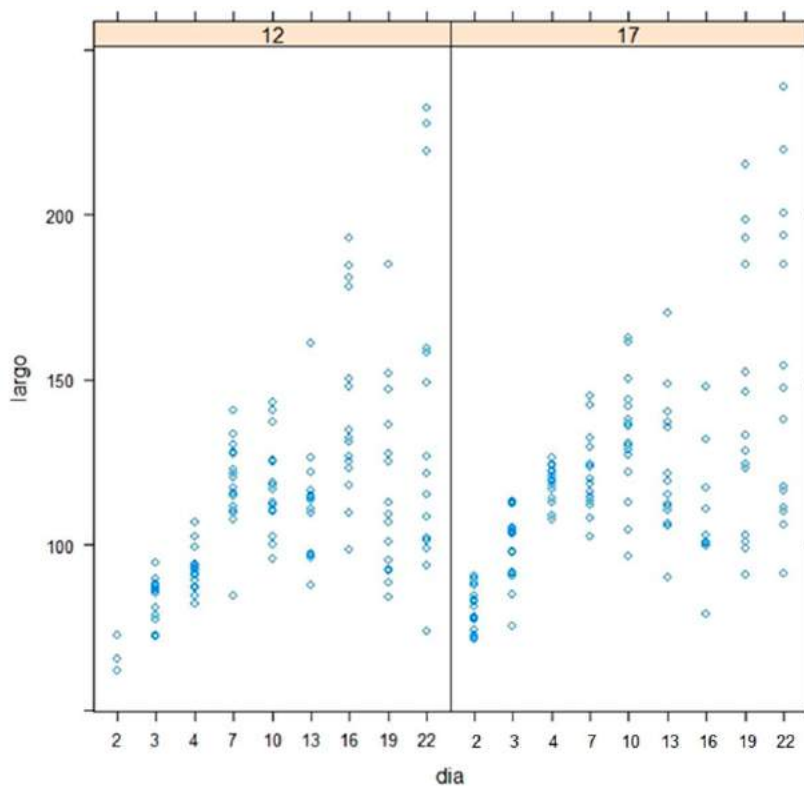


Figura 1.11. Longitud del cuerpo en larvas de *A. dufresnii* registrado en función del tiempo en días a dos temperaturas diferentes (12 y 17°C).

Tabla 1.11. Modelos propuestos para analizar las variables de la longitud del cuerpo de *A. dufresnii*. Resaltado en negrita se observan los modelos con el mejor ajuste a los datos según el criterio de información de Akaike (AIC).

	Modelo	Akaike
H1	Nulo	2471,82
H2	Tiempo	2306,68
H3	Progenie	2410,12
H4	Temperatura	2429,93
H5	Temperatura + progenie	2429,93
H6	Temperatura + tiempo	2294,31
H7	Tiempo + progenie	2306,68
H8	Temperatura x tiempo	2275,02
H9	Temperatura x progenie	2275,02
H10	Tiempo x progenie	2306,68
H11	Temperatura + tiempo + progenie	2294,31
H12	Temperatura x tiempo x progenie	2275,02

Tabla 1.12. Parámetros del modelo seleccionado: Temperatura + tiempo + progenie. Donde “***”= 0, “**”= 0,001, “*”= 0,01, “.”= 0,05. Datos obtenidos mediante un análisis de GLM. Se observa significancia en la temperatura de 17°C y en el origen de la progenie.

Coefficientes	Estimado	Error Estándar	Valor t	Pr(> t)	
Intercepto	0,009585	0,0002216	43,86	<0,00001	
Temperatura 17°	-0,0009888	0,0002632	-3,758	0,000216	**
Tiempo	-0,006259	0,0008956	-6,988	<0,00001	***
Origen de la progenie	-0,001587	0,0004294	3,696	0,000273	**

Protocolo de cultivo de embriones y larvas de *Arbacia dufresnii*

Con la información obtenida en los experimentos realizados en este capítulo, se elaboró el siguiente protocolo de trabajo. Las recomendaciones descritas en este protocolo, permiten cultivar embriones y larvas de *Arbacia dufresnii* saludables (Figura 1.12). Por lo tanto, en los siguientes capítulos de esta tesis las larvas, que serán el objeto de estudio, serán cultivadas siguiendo estos pasos.

- a) Individuos **adultos progenitores** de *A. dufresnii* se recolectan en las cercanías de Punta Cuevas, en el Golfo Nuevo, Provincia del Chubut mediante buceo subacuático, durante la temporada de desove que abarca las estaciones de primavera y verano. Los individuos se aclimatan a las condiciones de acuario por 24 h a 17°C, se induce el desove de hembras y machos a partir de una inyección, a través de la membrana peristomial, de aproximadamente 0.5 ml de KCL 0.5 M.
- b) El **agua de mar** utilizada para el desove y el cultivo de embriones y larvas, es extraída de la costa, a aproximadamente 1km de la zona de extracción de los adultos progenitores. La misma es almacenada en las instalaciones del Centro Nacional Patagónico (CENPAT), y previo a su utilización es filtrada con mallas consecutivas de 10µm, 5µm y 1µm, irradiada con lámpara UV para su esterilización, aclimatada a la temperatura de utilización de 17°C y corregida a salinidad de 34 ppm.
- c) Los **óvulos** de cada hembra se recolectan cuidadosamente sobre medio líquido, se genera una mezcla de óvulos en un único recipiente y se cuantifican con triple conteo bajo lupa binocular utilizando una cámara de Sedgewick Rafter.
- d) El **esperma** se recolecta en seco en un único recipiente generando una mezcla, la cual se conserva en hielo hasta su utilización a fin de preservar la viabilidad de las gametas.
- e) Para la **fecundación** se colocan aproximadamente 1.000.000 de óvulos de la mezcla por litro de agua de mar en un recipiente esterilizado de base ancha, preferentemente de vidrio. Se prepara una dilución inicial de esperma en agua de mar 1:1000 v/v y se fertiliza con 10ml de la solución por litro de óvulos, alcanzando una

dilución final de esperma en agua de mar de 1:100.000 v/v.

f) Transcurridos 30 minutos, se extrae una alícuota de óvulos y se cuantifica el **porcentaje de fecundación** a partir de la observación en microscopio óptico de la formación del cono de fecundación y/o la membrana de fecundación. Se utilizan sólo las muestras que presentan como mínimo 90% de fecundación, asegurando la calidad de los embriones obtenidos.

g) Durante las primeras 48 h, los **embriones** son mantenidos en agua de mar suavemente oxigenada. Luego de las 48 h, los embriones ya se encuentran nadando y son trasvasados a un nuevo recipiente, y ajustados a una concentración de 4 individuos/ml en agua de mar filtrada y con oxigenación continua.

h) A partir de este momento, se recambia el 50% del agua cada 72 h, y a partir de las 96 h post-fecundación, se alimenta a las **larvas pluteus** diariamente con una mezcla de microalgas (*Isochrysis galbana* y *Nannochloropsis oculata*; concentración: $1-5 \cdot 10^4$ células/larva).

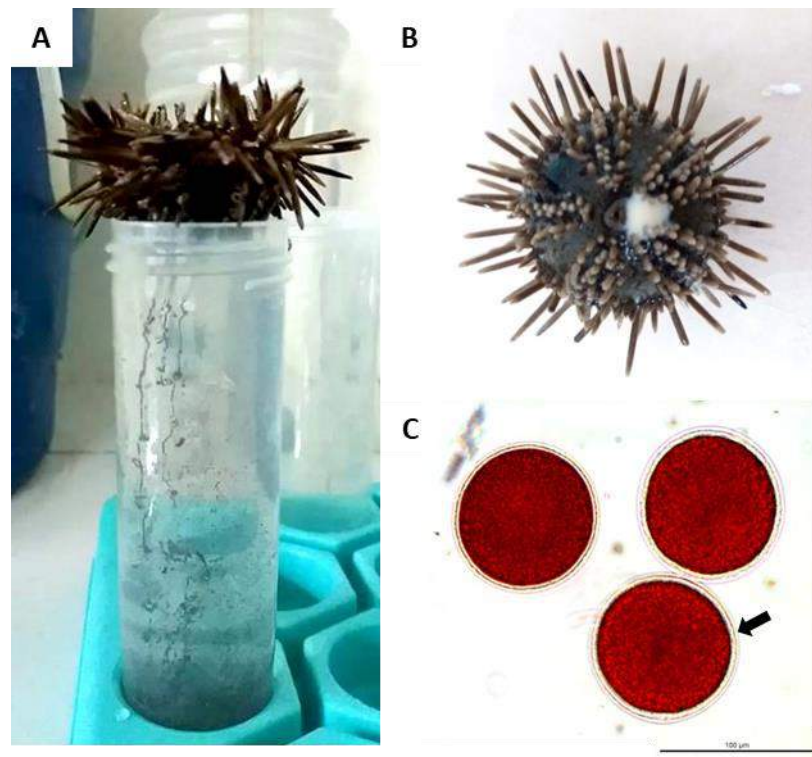


Figura 1.12. Desove y fecundación en *A. dufresnii* A) Desove de una hembra sobre medio líquido. B) Esperma de un macho en seco. C) Huevos fecundados, nótese la membrana de fecundación (flecha). Escala C: 100 μm.

Descripción del desarrollo larval y embrionario de *Arbacia dufresnii*

El desarrollo embrionario y larval de *A. dufresnii* mostró estadíos similares a los descritos para otras especies de equinoideos (Harvey 1956; Giudice 1986; Gilbert 2000). Los óvulos recién desovados presentaron un color púrpura intenso al igual que en otras especies del mismo género, y un diámetro de $56 \pm 11 \mu\text{m}$. Por su parte, los espermatozoides presentaron un largo aproximado de $70 \mu\text{m}$. La fecundación se detectó por la formación del cono de fecundación y/o la membrana de fecundación y estuvo asociada a un significativo aumento del diámetro $63 \pm 12 \mu\text{m}$ que se mantuvo casi constante hasta el estadío de gástrula. La segmentación, típicamente holoblástica radial, pasó por los estadíos de 2 células, 4 células, 8 células, y sucesivamente hasta alcanzar el estadío mórula de 64 células, caracterizado por presentar una estructura compacta de células. Posteriormente, en el estadío de blástula se hizo evidente la cavidad o blastocele en el centro del embrión. Las blástulas eclosionaron de la membrana de fecundación y desarrollaron cilios que les permitieron nadar libremente a las 24 h, y por lo tanto, comenzaron a ocupar el espacio de la columna de agua y se separaron del fondo. Luego, se observaron las primeras gástrulas que se distinguieron por la aparición del orificio o blastoporo en el polo vegetal. Las larvas prisma aparecieron cuando las gástrulas comenzaron a elongarse en el eje anteroposterior otorgándoles su característica forma triangular. Asimismo, se desarrolló la banda ciliar que rodea el perímetro de la larva y cambió el sentido del nado, ambas características pudieron observarse bajo el microscopio de campo claro. El estadío de larva prisma se detectó por un periodo de tiempo muy breve, y a partir de ese momento se hizo evidente el crecimiento en el cuerpo de las larvas (Figura 1.13).

A los 2 dpf el organismo se encontró en estadío de larva pluteus de dos brazos, evidenciado por la aparición de las dos pequeñas protuberancias que se elongan desde la zona ventral y que dan origen a los brazos post-orales. Otra característica importante de este periodo fue la formación del lóbulo oral que incluye al estomodeo

y a la parte anterior del esófago, que junto a la maduración del tubo digestivo, le permitirán al organismo alimentarse a partir de los 4 dpf. El segundo par de brazos o brazos pre-orales, comenzó a desarrollarse desde la zona dorsal a partir de los 6 dpf, pasando a llamarse ahora larva pluteus de cuatro brazos. Las larvas continuaron creciendo y a los 12 dpf aparecieron los primordios del tercer par de brazos en la zona media de la larva. Finalmente, a partir de los 21 dpf apareció el cuarto par de brazos a ambos lados del extremo apical de la larva.

Desde el estadio prisma y a medida que el organismo creció, las espículas se extendieron a lo largo de los brazos post-orales, pre-orales, dorsal y ventralmente formando el esqueleto de la larva.

Otro punto destacable, es la pigmentación que fue muy abundante en el óvulo y luego a lo largo del desarrollo fue reduciendo su distribución hasta hacerse cada vez más escasa. Entre los 7 y 14 dpf, la pigmentación se concentró en los extremos de los brazos y el extremo apical de la larva, y en los últimos días documentados disminuyó hasta hacerse casi imperceptible. Por último, es notable el crecimiento de la larva que triplica su longitud total y duplica el tamaño de su cuerpo entre los 2 y 22 dpf (Figura 1.14).

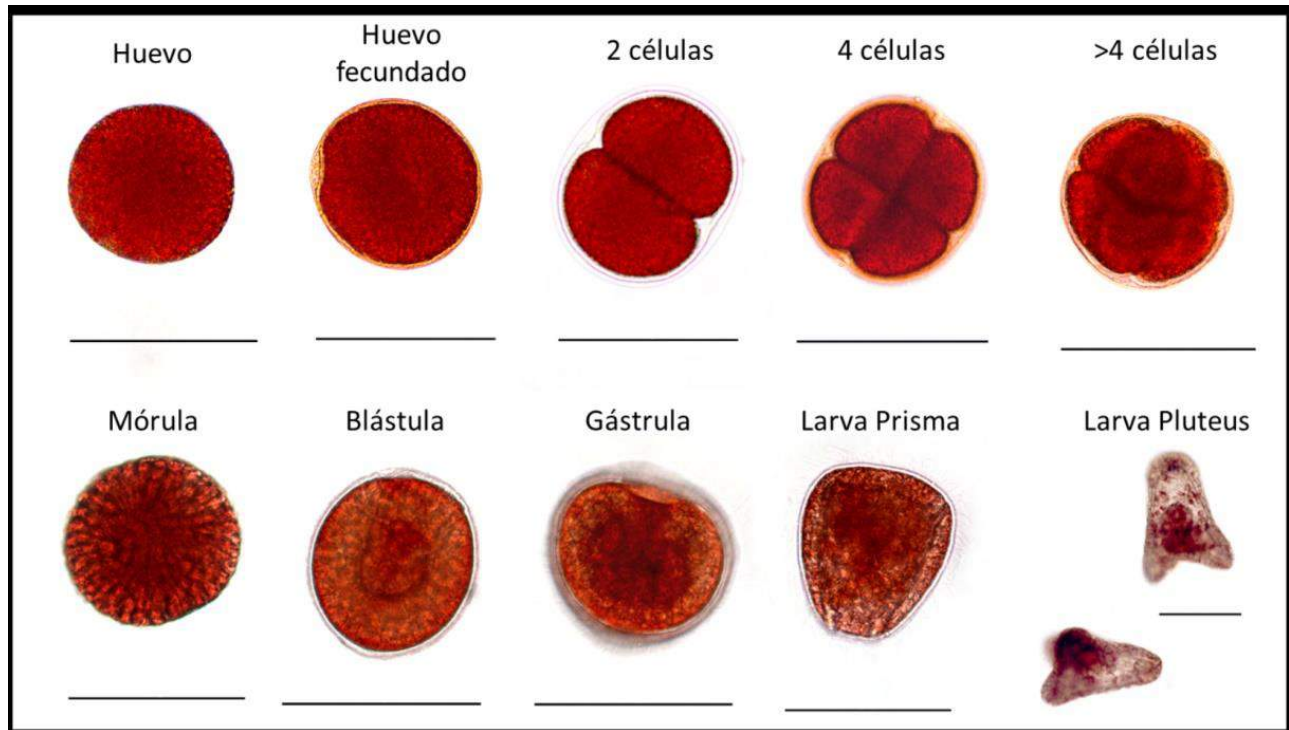


Figura 1.13. Desarrollo embrionario de *A. dufresnii*. Las escalas equivalen a 100 μm .

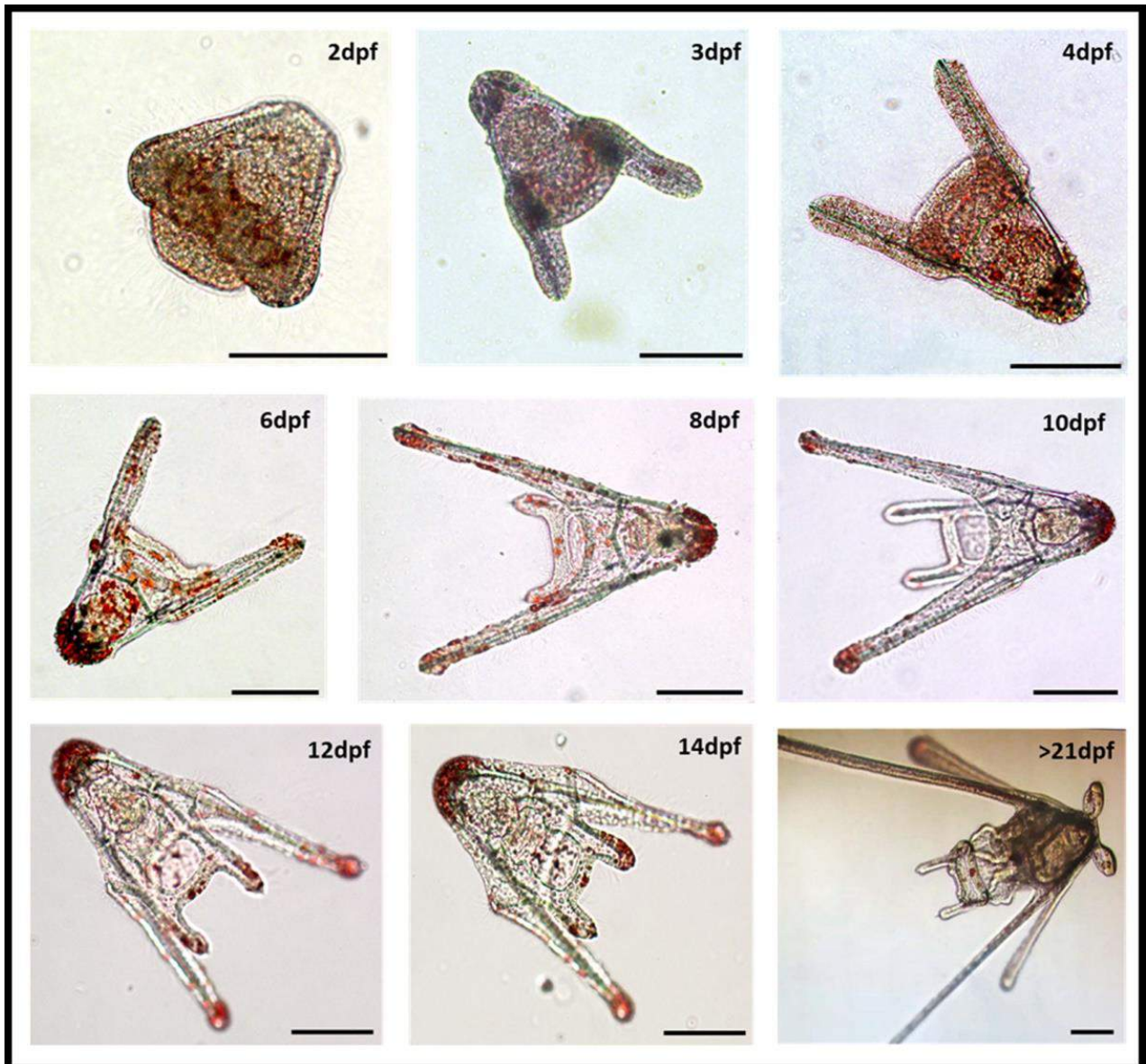


Figura 1.14. Desarrollo larval de *A. dufresnii* entre los 2 y 22 dpf. Las escalas equivalen a 100 μm .

Discusión del capítulo 1

Si bien se han realizado gran cantidad de estudios en *A. dufresnii*, existen pocos trabajos sobre el desarrollo embrionario y larval de esta especie (Bernasconi 1942, Brogger 2005), y los mismos abarcan sólo las primeras etapas del desarrollo. Este trabajo aporta una descripción detallada del desarrollo embrionario y larval de *A. dufresnii*, y establece una combinación de condiciones de laboratorio que resultan óptimas para el cultivo de las larvas.

El desarrollo observado en *A. dufresnii* no difiere del descrito para otras especies de erizos de mar (Harvey 1956; Giudice 1986; Gilbert 2000). Sin embargo, el tamaño del óvulo de *A. dufresnii* es pequeño en comparación con otras especies (Strathmann 1987; Pearse y Cameron 1991; Foltz et al. 2004). En el ambiente natural, el tamaño del óvulo de los erizos de mar influye en la tasa de fecundación, dado que óvulos de mayor tamaño ofrecen una mayor superficie en la que los espermatozoides pueden fecundarlos (Levitan 1991).

En condiciones controladas, los resultados muestran que con altas concentraciones de óvulos en un volumen fijo de agua de mar, se generan una gran cantidad de células en degradación y embriones asincrónicos. Probablemente, esto se deba al aplastamiento entre las células, la gran cantidad de sustancias metabólicas disueltas en el medio y/o una fecundación ineficaz o asincrónica. Por otra parte, la concentración de espermatozoides resultó determinante para una buena fecundación. Altas concentraciones generan poliespermia y, por lo tanto, embriones anormales que son inviables; y muy bajas concentraciones, podrían dejar óvulos sin fecundar o generar asincronía (Gilbert 2000).

Este trabajo determinó que la mejor condición para la fecundación se alcanzó

con pocos óvulos por ml de agua de mar (50) y una dilución de espermatozoides de 1:100.000 v/v. En *Strongylocentrotus droebachiensis*, la media del diámetro del óvulo es de 150 μm y se describieron las fecundaciones más altas (superiores al 80%) con una concentración de 30 óvulos/ml y con diluciones de espermatozoides de 1:1.000.000 v/v (Pennington 1985). En *Strongylocentrotus intermedius* la media del diámetro del óvulo es de 85 μm y se describieron las fecundaciones más altas con una concentración de 70 óvulos/ml y una dilución de espermatozoides de 1:100.000 v/v (Unuma et al. 2015). De esta forma, en las fecundaciones bajo condiciones controladas, el número de óvulos por mililitro que garantiza un desarrollo normal pudiera tener relación con el tamaño del mismo.

Adicionalmente, la dilución de espermatozoides óptima para cada especie se ve afectada por el tamaño del óvulo, siendo los óvulos de mayor tamaño los que necesitan diluciones mayores de espermatozoides con el fin de prevenir la poliespermia. A pesar de que la limitación de espermatozoides puede generar una disminución en la tasa de fecundación, el exceso de espermatozoides no es recomendable, y es necesario un ensayo preliminar para hallar una concentración que permita obtener embriones normales y en grandes cantidades. En este trabajo la dilución utilizada de 1:100.000 v/v, fue suficiente para garantizar una fecundación eficiente y prevenir la poliespermia.

Arbacia dufresnii es una especie que tiene una amplia distribución, presente tanto en el Océano Atlántico Sur como en el Océano Pacífico Sur (Brogger et al. 2013). Su distribución y batimetría indican que las larvas y adultos habitan aguas con una variabilidad muy grande de temperatura, salinidad, disponibilidad de alimento y otros factores externos. Por lo tanto, es muy probable que la especie presente estrategias para que sus larvas y embriones puedan desarrollarse en amplio abanico de condiciones.

A pesar de su pequeño tamaño y en relación con otros equinoideos, los óvulos de *A. dufresnii* presentan altos contenidos de lípidos, en especial lípidos de reserva energética (Díaz de Vivar, com. personal), esta característica podría permitirle

sobrevivir y desarrollarse a los embriones y larvas aún con poco alimento. La coloración de los óvulos indica la presencia de altas concentraciones de pigmentos carotenoides y equinocromas que podrían protegerlos de la radiación solar mientras se encuentran en la columna de agua. Si bien existen pocos estudios que evalúan los factores de dispersión de las larvas de erizos de mar, la supervivencia y el tiempo de permanencia en la columna de agua son de los más importantes (Metaxas 2013).

La rápida eclosión del embrión permite el desarrollo de una larva que puede alimentarse rápidamente e incrementar sus posibilidades de sobrevivir. Se ha descrito que la tasa de crecimiento larval se encuentra afectada por distintos factores abióticos como la temperatura, la salinidad, el pH, la radiación solar, y la disponibilidad de alimento, entre otros, siendo este último uno de los más importantes (Metaxas 2013). En este trabajo se mantuvieron condiciones similares a las encontradas en el ambiente durante la primavera y el verano, por lo tanto, se espera que en la naturaleza se produzca un desarrollo con características similares.

Las larvas se alimentan de diferentes especies fitoplanctónicas (Strathmann 1971) que son atrapadas y dirigidas hacia la zona oral mediante el uso de los cilios presentes a lo largo de su perímetro (Hart 1991). Durante el verano es frecuente la presencia de floraciones de fitoplancton en el Golfo Nuevo (Pastor y Bala 1995). Es posible que este evento provea alimentación a las larvas e incremente su probabilidad de supervivencia. El largo de brazos de las larvas se relaciona con la disponibilidad de alimento en el ambiente (Fenaux et al. 1994), y a pesar de que es muy difícil determinar la cantidad de alimento disponible en el ambiente natural, se ha descrito que en situaciones de enriquecimiento la metamorfosis se acelera y los brazos son más cortos (Paulay et al. 1985; Fenaux et al. 1994).

En este trabajo, los tiempos del desarrollo embrionario y larval no difieren de los encontrados en la bibliografía para este género, sin embargo, aún no se conoce si son los mismos que en la zona de muestreo. Para corroborar esto, sería necesario realizar muestreos de zooplancton regulares para monitorear el desarrollo en condiciones naturales. Kino (2010) realizó un trabajo con estas características en la

Isla de Chiloé en Chile y encontró que en comparación con la cantidad de larvas de 2 y 4 brazos halladas, la proporción de larvas de *A. dufresnii* que lograban pasar al estadio de 8 brazos era muy pequeño y aún menor era el porcentaje de larvas competentes. Estos resultados indican que la tasa de supervivencia fue muy baja en esta población o que la dispersión de estas larvas hacia otros sitios fue muy alta. Los factores asociados con esta dispersión aún se desconocen, sin embargo, se considera que los frentes costeros, los remolinos y otros factores marinos afectan esta dispersión (Metaxas 2013).

Sin duda, la temperatura es uno de los factores más importantes que controla la distribución de los equinodermos (Byrne et al. 2011). La fecundación y la embriogénesis son puntos clave en el ciclo de vida de cualquier organismo y, la temperatura juega un rol fundamental en esta etapa (Byrne et al. 2011). La termotolerancia en la fecundación del erizo de mar y el desarrollo temprano es transmitida por factores maternos. Existe una fuerte evidencia de que la historia térmica de los adultos progenitores, particularmente la aclimatación materna, influye en la tolerancia térmica de la fecundación y el desarrollo de su descendencia debido a la plasticidad fenotípica adaptativa con respecto a las temperaturas predominantes (O'Connor y Mulley 1977; Fujisawa 1989, 1995; Johnson y Babcock 1994). Los factores maternos, son impresos de acuerdo a la temperatura de los ovarios (Fujisawa 1995; Yamada y Mihashi 1998) y potencialmente pueden incluir proteínas protectoras de choque térmico (Sconzo et al. 1997). Las temperaturas elegidas para este estudio coinciden con las temperaturas en que se encuentran normalmente los individuos durante la época de desove, por lo que no generarían un factor de estrés extremo, como se observó en estudios previos (Bernasconi 1942, Brogger 2005).

La temperatura puede tener efectos positivos o negativos sobre los procesos fisiológicos y, por lo tanto, afectar la supervivencia o el fitness de un organismo (Pörtner y Farrell 2008). En general, un incremento en la temperatura del agua de mar genera un aceleramiento del desarrollo y de la tasa de crecimiento larval (Staver y Strathmann 2002; O'Connor et al. 2007; Sheppard Brennand et al. 2010; Byrne y Przeslawski 2013), y *A. dufresnii* no es la excepción. En esta especie, la temperatura

tuvo un efecto clave tanto en el desarrollo embrionario como en el crecimiento larval. Los óvulos mantenidos a 17°C presentaron un desarrollo embrionario más acelerado y un mayor crecimiento en las larvas, y esto probablemente tenga implicancias ecológicas. A principios de primavera, los florecimientos de fitoplancton son más prolongados que a finales del verano (Esteves et al. 1981, 1992), por lo tanto, las larvas en primavera tendrían disponibilidad de alimento durante más tiempo, lo que correlaciona con su desarrollo más lento a 12°C, y una corta disponibilidad de alimento en verano que coincide con un desarrollo más rápido a 17°C. En términos de cultivo para usos de laboratorio, una temperatura de 17°C genera menos dificultades técnicas haciendo que sea más fácil producir larvas saludables y con baja mortalidad.

Adicionalmente, en los análisis realizados con GLM, no se encontró que la temperatura por sí sola sea la responsable de las diferencias entre los tratamientos, sino que tanto el tiempo, como la temperatura y el origen maternal de la progenie actúan de manera aditiva durante el desarrollo embrionario. Es decir, que estos factores afectan al resultado final pero de manera independiente entre sí. El desarrollo larval, se encuentra influenciado por los mismos factores, pero en este caso existe una interacción entre ellos, es decir, que son dependientes entre sí.

Sin tener en cuenta el factor tiempo, dado que es natural que afecte al crecimiento, es interesante el efecto del origen maternal de la progenie. En estos experimentos, se mantuvieron separados los óvulos provenientes de las distintas hembras, lo que permitió determinar el efecto parental materno. Se ha descrito que el estado nutricional de los adultos reproductores afecta a su desarrollo gonadal (Ebert 1968; Vadas 1977; Thompson 1983; Keats et al. 1984; Lemire y Himmelman 1996; Walker y Lesser 1998; Rubilar et al. 2016) y por lo tanto, en el caso de las hembras a la producción de óvulos. Los embriones y larvas tempranas para poder desarrollarse correctamente utilizan las reservas de su vitelo durante el período denominado alimentación facultativa (Byrne et al. 2008). En los erizos de mar, el vitelo está compuesto en gran parte por glicoproteínas como la MYP y por lípidos que se sintetizan durante la gametogénesis (Sewell 2005; Prowse et al. 2009; Walker et al. 2013). El estado nutricional en la hembra produce un efecto transgeneracional, es

decir, que la historia de la generación parental modela el fenotipo de su descendencia (Marshall 2008; Bonduriansky y Day 2009). Hembras con un buen estado nutricional probablemente generen óvulos con gran cantidad y calidad de vitelo, que luego permitan una alimentación facultativa suficiente hasta que las larvas puedan alimentarse por sí solas. Este hecho tiene grandes implicancias ecológicas y evolutivas, dado que muy probablemente las reservas nutricionales almacenadas en los óvulos influyen la supervivencia de las larvas. Por lo tanto, aquellas larvas provenientes de óvulos con pocas reservas, que no llegan a suplir el periodo de alimentación facultativo, muy probablemente no logren sobrevivir.

Pero, ¿por qué en el período del desarrollo embrionario los factores actúan en forma aditiva mientras que en el período del desarrollo larval hay interacción? Muy probablemente esto tenga que ver con que durante el desarrollo embrionario, el embrión depende exclusivamente de las reservas que posee en su vitelo y de las condiciones abióticas más determinantes. Por lo tanto, los factores endógenos (nutrientes) y exógenos (temperatura) actúan de forma simultánea pero no dependen uno de otro. Este tipo de efectos aditivos observados en este trabajo en *A. dufresnii*, también se han observado en otras especies (Byrne et al. 2009). Durante el desarrollo larval, si tenemos en cuenta que las larvas se encuentran constantemente expuestas a una variedad de estresores abióticos y bióticos y que a su vez tienen la impronta de la historia de vida del embrión, no es de extrañar que los factores analizados sean dependientes entre sí. La historia de vida parental determina la cantidad y calidad de nutrientes que recibió el embrión, y el desarrollo de este embrión determina el estado general de la larva obtenida. Ese embrión se desarrolla a una temperatura que hace que sea más rápido o lento el proceso, y por tanto, que tenga más o menos nutrientes de reserva, hecho que luego determina que la larva pueda alimentarse rápidamente o no. Además, dado que la temperatura influencia la velocidad de las reacciones enzimáticas de la larva, entre ellas el metabolismo y la digestión; a mayores temperaturas su metabolismo probablemente se incremente y pueda tener una mayor tasa de crecimiento y desarrollo.

Con la finalidad del cultivo en el laboratorio, conocer el efecto de estos factores

es fundamental. Para poder alcanzar los siguientes objetivos planteados en esta tesis, es indispensable obtener larvas saludables que sean representativas de la población de estudio. De esta forma, el conocimiento de la concentración de gametas a utilizar para una fecundación eficiente, la temperatura más adecuada para obtener un rápido desarrollo embrionario y larval, y el conocimiento del fuerte efecto parental de la descendencia, permitieron desarrollar un protocolo de fecundación y cultivo de embriones y larvas óptimo para el desarrollo experimental de las siguientes partes de esta tesis.

Conclusiones del capítulo 1

El desarrollo embrionario y larval de *Arbacia dufresnii* es similar al desarrollo de otras especies de equinoideos, sin embargo, no existía hasta la fecha una descripción detallada de la misma. Los datos obtenidos en este trabajo sirven de base para futuros trabajos de investigación enfocados en larvas.

Fue posible encontrar una concentración de gametas óptima para lograr una fecundación eficiente en condiciones de laboratorio.

El desarrollo embrionario y larval se ven afectados significativamente por la temperatura, el tiempo y el origen de la progenie. En los embriones estos factores tienen un efecto aditivo, mientras que en el crecimiento larval hay interacciones entre éstos. El origen de los óvulos, influencia fuertemente el desarrollo de cada progenie. El tratamiento con mayor temperatura presentó un desarrollo embrionario y larval acelerado.

La información obtenida en este capítulo, se utilizó para desarrollar un protocolo sencillo para la fecundación y el cultivo de embriones y larvas de *A. dufresnii*.

Capítulo 2:
Determinación de secuencias
génicas de interés en *Arbacia dufresnii*
mediante análisis bioinformático

Introducción del capítulo 2

La bioinformática es una disciplina que surge a partir de los primeros análisis computacionales de secuencias de ADN y proteínas, como una interacción entre la biología y las ciencias de la computación (Gómez-Merino et al. 2010). Tiene como principales objetivos el manejo y análisis de grandes cantidades de datos, producidos por las nuevas tecnologías en biología molecular, como la genómica, la transcriptómica y la proteómica (Gómez-Merino et al. 2010). En este campo de la investigación se han desarrollado herramientas que permiten, por ejemplo, la búsqueda y el análisis de secuencias de ADN, ARN y proteínas, la predicción de la estructura tridimensional de estas moléculas, alineamientos múltiples de secuencias, el diseño de árboles filogenéticos por distintos métodos, e incluso la corrección de posibles errores de secuenciación, entre muchos otros usos (Xiong 2006).

Una de las aplicaciones más relevantes en esta disciplina, surge del interés en conocer la evolución de los organismos cordados. En las últimas décadas, se ha impulsado el estudio de organismos emparentados a los cordados y menos conocidos, como son los invertebrados deuterostomados (Lowe et al. 2003; Holland et al. 2004). Estos estudios permiten conocer cómo se expresan y actúan ciertas moléculas que son capaces de determinar patrones complejos de organización en el desarrollo del sistema nervioso, tanto en los estadios larvales como en adultos (Burke et al. 2006a).

En este capítulo se analizará la señalización de la familia de factores neurotróficos GFLs (Glial cell-line derived neurotrophic Factors Ligands) y su cascada intracelular con el fin de detectar proteínas que pudieran verse afectadas por la activación de este complejo y que se encuentren conservadas a lo largo de la filogenia.

El estudio de las secuencias proteicas

Las proteínas pueden agruparse de acuerdo a la similitud en su secuencia o en su estructura. La clasificación permite predecir las funciones de nuevas proteínas pertenecientes a un grupo, por comparación con las funciones conocidas del resto del grupo. Las proteínas de distintos organismos que presentan muy alta similitud en sus secuencias se consideran homólogas, es decir, que poseen un ancestro común, y se caracterizan por presentar estructuras y funciones similares (Bork y Koonin 1996). Estas macromoléculas pueden clasificarse de acuerdo a las *Familias* a las que pertenecen, es decir, que comparten un origen evolutivo común a partir del cual luego se han diversificado dentro del genoma, de acuerdo *Dominios* que contienen, o de acuerdo a los *Motivos* que poseen (Attwood y Parry-Smith 1999; Xiong 2006).

Un **motivo proteico** es una secuencia corta muy conservada, generalmente de alrededor de 20 aminoácidos. Suele encontrarse en una zona específica de la proteína y se la asocia a una determinada función. Un **dominio proteico** también es una secuencia muy conservada pero con independencia funcional y estructural, y con una extensión mayor que suele encontrarse entre los 40 y 700 residuos aminoácidos. Debido a su funcionalidad, los motivos y dominios están más conservados que otras regiones de una proteína, y tienden a evolucionar como unidades, las cuales pueden duplicarse, perderse o insertarse en otra región del genoma (Xiong 2006). Las diferentes combinaciones de motivos y dominios dan origen a la gran variedad de proteínas encontradas en la naturaleza. Por lo tanto, la identificación de éstos en una secuencia aminoacídica puede dar información muy valiosa respecto de su función y de su identificación dentro de una familia, e incluso pueden ser utilizados para identificar proteínas homólogas a lo largo de la evolución (Attwood y Parry-Smith 1999; Xiong 2006).

Sin embargo, las proteínas homólogas presentan distintos grados de divergencia, por lo que la comparación de sus secuencias no siempre presenta un alto

grado de similitud. Las **firmas proteicas** son expresiones que identifican a una proteína dentro de un grupo homólogo. Estas expresiones representan una secuencia o zona consenso para dicho grupo de proteínas homólogas. Por lo tanto, pueden ser una mejor estrategia para detectar proteínas homólogas divergentes (Xiong 2006).

La construcción de una **firma proteica** comienza con un alineamiento de las secuencias aminoacídicas en donde se analizan las secuencias completas, los dominios de las mismas, o los motivos proteicos. Con esta información se generan distintos tipos de firmas, entre ellas el **patrón consenso**, o firmas más complejas como un **perfil**, una **huella** o un **modelo oculto de markov** (HMMs por sus siglas en inglés), que se obtienen a partir de análisis estadísticos más profundos (Xiong 2006).

El análisis de los motivos proteicos de proteínas homólogas, permite encontrar un **patrón consenso** de pequeño tamaño, el cual luego puede escribirse de forma generalizada en una **expresión regular** (Xiong 2006). En una expresión regular cuando una posición se encuentra restringida a un sólo aminoácido conservado, se indica dicho aminoácido con su código de letra único. Cuando en una posición se encuentran más de una alternativa de aminoácido conservado, estos residuos se indican dentro de corchetes. Si en determinada posición se excluye cierto aminoácido, éste se coloca dentro de una llave. Los residuos no específicos o no conservados se representan con la letra X. Si un elemento se repite, se indica el número de repeticiones entre paréntesis. Por último, cada posición se separa por guiones (Xiong 2006).

Durante un análisis, estas expresiones pueden hacerse coincidir estrictamente con cada secuencia o pueden compararse con cierta flexibilidad; en ambos casos existen limitaciones. Por un lado, la falta de flexibilidad puede conducir a falsos negativos, excluyendo secuencias homólogas divergentes. Por el otro lado, el exceso de flexibilidad puede dar lugar a falsos positivos. Las bases de datos PROSITE (www.expasy.ch/prosite/), PRINT-S (<http://130.88.97.239/dbbrowser/sprint/>), y Pfam (<http://pfam.xfam.org>) son algunos de los sitios en donde pueden hallarse expresiones regulares y otras firmas para proteínas caracterizadas.

El complejo GFLs/GFR α /RET

El Factor Derivado de las Células Gliales (**GDNF**) (Durbec et al. 1996a; Trupp et al. 1996), Neurturin (**NRTN**) (Kotzbauer et al. 1996), Artemin (**ARTN**) (Baloh et al. 1998b) y Persephin (**PSPN**) (Milbrandt et al. 1998) constituyen la familia de factores neurotróficos **GFLs (Ligandos de la Familia de Factores Neurotróficos Derivados de las Células Gliales)**.

Los GFLs son un pequeño subgrupo dentro de la superfamilia de los TGF- β . A pesar de su baja homología en la secuencia aminoacídica, estas moléculas contienen siete residuos de cisteínas espacialmente ubicados en los mismos sitios que otros miembros de la superfamilia. Esta configuración les permite adquirir una conformación tridimensional similar a los demás miembros y también funciones relacionadas (Airaksinen y Saarma 2002).

Al igual que otras proteínas de secreción, los GFLs son sintetizados en forma de precursores *preproGFL*. Una vez secretados, la señal es clivada dejando libre a la molécula *proGFL*. Por último, estos factores adquieren su forma madura y función como GFL, luego de un clivaje proteolítico. En su forma madura, los GFLs son pequeñas proteínas que presentan un único dominio TGF- β (Airaksinen y Saarma 2002) el cual se ajusta a la expresión regular [LIVM]-x(2)-P-x(2)-[FY]-x(4)-C-x-G-x-C bajo el código PS00250 de PROSITE (Figura 2.1).

En el espacio extracelular los GFLs parecen unirse a los proteoglicanos de la matriz extracelular, esta característica podría restringir su difusión y aumentar en forma local su concentración (Hamilton et al. 2001).



Figura 2.1: Estructura de la familia de proteínas GFL. Se indica la señal de secreción *Pre*, el fragmento *Pro* que debe ser clivado para la activación del ligando, y la posición del dominio funcional TGF- β . Los números indican la cantidad aproximada de residuos aminoacídicos.

Los GFLs ejercen sus efectos mediante la unión a sus receptores específicos **GFR α (Receptores de la Familia de Factores Neurotróficos Derivados de las Células Gliales)** y la posterior activación del Receptor Tirosina Quinasa **RET**. Los GFR α se encuentran normalmente anclados en la cara externa de la membrana plasmática por un Glicosil fosfatidil inositol (GPI). Sin embargo, también se han encontrado formas solubles del receptor, posiblemente producidas por la acción de una fosfolipasa o proteasa que cliva dicha región (Paratcha et al. 2001).

Se han descrito cuatro GFR α , cada uno con mayor afinidad a uno de los cuatro GFL. GDNF se une a GFR α^1 , NRTN se une a GFR α^2 , ARTN se une GFR α^3 y PSPN se une a GFR α^4 , y además existe cierta actividad cruzada entre algunos ligandos y receptores (Baloh et al. 1997; 1998a; Buj-Bello et al. 1997; Jing et al. 1996; Klein et al. 1997; Masure et al. 2000; Naveilhan et al. 1998; Sanicola et al. 1997; Trupp et al. 1998).

En mamíferos, la proteína GFR α tiene una extensión de aproximadamente 468 aminoácidos. Su secuencia tiene variaciones a lo largo de la evolución pero presenta tres dominios D1, D2 y D3 que se encuentran más conservados. Estos dominios son ricos en cisteína y están involucrados en la interacción con su ligando específico (Airaksinen et al. 2006) (Figura 2.2). Esta proteína tiene una firma proteica de 3 elementos bajo el código PR01317 de PRINT-S, la cual se construyó a partir de un alineamiento inicial con 9 secuencias, y los motivos se identificaron analizando las regiones conservadas del alineamiento completo.



Figura 2.2: Estructura de la familia de proteínas GFR α . Se indican los tres dominios ricos en cisteínas D1, D2 y D3, y la región Glicosil fosfatidil inositol (GPI) de anclaje a la membrana plasmática. Los números indican la cantidad aproximada de residuos aminoacídicos.

La proteína RET es un receptor de membrana con una secuencia de aproximadamente 1016 aminoácidos. Presenta tres regiones funcionales, una región extracelular conformada por cuatro dominios ricos en cadherinas (CLD1-4), y una zona de unión al Ca²⁺; un paso simple transmembrana; y un dominio intracelular con actividad tirosina quinasa (Figura 2.3).

Los dominios caderina siguen la expresión regular [LIV]-x-[LIV]-x-D-x-N-D-[NH]-x-P bajo el código PS00232 de PROSITE, y el dominio tirosina quinasa la expresión: [LIV]-G-{P}-G-{P}-[FYWMGSTNH]-[SGA]-{PW}-[LIVCAT]-{PD}-x-[GSTACLIVMFY] -x(5,18)-[LIVMFYWCSTAR] -[AIVP]-[LIVMFAGCKR]-K, bajo el código PS00107 de PROSITE.

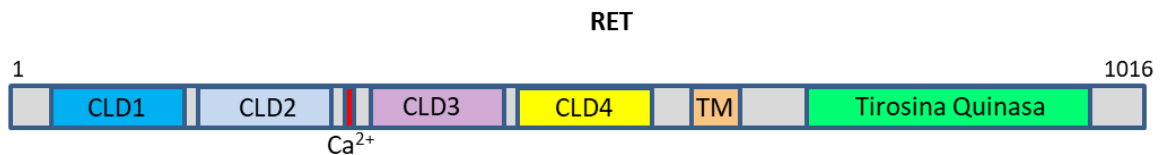


Figura 2.3: Estructura de la proteína RET. Se indican los cuatro dominios ricos en cadherinas CLD1-4, la zona de unión al Ca²⁺, el paso transmembrana TM y el dominio Tirosina Quinasa. Los números indican la cantidad aproximada de residuos aminoacídicos.

Una vez en el espacio extracelular, los GFLs maduros y solubles homodimerizan y pueden unirse a su GFR α específico, el cual también dimeriza en respuesta a esta unión. Posteriormente, el complejo GFL-GFR α se une al dominio extracelular de RET, induciendo la homodimerización de este último. Este evento

produce la autofosforilación de su dominio intracelular tirosina quinasa y la consecuente activación e inicio de la transducción de señales (Airaksinen et al. 1999, 2006).

En términos generales, la fosforilación de RET activa las vías de **Ras/MAP kinasa**, **PI3 kinasa/AKT**, **fosfolipasa C gama (PLC γ)**, **Src** y **c-Jun N-terminal Kinasa (JNK)** (Fielder et al. 2018) (Figura 2.4). Estas cascadas de señalización actúan sobre múltiples procesos celulares. En los vertebrados, la activación de este complejo cumple un rol crucial durante el desarrollo modulando la supervivencia celular, la proliferación, la diferenciación, la migración, la ramificación, la quimiotaxis y el mantenimiento de varias poblaciones de neuronas (Airaksinen et al. 1999; Airaksinen y Saarma 2002; Fielder et al. 2018).

Adicionalmente, se han descrito otros receptores para GDNF con capacidad de señalización como la molécula de adhesión neural **NCAM** y el Proteoglicano Heparán sulfato **syndecan-3**. **NCAM** se une a GFR α y actúa independientemente de RET, regulando la adhesión celular, permitiendo el crecimiento axonal, la plasticidad sináptica y la migración celular (Paratcha et al. 2003) (Figura 2.4). **Syndecan-3**, facilita la activación de RET por los GFLs y promueve el crecimiento neurítico y la dispersión celular (Bespalov et al. 2011).

Por otra parte, se han descrito efectos antagónicos producidos por la unión de RET a GAS1 (growth arrest specific gene 1). Esta proteína es estructuralmente similar a la familia de receptores GFR α y puede unirse y regular la actividad de transducción de señales de RET (Cabrera et al. 2006). Dependiendo de la expresión espacio temporal de GAS1 durante el desarrollo, este factor genera efectos diferentes tales como la inhibición del crecimiento, la inhibición de la proliferación o la inducción de la apoptosis (Schueler-Furman et al. 2006).

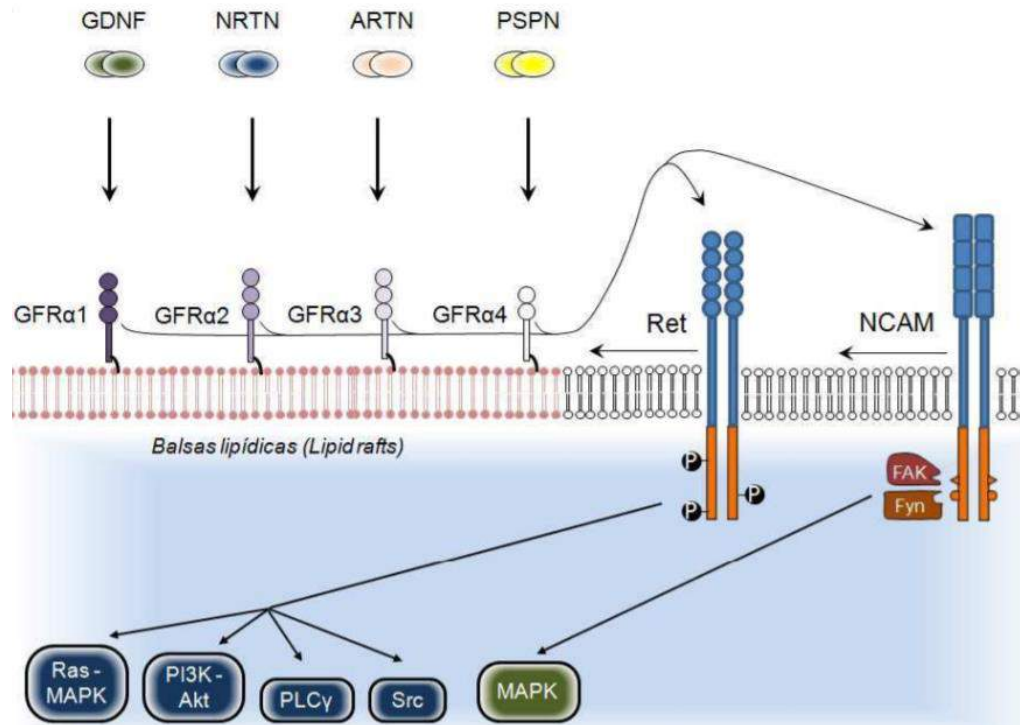


Figura 2.4: Esquema de la activación del complejo GFLs/GFR α /RET y GFLs/GFR α /NCAM y la activación de sus principales cascadas intracelulares. GDNF (Factor Derivado de las Células Gliales), NRTN (Neurturin), ARTN (Artemin) y PSPN (Persephin) constituyen la familia de factores neurotróficos GFLs (Ligandos de la Familia de Factores Neurotróficos Derivados de las Células Gliales); GFR α ¹⁻⁴ (Receptores de la Familia de Factores Neurotróficos Derivados de las Células Gliales); RET (Receptor Tirosina Quinasa); NCAM (molécula de adhesión neural), Ras/MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases); PI3K/AKT (fosfatidilinositol 3-quinasa Clase 1); PLC γ (fosfolipasa C gama); Src (tyrosine-protein kinase Src). Tomado de Alsina (2015).

Proteínas de acción apoptótica: Bcl-2 y Bax

Las proteínas de la familia Bcl-2 son conocidas por su función en la regulación de la apoptosis o muerte celular programada (Adams y Cory 2007). En respuesta a ciertos estímulos, estas proteínas regulan la liberación del Citocromo C desde las mitocondrias. Una vez en el citoplasma, el Citocromo C se une a la proteína APAF-1, y da inicio a la formación del complejo apoptosoma que activa a las caspasas e inicia el proceso de apoptosis (Kale et al. 2017).

Las proteínas de la familia Bcl-2 están conservadas evolutivamente y presentan una extensión de entre 200 y 220 aminoácidos y dominios BH homólogos. Algunos miembros además poseen dominios transmembrana en su extremo C-terminal que les permiten anclarse a la membrana mitocondrial (Youle y Strasser 2008). Estas proteínas presentan al menos uno de los cuatro dominios proteicos BH característicos: BH1, BH2, BH3 y BH4, los cuales son cruciales para su funcionalidad (Youle y Strasser 2008). De acuerdo a la función y la presencia de éstos, las proteínas Bcl-2 pueden clasificarse en tres grupos (Figura 2.5).

El grupo con los cuatro dominios BH en su estructura posee funciones **anti-apoptóticas**, y sus miembros son Bcl-XL y Bcl-2. Estas proteínas se localizan en la membrana mitocondrial externa (Bcl-XL) o en otras membranas intracelulares (Bcl-2) y su principal función es inhibir la actividad de las proteínas pro-apoptóticas (Polčic et al. 2015). El grupo con tres dominios BH (BH1, BH2 y BH3) tiene funciones **pro-apoptóticas** y sus miembros son Bax y Bak. Estas proteínas son esenciales para la permeabilización de la membrana mitocondrial que posibilita la liberación del Citocromo C al citoplasma. En ausencia de señal apoptótica, éstas proteínas se encuentran inactivas en forma de monómeros en el citoplasma o en la membrana externa mitocondrial (Polčic et al. 2015). El tercer grupo de esta familia posee sólo el dominio BH3 y sus funciones son **pro-apoptóticas**. En respuesta a la señal de activación, estas moléculas son activadas mediante una modificación post-

traduccional y posteriormente translocadas a la mitocondria donde ejercen sus funciones induciendo la translocación de Bax, la oligomerización de Bax o Bak en las membranas mitocondriales y la consecuente liberación del Citocromo C desde la mitocondria al citoplasma (Polčic et al. 2015).

GDNF fue descrito inicialmente como un potente factor capaz de prevenir la neurodegeneración en las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio en ratas (Lin et al. 1993). Posteriormente, se determinó que los efectos anti-apoptóticos de GDNF se debían a una regulación positiva sobre las proteínas Bcl-2 y Bcl-XL (Sawada et al. 2000), una inhibición de la translocación de Bax a las mitocondrias (Ghribi et al. 2001), una inhibición de la actividad de la caspasa-3 y una supresión de la expresión de otros genes relacionados al estrés celular (Li et al. 2007). Estos efectos son mediados por la vía PI3K, una de las rutas metabólicas activadas por el complejo GFLs/GFR α /RET, ya que se demostró que el tratamiento con LY294002, un inhibidor específico de PI3K, anula los efectos protectores de GDNF sobre la apoptosis (Sawada et al. 2000; Steinkamp et al. 2003).

Los Patrones Consenso para cada dominio son:

BH1: [LVMENQ]-[FTLS]-x-[GSDECQ]-[GLPCKH]-x(1,2)-[NST]-[YW]-G-[RK]-[LIV]-[LIVC]-[GAT]-[LIVMF](2)-x-F-[GSAEC]-[GSARY]

BH2: W-[LIM]-x(3)-[GR]-G-[WQ]-[DENSAV]-x-[FLGA]-[LIVFTC]

BH3: LIVAT]-x(3)-L-[KARQ]-x-[IVAL]-G-D-[DESG]-[LIMFV]-[DENSHQ]-[LVSHRQ]-[NSR]

BH4: [DS]-[NT]-R-[AE]-[LI]-V-x-[KD]-[FY]-[LIV]-[GHS]-Y-K-L- [SR]-Q-[RK]-G-[HY]-x-[CW]

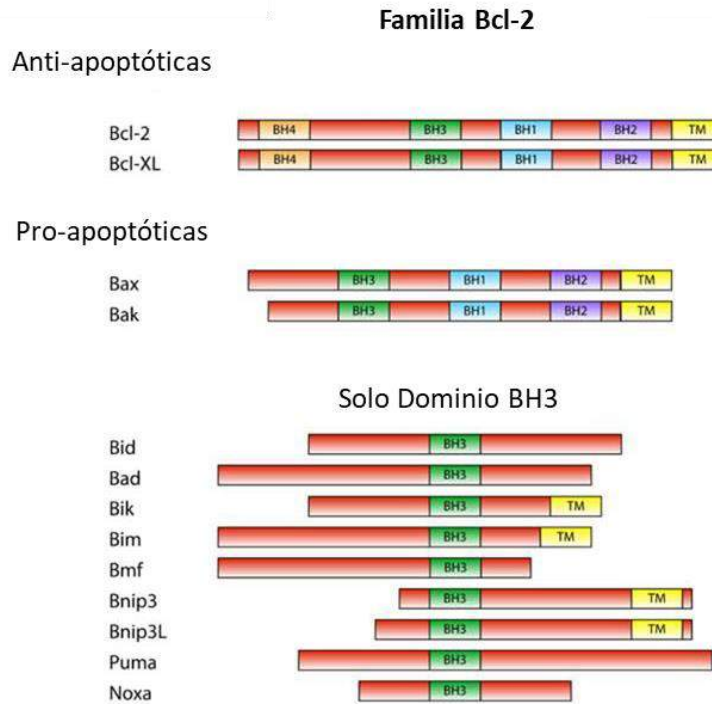


Figura 2.5: Estructura de la familia de proteínas Bcl-2. Se indica la presencia y posición de los dominios BH1-4 y el dominio transmembrana TM. Tomado y modificado de Polčic et al. (2015).

TRPa: Receptor de Potencial Transitorio A

Los **Receptores de Potencial Transitorios (TRP Transient receptor potential cation channel)** son una superfamilia de canales catiónicos que se encuentran presentes en la membrana plasmática de todos los eucariotas, desde las levaduras hasta los mamíferos (Clapham 2003). Estos canales, son capaces de responder a múltiples estímulos sensoriales como la temperatura, el tacto, el dolor, la osmolaridad, las feromonas, el gusto, etc. (Clapham 2003).

Existe gran cantidad de evidencia que indica que los mecanismos de termosensación se encuentran altamente conservados en la filogenia y asociados a la familia de proteínas TRP (Caterina 2006). En mamíferos, el canal TRPa1, miembro de la

familia TRP, ha sido asociado a la captación de estímulos térmicos nocivos, los cuales son activados también por sustancias irritantes y algunos péptidos inflamatorios (Viana et al. 2002; Bandell et al. 2004; Doerner et al. 2007). También se han identificado canales TRP sensibles a la temperatura en invertebrados, y se ha demostrado que su ablación genética altera el comportamiento frente a los cambios en la temperatura del ambiente (Tracey et al. 2003; Rosenzweig et al. 2005). En larvas del equinodermo *Patiria pectinifera*, se ha caracterizado el receptor PpTRPA1, perteneciente a esta familia, que participa de la respuesta comportamental de termotáxis positiva (Saito et al. 2017).

En estudios realizados en ratones adultos, se identificaron dos grandes poblaciones de neuronas cutáneas con funciones de nocicepción (Molliver et al. 1995; Priestley et al. 2002). En una de estas poblaciones se expresa el receptor RET (Luo et al. 2007), y se ha demostrado que la activación del complejo GDNF/GFR α /RET es condición necesaria para la expresión de ciertos genes específicos, entre los que se encuentra la proteína TRPa y cuya expresión es eliminada o reducida en los modelos de animales mutantes con ausencia de la proteína RET (Patapoutian et al. 2003; Luo et al. 2007).

Los canales TRP son permeables a cationes monovalentes como el Na⁺ y al catión bivalente Ca²⁺ (Clapham 2003; Patapoutian et al. 2003; Voets y Nilius 2003; Alexander et al. 2011). La proteína TRPa1 del *Homo sapiens* tiene una extensión de 1119 aminoácidos, posee seis dominios transmembrana y sus regiones N- terminal y C- terminal orientadas hacia la zona intracelular (Liao et al. 2015). Cada dominio está compuesto por repeticiones en tándem de 33 aminoácidos del motivo Anquirina (ANK por sus siglas en inglés). Los dominios ANK se encuentran en una gran cantidad de proteínas en particular en células eucariotas y funcionan como sitios de interacción proteicos. Dos de los seis dominios ANK forman el poro central del canal y los demás forman un tetrámero que rodea a dicho poro (Herrera et al. 2008). El perfil proteico de estos dominios se encuentra bajo el código PS50088 de PROSITE. Además, la proteína posee un dominio de unión al calcio que sigue el patrón consenso D-{W}-

[DNS]-{ILVIFYW}-[DENSTG]-[DNQGHRK]-{GP}-[LIVMC]-[DENQSTAGC]-x(2)-[DE]-[LIVMFYW].

En el extremo C-terminal esta proteína presenta una estructura de hélice superenrollada, que se cree que está involucrada al anclaje al inositol polifostato necesario para una óptima actividad del canal (Paulsen et al. 2015) (Figura 2.6).

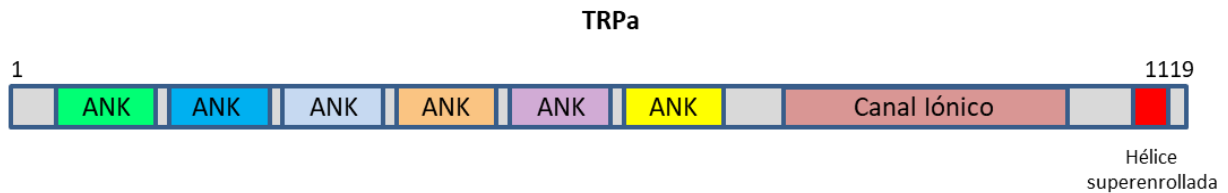


Figura 2.6. Estructura de la proteína TRPa. Se indican los seis dominios ANK, la zona que forma el canal iónico, y la región de hélice superenrollada. Los números indican la cantidad aproximada de residuos aminoacídicos.

Syt1: Sinaptotagmina 1

Las Sinaptotagminas (Syt) son una familia de proteínas sensibles al Ca^{2+} involucradas en la exocitosis de vesículas con neurotransmisores (Südhof 2002). Estas proteínas tienen un dominio transmembrana en su extremo N-terminal que les permite anclarse a las membranas de las vesículas, y dos dominios C2 (C2A y C2B) que en presencia de Ca^{2+} interactúan con diversos complejos de la membrana plasmática y median la fusión de la vesícula facilitando la exocitosis (Südhof 2002; Schwarz 2004) (Figura 2.7).

Existen 17 isoformas diferentes de Syt en humanos y en roedores, y la mayoría se expresa en el tejido neural. Las isoformas Syt1 y Syt2 están asociadas a la liberación rápida y sincrónica de neurotransmisores (Südhof 2002, 2004; Jahn et al. 2003), mientras que otras isoformas participan en la liberación lenta y asincrónica de los componentes de secreción de las células neuroendocrinas. Por último, existen algunas isoformas insensibles al Ca^{2+} de las que aún se desconoce con precisión su función (Saraswati et al. 2007; Volynski y Krishnakumar 2018).

En el equinoideo *S. purpuratus* se han descrito 14 isoformas de Syt. Estas proteínas poseen dos dominios C2 que presentan gran similitud de secuencia con los dominios C2A y C2B hallados en las Syt de mamíferos (Burke et al. 2006b). En particular, la Sinaptotagmina B (Syt1-1) de equinodermos, muestra un alto nivel de similitud a la proteína Syt1 de mamíferos cuya función es la fusión de las vesículas con neurotransmisores, y se consideran genes ortólogos (Burke et al. 2006b). La expresión de Syt1-1 en equinodermos puede detectarse desde estadios tempranos del desarrollo. En larvas pluteus de 72 y 96 h se han identificado tanto el ARNm como la proteína Syt1-1 en células neuronales del órgano apical, la banda ciliar y la zona oral. Asimismo, la expresión de esta proteína también se ha detectado en el tejido neural de organismos adultos. Tanto por la estructura proteica como por su patrón de expresión, se cree que Syt1-1 cumple un rol similar en la liberación de neurotransmisores (Burke et al. 2006a, b).

Los factores tróficos GFLs cumplen una importante función durante el desarrollo y el mantenimiento del Sistema Nervioso Central y Periférico, y además constituyen potentes factores de diferenciación al fenotipo neural (Fielder et al. 2018). Por estas razones, resulta interesante el análisis simultáneo de la expresión de ambas proteínas, con el fin de dilucidar si la acción trófica de GFL genera algún tipo de respuesta sobre la expresión del gen Syt1-1, característico de neuronas en equinodermos.

Las proteínas Syt1 tienen aproximadamente 422 aminoácidos, sus dominios C2 están constituidos por entre 130 y 140 aminoácidos cada uno, y son las regiones que presentan el mayor grado de conservación a lo largo de la filogenia. En su conformación tridimensional, cada dominio C2 forma una estructura compacta llamada *llave C2* (Sutton et al. 1995). El perfil proteico se encuentra descrito bajo el código PS50004 de PROSITE (Figura 2.7).

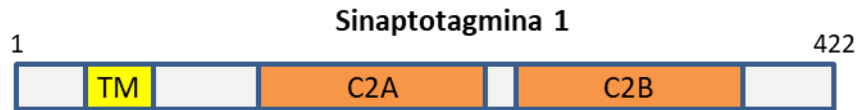


Figura 2.7. Estructura de la proteína Sinaptotagmina 1. Se indican el dominio transmembrana TM, y los dominios funcionales C2A y C2B. Los números indican la cantidad aproximada de residuos aminoacídicos.

GFAP: Glial Fibrillary Acidic Protein

GFAP es una proteína de filamento intermedio (FI) que se expresa mayoritariamente en las células gliales del sistema nervioso (Hol y Pekny 2015). Los FI constituyen el mayor componente del citoesqueleto de las células eucariotas y su diámetro ronda los 10 nm. De acuerdo al tamaño y la secuencia aminoacídica, los FI se pueden agrupar en seis subgrupos, los cuales se expresan específicamente en distintos tejidos (Chen y Liem 1994).

GFAP, vimentina, desmina y periferina constituyen el tipo III de FI (Hol y Capetanaki 2017). En humanos, la proteína GFAP tiene una extensión de 432 aminoácidos y al igual que los demás FI, está compuesta por tres regiones: una cabeza en el extremo N-terminal, una región central denominada ROD y una cola en el extremo C-terminal. Mientras que la región ROD es un dominio característico de todos los FI y está altamente conservada, las regiones de la cabeza y cola varían en su tamaño y secuencia aminoacídica (Hol y Pekny 2015) (Figura 2.8).

La región ROD está compuesta por 309 aminoácidos que en su secuencia contienen repeticiones en tándem de siete residuos según la forma (a-b-c-d-e-f-g)_n. Las posiciones *a* y *d* generalmente son ocupadas por residuos apolares, y éstos contribuyen a la formación de la estructura de alfa hélice superenrollada característica de este dominio (Chen y Liem 1994). Esta región espontáneamente puede formar dímeros o tetrámeros, sin embargo, el ensamblaje de oligómeros para formar los filamentos necesita de la contribución de las regiones de la cabeza y cola

(Hol y Capetanaki 2017). El patrón consenso de este dominio es [IV]-{K}-[TACI]-Y-[RKH]-{E}-[LM]-L-[DE] almacenado con el código PS00226 en PROSITE.

La región de la cabeza tiene un total de 42 aminoácidos y es rica en residuos básicos. El estado de fosforilación o desfosforilación de algunos aminoácidos específicos en esta región regula el ensamblaje de unidades en filamentos, en especial el motivo MERRRITS-ARRSY se ha asociado a dicha función (Ralton et al. 1994).

La región de la cola está compuesta por 55 aminoácidos que de acuerdo a su estado de fosforilación o desfosforilación, regula el mecanismo de ensamblaje de GFAP, tanto en la fase de nucleación como en la elongación del filamento (Ralton et al. 1994).

En respuesta a una lesión o degeneración en el sistema nervioso, los astrocitos (componente mayoritario de la glía) rápidamente incrementan la expresión de GFAP (Junier et al. 1994), se localizan alrededor de la zona afectada y sufren una serie de cambios morfológicos incluida la hipertrofia del cuerpo celular, la extensión de los procesos celulares y un incremento en la producción de factores neurotróficos y citoquinas que promueven la supervivencia celular (Lin et al. 1993; Junier et al. 1994; Logan et al. 1994). En experimentos con ratones deficientes en GFAP se observó que en ausencia de este FI hay un incremento considerable en la expresión del factor GDNF, miembro de la familia de los GFLs, y este evento genera un efecto protector sobre las neuronas del cuerpo estriado que sufrieron la lesión. Asimismo, se determinó que si bien GFAP regula la expresión de GDNF no afecta la expresión de otros factores neurotróficos como CNTF o NGF (Hanbury et al. 2003).

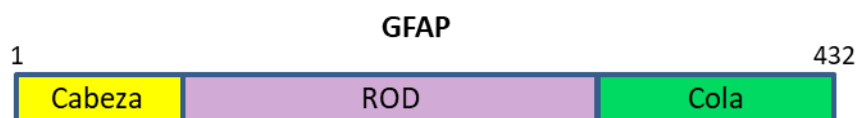


Figura 2.8. Estructura de la proteína GFAP. Se indican el dominio de la cabeza, el dominio central ROD y el dominio de la cola. Los números indican la cantidad aproximada de residuos aminoacídicos.

Proteínas constitutivas

Los genes usualmente conocidos como “Housekeeping” codifican para proteínas constitutivas que son necesarias para el mantenimiento de las funciones basales celulares. Por esta razón, se expresan normalmente en todas las células de un organismo, tanto en condiciones normales como patológicas, independientemente del tejido o especie en la que se trabaje, el momento del ciclo celular, el momento del desarrollo del organismo, etc. (Livak y Schmittgen 2001).

Estos genes se utilizan comúnmente en dos tipos de estudios científicos. Para analizar el set de genes mínimos necesarios para el funcionamiento y la supervivencia celular; y como controles internos para estudios experimentales de expresión génica (Moein et al. 2017). De esta forma, la confiabilidad de los resultados obtenidos mediante PCR cuantitativa (qPCR), se puede relativizar a la expresión endógena de un gen control que se considere invariante, para corregir errores metodológicos de la técnica y normalizar los resultados (Livak y Schmittgen 2001).

En este aspecto los genes para Actina, GAPDH, EF1- α 1 y RPL8 son considerados genes constitutivos y eficientes como Housekeeping, por lo que se los introducirá brevemente a continuación (Eisenberg y Levanon 2013; Curina et al. 2017; Moein et al. 2017).

Actina

La actina es una de las proteínas que se encuentran más conservadas a lo largo de la filogenia y no difiere en más de un 20% entre organismos tan distantes como las algas y los humanos (Hanukogole et al. 1983; Gunning et al. 2015). Su secuencia tiene una extensión de entre 374 y 379 aminoácidos (Figura 2.9), y responde a dos patrones consenso que se localizan en distintas regiones:

Patrón consenso 1, código PS00406: [FY]-[LIV]-[GV]-[DE]-E-[ARV]-[QLAH]-x(1,2)-[RKQ](2)-[GD].

Patrón consenso 2, código, PS00432: W-[IVC]-[STAK]-[RK]-x-[DE]-Y-[DNE]-[DE].

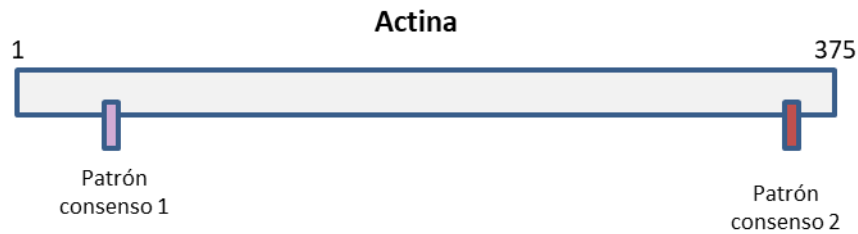


Figura 2.9. Estructura de la proteína Actina. Se indican las dos zonas aproximadas en donde se ubican los patrones consenso. Los números indican la cantidad aproximada de residuos aminoacídicos.

GAPDH: Gliceraldehído 3-Fosfato Deshidrogenasa

La proteína GAPDH es una enzima presente en el citoplasma y núcleo de todas las células eucariotas y procariotas (Martin y Cerff 2017; Huang et al. 1989). Cumple un rol importante tanto en la glucólisis como en la gluconeogénesis al catalizar la oxidación y fosforilación de la molécula D-gliceraldehído-3-fosfato en 1,3-difosfoglicerato (Dugaiczky et al. 1983; Huang et al. 1989).

GAPDH presenta una extensión de alrededor de 333 aminoácidos y posee dos dominios funcionales: un dominio de unión a NAD y un dominio C-terminal (Figura 2.10). Además, posee dos motivos conservados, uno de los cuales forma el sitio activo enzimático y tiene el patrón consenso [ASV]-S-C-[NT]-T-[S]-x-[LIM] (PS00071-PROSITE), y el segundo motivo en la zona del sitio de nitrosilación de la cisteína con la secuencia consenso [IL]-x-C-x-x-[DE] según Uniprot (Figura 2.10).

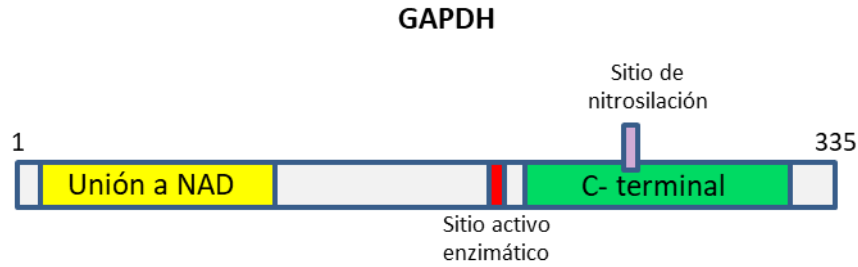


Figura 2.10. Estructura de la proteína GAPDH. Se indican el dominio de unión a NAD, el dominio C-terminal, el sitio activo enzimático y el sitio de nitrosilación. Los números indican la cantidad aproximada de residuos aminoacídicos.

RPL8

Rpl8 pertenece a la familia de proteínas ribosomales L2P y en esta organela se encuentra asociada al ARNr 5.8S. Entre sus funciones se destacan la participación en la unión entre los aminoácidos y los RNAt, y como uno de los componentes del sitio de unión del factor de elongación 2, ubicado en la interfaz de la subunidad ribosomal (Shi y Liang 1994).

La secuencia de Rpl8 tiene una extensión de aproximadamente 257 aminoácidos, los cuales se encuentran muy conservados a lo largo de la filogenia. Posee dos dominios: un dominio ribosomal L2 localizado entre los aminoácidos 11 y 90, y un dominio ribosomal L2C, entre los 97 y los 234 (Shi y Liang 1994; Yoshihama et al. 2002) (Figura 2.11). La región más conservada de esta proteína se encuentra en el extremo C-terminal y tiene la secuencia consenso: P-x (2)-R-G-[STAIV](2)-x-N-[APK]-x-[DE] almacenada en PROSITE bajo el código PS00467.



Figura 2.11: Estructura de la proteína Rpl8. Se indica el dominio L2 y el dominio L2C ubicado en la región C-terminal. Los números indican la cantidad aproximada de residuos aminoacídicos.

EF1- α 1: Factor de Elongación 1-alfa1

La proteína EF1- α 1 cataliza la entrega de cada aminoácido unido a su ARN de transferencia (aa-ARNt) durante la fase de elongación de la síntesis proteica. Además de esta función, participa en una gran cantidad de funciones celulares entre las que se destacan su interacción con algunos factores de transcripción y la regulación de la expresión génica (Maruyama et al. 2007; Sasikumar y Goss Kinzy 2012).

EF1- α 1 posee una extensión de alrededor de 460 aminoácidos y se encuentra muy conservado filogenéticamente. Presenta tres dominios: EF-Tu1 con 238 aminoácidos y ubicado en su región N-terminal que incluye el sitio de unión al nucleótido Guanina. Este sitio de unión a la Guanina es capaz de intercambiar la forma inactiva GDP por la forma activa GTP, y su patrón consenso es: D-[KRSTGANQFYW]-x(3)-E-[KRAQ]-x-[RKQD]-[GC]-[IVMK]-[ST]-[IV]-x(2)-[GSTACKRNQ]. El dominio EF-Tu2 y el EF-Tu3, ambos involucrados en la unión al aa-ARNt y otras proteínas (Nissen et al. 1995; Wang et al. 1997) (Figura 2.12).

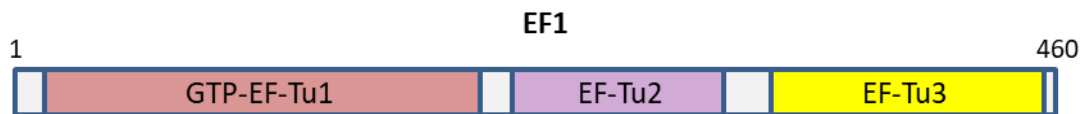


Figura 2.12: Estructura de la proteína EF1- α 1. Se indican el dominio N-terminal GTP-EF-Tu1, el dominio central EF-Tu2 y el dominio C-terminal EF-Tu3. Los números indican la cantidad aproximada de residuos aminoacídicos.

Para poder conocer la expresión de un gen de interés y cómo ésta se modifica en determinadas condiciones, primero es necesario conocer su secuencia génica. Las secuencias de los genes de las proteínas pertenecientes a la cascada GFLs/GFR α /RET y de los genes de las proteínas que se encuentran río debajo de la misma, aun no han sido anotados para la especie de estudio *Arbacia dufesnii*. Por lo tanto, el objetivo específico de este capítulo de tesis es encontrar en los transcriptomas de *A. dufesnii* secuencias candidatas para genes ortólogos del complejo GFLs/GFR α /RET y/o de genes río abajo del mismo, y diseñar partidores o *primers* para luego poder estudiar su expresión.

Materiales y métodos del capítulo 2

Para llevar a cabo el análisis de las secuencias de los genes de interés en distintas especies, entre las que se encuentra el erizo de mar de *Arbacia dufresnii*, se utilizaron algunas herramientas y funciones bioinformáticas que se detallan en esta sección.

2.1 Genes de interés para el estudio de las acciones mediadas por los GFLs

A partir de la información conocida sobre la cascada intracelular mediada por el complejo de señalización GFLs/GFR α /RET, se seleccionaron varios genes que podrían verse afectados por la activación de dicho complejo de señalización. Para ello se realizó una búsqueda informática exhaustiva de posibles genes candidatos y en base a la información obtenida, se seleccionaron diez genes. Entre ellos, se eligió un gen que pertenece al complejo de señalización, genes que se encuentran río abajo del mismo o que podrían verse afectados por éste, y genes que no tienen ninguna relación con dicha cascada y que se considera que mantienen su expresión sin alteración (genes constitutivos).

2.2 Búsqueda de secuencias en bases de datos públicas

Para cada gen seleccionado, se realizó una búsqueda de las secuencias aminoacídicas en diferentes organismos, a fin de generar un amplio espectro de información de secuencias para su posterior comparación. Por esta razón, los organismos fueron elegidos por su pertenencia a diferentes familias ubicadas a lo largo de la filogenia. Se seleccionaron secuencias de organismos protostomados como la clase Insecta, y los phyla Nematoda y Mollusca, y de organismos deuterostomados, como los vertebrados mamíferos, aves, anfibios y peces, y los invertebrados hemicordados y equinodermos.

Para esta búsqueda, se utilizaron las bases de datos públicas **Uniprot** y **NCBI**, la herramienta bioinformática **BLAST**, y el programa **CLC Main Workbench 8.0**, en donde se almacenó la información.

UniProt (The Universal Protein Resource: www.uniprot.org), es un repositorio central de datos sobre proteínas. Fue creado como resultado de la colaboración entre el Instituto Europeo de Bioinformática (EMBL-EBI), el Instituto Suizo de Bioinformática (SIB) y el Recurso de Información Proteica (PIR). Actualmente, se ha convertido en el sitio de referencia a nivel mundial para el almacenamiento y búsqueda de información confiable sobre proteínas.

NCBI (National Center for Biotechnology Information: www.ncbi.nlm.nih.gov), forma parte de la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos. Esta extensa base de datos es una importante fuente de información de biología molecular. Se desatacan la sección PubMed, que nuclea artículos científicos, y la sección GenBank que almacena información relacionada a secuencias genómicas, además de otros datos biotecnológicos de relevancia.

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), es un algoritmo informático que permite, mediante el alineamiento de secuencias de ADN, ARN o proteínas, la comparación de una secuencia específica o “Query” con una base de datos, por ejemplo,

la de NCBI. Como resultado, se obtiene una lista de secuencias de gran similitud a la secuencia Query que muchas veces corresponden a secuencias de genes ortólogos de otras especies. También es muy común el uso de BLAST para caracterizar una secuencia desconocida e inferir su función a partir de la comparación con otras secuencias que ya se encuentran caracterizadas en la base de datos.

Es importante destacar que este tipo de búsqueda por similitud en especies alejadas filogenéticamente, se realizó utilizando las secuencias aminoacídicas y no las génicas. Esto se debe a que el código genético del ADN es degenerado, es decir, que más de una combinación o triplete de bases nitrogenadas codifican para el mismo aminoácido en una proteína. Por lo tanto, si bien a nivel génico pueden presentarse mayores variaciones en las secuencias de genes ortólogos, la mayoría de éstas quedan sin efecto al traducirse los transcritos a proteína, observándose una mayor conservación en las secuencias aminoacídicas respecto a las de ADN.

Para cada gen, se inició la búsqueda con una exploración en la base de datos Uniprot. En los casos en que una secuencia correspondiente a un organismo se encontrara **revisada**, es decir, previamente descripta, caracterizada y anotada por otros grupos de investigación, se le dio preferencia y se la almacenó. Para los casos en que la secuencia buscada en determinado organismo no se encontrara revisada, se realizó una búsqueda por similitud en la base de datos NCBI. Para ello, se utilizó la herramienta BLAST y un templado de búsqueda o **secuencia Query** que ya se encontrara revisado y perteneciente a un organismo modelo, de preferencia *Homo sapiens* u otro mamífero. Este tipo de búsqueda arroja una gran cantidad de secuencias que por lo general no están totalmente caracterizadas. Por lo tanto, se dio preferencia a aquellas que presentaron mayor información sobre la secuenciación, mayor similitud a la secuencia Query, una secuencia completa y zonas con función, es decir dominios y motivos proteicos, similares a los de la secuencia Query.

Las secuencias que cumplieron con estos requisitos, fueron seleccionadas y almacenadas en forma local y en formato FASTA, mediante el programa CLC Main

Workbench 8.0. Junto a esto, también se guardó registro de los códigos de identificación de cada una de estas secuencias.

2.3 Análisis y comparación de secuencias

La comparación de secuencias es un punto clave para el análisis de una secuencia desconocida, y también para poder realizar inferencias evolutivas. En este caso, el análisis y la comparación de las secuencias almacenadas en la sección 2.2, se realizó utilizando el programa CLC Main Workbench 8.0.

Alineamiento múltiple de secuencias

El **alineamiento de secuencias** es el primer paso para la comparación de una serie de datos y consiste en el establecimiento de una correspondencia residuo a residuo entre las secuencias analizadas y luego una búsqueda de patrones de caracteres comunes (Xiong 2006).

Cuando en un alineamiento, una secuencia desconocida muestra una similitud significativa respecto a un grupo de secuencias ya caracterizadas, puede inferirse que es miembro de esta familia de proteínas. En este caso, se puede predecir la estructura y las posibles funciones aunque no se hayan estudiado aún experimentalmente, permitiendo un acercamiento preliminar a la proteína (Xiong 2006). También pueden inferirse relaciones evolutivas entre secuencias, ya que si dos genes son lo suficientemente similares es poco probable que esto se deba al azar y por lo tanto se pueden encontrar proteínas con un origen evolutivo común, es decir, **homólogas** (Autenrieth et al. 2005; Xiong 2006).

En un alineamiento de secuencias aminoacídicas homólogas, las regiones que alinean pero no son idénticas representan sustituciones de residuos y las regiones en

donde los residuos de una secuencia no se corresponden con nada en la otra secuencia representan inserciones o deleciones que ocurrieron durante la evolución. Sin embargo, también es posible que dos secuencias que derivan de un ancestro común hayan divergido lo suficiente como para no mostrar claramente las relaciones evolutivas a nivel de secuencia. En este último caso, la homología puede detectarse utilizando otros métodos, como por ejemplo, analizando sólo las zonas funcionales como son los motivos y/o dominios proteicos, dado que en estas regiones la divergencia suele ser mucho menor.

Condiciones de alineamiento

Para este trabajo se realizaron alineamientos globales en todos los casos, es decir, que se buscó el mejor alineamiento posible utilizando las secuencias aminoacídicas completas. Este tipo de alineamiento parte del supuesto de que las secuencias utilizadas son muy similares entre sí, que en este caso puede justificarse debido a que fueron halladas por su caracterización previa en Uniprot, o bien por similitud utilizando BLAST en NCBI.

Entre las condiciones que se fijaron se encuentran las penalizaciones por Gaps. Para realizar un alineamiento óptimo, muchas veces es necesario aplicar gaps o huecos en alguna de las secuencias, las cuales representan inserciones y deleciones que pudieron ocurrir durante la evolución. Sin embargo, dado que estos eventos son relativamente raros en la naturaleza en comparación con las sustituciones, computacionalmente se asigna un costo a cada una de estas operaciones a fin de equilibrar estos eventos y obtener un resultado que imite lo mejor posible a lo que pudo ocurrir naturalmente (Autenrieth et al. 2005; Xiong 2006). Los valores de penalización por **aparición de un gap**, se asignan arbitrariamente teniendo en cuenta que cuanto mayor es el costo, más raras serán las inserciones o deleciones haciendo más difícil encontrar similitudes entre dos secuencias. Por otra parte, cuanto menor sea la penalización, mayores serán las probabilidades de alinear secuencias que no sean homólogas. Otro factor a tener en cuenta es el **costo de extensión de un gap** ya existente. Dado que se sabe que es mucho más probable que se extienda un gap ya

existente a que se forme un gap nuevo, es que la penalidad por extensión suele ser mucho menor que la penalización por aparición. Por último, los gaps que aparecen en la región terminal de una proteína muchas veces son despenalizados para que el programa pueda alinear secuencias de largo muy variable (Xiong 2006).

Para este análisis se realizó para cada gen un alineamiento global y múltiple, es decir, con todas las secuencias halladas en las bases de datos y alineando las secuencias completas. Se asignaron los valores estándar para abrir un gap y para su extensión de 10-1 respectivamente, y no se despenalizaron las inserciones al final de la secuencia.

Comparación de pares de un alineamiento múltiple

Una vez obtenido cada alineamiento, se realizó una comparación de pares. Este análisis permite una visión general de las secuencias alineadas a partir de una tabla de comparación (Xiong 2006). Los parámetros observados fueron **Identidad de secuencias** que calcula el número de residuos idénticos en cada posición del alineamiento y **porcentaje de identidad** que calcula el porcentaje del parámetro anterior.

Uno de los factores cruciales en la comparación de secuencias es la longitud de las mismas. Cuanto más cortas son las secuencias, mayor es la probabilidad de encontrar puntos de alineamiento debidos al azar, y cuanto más largas son las secuencias menor es la probabilidad de que alineen con un buen porcentaje cuando no son homólogas. Por esta razón, en las secuencias más cortas se debe aumentar la rigurosidad para inferir homología.

Con este propósito, para la comparación de secuencias de los alineamientos globales se utilizaron los parámetros descritos por Rost (Rost 1999). Este autor relaciona el porcentaje de identidad hallado para cada secuencia con la longitud de las mismas y delimita tres zonas: La **zona segura** en donde la similitud es tan alta que puede inferirse homología con gran certeza, la **zona crepuscular** en donde la inferencia de homología se vuelve menos segura y la similitud debido al azar empieza a tener cierta relevancia, y la **zona oscura**, en donde no puede inferirse homología de

secuencias a partir de este análisis, dado que la similitud hallada es tan baja que podría deberse tanto a un origen ancestral común como al azar (Rost 1999; Xiong 2006) (Figura 2.13).

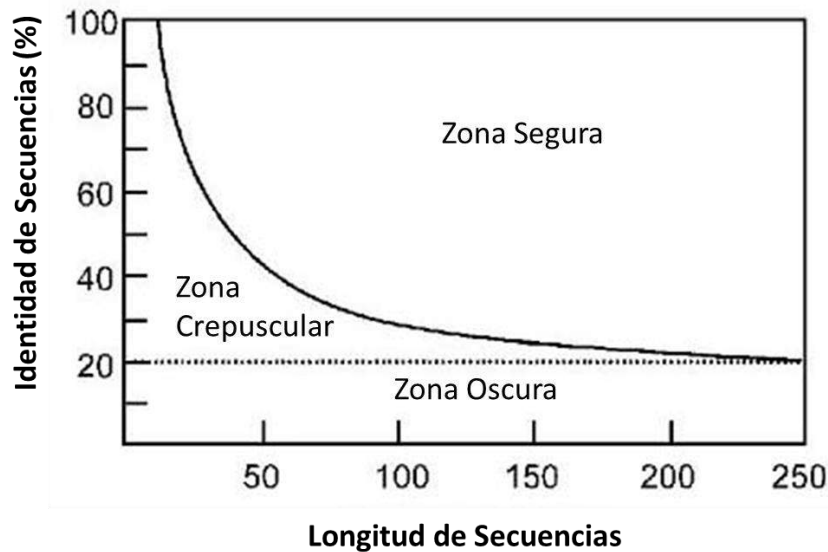


Figura 2.13: Las tres zonas delimitadas que relacionan el porcentaje de Identidad de las secuencias con la Longitud de las mismas en un alineamiento: La zona segura, la zona crepuscular y la zona oscura. Tomado y modificado de Rost (1999).

Para cada uno de los diez genes de estudio, se realizó un análisis preliminar de todas las secuencias almacenadas provenientes de las bases de datos Uniprot y NCBI a fin de refinar la selección y descartar las secuencias no homologas y/o disimiles.

Para ello, se realizó un alineamiento múltiple y global y una comparación de pares. Con los datos obtenidos y utilizando los criterios de Ross (1999), se analizó la similitud y posible homología de cada una de las secuencias respecto al alineamiento múltiple. Las secuencias que presentaron muy baja similitud y se ubicaron en la Zona Oscura fueron descartadas, y las secuencias que presentaron media y alta similitud correspondiente a la Zona Crepuscular y Zona Segura, se conservaron.

2.4 Selección de secuencias en *A. dufresnii*

Dado que el organismo de estudio, *A. dufresnii*, aún no tiene su genoma secuenciado, la búsqueda de las secuencias de cada uno de los genes de interés en esta especie, se realizó en bases de datos construidas a partir de dos transcriptomas.

Un transcriptoma es la suma de todos los genes que se encuentran expresándose, es decir, el ARN total aislado de uno o varios organismos, en determinado momento y en determinado tejido. Por lo tanto, en éste sólo van a hallarse los genes que se encuentran activos en dichas circunstancias. Este tipo de análisis brinda gran información para el estudio de la funcionalidad de las proteínas, pero también debe conocerse su alcance, ya que la ausencia de una secuencia en el transcriptoma no significa que dicho gen no exista en el genoma del organismo, sino que no se encuentra activo en ese momento, o bien, que el mismo es lo suficientemente diferente como para no ser detectada en un BLAST local con alta rigurosidad.

Teniendo esto en consideración, se eligió de entre las secuencias almacenadas, una secuencia que además de cumplir con los criterios mencionados en la sección 2.3, pertenezca a un organismo filogenéticamente cercano a *A. dufresnii*, como puede ser otro equinodermo. Esta secuencia fue utilizada como Query para realizar un BLAST local en las bases de datos de transcriptomas pertenecientes al **Laboratorio de Biorrecursos Antárticos del Instituto Antártico Chileno** (INACH). Los transcriptomas fueron secuenciados por la empresa Macrogen (Korea) y ensamblados por el Bioproyecto ID PRJNA523322.

Los transcriptomas analizados fueron:

1. Transcriptoma de tejido de Glándula Digestiva de *A. dufresnii* adulto.
2. Transcriptoma de tejido de Esófago de *A. dufresnii* adulto.

Como resultado de la búsqueda BLAST en los dos transcriptomas de *A. dufresnii*, se obtuvieron varias secuencias similares al Query utilizado. Estas secuencias fueron

almacenadas y luego analizadas para decidir si alguna de ellas presentaba las características del gen de interés. Para ello:

1. Se realizó un BLAST en NCBI con cada una de las secuencias encontradas en los transcriptomas de *A. dufresnii*. Estas secuencias aún no se encuentran descritas por otros grupos de investigación por lo que no aparecen en NCBI, pero a través de BLAST se puede observar si generan alineamientos con secuencias del mismo gen en otras especies que ya estén descritas.

2. Utilizando la herramienta Pfam, se estudiaron los dominios proteicos de cada secuencia seleccionada de *A. dufresnii*.

La base de datos Pfam almacena información sobre familias de proteínas analizando la similitud de secuencias, estructura y perfil HMM (hidden Markov models). Esta herramienta permite por comparación, la identificación de los dominios proteicos en una secuencia desconocida.

3. Se dio prioridad a las secuencias completas halladas en los transcriptomas de *A. dufresnii* y con una extensión de aminoácidos similar a la que presentan las demás secuencias para dicho gen.

4. Se realizó un segundo alineamiento y una comparación de pares, pero en esta ocasión se incluyeron todas las secuencias de *A. dufresnii* encontradas junto las previamente seleccionadas de otras especies. Con esta información, se eligió la secuencia de *A. dufresnii* que presentó el mayor grado de similitud con el resto.

5. Por último, con la secuencias previamente seleccionadas y la secuencia elegida para *A. dufresnii*, se construyó un tercer y definitivo alineamiento en el que se marcaron los dominios y motivos proteicos característicos, y una comparación de pares en donde puede apreciarse la identidad de secuencias y su porcentaje.

2.5 Análisis de las secuencias nucleotídicas de *A. dufresnii*

A partir de la secuencia aminoacídica de *A. dufresnii* que se seleccionó en la sección 2.4 para cada gen de interés, se buscó y localizó en los transcriptomas locales, su secuencia nucleotídica correspondiente. Utilizando la herramienta de traducción del sitio *web de expasy* (web.expasy.org/translate), se obtuvo el marco de lectura de cada secuencia (ORF por sus siglas en inglés) y se marcaron los codones de inicio y fin de la misma. Se adicionó la secuencia aminoacídica correspondiente a la zona codificante completa y sobre ésta última se marcaron los dominios proteicos.

2.6 Diseño de partidores para las secuencias candidatas de *A. dufresnii*

El diseño de partidores o *primers* es una de las aplicaciones más utilizadas en bioinformática. Los partidores son secuencias cortas de oligonucleótidos que son utilizadas para la aplicación de técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la secuenciación de ADN. Cualquiera sea su uso, el diseño de los partidores que se utilizarán, es un paso crítico para la obtención de resultados satisfactorios (Dieffenbach et al. 1993).

Los partidores son diseñados para ser el inverso complementario de una cadena de ADN o templado en una región de interés. Por cada región a amplificar se diseñan dos partidores, el partidador *Forward* y el partidador *Reverse*, situados a ambos extremos del segmento a amplificar y con sentidos de lectura opuestos. Durante una amplificación, cada oligonucleótido hibridará de manera específica con una de las dos

cadena de ADN, permitiendo luego de varios ciclos, la amplificación de un fragmento específico (Dieffenbach et al. 1993; Xiong 2006).

Para cada una de las secuencias de *A. dufresnii* analizadas en la sección 2.5, se diseñaron dos pares de partidores que amplifican dos fragmentos distintos de entre 80 pares de bases (pb) y 200 pb dentro de cada gen. Para el diseño de estos partidores se utilizó el programa *Amplifx 1.7.0*, que permite a partir de un templado o secuencia, obtener varios oligonucleótidos candidatos que cumplen con características pre-establecidas. Se establecieron como condiciones una longitud del partidor de entre 18 y 22 pb; que garantiza una alta especificidad y una rápida hibridación; una diferencia máxima de T_m (temperatura de fusión) de 1°C , es decir, que la temperatura a la cual la mitad de las moléculas del partidor están apareadas con el ADN templado no difiere en más de un grado entre el partidor Forward y su par Reverse; una calidad del partidor mínima de 90%; alta estabilidad en el extremo 3'; etc.

Los partidores obtenidos fueron revisados con la herramienta OligoCalc (Kibbe 2007) para descartar problemas asociados a la formación de estructuras secundarias como horquillas, auto-complementariedad y complementariedad cruzada entre los partidores de un par. A fin de esquematizar el fragmento a amplificar, ambos pares de partidores seleccionados para cada gen se marcaron sobre sus secuencias correspondientes.

Resultados del capítulo 2

Genes de interés

Luego de un análisis cuidadoso de la cascada de señalización de los GFLs y una búsqueda preliminar, se seleccionaron diez genes candidatos que se encontraron presentes a lo largo de la filogenia y que son el objeto de estudio de las secciones a continuación:

Tabla 2.1: Genes de interés seleccionados y algunas de sus características

Gen	Motivo de elección	Función	Localización celular
BCL2	Gen susceptible de ser afectado por la cascada de estudio	Anti- apoptótica	Citoplasma
BAX		Apoptótica	Citoplasma, membrana mitocondrial
TRPa		Termorreceptor	Membrana celular
GFRα	Gen perteneciente a la cascada de estudio	Receptor de GFLs	Membrana celular
Syt1	Gen específico de sistema nervioso	Exocitosis de vesículas neuronales	Vesículas
GFAP		Filamentos intermedios de glía	Citoplasma
ACTINA	Genes constitutivos	Proteína estructural	Citoplasma
GAPDH		Proteína del metabolismo celular	Citoplasma
RPL8		Proteína Ribosomal	Ribosoma
EF1-α1		Proteína Ribosomal	Ribosoma

Búsqueda y análisis de secuencias

Con las secuencias halladas en las bases de datos Uniprot y NCBI, que cumplieron con las características deseadas en la sección 2.2, fueron refinadas en la sección 2.3, y utilizadas para la búsqueda de genes ortólogos en los transcriptomas de *A. dufresnii* en la sección 2.4, se construyeron alineamientos globales para cada gen y se señalaron los dominios, los motivos proteicos, y los patrones consenso característicos. Asimismo, se realizaron las comparaciones de pares correspondientes para cada alineamiento. Por una cuestión de espacio, los alineamientos globales y los códigos de identificación de cada una de las secuencias utilizadas se encuentran en el Anexo de este capítulo (Figuras 2.14 a 2.23, Tabla 2.13).

Bcl-2: Supresor de la apoptosis

El alineamiento de las secuencias de Bcl-2 muestra moderada variabilidad, en especial en el extremo N-terminal (Anexo: Figura 2.14). En las especies analizadas, esta proteína tiene una extensión de entre 195 y 325 aminoácidos. En la mayoría de los casos esta longitud fue de alrededor de 220 aminoácidos y coincide con la extensión característica para esta proteína. Las secuencias más largas fueron las de *Xenopus laevis* con 300 aminoácidos y de *D. melanogaster* con 325 aminoácidos, que en ambos casos presentaron una gran inserción ubicada entre las posiciones 110 y 220 del alineamiento. En *D. melanogaster* se encontraron además, 2 inserciones pequeñas entre las posiciones 273 y 278, y entre 388 y 392. En los invertebrados deuterostomados (los equinodermos y el hemicordado *Saccoglossus kowalevskii*) se observó una gran inserción en la región N-terminal y una delección en la región C-terminal, entre las posiciones 272 y 278.

Utilizando los patrones consenso BH, se identificaron los cuatro dominios y se observó que en estas zonas las secuencias se encuentran más conservadas. El dominio BH4 fue el que presentó mayor variación respecto a su patrón consenso. Los dominios BH3, BH1 y BH2 se encontraron más conservados y por lo general todas las secuencias respondieron en un buen porcentaje a sus patrones consensos respectivos.

La secuencia obtenida para *A. dufresnii* tiene 249 aminoácidos y presenta la inserción y la delección mencionadas para los equinodermos. Al analizar los patrones consenso de cada dominio se observó una concordancia regular en la secuencia respecto al dominio BH4, y una gran concordancia respecto a los demás dominios.

Comparación de pares del alineamiento múltiple de Bcl-2

La comparación de pares para este alineamiento múltiple muestra un alto porcentaje de identidad en los grupos filogenéticamente cercanos como por ejemplo entre vertebrados, o entre equinodermos (Tabla 2.2).

Las secuencias de los vertebrados analizados *H. sapiens*, *Bos taurus*, *Rhincodon typus*, *X. laevis*, del hemicordado *S. kowalevskii*, del molusco *Mizuhopecten yessoensis* y del nematodo *Trichuris trichiura*, presentan un porcentaje de identidad mayor al 24%. Las secuencias correspondientes a los equinodermos, entre ellos *A. dufresnii*, presentan un alto porcentaje de identidad entre sí, que supera el 45%; un porcentaje de identidad cercano al 20% con *S. kowalevskii*; y un bajo porcentaje respecto al resto de las secuencias. Por último, la secuencia analizada para *D. melanogaster*, presenta un bajo porcentaje de identidad con todas las secuencias analizadas

Tabla 2.2. Comparación de pares para el alineamiento múltiple de Bcl-2. La zona inferior izquierda corresponde a la identidad de las secuencias y la zona superior derecha corresponde a los porcentajes de identidad de dichas secuencias.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>H. sapiens_239aa</i>	1	90,38	43,03	53,00	27,21	13,56	13,62	12,46	33,20	26,74	15,00
<i>B. taurus_229aa</i>	2	216	43,83	51,67	27,84	14,66	15,02	12,54	34,60	28,23	14,12
<i>R. tytus_205aa</i>	3	105	103	32,45	24,61	13,89	13,95	15,58	30,00	24,24	10,81
<i>X. laevis_300aa</i>	4	159	155	98	20,64	11,64	11,72	11,75	24,68	20,69	12,61
<i>S. kowalevskii_228aa</i>	5	77	76	63	71	20,00	19,20	19,84	41,20	33,19	11,62
<i>S. A. dufresnii_249aa</i>	6	43	45	40	44	54	85,21	46,85	16,42	16,30	9,55
<i>S. purpuratus_255aa</i>	7	44	47	41	45	53	219	45,77	16,42	15,64	8,73
<i>A. japonicus_239aa</i>	8	38	37	43	43	51	119	119	16,02	13,62	8,38
<i>M. yessoensis_195aa</i>	9	82	82	66	76	96	44	45	41	35,41	11,57
<i>T. trinchira_204aa</i>	10	69	70	56	66	78	44	43	35	74	10,69
<i>D. melanogaster_325aa</i>	11	51	48	36	44	43	36	33	31	39	37

Bax: Activador de la apoptosis

El alineamiento de las secuencias de Bax muestra moderada variabilidad, siendo la región N-terminal la más variable (Anexo: Figura 2.15). Las secuencias analizadas tienen una extensión de entre 190 y 241 aminoácidos, y la mayoría se encuentra alrededor de 200 aminoácidos que es la extensión característica para esta proteína. La secuencia de *S. purpuratus* es la única que se aleja del tamaño promedio con una extensión de 241 aminoácidos, y en la cual se puede apreciar una inserción en la zona N-terminal. En el grupo de los vertebrados se observa una delección entre las posiciones 104 y 112, y en los equinodermos una delección entre las posiciones 91 y 96. Asimismo, en los invertebrados deuterostomados, se observa una inserción entre las posiciones 184 y 187.

Utilizando los patrones consenso BH, se identificaron tres dominios BH, estando ausente el dominio BH4. Las secuencias analizadas se ajustaron en gran medida a los patrones consenso para los dominios BH1, BH2 y BH3, siendo el más conservado el dominio BH1.

La secuencia obtenida para *A. dufresnii* tiene 222 aminoácidos, presenta la deleción y la inserción ya mencionada para los invertebrados deuterostomados. Además, esta secuencia mostró una buena concordancia respecto a cada dominio BH.

Comparación de pares del alineamiento múltiple de Bax

La comparación de pares para este alineamiento múltiple muestra un buen porcentaje de identidad, en especial en los grupos filogenéticamente cercanos. En todos los casos, los porcentajes de identidad fueron superiores al 22%, siendo entre vertebrados mayores al 49%, y entre equinodermos mayores al 38% (Tabla 2.3).

La secuencia correspondiente a *A. dufresnii* mostro porcentajes de identidad superiores al 26% respecto a los vertebrados, y porcentajes superiores al 30% en comparacion con otros invertebrados.

Tabla 2.3. Comparación de pares para el alineamiento múltiple de Bax. La zona inferior izquierda corresponde a la identidad de las secuencias y la zona superior derecha corresponde a los porcentajes de identidad de las secuencias analizadas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>H. sapiens_192aa</i>	1	97,40	50,50	54,95	26,64	27,04	25,33	24,90	35,05
<i>B. taurus_192aa</i>	2	187	50,50	54,05	26,20	26,18	24,89	24,50	35,05
<i>B. pectinirostris_190aa</i>	3	101	101	49,33	29,52	26,41	23,25	24,29	28,97
<i>X. tropicalis_221aa</i>	4	122	120	110	27,00	26,58	24,58	22,92	32,19
<i>S. kowalevskii_217aa</i>	5	61	60	67	64	46,02	42,60	38,37	30,94
<i>1_A. dufresnii_222aa</i>	6	63	61	61	63	104	52,02	63,07	28,19
<i>A. planci_217aa</i>	7	58	57	53	58	95	116	48,76	28,57
<i>S. purpuratus_241aa</i>	8	62	61	60	58	94	152	118	25,61
<i>C. virginica_199aa</i>	9	75	75	62	75	69	64	64	63

TRPa: Receptor de Potencial Transitorio A

El alineamiento para las distintas secuencias de TRPa muestra una gran variabilidad en el extremo N-terminal, en donde las primeras 307 posiciones son ocupados por unas pocas secuencias. Luego, a lo largo del alineamiento las secuencias se vuelven más similares especialmente en algunas regiones. En el extremo C-terminal aumenta nuevamente la variabilidad (Anexo: Figura 2.16).

La longitud de las secuencias analizadas se encuentra entre 1022 y 1398 aminoácidos, estando la mayoría alrededor de 1100 aminoácidos que es la longitud habitual para este péptido. La secuencia más larga corresponde a *P. pectinifera* (1398 aminoácidos), la cual posee una gran inserción en la región N-terminal. Por su parte, las secuencias más cortas corresponden a *A. dufresnii* (1022 aminoácidos) y a *S. purpuratus* (1024 aminoácidos), que en ambos casos presentan una delección en la región N-terminal. A lo largo del alineamiento se observan varias inserciones que se mantienen dentro de grupos taxonómicos, por ejemplo, una inserción hallada en vertebrados entre las posiciones 641 a 644, o las inserciones presentes en la mayoría de equinodermos entre las posiciones 1020 a 1046 y 1377 a 1390.

Utilizando la herramienta **Pfam** fue posible identificar las regiones de los seis dominios ANK, cada uno compuesto por repeticiones en tándem de 33 aminoácidos. En estos dominios las secuencias presentan mayor similitud, a excepción del primer dominio ANK que presenta más variabilidad que los demás. También fue posible identificar la región que forma el canal iónico la cual es muy extensa y presenta algunos residuos muy conservados. Por último, la región C-terminal correspondiente al dominio de hélice superenrollada se encontró poco conservada, estando ausente en la mayoría de los invertebrados analizados.

La secuencia obtenida para *A. dufresnii* tiene 1022 aminoácidos y presenta la delección N-terminal ya mencionada, que involucra y elimina al primer dominio ANK. Al igual que en la mayoría de los invertebrados analizaos, esta secuencia no posee el dominio C-terminal de hélice superenrollada. Sin embargo, los cinco dominios ANK

restantes y el canal iónico fueron identificados y se encuentran conservados respecto al resto del alineamiento.

Comparación de pares del alineamiento múltiple de TRPa

La comparación de pares para el alineamiento múltiple de TRPa muestra un buen porcentaje de identidad, y nuevamente altos porcentajes de similitud entre especies emparentadas.

Todas las secuencias presentaron porcentajes de identidad mayores o muy cercanos al 20%, siendo entre vertebrados mayores al 46%, y entre equinodermos mayores al 22%. La secuencia de *A. planci*, presentó los porcentajes de identidad mas bajos, alcanzando un mínimo de 19,61% al compararse con *H. sapiens*, y un máximo de 36,07% respecto a *S. kowaleskii* (Tabla 2.4).

La secuencia correspondiente a *A. dufresnii* mostró altos porcentajes de identidad respecto a otros equinodermos, y porcentajes superiores al 20% tanto al compararla con los vertebrados, como con los demás invertebrados analizados.

Tabla 2.4. Comparación de pares para el alineamiento múltiple de TRPa. La zona inferior izquierda corresponde a la identidad de las secuencias y la zona superior derecha corresponde a los porcentajes de identidad de las secuencias analizadas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>H. sapiens_1119aa</i>	1	80,36	46,04	53,09	22,01	21,74	21,46	19,61	19,61	20,84	32,45
<i>B. taurus_119aa</i>	2	904	46,14	55,01	22,47	21,36	21,49	20,37	19,72	20,21	32,12
<i>C. milii_1101aa</i>	3	523	526	47,05	22,27	22,18	22,06	20,41	19,69	20,53	32,56
<i>X. tropicalis_1144aa</i>	4	610	631	542	21,41	20,55	20,68	20,18	19,65	20,79	33,31
<i>S. kowalevskii_1145aa</i>	5	283	289	281	280	25,47	26,15	26,22	36,07	28,23	22,03
<i>S. purpuratus_1024aa</i>	6	265	260	265	254	314	77,78	43,69	22,33	38,41	20,19
<i>4_A. dufresnii_1022aa</i>	7	262	262	264	256	323	798	43,98	22,61	38,56	20,39
<i>P. pectinifera_1398aa</i>	8	288	299	296	299	372	613	617	22,07	38,72	20,35
<i>A. planci_1206aa</i>	9	262	263	258	266	444	287	291	326	23,32	19,94
<i>C. virginica_1234aa</i>	10	282	273	273	285	367	487	489	563	316	20,66
<i>D. melanogaster_1197aa</i>	11	393	389	394	404	295	256	259	304	276	288

GFR α : Receptor de la familia de los GFLs

La búsqueda de secuencias para este gen en los transcriptomas utilizados de *A. dufresnii* no arrojó un resultado suficientemente favorable. Por esta razón, se utilizó como referencia a *S. purpuratus*, un organismo que está cercanamente emparentado con la especie de estudio, cuyo genoma se encuentra secuenciado y en el que se pudo encontrar una secuencia que se ajusta a las características del gen GFR α .

El alineamiento de las secuencias de GFR α muestra grandes variaciones tanto en la composición de las secuencias aminoacídicas como en la extensión de las mismas. Sin embargo, también se observan algunas características conservadas (Anexo: Figura 2.17).

La longitud de las secuencias analizadas se encuentra entre 456 y 916 aminoácidos, siendo en la mayoría de los vertebrados de alrededor de 460 aminoácidos, y en todos los invertebrados analizados mucho más extensas. Las secuencias más largas fueron del nematodo *Trichinella nelsoni* con 916 aminoácidos, y del insecto *D. melanogaster* con 864 aminoácidos, y presentaron algunas inserciones a lo largo de la secuencia. En los vertebrados analizados se observaron múltiples deleciones muy conservadas dentro de este grupo y distribuidas a lo largo de toda la secuencia.

Utilizando la información provista por la base de datos **Pfam**, fue posible identificar los dominios D1, D2 y D3, y también la zona de anclaje a la membrana plasmática por un glicosil fosfatidil inositol (GPI). Las secuencias dentro de los dominios presentan un mayor grado de similitud entre sí, en especial entre los vertebrados. Asimismo, el patrón de cisteínas respecto a la presencia y posición de este aminoácido se encuentra notablemente conservado en todas las secuencias analizadas, y fue señalado en el alineamiento (Anexo: Figura 2.17). Finalmente, la región GPI de anclaje a membrana se observa medianamente conservada.

En particular, la secuencia obtenida para *S. purpuratus* posee 717 aminoácidos y presenta el patrón de cisteínas totalmente conservado, con la excepción de la primer cisteína del dominio D2. Asimismo, dentro de los dominios D, esta secuencia presenta una moderada similitud respecto a los vertebrados. Por último, en la región GPI, se observa una baja similitud con las demás secuencias.

Comparación de pares del alineamiento múltiple de GFR α

La comparación de pares para este alineamiento múltiple generó una tabla con dos regiones bien delimitadas. Por un lado, se observa un gran porcentaje de identidad entre todas las secuencias de vertebrados con valores mayores al 52%. Por otro lado, los invertebrados en general presentaron bajos porcentajes de similitud con el resto de las secuencias (Tabla 2.5).

En particular, la secuencia hallada para *S. purpuratus*, presentó porcentajes de identidad de alrededor del 10% respecto a todos los vertebrados analizados y al nematodo *T. nelsoni*. Un porcentaje levemente mayor de 16,7% con *D. melanogaster*, y un notable aumento del porcentaje de identidad respecto al equinodermo *Acanthaster planci* con un valor de 24,8%.

Tabla 2.5. Comparación de pares para el alineamiento múltiple de GFR α . La zona inferior izquierda corresponde a la identidad de las secuencias y la zona superior derecha corresponde a los porcentajes de identidad de las secuencias analizadas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
<i>H. sapiens_465aa</i>	1	93,13	92,95	77,73	54,60	68,55	10,38	8,53	13,62	7,71	
<i>B. taurus_456aa</i>	2	434		92,31	77,31	52,80	67,99	10,43	8,96	13,45	7,81
<i>M. musculus_468aa</i>	3	435	432		77,52	54,00	69,04	10,38	8,79	13,70	7,81
<i>G. gallus_469aa</i>	4	370	368	369		55,09	69,77	10,42	8,80	12,62	7,62
<i>S. canicula_492aa</i>	5	273	264	270	276		52,89	10,40	8,70	11,47	8,53
<i>X. tropicalis_460aa</i>	6	327	325	330	330	265		10,07	8,67	11,76	7,08
<i>S. purpuratus_717aa</i>	7	84	84	84	84	85	81		24,80	10,05	16,70
<i>A. planci_608aa</i>	8	65	68	67	67	67	66	188		8,27	16,80
<i>T. nelsoni_916aa</i>	9	126	124	127	117	106	109	96	79		10,00
<i>D. melanogaster_864aa</i>	10	73	74	74	72	82	67	159	152	110	

Syt-1: Sinaptotagmina 1

El alineamiento entre las distintas secuencias para Syt1 presentó una alta similitud en la mayor parte de la extensión y una región N-terminal moderadamente variable (Anexo: Figura 2.18).

En las especies analizadas, esta proteína tiene una longitud de entre 378 y 474 aminoácidos, siendo en la mayoría de los casos de alrededor de 420 aminoácidos que es la extensión característica. La secuencia más larga corresponde a *D. melanogaster* que presenta una inserción en la región N-terminal, y la más corta corresponde a *A. dufresnii*, con una deleción en la misma región. La región central del alineamiento se encuentra altamente conservada, destacándose sólo una inserción en la secuencia de *C. elegans* entre las posiciones 155 y 161, y una deleción en todos los vertebrados analizados entre las posiciones 332 y 226. Los últimos aminoácidos del extremo C-terminal presentan una deleción en el grupo de los invertebrados deuterostomados de ocho aminoácidos que le da una cierta variabilidad a esta región.

El análisis de los dominios se realizó con la información provista por **PROSITE** bajo el código PS50004 y **Pfam**. Se localizó el dominio transmembrana en la región N-terminal, el cual se encuentra altamente conservado en todas las especies analizadas, y los dominios C2A y C2B que representan las regiones más conservadas de este alineamiento.

La secuencia obtenida para *A. dufresnii* tiene 378 aminoácidos, presenta gran similitud con el resto de las secuencias halladas, la deleción descrita en la región C-terminal para los invertebrados deuterostomados, y los tres dominios característicos de esta proteína.

Comparación de pares del alineamiento múltiple de Syt1

La comparación de pares para el alineamiento múltiple de Syt1 muestra muy altos porcentajes de similitud entre todas las secuencias analizadas, con un máximo de 99,76% entre especies de mamíferos y un mínimo de 49,80% entre las especies *C. elegans* y *D. melanogaster*. La secuencia hallada para *A. dufresnii* presentó porcentajes de identidad muy altos, siendo superiores al 58% respecto los vertebrados, superiores al 51% respecto a los protostomados, y mayores al 73% respecto a los invertebrados deuterostomados (Tabla 2.6).

Tabla 2.6. Comparación de pares para el alineamiento múltiple de Syt1. La zona inferior izquierda corresponde a la identidad de las secuencias y la zona superior derecha corresponde a los porcentajes de identidad de las secuencias analizadas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>H. sapiens_422aa</i>	1	99,76	87,33	72,54	56,92	60,23	58,73	59,82	59,82	58,77	51,43	50,52
<i>B. taurus_422aa</i>	2	421	87,33	72,54	56,92	60,23	58,73	59,82	59,82	58,77	51,43	50,31
<i>C. mili_433aa</i>	3	379	379	72,35	56,70	58,18	57,65	58,48	58,93	58,54	51,21	49,79
<i>X. laevis_416aa</i>	4	309	309	314	57,81	59,11	59,32	58,45	58,68	58,90	50,44	49,38
<i>S. kowalevskii_426aa</i>	5	255	255	254	259	73,83	75,63	75,63	76,09	64,32	51,08	53,00
<i>7_A. dufresnii_378aa</i>	6	259	259	256	253	316	79,39	86,87	86,46	64,88	52,22	52,80
<i>A. planci_427aa</i>	7	259	259	260	261	332	339	82,01	82,24	66,67	52,69	54,04
<i>S. purpuratus_419aa</i>	8	262	262	262	256	329	364	351	95,72	64,38	51,09	53,83
<i>L. variegatus_421aa</i>	9	262	262	264	257	331	364	352	403	64,38	51,52	53,62
<i>L. gigantea_424aa</i>	10	258	258	257	258	283	279	294	282	282	54,77	54,04
<i>C. elegans_421aa</i>	11	234	234	233	229	237	235	245	235	238	247	49,80
<i>D. melanogaster_474aa</i>	12	245	244	241	238	256	255	261	260	259	261	245

GFAP: Glial fibrillary acidic protein

El alineamiento para las secuencias de GFAP muestra una gran similitud entre residuos en la zona central y cierta variabilidad en los extremos N-terminal y C-terminal (Anexo: Figura 2.19).

La longitud de las secuencias analizadas se encuentra entre 428 y 631 aminoácidos. Las secuencias más cortas corresponden al grupo de los vertebrados, las de mediana longitud corresponden a los invertebrados deuterostomados y las más

extensas corresponden a los protostomados. En la región N-terminal se observan varias inserciones y deleciones en los distintos grupos taxonómicos que hacen que el alineamiento sea variable entre las posiciones 20 y 105. En la región central se observan cuatro deleciones en el grupo de los vertebrados, y en el extremo C-terminal se observan varias deleciones e inserciones que se mantienen dentro de grupos taxonómicos como en el caso de los vertebrados que presentan cuatro grandes deleciones, o el caso de los invertebrados deuterostomados con una inserción entre las posiciones 655 a 676.

Utilizando la información provista por PROSITE y otras fuentes bibliográficas se identificó para este filamento intermedio el dominio de la cabeza en la región N-terminal, el dominio ROD en la región central y el dominio de la cola en la región C-terminal. Asimismo, se identificaron los dos patrones consenso característicos que se encuentran muy conservados.

La secuencia obtenida para *A. dufresnii* tiene 571 aminoácidos y los tres dominios característicos. El dominio de la cabeza es el más variable y presenta regular homología respecto a su patrón consenso. El dominio ROD presenta gran similitud de secuencia y además cumple con su patrón consenso característico. Por último, el dominio de la cola presenta una similitud moderada y la inserción ya mencionada para los invertebrados deuterostomados.

Comparación de pares del alineamiento múltiple de GFAP

La comparación de pares para este alineamiento múltiple muestra un buen porcentaje de identidad entre organismos filogenéticamente cercanos, con valores superiores al 51% entre vertebrados, mayores al 47% entre invertebrados deuterostomados, y mayores al 20% entre protostomados. Asimismo, los valores más bajos fueron de alrededor del 20% o levemente inferiores, y se obtuvieron al comparar secuencias de organismos distantes (Tabla 2.7).

La secuencia hallada para *A. dufresnii* presentó porcentajes de identidad de alrededor del 20% respecto a los vertebrados, porcentajes mayores al 22% respecto a los protostomados, y porcentajes mayores al 47% respecto a otros invertebrados deuterostomados.

Tabla 2.7. Comparación de pares para el alineamiento múltiple de GFAP. La zona inferior izquierda corresponde a la identidad de las secuencias y la zona superior derecha corresponde a los porcentajes de identidad de las secuencias analizadas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
<i>H. sapiens_432aa</i>	1		95,37	90,99	65,40	51,83	18,72	20,69	20,16	20,00	19,54	19,18	17,92	20,77	19,97
<i>B. taurus_428aa</i>	2	412		91,92	64,51	53,46	19,16	20,83	20,46	20,29	19,83	19,47	18,33	21,10	19,97
<i>M. musculus_430aa</i>	3	394	398		64,73	51,83	19,87	21,18	20,81	20,65	20,53	19,51	18,22	20,93	19,78
<i>D. rerio_444aa</i>	4	293	289	290		54,74	17,72	18,67	20,26	19,94	19,97	18,93	17,73	20,13	18,62
<i>X. laevis_458aa</i>	5	241	247	241	254		17,06	17,73	18,12	18,12	18,43	17,36	16,42	20,29	19,25
<i>S. kowalevskii_577aa</i>	6	117	119	124	112	109		49,06	48,13	47,96	47,10	49,14	36,39	25,84	22,89
<i>A. brasiliensis_565aa</i>	7	126	126	129	115	111	286		56,50	56,85	56,64	76,58	35,24	24,11	20,61
<i>4_A. dufresnii_571aa</i>	8	124	125	128	126	114	283	326		98,07	79,02	58,58	35,77	24,30	22,04
<i>12_A. lixula_571aa</i>	9	123	124	127	124	114	282	328	560		79,20	58,58	35,93	24,61	22,04
<i>S. purpuratus_565aa</i>	10	119	120	125	123	115	276	324	452	453		56,37	35,29	23,72	22,68
<i>A. planci_567aa</i>	11	117	118	119	117	109	287	435	338	338	323		36,19	24,96	21,60
<i>D. melanogaster_621aa</i>	12	119	121	121	119	111	230	222	225	226	222	228		22,81	22,40
<i>O. volvulus_613aa</i>	13	129	131	130	125	126	169	156	157	159	153	162	156		41,92
<i>C. virginica_631aa</i>	14	127	127	126	119	123	152	136	145	145	149	143	155	267	

Actina

El alineamiento de las secuencias de Actina muestra muy alta similitud a lo largo de toda la secuencia y en todos los organismos analizados (Anexo: Figura 2.20).

Se observa en el alineamiento una longitud muy constante, presentando entre 375 y 376 aminoácidos en todos los organismos analizados. Se observa sólo una deleción de un aminoácido en la posición 2 en el grupo de los vertebrados, y unas pocas sustituciones de un aminoácido en algunas posiciones. Utilizando los dos patrones consenso se localizaron estas regiones en las que no hay ninguna sustitución de los aminoácidos.

La secuencia obtenida para *A. dufresnii* tiene 376 aminoácidos, presenta gran similitud con el resto de las secuencias halladas y los dos motivos consenso característicos conservados.

Comparación de pares del alineamiento múltiple de Actina

La comparación de pares para el alineamiento múltiple de Actina muestra muy altos porcentajes de similitud entre todas las secuencias analizadas, con un máximo de 100% y un mínimo de 94,41%. La secuencia hallada para *A. dufresnii* presenta porcentajes de similitud superiores al 96% en todos los casos (Tabla 2.8).

Tabla 2.8. Comparación de pares para el alineamiento múltiple de Actina. La zona inferior izquierda corresponde a la identidad de las secuencias y la zona superior derecha corresponde a los porcentajes de identidad de las secuencias analizadas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>H. sapiens_375aa</i>	1	100,00	99,47	99,47	96,81	97,34	96,81	96,81	96,01	95,74	97,87	97,87	97,34
<i>B. taurus_375aa</i>	2	375		99,47	99,47	96,81	97,34	96,81	96,81	96,01	95,74	97,87	97,34
<i>R. tyfus_375aa</i>	3	373	373		99,47	97,34	97,34	96,81	96,81	96,01	95,74	98,40	97,87
<i>X. laevis_375aa</i>	4	373	373	373		96,81	97,34	96,81	96,81	96,01	95,74	97,87	97,87
<i>S. kowalevskii_376aa</i>	5	364	364	366	364		96,01	95,48	95,48	95,21	94,41	97,34	97,07
<i>5_A. dufresnii_376aa</i>	6	366	366	366	366	361		98,67	98,67	98,40	97,87	97,61	97,61
<i>A. planci_376aa</i>	7	364	364	364	364	359	371		99,20	98,14	97,61	97,34	97,07
<i>P. pectinifera_376aa</i>	8	364	364	364	364	359	371	373		98,40	97,61	97,34	97,34
<i>S. purpuratus_376aa</i>	9	361	361	361	361	358	370	369	370		98,67	96,28	96,54
<i>S. neumayeri_376aa</i>	10	360	360	360	360	355	368	367	367	371		96,01	96,01
<i>D. melanogaster_376aa</i>	11	368	368	370	368	366	367	366	366	362	361		97,87
<i>C. elegans_375aa</i>	12	368	368	368	368	365	367	365	366	363	361	368	
<i>D. chilensis_376aa</i>	13	366	366	366	366	362	366	366	366	363	361	367	367

GAPDH: Gliceraldehído 3-Fosfato Deshidrogenasa

El alineamiento para las secuencias de GAPDH muestra una alta similitud a lo largo de toda la extensión y en todos los organismos analizados (Anexo: Figura 2.21). Las secuencias analizadas tienen una longitud de entre 332 y 341 aminoácidos que es característica para esta proteína. Se observan pocos eventos de inserción como por

ejemplo, en el extremo N-terminal y en la posición 71, y algunas sustituciones de aminoácidos.

Utilizando la información provista por **Pfam** y PROSITE, se localizaron los dominios de unión a NAD en la región N-terminal y el dominio C-terminal que ocupa la zona central y terminal de la proteína, en ambos casos las secuencias se encuentran muy conservadas. Además, se localizaron los patrones consenso para el sitio activo enzimático y el sitio de nitrosilación de la cisteína.

La secuencia obtenida para *A. dufresnii* tiene 335 aminoácidos y presenta una buena similitud respecto al resto de las secuencias analizadas. Asimismo, se identificaron los dominios de unión a NAD y C-terminal, y ambos patrones consenso, que se encuentran muy conservados.

Comparación de pares del alineamiento múltiple de GAPDH

La comparación de pares para el alineamiento múltiple de GAPDH muestra muy altos porcentajes de similitud entre todas las secuencias analizadas, con un máximo de 94,33% y un mínimo de 69,48%. La secuencia hallada para *A. dufresnii* presenta porcentajes de similitud superiores al 71,81% en todos los casos (Tabla 2.9).

Tabla 2.9. Comparación de pares para el alineamiento múltiple de GAPDH. La zona inferior izquierda corresponde a la identidad de las secuencias y la zona superior derecha corresponde a los porcentajes de identidad de las secuencias analizadas

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
<i>H. sapiens_335aa</i>	1	94,33	85,97	85,07	73,08	74,26	72,94	72,70	71,68	75,60	74,78	71,81	
<i>B. taurus_333aa</i>	2	316		87,09	85,59	73,67	73,89	73,75	73,21	72,49	76,79	74,49	72,92
<i>D. rerio_333aa</i>	3	288	290		83,78	73,67	74,18	73,75	72,62	73,37	75,30	76,54	74,70
<i>X. laevis_333aa</i>	4	285	285	279		74,56	74,18	74,93	72,02	73,37	76,19	74,78	72,62
<i>S. kowalevskii_337aa</i>	5	247	249	249	252		75,81	77,35	72,86	75,37	71,98	69,48	69,91
<i>f_A. dufresnii_335aa</i>	6	251	249	250	250	257		82,54	75,60	83,73	71,81	72,59	72,94
<i>S. purpuratus_337aa</i>	7	248	250	250	254	263	279		76,56	88,50	71,98	71,59	72,43
<i>A. planci_333aa</i>	8	245	246	244	242	247	254	258		76,92	71,81	69,97	72,86
<i>S. neumayeri_337aa</i>	9	243	245	248	248	257	283	300	260		70,71	72,38	73,90
<i>D. melanogaster_332aa</i>	10	254	258	253	256	244	242	244	242	239		73,31	72,49
<i>C. elegans_341aa</i>	11	255	254	261	255	239	249	247	240	249	250		69,97
<i>L. littorea_336aa</i>	12	242	245	251	244	237	248	247	247	252	245	240	

RPL8

El alineamiento para secuencias de RPL8 muestra muy alta similitud a lo largo de casi toda la secuencia, con muy pocas zonas variables ubicadas en los extremos N-terminal y C-terminal (Anexo: Figura 2.22). Las secuencias analizadas tienen una extensión de entre 256 y 264 aminoácidos que coincide con la longitud descripta para esta proteína. Las secuencias de *Apostichopus japonicus* y *Crassostrea virginica* fueron las más largas y en ambas se observa una inserción en la región N-terminal.

Utilizando la información provista por la base de datos **Pfam** y **PROSITE**, fue posible identificar los dos dominios característicos que abarcan casi la totalidad de la proteína: el dominio L2 y el dominio L2C, así como también el patrón consenso.

La secuencia obtenida para *A. dufresnii* tiene 257 aminoácidos, posee ambos dominios proteicos muy conservados y cumple con el 100% del patrón consenso característico.

Comparación de pares del alineamiento múltiple de RPL8

La comparación de pares para el alineamiento múltiple de RPL8 muestra muy altos porcentajes de similitud entre todas las secuencias analizadas, con un máximo de 100% y un mínimo de 68,42%. La secuencia hallada para *A. dufresnii* presenta porcentajes de similitud superiores al 72% en todos los casos (Tabla 2.10).

Tabla 2.10. Comparación de pares para el alineamiento múltiple de RPL8. La zona inferior izquierda corresponde a la identidad de las secuencias y la zona superior derecha corresponde a los porcentajes de identidad de las secuencias analizadas

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
<i>H. sapiens_257aa</i>	1		100,00	96,89	96,89	80,93	83,66	82,95	81,85	80,93	76,54	76,60	79,55	78,38	72,69
<i>B. taurus_257aa</i>	2	257		96,89	96,89	80,93	83,66	82,95	81,85	80,93	76,54	76,60	79,55	78,38	72,69
<i>D. rerio_257aa</i>	3	249	249		96,50	82,10	84,44	83,33	80,69	81,71	77,31	76,98	79,17	78,38	73,46
<i>X. laevis_257aa</i>	4	249	249	248		80,93	82,88	82,95	80,69	80,16	75,77	76,23	78,03	78,38	74,23
<i>S. kowalevski_256aa</i>	5	208	208	211	208		82,49	82,56	82,24	82,49	74,62	81,06	79,17	77,22	72,69
<i>1_A. dufresnei_257aa</i>	6	215	215	217	213	212		85,66	79,54	95,33	88,85	82,26	76,89	76,45	72,31
<i>A. planci_258aa</i>	7	214	214	215	214	213	221		83,78	84,88	76,92	83,46	79,17	79,15	75,77
<i>H. discus_259aa</i>	8	212	212	209	209	213	206	217		78,76	72,69	75,28	83,77	79,54	71,92
<i>S. purpuratus_257aa</i>	9	208	208	210	206	212	245	219	204		88,46	81,51	76,14	76,45	73,08
<i>P. lividus_257aa</i>	10	199	199	201	197	194	231	200	189	230		74,63	68,80	74,03	68,46
<i>A. japonicus_264aa</i>	11	203	203	204	202	214	218	222	201	216	200		75,56	74,91	69,03
<i>C. virginica_264aa</i>	12	210	210	209	206	209	203	209	222	201	183	201		75,47	68,42
<i>D. melanogaster_256aa</i>	13	203	203	203	203	200	198	205	206	198	191	200	200		73,08
<i>C. elegans_260aa</i>	14	189	189	191	193	189	188	197	187	190	178	185	182	190	

EF1- α 1: Factor de Elongación 1-alfa1

El alineamiento para las secuencias EF1- α 1 muestra una gran similitud en todas las secuencias, y la zona más variable se encuentra en el extremo C-terminal, en donde se observan algunas sustituciones de aminoácidos y una delección de un aminoácido ubicada en las últimas posiciones que se aprecia en varios organismos (Anexo: Figura 2.23). Las secuencias analizadas tienen una extensión de entre 450 y 464 aminoácidos. La secuencia más corta corresponde al equinodermo *Pseudocentrotus depressus*, el cual presenta una delección de 11 aminoácidos en su extremo N-terminal. Por otro lado, la secuencia más larga corresponde al equinodermo *A. planci*, el cual posee una inserción de tres aminoácidos entre las posiciones 219 y 221.

Utilizando la información provista por la base de datos **Pfam** y **PROSITE**, fue posible identificar los tres dominios característicos, el dominio GTP-EF-Tu1 en el extremo N-terminal, el dominio central EF-Tu2, y el dominio C-terminal EF-Tu3, y a partir del patrón consenso se identificó el sitio de unión al nucleótido Guanina.

La secuencia obtenida para *A. dufresnii* tiene 260 aminoácidos, presenta sólo algunas sustituciones a lo largo de toda la secuencia, los tres dominios proteicos conservados, y responde en su totalidad al patrón consenso mencionado.

Comparación de pares del alineamiento múltiple de EF1- α 1

La comparación de pares para el alineamiento múltiple de EF1- α 1 muestra muy altos porcentajes de similitud entre todas las secuencias analizadas, con un máximo de 100% y un mínimo de 74,30%. La secuencia hallada para *A. dufresnii* presenta porcentajes de similitud superiores al 79% en todos los casos (Tabla 2.11).

Tabla 2.11. Comparación de pares para el alineamiento múltiple de EF1- α 1. La zona inferior izquierda corresponde a la identidad de las secuencias y la zona superior derecha corresponde a los porcentajes de identidad de las secuencias analizadas

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
<i>H. sapiens_462aa</i>	1	100,00	91,99	90,91	81,76	81,21	77,59	76,72	85,53	83,37	81,86	
<i>B. taurus_462aa</i>	2	462		91,99	90,91	81,76	81,21	77,59	76,72	85,53	83,37	81,86
<i>D. rerio_462aa</i>	3	425	425		90,69	84,12	81,21	78,02	76,94	85,75	85,10	84,23
<i>X. laevis_461aa</i>	4	420	420	419		81,51	79,65	77,75	74,30	83,80	84,23	82,29
<i>A. planci_464aa</i>	5	381	381	392	379		80,43	75,54	75,54	81,76	78,97	80,04
<i>1_A. dufresnii_460aa</i>	6	376	376	376	368	374		81,78	81,78	80,56	79,05	79,48
<i>S. purpuratus_461aa</i>	7	360	360	362	360	352	377		85,68	76,94	78,23	76,51
<i>P. depressus_450aa</i>	8	356	356	357	344	352	377	395		75,22	75,22	75,22
<i>D. melanogaster_463aa</i>	9	396	396	397	388	381	373	357	349		82,51	83,15
<i>C. elegans_463aa</i>	10	386	386	394	390	368	366	363	349	382		82,72
<i>C. gigas_462aa</i>	11	379	379	390	381	373	368	355	349	385	383	

Análisis de las secuencias nucleotídicas de A. dufresnii y diseño de partidores

Como resultado de la sección anterior, se obtuvieron varias secuencias de diferentes especies para cada uno de los genes de interés, junto con un análisis de sus dominios, motivos, patrones proteicos y porcentajes de similitud que permitieron inferir cuales secuencias son homólogas.

En esta sección, se procedió el análisis sólo con las secuencias aminoacídicas halladas para *A. dufresnii*. En las secuencias nucleotídicas correspondientes a cada uno de estos genes, se indica el marco de lectura (ORF por sus siglas en inglés), la secuencia aminoacídica de la zona codificante completa y los dominios proteicos. Con estas secuencias se diseñaron los dos pares de partidores: el par Forward 1 y Reverse 1 (Fw1 y Rv1), y el par Forward 2 y Reverse 2 (Fw2 y Rv2). Estos oligonucleótidos también fueron marcados sobre las secuencias (Anexo: Figuras 2.24 a 2.33).

Por último, a modo de resumen y como producto final de este capítulo, se adicionó la Tabla 2.12, que resume las secuencias de cada uno de los partidores que fueron diseñados y sus características principales. Cabe destacar, que estos partidores fueron enviados a sintetizar, se probaron y utilizaron para las amplificaciones por PCR y qPCR de los capítulos siguientes de esta tesis.

Tabla 2.12. Secuencias para los partidores diseñados ubicados en el sentido 5'-3', tamaño del fragmento a amplificar (amplicón) y temperatura media de fusión (TM).

GEN		Secuencia Partidor 5'- 3'	Amplicón (pb)	TM (°C)
RPL8	Arb_qRPL8_Fw1	ATCGACTTTGCCGAGCGTCAT	132	61.2
	Arb_qRPL8_Rv1	CAGCTCGTTGCGCTTCTTGTA		61.2
	Arb_qRPL8_Fw2	AGTGATCCGTGGACAGCGTAA	106	61.2
	Arb_qRPL8_Rv2	ATGACGCTCGGCAAAGTCGAT		61.2
GAPDH	Arb_qGAPDH_Fw1	GCCGTCAACGATCCCTTCATT	130	61.2
	Arb_qGAPDH_Rv1	TGATCTGCATCCCGTTGACGA		61.2
	Arb_qGAPDH_Fw2	GCCAAGGTGATCAACGACAAC	107	61.2
	Arb_qGAPDH_Rv2	CATTTCTTTCCGCTGGGTCCAT		62.1
ACTINA	Arb_qACTINA_Fw1	CACCGAGCGTGGATACTCTTT	183	61.2
	Arb_qACTINA_Rv1	CGCTCGTTGCCGATTGTGAT		60.5
	Arb_qACTINA_Fw2	CACAATCGGCAACGAGCGTTT	198	61.2
	Arb_qACTINA_Rv2	TGCATACGGTCGGCAATACCA		61.2
EF1-α1	Arb_qEF1- α 1_Fw1	CCGGCCATCTCATCTACAAGT	114	61.2
	Arb_qEF1- α 1_Rv1	TGTCCAACACCCAGGCATACT		61.2
	Arb_qEF1- α 1_Fw2	CAAGTATGCCTGGGTGTTGGA	102	61.2
	Arb_qEF1- α 1_Rv2	GTGATGGCATACTTGCTGGTGT		62.1
BCL2	Arb_qBCL2_Fw1	ATGGTCGGGTGGATGTGACAA	121	61.2
	Arb_qBCL2_Rv1	CGGCTGTTCTTCGACATTC		60.5
	Arb_qBCL2_Fw2	GCAGCCGTCTTGCAAAGTAT	178	61.2
	Arb_qBCL2_Rv2	ATGCTGCCTTCTCCTTCCAGT		61.2
BAX	Arb_qBax_Fw1	CAACAGGATGGGTTTGACAAC	175	59.5
	Arb_qBax_Rv1	AGTCCGAAGGAAGTGCCTCTAT		62.1
	Arb_qBax_Fw2	AGACGAGGATTGAGCAACGAG	108	61.2
	Arb_qBax_Rv2	CAAACCCATCCTGTTGAAACCG		62.1
Syt 1-1	Arb_qSyt_Fw	AGATCAAGCTCGGCAAACCTCC	199	61.2
	Arb_qSyt_Rv1	ACTGGGTTGAGGGTCTTTCTG		61.2
	Arb_qSyt_Fw2	TGGGCAACAGCTACAAGGAGA	108	61.2
	Arb_qSyt_Rv2	GGAGTTTGCCGAGCTTGATCT		61.2
GFAP	Arb_qGFAP_Fw1	CAAGGTGGCCAAGAAACAGGT	142	61.2
	Arb_qGFAP_Rv1	ATGGCGTTTTGGTGCAGTCT		60.5
	Arb_qGFAP_Fw2	TGACCTGCGACCAAGAGTGA	95	60.5
	Arb_qGFAP_Rv2	CATCCTTCTCGGCAATCTGG		60.5
TRPa	Arb_qTRPA_Fw1	CACGCAGATGTTGACGGATGT	177	61.2
	Arb_qTRPA_Rv1	ATCTCCAGGTGCCAGCAAT		60.5
	Arb_qTRPA_Fw2	ACAAGCCAGAGGCACTTAAGG	156	61.2
	Arb_qTRPA_Rv2	CTATCTCCGCTCCGTTATCCA		61.2
GFRα	SP_GFR α _Fw1	AACGTGGATGGTCGGTCATGT	170	61.2
	SP_GFR α _Rv1	CACGGATTGGAGATGGTCAGA		61.2
	SP_GFR α _Fw2	GTTGTGCCTACAGCTACGGT	113	60.5
	SP_GFR α _Rv2	CTGGTGATAGCGACAGTCAGT		61.2

Discusión del capítulo 2

Las secuencias analizadas para los genes de interés **Bcl-2**, **Bax**, **Syt1**, **TRPa**, **GFAP** y **GFR α** mostraron un grado de similitud variable en el alineamiento global, y en general se observó que hay mayor variabilidad en el extremo N-terminal. Por su parte, las secuencias analizadas para los genes constitutivos **Actina**, **Rpl8**, **GAPDH** y **EF1- α 1** mostraron un muy alto grado de similitud, que coincide con lo esperado para este tipo de genes (Livak y Schmittgen 2001; Curina et al. 2017).

En la mayoría de los casos las secuencias analizadas presentaron una longitud aproximada a la esperada para cada proteína. Los casos en que se observaron secuencias que se alejan del tamaño medio de la proteína fueron escasos, y en ellos se pudo identificar la presencia de inserciones y/o deleciones que podrían explicar estas diferencias (Xiong 2006). Por ejemplo, la secuencia del gen **Bcl-2** de *X. laevis* tiene una longitud de 70 aminoácidos más larga que la media, y al mismo tiempo posee una gran inserción de aproximadamente el mismo tamaño. En otras investigaciones, se han hallado secuencias candidatas para el gen Bcl-2 en *X. laevis* y presentan características similares a las encontradas en este trabajo (Cruz-Reyes y Tata 1995). Adicionalmente, se observó que en algunos casos estos eventos de inserción o deleción aparecen en un sólo organismo, como es el caso de la inserción en N-terminal en el gen **TRPa** para *P. pectinifera*. El hecho de que esta inserción esté ausente en otros organismos del mismo grupo taxonómico, podría indicar que este evento ocurrió posterior a la divergencia en los equinodermos, y por lo tanto, sólo *P. pectinifera* y tal vez otro equinodermo muy cercanamente emparentado poseerían esta inserción (Xiong 2006; Saito et al. 2017). En otros casos, se observa que los eventos de inserción o deleción se mantienen dentro de todo un grupo taxonómico, como es el caso de las múltiples deleciones que se observan en las secuencias de **GFAP** de vertebrados, y que a consecuencia de ello resulta en una extensión considerablemente menor respecto a la hallada en invertebrados. En este último caso, por encontrarse el mismo patrón de

deleciones conservado en todo un grupo taxonómico, lo más probable es que estos eventos hayan ocurrido en el ancestro común que dio origen a todo este grupo taxonómico (Xiong 2006).

El mayor grado de similitud de cada alineamiento se observó en las regiones de los dominios y motivos proteicos, y este hecho se repitió en todos los genes estudiados. En concordancia con esto, también se encontró una alta correspondencia respecto a los patrones consenso específicos de cada gen. Este aumento en la similitud en regiones específicas, se debe a que estas zonas generalmente le dan funcionalidad o son cruciales para la formación de la estructura tridimensional de las proteínas, y por lo tanto, están sometidas a una presión de selección mayor que otras regiones de las proteínas (Xiong 2006). Como resultado de esto, es esperable observar una mayor conservación filogenética de los dominios y motivos y esta es la razón por la que en algunos estudios se utilizan sólo estas fracciones para analizar homología entre secuencias muy divergentes (Xiong 2006).

Los porcentajes de identidad calculados en la comparación de pares junto a la extensión media de cada proteína, permiten ubicar a las secuencias en el **gráfico de Rost** (Rost 1999) para inferir homología con mayor o menor seguridad. Según este autor, para secuencias como **Bcl-2** y **Bax**, que presentan una extensión de alrededor de 200 a 250 aminoácidos, es necesario un mínimo aproximado de 22% de identidad para ubicar a las secuencias en la zona segura e inferir homología entre éstas. Con porcentajes de entre 20 y 22% de identidad las secuencias se ubican en la zona crepuscular, y por debajo del 20% se ubican en la zona oscura. Por otro lado, para secuencias más extensas, como las correspondientes a los genes **TRPa**, **GFAP**, **Syt1**, **GFR α** y los genes constitutivos **Actina**, **GAPDH**, **Rpl8** y **EF1- α 1**, que tienen una longitud mayor a 250 aminoácidos, el gráfico de Rost se simplifica en sólo dos zonas. Con porcentajes mayores al 20% de identidad las secuencias se ubican en la zona segura y por debajo del 20% de identidad quedan en la zona oscura. En conjunto, la observación del alineamiento, el análisis de la similitud y longitud de una secuencia, la presencia y conservación de sus dominios, la correspondencia con su patrón consenso

característico y la clasificación dentro del gráfico de Rost, permiten inferir con una baja incertidumbre si las secuencias analizadas pertenecen a genes ortólogos o no.

El análisis de homología entre las secuencias de los **genes constitutivos** es el más simple de todos, dado que al tratarse de genes esenciales para el funcionamiento celular están sometidos a una presión de selección muy alta y como consecuencia de esto han divergido muy poco a lo largo de la filogenia (Eisenberg y Levanon 2013; Curina et al. 2017; Moein et al. 2017). Un claro ejemplo de esto se observa con el gen de la actina, para el que se ha descrito que no difiere en más de un 20% entre organismos tan distantes como las algas y los humanos (Hanukogole et al. 1983; Gunning et al. 2015), y que en este trabajo se encontró que no difiere en más de un 5,6% entre secuencias de organismos metazoos distantes. De la misma forma que ocurre para la Actina, los demás genes constitutivos estudiados Rpl8, GAPDH y EF1- α 1, muestran muy altos porcentajes de identidad que ubican a todas las secuencias en la zona segura de Rost para inferir homología. Sumado a esto, la alta coincidencia en la longitud de todas las secuencias, la presencia de todos los dominios y patrones consenso descritos, permiten inferir con seguridad que se trata de genes ortólogos. Asimismo, las secuencias que se seleccionaron para estos genes a partir de los transcriptomas de *A. dufresnii*, cumplieron con todos los parámetros mencionados, y por lo tanto resultaron elegibles para el diseño de partidores y el posterior estudio de la expresión génica.

El análisis de homología entre las secuencias para los **genes no constitutivos**, fue más variable de acuerdo a la divergencia específica de cada gen.

El análisis de las secuencias de **Bcl-2** y **Bax**, ambos pertenecientes a la familia Bcl-2, mostró variaciones en la longitud y en la composición de las secuencias, en especial en el extremo N-terminal. Consistentemente con esto, en otras investigaciones se han reportado grandes variaciones en la organización de los motivos BH, así como también en las secuencias globales de esta familia de proteínas (Aouacheria et al. 2013), y en particular se observa que la región N-terminal es muy variable (Lasi et al. 2010).

Asimismo, se han encontrado miembros de esta familia en organismos como las hidras, en las cuales la maquinaria que regula el fenómeno de la apoptosis muestra una mayor complejidad a la encontrada en los protostomados *D. melanogaster* y *C. elegans* (Lasi et al. 2010). Un análisis funcional de las proteínas de hidra homólogas a Bcl-2 y Bax sobre células de mamíferos, permitió comprobar que mantienen conservados sus funciones anti y pro apoptóticas, respectivamente. Estos hallazgos demuestran que tanto la familia Bcl-2, como otras familias de proteínas que regulan el fenómeno de la apoptosis aparecieron temprano en la evolución de los organismos pluricelulares, previo a la aparición de los bilaterales (Lasi et al. 2010).

Las regiones de los motivos BH son cruciales para la formación de la estructura terciaria de estas proteínas, y es esta conformación tridimensional la que luego define las acciones pro o anti apoptóticas (Polčic et al. 2015). En las secuencias estudiadas en este trabajo para Bcl-2 y Bax, los motivos BH se encuentran mucho más conservados que el resto de la secuencia y presentan alta concordancia con su patrón consenso. En el caso del motivo BH4 de Bcl-2 se observó una menor conservación que es consistente con lo documentado por Aouacheria (Aouacheria et al. 2013), y en el caso de Bax se observó ausencia de este dominio, una característica típica de Bax y que lo distingue de Bcl-2 (Polčic et al. 2015).

De acuerdo a la comparación de pares para **Bcl-2**, las secuencias de los vertebrados *H. sapiens*, *B. taurus*, *R. typus* y *X. laevis*, del hemicordado *S. kowalevskii*, del molusco *M. yessoensis* y del nematodo *T. trichiura* con porcentajes de identidad mayores al 24%, se ubican en la zona segura del gráfico de Rost. Dado que estas secuencias también cumplieron con las demás características analizadas, puede inferirse homología entre las mismas.

Por el contrario, la secuencia para *D. melanogaster*, si bien posee los dominios BH con moderada conservación, presenta un bajo porcentaje de similitud respecto a todas las secuencias analizadas, ubicándose en la zona oscura del gráfico de Rost. Este bajo porcentaje es esperable debido a las grandes inserciones que presenta esta secuencia en comparación con las demás y a la divergencia en la familia de Bcl-2 en

estos organismos (Robertson et al. 2006; Lasi et al. 2010). Por lo tanto, no se puede afirmar que esta secuencia corresponda al gen ortólogo de Bcl-2, aunque es probable que si corresponda a algún miembro de la familia Bcl-2, tal como Debcl y BUFFY, que han sido caracterizados para esta especie (Igaki y Miura 2004; Lasi et al. 2010).

Las secuencias de los equinodermos sólo presentaron altos porcentajes de identidad respecto a su mismo grupo taxonómico con valores superiores al 45%, y de alrededor del 20% respecto al hemicordado *S. kowalevskii*. Consistentemente con esto, en estudios filogenéticos del conjunto de proteínas que controla el fenómeno de la apoptosis se ha encontrado que tanto las caspasas como las proteínas de la familia Bcl-2 no sólo aparecieron temprano en la evolución (Lasi et al. 2010), sino que se redujeron en los protostomados Ecdysozoa (*D. melanogaster* y *C. elegans*), y sufrieron expansiones independientes en los deuterostomados cordados y en los equinodermos (Robertson et al. 2006). Además, se ha estudiado la maquinaria que controla la apoptosis en el equinodermo *S. purpuratus*, y se ha propuesto que esta complejidad junto a la divergencia observada en estos genes, podrían ser una adaptación que facilite la extensa apoptosis que ocurre durante la metamorfosis de los equinodermos, o que se encuentre asociada a su complejo sistema inmune (Hibino et al. 2006; Robertson et al. 2006) y/o a sus extraordinarias capacidades regenerativas (San Miguel-Ruiz et al. 2009).

En este contexto, los altos porcentajes de similitud obtenidos entre equinodermos y la presencia de los dominios BH, nos permiten asumir con ciertos recaudos que las secuencias seleccionadas pertenecen a genes ortólogos, y que las diferencias observadas con otros taxones reflejan la gran divergencia evolutiva en los mecanismos de apoptosis descritos en equinodermos. En particular, la secuencia aminoacídica hallada para Bcl-2 en *A. dufresnii* presentó la extensión característica, los dominios BH conservados, un 20% de identidad con el hemicordado *S. kowalevskii* y un muy alto porcentaje de identidad con otros equinodermos. Por lo tanto, resulta una secuencia elegible para el diseño de partidores y el posterior estudio de la expresión génica.

De acuerdo a la comparación de pares realizada para **Bax**, todas las secuencias analizadas presentaron porcentajes de identidad mayores al 22%, ubicándose en la zona segura del gráfico de Rost, y por lo tanto, puede inferirse homología entre las mismas dado que también cumplen con las demás características analizadas. La secuencia que presentó el menor porcentaje de identidad fue la de *S. purpuratus*, y en especial al compararla con en anfibio *Xenopus tropicalis*, hecho que se puede justificar por la presencia de una inserción N-terminal en *S. purpuratus*. Sin embargo, incluso en esta secuencia se observan muy altos porcentajes de identidad respecto a su grupo taxonómico, alcanzando el 63% respecto a *A. dufresnii*, y muy aceptables porcentajes respecto a otros grupos como los vertebrados y los protostomados. En particular, la secuencia aminoacídica hallada para Bax en *A. dufresnii* presentó una extensión característica, los dominios BH típicos de Bax conservados y un porcentaje de identidad mayor a 26% respecto a vertebrados y mayor al 35% respecto al protostomado *C. virginica*. Por lo tanto, resulta una secuencia elegible para el diseño de partidores y el posterior estudio de la expresión génica.

El alineamiento para **TRPa**, mostró variaciones en la longitud y en la composición de las secuencias, en especial en el extremo N-terminal, en el primer dominio ANK y en el extremo C-terminal. Sin embargo, los demás dominios ANK y la región del canal iónico se encontraron mucho más conservados que el resto de la secuencia. Consistentemente con esto, se ha hallado que en diferentes especies los canales TRPa1 son utilizados para diferentes funciones fisiológicas, generalmente relacionadas a la termorrecepción o a la quimiorrecepción (Hamada et al. 2008; Gracheva et al. 2010; Kang et al. 2010). Se ha propuesto que estas diferencias de función podrían ser el resultado de una presión adaptativa que ocasionó, por ejemplo, que en los organismos que utilizan esta molécula para la quimiorrecepción se redujera la activación del canal por la temperatura, y viceversa (Cordero-Morales et al. 2011). La organización de la región N-terminal, incluido el primer dominio ANK, conforma una unidad funcional e independiente y podría ser la responsable de estas diferencias. De esta manera, las variantes en la región N-terminal pudieron facilitar este ajuste evolutivo dando especificidad en la detección de un tipo de estímulo

(termal, químico, o de calcio citoplasmático), a la vez que permitió mantener un alto grado de similitud de secuencia a lo largo de las especies (Cordero-Morales et al. 2011).

Por otra parte, el dominio C-terminal ha sido implicado en la modulación del umbral de activación del canal frente al estímulo. Por lo que las variaciones ocurridas en esta región podrían reflejar un ajuste adaptativo de acuerdo a la intensidad del estímulo ambiental (Jordt et al. 2000; Brauchi 2006; Grandl et al. 2010).

La conservación en el patrón de los dominios ANK y del canal iónico observado en las secuencias estudiadas, junto al análisis de los porcentajes de similitud, que fueron muy altos dentro de grupos taxonómicos como los vertebrados o los equinodermos, y superiores al 20% en la mayoría de las comparaciones entre organismos distantes, permite asumir homología entre las secuencias seleccionadas.

Las secuencias que presentaron los porcentajes de identidad más bajos, fueron de *P. pectinifera* o *A. planci* respecto a *H. sapiens*, y presentaron valores sólo levemente menores al 20% (19,61%). Tratándose de una secuencia tan extensa, y recordando que cuanto mayor es la longitud, mas significativas son las similitudes (Rost 1999), éstas secuencias se ubican muy cerca de la zona segura del gráfico de Rost. Además, los datos obtenidos en la reciente caracterización de la secuencia de TRPa en *P. pectinifera* (Saito et al. 2017), junto a la observación de la gran inserción N-terminal en ambas secuencias, que justifican tales diferencias en el porcentaje de identidad permiten que, a pesar de la divergencia, se pueda asumir homología con estas secuencias.

Por último, la secuencia seleccionada para TRPa en *A. dufresnii* cumplió con todos los parámetros mencionados, presentó un alto porcentaje de identidad dentro de su grupo taxonómico, y un porcentaje mayor al 20% con el resto de los organismos analizados. Por lo tanto, resultó elegible para el diseño de partidores y el posterior estudio de su expresión génica.

En análisis del gen **Syt1** permite apreciar un alto grado de conservación de las secuencias analizadas que se ve reflejado en todos los parámetros analizados. Es importante destacar que la familia de proteínas Syts apareció temprano en la evolución y se encuentra presente tanto en plantas terrestres como en animales (Craxton 2004). La variante Syt1, relacionada al funcionamiento del sistema nervioso, se ha descrito tanto en organismos protostomados en los géneros *Drosophila*, *Anopheles* y *Caenorhabditis*, como en deuterostomados en los géneros *Strongylocentrotus*, *Ciona*, *Danio*, *takifugu*, *Mus*, y *Homo* (Craxton 2004; Burke et al. 2006b). En todos los casos, esta proteína mantiene su estructura típica, con un dominio transmembrana N-terminal seguido de una región variable y luego los dominios C2A y C2B altamente conservados (Südhof 2002; Craxton 2004). En las secuencias analizadas de este trabajo se observó el mismo tipo de estructura con la presencia de los tres dominios típicos de Syt1 altamente conservados, pocas sustituciones en estas regiones y algunas inserciones o deleciones mayormente ubicadas en las zonas lindantes al dominio transmembrana. Además, como consecuencia de esta homogeneidad, la longitud de las secuencias fue la esperada en la mayoría de los casos.

Estas características junto a los muy altos porcentajes de similitud, con valores de entre 99,76% y 49,8%, ubican a todas las secuencias en la zona segura de Rost y permiten inferir que se trata de genes ortólogos para esta proteína. Asimismo, la secuencia seleccionada para Syt1 en *A. dufresnii* cumplió con todos los parámetros mencionados, destacándose su alto porcentaje de similitud en la comparación de pares que fue superior al 51% en todos los casos. Por lo tanto, resultó elegible para el diseño de partidores y el posterior estudio de su expresión génica.

La observación del alineamiento para las secuencias para **GFAP** permitió diferenciar las tres regiones de la proteína. La región central correspondiente al dominio ROD, fue la menos variable y las diferencias observadas se debieron a las múltiples deleciones presentes en todo el grupo de vertebrados. Por otra parte, los extremos N-terminal y C-terminal, que corresponden a la cabeza y cola de este filamento intermedio, mostraron mayores variaciones. Sin embargo, a pesar de la

variabilidad observada, en los primeros aminoácidos de la región N-terminal de este alineamiento se pudo identificar el patrón consenso MERRRITS-ARRSY con moderada conservación.

En concordancia con lo hallado, en otros trabajos se ha descrito que la región ROD, que forma la estructura del filamento intermedio, es una zona altamente conservada mientras que las regiones de la cabeza y cola que participan en la regulación del ensamblaje del mismo, son las regiones más variables en cuanto a la composición y la longitud (Hol y Pekny 2015). Asimismo, también se ha descrito que la presencia del patrón MERRRITS-ARRSY es una característica típica de esta proteína ya que el estado de fosforilación y desfosforilación de dicho motivo resulta crítico para el ensamblaje del filamento (Matsuoka et al. 1992; Ralton et al. 1994).

Al analizar las longitudes de las secuencias aminoacídicas, se observan tres grupos bien diferenciados: los vertebrados con las secuencias más cortas, los invertebrados deuterostomados con longitudes intermedias y los protostomados con las secuencias más largas. Estas diferencias pueden justificarse por la presencia de las deleciones e inserciones observadas en el alineamiento y que se encuentran conservadas dentro de cada grupo taxonómico (Xiong 2006).

Si bien la proteína GFAP ha sido utilizada tradicionalmente como un marcador de las células gliales del sistema nervioso de vertebrados (Dahl et al. 1985; Pinto y Götz 2007), en invertebrados los estudios de la presencia de esta proteína aún son muy escasos. Sin embargo, en las últimas décadas, se ha detectado GFAP en algunos protostomados como el insecto *Bombyx mori* (Choi y Park 2012), así como también en cangrejos, gasterópodos y sanguijuelas (Cardone y Roots 1990; Dos Santos et al. 2005). Esta evidencia apoya la premisa de que la proteína GFAP no sólo se encuentra conservada entre los vertebrados, sino que también parece expresarse en los invertebrados.

Consistentemente con esto, las secuencias seleccionadas tanto en los vertebrados como en los invertebrados, presentaron los tres dominios característicos, sus patrones consenso y buenos o moderados porcentajes de identidad. Entre secuencias de vertebrados se observaron porcentajes mayores al 51%, y de igual manera, entre las secuencias de los invertebrados deuterostomados se observaron

valores superiores al 47%, lo que permite afirmar que dentro de cada grupo se trata de secuencias homólogas. Por último, al comparar las secuencias de los vertebrados respecto a las de los invertebrados, se observan porcentajes de identidad de alrededor del 20%, que junto con la evidencia de la presencia de GFAP y la inmunorreactividad positiva de los anticuerpos anti-GFAP de mamíferos sobre los invertebrados (Hartline 2011), sugiere que estas proteínas podrían ser homólogas.

Por último, la secuencia seleccionada para GFAP en *A. dufresnii* presentó una similitud aceptable; los dominios característicos; los patrones consenso moderadamente conservados; la longitud típica para las secuencias de equinodermos; así como también, un alto porcentaje de identidad dentro de su grupo taxonómico; y un porcentaje mayor al 20% con el resto de los organismos analizados, con excepción de *X. laevis* en donde fue levemente menor. Por lo tanto, esta secuencia resultó elegible para el diseño de partidores y el posterior estudio de su expresión génica.

La búsqueda de secuencias para el gen **GFR α** en los transcriptomas utilizados de *A. dufresnii* no arrojó un resultado favorable, dado que no se pudo detectar una secuencia que presentara suficiente similitud, longitud y los dominios característicos. Esto puede deberse a varias razones.

Una posible explicación, es que el gen GFR α no se encuentre presente en el genoma de *A. dufresnii*. Sin embargo, dado que hay evidencia de que GFR α está presente tanto en vertebrados, como en protostomados (Hätinen et al. 2007; Kallijärvi et al. 2012; Appeltans et al. 2012; Hernández et al. 2015), es esperable que también se encuentre en organismos con una posición filogenética intermedia entre estos grandes grupos taxonómicos. Apoyando esta hipótesis, se han encontrado secuencias con las características de GFR α en los equinodermos *S. purpuratus* (Hätinen et al. 2007) y se ha predicho una secuencia para *A. planci* (con anotación predictiva en NCBI con el código NW_019091424.1), aunque no se han estudiado aún en profundidad. Por lo tanto, resulta poco probable que este gen esté ausente en el equinodermo *A. dufresnii*.

Otra de las razones que podría explicar esta ausencia de GFR α , es que debido a que el genoma de *A. dufresnii* aún no se encuentra secuenciado, el trabajo de búsqueda de este capítulo se realizó sobre dos transcriptomas de la especie. En ambos casos, estos transcriptomas fueron construidos a partir de tejido digestivo de individuos adultos. Por esta razón, la ausencia de una secuencia elegible para GFR α puede deberse a que este gen no se encontraba activo en los tejidos utilizados al momento de la extracción, y por lo tanto, no formaba parte de los transcriptos de dichas células. Por lo tanto, la utilización de un mayor número de transcriptomas, en particular de aquellos obtenidos en los estadios larvales, podría arrojar un resultado positivo para esta búsqueda. En este aspecto, se ha planificado realizar un transcriptoma de larvas de *A. dufresnii* y se planea seguir trabajando en colaboración con el *Instituto Antártico Chileno*, para abordar este tema con mayor profundidad.

Por último, otra explicación posible es que debido a las características de esta proteína y a la gran divergencia que se observa a lo largo de la filogenia, la metodología utilizada no haya sido lo suficientemente potente. En este gen en particular, lo que parece mantenerse conservado filogenéticamente es el patrón de cisteínas y en especial la posición en la que se encuentra este aminoácido a lo largo de la secuencia (Airaksinen et al. 2006; Hättinen et al. 2007).

Una de las características de la metodología utilizada en este trabajo para analizar homología, y que en este caso resultó una debilidad, es que se analizaron los alineamientos globales de las secuencias, es decir, utilizando la secuencia completa. Por lo tanto, el análisis de la comparación de pares refleja cuan similares son las secuencias en su totalidad. Esta metodología resultó muy útil para la mayoría de los genes estudiados, pero en el caso de GFR α no permitió identificar secuencias elegibles en *A. dufresnii*.

Un estudio más adecuado para este tipo de genes, involucra realizar análisis más complejos y en ocasiones acompañado a un estudio de la estructura tridimensional de las proteínas. De esta forma, es posible dar un mayor peso a la ocurrencia y a la posición de las cisteínas, así como también sus implicancias sobre la

estructura tridimensional de la proteína madura. Un ejemplo de estos análisis se encuentra en los trabajos de Hätingen y de Goodman, en donde logran encontrar homología entre secuencias divergentes de GFR α analizando sólo el patrón de cisteínas, o bien analizando la estructura tridimensional y la interacción con su ligando GDNF y el receptor RET (Hätinen et al. 2007; Goodman et al. 2014).

A pesar de las dificultades mencionadas, para este trabajo se tomó como referencia a *S. purpuratus*, otro erizo de mar del que se encuentra su genoma secuenciado, y en el que se pudo encontrar una secuencia que se ajusta a las características del gen GFR α .

Si bien en el alineamiento se observaron variaciones en la composición de las secuencias y en la extensión de las mismas, fue posible identificar los dominios y también la zona de anclaje a la membrana plasmática GPI. Las variaciones observadas en la extensión pueden justificarse por la gran cantidad de deleciones presentes en el grupo de los vertebrados y a las inserciones halladas en algunos invertebrados. Asimismo, la similitud de las secuencias fue mayor dentro de los dominios, y moderada en el GPI. En particular, la similitud fue alta en el grupo de los vertebrados, evidenciando un cierto grado de conservación, y disminuyó a medida que se analizan organismos más alejados filogenéticamente a éstos, haciéndose cada vez más ocurrentes las sustituciones, las deleciones y/o las inserciones. La comparación de pares, reflejó muy claramente lo observado en el alineamiento, con porcentajes de identidad altos entre vertebrados, moderados entre los equinodermos *S. purpuratus* y *A. planci*, y bajos al comparar invertebrados con vertebrados.

Consistentemente con lo descripto, en otros trabajos realizados en esta familia de proteínas (Airaksinen y Saarma 2002; Hätingen et al. 2007), la posición y ocurrencia de las cisteínas se encuentra altamente conservada en todos los organismos analizados, mientras que se observa divergencia entre especies. Por lo expuesto, y dado que las cisteínas cumplen un rol importante en la estructura terciaria de la proteína, así como también en la interacción con su ligando (principal función de este

receptor), el patrón conservado de las cisteínas que se observó en el alineamiento, fue el resultado más importante del análisis de GFR α .

La secuencia seleccionada para *S. purpuratus* presentó los tres dominios moderadamente conservados, y el patrón de cisteínas altamente conservado, con una única excepción en la primer cisteína del dominio D2, y por lo tanto, se consideró que esta secuencia es un buen candidato para el diseño de partidores.

Por último, a partir de las secuencias aminoacídicas seleccionadas en *A. dufresnii* para cada gen, se pudo identificar en los transcriptomas las secuencias nucleotídicas correspondientes. En todos los casos, éstas últimas presentaron un marco de lectura completo (ORF) y sus zonas no codificantes anexas, evidenciando que se trata de un gen completo. Además, los dos pares de partidores diseñados para cada secuencia, mostraron todas las características deseadas como por ejemplo, una longitud de partidoreo aceptable; una longitud del fragmento a amplificar conveniente para cuantificar la expresión génica; y temperaturas de fusión muy similares entre sí. Por lo tanto, es esperable que funcionen bien para la posterior cuantificación de la expresión de dichos genes.

Conclusiones del capítulo 2

A partir de la búsqueda informática en las bases de datos públicas NCBI y Uniprot, fue posible seleccionar para cada gen de interés, una amplia variedad de secuencias en organismos filogenéticamente distantes.

En la mayoría de los casos, con un análisis sencillo que involucró un alineamiento global, una búsqueda de dominios y patrones característicos y una comparación de pares del conjunto de secuencias, se pudo determinar homología entre las secuencias.

Utilizando dos transcriptomas de la especie de estudio fue posible hallar secuencias elegibles para todos los genes de interés, excepto para el gen GFR α . En este último caso, se utilizó la secuencia hallada en un organismo emparentado a la especie de estudio.

Con las secuencias de *A. dufresnii* obtenidas para cada gen de interés, fue posible diseñar dos juegos de partidores que cumplieron con todas las características pre-establecidas y que se utilizaron en los siguientes capítulos para estudiar la expresión génica.

Capítulo 3:
Desarrollo del sistema nervioso en
Arbacia dufresnii

Introducción del capítulo 3

El sistema nervioso es una de las características más destacables en el reino animal, está involucrado y es responsable, en la mayoría de los casos, de muchas características de los animales como: el movimiento, el comportamiento, la reproducción, el pensamiento coordinado, las respuestas a estímulos, etc. (Schmidt-Rhaesa et al. 2015). Existe una gran diversidad de sistemas nerviosos que han evolucionado en cada grupo de organismos de acuerdo a las presiones ambientales a las que fueron sometidos a lo largo de su historia. Esta diversidad de sistemas, abarca desde las redes nerviosas sencillas encontradas en las hidras y anémonas (Epp y Tardent 1978; Rentzsch et al. 2017), hasta los sistemas nerviosos complejos y centralizados como los encontrados en los cefalópodos (Abbott et al. 1995) y en los vertebrados (Holland y Holland 1999; Northcutt 2012).

Los equinodermos adultos poseen un sistema nervioso central que sigue un patrón pentamérico, con cinco cordones nerviosos que se unen en un anillo nervioso circular (Mashanov et al. 2016). En comparación con los vertebrados, este sistema es relativamente simple y menos centralizado, pero sin embargo, posee muchas similitudes con éstos y con otros deuterostomados. Esta característica resulta ventajosa como modelo animal para el estudio y la comprensión de los mecanismos basales del sistema nervioso dentro del gran grupo de organismos deuterostomados (Hinman y Burke 2018).

Origen embriológico del sistema nervioso en metazoos

Durante el desarrollo embrionario se desencadenan los mecanismos que determinan la especificación y la diferenciación del sistema nervioso. Los componentes de señalización y las familias de factores de transcripción tienen un rol fundamental durante este proceso (Sinigaglia et al. 2013; Marlow et al. 2014). La evidencia sugiere que estos factores de transcripción tienen un origen común, debido a las grandes similitudes encontradas a lo largo de los metazoos (Saudemont et al. 2010; Garner et al. 2016).

En algunos organismos el potencial neurogénico, es decir, la capacidad de las células de diferenciarse al linaje neuronal, se encuentra disperso en todo el ectodermo. En estos organismos, los precursores neurales se originan y diferencian formando una red difusa de neuronas (Dunne et al. 1985; Miljkovic-Licina et al. 2004; Satterlie 2015).

En los organismos bilaterales, la neurogénesis se encuentra restringida en el desarrollo a ciertos dominios específicos del ectodermo (Bier y De Robertis 2015). Esta regionalización del ectodermo se origina temprano en el desarrollo embrionario y se encuentra principalmente mediada por el gradiente morfogenético de Wnt, que define el eje anteroposterior (AP) en el embrión, y posteriormente regula a los morfógenos Nodal y BMP_{2/4}, pertenecientes a la superfamilia de los TGFβ, que definen el eje dorsoventral (DV). En conjunto, estas señales acotan la capacidad neurogénica del embrión a territorios específicos (Angerer et al. 2011). Como consecuencia de esto, los organismos bilaterales tienen un sistema nervioso con componentes centrales y periféricos, derivados de diferentes regiones del ectodermo. Generalmente, el Sistema Nervioso Central deriva de un epitelio neural específico de la zona anterior del embrión, y las neuronas periféricas se originan en otras regiones del ectodermo y luego se conectan con el Sistema Nervioso Central (Hartenstein y Stollewerk 2015).

La organización del sistema nervioso de los erizos de mar

En los erizos de mar, el sistema nervioso de la larva pluteus posee una estructura típica de un organismo bilateral, con componentes centrales y periféricos, y con vías aferentes y eferentes (Garner et al. 2016).

De manera homóloga a lo encontrado en otros organismos bilaterales, en etapas tempranas del desarrollo, los morfógenos Wnt, Nodal y BMP_{2/4} establecen los ejes AP y DV del embrión (Figura 3.1a y 3.1b). En la región anterior se desarrolla un epitelio neural que dará origen al **órgano apical**. Esta estructura posee características similares a las halladas en el Sistema Nervioso Central de otros deuterostomados y expresa genes similares a los que se observan durante la neurogénesis del cerebro de vertebrados (Wei et al. 2009; Angerer et al. 2011). Posteriormente en el desarrollo queda delimitado un segundo territorio del ectodermo que dará origen a los **componentes periféricos** con ganglios laterales secundarios, neuronas motoras, neuronas sensoriales e interneuronas (Angerer et al. 2011) (Figura 3.1c).

El **órgano apical**, de simetría bilateral y ubicado entre los brazos pre-orales, constituye el Sistema Nervioso Central de las larvas pluteus. Las neuronas que lo conforman se distribuyen formando una estructura ganglionar o neuropilo, es decir, un conjunto de neuronas y células de soporte (Burke 1978; Moss et al. 1994). En este órgano aparecen los primeros grupos de neuronas serotorinérgicas (Byrne et al. 2007).

Los **componentes periféricos** lo constituyen las neuronas que se encuentran dentro de los tejidos de la banda ciliar, la zona oral y el tubo digestivo. Estas neuronas, integran y controlan localmente las respuestas motoras (Cobb 1987).

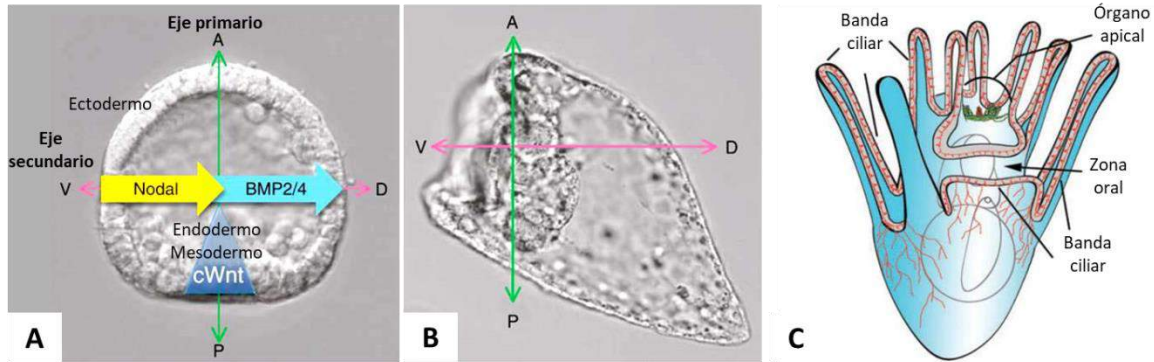


Figura 3.1: Diagrama simplificado de la formación y la organización del sistema nervioso en equinoideos. A) Embrión de erizo de mar, se observan los gradientes de los morfógenos Wnt, Nodal y BMP_{2/4} que establecen los ejes AP y VD. B) Larva prisma mostrando los ejes AP y VD. C) Esquema con los principales componentes del sistema nervioso de la larva pluteus: un pequeño centro ganglionar llamado el órgano apical (verde), y una gran cantidad de neuronas periféricas y cordones axonales que inervan el esófago, el estómago y la banda ciliar (rojo). Tomado y modificado de Angerer et al. (2011), y de Hinman y Burke (2018).

La **banda ciliar** permite la alimentación y la locomoción. Esta estructura recorre el perímetro de la larva, incluyendo los brazos de la misma, y rodea a la epidermis oral, un epitelio especializado de dicha zona (Strathmann 1971; 1975). Las neuronas que conforman la banda ciliar tienen características típicas de las neuronas periféricas, como por ejemplo, la proyección de sus axones hacia el órgano apical (Burke et al. 2014). Los cilios pueden moverse con distinta intensidad y dirección; acercando las partículas de alimento hacia la boca cuando se mueven hacia ésta, o propulsando a la larva cuando se mueven en sentido contrario (Strathmann 1971; 2007). El sistema nervioso controla el sentido de movimiento de los cilios, regulando la despolarización de las células ciliadas (Mackie et al. 1969; Strathmann 2007). La interpretación más aceptada de este sistema, es que el órgano apical constituye el componente central e integrador de las respuestas, mientras que las neuronas de la banda ciliar responden a los estímulos local y coordinadamente, controlando la actividad de los cilios (Strathmann 2007).

En el tubo digestivo, los componentes del sistema nervioso se desarrollan e inervan la musculatura del esófago. Adicionalmente, algunas de las neuronas viscerales en la larva se originarían a partir de **precursores endodérmicos** de forma singular e independiente al resto de las neuronas del organismo de origen ectodérmico (Wei et al. 2011).

Una característica destacable en estos organismos es que el número de neuronas aumenta a lo largo del desarrollo larval, esto indica que en este modelo animal, la neurogénesis no se encuentra restringida sólo a los estadios embrionarios, sino que existen regiones de continuo crecimiento neural (Bisgrove y Burke 1986; Beer et al. 2001).

Finalmente, este complejo sistema nervioso degenera casi completamente al momento de la metamorfosis, y por lo tanto, no contribuye al sistema nervioso de los organismos juveniles y adultos (Beer et al. 2001; Nakano et al. 2006). La única excepción, es la red neuronal del tubo digestivo de la larva, que parece contribuir con algunos elementos neuronales al plexo basiepitelial del Sistema Nervioso Entérico (SNE) del organismo adulto (Beer et al. 2001; Mashanov et al. 2016b).

En el sistema nervioso de los equinodermos adultos se han descripto cuatro componentes principales: los cordones Ectoneural e Hiponeural, que constituyen el Sistema Nervioso Central; el sistema Endoneural, también conocido como Sistema Nervioso Aboral o Apical, presente sólo en crinoideos; y el Sistema Nervioso Entérico (SNE) (Hyman, 1955; Pentreath y Cobb, 1972; Cobb, 1987; Garcia-Arraras et al. 2001; Mashanov et al. 2015) (Figura 3. 2).

El SNE es una red compleja de neuronas interconectadas o plexo, dispuestas sobre la superficie basal de los órganos que recubre. Puede dividirse en cuatro componentes: el plexo visceral, el plexo basiepitelial, el plexo neuroendocrino de la mucosa y el plexo del tejido conectivo. En conjunto este sistema inerva el tracto digestivo y lo conecta al SNC del organismo (García-Arrarás et al. 2001).

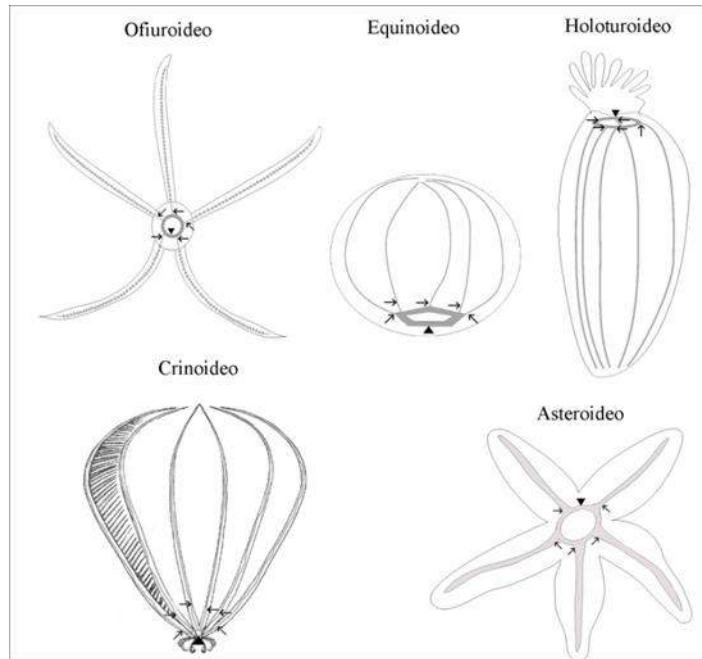


Figura 3.2: Sistema nervioso de los equinodermos adultos. Observe el anillo circumoral indicado por la punta de flecha y los cordones radiales ectoneurales e hiponeurales señalados por flechas. Tomado de Rubilar (2010).

Tipos celulares en el sistema nervioso de larvas de equinodermos

En el sistema nervioso larval de los equinodermos se han encontrado distintos subtipos de neuronas, y se ha descrito la expresión de una gran variedad de neurotransmisores (Burke et al. 2006a). Se cree que esta diversidad proporciona a los organismos la capacidad de censar varios aspectos del ambiente y coordinar una amplia gama de respuestas comportamentales (Hinman y Burke 2018).

En la mayoría de las especies, las neuronas **serotorinérgicas** son las primeras en diferenciarse y se agrupan en dos secciones de la región anterior de las larvas en desarrollo (Byrne et al. 2007). Son el tipo celular más abundante en el órgano apical y algunas secciones de la boca y el esófago, y además, su número se incrementa a lo largo del desarrollo larval (Bisgrove y Burke 1986; Chee y Byrne 1999; Murabe et al. 2008). Estas neuronas son principalmente de tipo sensorial, la mayoría desarrollan un polo dendrítico corto y proyecciones axonales basales, en otros casos desarrollan morfología de tipo bipolar o multipolar (Hinman y Burke 2018).

Las neuronas **dopaminérgicas**, se han hallado sólo en las larvas de erizo de mar. Se localizan en la región de la boca y del esófago, así como también, en la base de los brazos post-orales. En esta última región, estas neuronas parecen tener una función específica en la percepción de la densidad de alimento en el ambiente (fitoplancton), y se ha postulado que la dopamina conformaría parte de una vía de señalización responsable de regular la longitud de los brazos en función de la oferta de alimento (Adams et al. 2011).

Otro de los tipos celulares encontrados en las larvas de equinoideos son las neuronas **GABAérgicas**. Mediante la utilización de anticuerpos anti-GABA se ha localizado a estas neuronas en la región de la boca y el esófago (Bisgrove y Burke 1986). Además, también se ha hallado a la enzima responsable de su síntesis en las neuronas serotorinérgicas ubicadas en la banda ciliar (Katow et al. 2016).

Por otro lado, utilizando agonistas y antagonistas farmacológicos de la **acetilcolina**, se han descrito respuestas en el movimiento de los cilios y contracciones musculares, por lo que se cree que este neurotransmisor también está presente (Gustafson et al. 1972; Lacalli et al. 1990). La **histamina** y las **catecolaminas** se han encontrado en el órgano apical, los ganglios laterales secundarios y la banda ciliar de las larvas pluteus que se encuentran próximas a la metamorfosis (Sutherby et al. 2012).

Existen varios tipos de neuronas especializadas que conforman el conjunto de **células sensoriales** (Burke 1978, 1983; Lacalli et al. 1990). En la banda ciliar existen células neurales que proyectan sus axones hacia el órgano apical y se cree que se encargan de la **percepción olfativa**. Estas neuronas aparecen al final de la vida larval y se las asocia a la detección de ciertos estímulos químicos involucrados en la metamorfosis (Bishop y Brandhorst 2007; Bishop y Hall 2009).

También se han encontrado **fotorreceptores** ciliados formando dos grupos dispuestos bilateralmente en la zona anterior a la boca y adyacentes al órgano apical (Valero-Gracia et al. 2016). Estas neuronas expresan **opsina 2 y 3**, presentan cilios apicales cortos e inmóviles que responden a la estimulación lumínica incrementando la concentración de Ca^{2+} intracelular. Colaborando con éstas, las **células pigmentarias** que se encuentran dispersas en la superficie dorsal de la larva, podrían generar sombra facilitando la orientación de la fotorrecepción (Hinman y Burke 2018).

Las neuronas también pueden sintetizar **neuropéptidos** y sus **receptores**, que son los mediadores críticos de la señalización neuronal y pertenecen a familias de proteínas con un origen común entre los bilaterales (Jékely 2013; Mirabeau y Joly 2013). En el órgano apical de las larvas pluteus, se ha encontrado el neuropéptido SALMFamide1 (S1) co-localizando, es decir, expresándose en la misma célula, con la Serotonina. Este neuropéptido también ha sido descrito en otros tejidos, por lo que se le adjudican diversas funciones en el sistema nervioso larval (Thorndyke et al. 1992).

Si bien se han realizado grandes avances en la descripción del sistema nervioso en los estadios larvales de los equinodermos, este sistema aún no ha sido caracterizado completamente. Uno de los grandes interrogantes por determinar, es la presencia de células no nerviosas en el sistema nervioso larval, tal como se encontró en los estadios juveniles y adultos. Este tipo celular se denomina **Glía Radial** por su gran semejanza a las células gliales radiales de los vertebrados y es una de las características más sobresalientes que los equinodermos comparten con los cordados (Mashanov et al. 2009).

La Glía Radial posee una morfología específica, con haces sobresalientes que son producto de la organización de sus filamentos intermedios en el citoplasma, y una forma alargada que les permite abarcar la totalidad del espesor del cordón nervioso. En los equinodermos, las células gliales han sido descritas a partir del establecimiento del SNC de los individuos juveniles (Pinto y Götz 2007; Mashanov et al. 2009) y se mantienen con sus características no neurales durante toda la vida adulta del organismo, ubicándose a lo largo de todo el SNC (Märkel y Röser 1991; Mashanov et al. 2006; Viehweg et al. 1998).

En los vertebrados, la Glía Radial cumple un rol crucial durante la neurogénesis (Pinto y Götz 2007), distribuyéndose entre las células del neuroepitelio y aportando los precursores celulares que formarán las paredes del tubo neural. En los equinodermos, aún no se conocen las funciones de la glía durante el desarrollo juvenil y la neurogénesis de los adultos. Sin embargo, se ha encontrado que en los pepinos de mar adultos, estas células contribuyen significativamente a la regeneración de los tejidos luego de una lesión, orientando la migración de las neuronas y generando nuevas neuronas y células gliales en la zona de regeneración del sistema nervioso (Mashanov et al. 2008).

Inmunorreactividad del sistema nervioso de los equinodermos

Gran parte de los estudios que permitieron conocer y caracterizar el sistema nervioso de los equinodermos fueron posibles gracias al desarrollo de anticuerpos como **anti-1E11**, que reconoce específicamente a la proteína **Syt1-1** (Burke et al. 2006b) o **anti-RN1** de epítipo desconocido pero que se sabe que marca las fibras y otros componentes del sistema nervioso. Otras poblaciones de neuronas pudieron reconocerse y caracterizarse utilizando marcadores estándares de sistema nervioso descriptos para otros organismos, en particular anticuerpos que reconocen neurotransmisores peptídicos o las enzimas que los sintetizan. De esta manera, se describieron los componentes **GABAérgicos** y las **catecolaminas** de los equinodermos, así como también muchas neuronas, células endocrinas y fibras que expresan los neuropéptidos **SALMFamide** (Elphick et al. 1995; Newman et al. 1995), **GFSKLYFamide** (Díaz-Miranda et al. 1995), **galanin** (Díaz-Miranda et al. 1996), y **FMRFamide** (Hoekstra et al. 2012; Díaz-Balzac et al. 2016).

El anticuerpo monoclonal **anti-1E11**, fue desarrollado a partir de lisados de nervio radial de adultos de la estrella de mar *Asterina pectinifera* (Nakajima et al. 2004a, b), y actualmente es utilizado como marcador neuronal por su capacidad de unirse eficientemente a las células nerviosas de larvas y adultos de toda clase de equinodermos, hemicordados y urocordados (Burke et al. 2006a, b). El antígeno 1E11 puede detectarse en las células precursoras del sistema nervioso de la gástrula de los embriones de equinodermos, y en las larvas pluteus marca todas las estructuras neurales conocidas: el órgano apical, la zona oral, y una red de neuronas y neuritas en la banda ciliar, el esófago y el estómago (Nakajima et al. 2004a; Burke et al. 2006b). El anticuerpo policlonal **anti-GFSK**, marca las neuronas y fibras nerviosas que expresan el péptido GFSKLYFamide. Aún no se ha descrito la expresión de este péptido en los estadios larvales de equinodermos, pero en los individuos adultos, esta molécula tiene acciones de transmisor neuromuscular o neuromodulador dada su presencia exclusiva en los tejidos neurales y neuroendocrinos, y la localización próxima a ciertas

fibras musculares (Díaz-Miranda et al. 1995). Se ha descrito la expresión de esta molécula en las secciones de los cordones ectoneural e hiponeural del SNC, en el SNE que inerva el sistema digestivo, y en otros sistemas como el hemal y el respiratorio, posiblemente con un rol importante en el control de la acción de los mismos (Díaz-Miranda et al. 1995). El anticuerpo monoclonal **anti-GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein)** es un marcador clásico de células gliales en los mamíferos. Originalmente, se describió la expresión de GFAP en los astrocitos en el SNC, uno de los tipos gliales más abundantes e importantes de los vertebrados. Posteriormente, se encontraron células gliales en el SNE de distintos vertebrados que también expresan la proteína GFAP (Jessen y Mirsky 1980), y existen algunos estudios en donde se ha encontrado inmunorreactividad frente a este anticuerpo en organismos protostomados (Cardone y Roots 1990; Dos Santos et al. 2005; Hartline 2011; Choi y Park 2012). Actualmente, este anticuerpo se utiliza para identificar células de tipo glial durante el desarrollo embrionario de mamíferos, y dado que se ha demostrado que los equinodermos adultos poseen células gliales con características similares a las de los mamíferos (Mashanov et al. 2009), se estudiará la presencia de este marcador glial durante el desarrollo embrionario de larvas de equinodermos. El anticuerpo policlonal **anti-GFR α** , marca las células que expresan la proteína GFR α , el receptor de membrana de la familia de ligandos GFLs (Serra et al. 2005). La presencia de antígenos que reaccionen con este anticuerpo podría dar información importante sobre la presencia y la localización de esta vía de señalización durante el desarrollo larval de los equinodermos.

Para poder evaluar cómo responde un organismo y su sistema nervioso frente a determinados estímulos, primero es necesario conocer cómo es su desarrollo en condiciones normales de cultivo. El objetivo específico de este capítulo fue describir el desarrollo del sistema nervioso larval de *Arbacia dufresnii* en condiciones normales de cultivo durante los primeros 14 días post-fecundación, a partir del estudio de la expresión de proteínas específicas de dicho tejido; y conocer cómo se expresan los genes afectados por la cascada de señalización GFLs/GFR α /RET durante el mismo periodo.

Materiales y métodos del capítulo 3

3.1 Generación de larvas

Utilizando el protocolo desarrollado en el capítulo 1 de esta tesis, se obtuvieron embriones y larvas de *A. dufresnii*, los cuales fueron mantenidos en cultivo entre 1 y 14 dpf para estudiar su desarrollo neural.

3.2 Inmunocitoquímica de fluorescencia indirecta

Esta técnica consta de una inmunomarcación con anticuerpos comerciales, en este caso desarrollados en tejido nervioso de vertebrados e invertebrados. Seguido de un revelado con una inmunomarcación específica fluorescente. El protocolo de la técnica se encuentra en el Anexo del capítulo 3.

Para este estudio se probaron varios anticuerpos comerciales de tejido nervioso. De los que presentaron reactividad en larvas de *A. dufresnii*, se eligieron 4 anticuerpos diferentes; dos marcadores de tejido nervioso, un marcador glial y un marcador de la vía de señalización de los GFLs. Se realizaron inmunocitoquímicas de fluorescencia indirecta con cada uno de los 4 anticuerpos elegidos, sobre embriones y larvas de *A. dufresnii* de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, y 14 dpf. Los organismos utilizados fueron previamente fijados utilizando un protocolo adaptado a este modelo animal que permite una fijación suave (*Anexo del capítulo 3*) y almacenados en frío hasta su uso. Al finalizar la técnica de inmunomarcación, los organismos procesados fueron colocados sobre portaobjetos

silanizados y montados utilizando una solución de 'fluoromount antifading' que permite una buena conservación de la marca fluorescente. Se dejaron secar los preparados en oscuridad y a temperatura ambiente por al menos 24 h. En todos los casos se adicionó un control negativo de la inmunomarcación que consistió en la aplicación del mismo protocolo pero con omisión del anticuerpo primario utilizado e incubando sólo con PBS en este paso.

Se observaron y fotografiaron los preparados utilizando un microscopio Leica DM2500. Este equipo cuenta con los aumentos 10, 20, 40 y 100x, luz blanca LED y luz UV que permiten la observación de las muestras en campo claro y con epifluorescencia a gran magnificación. El sistema tiene adosado una cámara digital Leica y su software correspondiente que permite la observación, fotografía y edición de las mismas desde una computadora.

3.3 Cuantificación de la expresión génica

Para conocer la expresión de los genes de interés seleccionados en el capítulo 2 de esta tesis a lo largo del desarrollo de *A. dufresnii*, se realizó la siguiente metodología:

1) **Obtención de organismos, fijación y conservación:**

Se realizó una fecundación siguiendo el protocolo descrito en el capítulo 1. A fin de asegurar un buen acervo genético de la población estudiada de *A. dufresnii*, se utilizó una mezcla de gametas femeninas de 20 hembras, y se fecundó con una mezcla de gametas masculinas de 20 machos. Se mantuvieron en cultivo los organismos resultantes durante 14 días. Antes de la fijación de cada muestra, se realizaron tres recambios del 50% del agua de las larvas, con el objetivo de eliminar cualquier impureza de la misma.

Se fijaron con solución *ARN hold (Transbionovo)* 10 alícuotas de 1000 larvas cada una, para cada tiempo de muestreo: 1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14 dpf.

Las muestras se conservaron a 4°C durante los primeros 15 días, y luego se congelaron con nitrógeno líquido 10 seg. y se almacenaron a -80°C hasta su

utilización.

2) Homogenización, extracción y purificación de ARNm

Para cada uno de los tiempos de estudio, se realizó por triplicado la homogenización, extracción y purificación de los ARN totales, utilizando en cada ocasión 2000 larvas (dos muestras).

Para ello, se descongelaron las muestras sobre hielo para evitar la degradación del ARN. Se eliminó el conservante *ARN hold* agregando dos volúmenes de PBS a fin de disminuir la densidad del conservante y luego una centrifugación de 5 min. a 10.000 rpm, para concentrar la muestra en el pellet. Se colocó la muestra en un tubo de homogenización, con entre 7 y 10 esferas de homogenización de 1,4 mm de diámetro, 1ml de buffer de lisis RNA-Solv (Omega bio-tek) y 20 μ l de β -mercaptoetanol.

Para la homogenización se utilizó un equipo homogeneizador modelo Precellys Evolution acoplado a la unidad Cryolys evolution (Bertin Instruments) que permite el ajuste de la temperatura, pulsos y velocidad de agitación. Se probaron algunas variantes de homogenización y se seleccionó la que permitió obtener la mejor relación entre la cantidad de muestra utilizada y la concentración e integridad del ARN obtenido. La variante utilizada fue de tres pulsos de 15 segundos de duración con intervalos de 15 segundos, a una velocidad de 5800 rpm y a 4°C.

La extracción y purificación de los ARN totales se llevó a cabo con el Kit II de ARNtotal, E.Z.N.A (Omega bio-tek), que utiliza columnas de intercambio HiBind para aislar el ARN de manera específica. A fin de evitar contaminación por presencia de ADN, se adicionó un protocolo de digestión con DNAsa I provisto por el mismo fabricante. Por último, se eluyó el ARN de las columnas HiBind con agua ultra pura (Gibco) en dos alícuotas, la primera de 50 μ l y la segunda de 40 μ l.

3) Cuantificación e integridad del ARN total

Se realizó una cuantificación del ARN obtenido, mediante espectrofotómetro de microvolúmenes NanoQuant infinite M200 Tecan y su software i-control v.1.9. Este equipo permite la cuantificación de la concentración de los ácidos nucleicos de una microgota de 2 μ l a partir de la absorbancia a 260 λ y 280 λ . Como resultado se obtiene un valor de concentración de ácidos nucleicos en ng/ μ l, que no debe ser

menor a 10 ng/ μ l, para poder aplicar los pasos siguientes; y una razón o coeficiente de las absorbancias, que depende de la composición de ácidos nucleicos obtenidos y la pureza de los mismos, siendo lo esperado los valores cercanos a 2 que indican que el producto obtenido es ARN puro.

La integridad del ARN se analizó en un gel de agarosa al 1,5% p/v en buffer Tris-ác. Bórico-EDTA (TBE). Para cada muestra se cargaron 100 ng de ARN, agua ultra pura y el buffer de carga correspondiente, en un volumen final de 15 μ l. El gel se corrió en buffer TBE durante 70 min. a 70 V, y se analizó en un trans-iluminador de luz UV. Los ARNs se conservaron a -80°C hasta su utilización.

4) Retrotranscripción o RT-PCR

La síntesis de ADN complementario se realizó a partir de 120 ng de ARN totales para cada una de las muestras. Para esto se utilizaron hexámeros aleatorios [50 μ M] (Thermo Fisher), Oligo dT de 12 - 18 pb (500 μ g/ml) (Thermo Fisher), dNTPs [10 mM](Invitrogen), 40 U inhibidor de RNAsa (Invitrogen) y 200 U de transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen), cada reacción se realizó según indicaciones del proveedor y con un volumen final de 20 μ L. Los ADNc fueron almacenados a -20°C hasta su uso.

5) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para estandarizar los partidores

Los partidores diseñados en el capítulo 2 de esta tesis, fueron enviados a sintetizar y luego resuspendidos con agua ultrapura, alcanzando una concentración madre de 100 μ M y una concentración de uso de 10 μ M, y almacenados a -20°C.

A fin de poner a prueba los dos pares de partidores diseñados para cada uno de los genes de interés, se realizaron PCRs convencionales a dos temperaturas de hibridación diferentes (60°C y 58°C). El perfil térmico consistió en una desnaturalización inicial de 10 min. a 95°C; 35 ciclos a 95°C por 15seg., 60°C o 58°C por 15seg., 72°C por 15seg., una extensión final de 5 min. a 72°C y una posterior incubación a 4°C al infinito. Finalizada la técnica, se realizó una electroforesis con el producto de PCR en un gel de agarosa al 2% por 70 min. a 70 V. Por último, se analizó el patrón de bandas del gel comparando la intensidad de cada producto, y se eligió la

temperatura y el juego de partidores que permitió obtener el producto de PCR más abundante y sin amplificaciones inespecíficas.

6) Análisis de expresión de los genes Bcl-2, Bax, TRPa, Syt1-1, GFAP, Actina, RPL8, GAPDH, EF1- α 1 por PCR cuantitativo (qPCR)

El análisis de expresión de los transcritos fue llevado a cabo mediante PCR cuantitativo utilizando un termociclador Mx3005P (Agilent). Para cada reacción se tomaron 2 μ L de ADNc diluído 1:10, se utilizó 0,5 μ L de partidores [250 nM] y 10 μ L de Master Mix Brilliant II SybrGreen (Agilent) para un volumen final de 20 μ L, el cual se completó con agua ultrapura (Gibco). El perfil térmico consistió en una desnaturalización inicial de 10 min. a 95°C y 40 ciclos a 95°C por 15 seg., 60°C por 15 seg., 72°C por 15 seg. y un ciclo final donde se midió la curva de disociación.

La validación de los partidores se llevó a cabo mediante el cálculo de la eficiencia, para lo cual se realizó una dilución seriada de un producto de PCR que fue utilizado como templado de la reacción. El software MxPro V4.10 (Agilent Technologies) permitió obtener los valores a través del cálculo de la pendiente obtenida $E: 10[-1/\text{pendiente}]$. La especificidad de los partidores se comprobó por medio de la curva de disociación.

7) Análisis de los resultados

Los análisis de expresión se llevaron a cabo usando un único valor de umbral en la fase exponencial de la reacción, el cual permitió determinar el punto de cruce para cada muestra (Ct). Se realizaron dos réplicas técnicas para cada una de las muestras. La expresión relativa de cada gen se basó en el método del $2^{-\Delta\Delta C_P}$ (Livak y Schmittgen 2001), y con valores de housekeeping calculados a partir de los genes de referencia RPL8 y GAPDH con planilla de cálculo Bestkeeper (Pfaffl et al. 2004).

Para analizar las diferencias en la expresión relativa de cada gen a lo largo de los primeros 14 dpf, se corroboraron los supuestos de normalidad y homocedacia y realizó un análisis de la varianza de una vía transformando los valores a escala logarítmica. Las diferencias a lo largo de los días fueron evaluadas con la prueba Tukey (Zar 1984). Para una mejor interpretación de los gráficos éstos se presentan sin escala logarítmica.

Resultados del capítulo 3

*Desarrollo del sistema nervioso de *Arbacia dufresnii**

Para describir el desarrollo del sistema nervioso en esta especie durante los primeros 14 dpf, se probaron los anticuerpos primarios que figuran en la Tabla 3.1, y en función de la inmunomarcación, se eligieron anti-1E11, anti-GFSK, anti-GFAP y anti-GFR α . Estos anticuerpos presentaron un marcaje específico e intenso, y en sus controles negativos no se observó marca.

Tabla 3.1 Anticuerpos probados en este trabajo en larvas de *A. dufresnii*

Anticuerpo	Fuente	Especie huésped	Dilución	Resultado
anti-1E11	Dr. R. Burke	Rata	1:200	+++
(Syt1-1)	(University of Victoria, Canada)	Monoclonal		
anti-Tpep	Dr. S. Cain	Conejo Policlonal	1:250	-
	(University of Washington, USA)			
anti-RN1	Dr. J. García Arrarás	Conejo Policlonal	1:10000	+
	(Universidad de Puerto Rico)			
anti-GFSK	Dr. J. García Arrarás	Conejo Policlonal	1:250	+++
	(Universidad de Puerto Rico)			
anti-Ki 67	Sigma Aldrich	Ratón Monoclonal	1:500	+
anti-Tau	Developmental Studies	Ratón Monoclonal	1:100	+
	Hybridoma Bank			
anti-GFAP	Sigma Aldrich	Ratón Monoclonal	1:200	+++
anti-GFRα	Thermo Fischer Scientific	Conejo Policlonal	1:250	++++

Inmunodetección de Syt1-1 a lo largo de los primeros 14 dpf

En *A. dufresnii*, el anticuerpo monoclonal **anti-1E11**, que se une específicamente a la proteína Syt1-1, marcó neuronas en todos los estadios estudiados. En los organismos de 1dpf, que corresponden al estadio de gástrula en esta especie, se observó marca específica en la superficie del embrión, concentrándose mayormente en la zona del polo animal (Figura 3.3A).

Entre los 2 y 7 dpf se puede apreciar en la zona anterior de la larva, la aparición y el desarrollo del sistema nervioso primordial de la larva, y en particular de su estructura principal: el órgano apical (Figura 3.3 B-D y Figura 3.4 E). En esta estructura de gran complejidad se pueden apreciar el desarrollo de los cordones nerviosos a los 5 dpf (Figura 3.4 B).

El sistema neural periférico se hace evidente a partir de los 3 dpf, con la aparición de los cordones nerviosos que se extienden desde el órgano apical hacia los brazos post-orales (Figura 3.4 A). A partir de los 6 dpf aparecen a ambos lados del órgano apical, los primordios de los brazos pre-orales y la marca de 1E11 se concentra también en esta zona (puntas de flecha, figura 3.3 D). Asimismo, a los 6 dpf se puede apreciar en la zona lateral de la larva, una neurona de gran tamaño con su soma y su prolongación axonal, y una zona de aparente unión neuronal en la que se pueden distinguir la inervación entre el proceso axonal y el soma de otra neurona (Figura 3.4 C-D).

Posteriormente, durante la segunda semana del desarrollo se observa que el sistema nervioso comienza a desarrollarse alrededor de las estructuras alimenticias: la zona oral, el esófago y el estómago, en donde forma una red de neuronas y neuritas. Además, a partir de los 8 dpf pueden observarse neuronas que inervan las paredes del estómago (Figura 3.4, F), y esta inervación se hace particularmente evidente entre los 10 y los 14 dpf (Figura 3.3, E - F).

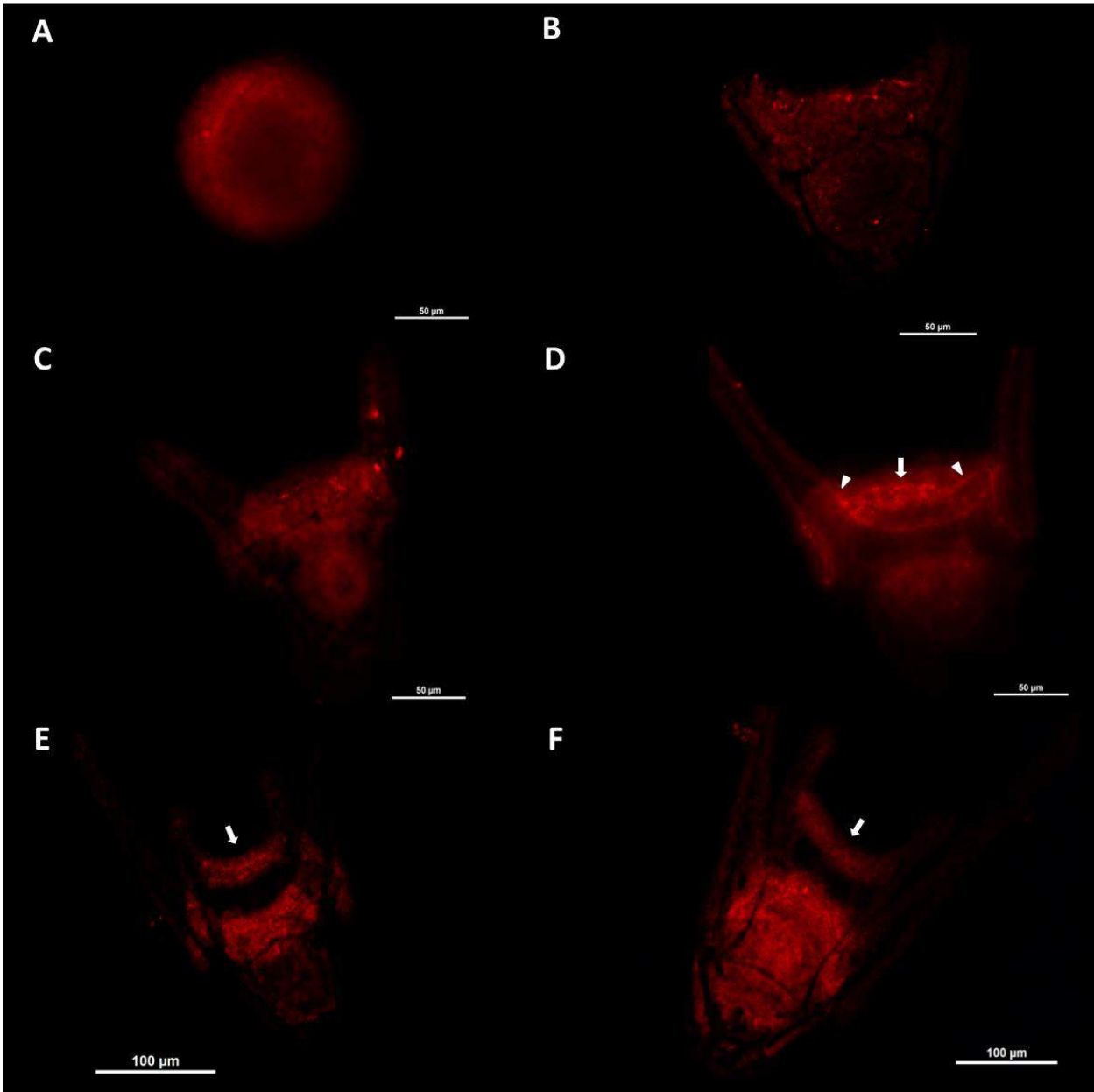


Figura 3.3: Inmunocitoquímica con **anti-1E11** revelada con **Cy3** en embriones y larvas de *A. dufresnii* entre 1 dpf y 14 dpf. Observe la presencia predominante en la zona anterior de la larva, los cordones nerviosos en el órgano apical (flechas), y en los primordios de los brazos pre-orales (puntas de flechas). A) Gástrula, marcación más intensa en el polo animal. B) Larva plánula de 2 dpf. C) Larva pluteus de 4 dpf. D) Larva pluteus de 6 dpf. E) Larva pluteus de 10 dpf. F) Larva pluteus de 14 dpf, observe la gran inervación en el esófago y estómago.

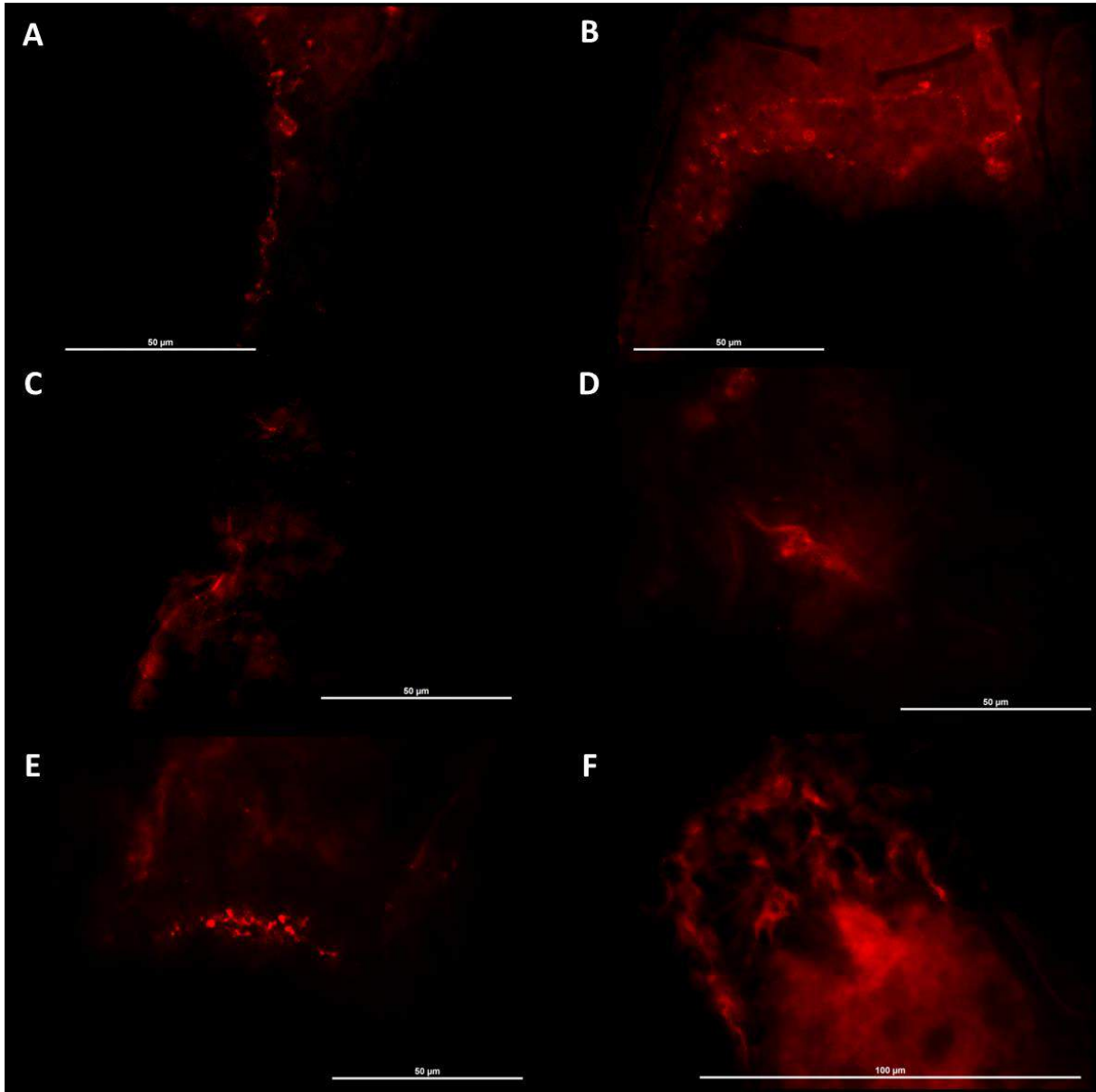


Figura 3.4: Detalle de Inmunocitoquímica con **anti-1E11** revelada con **Cy3** en larvas pluteus de *A. dufresnii* entre 3 dpf y 8 dpf. A) Cordón nervioso extendiéndose dentro del brazo post-oral a los 3 dpf. B) Órgano apical a los 5dpf. C) Soma y prolongación axonal de una neurona lateral a los 6 dpf. D) Zona de unión neuronal a los 6 dpf, se observa la inervación entre un proceso axonal y el soma de otra neurona. E) Órgano apical a los 7 dpf. F) Neuronas inervando las paredes del estómago a los 8 dpf.

Inmunodetección de GFSKLYFamide a lo largo de los primeros 14 dpf

El anticuerpo policlonal **anti-GFSK**, marca las neuronas y fibras nerviosas que expresan el péptido GFSKLYFamide, y en embriones y larvas de *A. dufresnii* dio resultados positivos.

En embriones de 1 dpf, correspondientes al estadio de gástrula, se observa un patrón difuso de expresión que se concentra en la zona interna del organismo, en las paredes de la cavidad del bastecele y el arquenterón en desarrollo (Figura 3.5, A).

A los 3 dpf, la larva pluteus muestra una expresión puntual en algunas células ubicadas a lo largo de su perímetro y en la región de formación del órgano apical (Figura 3.5, B). Entre los 4 y 5 dpf, la expresión se concentra en el órgano apical, la zona oral, la zona de crecimiento de los brazos pre-orales, en donde se observan fibras nerviosas marcadas, y comienza a hacerse visible en el estómago (Figura 3.5, C y Figura 3.6, A y B). Entre los 6 y 14 dpf se observa un patrón más acotado del antígeno GFSK, localizándose mayoritariamente en la zona del estómago y esófago (Figura 3.5, D-F). En especial la marcación se vuelve particularmente fuerte en un pequeño grupo de células que se ubican dentro del estómago (Figura 3.6, C, D, F). En algunas ocasiones, se registró también, la expresión de esta proteína en otras estructuras como es el caso de algunas larvas de 12 dpf en donde se marcó el órgano apical y los cordones nerviosos que lo conectan con los brazos pre-orales (Figura 3.6, E).

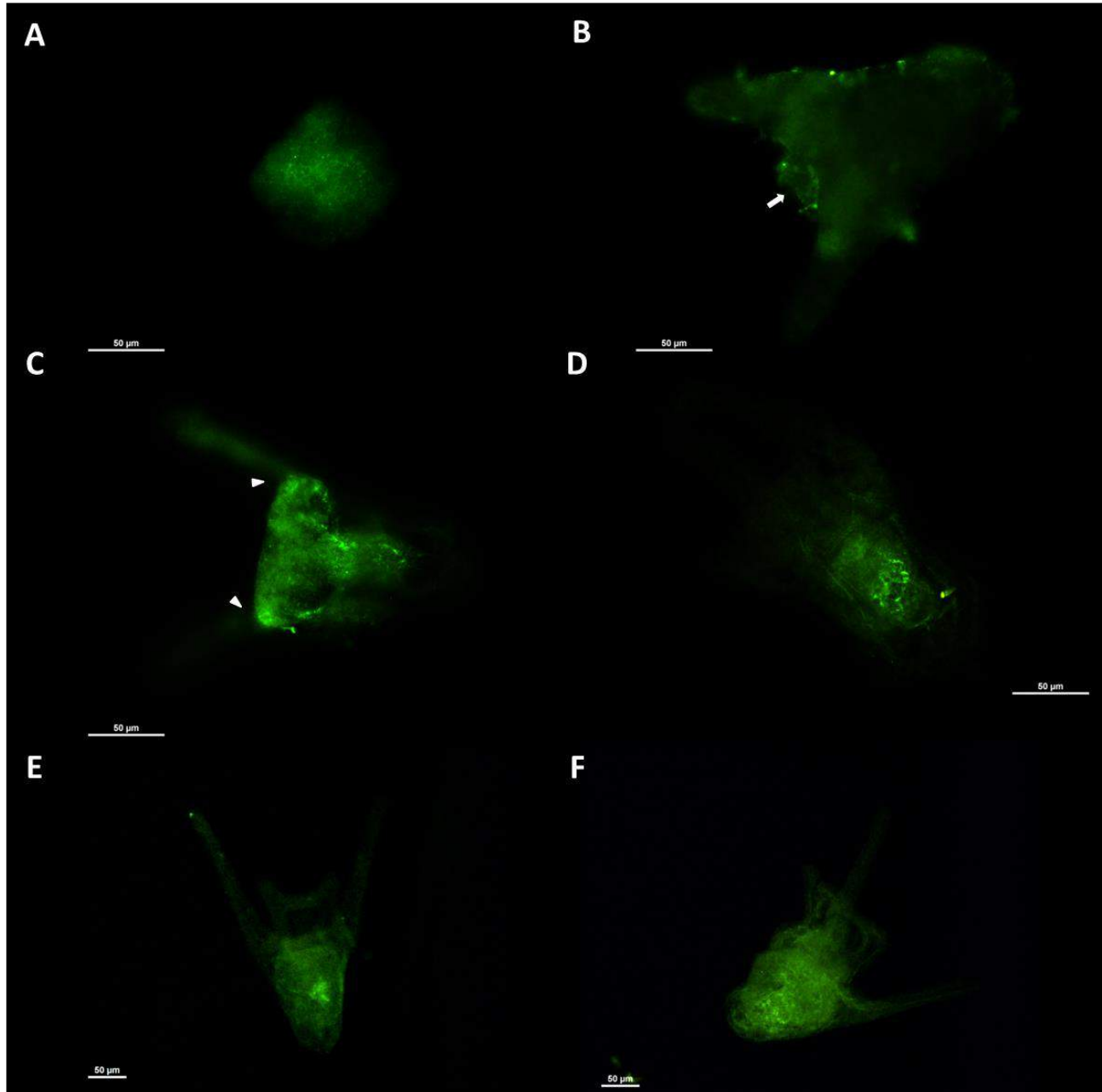


Figura 3.5: Inmunocitoquímica con **anti-GFSK** revelada con **Cy2** en *A. dufresnii* entre 1 y 14 dpf. A) Gástrula, expresión difusa predominante en zona del blastocele y arquerterón. B) Larva de 3 dpf con expresión puntual en su perímetro y en la zona de formación del órgano apical (flecha). C) Larva de 4 dpf, expresión en la zona del estómago, primordios de los brazos pre-orales (puntas de flecha) y órgano apical. D) Larva de 6 dpf, observe la expresión puntual en células del estómago a partir de este día. E) Larva de 8 dpf. F) Larva de 14 dpf.

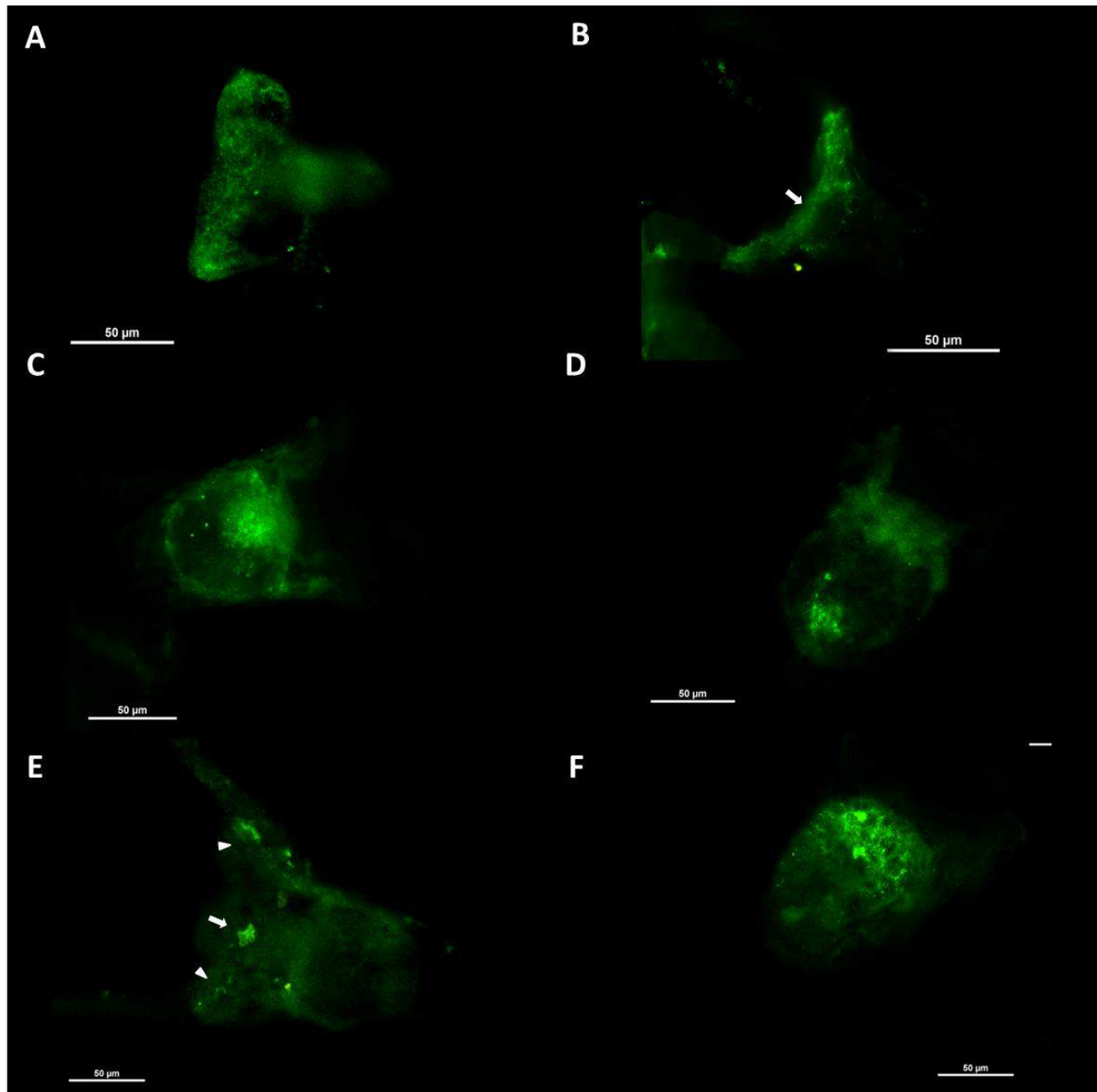


Figura 3.6: Detalle de inmunocitoquímica con **anti-GFSK** revelada con **Cy2** en *A. dufresnii* entre los 4 y 14 dpf. A) Larva de 4 dpf, expresión en la zona de los primordios de los brazos pre-orales B) Larva de 5 dpf, expresión en primordios pre-orales, zona oral y órgano apical, nótese las fibras nerviosas marcadas con el anticuerpo (flechas). C) y D) Larva de 8 dpf, expresión en la zona del esófago y estómago, respectivamente. E) Larva de 12 dpf, expresión en órgano apical (flecha) y cordones nerviosos que inervan brazos pre-orales (puntas de flecha). F) Larva pluteus de 14 dpf, expresión en esófago y estómago.

Inmunodetección de GFAP a lo largo de los primeros 14 dpf

El marcaje con el anticuerpo monoclonal **anti-GFAP** en embriones y larvas de *A. dufresnii* dio resultados positivos.

En embriones de 1 dpf, correspondientes al estadio de gástrula, se detectó marca de GFAP (Figura 3.7, A). A los 4 dpf, la expresión se hizo mucho más evidente en la zona del tubo digestivo siguiendo un patrón difuso (Figura 3.7, B). A los 6 dpf, se observó la concentración de la marca en la zona del estómago y en la zona oral de la larva (Figura 3.7, C, flechas). A partir de los 7 dpf, la marca se concentra preferentemente en las paredes del estómago (Figura 3.7, D), y en larvas de 8 dpf se vuelve muy intensa y específica en la zona oral, el esófago y el estómago, y en particular este marcaje se vuelve más abundante en las dos constricciones que dividen al tubo digestivo (Figura 3.8, punta de flecha).

En larvas de entre 10 y 14 dpf, se mantiene el patrón descrito, pudiendo apreciarse detalles de la morfología típica de las células marcadas que son similares a las células gliales y su localización en el tubo digestivo (Figura 3.7, E y F).

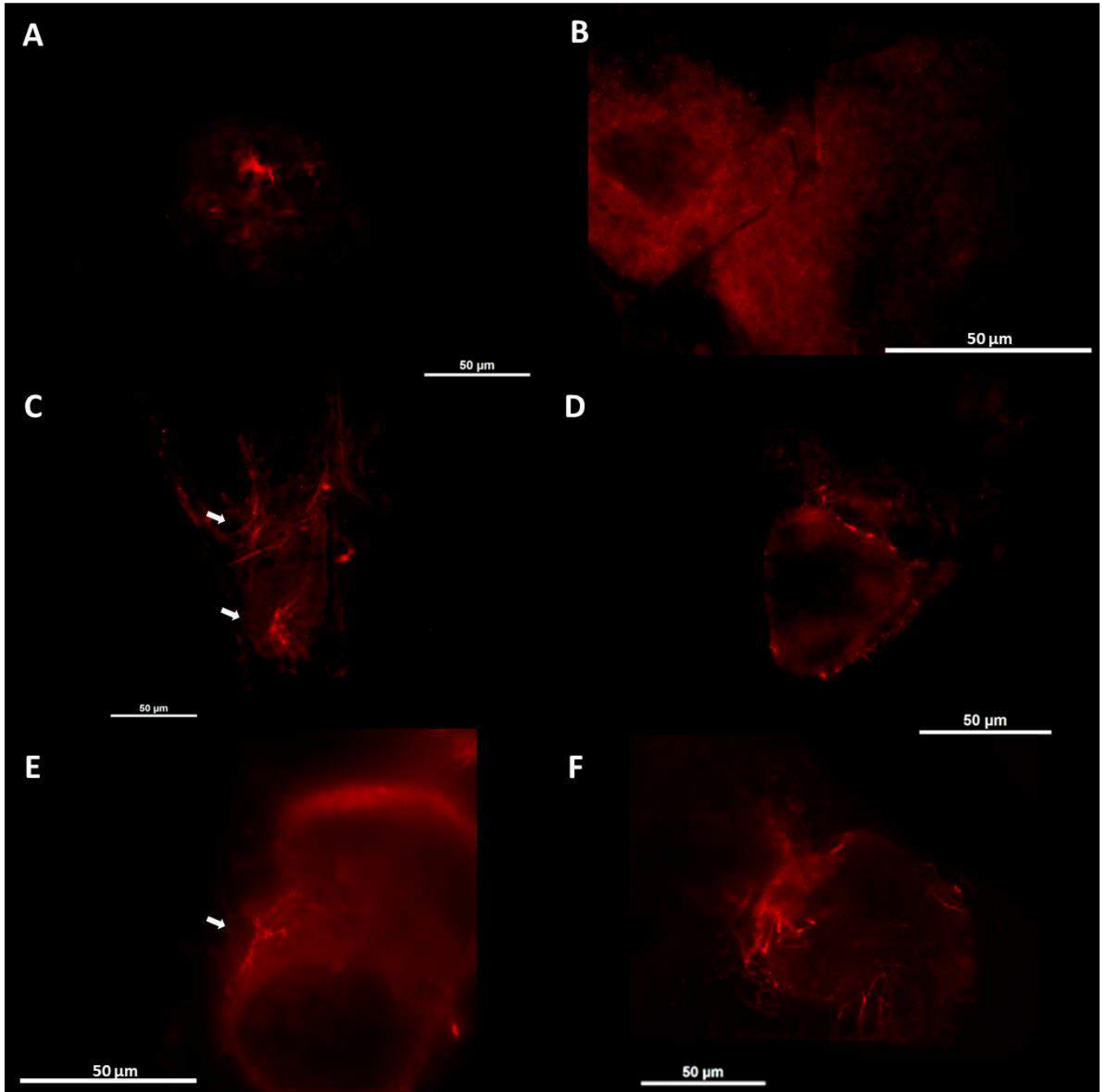


Figura 3.7: Inmunocitoquímica con **anti-GFAP** revelada con **Cy3** en *A. dufresnii* entre 1 y 14 dpf. A) Gástrula, con expresión puntual en la zona media. B) Larva de 4 dpf con expresión difusa en la zona del tubo digestivo. C) Larva de 6 dpf con expresión en la zona del estómago y en la zona oral (flechas). D) Larva de 7 dpf con expresión en las paredes del estómago. E) Larva de 10 dpf, detalle de la morfología típica de las células marcadas con GFAP (flecha). F) Larva de 14 dpf con expresión en la zona del esófago y estómago.

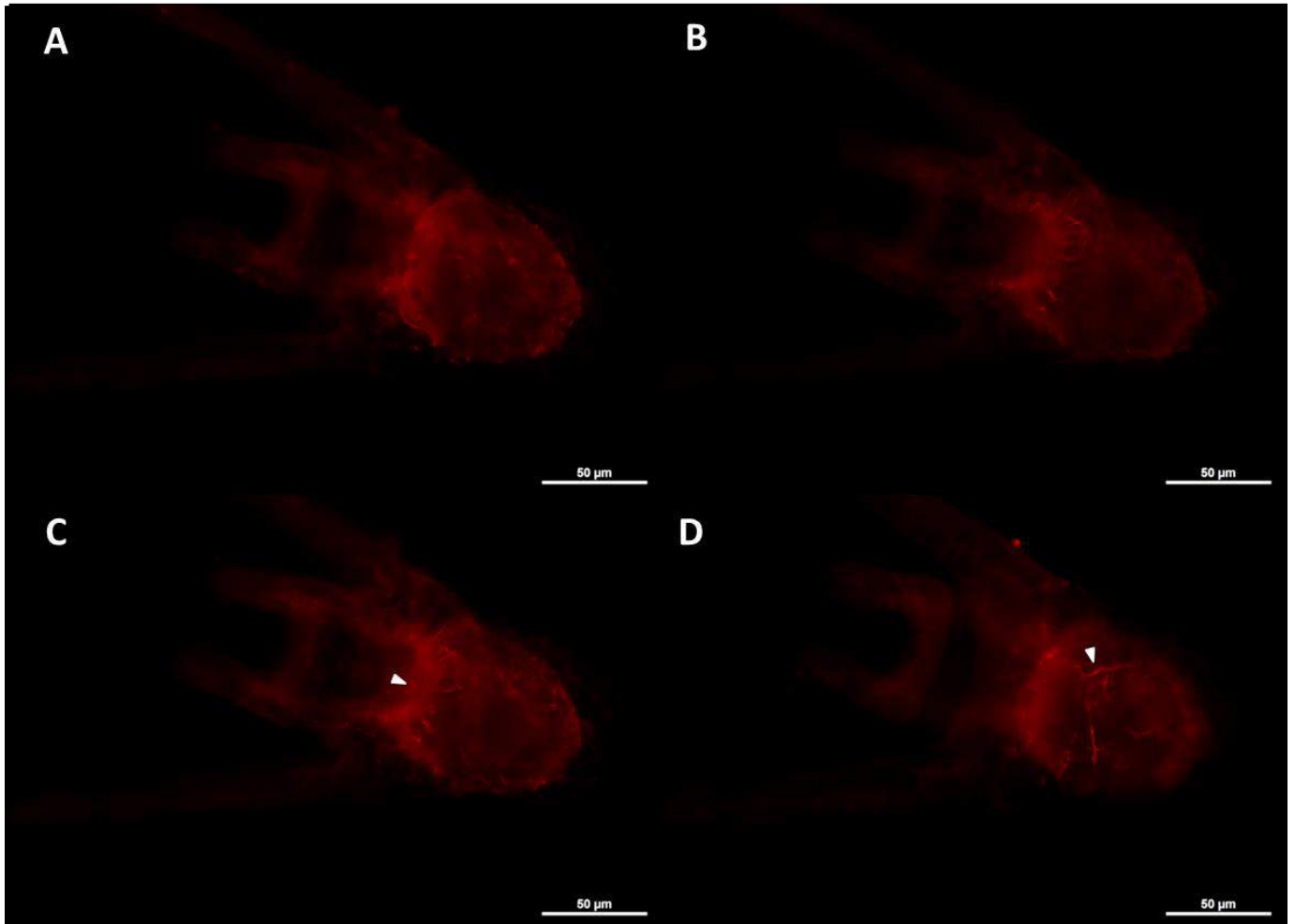


Figura 3.8: Inmunocitoquímica con **GFAP** revelada con **Cy3** en larvas de *A. dufresnii*. Fotografías en cuatro planos distintos de una larva de 8 dpf. Puede apreciarse el marcaje específico en células que recubren a los tejidos digestivos. En especial se observan múltiples células marcadas envolviendo el estómago y en la zona de la constricción entre el esófago y el estómago (puntas de flecha).

Inmunodetección del receptor GFR α durante los primeros 14 dpf

El marcaje con el anticuerpo **anti- GFR α** en larvas de *A. dufresnii* dio resultados positivos, pudiendo monitorear *in situ* la expresión de esta proteína, y los sitios y momentos del desarrollo con mayor expresión.

En embriones de 1 dpf se observó marca en la superficie celular tanto en la zona exterior de la gástrula como en la superficie de su interior o arquenterón, y en especial se aprecia un mayor marcaje en la zona del polo vegetal (Figura 3.9, A). A los 2 dpf, las larvas plánulas muestran una expresión de GFR α en la zona anterior del organismo, tanto en los primordios de los brazos post-orales como en la zona central en donde se desarrollará el órgano apical (Figura 3.9, B). A los 4 dpf se observa la mayor expresión de la proteína GFR α . La marca se concentra en los ganglios laterales ubicados en la base de estos brazos post-orales, y en los extremos de los mismos, en los primordios de los brazos pre-orales, en el órgano apical en desarrollo, y en la zona del estómago (Figura 3.9, C). Además, pueden apreciarse detalles celulares de la expresión de GFR α durante el desarrollo de los brazos post-orales entre los 3 y 8 dpf, (Figura 3.10, A-C), la localización específica en la superficie celular (Figura 3.10, D) y la expresión en las conexiones entre estas células (Figura 3.10 E y F).

En larvas de 7 dpf se mantiene el patrón e intensidad observado en días previos (Figura 3.9, D). Adicionalmente, entre los 5 y 14 dpf se observa un patrón diferencial de expresión entre los lados izquierdo y derecho de la larva, que se hace cada vez más evidente a medida que avanza el desarrollo larval (Figura 3.9, E y F, flechas). En larvas de 12 y 14 dpf, la expresión de GFR α se localiza en regiones específicas como los ganglios laterales y brazos post-orales (Figura 3.9, F).

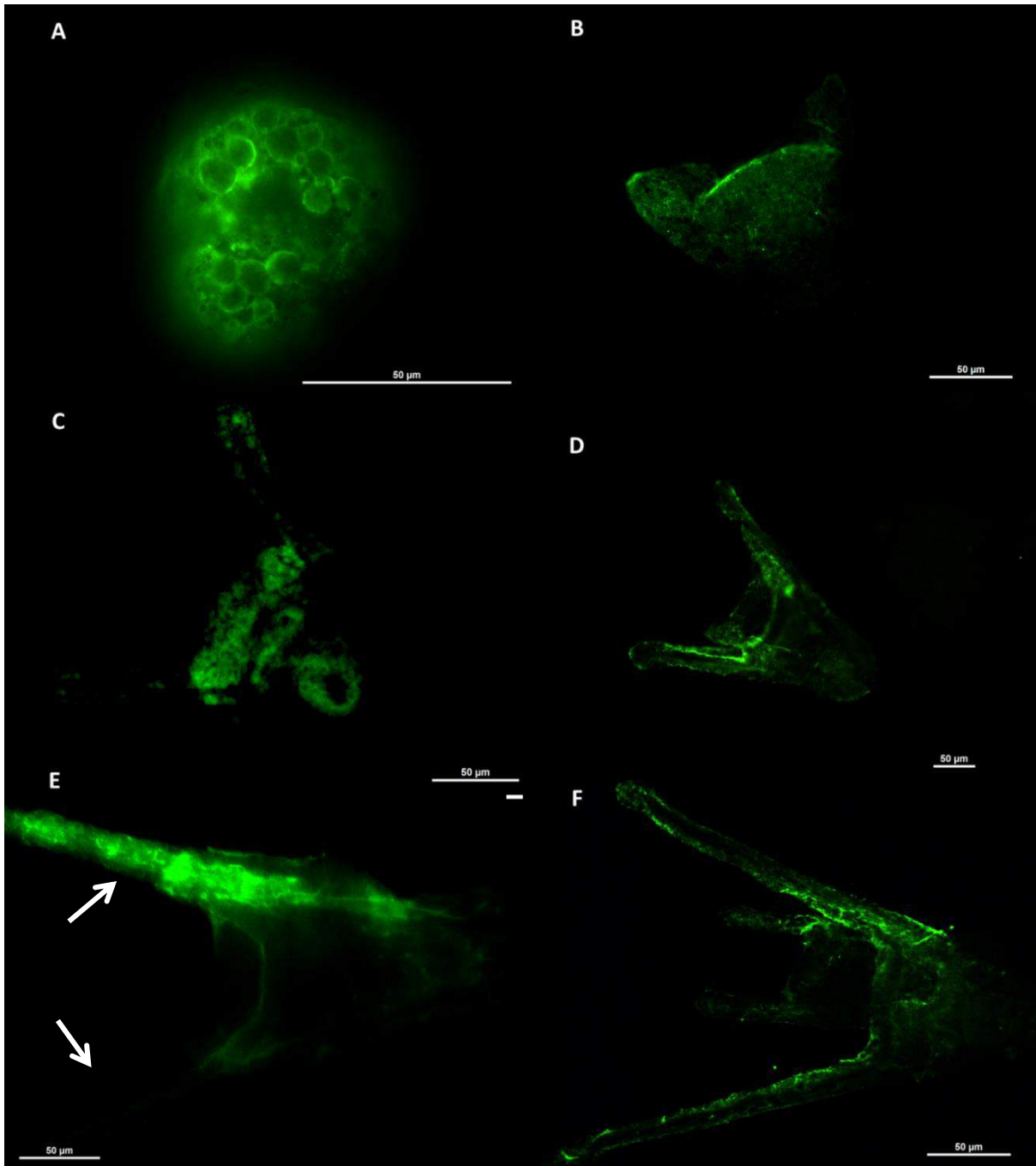


Figura 3.9: Inmunocitoquímica con **GFR α** revelada con **Cy2** en *A. dufresnii* entre 1 y 14 dpf. A) Gástrula con expresión en el polo vegetal. B) Larva plánula de 2 dpf, observe la expresión predominante en la zona anterior C) Larva pluteus de 4 dpf. D) Larva de 7 dpf con expresión en brazos post-orales E) Larva de 10 dpf, observe el patrón diferencial a ambos lados de la larva (flechas). F) Larva de 14 dpf.

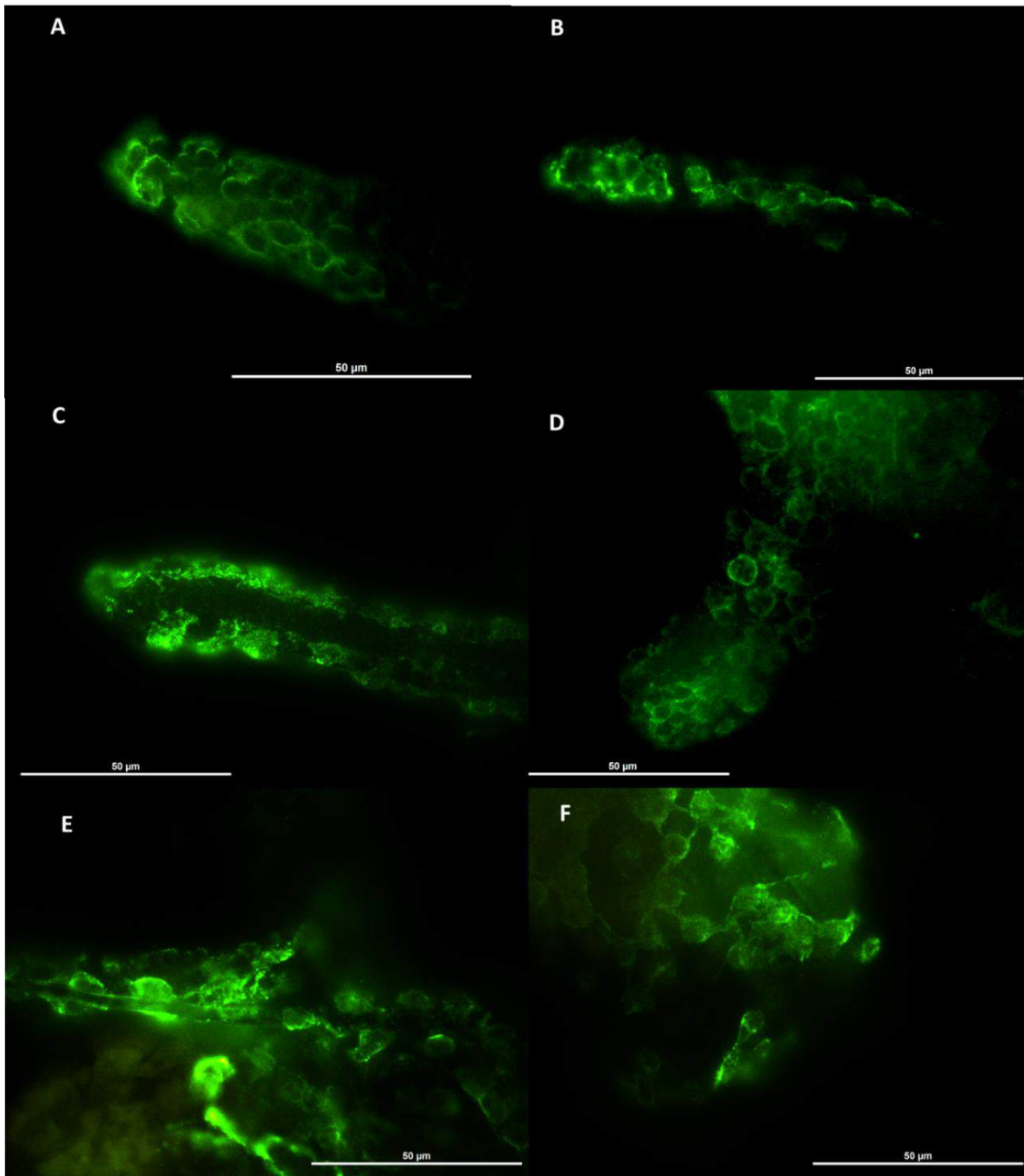


Figura 3.10: Detalle de inmunocitoquímica con **GFR α** revelado con **Cy2** en larvas de *A. dufresnii*. A) Brazo post-oral a los 3 dpf. B) Brazo post-oral a los 5 dpf. C) Brazo post-oral a los 8 dpf. D) Detalle de la expresión en la superficie celular en una larva de 4 dpf. E) Gran aumento de la expresión a partir de los 4 dpf. F) Presencia de la proteína GFR α en las conexiones entre células en una larva de 4 dpf.

Cuantificación de la expresión génica

ARN obtenido

La concentración de ARN total obtenido en las muestras utilizadas presentó valores de entre 132,25 ng/ μ l y 14,1 ng/ μ l. Las razones entre absorbancias en la mayoría de los casos se mantuvieron entre 2,03 y 2,33, evidenciando una pureza aceptable. Los valores que no cumplieron con la concentración y pureza necesarios fueron descartados (Tabla 3.2).

Tabla 3.2: Concentración de ARN total obtenido medido por absorbancia a 260 λ y 280 λ . Razón de absorbancias calculada como 260 λ /280 λ .

dpf de las larvas	[ARN total] ng/ μ l	Razón
1	38,6	2,19
1	30,9	2,15
1	66,25	2,19
2	47,35	2,11
2	23,9	2,26
2	57,4	2,09
4	14,1	2,33
4	34,45	2,14
6	14,5	2,10
7	82,35	2,13
7	68,3	2,21
7	16,6	2,22
8	17,15	2,25
8	19,95	2,22
8	132,25	2,08
9	48,6	2,15
9	16,85	2,24
9	87,05	2,04
10	15,45	2,24
10	23,55	2,27
10	21,25	2,18
12	18,7	2,07
12	21,3	2,10
12	33,7	2,21
14	16,9	2,29

El estado de integridad del ARN total obtenido fue muy bueno en la mayoría de las muestras. La electroforesis en gel de agarosa presentó bandas muy tenues, debido a la baja cantidad de ARN utilizado en este paso (100 ng). Sin embargo, en la mayoría de los casos se pudo observar el patrón típico del ARN en buen estado de conservación que consta de dos bandas bien definidas correspondientes a las subunidades mayor y menor del ARN ribosomal (Figura 3.11).

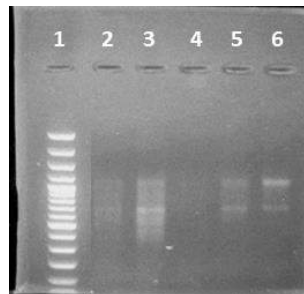


Figura 3.11: Ejemplo de una electroforesis en gel de agarosa observada en un transiluminador UV. Calle 1: corresponde a un marcador de peso molecular de 100pb. Calles 2 y 3: muestras de ARN en estado regular, puede observarse el patrón difuso de bandas. Calle 4: no se aprecian bandas de ARN en la fotografía por la baja concentración de la muestra. Calle 5 y 6: patrón de bandas característico de ARN en buen estado de conservación y en buena concentración.

Estandarización de los partidores mediante PCR

Utilizando los partidores diseñados en el capítulo 2 de esta tesis, se obtuvo amplificación por PCR de un fragmento para la mayoría de los genes estudiados (Figuras 3.12 y 3.13).

La amplificación de los genes constitutivos mostró una única banda bien definida, evidenciando la amplificación de gran cantidad de copias de un único fragmento para cada gen. RPL8 mostró una muy buena amplificación en todas las temperaturas de hibridación estudiadas y con ambos juegos de partidores. La amplificación de fragmentos de EF1- α 1, Actina y GAPDH mostró diferencias en las intensidades de bandas obtenidas variando la temperatura y los partidores (Figura 3.12). A partir de lo observado, se seleccionó el par de partidores que mejor funcionó

para cada gen, y la temperatura de hibridación de 60°C, ya que con ésta se obtienen buenos resultados en todos los casos (Figura 3.12, flechas).

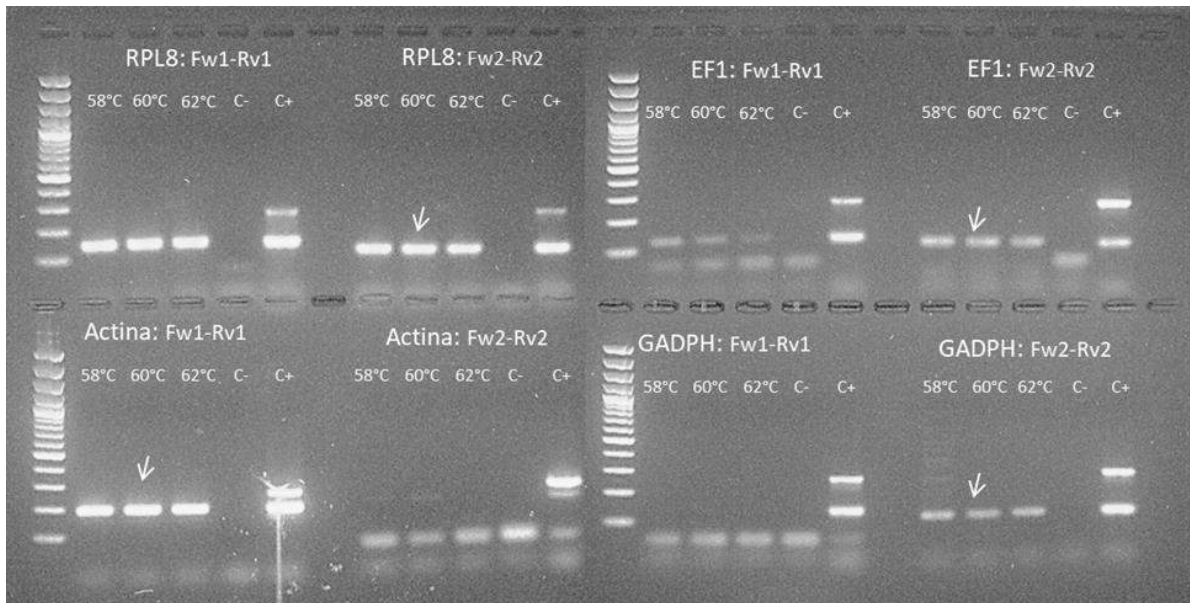


Figura 3.12: Electroforesis en gel de agarosa al 2% del producto de PCR obtenido con dos juegos de primarios Fw1-Rv1 y Fw2-Rv2 (detalles en Tabla 2.12), para los genes constitutivos RPL8, EF1- α 1, Actina y GAPDH, a tres temperaturas diferentes. C-: control negativo por omisión de templado en la reacción. C+: control positivo por adición de un templado y un par de primarios extra que se sabe que generan amplificación. Debido a la presencia de dos juegos de primarios, uno para el gen de estudio y otro como control positivo, es que en esta calle se observan dos bandas. Las flechas indican la combinación de primario y temperatura que dio el mejor resultado para cada gen.

La amplificación de fragmentos para los genes de interés mostró un resultado positivo, aunque mucho más variable y con un patrón de bandas más tenue (Figura 3.13). El gen Bcl-2 pudo ser amplificado, en ambas temperaturas de hibridación con el par de primarios Fw2 y Rv2 pero no con el par Fw1 y Rv1. El gen Bax fue amplificado con los dos juegos de primarios, pero en ambos casos se obtuvo una banda tenue, por lo que se eligió el par Fw2 y Rv2 que genera la mejor banda a la temperatura de 60°C. El gen TRPa pudo ser amplificado con ambos pares de primarios, obteniendo la mejor banda con Fw2 y Rv2 y a 60°C. Para el gen GFAP se obtuvo amplificación sólo con el par Fw1 y Rv1 para las dos temperaturas estudiadas (Figura 3.13, flechas). Para los

genes *Syt1-1* y *GFR α* no se observaron bandas, por lo que con este protocolo de PCR no fue posible amplificar un fragmento de estos genes.

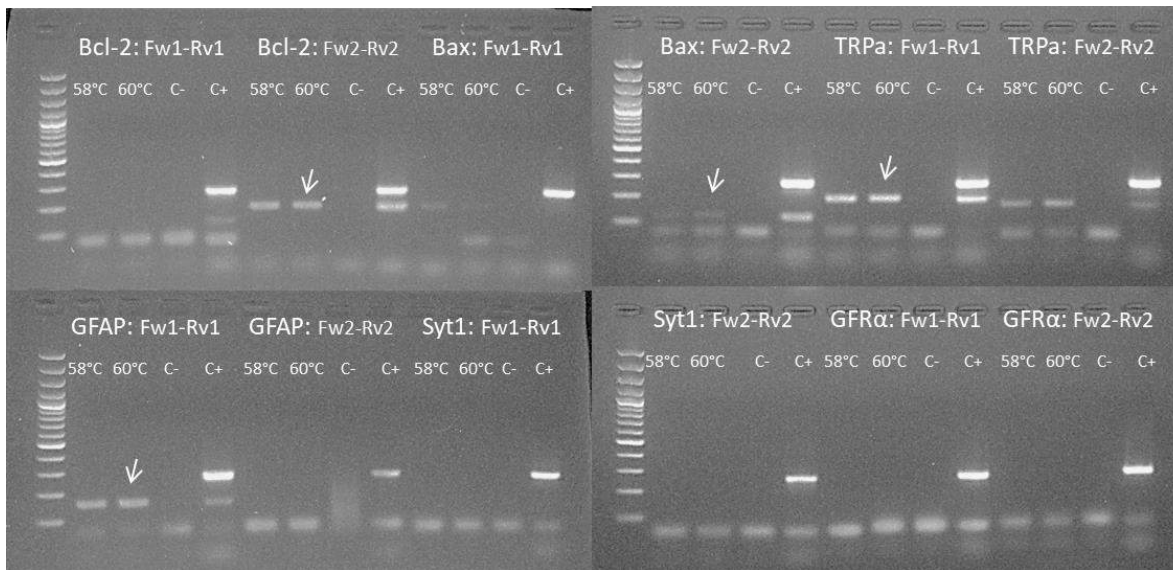


Figura 3.13: Electroforesis en gel de agarosa al 2% del producto de PCR obtenido con dos juegos de primarios Fw1-Rv1 y Fw2-Rv2 (Detalles en Tabla 2.12) para los genes *Bcl-2*, *Bax*, *TRPA*, *GFAP*, *Syt1-1* y *GFR α* , a dos temperaturas diferentes. C-: control negativo por omisión de templado en la reacción. C+: control positivo por adición de un templado y un par de primarios extra control positivo por adición de un templado y un par de primarios extra que se sabe que generan amplificación. Debido a la presencia de dos juegos de primarios, uno para el gen de estudio y otro como control positivo, es que en esta calle se observan dos bandas. Las flechas indican la combinación de primario y temperatura que dio el mejor resultado para cada gen.

Posteriormente, se realizaron pruebas con PCR cuantitativa (qPCR) para intentar amplificar *Syt1-1* y *GFR α* , y para optimizar la amplificación de *Bax* que resultó muy tenue en la PCR convencional. Para ello, se aumentó la concentración de primarios desde [250mM] a [500mM] y se pudo mejorar la amplificación de *Bax*, y obtener una buena amplificación para *Syt1-1*. Sin embargo, tampoco se logró amplificar *GFR α* con esta técnica. La Tabla 3.3 resume las combinaciones elegidas luego de esta etapa.

Tabla 3.3: Partidores y temperaturas de hibridación seleccionadas para cada gen.

Gen	Partidores	Temperatura	Gen	Partidores	Temperatura
Rpl8	Fw2-Rv2	60°C	EF1-α1	Fw2-Rv2	60°C
Actina	Fw1-Rv1	60°C	GAPDH	Fw2-Rv2	60°C
Bcl-2	Fw2-Rv2	60°C	Bax	Fw2-Rv2	60°C
TRPa	Fw1-Rv1	60°C	GFAP	Fw1-Rv1	60°C
Syt1-1	Fw2-Rv2	60°C	GFRα	Sin determinar	

Cuantificación de la expresión de los genes Bcl-2, Bax, TRPa, Syt1-1, GFAP, Actina, RPL8, GAPDH por qPCR

Para cada uno de los genes de estudio, se muestran las qPCR constituidas por 60 reacciones, que corresponden a las tres réplicas de cada tiempo de muestreo, y sus duplicados o replicas técnicas (Figuras 3.14 y 3.15). Dado que se necesitan sólo dos genes constitutivos para los análisis posteriores, no fue necesario amplificar por qPCR el gen EF1- α 1.

En las curvas de amplificación se muestra la lectura de fluorescencia en función de los ciclos de PCR realizados. Las curvas de amplificación obtenidas para cada gen mostraron la forma sigmoidea típica, en la que se pudieron distinguir las tres fases de amplificación. La primer fase comienza cercana a la línea de base y termina cuando la fluorescencia comienza a aumentar. Se fijó manualmente un umbral de fluorescencia que coincidió con el final de la primer fase de la curva (Figuras 3.14 A y 3.15 A, línea azul), y se registraron los puntos de intersección con las curvas, es decir, los Ct. Para los genes analizados, se registraron valores de Ct cercanos al ciclo 26 para la mayoría de los genes constitutivos, y cercanos al ciclo 28 para los demás genes de estudio (Figuras 3.14 A y 3.15 A).

En las curvas de disociación se muestra la lectura de la primera derivada de la fluorescencia registrada ($-R'(t)$) en función de la temperatura. Para la mayoría de los genes, se obtuvo un único pico de disociación, que indica que se amplificó un único

producto de PCR, y por lo tanto, que la amplificación fue específica. Por el contrario, para el gen de actina se obtuvieron dos picos de disociación, que evidencia que se obtuvieron varios productos de PCR (Figuras 3.14 B y 3.15 B).

Se registraron además, las temperaturas de fusión o T_m (pico de la curva) que son específicas para cada gen ya que dependen de la longitud y la composición de la secuencia de cada amplicón. Para todos los genes analizados, se obtuvieron valores para T_m mayores o iguales a 80°C . Estos valores se corresponden con productos de PCR grandes y en general específicos. Por otra parte, no se encontraron valores de T_m menores a 75°C , que se corresponden con productos de PCR inespecíficos y en general no homogéneos, es decir, compuestos por una mezcla de productos (Figuras 3.14 B y 3.15 B).

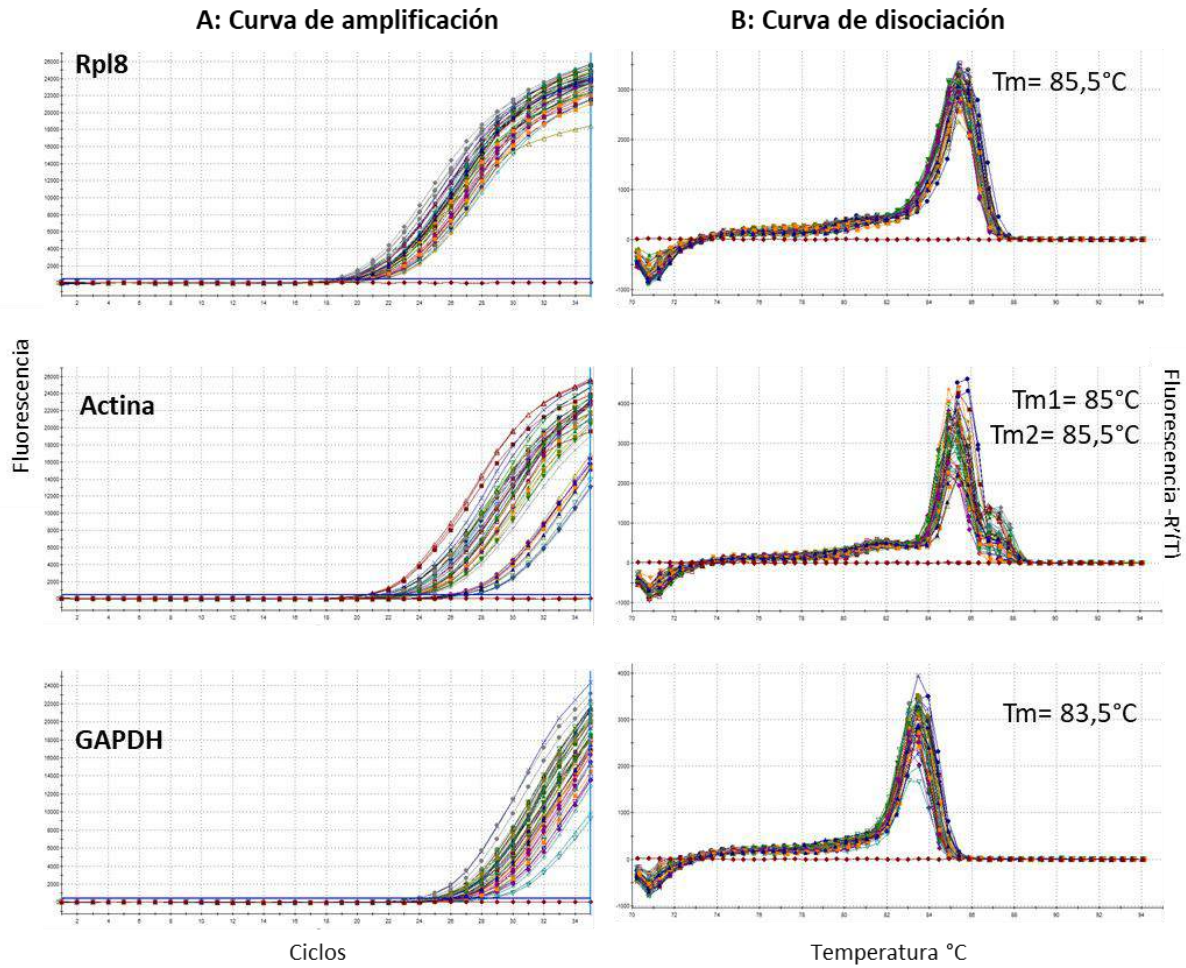


Figura 3.14: PCR cuantitativa para los genes constitutivos Rpl8, Actina y GAPDH. A) Curvas de Amplificación, muestra la fluorescencia registrada en función de los ciclos de PCR. B) Curvas de disociación obtenidas en el ciclo final de las qPCR, se muestra la fluorescencia registrada en función de la temperatura. T_m : temperatura del pico de disociación.

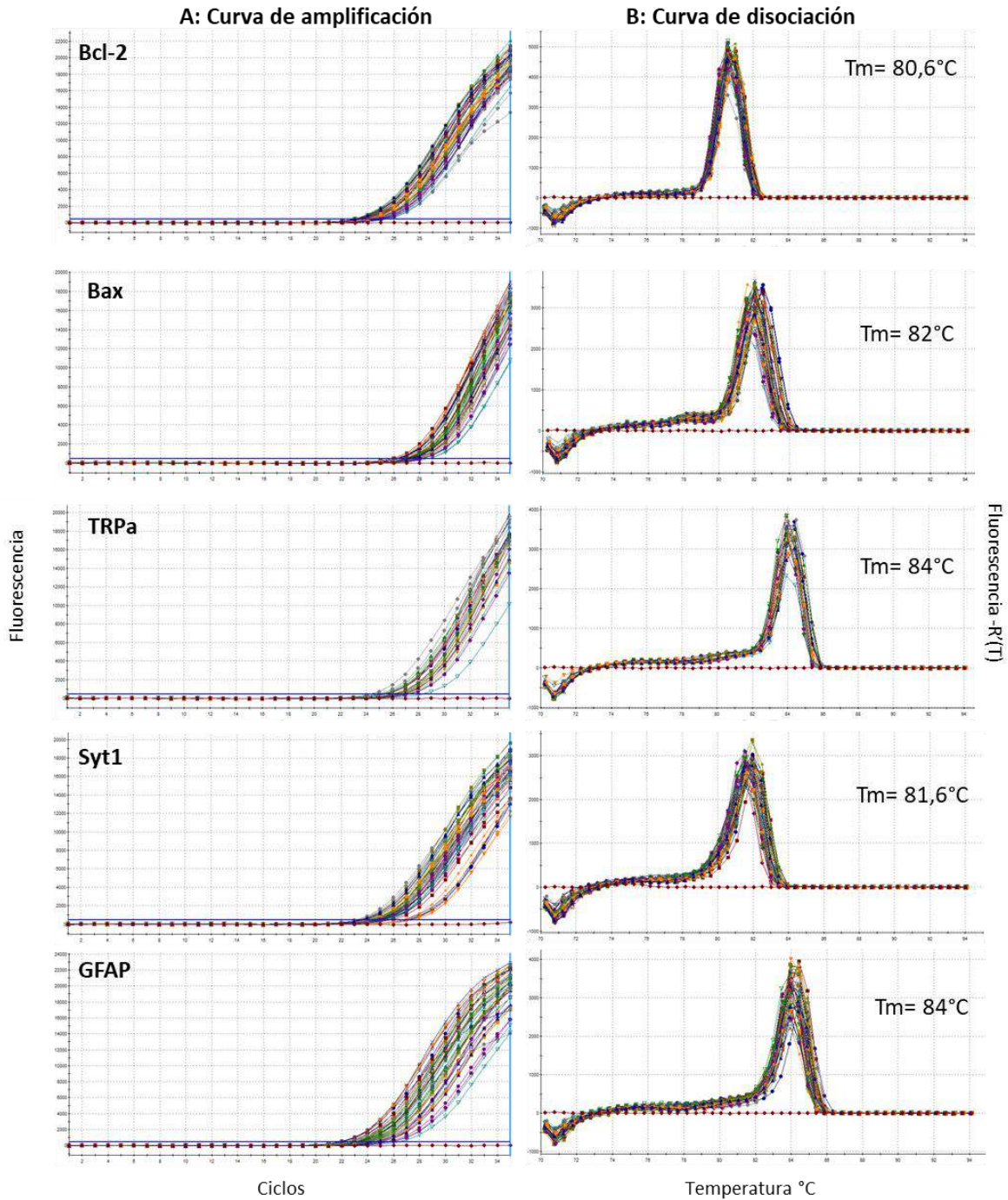


Figura 3.15: PCR cuantitativo para los genes Bcl-2, Bax, TRPa, Syt1-1 y GFAP. A) Curvas de Amplificación, muestra la fluorescencia registrada en función de los ciclos de PCR. B) Curvas de disociación obtenidas en el ciclo final de las qPCR, se muestra la fluorescencia registrada en función de la temperatura. Tm: temperatura del pico de disociación.

Eficiencia de los partidores:

La validación de los partidores para los genes seleccionados y sus regresiones lineales pueden observarse en la Figura 3.16 y en la Tabla 3.4. Los partidores para el gen Actina no fueron considerados debido a que resultaron inespecíficos según la curva de disociación obtenida.

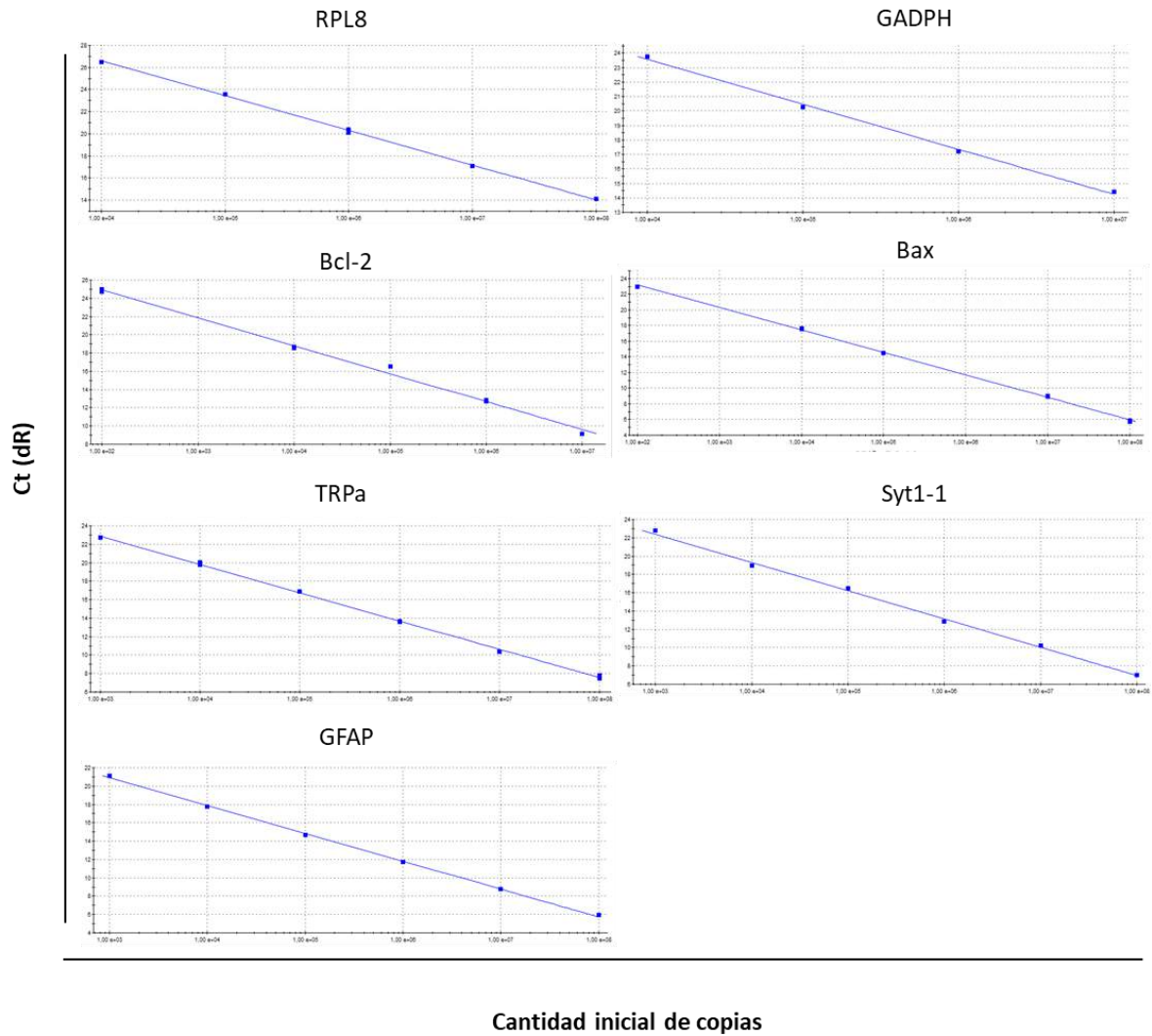


Figura 3.16: Curvas de regresión para los partidores seleccionados, obtenidas a partir de una dilución seriada del producto de PCR de cada gen que fue utilizada como templado de cada reacción.

Tabla 3.4: Eficiencias calculadas, coeficiente de correlación (RSq) y pendientes de las curvas de regresión obtenidas para cada gen.

	RSq	Eficiencia (%)	Pendiente
RPL8	0,999	108,0	-3,145
GAPDH	0,998	109,8	-3,108
Bcl-2	0,996	112,1	-3,063
Bax	0,999	122,8	-2,874
TRPa	0,999	112,2	-3,060
GFAP	0,999	113,4	-3,038
Syt1-1	0,997	111,0	-3,084

Análisis de la expresión génica

La expresión relativa de ARN para los genes de interés Bcl-2, Bax, TRPa, Syt1-1 y GFAP a lo largo de los 14 dpf se graficó en función del tiempo (Figuras 3.17-3.21).

La expresión del gen Bcl-2 mostró variaciones a lo largo de los primeros 14 dpf. Los valores más altos de expresión se observaron a los 1, 9 y 12 dpf, los valores intermedios se registraron a los 4, 7 y 10 dpf y los valores más bajos a los 2 y 8 dpf. Entre estos tres grupos se hallaron diferencias significativas ($F_{7,17}: 7,24, p<0,001$), sin embargo, no se observó una tendencia clara respecto al tiempo (Figura 3.17).

La expresión del gen Bax mostró una disminución a lo largo del tiempo. Los valores más altos de expresión se observaron en organismos de 1 dpf, seguidos de una gran disminución a los 2 y 4 dpf, y una última disminución (detalle de la Figura 3.18) que se mantuvo desde los 7 y los 8 dpf ($F_{7,17}: 11,70, p<0,001$) (Figura 3.18).

La expresión del gen TRPa mostró una disminución a lo largo del tiempo. Los valores más altos se observaron en organismos de 1 dpf, seguidos de una gran disminución entre los 2 y 14 dpf, y una disminución aún más pronunciada (detalle de la Figura 3.19) en los organismos de 9 dpf ($F_{7,17}: 5,38, p<0,05$) (Figura 3.19).

La expresión del gen *Syt1-1* mostró un aumento a lo largo del tiempo. Los valores más bajos de expresión se observaron en organismos de 1 y 2 dpf, y luego se triplicó en organismos de 4, 7 y 8 dpf, y se quintuplicó en organismos de 9, 10 y 12 dpf ($F_{7,17}: 10,10, p < 0,001$) (Figura 3.20).

La expresión del gen *GFAP* mostró una disminución significativa a lo largo del tiempo. Los valores más altos de expresión se observaron en organismos de 1 dpf, seguidos de una gran disminución a los 2 dpf, y otra disminución a los 4 dpf que se mantuvo hasta los 12 dpf (detalle de la Figura 3.21) ($F_{7,17}: 5,38, p < 0,05$) (Figura 3.21).

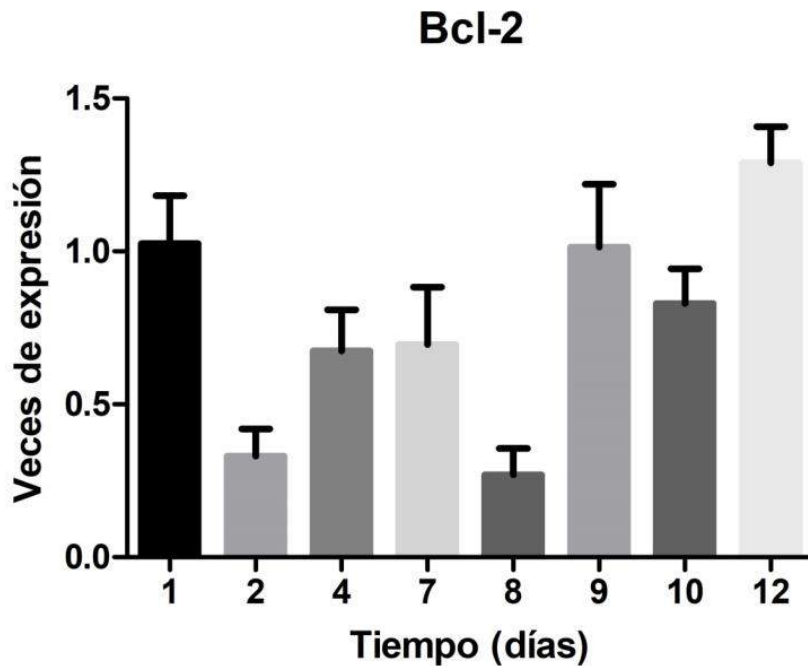


Figura 3.17: Expresión relativa del gen *Bcl-2* a lo largo de los primeros 14 dpf en larvas de *A. dufresnii*, expresada como veces de expresión respecto al valor hallado en el día 1. La barra de tiempo = 4 corresponde a organismos de 4 y 6 dpf. La barra de tiempo = 12 corresponde a organismos de 12 y 14 dpf.

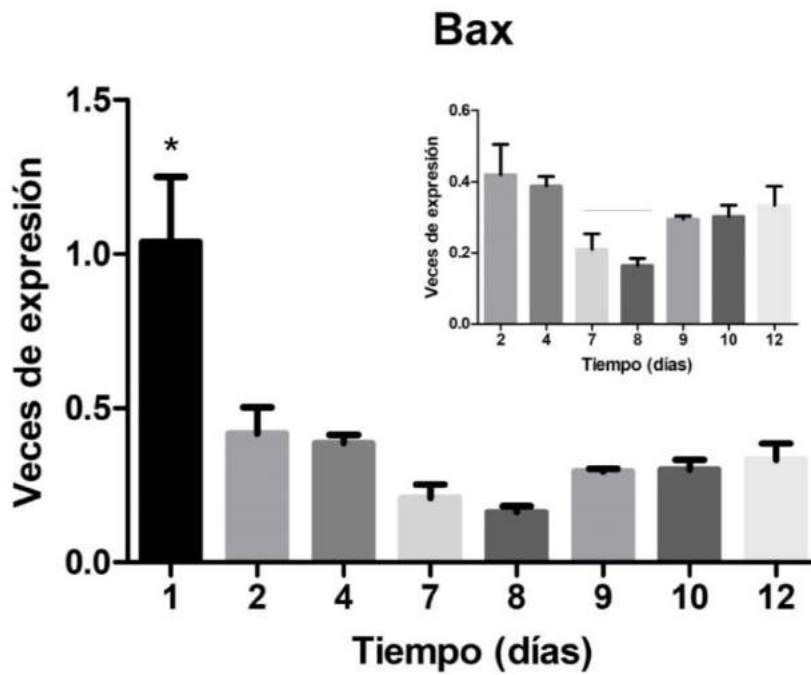


Figura 3.18: Expresión relativa del gen Bax a lo largo de los primeros 14 dpf en larvas de *A. dufresnii*, expresada como veces de expresión respecto al valor hallado en el día 1. La barra de tiempo = 4 corresponde a organismos de 4 y 6 dpf. La barra de tiempo = 12 corresponde a organismos de 12 y 14 dpf.

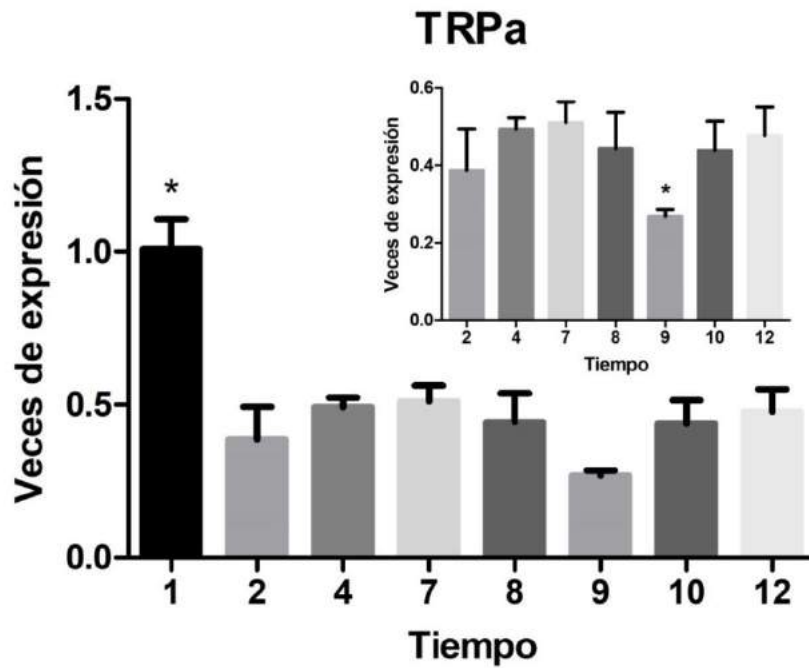


Figura 3.19: Expresión relativa del gen TRPa a lo largo de los primeros 14 dpf en larvas de *A. dufresnii*, expresada como veces de expresión respecto al valor hallado en el día 1. La barra de tiempo = 4 corresponde a organismos de 4 y 6 dpf. La barra de tiempo = 12 corresponde a organismos de 12 y 14 dpf.

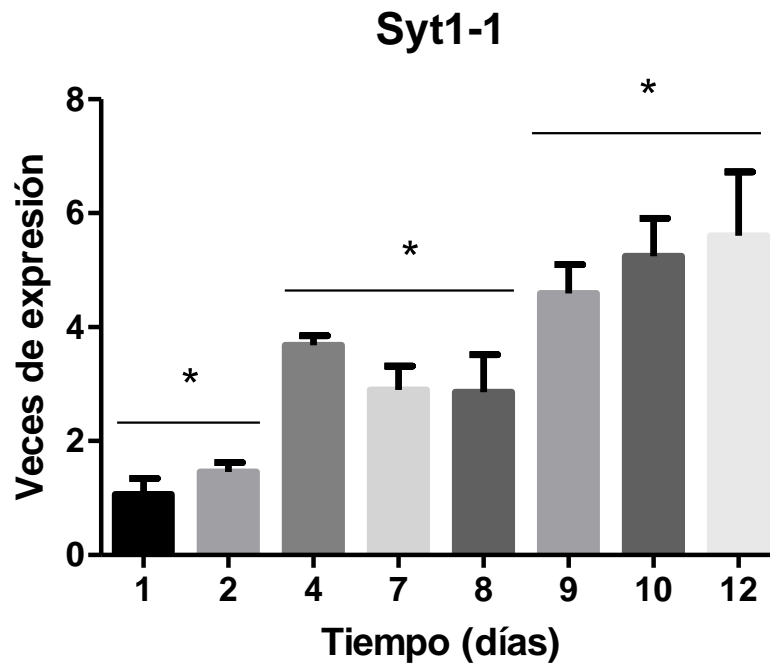


Figura 3.20: Expresión relativa del gen Syt1-1 a lo largo de los primeros 14 dpf en larvas de *A. dufresnii*, expresada como veces de expresión respecto al valor hallado en el día 1. La barra de tiempo = 4 corresponde a organismos de 4 y 6 dpf. La barra de tiempo = 12 corresponde a organismos de 12 y 14 dpf.

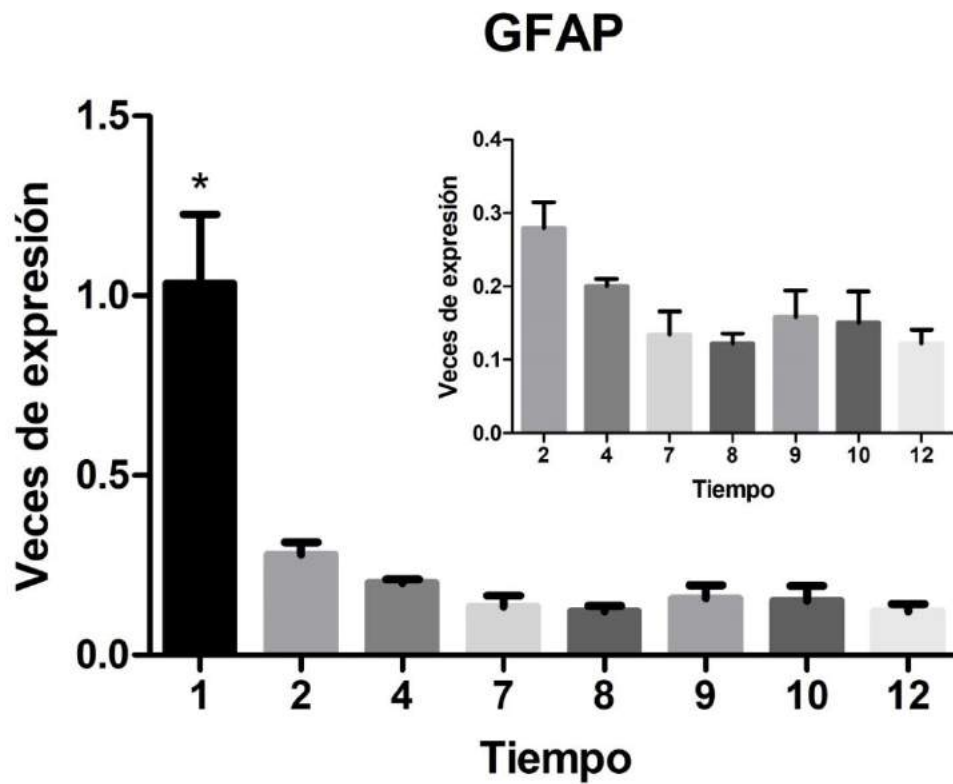


Figura 3.21: Expresión relativa del gen GFAP a lo largo de los primeros 14 dpf en larvas de *A. dufresnii*, expresada como veces de expresión respecto al valor hallado en el día 1. La barra de tiempo = 4 corresponde a organismos de 4 y 6 dpf. La barra de tiempo = 12 corresponde a organismos de 12 y 14 dpf.

Discusión del capítulo 3

A partir de la aplicación de técnicas de inmunocitoquímica y de biología molecular, fue posible describir algunos componentes del sistema nervioso durante el desarrollo de *A. dufresnii*.

La aplicación de la técnica de inmunocitoquímica requirió un protocolo adaptado a las características de organismos muy pequeños y frágiles. El protocolo desarrollado permitió una fijación suave que no altera los epítopes específicos, una inmunomarcación de buena intensidad y una manipulación delicada que preserva la estructura de los organismos. Asimismo, la inmunomarcación arrojó resultados específicos evidenciados por la ausencia de marca en todos los controles negativos realizados. Dicho protocolo se desarrolló teniendo en consideración los trabajos de otros autores en organismos similares, y por lo tanto, posee varias similitudes con los mismos (Nakano et al. 2006; Katow et al. 2010).

En larvas de *A. dufresnii*, el anticuerpo monoclonal **anti-1E11** marcó específicamente todas las estructuras neurales conocidas. Se ha descrito que este anticuerpo se une específicamente a la proteína Syt1-1, que forma parte del complejo de fusión de vesículas sinápticas dependiente de Ca^{2+} y se expresa exclusivamente en neuronas (Südhof 2002; Schwarz 2004). De esta forma, la utilización de este anticuerpo permitió marcar neuronas y describir el desarrollo del sistema nervioso de *A. dufresnii*.

En las gástrulas, el anticuerpo anti-1E11 marcó células ubicadas en el polo animal, la región de la gástrula que da origen al ectodermo. En esta región se encuentran los progenitores neurales (Gilbert 2000; Rahman et al. 2012), y por lo tanto, es esperable encontrar a la proteína Syt1-1 expresándose. Adicionalmente, esta

observación coincide con lo descrito para otros equinodermos, en donde el anticuerpo anti-1E11 también permite reconocer células durante la neurogénesis temprana (Nakajima et al. 2004a, b), que se ubican en el polo animal en el estadio de gástrula (Nakano et al. 2006).

Durante la primer semana de crecimiento larval, se observa un gran desarrollo del sistema nervioso. En particular, hay una marcación intensa en el órgano apical, que constituye el Sistema Nervioso Central del organismo, y es la principal estructura que se marca con este anticuerpo en la larva plánula. Posteriormente se observa el desarrollo de neuronas periféricas que comienzan a aparecer a lo largo del perímetro de la larva, en la banda ciliar en formación, en la zona oral, en los ganglios laterales, y en los brazos post y pre-orales. Consistentemente con lo hallado, el patrón de expresión observado coincide con lo descrito por otros autores en diferentes larvas de equinodermos tanto por las estructuras marcadas (Nakajima et al. 2004a; Burke et al. 2006b), como por la temporalidad en que aparecen (Garner et al. 2016). Adicionalmente, se ha probado que la expresión del antígeno 1E11 es específica de neuronas, y el anticuerpo utilizado presenta inmunorreactividad tanto en larvas como en adultos de todas las clases de equinodermos, hemicordados y urocordados (Nakajima et al. 2004a, b).

Durante la segunda semana del desarrollo, se observa un aumento en la inervación de las estructuras alimenticias como la boca, el esófago y el estómago. El anticuerpo anti-1E11 marca una red neuronal que envuelve dichas estructuras, y que correlaciona en posición y temporalidad con el desarrollo del tejido muscular en estos organismos (Dyachuk y Odintsova 2013). Esta correlación, probablemente indique la colonización del tubo digestivo por el sistema nervioso y la inervación de su musculatura. Cabe destacar, que esta red neuronal es la única región del sistema nervioso de la larva que se mantiene luego de la metamorfosis, y que contribuye con algunos elementos al SNE de los organismos adultos, que luego inervará el sistema digestivo (Beer et al. 2001; Mashanov et al. 2016).

Por otra parte, si bien aún no se había descrito la expresión del péptido GFSKLYFamide durante el desarrollo de los erizos de mar, en este trabajo fue posible identificar inmunorreactividad en embriones y larvas de *A. dufresnii* utilizando el anticuerpo policlonal **anti - GFSK**. Este anticuerpo fue desarrollado a partir del péptido GFSKLYFamide, aislado del tubo digestivo de organismos adultos del pepino de mar *Holothuria glaberrima* (Díaz-Miranda et al. 1992).

En los embriones en estadio de gástrula analizados, se observa que GFSKLYFamide se expresa en forma difusa alrededor de la región del arquenterón, la estructura que dará origen al tubo digestivo de la larva. Luego, durante la primer semana del desarrollo, se observa la expresión con un patrón acotado, localizándose en las estructuras en formación del Sistema Nervioso Central y Periférico de la larva, es decir, en el órgano apical, los brazos pre y post-orales y la banda ciliar. En esta etapa, se puede apreciar la expresión del péptido en las fibras del órgano apical en formación entre los 4 y 5 dpf. De manera análoga a lo observado en larvas, en los equinodermos adultos estudiados, GFSKLYFamide se expresa en las fibras y células de los cordones Ectoneural e Hiponeural, que constituyen el SNC de los individuos, y en el SNE que inerva el tubo digestivo (Díaz-Miranda et al. 1995; García-Arrarás et al. 2001; Díaz-Balzac et al. 2014).

Posteriormente, en la segunda semana del desarrollo larval, el péptido comienza a expresarse fuertemente en la región del tubo digestivo, en donde finalmente se localiza en unas pocas células con una muy alta expresión a los 12 y 14 dpf. En los equinodermos adultos, GFSKLYFamide ha sido asociado principalmente a las funciones de neuromodulación endocrina y a la transmisión neuromuscular. Por lo tanto, la localización de este péptido en una región particular del estómago de las larvas, podría indicar la participación del mismo en la señalización del sistema nervioso que inerva el estómago, coincidiendo temporalmente con el desarrollo muscular del estómago (Dyachuk y Odintsova 2013), y el aumento en la expresión de 1E11 observado en la región. O podría evidenciar la presencia de funciones neuroendócrinas en esta región específica. Una observación interesante es que la región que delimita este anticuerpo en larvas de 12 dpf, tiene cierta similitud en

tamaño y localización con la región en donde aparece el rudimento que inicia la metamorfosis del organismo. En este proceso, se ha descrito que participan señales químicas del ambiente, y que las células que forman el rudimento expresan algunas moléculas del sistema peptidérgico (Cisternas y Byrne 2003; Bishop y Brandhorst 2007; Bishop y Hall 2009).

Por último, si bien el patrón de marcación del anticuerpo anti-GFSK difiere del hallado para anti-1E11, es posible apreciar que ambos anticuerpos marcan las distintas estructuras neurales en un orden similar. Esta coincidencia posiblemente este indicando el orden en que cada una de las estructuras se desarrolla en la larva.

Si bien en los últimos años se han realizado grandes avances en la descripción de sistema nervioso de los equinodermos (Hinman y Burke 2018), aún quedan muchos interrogantes por resolver. Uno de los grandes hallazgos de la última década fue el descubrimiento de células no nerviosas de tipo glial formando parte del sistema nervioso de los equinodermos adultos, lo que constituye una de las características más importantes que los equinodermos comparten con los cordados (Mashanov et al. 2009; Rubilar 2010). Sin embargo, y a pesar de la importancia evolutiva y funcional que tiene la presencia de este tipo celular en los equinodermos, aún no se ha descrito su presencia en los estadios embrionarios y larvales.

El anticuerpo monoclonal **anti-GFAP (Glial fibrillary acidic protein)** es un marcador clásico de células gliales de mamíferos. Este anticuerpo reconoce específicamente a la proteína GFAP que forma los filamentos intermedios de tipo III. Este filamento intermedio se expresa específicamente en las células gliales, y es el responsable de mantener su morfología típica, con haces sobresalientes, que le confieren una forma estrellada (Cardone y Roots 1990). Sorprendentemente, durante el desarrollo de *A. dufresnii* estudiado en este trabajo de tesis doctoral, fue posible identificar inmunoreactividad para GFAP en embriones y larvas de *A. dufresnii*. Esta proteína se detecta en el estadio de gástrula de forma muy tenue, y a lo largo del desarrollo se hace cada vez más evidente en la zona del tubo digestivo de las larvas. Durante la segunda semana del desarrollo, la expresión aumenta hasta alcanzar un

patrón muy claro e intenso en la región de las paredes del esófago y el estómago, y en particular en las regiones de las constricciones que separan estas estructuras.

Cabe destacar que durante la segunda semana del desarrollo, la inmunomarcación de GFAP coincide en posición y temporalidad con el desarrollo del tejido muscular descrito en estos organismos (Dyachuk y Odintsova 2013), y con la inmunomarcación ya mencionada para 1E11. Sin embargo, la morfología de las células que expresan GFAP es muy diferente a la hallada para las células que expresan 1E11, por lo que es probable que se trate de tipos celulares diferentes que pertenecen al mismo tejido y que rodean al sistema digestivo. Tales características, resultan muy similares a la estructura hallada en el SNE que envuelve el sistema digestivo de los equinodermos adultos (García-Arrarás et al. 2001), y en el cual fue posible identificar células gliales formando parte del sistema nervioso (Mashanov et al. 2009). Como ya se mencionó, esta región del sistema nervioso larval no se pierde totalmente durante la metamorfosis y contribuye con algunos elementos al SNE de los organismos adultos. Esta evidencia sugiere la presencia de células gliales en las larvas de los erizos de mar en una región del sistema nervioso con características de SNE, un hecho no observado hasta la fecha en ninguna especie y que pone de manifiesto que la presencia de células gliales en el sistema nervioso de los equinodermos adultos podría tener un origen embrionario.

La inmunomarcación con el anticuerpo policlonal **anti-GFR α** , dio resultados positivos tanto en embriones como en larvas de *A. dufresnii*, localizándose en la membrana celular, y en ocasiones también en las aparentes uniones celulares. En vertebrados este anticuerpo se une específicamente a la proteína GFR α , el receptor de la vía de factores neurotróficos GFLs, que se encuentra generalmente anclado a la membrana plasmática (Paratcha et al. 2001; Serra et al. 2005).

En *A. dufresnii*, la expresión de GFR α se detecta desde el estadio de gástrula, y luego durante la primer semana del desarrollo se localiza preferentemente en la región anterior de la larva plánula y pluteus, marcando fuertemente el órgano apical, los ganglios laterales y los brazos pre y post-orales, y en menor medida el tubo

digestivo. El patrón observado para la expresión de esta proteína, coincide con las regiones en donde se encuentra el Sistema Nervioso Central y Periférico de la larva, pero delimita un territorio más amplio que el hallado con el anticuerpo anti-1E11. En vertebrados la expresión de este receptor es crucial para el desarrollo y el mantenimiento de distintas poblaciones de neuronas del Sistema Nervioso Central y del Sistema Nervioso Periférico, así como también, para la organogénesis de los riñones y la espermatogénesis (Airaksinen y Saarma 2002; Kallijärvi et al. 2012), y dada su localización en las larvas del erizo de mar podría estar cumpliendo alguna función similar.

Una observación interesante es que la expresión de esta proteína parece concentrarse en las regiones que se encuentran en activo desarrollo en *A. dufresnii*. Se puede ver fuertemente marcado el órgano apical en larvas de 2 y 3 dpf, mientras este órgano se encuentra en plena formación. También se observa una marca intensa en los brazos post-orales a partir de los 7 dpf, en donde también puede verse un gran crecimiento de esta estructura, como se indicó en el capítulo 1 de esta tesis. El patrón de expresión hallado en equinodermos, podría estar relacionado con alguna de las funciones múltiples que se le atribuyen al receptor GFR α . En vertebrados, este receptor activa cascadas intracelulares como Ras/MAP kinasa, PI3 kinasa/AKT, fosfolipasa C gama (PLC γ), Src y c-Jun N-terminal Kinasa (JNK) (Fielder et al. 2018), con funciones múltiples relacionadas al crecimiento, la modulación de la supervivencia celular, la proliferación, la diferenciación, la migración, la ramificación, la quimiotaxis y el mantenimiento de varias poblaciones de neuronas (Airaksinen et al. 1999; Airaksinen y Saarma 2002; Fielder et al. 2018).

Por último, durante la segunda semana del desarrollo larval se vuelve muy notorio el patrón diferencial de expresión de esta proteína entre el lado izquierdo y el derecho de larva. Este hecho podría indicar la presencia de mecanismos de lateralización relacionados a la expresión de GFR α y a su vía de señalización mediada por los GFLs. Este tipo de mecanismos, han sido descritos en otros organismos bilaterales (Ocklenburg y Güntürkün 2012), y se ha postulado que se encuentran conservados evolutivamente tanto en vertebrados como en equinodermos, siendo los

morfógenos WNT y Nodal los responsables de establecer dicha asimetría durante el desarrollo (Luo y Su 2012). En este contexto, es fundamental recordar que tanto WNT como Nodal y los ligandos GFLs que activan a $GFR\alpha$, pertenecen a la superfamilia de los TGF β .

La aplicación de las técnicas utilizadas de biología molecular requirió del ajuste de un protocolo para la homogenización, y un cuidadoso y eficiente procesamiento de las muestras, a fin de obtener ARN total en cantidad y calidad suficientes. La concentración de ARN obtenido y la razón de sus absorbancias evidencian que fue posible obtener ARN con una pureza aceptable y que se pudo alcanzar, en la mayoría de los casos, la concentración necesaria de ARN total para los pasos subsiguientes. Sin embargo, dadas las características de los organismos utilizados, el factor limitante para la obtención de ARN estuvo generalmente asociado a la cantidad inicial de tejido del que se disponía. Este hecho puede observarse claramente en los geles que se realizaron para el análisis de integridad de los ARN, en donde se observó una muy buena integridad de ARN, pero una baja o media concentración en la mayoría de los casos.

La estandarización de los partidores que fueron diseñados en el capítulo 2 de esta tesis doctoral, fue satisfactoria, y permitió elegir la condición de temperatura de hibridación y el par de partidores que generaron el mejor producto de PCR. Las diferencias halladas en la intensidad de los productos de PCR resultan de una combinación entre la cantidad de transcritos disponibles para dicho gen en la muestra utilizada, y la capacidad de los partidores para hibridarse con éstos y amplificar el fragmento. El cálculo de las eficiencias de los partidores fue aceptable y permitió validar el método para cuantificar los transcritos de cada gen. El análisis de la curva de disociación evidenció la especificidad de los partidores para cada gen. La única excepción fue hallada para la proteína Actina, que presentó dos picos en su curva de disociación, indicando que dichos partidores son capaces de amplificar más de una isoforma de esta proteína. Esto puede deberse a que la Actina si bien es una de las proteínas más conservadas evolutivamente (Hanukogle et al. 1983; Gunning et al.

2015), presenta muy pocas diferencias nucleotídicas entre sus distintas isoformas (Perrin y Ervasti 2010).

Por otro lado, el único gen que no fue posible amplificar con las técnicas moleculares utilizadas y los partidores diseñados fue **GFR α** . Este resultado era probable puesto que no fue posible identificar dicho gen en los transcriptomas de *A. dufresnii* disponibles, y los partidores fueron diseñados a partir de una secuencia de *S. purpuratus*. Por esta razón, existía la posibilidad de que los partidores diseñados no hibriden con especificidad con la secuencia de *A. dufresnii* debido a diferencias en su secuencia nucleotídica, algo esperable debido a la gran divergencia que se observa en este gen. Otra posibilidad que puede explicar la ausencia de amplificación, es que este gen no se encuentre activo durante los estadios larvales estudiados, y por lo tanto, no esté presente en los ARN totales extraídos. Por último, también existe la posibilidad de que este gen no esté presente en *A. dufresnii*. Sin embargo, al observar los resultados de los análisis inmunocitoquímicos para este mismo gen, lo más posible es que GFR α se encuentre presente en las larvas de *A. dufresnii* pero no se haya podido amplificar con los partidores diseñados. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que dado que el anticuerpo utilizado para detectar GFR α es policlonal, no puede descartarse que haya marcado otra proteína. A pesar de esto, las microfotografías evidencian que se trata de una marcación específica y con características coherentes con lo esperado para GFR α . Sería necesario profundizar en este estudio de este gen a fin de obtener mayor evidencia y certeza sobre la naturaleza y expresión de GFR α en esta especie.

El análisis de la expresión de los genes apoptóticos **Bcl-2** y **Bax**, mostró variaciones a lo largo del tiempo analizado. Estas variaciones pueden entenderse considerando que durante el desarrollo embrionario el fenómeno de apoptosis, tiene un rol fundamental en la morfogénesis (Penalosa et al. 2006). En los estadios tempranos del desarrollo embrionario, existe cierta protección frente a la apoptosis, que evita que los organismos tanto en condiciones normales como frente a la exposición a tóxicos nocivos, experimenten este proceso prematuramente (Vega Thurber y Epel 2007). Esta protección parece hallarse evolutivamente conservada y se extiende hasta el estadio de gástrula (Vega Thurber y Epel 2007). Luego de dicho

estadio, el fenómeno de apoptosis cobra mayor relevancia al mismo tiempo que ocurre la morfogénesis del organismo. En larvas del erizo de mar *Paracentrotus lividus*, se ha descrito que la apoptosis es un proceso fisiológico necesario para que los tejidos adquieran su forma normal, y se han identificado células apoptóticas en los brazos pre y post-orales, la banda ciliar y el estómago de larvas (Roccheri et al. 2002). Por último, durante la metamorfosis la apoptosis ocurre en forma masiva y permite la reabsorción de los tejidos de la larva para la posterior formación del individuo juvenil (Vega Thurber y Epel 2007).

Consistentemente con lo descrito, la expresión de **Bcl-2** hallada en *A. dufresnii* fue alta en el estadio de gástrula, posiblemente representando el efecto protector frente a la apoptosis en esta etapa. Luego los transcritos de este gen disminuyeron abruptamente al finalizar este estadio e iniciar el estadio de la larva plánula a los 2 dpf. Este hecho coincide con una etapa del desarrollo de grandes modificaciones morfológicas que se extiende hasta los 4 dpf, en donde la larva pluteus forma sus estructuras básicas y las principales estructuras nerviosas. A partir de este momento, la expresión de Bcl-2 presenta un aumento suave hasta los 12 dpf, con una disminución muy importante a los 8 dpf, que coincide temporalmente con el desarrollo del tubo digestivo, de su musculatura y de su inervación nerviosa.

La expresión del gen pro-apoptótico **Bax**, es alta en el estadio de gástrula mientras prevalece el efecto protector frente a la apoptosis, y luego se mantiene baja durante los estadios analizados, alcanzando un mínimo a los 8 dpf. Parece ser que la ausencia de la apoptosis durante el desarrollo temprano no se debe a una baja expresión de los genes pro-apoptóticos, sino a la presencia de los factores anti-apoptóticos como Bcl-2 (Bloom et al. 1998; Muscarella et al. 1998; Exley et al. 1999; Yabu et al. 2001). De esta forma la expresión de Bax durante este período podría no tener un efecto tan profundo como la de su par antagónico. Adicionalmente, es importante tener en cuenta que la inducción de la apoptosis es multifactorial, y por lo tanto, es el resultado de un balance entre varios factores pro y anti-apoptóticos de los cuales se han analizado solamente dos en este trabajo de tesis doctoral (Robertson et al. 2006; Polčic et al. 2015).

En *A. dufresnii*, la expresión del gen **TRPa** presentó un máximo en el estadio de gástrula y luego disminuyó a la mitad manteniéndose estable en los siguientes días analizados y observándose un mínimo a los 9 dpf. La proteína TRPa es un canal de membrana involucrado en los mecanismos de nocicepción, y en particular ésta isoforma es sensible a la temperatura y participa en el proceso de termorrecepción (Rosenzweig et al. 2005; Herrera et al. 2008). Esta proteína también ha sido observada en larvas del equinodermo *Patiria pectinifera* y se la ha asociado a la captación de estímulos térmicos con una respuesta comportamental de termotaxis positiva (Saito et al. 2017).

Dado que en los estadios larvales los organismos tienen como función principal el crecimiento y la supervivencia, resulta muy importante que desarrollen rápidamente mecanismos que les permitan censar el ambiente para adaptarse a las condiciones ambientales (Saito et al. 2017). La presencia de esta proteína desde estadios tan tempranos en larvas de equinodermos puede proporcionar una ventaja adaptativa para su supervivencia (Pechenik 1999; Saito et al. 2017). Por esta razón, el patrón observado en la cantidad de transcritos de este gen a lo largo el tiempo podría explicarse considerando la existencia de una herencia materna de los mismos que proporcione a la larva temprana los elementos necesarios para sintetizar dicha proteína. En este contexto, la disminución en los ARN de TRPa observada en *A. dufresnii* a los 2 dpf, podría indicar que los transcritos heredados han sido utilizados para la síntesis de la proteína a medida que la larva se desarrolla.

La expresión de **GFAP** obtenida en *A. dufresnii*, presenta un patrón similar al descrito para TRPa, con un máximo registrado a 1 dpf y una abrupta disminución a partir de los 2 dpf que se hace más pronunciada a los 8 dpf, y luego un leve aumento. Al igual que en el caso anterior, la proteína GFAP es específica de células diferenciadas y especializadas del sistema nervioso. En este caso, las células que expresan GFAP son de tipo glial, y como ya se mencionó, dicha proteína participa en la formación del citoesqueleto celular confiriéndole la forma clásica estrellada y permitiéndole cumplir sus múltiples funciones en el sistema nervioso (Cardone y Roots 1990).

La comparación entre la cuantificación de los ARN de GFAP y la presencia de la proteína en las inmunocitoquímicas, muestra un patrón inverso. Por ejemplo, la menor concentración de la proteína detectada por inmunocitoquímica corresponde al estadio de gástrula, periodo en donde se registró un máximo de los transcritos para la misma. Por otro lado, la mayor marcación de la proteína se observó a los 8 dpf, que coincide con el mínimo detectado para los ARN de la misma. En este contexto, resulta coherente la explicación de una herencia materna de los ARN para GFAP, en donde a partir de los 2 dpf comienzan a utilizarse para la síntesis de dicha proteína y disminuye la concentración de ARN a medida que el organismo se desarrolla. Este tipo de patrón ha sido observado para otros genes en múltiples investigaciones. Por ejemplo, se ha evidenciado que los huevos de diversas especies de vertebrados e invertebrados, poseen una carga de ARN materna de genes relacionados a cascadas biológicas y procesos específicos que son relevantes para el desarrollo embrionario (Tadros y Lipshitz 2009; Rauwerda et al. 2016; Musacchia et al. 2017).

En el capítulo 1 de esta tesis doctoral, fue posible hallar diferencias en el desarrollo larval, tanto en función de la temperatura como en función del origen maternal de los huevos utilizados. Este resultado, evidencia que en *A. dufresnii* existe una fuerte influencia materna, y los resultados de la cuantificación de ARN hallados tanto para TRPa como GFAP podrían ser ejemplos de esta herencia. Por último, también es importante destacar que debe existir, aunque en una pequeña escala, cierta síntesis larval de GFAP y de TRPa que explique el aumento en expresión que se observa luego de los 8 dpf para el gen GFAP y de los 9 dpf para el gen TRPa. Estos resultados son coherentes con otros estudios analizados, en donde se observa que durante el desarrollo gradualmente disminuye la influencia de los transcritos maternos a la vez que aparece la expresión endógena del embrión (Tadros y Lipshitz 2009).

Por último, la cuantificación de la expresión del gen **Syt1-1** obtenida en *A. dufresnii*, mostró un aumento en tres etapas a lo largo del tiempo, con valores mínimos en el estadio de gástrula y 2 dpf, valores que triplican la expresión entre los 4 y 8 dpf y valores que quintuplican la expresión entre los 9 y 12 dpf. Este patrón de

expresión concuerda con la aparición de la proteína Syt1-1 evidenciada en las inmunocitoquímicas (anticuerpo anti-1E11), en donde la intensidad de la inmunomarcación es creciente y presenta las mismas tres etapas a lo largo del desarrollo.

Por lo tanto, en vista del patrón de expresión de ARN observado para el gen Syt1-1 que tiene directa relación con la aparición de la proteína Syt1-1 en embriones y larvas, y en concordancia con el desarrollo de su sistema nervioso, podemos concluir que la expresión de este gen ocurre de forma endógena en los organismos a medida que se desarrollan y no parece ser heredado de la madre como ocurre con los genes GFAP y TRPa.

Conclusiones del capítulo 3

Utilizando inmunocitoquímica de fluorescencia indirecta se pudo identificar y caracterizar el desarrollo del sistema nervioso en larvas de *A. dufresnii*:

1. El anticuerpo monoclonal anti- 1E11 marcó todas las estructuras neurales esperadas, coincidiendo en temporalidad, localización y morfología con descripciones previas realizadas en otras especies de equinoideos.

2. El anticuerpo policlonal anti- GFSK permitió identificar expresión del péptido GFSKLYFamide en el Sistema Nervioso Central y Periférico larval, lo que representa la primer evidencia de su presencia en los estadios larvales de los equinodermos.

3. El anticuerpo monoclonal anti-GFAP permitió identificar células que expresan GFAP, una proteína glial específica, en células cuya morfología y localización coincide con las características de las células gliales. Estos resultados representan la primer evidencia de su presencia en los estadios larvales de los equinodermos.

4. El anticuerpo policlonal anti-GFR α permitió identificar al receptor de los factores neurotróficos GFLs, en embriones y larvas. La expresión de esta proteína coincide con las regiones del Sistema Nervioso Central y Periférico de las larvas, pero delimita un territorio más amplio, y presenta un patrón diferencial de expresión entre el lado izquierdo y el derecho de la larva.

Los partidores diseñados en el capítulo 2 de esta tesis permitieron amplificar satisfactoriamente todos los genes candidatos propuestos en larvas de *A. dufresnii*, a excepción de GFR α y Actina. En el caso GFR α , los partidores no amplificaron ningún transcrito, y en caso de Actina, los partidores no resultaron específicos para una sola isoforma de la proteína.

La expresión de los genes apoptóticos Bcl-2 y Bax, presentó variaciones a lo largo del tiempo analizado en larvas de *A. dufresnii*, que se pueden correlacionar con eventos del desarrollo larval.

La expresión de los genes TRPa asociado a la captación de estímulos térmicos, y GFAP asociado al fenotipo glial, junto a la inmunomarcación de la proteína GFAP, y los resultados hallados sobre crecimiento larval en el capítulo 1 de esta tesis, sugieren que en *A. dufresnii* existe una fuerte herencia maternal, y que estos genes podrían ser ejemplos de dicho fenómeno.

La expresión creciente del gen Syt1-1, asociado al fenotipo neuronal, y la aparición creciente de su proteína asociada, sugieren que en larvas de *A. dufresnii*, ocurre una expresión *de novo* de este gen.

Capítulo 4:
El efecto de los Factores
Neurotróficos en el desarrollo y la
regeneración de larvas de *Arbacia*
dufresnii

Introducción del capítulo 4

Factores neurotróficos en la filogenia

En el tejido nervioso, las redes de neuronas se encuentran altamente interconectadas, y requieren de señales intercelulares para su correcto funcionamiento. Los neurotransmisores, las hormonas y los factores neurotróficos participan en la comunicación entre neuronas y entre éstas con otros tipos celulares. Las interacciones tróficas son importantes para la generación y el mantenimiento del sistema nervioso, y repercuten tanto en los aspectos estructurales como en los comportamientos generados (Von Bartheld 2006).

Actualmente, se sabe que los factores neurotróficos cumplen funciones importantes en la ontogenia del sistema nervioso, es decir, en el desarrollo y la maduración de éste. Las investigaciones de las últimas décadas permitieron el descubrimiento de una gran cantidad de factores neurotróficos (Von Bartheld 2006). Sin embargo, se ha avanzado muy poco en el estudio de la historia evolutiva de estas moléculas y en los roles que pudieron tener en el desarrollo de circuitos neuronales complejos a lo largo de la filogenia, y por lo tanto del comportamiento (Von Bartheld 2006).

A partir de los estudios realizados sobre las acciones de la neurotrofina NGF (factor de crecimiento nervioso) en la ontogenia, se postuló que las interacciones tróficas facilitaron la especiación a lo largo de la filogenia (Purves 1988). En concordancia con esto, se observó que los factores neurotróficos que aparecieron tardíamente en la evolución, como por ejemplo NGF, tendían a estar asociados a sistemas y poblaciones neuronales filogenéticamente nuevos, como la nocicepción y el

Sistema Simpático (Barde 1994). Por otra parte, el estudio de la presencia y la evolución de los factores neurotróficos GFLs (Ligandos de la Familia de Factores Neurotróficos Derivados de las Células Gliales) a lo largo de la filogenia de los vertebrados parece indicar que la aparición de los distintos ligandos de los GFLs y sus receptores está relacionada con el surgimiento secuencial de los distintos componentes del Sistema Nervioso Autónomo (SNA) (Airaksinen et al. 2006).

La secuenciación de genomas de organismos no vertebrados realizados en las últimas décadas, ha aportado información muy valiosa para el entendimiento de la aparición y evolución de estas moléculas. Algunos investigadores han demostrado que al igual que en los vertebrados, el sistema nervioso de los invertebrados utiliza factores neurotróficos, y anticipan que muchos de éstos aún no han sido identificados (Von Bartheld 2006).

En los invertebrados deuterostomados *Saccoglossus kowalevskii* (Hemicordado) y *Strongylocentrotus purpuratus* (equinodermo), se encuentran presentes los genes ortólogos para las neurotrofinas y sus receptores (Bothwell 2006). Más relevante aún en términos evolutivos, es el hallazgo de esta familia de factores neurotróficos en el invertebrado protostomado *Lymnaea stagnalis* (molusco gasterópodo), un organismo que presenta un sistema nervioso complejo (Van Kesteren et al. 1998; Hamakawa et al. 1999); así como también, la reciente identificación y caracterización en el protostomado *D. melanogaster* de las neurotrofinas 1, 2 (DNT1 y DNT2) y Spatzle, homólogas de las neurotrofinas de vertebrados (Zhu et al. 2008), y de la proteína D-Manf, homóloga de la familia de factores neurotróficos de mamíferos CDNF/MANF (Palgi et al. 2009; Lindholm y Saarma 2010).

Por otra parte, las investigaciones *in silico* realizadas en genomas de organismos no vertebrados, indican la presencia de genes ortólogos para GFR α , el receptor de los factores neurotróficos GFLs, en invertebrados deuterostomados como el urocordado *Ciona intestinalis*, el equinodermo *S. purpuratus*, y el hemicordado

Branchiostoma floridae; y en los invertebrados protostomados *D. melanogaster*, *Apis mellifera* y *C. elegans* (Airaksinen et al. 2006; Hättinen et al. 2007).

Estos descubrimientos apoyan la teoría de que la señalización mediada por factores neurotróficos apareció más temprano en la evolución de los metazoos de lo que se creía antiguamente, y que éstos existían previo a la separación entre los grupos de protostomados y deuterostomados (Von Bartheld 2006).

GFLs, GFR α y RET en la filogenia

En vertebrados, las acciones de los GFLs son cruciales para el desarrollo y el mantenimiento de distintas poblaciones de neuronas del Sistema Nervioso Central y del Sistema Nervioso periférico, así como también, para la organogénesis de los riñones y la espermatogénesis (Airaksinen y Saarma 2002; Kallijärvi et al. 2012). Estos ligandos ejercen sus acciones a partir de la unión a su receptor GFR α y luego a su receptor transmembrana RET o NCAM (Airaksinen y Saarma 2002).

Con el surgimiento de los vertebrados aparecieron las células de la cresta neural, un tipo celular exclusivo de estos organismos y del cual se desarrollan múltiples estructuras (Myers et al. 2018). Coincidiendo con esta aparición, ocurrió una expansión génica de los receptores GFR α s, duplicándose en dos ocasiones para dar lugar a cuatro receptores diferentes GFR α^1 - GFR α^4 (Airaksinen et al. 2006; Hättinen et al. 2007; Kallijärvi et al. 2012).

Por otra parte, en algunos invertebrados se han hallado ortólogos de los genes RET y GFR α , y hasta hace muy poco se creía que en estos organismos funcionaban independientemente entre sí, con GFR α actuando a través de las moléculas FasII y NCAM (Kallijärvi et al. 2012), y RET activado por integrinas (Soba et al. 2015). Sin embargo, recientemente se encontró evidencia que sugiere que estas proteínas podrían actuar en conjunto, al igual que ocurre en los vertebrados (Myers et al. 2018).

En *Drosophila melanogaster* se ha descrito un ortólogo muy conservado del gen RET, denominado D-Ret (Hahn y Bishop 2001a). La expresión de este gen se registró en los órganos reproductores femenino y masculino (Kallijärvi et al. 2012); en los túbulos de Malpighi, una estructura equivalente a los riñones de vertebrados; y en los progenitores neurales que formarán el Sistema Nervioso Estomatogástrico (Hahn y Bishop 2001; Perea et al. 2017), un sistema equivalente al Sistema Nervioso Entérico (SNE) de los vertebrados. Además, se ha determinado experimentalmente que la pérdida de función para el gen RET resulta en graves defectos que afectan la fertilidad de los organismos, y en la inervación nerviosa del sistema digestivo. En este último caso, se observan movimientos peristálticos insuficientes para el correcto funcionamiento del sistema digestivo (Myers et al. 2018).

Luego de los hallazgos *in silico* de la presencia de algunas secuencias génicas de GFR α en invertebrados (Airaksinen et al. 2006; Hätingen et al. 2007), en *D. melanogaster* se ha confirmado experimentalmente la presencia de este gen, denominado D-Gfrl (*Drosophila* GFR α like) (Hernández et al. 2015). Asimismo, se ha encontrado evidencia de que al igual que ocurre en vertebrados, D-Gfrl podría funcionar asociándose a D-Ret, ya que la pérdida de función de este gen presenta el mismo tipo de defectos que la pérdida de función de D-Ret (Myers et al. 2018).

El último de los componentes de este sistema de señalización corresponde a los ligandos GFLs, que han sido descritos exitosamente desde los peces cartilaginosos hasta los mamíferos. Sin embargo, no se conoce aún con exactitud el ancestro, perteneciente a la superfamilia de los TGF β , del cual esta familia de genes ha evolucionado (Airaksinen et al. 2006; Hätingen et al. 2007). Sin embargo, recientemente en *D. melanogaster* se identificó un gen perteneciente a esta superfamilia denominado Maverick (Mav), el cual se cree que podría funcionar como ligando de D-Gfrl y D-Ret, ya que las deficiencias de este gen provocan el mismo fenotipo en el Sistema Nervioso Estomatogástrico que el encontrado en los casos de pérdida de función de D-Gfrl y D-Ret (Myers et al. 2018). En conjunto, estos hallazgos revelan importantes similitudes en la estimulación trófica del Sistema Nervioso Estomatogástrico de insectos y el SNE de vertebrados (Myers et al. 2018).

Debido a que los componentes del complejo GFLs/GFR α /RET se han hallado en organismos tan distantes filogenéticamente como vertebrados e insectos, se cree que los ligandos y receptores Ret y Gfrl aparecieron temprano en la evolución de los metazoos y que los distintos componentes de esta vía podrían haber co-evolucionado antes de la separación de los linajes de protostomados y deuterostomados (Myers et al. 2018).

Sin embargo, aún se conoce muy poco sobre las funciones de este complejo en la mayoría de los organismos no cordados, y los avances en el estudio en otros invertebrados podrían ampliar el panorama descrito hasta la fecha. En especial la investigación de estas proteínas en organismos pre-cordados como los equinodermos y los hemicordados, que se encuentran en una posición intermedia entre los vertebrados y los invertebrados protostomados, podrían aportar importante información que permita una comprensión más profunda del origen y la evolución de esta familia de factores neurotróficos.

Importancia del complejo GFLs/GFR α -RET en el Sistema Nervioso Entérico

En los vertebrados, el SNE comienza a formarse durante el desarrollo embrionario a partir de las células de la cresta neural que migran, proliferan y se diferencian (Le Douarin y Teillet 1973, 1974; Pomeranz et al. 1991; Serbedzija et al. 1991). Inicialmente estas células son pluripotentes, pero una vez inmersas en el microambiente del tracto digestivo, detienen su proliferación y comienzan a diferenciarse en neuronas entéricas y células gliales (Le Douarin et al. 1975). Los factores de crecimiento y la matriz extracelular, constituyen las señales que regulan estos fenómenos de migración, proliferación, supervivencia y diferenciación celular a los linajes específicos (Gershon 1997; Heuckeroth et al. 1998).

En mamíferos, la descripción de la expresión del receptor de membrana tirosina quinasa RET, en la población de células de la cresta neural que migra hacia el tracto digestivo y da origen a las neuronas del SNE y glía, data de la década del '90 (Pachnis et al. 1993). Posteriormente, en investigaciones con ratones *knock out* para el gen RET se observó que éstos carecían de neuronas entéricas en gran parte de su sistema digestivo, concluyendo que la señalización de este receptor es determinante para el desarrollo normal del SNE (Enomoto et al. 1998; Rossi et al. 1999).

En vertebrados la expresión del receptor GFR α también se ha descrito a lo largo del tracto digestivo y se lo asocia al desarrollo de dichas neuronas del SNE (Widenfalk et al. 1997). Una vez diferenciados los precursores del SNE, la expresión de RET se mantiene en el linaje neuronal pero desaparece en las células gliales (Heuckeroth et al. 1998).

Adicionalmente, se ha documentado que las deficiencias en algunos miembros de la familia de ligandos GFLs (GDNF, NRTN, PSPN y ARTN), generan fenotipos similares a los hallados en ratones *knock out* para el gen RET. Por ejemplo, en ratones mutantes para el gen de GDNF se observa que carecen de neuronas entéricas en gran

parte de su sistema digestivo (Moore et al. 1996; Pichel et al. 1996; Sánchez et al. 1996). Asimismo, en experimentos *in vitro* con células precursoras entéricas de rata, se ha demostrado que la adición del ligando GDNF al medio de cultivo incrementa la supervivencia y la proliferación de las mismas, dando como resultado una mayor cantidad de células neuronales y glía. En presencia de GDNF o NRTN, éstas células se agrupan formando ganglios y forman una extensa red de neuronas y glía interconectadas (D'Anglemont de Tassigny et al. 2015).

Se ha demostrado que la molécula **LY294002** (Figura 4.1), es capaz de inhibir selectivamente la fosforilación de PI3K, uno de los segundos mensajeros de la vía activada tanto por GDNF como por NRTN (Worley et al. 2000; Chen et al. 2001; Huang et al. 2017). En experimentos *in vitro* e *in vivo*, realizados sobre células nerviosas de mamíferos, la adición de GDNF o NRTN estimula la expresión de ciertos genes específicos como por ejemplo GLAST-1, TRPa, Mrg, así como también de su receptor de membrana GFR α (Luo et al. 2007; Koeberle y Bähr 2008). Sobre estas células, la adición del inhibidor LY294002 parece no tener efecto, por sí sólo sobre la expresión génica. Sin embargo, la adición de LY294002 junto a los factores GDNF o NRTN, deja sin efecto a estos últimos en las células tratadas. Así LY294002 inhibe específicamente la cascada intracelular de señalización mediada por GDNF y NRTN, convirtiéndolo en una herramienta útil para la comprensión de los mecanismos de acción de ambos factores (Koeberle y Bähr 2008).

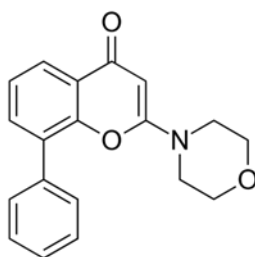


Figura 4.1: Estructura del inhibidor LY294002.

En conjunto, estos hallazgos han demostrado que la vía de señalización mediada por los ligandos GFLs (GDNF y NRTN), sus receptores específicos GFR α , el receptor transmembrana RET y la cascada intracelular mediada por PI3K, están involucrados en algunas de las señales necesarias durante la formación y organización del SNE de vertebrados. La adición de los ligandos GDNF y NRTN estimula la diferenciación a los fenotipos entéricos en los precursores de la cresta neural y la adición de LY294002 inhibe los efectos neurotróficos de estos factores (Koeberle y Bähr 2008).

Por otra parte, a partir de la evidencia hallada en estudios filogenéticos, se ha postulado que una de las funciones más primitivas de la familia de los GFLs parece estar relacionada al desarrollo del SNE, más específicamente a través de la acción de GDNF, quien parece ser el ligando más antiguo. Los equinodermos, carecen de células de la cresta neural y sus derivados, pero poseen un sistema nervioso complejo con muchas similitudes al SNE de vertebrados (García-Arrarás et al. 2001).

Adicionalmente, en los estadíos larvales de los equinodermos algunas de las neuronas que inervan el tubo digestivo tienen un origen diferente al resto de las células nerviosas y además, se conservan durante la metamorfosis para luego formar parte del SNE de los organismos adultos (Plexo basiepitelial) (Beer et al. 2001; Wei et al. 2011; Mashanov et al. 2016). Esta pequeña población de células con características tan exclusivas, recuerda a los precursores entéricos hallados en vertebrados y por lo tanto resulta de especial interés para el estudio de la expresión del complejo GFLs-GFR α -RET y sus funciones en el desarrollo de este sistema.

La regeneración y los factores neurotróficos

La regeneración es el proceso por el cual frente a un daño los organismos son capaces de volver a desarrollar nuevamente tejidos y órganos en un contexto de tejidos maduros. Este fenómeno está ampliamente distribuido pero no uniformemente presente a lo largo del reino animal (Alvarado y Tsonis 2006).

A pesar de que el mecanismo de reparación de una herida es común a todos los organismos, la recuperación funcional y morfológica de dicha zona no es igual en todos los metazoos (Carlson 2007). Esto se debe a que el potencial regenerativo se expresa de forma diferente en los distintos organismos, e inclusive varía a lo largo de la vida de los mismos (Alvarado y Tsonis 2006).

Las estrategias de regeneración incluyen una reorganización de los tejidos pre-existentes, la utilización de las células madre somáticas, la des-diferenciación, en la que una célula pierde sus características tejido-específicas y se vuelve indiferenciada, y/o la trans-diferenciación, en la que una célula diferenciada se des-diferencia y luego se diferencia en una célula de diferente linaje (Alvarado y Tsonis 2006).

La regeneración en invertebrados se conoce desde hace más de 200 años (Lenhoff 1986). Debido a que en un organismo las partes del cuerpo regeneradas son idénticas a las que se formaron durante el desarrollo embrionario, se ha postulado que todos los animales comparten un conjunto finito de mecanismos pleiotrópicos de desarrollo (Carroll et al. 2005), y que durante la regeneración, se vuelve a acceder a algunos de estos mecanismos embriológicos que determinaron la formación del cuerpo (Alvarado y Tsonis 2006). Estas evidencias indican que existe una conservación en la filogenia de los mecanismos de señalización del desarrollo, y que estos mecanismos pueden ser activados por procesos no relacionados al desarrollo embrionario, tales como la amputación de una extremidad.

Si bien estos procesos aún no se comprenden en profundidad, se ha descrito en múltiples organismos que la importancia del sistema nervioso en la producción de

neuropéptidos y factores neurotróficos es esencial para que este proceso ocurra (Brookes 1997; Ferretti y Géraudie 1998). En este contexto y en reiteradas ocasiones durante la regeneración, se han hallado activas las vías de señalización de Wnt, BMP, TGF β (transforming growth factor- β) y FGF, actuando no sólo como moduladores de la diferenciación de los tejidos regenerados, sino también participando de la inducción del proceso regenerativo (Alvarado y Tsonis 2006). El avance en la comprensión de los mecanismos involucrados en esta activación, podría aclarar las diferencias y las similitudes que existen entre el desarrollo embrionario y la regeneración.

Los equinodermos se destacan por su gran capacidad regenerativa, tanto durante los estadios larvales como en los juveniles y adultos. Esta capacidad les permite reemplazar tejidos adultos y larvales que se han perdido producto de una lesión o una amputación, proporcionándoles una mayor supervivencia (Vickery y McClintock 1998; Thorndyke y Candia Carnevali 2001; Candia Carnevali y Bonasoro 2001; Mashanov et al. 2015), e incluso este mecanismo puede ser utilizado como una estrategia de reproducción asexual (Vickery y McClintock 2000; Eaves y Palmer 2003; Rubilar et al. 2005; Vaughn y Strathmann 2008).

A pesar de la extensa evidencia histológica y celular que describe el fenómeno de regeneración en esta familia, aún no se conocen en profundidad las moléculas y los mecanismos regulatorios involucrados en este fenómeno (Patrino et al. 2002). Al igual que en otros organismos, se ha descrito que en los equinodermos adultos, el sistema nervioso desempeña un rol vital en la regeneración (Mashanov et al. 2008, 2015; San Miguel-Ruiz et al. 2009). Durante este proceso, el tejido nervioso libera factores regulatorios que actúan tanto en forma paracrina como autocrina y que son cruciales para que la regeneración tisular suceda (Patrino et al. 2001, 2002; Thorndyke et al. 2001; Candia Carnevali 2006).

Algunos miembros de la superfamilia de los TGF β se han hallado en los estadios larvales de los equinodermos (Patrino et al. 2002). Por ejemplo, en estadios embrionarios de equinoideos los miembros de esta familia han sido asociados al establecimiento temprano de patrones de formación (Stenzel et al. 1994; Hwang et al.

2003; Hinman y Burke 2018). Los TGF β están involucrados en una amplia gama de procesos incluyendo la proliferación celular, la diferenciación neuronal, la apoptosis, el establecimiento de patrones axiales, la cicatrización y la reorganización de los tejidos (Kingsley 1994; Raftery y Sutherland 1999), y se los ha descrito como importantes candidatos durante las etapas tempranas y avanzadas del proceso de regeneración en equinodermos (Candia Carnevali et al. 1998; Patruno et al. 2001, 2002).

En crinoideos adultos de la especie *Antedon mediterránea*, perteneciente al phylum Echinodermata, se describió la presencia de moléculas de la familia de los TGF β en los tejidos nerviosos, tanto en condiciones normales como durante la regeneración de sus brazos. En ambas condiciones se detectó una forma inmadura o pro-péptido, y una forma madura de la proteína. Durante la regeneración, se registró que la expresión de la forma madura y de su receptor aumentan considerablemente, y además aparece la expresión de otra isoforma de esta superfamilia (Patruno et al. 2002). Estas evidencias sugieren que en los equinodermos, los miembros de la familia de los TGF β podrían tener un rol en el mantenimiento normal de los tejidos, y una participación relevante en la regulación del proceso de regeneración que explique los cambios observados en su expresión (Patruno et al. 2002).

En este contexto, resulta relevante el estudio de la participación de los factores neurotróficos GFLs, miembros de la familia de los TGF β , así como también de la expresión de su receptor GFR α , tanto en condiciones de estimulación e inhibición farmacológica de esta vía de señalización, como durante la regeneración de sus tejidos dañados. Por lo tanto, los objetivos específicos de este capítulo son: A) Estudiar el efecto y establecer la expresión de los genes de interés luego de la adición de activadores e inhibidores del complejo GFLs/GFR α /RET en larvas de *A. dufresnii* en desarrollo. B) Estudiar el efecto de la adición de activadores del complejo GFLs/GFR α /RET en larvas de *A. dufresnii* durante la regeneración de su tejido.

Materiales y métodos del capítulo 4

Experimentos de activación e inhibición farmacológica de la vía de los GFLs

A fin de estudiar el efecto de la adición de activadores e inhibidores de la vía de señalización GFLs/GFR α /RET en larvas de *A. dufresnii* en desarrollo, se aplicó el diseño experimental explicado a continuación, y se estudió la expresión de proteínas marcadores del sistema nervioso por inmunocitoquímica, y la expresión de los genes seleccionados en el capítulo 2 de esta tesis.

Diseño experimental

Se realizó una fecundación siguiendo el protocolo descrito en el capítulo 1. A fin de asegurar un buen acervo genético de la población estudiada de *A. dufresnii*, se utilizó una mezcla de gametas femeninas de 20 hembras, y se fecundó con una mezcla de gametas masculinas de 20 machos. Larvas de 7 dpf fueron incubadas durante 24 h en agua de mar filtrada con la adición de los siguientes tratamientos farmacológicos:

- I) Control: Sin adición de factores al agua de mar filtrada.
- II) LY294002 20 μ M, Inhibidor del segundo mensajero PI3K, que se encuentra río abajo de los GFLs. (Worley et al. 2000).
- III) GDNF 10 ng/ml, miembro y activador de la vía de señalización GFL (Tang et al. 1998).
- IV) GDNF 10 ng/ml + LY294002 20 μ M.
- V) NRTN 10 ng/ml, miembro y activador de la vía de señalización GFL (Wang et al. 2002).
- VI) NRTN + LY294002 20 μ M.

Transcurrido el tiempo de exposición, se eliminó el tratamiento farmacológico realizando tres recambios del 50% del medio líquido por agua de mar filtrada a $1\mu\text{m}$ y esterilizada con luz UV. Se tomaron muestras de 1000 larvas para los siguientes ensayos a las 24, 48 y 72 horas post tratamiento (hpt).

Inmunocitoquímica de fluorescencia indirecta

Las muestras tomadas para esta técnica se procesaron siguiendo el protocolo de *Fijación para Inmunocitoquímica* (Anexo del capítulo 3), y se almacenaron en frío hasta su uso. Se realizó la técnica de inmunocitoquímica de fluorescencia indirecta doble combinando los anticuerpos primarios anti-GFR α con anti-1E11 y anti-GFR α con anti-GFAP, según el *Protocolo de Inmunocitoquímica* (Anexo del capítulo 3). Se observaron y fotografiaron los preparados utilizando un microscopio Leica DM2500.

Cuantificación de la expresión génica

Para los análisis de expresión génica se tomaron tres alícuotas de 1000 larvas cada una, para cada tratamiento y para cada tiempo de muestreo. Las muestras se fijaron con solución *ARN hold* (*Transbionovo*) y se conservaron a 4°C durante los primeros 15 días, para luego congelarlas con nitrógeno líquido 10 seg. y almacenarlas a -80°C hasta su utilización.

La cuantificación de la expresión de génica se realizó siguiendo los pasos 2 a 7 que fueron descritos en el capítulo 3 (sección 3.3 de materiales y métodos). En esta oportunidad, no fue necesario realizar la estandarización y la eficiencia de los partidores dado que se trabajó con los mismos partidores y con muestras biológicas similares. La expresión relativa de los genes de interés en los distintos tratamientos fue normalizada respecto a la expresión del mismo gen hallada en el tratamiento control a las 24 hpt.

Para analizar las diferencias en la expresión relativa de cada gen en cada tratamiento y tiempo de muestreo, se corroboraron los supuestos de normalidad y homocedacia (Zar 1984). Luego se realizó un análisis de la varianza de dos vías,

transformando los valores a escala logarítmica. Las diferencias fueron evaluadas con la prueba de Tukey (Zar 1984). Para una mejor interpretación de los gráficos, éstos se presentan sin escala logarítmica.

Experimentos de regeneración con exposición farmacológica a activadores de la vía GFLs

A fin de estudiar el efecto de la adición de los ligandos del complejo GFLs/GFR α /RET en larvas de *A. dufresnii* durante la regeneración de su tejido, se practicaron microablaciones en las larvas. Para ello, se aplicó el diseño experimental de regeneración y se fotografiaron y analizaron los organismos por inmunocitoquímica.

Obtención de larvas y estadio larval utilizado

Para llevar a cabo los experimentos se utilizaron larvas pluteus de entre 6 y 8 dpf, obtenidas con el protocolo desarrollado en el capítulo 1 de esta tesis.

Protocolo de micromanipulación de larvas

A fin de generar una microablación en las larvas pluteus y estudiar el proceso de regeneración, se desarrolló y aplicó el siguiente protocolo. El objetivo del mismo, es generar una lesión o ablación de aproximadamente 10 μm , ubicada en la base de uno de los brazos post-orales. Cabe destacar que el método debe asegurar la supervivencia de las larvas para así poder estudiar el proceso de regeneración posterior.

Pasos del protocolo de microablación:

1. Se selecciona una larva pluteus bajo lupa utilizando una «pipeta de boca» artesanal. Esta herramienta, construida a partir de elementos comunes del laboratorio, permite la selección rápida y micromanipulación de las larvas sin generar ningún perjuicio a las mismas (Figura 4.2, A).
2. Se coloca la larva sobre una superficie de gel de agarosa en PBS al 5%. Esta superficie no es tóxica y permite sostener e inmovilizar a la larva de forma reversible, además de mantenerla hidratada durante la microablación. El gel se encuentra previamente humedecido en agua de mar y Cl_2Mg 5% que cumple la función de anestésico, aletargando al organismo y presumiblemente disminuyendo su percepción nerviosa durante la microablación, como recomiendan Rubilar y Crespi-Abril (2017). Este gel se prepara previo a la experimentación y se gelifica sobre un cubreobjetos que luego es montado sobre un portaobjetos (Figura 4.2, B, C).
3. Se coloca el portaobjetos con el gel y la larva en la platina del microscopio óptico, se posiciona en el sitio de ablación la micropipeta de vidrio TIP10TW1 (Marca WPI), y se succiona suavemente. Esta micropipeta es dirigida por un micromanipulador que permite un movimiento de precisión en los tres ejes espaciales, y además se encuentra conectada a un sistema de succión hidráulico artesanal, el cual genera presión negativa permitiendo la succión a través de la micropipeta. Por último, se retira suavemente la micropipeta del preparado (Figura 4.3).
4. Se retira el portaobjetos del microscopio y se sumerge el cubreobjetos con el gel y la larva en un recipiente con agua de mar. Se observa bajo lupa que el organismo vuelva a nadar libremente para corroborar la supervivencia del mismo a esta intervención (Figura 4.4, A).
5. Se coloca a la larva en una microplaca con agua de mar y con la adición de su tratamiento correspondiente (Figura 4.4, B).

El protocolo de microablación de larvas es una técnica con una alta dificultad técnica y en un día laboral es posible realizar la microablación exitosa de un máximo de 10 larvas. Debido a que para poder determinar la expresión génica en larvas de esta especie, el protocolo de extracción de ARN total del que se dispone requiere de un mínimo de entre 1000 y 2000 larvas por réplica, como se detalló en el capítulo 3 de

esta tesis, la regeneración de las larvas se estudió mediante micro fotografías de campo claro y técnicas inmunocitoquímicas.

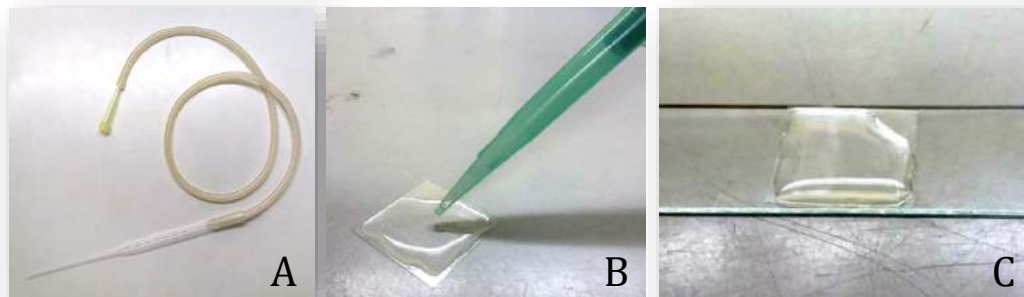


Figura 4.2: Elementos necesarios para llevar a cabo la micromanipulación. A) Pipeta de boca. B) Preparación de gel de agarosa en un cubreobjetos. C) Cubreobjeto sobre un portaobjeto listo para colocar las larvas pluteus.



Figura 4.3: Equipamiento para realizar la microablación. A) Disposición del equipamiento necesario, (1). Microscopio Leica M2500 con cámara digital conectada a PC. (2). Micromanipulador analógico montado en un pie estativo con movilidad en los ejes Z, X e Y. (3). Sistema de succión hidráulico artesanal construido a partir de una jeringa cuyo embolo es dirigido por una rosca. (4). Software Leica para observar y realizar la microablación. B) Detalle de Micromanipulador. C) Detalle del sistema de succión. D) Aguja de vidrio de 10 μm de diámetro (TIP10TW1 marca WPI).

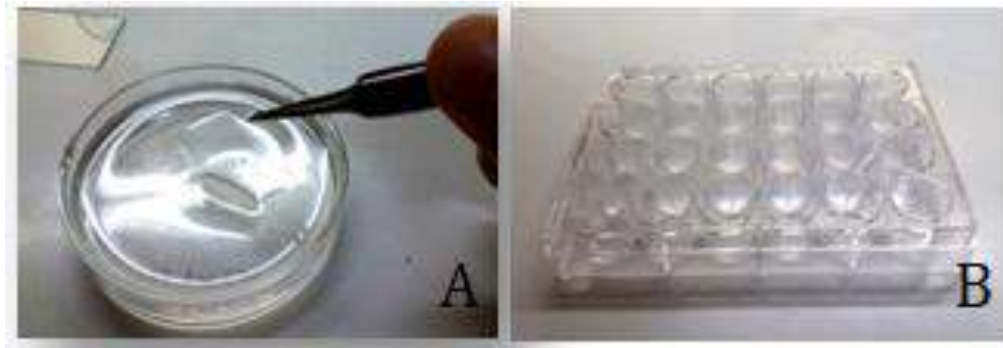


Figura 4.4: A) Recuperación de larvas en agua de mar. B) Micro placa para incubar a las larvas con los distintos tratamientos.

Diseño experimental para la activación farmacológica durante la regeneración

Luego de la microablación, las larvas fueron incubadas durante 24 h con los siguientes tratamientos:

1. Control: larva sin microablación en agua de mar
2. Regeneración: larva con microablación en agua de mar
3. Control + GDNF: larva sin microablación y factor neurotrófico GDNF
4. Regeneración + GDNF: larva con microablación y factor GDNF
5. Control + NRTN: larva sin microablación y factor neurotrófico NRTN
6. Regeneración + NRTN: larva con microablación y factor NRTN

Transcurrido el tiempo de exposición, se eliminó el factor trófico realizando tres recambios del 50% del medio líquido por agua de mar filtrada. Se fotografiaron las larvas a las 0, 24, 48 y 72 hpt (horas post tratamiento).

Inmunocitoquímica

Se fijaron para Inmunocitoquímica tres réplicas de 15 larvas cada una para los tratamientos I a VI, a las 24, 48 y 72 hpt. Se realizaron inmunocitoquímicas de fluorescencia doble combinando los anticuerpos primarios anti-GFR α con anti-1E11. Se siguieron los pasos descritos en el “Protocolo de Inmunocitoquímica” (Anexo del capítulo 3). Se observaron y fotografiaron los preparados utilizando en microscopio Leica DM2500, y se valoró cualitativamente el patrón e intensidad de la marca correspondiente.

Resultados del capítulo 4

Experimentos de activación e inhibición de la vía de los GFLs

*Inmunomarcación de GFR α y Syt1-1 en larvas de *A. dufresnii* tratadas farmacológicamente*

El **tratamiento I**, correspondiente a larvas control y posterior inmunocitoquímica doble, muestra un patrón similar al hallado para los mismos antígenos en las inmunocitoquímicas simples del capítulo 3 de esta tesis doctoral, en larvas de igual etapa del desarrollo (8 a 10 dpf). GFR α se expresa en el órgano apical, en la zona del estómago, en los ganglios laterales y en los extremos de los brazos pre y post-orales. Además, se observa el patrón diferencial de expresión entre los lados derecho e izquierdo de la larva. El antígeno 1E11, correspondiente al gen Syt1-1, en esta etapa del desarrollo comienza a expresarse claramente en las células de las paredes del tubo digestivo, en particular en las regiones de las constricciones entre la boca, el esófago y el estómago (Figura 4.5).

En el **tratamiento II**, correspondiente a larvas con adición del inhibidor LY294002, se observó una disminución en la expresión de GFR α entre las 24 y 72 hpt y una localización puntual de la marca que puede apreciarse a las 72 hpt y que difiere del patrón control descrito para esta proteína. Por otra parte, la expresión de 1E11 se mantuvo sin alteraciones (Figura 4.6).

En el **tratamiento III**, correspondiente a larvas con adición de GDNF, se observó nuevamente un cambio en el patrón de GFR α , que presenta un aumento en su expresión en los brazos pre-orales asociado a una morfología atípica en dicha zona. 1E11 también mostró un incremento en su expresión en las zonas del órgano apical y

el estómago, y comenzó a expresarse muy fuertemente en un conjunto de células en forma de anillo en la base del estómago (Figura 4.7).

En el **tratamiento IV**, correspondiente a larvas con adición de GDNF e Inhibidor LY294002, se observó un cambio morfológico muy importante con la formación de un surco en la zona del estómago a las 72 hpt. El patrón de expresión de GFR α se modificó, siendo muy tenue a las 24 hpt y luego se incrementó a las 48 y 72 hpt, principalmente en la zona de los brazos pre y post-orales y en la región del surco. El patrón de expresión de 1E11 se modificó levemente, manteniéndose en el órgano apical, y aumentando en la zona del estómago y en el surco (Figura 4.8).

En el **tratamiento V**, correspondiente a larvas con adición de NRTN, se observó un patrón de GFR α inicialmente similar al control y luego un cambio en su expresión a las 72 hpt en donde se hace predominante en los brazos pre-orales y luego en los extremos de todos los brazos y en la zona del estómago. El patrón de expresión de 1E11 cambió a lo largo del tiempo, siendo normal a las 24 hpt y luego concentrándose en los ganglios laterales y muy notoriamente en el estómago a las 48 y 72 hpt (Figura 4.9).

En el **tratamiento VI**, correspondiente a larvas con NRTN e inhibidor LY294002, se observó la expresión de GFR α a las 24 hpt en los brazos de la larva con algunas células y fibras más fuertemente marcadas. A las 48 y 72 hpt se observó una concentración de la expresión en la región del estómago y órgano apical. La expresión de 1E11 fue muy alta en el órgano apical a las 24 hpt y luego aumentó en la zona del estómago a las 72 hpt (Figura 4.10).

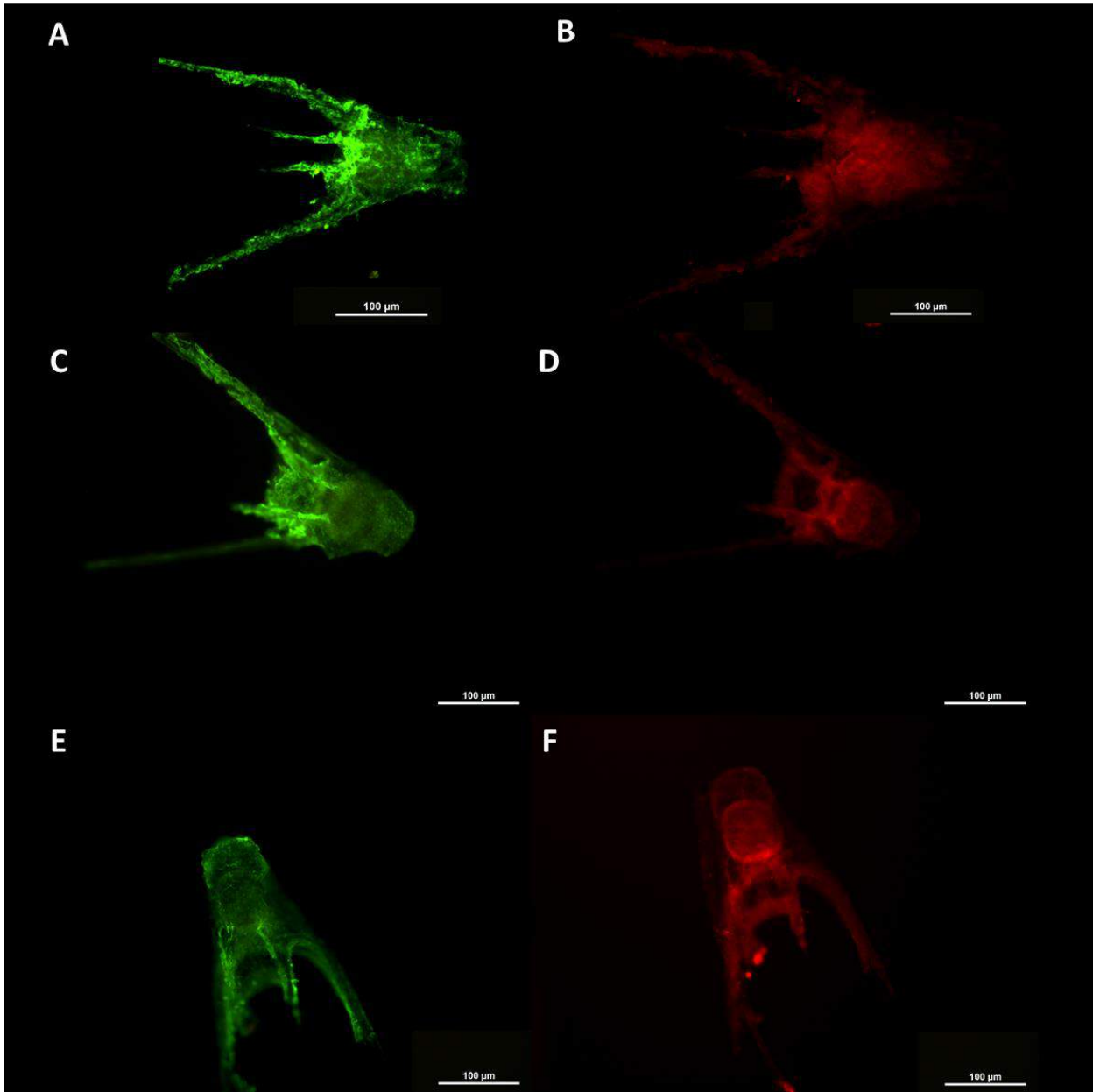


Figura 4.5: Tratamiento I Control. Inmunocitoquímica de fluorescencia doble en larvas de *A. dufresnii* con el anticuerpo anti-GFR α - Cy2 (verde) y anti-1E11 - Cy3 (rojo). Observe el patrón típico de expresión de cada antígeno a las 24 (A y B), 48 (C y D) y 72 hpt (E y F).

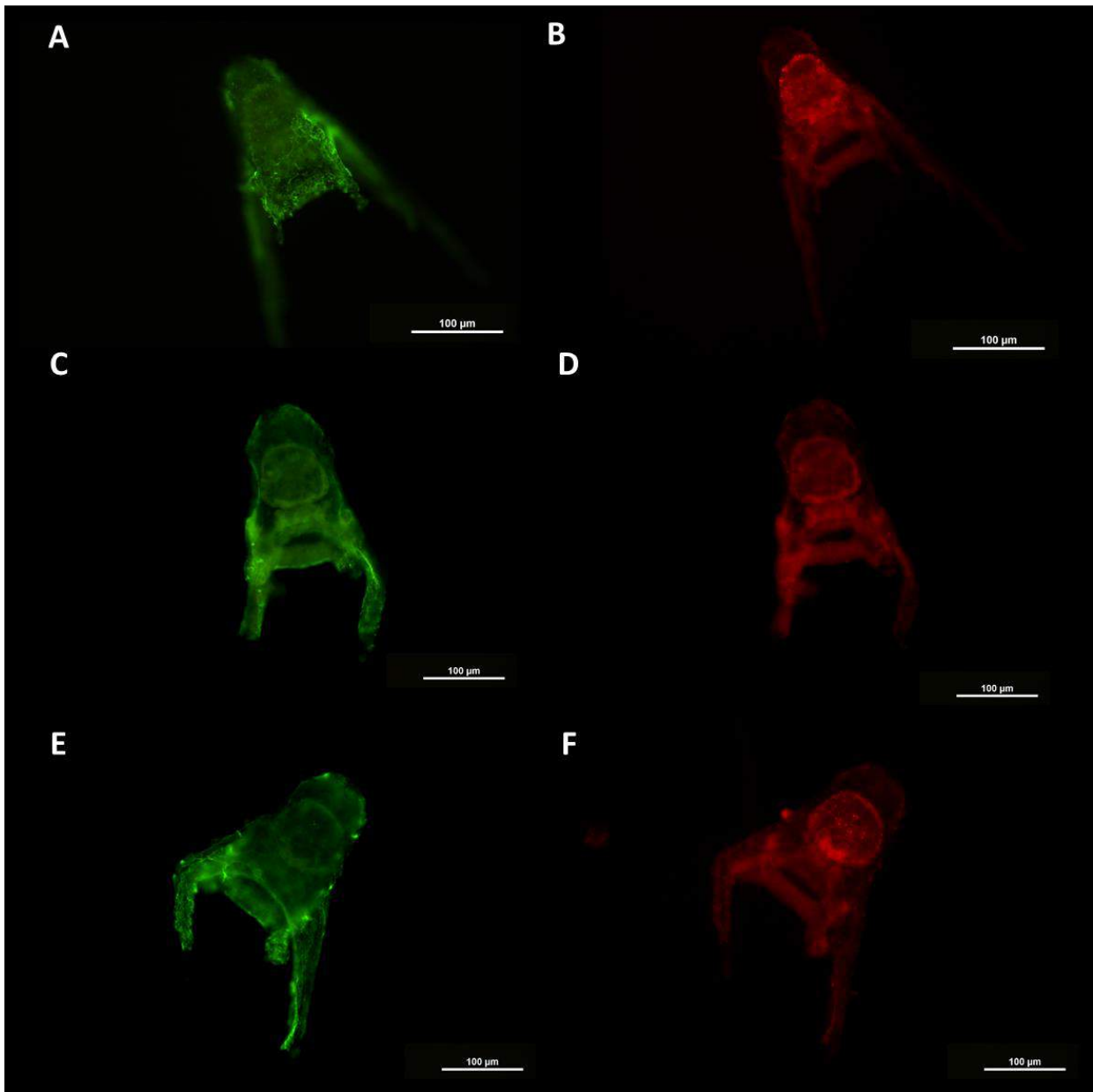


Figura 4.6: Tratamiento II con inhibidor LY294002. Inmunocitoquímica de fluorescencia doble en larvas de *A. dufresnii* con el anticuerpo anti-GFR α - Cy2 (verde) y anti-1E11 - Cy3 (rojo) a las 24 (A y B), 48 (C y D) y 72 hpt (E y F). Observe la disminución en la marca de GFR α a las 24 y 48 hpt, y su localización puntual a las 72 hpt. Observe como se mantiene el patrón de 1E11.

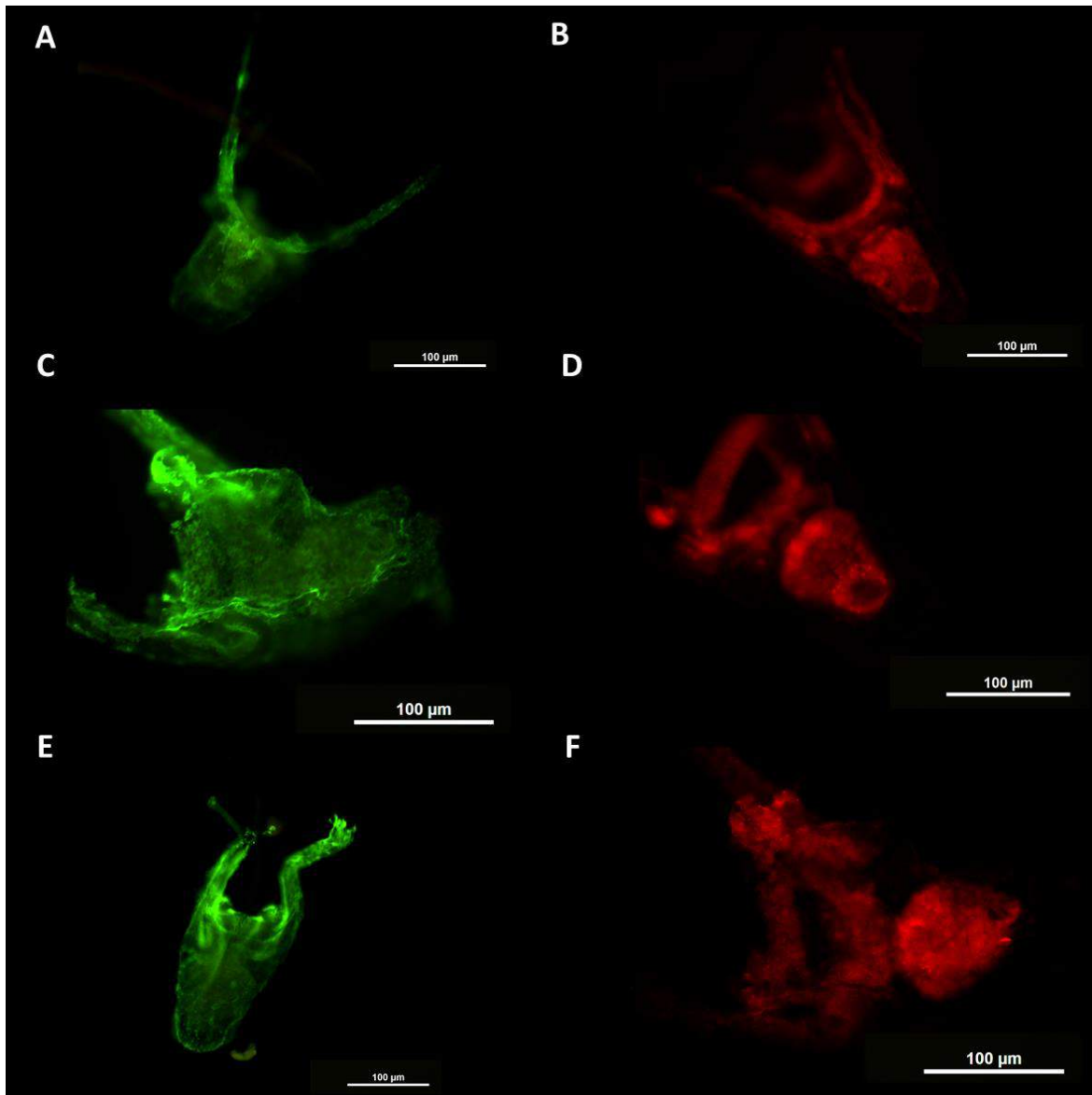


Figura 4.7: Tratamiento III con GDNF. Inmunocitoquímica de fluorescencia doble en larvas de *A. dufresnii* con el anticuerpo anti-GFR α - Cy2 (verde) y anti-1E11 - Cy3 (rojo) a las 24 (A y B), 48 (C y D) y 72 hpt (E y F). Observe como se modifica el patrón de expresión de GFR α (A, C y E), y se profundizan las protuberancias de los brazos preorales (C). Observe el incremento de 1E11 en el órgano apical y la zona digestiva (B, D y F), en particular, la aparición de marca en un grupo de células en la base del estómago (D).

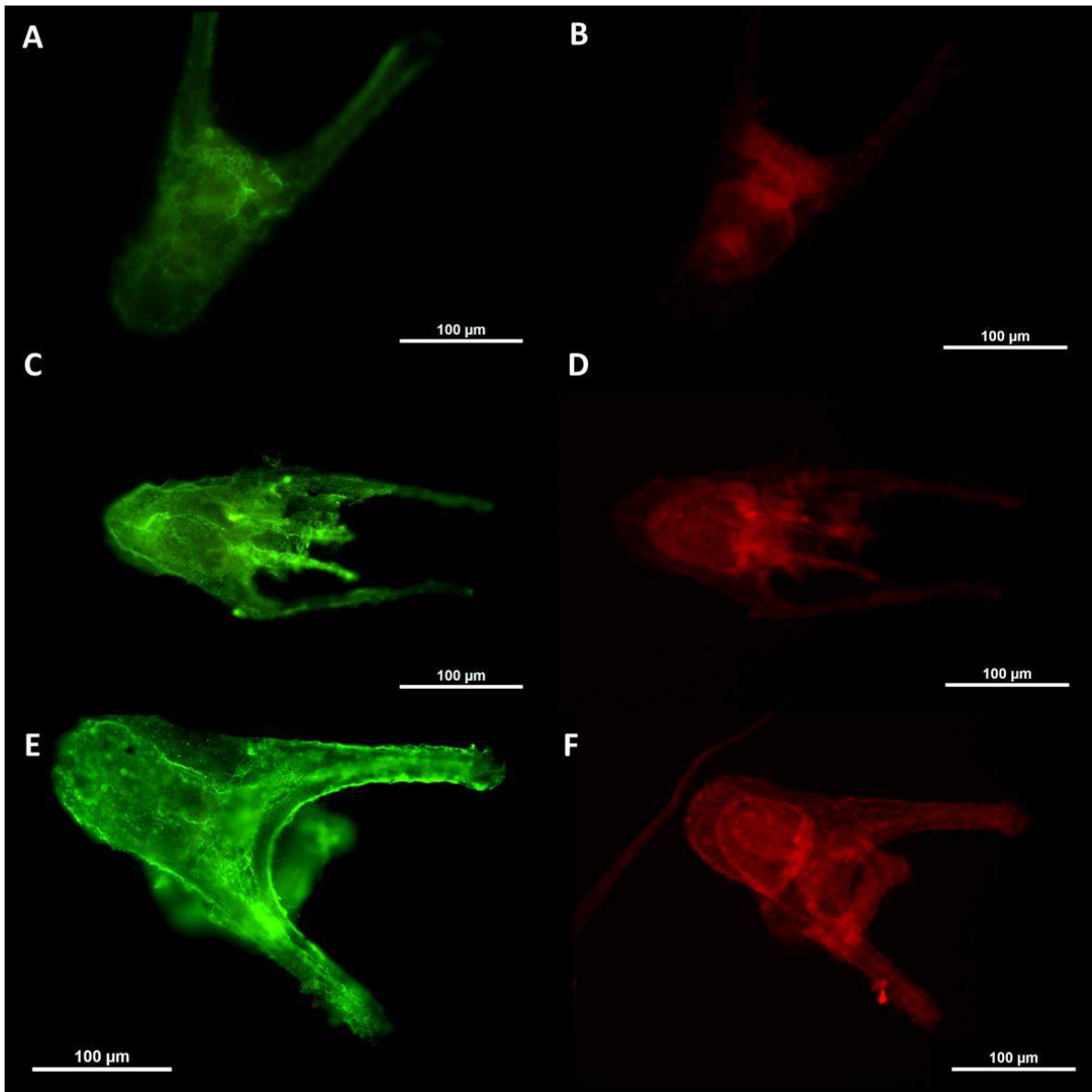


Figura 4.8: Tratamiento IV con GDNF + inhibidor LY294002. Inmunocitoquímica de fluorescencia doble en larvas de *A. dufresnii* con el anticuerpo anti-GFR α - Cy2 (verde) y anti-1E11 - Cy3 (rojo) a las 24 (A y B), 48 (C y D) y 72 hpt (E y F). Observe el cambio en el patrón de expresión de GFR α , con baja señal a las 24 hpt (A), y luego un gran aumento localizado en los brazos post y pre-orales, y en un surco anómalo en la zona del estómago (C y E). El patrón de expresión de 1E11 se mantiene en el órgano apical (B, D) y se incrementa en la zona digestiva y en la zona del surco mencionado (D y F).

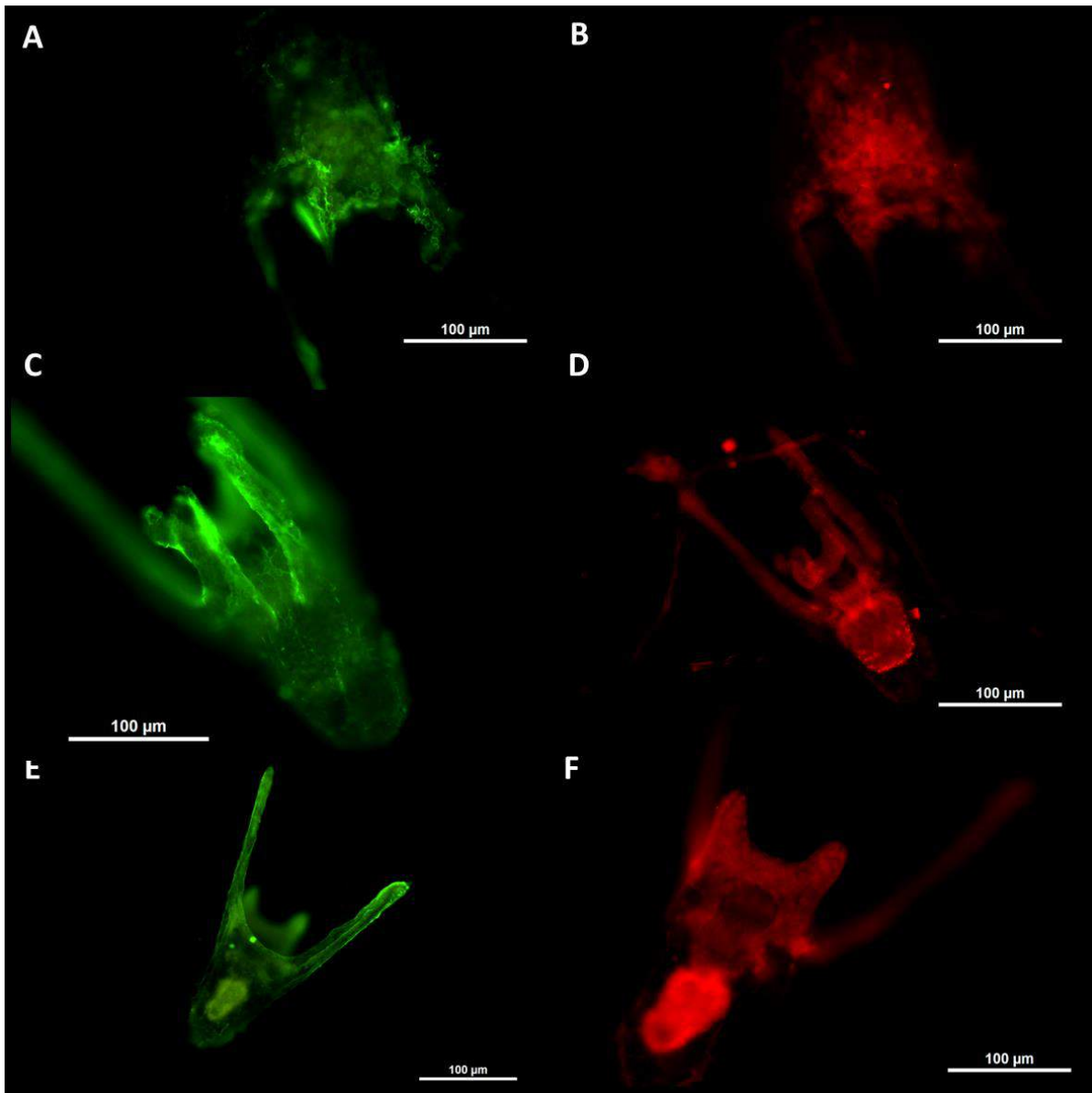


Figura 4.9: Tratamiento V con NRTN. Inmunocitoquímica de fluorescencia doble en larvas de *A. dufresnii* con el anticuerpo anti-GFR α - Cy2 (verde) y anti-1E11 - Cy3 (rojo) a las 24 (A y B), 48 (C y D) y 72 hpt (E y F). El patrón de expresión de GFR α inicialmente se mantiene similar al control (A y C) y luego cambia concentrándose en los extremos de los brazos y en la zona del estómago (E). El patrón de expresión de 1E11 a las 24 hpt es similar al control (B), y luego comienza a concentrarse en la zona baja del estómago y ganglios laterales (D) hasta alcanzar una muy alta concentración a las 72 hpt (F).

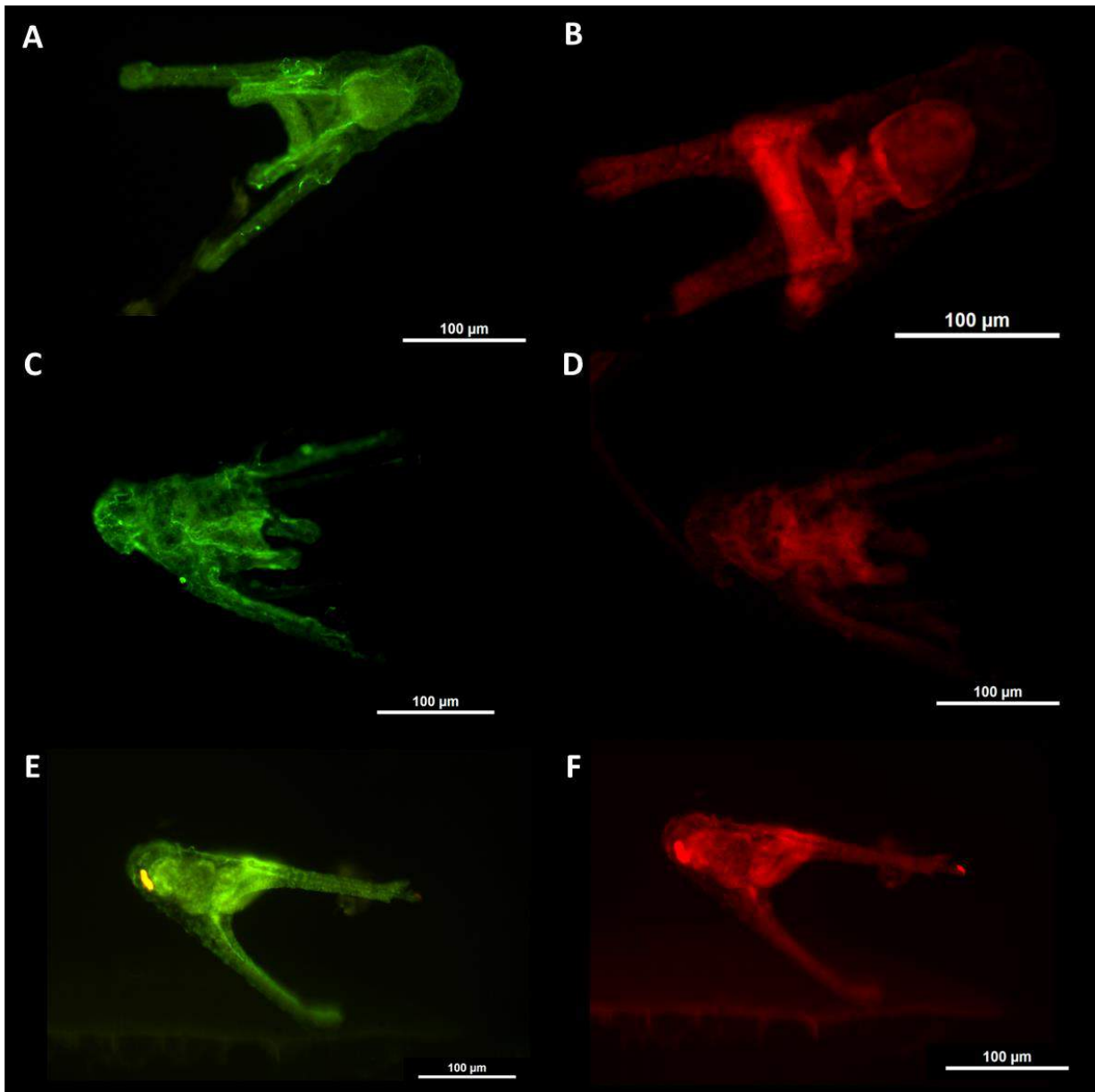


Figura 4.10: Tratamiento VI con NRTN + inhibidor LY294002. Inmunocitoquímica de fluorescencia doble en larvas de *A. dufresnii* con el anticuerpo anti-GFR α - Cy2 (verde) y anti-1E11 - Cy3 (rojo) a las 24 (A y B), 48 (C y D) y 72 hpt (E y F). Observe el patrón de expresión de GFR α con una concentración de la expresión en la región del estómago y el órgano apical (C) que se profundiza a las 72 hpt (E). Observe el aumento en la expresión de 1E11 en el órgano apical y en la inervación del tubo digestivo (B, D, y F).

*Inmunomarcación de GFR α y GFAP en larvas de *A. dufresnii* tratadas farmacológicamente*

El **tratamiento I**, correspondiente a larvas control y posterior inmunocitoquímica doble con anti-GFR α y anti-GFAP, mostró un patrón similar al hallado para los mismos antígenos en las inmunocitoquímicas simples del capítulo 3 de esta tesis. GFR α se expresó en el órgano apical, la zona del estómago y en mayor grado en los brazos pre y post-orales presentando diferencias entre el lado izquierdo y derecho de la larva. GFAP se expresó predominantemente en la zona del estómago y el esófago, en células que presentaron una morfología estrellada que recuerda a la glía radial (Figura 4.11).

En el **tratamiento II**, correspondiente a larvas con adición del inhibidor LY294002, la expresión de GFR α aumentó levemente en la región del estómago. La expresión GFAP disminuyó inicialmente y luego se restableció a las 72 hpt. Sin embargo, se observó un cambio importante en las células marcadas con GFAP que se concentraron en el estómago, y no desarrollaron su morfología típica estrellada (Figura 4.12).

En el **tratamiento III**, correspondiente a larvas con adición de GDNF, se observó nuevamente un cambio en el patrón de GFR α , que presentó un aumento en su expresión en la zona del estómago y brazos pre-orales, y perdió su disparidad entre el lado izquierdo y derecho a partir de las 48 hpt. La expresión de GFAP se mantuvo similar al control pero aumentó la intensidad de la marca, en particular en la zona de la constricción entre el estómago y el esófago (Figura 4.13).

En el **tratamiento IV**, correspondiente a larvas con adición de GDNF e Inhibidor LY294002, se observó una disminución muy pronunciada de la expresión de GFR α a las 24 hpt, que luego se incrementó a las 72 hpt generando un patrón fragmentado a lo largo del perímetro de la larva. La expresión de GFAP se observó muy reducida a las 24 hpt y luego aumentó concentrándose en un pequeño grupo de células en el estómago que no desarrollaron la forma estrellada típica (Figura 4.14).

En el **tratamiento V**, correspondiente a larvas con adición de NRTN, se observó una expresión de GFR α concentrada en los brazos pre-orales, los ganglios laterales, el órgano apical y levemente en el estómago. La expresión de GFAP se observó preferentemente en el órgano apical y muy concentrada en unas pocas células en el estómago en donde la mayoría no desarrolla su forma típica estrellada (Figura 4.15).

En el **tratamiento VI**, correspondiente a larvas con NRTN e inhibidor LY294002, se observó una expresión de GFR α reducida, que a las 24 hpt se localizó en un pequeño grupo de células en la zona del estómago, a las 48 hpt se localizó en los brazos pre-orales y a las 72 hpt en los brazos post-orales, expresándose en algunas células y fibras fuertemente marcados La expresión de GFAP también se observó reducida y localizada preferentemente en el esófago. En este caso, las células que expresaron GFAP no desarrollaron su morfología radial típica a las 48 hpt, pero recuperaron parcialmente su morfología a las 72 hpt. (Figura 4.16).

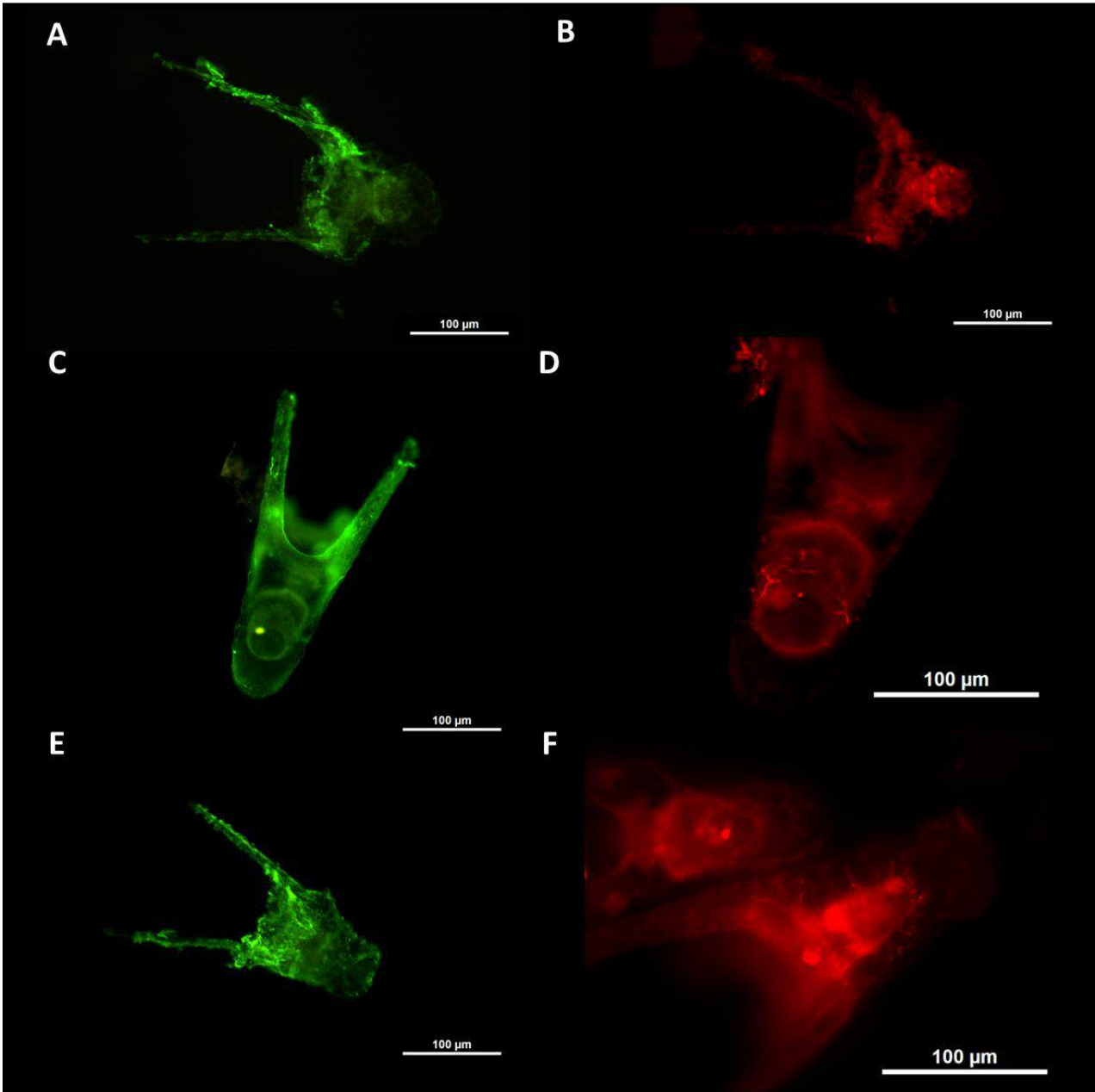


Figura 4.11: Tratamiento I Control. Inmunocitoquímica de fluorescencia doble en larvas de *A. dufresnii* con el anticuerpo anti-GFR α - Cy2 (verde) y anti-GFAP - Cy3 (rojo) a las 24 (A y B), 48 (C y D) y 72 hpt (E y F). Observe el patrón típico de expresión de GFR α , y la expresión normal de GFAP en la región del esófago y estómago.

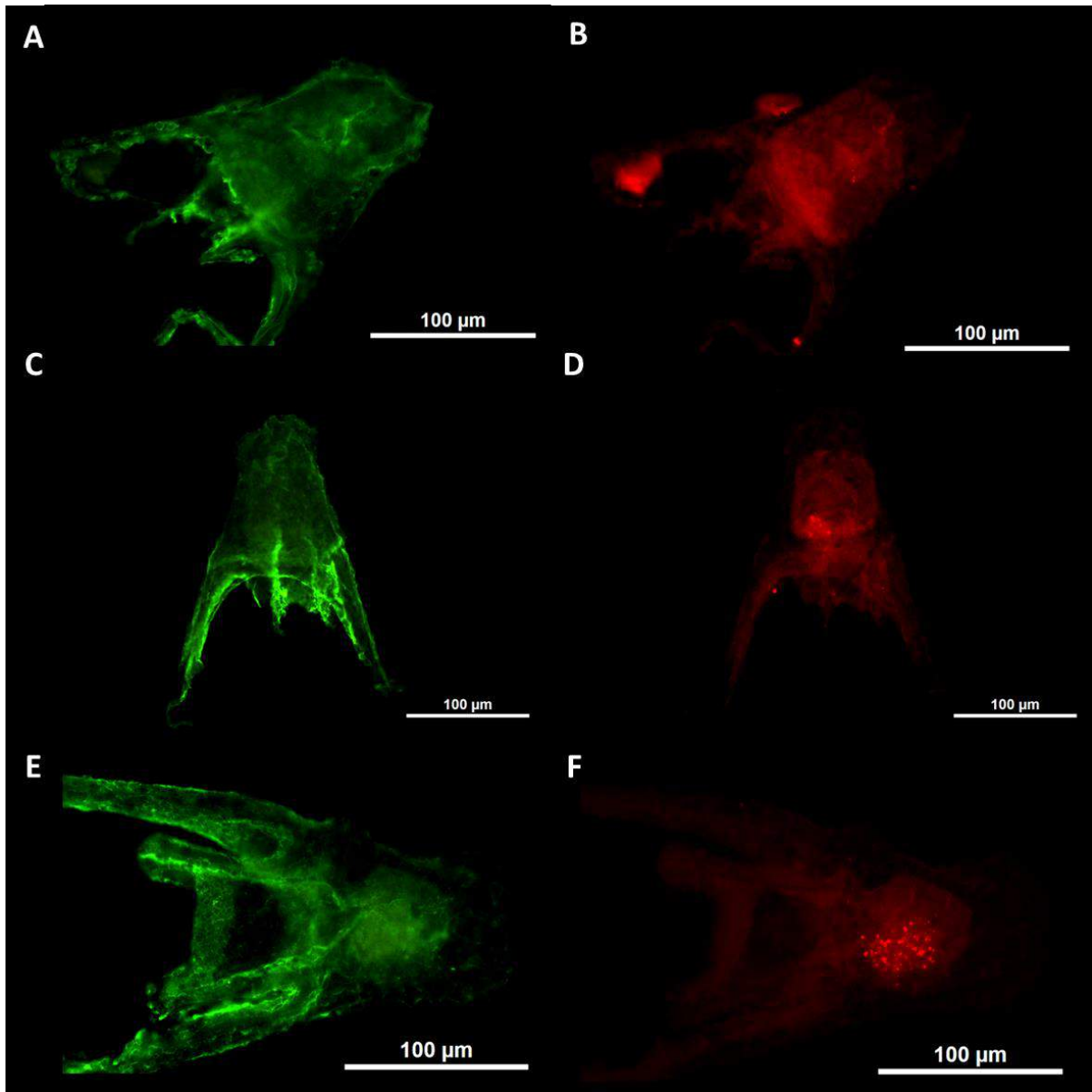


Figura 4.12: Tratamiento II con inhibidor LY294002. Inmunocitoquímica de fluorescencia doble en larvas de *A. dufresnii* con el anticuerpo anti-GFR α - Cy2 (verde) y anti-GFAP - Cy3 (rojo) a las 24 (A y B), 48 (C y D) y 72 hpt (E y F). La expresión de GFR α se mantiene similar al control con un aumento leve en el estómago. La expresión de GFAP se concentra muy fuertemente en unas pocas células del estómago, las cuales pierden su morfología radial típica.

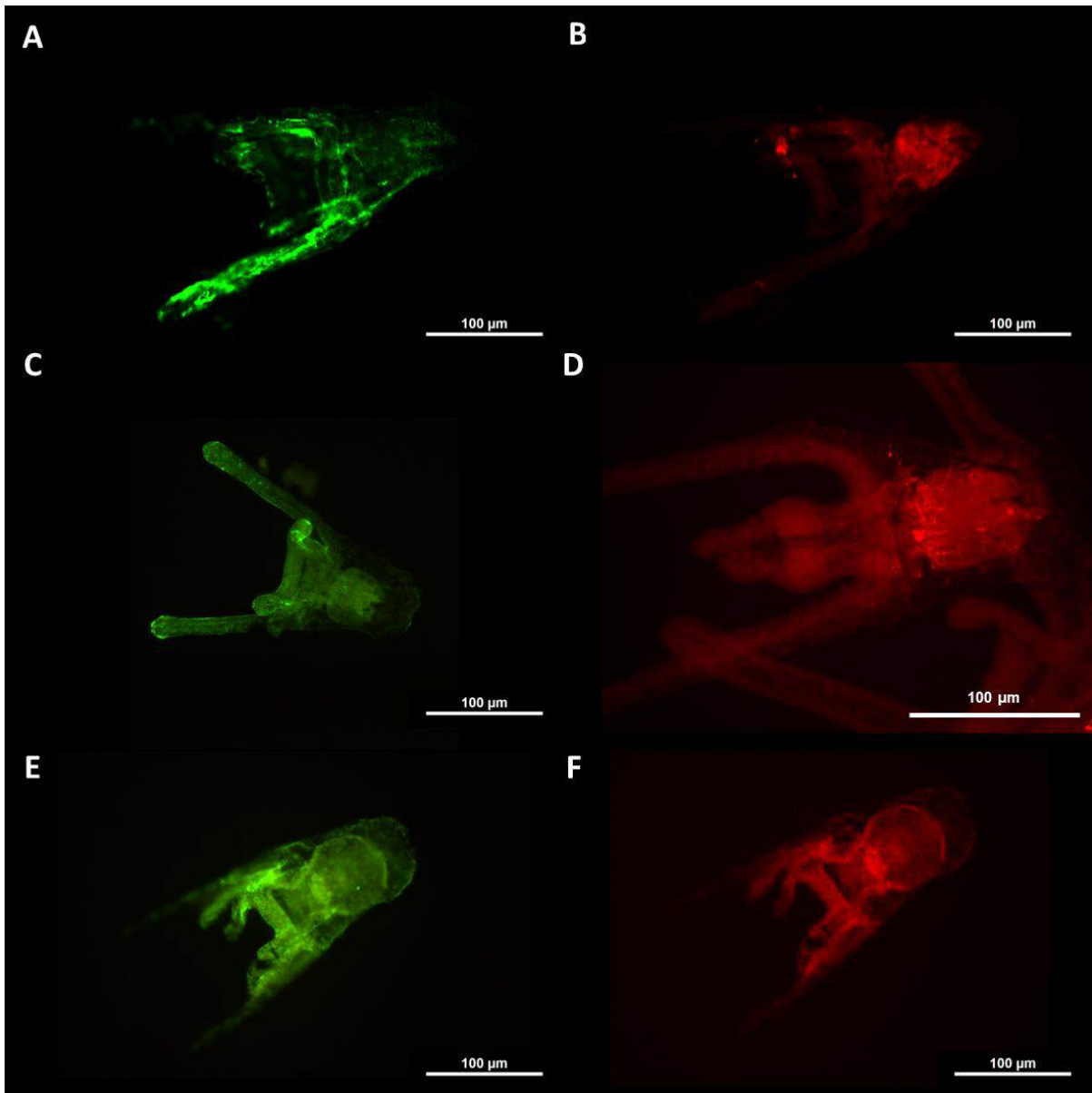


Figura 4.13: Tratamiento III con GDNF. Inmunocitoquímica de fluorescencia doble en larvas de *A. dufresnii* con el anticuerpo anti-GFR α - Cy2 (verde) y anti-GFAP - Cy3 (rojo) a las 24 (A y B), 48 (C y D) y 72 hpt (E y F). La expresión de GFR α pierde la disparidad entre el lado izquierdo y derecho a las 48 y 72 hpt y se acentúa la expresión en la zona del estómago. La expresión de GFAP mantiene el patrón descrito en el control pero con una mayor intensidad.

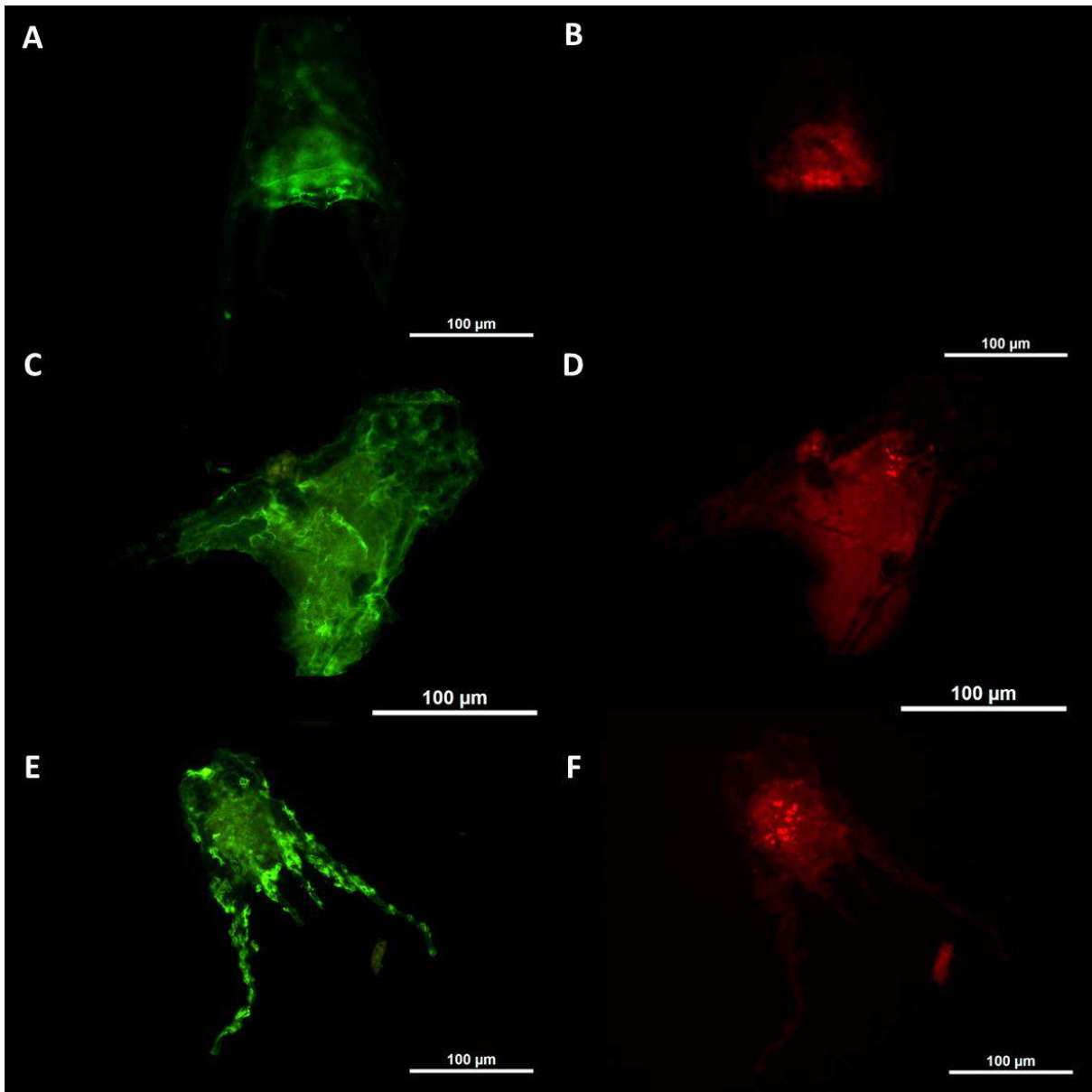


Figura 4.14: Tratamiento IV GFAP e inhibidor LY294002. Inmunocitoquímica de fluorescencia doble en larvas de *A. dufresnii* con el anticuerpo anti-GFR α - Cy2 (verde) y anti-GFAP - Cy3 (rojo) a las 24 (A y B), 48 (C y D) y 72 hpt (E y F). La expresión de GFR α se observa muy reducida a las 24 hpt y luego aumenta presentando un patrón fragmentado a las 72 hpt. La expresión de GFAP se observa muy reducida a las 24 hpt y luego aumenta levemente concentrándose en unas pocas células del estómago, que no desarrollan su morfología típica estrellada.

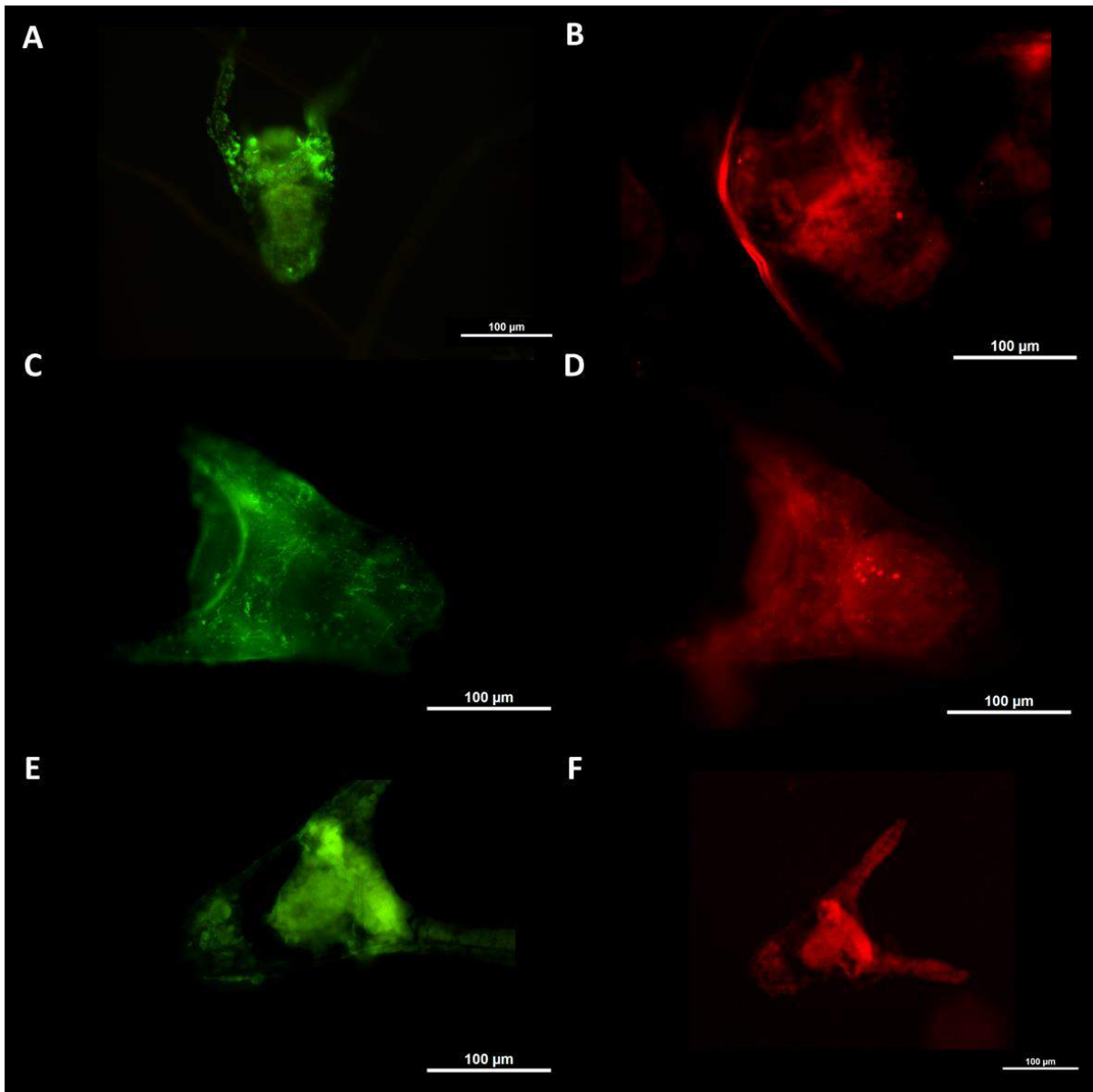


Figura 4.15: Tratamiento V NRTN. Inmunocitoquímica de fluorescencia doble en larvas de *A. dufresnii* con el anticuerpo anti-GFR α - Cy2 (verde) y anti-GFAP - Cy3 (rojo) a las 24 (A y B), 48 (C y D) y 72 hpt (E y F). La expresión de GFR α se observa concentrada preferentemente en los ganglios laterales, el órgano apical y levemente en el estómago. La expresión de GFAP se observa reducida localizándose en el órgano apical y en algunas células del estómago.

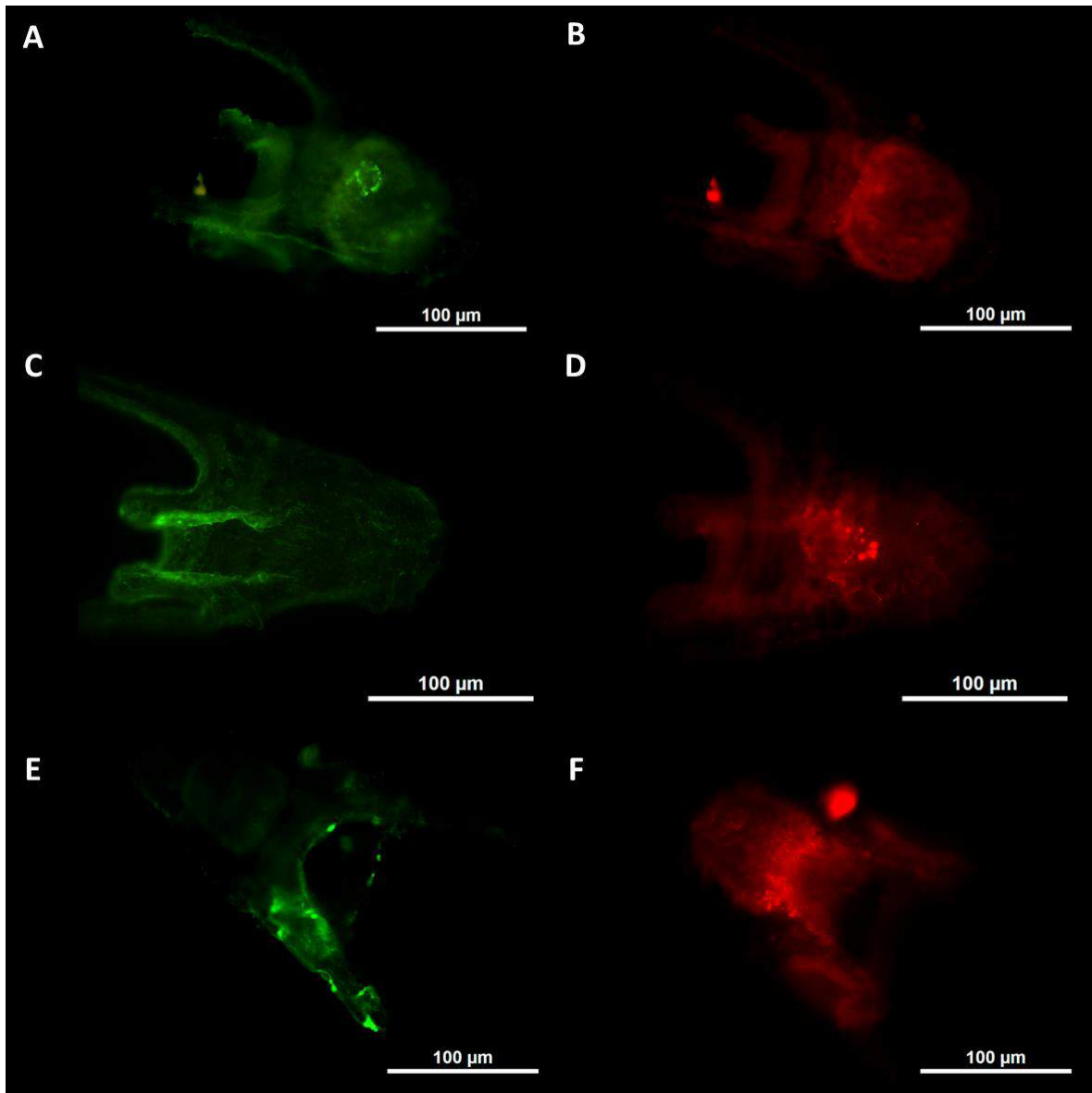


Figura 4.16: Tratamiento VI con NRTN e inhibidor LY294002. Inmunocitoquímica de fluorescencia doble en larvas de *A. dufresnii* con el anticuerpo anti-GFR α - Cy2 (verde) y anti-GFAP - Cy3 (rojo) a las 24 (A y B), 48 (C y D) y 72 hpt (E y F). La expresión de GFR α se observa muy reducida, expresándose sólo en pequeños grupos de células. La expresión de GFAP se observa reducida y localizada preferentemente en el esófago. Las células que expresan esta proteína recuperan parcialmente su morfología radial típica a las 72 hpt.

Cuantificación y análisis de la expresión de génica

La expresión relativa de ARNm para los genes de interés Bcl-2, Bax, TRPa, Syt1-1 y GFAP a las 24, 48 y 72 hpt, se graficó en función del tiempo (Figura 4.17).

Como ya se mencionó, en los **tratamientos II, IV y VI**, inmediatamente luego de la aplicación del inhibidor LY294002 ocurrió una muerte masiva de los organismos, y las larvas sobrevivientes (alrededor del 50%) fueron procesadas a los tiempos previstos. Por esta razón, el tratamiento con NRTN no posee réplicas, ya que se contaba con una cantidad limitada de dicho factor neurotrófico, y por lo tanto una cantidad limitada de larvas tratadas con el mismo. Sumado a esto, algunas de las extracciones de ARN no tuvieron la pureza, integridad o concentración adecuada para proseguir con la técnica y debieron descartarse.

En el **tratamiento I**, correspondiente a larvas control, se registró una modificación en la expresión de Bcl-2 y Syt1-1 a lo largo del tiempo. En el caso de Bcl-2 se observó un aumento significativo a las 48 hpt ($F_{2,6}=2,14$; $p=0,0332$), seguido de una disminución a las 72 hpt. Por su lado, en Syt1-1 registró un aumento progresivo con un máximo significativo a las 72 hpt ($F_{2,6}=16,41$; $p=0,0118$). Los genes Bax y TRPa mantuvieron su expresión constante, mientras que GFAP registró un aumento no significativo a las 72 hpt.

El **tratamiento II**, correspondiente a larvas con el inhibidor LY294002, presentó cambios en los patrones de expresión de todos los genes analizados respecto al control. Sin embargo, únicamente la expresión del gen GFAP aumentó significativamente sus valores a las 48 hpt ($F_{1,3}=12,71$; $p=0,0377$). Al comparar este tratamiento con el control, puede observarse que la expresión del gen Bcl-2 entre tratamientos disminuyó significativamente para los tres tiempos analizados ($F_{3,7}=11,26$; $p=0,0045$), y lo mismo sucedió con el gen Syt1-1 ($F_{3,9}=8,06$; $p=0,0064$). El gen TRPa también disminuyó su expresión y el gen Bax la aumentó, en ambos casos a las 72 hpt aunque de forma no significativa.

El **tratamiento III**, correspondiente a larvas con adición de GDNF, modificó la expresión de casi todos los genes. El gen Bcl-2 no presentó diferencias significativas a lo largo del tiempo ($F_{2,5}=0,86$; $p=0,4767$), pero su par antagónico Bax, aumentó de manera significativa su expresión a las 72 hpt ($F_{2,5}=5,16$; $p=0,0408$). Asimismo, al comparar este tratamiento con el control, se observó que el gen Bcl-2 disminuyó su expresión significativamente respecto al control para los tres tiempos analizados ($F_{3,11}=12,45$; $p=0,0007$), mientras que Bax aumentó a las 72 hpt ($F_{3,11}=0,98$; $p=0,0430$). Los genes Syt1-1, GFAP y TRPa mostraron variaciones en su expresión aunque no significativas. La expresión de GFAP y de TRPa aumentó progresivamente a lo largo del tiempo y la expresión de Syt1-1 aumentó entre las 24 y 48 hpt.

El **tratamiento IV**, correspondiente a larvas con GDNF e Inhibidor LY294002, nuevamente generó cambios en la expresión génica a lo largo del tiempo y también respecto a otros tratamientos. Al analizar los efectos a lo largo del tiempo dentro del tratamiento, se observó que a las 72 hpt hubo un aumento en la expresión Bcl-2, aunque no fue significativo ($F_{2,7}=1,38$; $p=0,3343$). En cambio los aumentos de Bax y GFAP a las 72 hpt si fueron significativos ($F_{2,7}=16,97$; $p=0,0059$; $F_{2,7}=18,92$ $p=0,0047$, respectivamente). Por su lado, el gen TRPa disminuyó su expresión a las 72 hpt y el gen Syt1-1 aumentó su expresión a las 72 hpt, sin embargo en ambos casos estas variaciones no fueron significativas. Al comparar este tratamiento respecto al control, se observó que hubo una disminución significativa en la expresión de Bcl-2 para los tres tiempos analizados ($F_{3,11}=3,99$; $p=0,0378$), y un aumento significativo en la expresión de Bax y GFAP ($F_{3,11}=2,86$; $p=0,0455$; $F_{3,11}=1,08$; $p=0,0217$). Adicionalmente, al comparar este tratamiento respecto al tratamiento III, se observó un patrón similar en la expresión de Bax, un aumento en la expresión de Bcl-2 y GFAP a las 72 hpt, una disminución en la expresión de TRPa y variaciones en la expresión Syt1-1.

El **tratamiento V**, correspondiente a larvas con NRTN, no tuvo réplicas y por lo tanto no se realizaron análisis estadísticos. Sin embargo, se puede observar a lo largo del tiempo un aumento abrupto en la expresión de los genes Bcl-2 y Bax a las 72 hpt, y un incremento en la expresión de GFAP a las 48 hpt. Por otra parte, la expresión de los

genes TRPa y Syt1-1 se mantuvieron constantes. Al comparar este tratamiento con el control, puede apreciarse que los aumentos observados en Bcl-2, Bax y GFAP fueron diferentes al control, mientras que la expresión de TRPa pareció mantenerse similar y la expresión Syt1-1 no aumentó a las 72 hpt como ocurre en el control.

Por último, el **tratamiento VI**, correspondiente a larvas con NRTN e Inhibidor LY294002, tampoco tuvo réplicas, pero sin embargo se observaron variaciones en la expresión génica. Se observó un aumento en la expresión de Bcl-2, Bax a las 72 hpt, y para GFAP a las 48 hpt, pero en este caso el aumento fue mucho menor al observado en el tratamiento V. La expresión de Syt1-1 pareció recuperar el patrón observado en el tratamiento control y la expresión de TRPa se mantuvo sin grandes modificaciones.

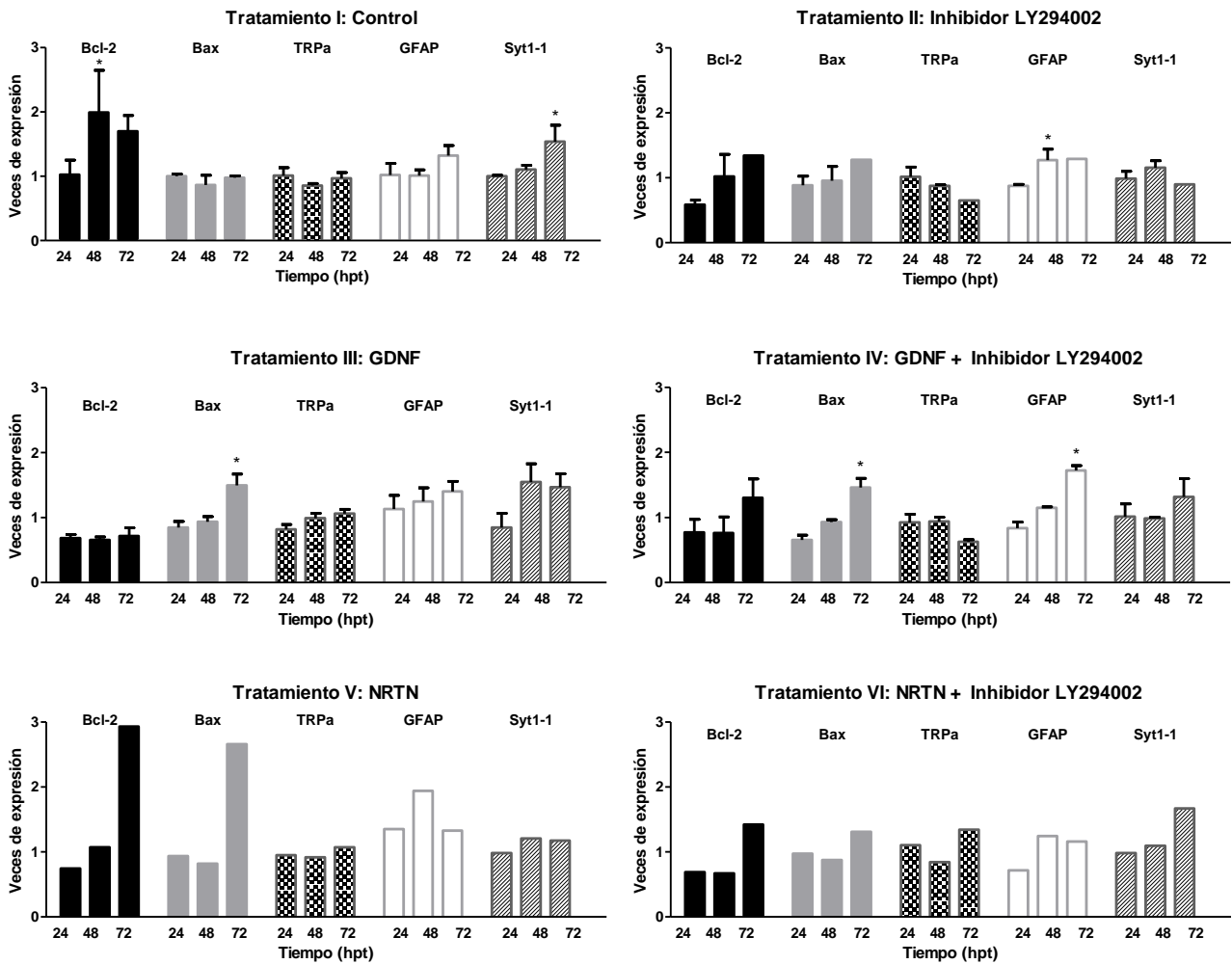


Figura 4.17: Expresión relativa de los genes Bcl-2, Bax, TRPa, GFAP y Syt1-1 en larvas de *A. dufresnii* sometidas a seis condiciones experimentales diferentes y analizadas a las 24, 48 y 72 horas post tratamiento (hpt). Observar también las diferencias de expresión génica entre tratamientos. Las barras representan las veces de expresión respecto a los valores hallados para cada gen a las 24 hpt del tratamiento control (media \pm error estándar).

Experimentos de regeneración con exposición farmacológica a activadores de la vía GFLs

A pesar de ser un protocolo con una gran dificultad técnica, que requiere una manipulación muy cuidadosa, las larvas sobrevivieron en un 95% a la micromanipulación y microablación. Se realizaron microablaciones en un total de 200 larvas, de las cuales únicamente murieron 10 larvas y el resto regeneró su lesión y sobrevivió (Figura 4.18, A). En los casos en que la larva no sobrevivió, esto coincidió con una demora en la ejecución del protocolo de microablación, en el cual se observó una mayor evaporación del medio húmedo en el gel del agarosa.

Luego de la microablación, las larvas devueltas al medio líquido fueron capaces de nadar y desplazarse. Sin embargo, con uno de los brazos post-orales lesionado el movimiento natatorio fue deficiente, y se observó que en general las larvas nadaron en círculos (Figura 4.18, B).

A las 24 h de realizarse la microablación, las larvas de todos los tratamientos mostraron una recuperación total del patrón de nado, junto a una cicatrización completa de la lesión realizada (Figura 4.18, C).

A las 48 y 72 h de realizada la microablación, no se registraron cambios morfológicos apreciables respecto a lo hallado a las 24h y la zona de la lesión resultó imperceptible.

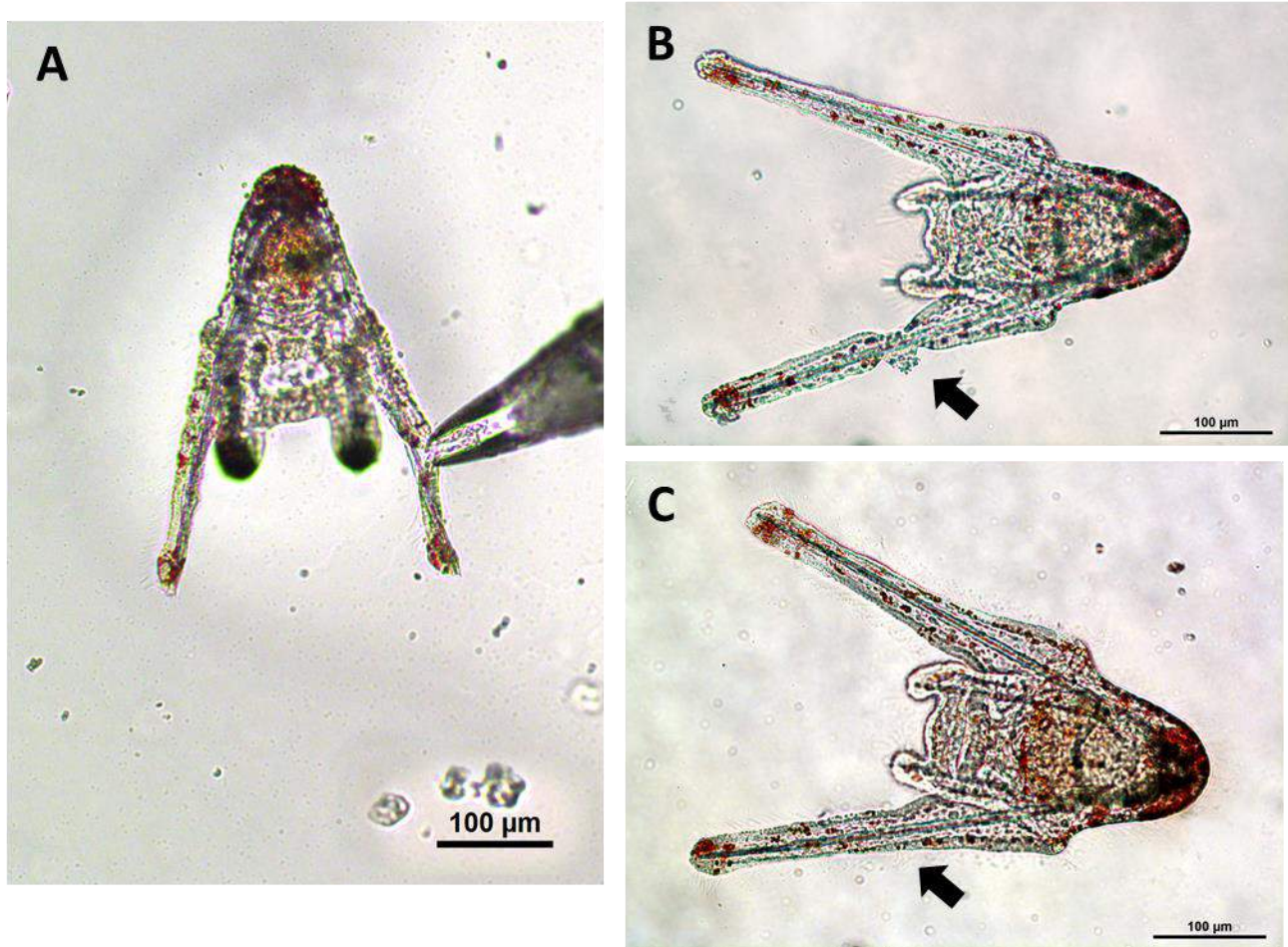


Figura 4.18: Microablación y regeneración en larvas de *A. dufresnii*. A) Momento de la microablación. Observe la micropipeta de 10 µm succionando parte de los tejidos en uno de los brazos post-orales B) Larva inmediatamente después de la microablación. Observe la lesión generada (flecha). C) Larva a las 24h, observe la cicatrización de la zona ablacionada, que se encuentra recuperada casi totalmente (flecha).

*Expresión de GFR α y 1E11 en larvas de *A. dufresnii* en regeneración con activación de la vía de los GFLs*

En los **tratamientos I, III, y V**, las larvas no sufrieron microablación, pero fueron micromanipuladas, expuestas al gel de agarosa, fotografiadas en el microscopio, y luego incubadas en agua de mar (I) o con los inductores de la vía de los GFLs: GDNF (III) y NRTN (V). En estos tratamientos, se observó un patrón de expresión de GFR α y 1E11 similar al descrito previamente en los tratamientos de activación farmacológica de este capítulo (Figuras 4.6, 4.8 y 4.10), por lo tanto, sólo se hará referencia a estos tratamientos con fines comparativos para los tratamientos con microablación II, IV y VI.

En las larvas del **tratamiento II**, correspondiente a la **microablación** y cultivo en agua de mar (Figura 4.19), se observó un patrón diferente en la expresión de GFR α y 1E11, respecto al tratamiento I (Figura 4.6). En el tratamiento II, a las 24 hpt se observó un aumento en la expresión de GFR α y 1E11 en la zona puntual de la microablación, y también en el ganglio lateral del brazo lesionado. A las 48 y 72 hpt, este patrón de expresión descrito se mantuvo pero se hizo cada vez más difuso y marcó un territorio más amplio. La expresión de GFR α mantuvo la asimetría entre el lado izquierdo y derecho de la larva, siendo en todos los casos más intensa en el lado de la lesión. La expresión de 1E11 fue tenue en todos los casos y se hizo poco perceptible hacia las 72 hpt (Figura 4.19).

En las larvas del **tratamiento IV**, correspondiente a la **microablación** y cultivo con GDNF, se observó un aumento en la expresión de GFR α en la zona microablacionada del brazo post-oral (Figura 4.20). Este aumento fue similar al observado en el tratamiento II (Figura 4.19) pero con un patrón de distribución más difuso y manteniendo la asimetría lateral en la expresión entre el lado izquierdo y derecho. La expresión de 1E11 fue muy tenue en este tratamiento, pero se observó levemente aumentada en el lado que sufrió la microablación, con un patrón difuso y sin marcar la zona específica de esta lesión. Este patrón, guarda cierta relación al

hallado en el tratamiento II (Figura 4.19) en donde también se apreció una expresión levemente mayor de 1E11 en el lado que sufrió la lesión. Sin embargo, en contraste con lo descrito, la expresión de 1E11 resultó mucho menor a la hallada para el tratamiento III, correspondiente a larvas con GDNF y sin microablación (Figura 4.8), y con un sitio de localización diferente a éste que se caracterizó por una concentración en la zona del tubo digestivo.

En las larvas con el **tratamiento VI**, correspondiente a la **microablación** y cultivo con NRTN, se observó que la expresión de GFR α aumentó en la zona microablacionada del brazo post-oral en forma puntal y tenue. Además, no se observó la expresión diferencial típica de GFR α entre el lado izquierdo y derecho (Figura 4.21). La marcación de GFR α hallada en la zona lesionada se asemejó a la encontrada en las larvas del tratamiento II (Figura 4.19), aunque fue más tenue en el tratamiento IV. Al comparar este tratamiento con el tratamiento V, correspondiente a larvas sin microablación y con adición de NRTN (Figura 4.10), se observó similitud en el patrón de expresión general de GFR α , que marcó fuertemente en los brazos pre y post-orales y hay una pérdida de la expresión diferencial entre los lados izquierdo y derecho de la larva. La expresión de 1E11 fue imperceptible en la zona lesionada pero presentó un patrón general en la larva muy aumentado que difirió del hallado en las larvas del tratamiento II y se asemejó en intensidad y localización al hallado en el tratamiento V, con una gran marcación en la zona del tubo digestivo y el órgano apical a las 24 y 48 hpt, y con la aparición de un patrón fragmentado para 1E11 a las 72 hpt. Por último, es destacable la fragilidad observada en los brazos post-orales de las larvas en este tratamiento que se presentaron quebradizos en distintas larvas. Este fenómeno también fue observado en la primer parte de este capítulo, en larvas tratadas tanto con factores neurotróficos como con el inhibidor LY294002, pero no se observó en larvas control.

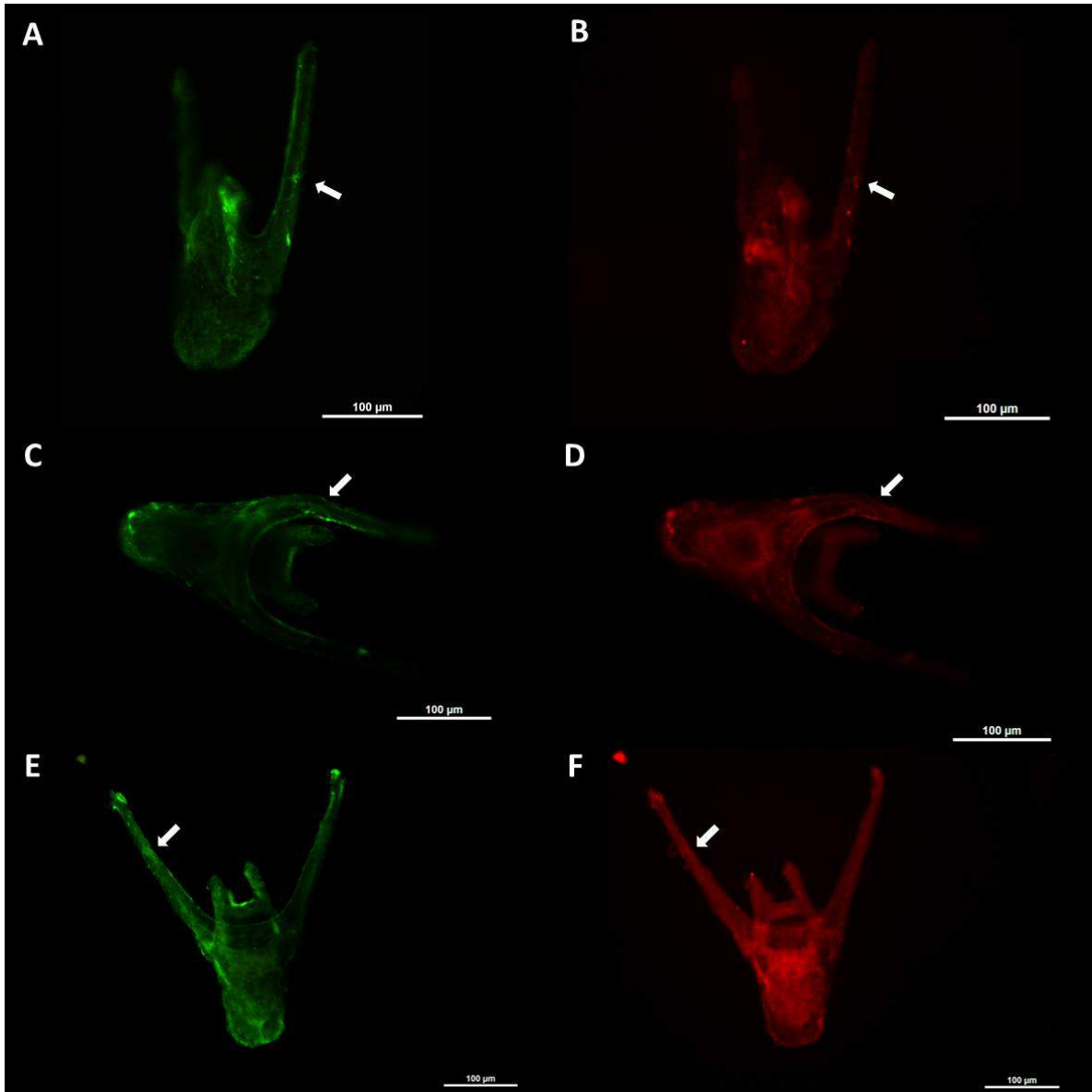


Figura 4.19: Tratamiento II: Larvas con microablación sin factor trófico. Inmunocitoquímica de fluorescencia doble en larvas de *A. dufresnii* con el anticuerpo anti-GFR α - Cy2 (verde) y anti-1E11 - Cy3 (rojo) a las 24 (A y B), 48 (C y D) y 72 hpt (E y F). Observe la expresión aumentada de GFR α en la zona microablacionada del brazo post-oral (flechas), y en el ganglio lateral de dicho brazo. Observe la expresión tenue de 1E11 en la zona de la microablación (flechas).

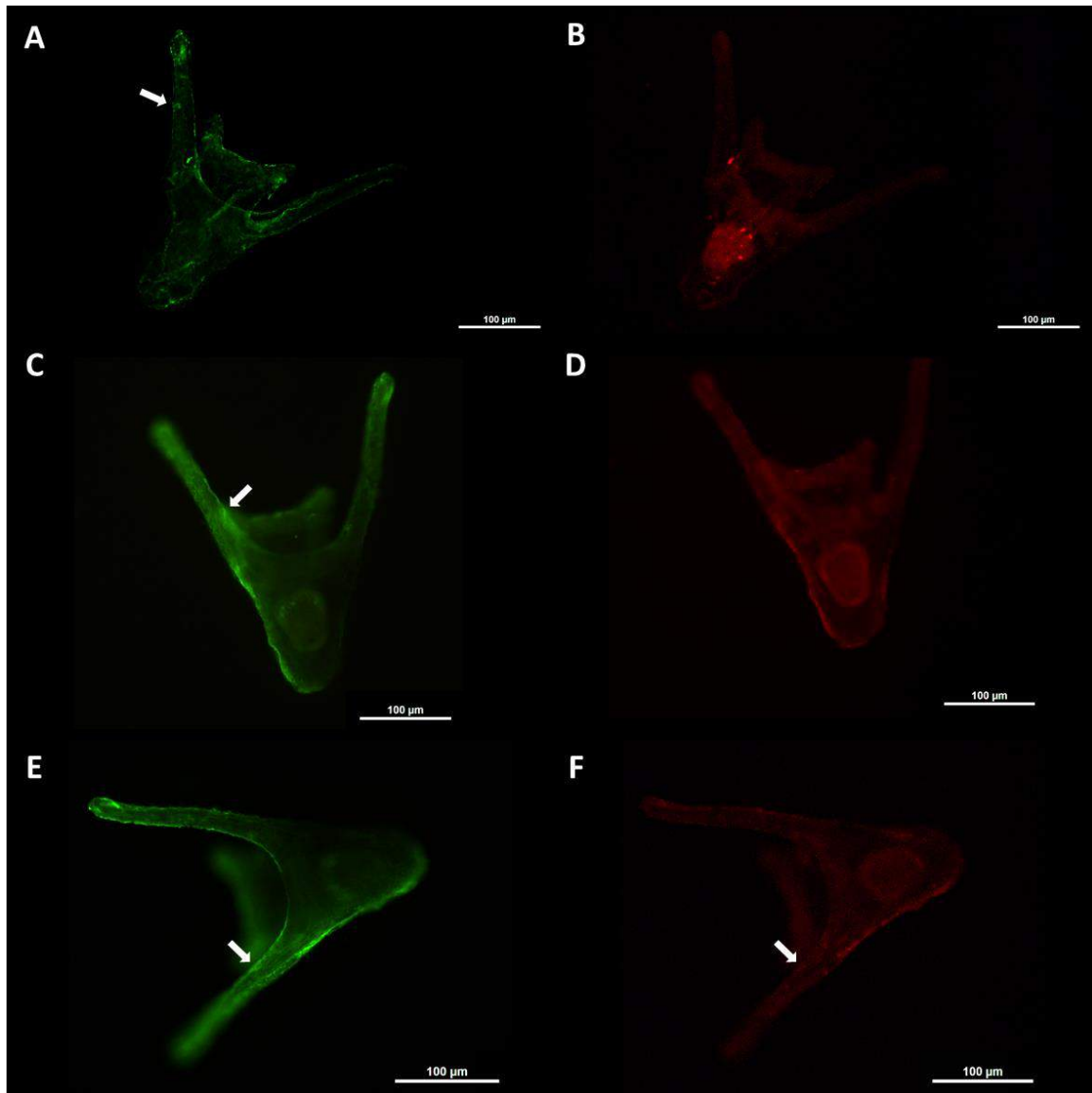


Figura 4.20: Tratamiento IV: Larvas con microablación y GDNF. Inmunocitoquímica de fluorescencia doble en larvas de *A. dufresnii* con el anticuerpo anti-GFR α - Cy2 (verde) y anti-1E11 - Cy3 (rojo) a las 24 (A y B), 48 (C y D) y 72 hpt (E y F). Observe la expresión aumentada y difusa de GFR α en la zona microablacionada del brazo post-oral (flechas), en particular a las 48 y 72 hpt. Observe la expresión muy tenue de 1E11 en el lado que sufrió la microablación, y la ausencia de marca en la zona específica de la lesión.

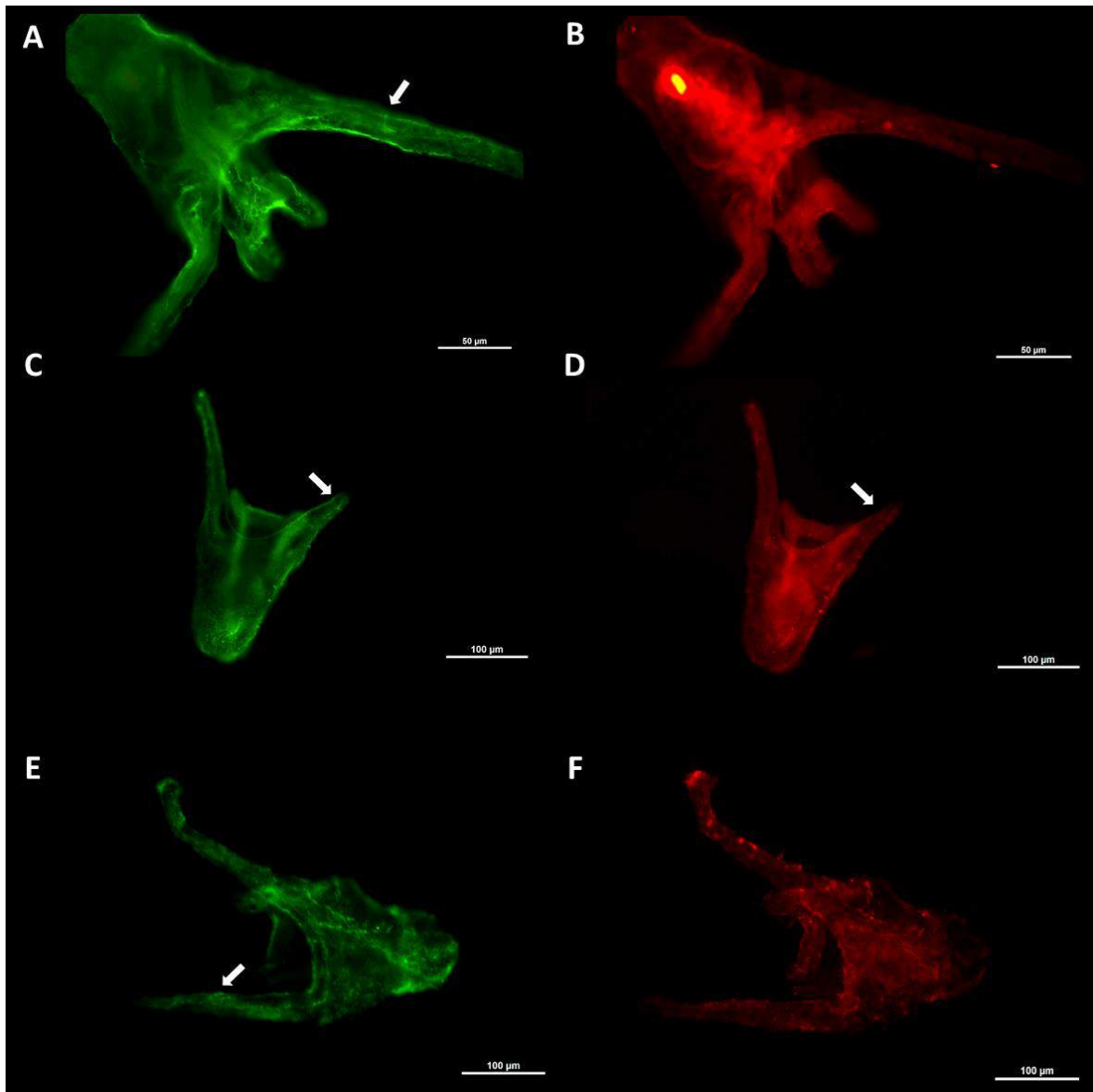


Figura 4.21: Tratamiento VI: Larvas con microablación y NRTN. Inmunocitoquímica de fluorescencia doble en larvas de *A. dufresnii* con el anticuerpo anti-GFR α - Cy2 (verde) y anti-1E11 - Cy3 (rojo) a las 24 (A y B), 48 (C y D) y 72 hpt (E y F). Observe la expresión aumentada de GFR α en la zona microablacionada del brazo post-oral (flechas). Observe la expresión aumentada de 1E11 en toda la larva, principalmente en la zona del tubo digestivo y órgano apical a las 24 y 48 hpt, y el patrón fragmentado a lo largo de toda la larva a las 72 hpt. Observe la fragilidad en los brazos de estas larvas.

Discusión del capítulo 4

En este capítulo, se estudiaron los efectos de los factores neurotróficos GDNF y NRTN, miembros de los GFLs e inductores de la vía GFLs/GFR α /RET, y los efectos de la inhibición de dicha vía mediante la molécula LY294002, en larvas de *A. dufresnii* de una semana de desarrollo. Posteriormente, se estudiaron los efectos de los factores neurotróficos GDNF y NRTN durante la regeneración de una fracción de tejido en larvas de *A. dufresnii* de una semana de desarrollo.

Al estudiar los efectos de los factores neurotróficos sobre larvas en desarrollo, el **tratamiento I** describe la condición control que permitirá analizar el cambio realizado con los otros tratamientos.

Las inmunocitoquímicas dobles realizadas en las larvas sometidas a este tratamiento mostraron el mismo patrón descrito en las inmunocitoquímicas simples hallado en el capítulo 3, y además no se obtuvo marca inespecífica en los controles negativos (resultado no mostrado). Por lo tanto, las variantes en la técnica de inmunocitoquímica utilizadas en esta tesis doctoral, no afectaron la accesibilidad a ninguno de los epítopes estudiados y no generaron reacciones cruzadas entre los anticuerpos secundarios. Estos efectos indeseados han sido descritos como los principales inconvenientes en la aplicación de la técnica de inmunocitoquímica (Mason et al. 2000).

Debido a que las larvas utilizadas en los experimentos de activación e inhibición de la vía de los GFLs tenían 7 dpf, los resultados obtenidos a las 24, 48 y 72 hpt, corresponden a larvas de 8, 9 y 10 dpf. El anticuerpo anti-GFR α marcó las estructuras esperadas para la etapa del desarrollo analizada y se observó claramente el patrón diferencial de expresión entre los lados derecho e izquierdo de la larva. El anticuerpo anti-1E11, que reconoce a la proteína Syt1-1, se localizó en la región del

tubo digestivo y el anticuerpo anti-GFAP también marcó predominantemente la zona del tubo digestivo pero en células cuya morfología recuerda a la glía radial. Consistentemente con lo observado en el capítulo 3 de esta tesis y con descripciones de otros autores, en esta etapa del desarrollo larval el sistema nervioso y el tejido muscular (Dyachuk y Odintsova 2013) se desarrollan predominantemente alrededor de las estructuras alimenticias.

La expresión génica en este tratamiento mostró grandes similitudes respecto a lo descrito en el capítulo 3 para la misma etapa del desarrollo larval. La expresión de los genes Bcl-2, TRPa y Syt1-1 fue idéntica a la observada previamente. La expresión del gen Bax, se mantuvo constante a lo largo del tiempo, mostrando una tendencia levemente diferente a la descrita en el capítulo 3, en donde se había registrado un mínimo a los 8 dpf. La expresión de GFAP presentó un mínimo a los 8 dpf en ambos casos, seguido de un leve aumento no significativo que se registró a tiempos diferentes, siendo a los 9 dpf en el capítulo 3 y a los 10 dpf en este capítulo. En términos generales, estos resultados coinciden con lo esperado y por lo tanto, le dan mayor confiabilidad a las cuantificaciones de la expresión génica de ambas experiencias. Adicionalmente, también permite que se realicen comparaciones cualitativas entre ambas experiencias, ya que se evidenció que los procedimientos experimentales aplicados fueron lo suficientemente homogéneos como para no alterar de manera significativa el resultado obtenido en la expresión génica.

Los resultados obtenidos en el **tratamiento II**, correspondiente a larvas que fueron expuestas al inhibidor LY294002, mostraron importantes cambios.

Inicialmente se observó una alta mortalidad que ocurrió inmediatamente después de la adición del tratamiento al medio en el que se encontraban las larvas. La molécula LY294002, actúa como un inhibidor selectivo de la vía PI3K, uno de los segundos mensajeros que se encuentra río debajo de la cascada GFLs/GFR α /RET (Vlahos et al. 1994). Se ha descrito que la activación por factores neurotróficos de la enzima PI3K promueve mecanismos de supervivencia celular, y su inhibidor específico LY294002 ha sido asociado en reiteradas ocasiones al proceso de inducción

de la apoptosis, principalmente por la supresión de la enzima PI3K, pero también mediante la activación de la caspasa 9, una de las proteínas que actúan en el proceso apoptótico (Vlahos et al. 1994; Yao y Cooper 1995; Chen et al. 2001; Jiang et al. 2010). Por otro lado, el solvente utilizado para disolver el inhibidor fue DMSO (Dimetil Sulfóxido), el cual es comúnmente utilizado para disolver sustancias orgánicas en ensayos *in vivo*. Este solvente, en concentraciones similares a las utilizadas, no afecta la supervivencia en ensayos con zooplancton (Stampfli et al. 2013), y en particular, no altera el desarrollo embrionario y larval del equinodermo *Paracentrotus lividus* (Arizzi Novelli et al. 2002). Por lo tanto, inferimos que el factor que produjo la mortalidad de las larvas fue el inhibidor LY294002, que inicialmente debió alterar la capacidad de nadar de las larvas, y posteriormente produjo la muerte de las mismas. Las larvas sobrevivientes presentaron importantes cambios a nivel celular que se reflejaron tanto en las inmunocitoquímicas como en la expresión génica.

Las inmunocitoquímicas mostraron una disminución en la expresión de GFR α en los tiempos muestreados, y un cambio en el patrón de distribución del mismo, que se concentró en la región del estómago. Una posible explicación a la disminución observada es que en la activación de la expresión de GFR α esté involucrada la vía PI3K, y por lo tanto, al inhibir dicha vía se reduciría la presencia de la proteína. En mamíferos, la estimulación de la cascada GFLs/GFR α /RET, aumenta la expresión endógena de la proteína GFR α en un mecanismo conocido como loop positivo (Luo et al. 2007). En este caso, en el tratamiento II al inhibir una parte de dicha cascada correspondiente a PI3K, se observa reducción de GFR α sugiriendo que este segundo mensajero participa en el control de la expresión de esta proteína. Por otra parte, el cambio en el patrón de expresión registrado, sugiere que hay un efecto diferencial del tratamiento en los diversos tejidos y/o células.

Las inmunocitoquímicas realizadas con anti-1E11 no revelaron cambios apreciables entre las 24 y las 72 hpt en la marcación de la proteína Syt1-1. Sin embargo, al estudiar su expresión génica, se observó un descenso de los transcritos a las 72 hpt, que resultó significativo al compararlo con la expresión hallada a las 72 hpt en el tratamiento I. Esta discrepancia entre lo observado en inmunocitoquímica y la

expresión génica se debe a que existe un cierto desfase temporal entre la expresión de un gen en forma de ARNm y la posterior síntesis de la proteína. Por lo tanto, es probable que si se realizaran inmunocitoquímicas a tiempos posteriores, se vea reflejado un descenso en la cantidad de marca. Por lo tanto, la inhibición de la enzima PI3K mediante la adición de LY294002, afectó negativamente la expresión génica de Syt1-1.

En las inmunocitoquímicas para GFAP se observó un cambio en el patrón de la marca, que se concentró en unas pocas células de la zona del estómago que no desarrollaron su morfología típica estrellada. GFAP es una proteína monomérica, que tiene la capacidad de polimerizarse y formar los filamentos intermedios de tipo III de las células gliales. Estos filamentos tienen como función principal constituir el citoesqueleto glial confiriendo la estructura típica estrellada a las células que lo expresan (Hol y Capetanaki 2017). Esta polimerización es dependiente del estado de fosforilación y desfosforilación de los extremos N-terminal y C-terminal de GFAP (Ralton et al. 1994). El resultado hallado en las inmunocitoquímicas parece representar una disminución inicial de la proteína GFAP que luego se restablece, y un cambio en el estado de polimerización de la misma. Probablemente la enzima encargada del proceso de polimerización se vea afectada por la inhibición que ejerce la molécula LY294002 sobre la vía PI3K. Asimismo, al analizar la expresión génica de GFAP se observa nuevamente una disminución en su expresión a las 24 hpt, seguida de un aumento significativo a las 48 hpt en donde se alcanzan los niveles de expresión similares al control a las 72 hpt. Teniendo en cuenta el desfase temporal entre la expresión de un gen y la síntesis de su proteína, este resultado concuerda con la disminución inicial de la marca observada en inmunocitoquímica.

En cultivos celulares de mamíferos se ha descrito que la enzima PI3K controla las acciones del ácido retinoico y de las citoquinas, que a su vez estimulan la expresión de GFAP. Por lo tanto, la inhibición de PI3K mediante la molécula LY294002 en estas células, reduce inicialmente la expresión génica de GFAP de forma indirecta (Herrera et al. 2010). Dada la similitud en la respuesta hallada en mamíferos y en

equinodermos, estos resultados sugieren que en *A. dufresnii* la expresión de GFAP podría estar regulada de una manera similar a la descripta para mamíferos.

Por otra parte, en mamíferos se ha descrito que en respuesta a una lesión o degeneración en el sistema nervioso, las células gliales incrementan la expresión de GFAP (Junier et al. 1994), se localizan alrededor de la zona afectada y sufren una serie de cambios morfológicos entre los que se destacan la hipertrofia del cuerpo celular, la extensión de los procesos celulares y un incremento en la producción de factores neurotróficos y citoquinas que promueven la supervivencia celular (Lin et al. 1993; Junier et al. 1994; Logan et al. 1994). En este contexto, el aumento a las 48 y 72 hpt observado en la expresión de GFAP y la hipertrofia del cuerpo celular coinciden con lo observado en mamíferos y podrían indicar que, en este tipo celular que recuerda a las glías de mamíferos, existe una función similar de protección frente al daño.

Al analizar la expresión del gen anti-apoptótico Bcl-2, se observa que sufrió una disminución significativa en todos los tiempos muestreados respecto a lo hallado en el tratamiento I, y el gen pro-apoptótico Bax aumentó levemente a las 72 hpt. Ambos cambios registrados afectan el balance de la supervivencia celular favoreciendo la apoptosis. Estos resultados concuerdan con la gran mortalidad observada luego de la adición del inhibidor, y también con lo descrito en otros trabajos en donde se asocia a la vía de PI3K principalmente con la supervivencia celular, y su inhibición con la inducción de la apoptosis (Vlahos et al. 1994; Yao y Cooper 1995; Chen et al. 2001; Jiang et al. 2010). Adicionalmente y al igual que ocurre con GFAP, los cambios en la expresión de estos genes sugieren que hay un daño celular.

En este tratamiento, la expresión del gen TRPa se redujo a lo largo del tiempo, y esta disminución también se observó al compararlo con el tratamiento I. En el capítulo 3 de esta tesis, se observó que los transcritos para este gen en los estadios tempranos del desarrollo parecen provenir de herencia materna, y a partir de los 10 dpf la expresión comienza a aumentar, sugiriendo el comienzo de la expresión endógena en la larva. Los resultados obtenidos en este tratamiento, muestran que las larvas de 10 dpf, correspondientes a las 72 hpt, disminuyen la expresión para TRPa en lugar de

aumentarla, lo que evidencia una inhibición en su expresión. En células nerviosas de mamíferos, se ha descrito que el gen TRPA se expresa luego de la activación de la vía GFL/GFR α /RET, y que en ratones mutantes en donde se silencia el gen RET, la expresión de TRPA desaparece (Luo et al. 2007). Teniendo esto en consideración, el resultado obtenido parece indicar que en *A. dufresnii* la inducción en la expresión de este gen también se encuentra asociada a esta vía de señalización, y más específicamente, a través del segundo mensajero PI3K.

Los resultados obtenidos en el **tratamiento III**, correspondiente a larvas que fueron expuestas al factor neurotrófico GDNF, mostraron importantes cambios.

Las inmunocitoquímicas mostraron un cambio en el patrón de GFR α , con un aumento en su expresión en los brazos pre-orales asociado a una morfología atípica en esta zona, un aumento en la región del estómago y una pérdida de la disparidad entre el lado izquierdo y derecho.

En vertebrados, GDNF actúa como ligando de GFR α , y luego ambos se unen al receptor RET formando el complejo GDNF/GFR α /RET que inicia una cascada intracelular que puede estar asociada a múltiples segundos mensajeros, y por lo tanto, puede generar diversos efectos celulares (Fielder et al. 2018). La respuesta frente al ligando GDNF depende de la expresión tejido-específica de los receptores GFR α y RET en la superficie celular, y de la asociación de estos receptores con otras moléculas en la membrana plasmática y en el espacio intracelular. A su vez, estas moléculas, son las responsables de determinar la activación de algunos de los segundos mensajeros asociados a este complejo, y por lo tanto, de determinar las diferentes respuestas celulares frente a la presencia de la misma señal o ligando. Este tipo de mecanismos, han sido registrados en reiteradas ocasiones en vertebrados, y permiten que un factor trófico tenga acciones pleiotrópicas, es decir, acciones diferenciales sobre diferentes poblaciones celulares. Entre los múltiples efectos producidos por este factor, se ha descrito que la señalización mediada por RET, estimula la expresión GFR α , produciendo el ya mencionado loop positivo (Luo et al. 2007; Koeberle y Bähr 2008). Por lo tanto, el aumento observado en la expresión de GFR α en presencia de GDNF

podría ser consecuencia de una regulación similar a la descrita en vertebrados para esta proteína. La pérdida de la asimetría lateral en la expresión de GFR α sugiere que este tratamiento elimina o enmascara las diferencias en la señalización celular entre el lado izquierdo y derecho de la larva. Por último, dado que una de las características asociadas a GDNF, es su capacidad de estimular el desarrollo del SNE (Mably et al. 2011), el aumento en la marca en la región del estómago podría estar asociado a dicho efecto.

En condiciones normales y concentraciones fisiológicas, el factor GDNF y los demás miembros de la familia de los GFLs, han sido asociados a respuestas celulares que inducen la supervivencia, la proliferación, la diferenciación, la quimiotaxis, etc (Fielder et al. 2018). Sin embargo, en condiciones anormales las acciones de estos factores pueden inducir efectos oncogénicos, tales como la metástasis, la angiogénesis, la quimiorresistencia, la transformación a células madre cancerígenas, etc (Fielder et al. 2018). Teniendo esto en consideración, los cambios morfológicos observados en estas larvas, podrían ser el resultado de una sobre-estimulación o activación anormal de estas vías de señalización, como por ejemplo de la vía MAPK, JNK y/o PI3K.

Las inmunocitoquímicas con anti-1E11 mostraron un aumento en la marca en el órgano apical y la región del tubo digestivo, y en particular en un grupo de células que se disponen en forma de anillo en la base del estómago. Este aumento también se observó en la expresión del gen *Syt1-1* a las 48 hpt. En vertebrados, la señalización mediada por GDNF estimula la adquisición de características neurales y participa en el establecimiento de las conexiones sinápticas de las que la proteína *Syt1-1* forma parte (Ledda et al. 2007). Por lo tanto, este factor podría estimular el desarrollo del sistema nervioso en larvas de *A. dufresnii*. Sin embargo, se ha encontrado que en mamíferos, el tratamiento con GDNF no produce alteraciones en la expresión de gen *Syt1-1*, el cual parece ser dependiente de la señalización de BDNF, un factor neurotrófico perteneciente a otra familia (Ledda et al. 2007).

Las inmunocitoquímicas para GFAP mostraron un aumento en la intensidad de la marca en el tubo digestivo. En concordancia con esto, se observó un aumento

sostenido en la expresión de dicho gen tanto a lo largo del tiempo como en comparación con el tratamiento I. Este resultado es consistente con lo hallado en mamíferos, en donde como ya se mencionó, GDNF estimula la vía de PI3K que luego controla la expresión de GFAP (Herrera et al. 2010). Resumiendo lo observado, la expresión de GFAP a lo largo del tiempo se mantiene estable en el tratamiento control, aumenta significativamente a las 48 hpt de adicionar un inhibidor de la vía PI3K, y aumenta paulatinamente al adicionar el ligando GDNF perteneciente a los GFLs.

En este tratamiento, la expresión del gen anti-apoptótico Bcl-2, se mantuvo constante a lo largo del tiempo y fue menor respecto al tratamiento I. Por su parte, la expresión del gen pro-apoptótico Bax aumentó significativamente a las 72 hpt. Por lo tanto, ambos cambios registrados afectan el balance de la supervivencia celular favoreciendo la apoptosis. Este resultado es opuesto a lo registrado en estudios realizados *in vitro* en células de mamíferos, en donde se ha descrito que la activación mediada por GDNF aumenta la supervivencia de algunas poblaciones celulares principalmente a través de la activación de la vía PI3K, y disminuye la apoptosis (Clarkson et al. 1995, 1997; Chen et al. 2001; Zizer et al. 2012). Sin embargo, en ensayos *in vivo* en mamíferos, se ha registrado que la adición de GDNF estimula la expresión tanto del gen anti-apoptótico Bcl-xl como la del gen pro-apoptótico Bax, coincidiendo con lo observado en este tratamiento para Bax (Tsybko et al. 2015). Los mecanismos moleculares por los que GDNF influye sobre la expresión de los genes de la familia Bcl-2 (Bcl-2, Bax y Bcl-xl) aún no se conocen (Tsybko et al. 2015). Sin embargo, se ha postulado que GDNF podría actuar de forma similar al factor BDNF, que regula la expresión de esta familia de proteínas a partir de la estimulación del segundo mensajero MAPK y del factor de transcripción NFkB (Kosten et al. 2008; Dygalo et al. 2012; Tsybko et al. 2015).

La expresión del gen TRPa en este tratamiento a las 24 hpt fue levemente menor a la registrada en el control y luego aumentó a lo largo del tiempo hasta alcanzar valores normales. Tal como ya se mencionó, en células de mamíferos el gen TRPa se expresa como resultado de la activación de la vía GFL/GFR α /RET (Luo et al. 2007). Sin embargo, si bien se observó en el tratamiento II una disminución luego de

la inhibición de los segundos mensajeros de esta cascada (PI3K), no se observa un efecto opuesto luego de la adición del ligando GDNF. Por lo tanto, GDNF no fue capaz de estimular la expresión de TRPa.

Todos los efectos mencionados, sugieren que el ligando farmacológico GDNF, que fue sintetizado a partir de una secuencia de mamíferos, es capaz de generar respuestas en las larvas de estos equinodermos y de producir algunos de los efectos hallados en mamíferos. Más importante aún, resulta la observación de que este factor genera respuestas diferenciales en los diversos tejidos de las larvas, evidenciando que posee características pleiotrópicas, y por lo tanto, que se encuentra asociado a múltiples vías de señalización intracelular.

Los resultados obtenidos en el **tratamiento IV**, correspondiente a larvas que fueron expuestas al factor neurotrófico GDNF y al inhibidor LY294002, mostraron importantes cambios.

Morfológicamente se observó a las 72 hpt la formación de un surco en la zona del estómago. Nuevamente, la aparición de malformaciones estuvo asociada a la presencia de GDNF, pero en este caso al combinarla con el inhibidor LY294002 se observaron efectos aún más pronunciados. Una explicación a tales efectos es que la combinación entre estos tratamientos haya producido un gran desbalance en la activación mediada por GDNF de algunos segundos mensajeros como podrían ser MAPK y JNK, y la inhibición mediada por LY294002 de otros segundos mensajeros como PI3K, generando respuestas celulares anómalas y un fenotipo con malformaciones principalmente en la región del tubo digestivo.

Las inmunocitoquímicas mostraron un cambio en el patrón de GFR α , que presentó una disminución en su expresión a las 24 hpt y luego una recuperación en la intensidad de la marca a las 72 hpt con un patrón fragmentado y con pérdida de la disparidad de expresión entre el lado izquierdo y derecho. Comparando los resultados obtenidos en el tratamiento I, II, III y en el IV, se observa que la expresión de GFR α aumenta por la adición de GDNF y disminuye por la adición del inhibidor tanto al agregarse sólo como en combinación con GDNF. Estos resultados sugieren que al igual

que se describió en mamíferos (Luo et al. 2007; Koeberle y Bähr 2008), la estimulación de la expresión de $GFR\alpha$ está asociada a la inducción de su ligando GDNF, y que al menos una parte, ocurre a través del segundo mensajero PI3K.

Asimismo, la pérdida de la asimetría lateral en la expresión de $GFR\alpha$ hallada en este tratamiento coincide con lo observado en el tratamiento III. Por lo tanto, como ya se mencionó, posiblemente la adición del ligando GDNF elimina o enmascara las diferencias en la señalización celular que determinan la expresión de $GFR\alpha$ entre el lado izquierdo y derecho de la larva. Adicionalmente, en este tratamiento se observa que este efecto no puede revertirse por el inhibidor LY294002, es decir, que no depende del segundo mensaje PI3K.

Por último, dado que sólo en este tratamiento se observó la aparición de un patrón fragmentado de expresión de $GFR\alpha$, éste parece ser un efecto de la combinación entre GDNF y LY294002, tal vez producto de un desbalance en la activación de algunos segundos mensajeros y la inhibición de otros.

En las inmunocitoquímicas con anti-1E11 y en la cuantificación de la expresión de su gen *Syt1-1*, se observó un patrón parecido al hallado en el tratamiento control. Al comparar los resultados obtenidos por ambas técnicas en los tratamientos I, II, III y en el IV, se observa que la expresión del gen *Syt1-1* y de su proteína aumentan por la adición de GDNF, disminuyen por la adición del inhibidor, y revierten parcialmente ambos efectos al adicionar tanto GDNF como el inhibidor. Por lo tanto, los cambios observados en la expresión de este gen y de su proteína parecen estar influenciados por la vía GDNF/ $GFR\alpha$ /RET, y más específicamente, a través del segundo mensajero PI3K. Nuevamente en este tratamiento se confirmó el resultado contrapuesto a lo descrito en células de mamíferos, en donde la adición de GDNF no parece tener efecto sobre la expresión de este gen (Ledda et al. 2007).

En las inmunocitoquímicas para GFAP se observó una gran disminución inicial seguida de un aumento en la marcación que se reflejó a las 72 hpt. Además, la marcación se observó en células que no desarrollaron su morfología estrellada y se asemejaron a las encontradas en el tratamiento II. En este caso, nuevamente se

observó una falta en la polimerización de GFAP en presencia del inhibidor que no permitió el desarrollo de la morfología típica celular asociada a sus filamentos intermedios (Hol y Capetanaki 2017). Al analizar la expresión génica de GFAP, se observó un comportamiento similar al hallado en las inmunocitoquímicas, con una expresión disminuida a las 24 y 48 h que se asemeja a la hallada en el tratamiento II y luego un gran aumento a las 72 h que superó a lo registrado en los tratamientos I, II y III. Por lo tanto, en este tratamiento durante las primeras horas prevalece el efecto inhibidor sobre la expresión génica y también sobre la síntesis proteica de GFAP, y luego ocurre una fuerte inducción en la expresión de esta proteína. La disminución inicial observada puede explicarse considerando que la enzima PI3K controla las acciones del ácido retinoico y de las citoquinas, que a su vez controlan la expresión de GFAP (Herrera et al. 2010). Por lo tanto, la molécula LY294002 podría inhibir tempranamente la expresión de GFAP a través de la inhibición de PI3K. Por otra parte, el gran aumento registrado para GFAP a las 72 hpt podría indicar una respuesta fisiológica frente a un ambiente nocivo para la supervivencia celular, tal como ha sido demostrado que ocurre en células de mamíferos frente a la neurodegeneración (Junier et al. 1994).

La expresión del gen anti-apoptótico Bcl-2 en este tratamiento fue inicialmente tan baja como la registrada en el tratamiento II, y luego aumentó a las 72 hpt hasta alcanzar nuevamente valores similares al tratamiento II. Por otro lado, la expresión del gen pro-apoptótico Bax fue idéntica a la registrada en el tratamiento III. Por lo tanto, se observa una respuesta del gen Bcl-2 similar en los tratamientos con inhibidor, y una respuesta de Bax asociada a los tratamientos con GDNF. Teniendo en consideración los resultados obtenidos y lo descrito por otros autores (Kosten et al. 2008; Dygalo et al. 2012; Tsybko et al. 2015), la inducción de GDNF parece actuar sobre Bax de forma independiente a PI3K, y por lo tanto, a través de otros segundos mensajeros. Por su parte, la expresión de Bcl-2 disminuye tanto frente a GDNF como frente al inhibidor pero de manera diferente. Por lo tanto, Bcl-2 parece ser inhibida por al menos dos mecanismos diferentes que explicarían los patrones hallados en los

tratamientos I a IV, con un mecanismo dependiente de GDNF y otro dependiente de PI3K.

Por último, la expresión del gen TRPa en este tratamiento disminuyó a las 72 hpt de manera muy similar a lo observado en el tratamiento II. Por lo tanto, la inhibición de la PI3K afecta negativamente la expresión de TRPa en esta etapa de desarrollo larval en donde comienza a expresarse endógenamente dicho gen, y este efecto parece ser independiente de GDNF.

En este tratamiento, la gran mortalidad larval registrada, la observación de las malformaciones descritas, los cambios en el patrón e intensidad de expresión de GFR α , el aumento de GFAP y el desbalance en la expresión de los genes que controlan la apoptosis, parecen evidenciar fuertes efectos de las moléculas GDNF y LY294002 sobre estos organismos, generando un ambiente nocivo para la supervivencia de éstos y una respuesta fisiológica multifactorial que podría actuar evitando la apoptosis.

Los resultados obtenidos en el **tratamiento V**, correspondiente a larvas que fueron expuestas al factor neurotrófico NRTN, mostraron importantes cambios.

Tal como se describió para GDNF, el factor NRTN actúa a través del complejo NRTN/GFR α /RET, y de acuerdo al tejido en donde esté presente y los segundos mensajeros asociados, inicia diversas cascadas intracelulares, y por lo tanto, induce diversas respuestas celulares (Airaksinen y Saarma 2002; Fielder et al. 2018).

Al igual que ocurrió con GDNF, el tratamiento con NRTN produjo una pérdida de la asimetría lateral en la expresión de GFR α , y un aumento en la concentración en el estómago de las larvas. Por lo tanto, ambos factores parecen ser capaces de eliminar o enmascarar las diferencias en la señalización celular entre el lado izquierdo y derecho de la larva y de concentrar la expresión de GFR α en el tubo digestivo. Adicionalmente, NRTN también generó un aumento en la concentración de GFR α en los ganglios laterales. En concordancia con lo hallado, en experimentos *in vitro* con células precursoras del SNE de mamíferos, se ha encontrado que tanto con la adición de GDNF como con NRTN se produce un aumento del desarrollo de los ganglios y la formación

de una extensa red de neuronas y glía interconectadas (D'Anglemon de Tassigny et al. 2015). Asimismo, en vertebrados se han destacado las funciones de NRTN sobre el Sistema Nervioso Parasimpático, que forma parte del Sistema Nervioso Periférico (SNP). En concordancia con lo descrito en vertebrados, en las larvas de *A. dufresnii*, este factor parece generar respuesta tanto en la inervación del tubo digestivo (el equivalente al SNE) como en los ganglios laterales, ambos componentes pertenecientes al Sistema Nervioso Periférico de la larva. Por lo tanto, este resultado sugiere que en larvas de *A. dufresnii* tanto GDNF como NRTN tienen algunas funciones en común con los vertebrados.

Por otro lado, con NRTN no se observó un aumento en la marca de GFR α , por lo que probablemente con este ligando no sea posible inducir el loop positivo que sí parece ocurrir con GDNF, y que sí ocurre en vertebrados con ambos factores (Luo et al. 2007; Koeberle y Bähr 2008). Al contrario que con GDNF, en este tratamiento no se observaron cambios morfológicos importantes en las larvas, pero hubo una mayor concentración de GFR α en la región de los brazos pre-orales, los ganglios laterales y el órgano apical; y más tardíamente en los extremos de los cuatro brazos. Estos resultados evidencian que este ligando es capaz de inducir algunas respuestas similares a las producidas por GDNF y otras respuestas diferentes.

Las inmunocitoquímicas con anti-1E11 mostraron un aumento en la marca a partir de las 48 hpt en los ganglios laterales y en la zona del estómago, y este último se hizo muy notorio las 72 hpt. Sin embargo, la expresión génica de *Syt1-1* no parece aumentar a lo largo del tiempo en este tratamiento y fue menor a la registrada en el control a las 72 hpt. Este resultado contradictorio pudo deberse a la falta de réplicas para cuantificar la expresión génica en este tratamiento. Sin embargo, dado que anti-1E11 marca específicamente neuronas, con las inmunocitoquímicas se pudo evidenciar el aumento en el desarrollo de la inervación del tubo digestivo y de los ganglios laterales, sugiriendo nuevamente que NRTN tiene algunas acciones inductoras del SNP similares a las descritas en células de mamíferos (D'Anglemon de Tassigny et al. 2015).

Las inmunocitoquímicas para GFAP mostraron inicialmente una marca tenue y luego un aumento en la intensidad, que se localizó en la región del órgano apical, la zona oral y el estómago. Si bien algunas células que expresan GFAP parecen adquirir su forma típica estrellada, las que poseen una marca más intensa de esta proteína no desarrollaron la estructura esperada. Estos resultados sugieren que NRTN ejerce una mayor estimulación sobre la expresión de GFAP, y que esta sobreexpresión podría acumularse en las células formando agregados, tal como se ha registrado en mamíferos (Messing et al. 1998).

Al analizar la expresión génica de GFAP a lo largo del tiempo, se observó que el tratamiento con NRTN induce un importante aumento en su expresión a las 48 hpt, que fue diferente al aumento gradual observado en el tratamiento con GDNF y que también difirió del tratamiento control. Estos resultados confirman que NRTN es capaz de estimular la expresión de GFAP de forma diferente a la estimulación que ejerce GDNF. Considerando que este aumento en la expresión génica de GFAP se encuentra asociado a un fenotipo particular y anómalo en las células gliales, ambos fenómenos podrían indicar una respuesta del organismo frente a un ambiente nocivo para el sistema nervioso con algunas características que se han descrito en otros modelos animales. Por ejemplo, en mamíferos el aumento abrupto de GFAP es señal de un fenómeno conocido como gliosis, en donde frente a un ambiente nocivo para el sistema nervioso, las células gliales sufren una serie de cambios y sobre-expresan GFAP protegiendo a las neuronas de la degeneración (Eng et al. 2000). Adicionalmente, en un modelo experimental de ratones que sobre-expresan GFAP, se ha detectado la formación de agregados en los astrocitos (componente mayoritario de la glía), que resultan en un fenotipo con neurodegeneración severa y muerte prematura (Messing et al. 1998).

En este contexto, el aumento abrupto a las 72 hpt de la expresión del gen proapoptótico Bcl-2 y de su par antagónico Bax, nuevamente ponen de manifiesto los severos efectos del tratamiento sobre la homeostasis celular, y la activación de mecanismos compensatorios para la supervivencia celular. Tales respuestas podrían ser la sobre-expresión de Bcl-2 y GFAP, que se contraponen a los efectos pro-

apoptóticos de Bax. Adicionalmente, en este tratamiento también se observó una baja supervivencia y una mayor fragilidad en los organismos, particularmente en los brazos post-orales.

Por último, la expresión de TRPa parece no alterarse en presencia de NRTN y este patrón se asemeja a lo hallado en el tratamiento control.

Todos los efectos mencionados, sugieren que el ligando farmacológico NRTN, que fue sintetizado a partir de una secuencia de mamíferos, es capaz de generar respuestas en las larvas de *A. dufresnii* y de producir algunos de los efectos hallados en mamíferos. Asimismo, estos resultados reflejan algunas respuestas celulares similares y otras diferentes a las halladas con GDNF, por lo que algunos de los mecanismos intracelulares de acción deben ser compartidos y otros diferentes.

Por último, los resultados obtenidos en el **tratamiento VI**, correspondiente a larvas que fueron expuestas al factor neurotrófico NRTN y al inhibidor LY294002, mostraron importantes cambios.

La expresión de GFR α se observó disminuida, y se concentró inicialmente en algunas células y fibras preferentemente de los brazos y luego en el órgano apical y el estómago. Este patrón fue diferente al hallado tanto en el tratamiento control, como en los distintos tratamientos que involucraron al inhibidor o a NRTN. Por lo tanto, ambas moléculas solas y también combinadas modulan la expresión y distribución de la proteína GFR α . Dado que en el tratamiento V se observó que NRTN no es capaz de estimular la expresión de GFR α , y en todos los tratamientos con LY294002 se observó una disminución inicial de esta proteína, la expresión de GFR α parece estar influenciada por la vía PI3K pero ser independiente de la activación de NRTN.

Las inmunocitoquímicas con anti-1E11 mostraron una expresión alta en el órgano apical a las 24 hpt que luego aumentó en la zona del estómago a las 72 hpt. Asimismo, la expresión de su gen *Syt1-1* aumentó a lo largo del tiempo, y ambos resultados se asemejaron a lo hallado en el tratamiento control. Por lo tanto, la activación de la expresión del gen *Syt1-1* mediante NRTN parece ocurrir a través de la

vía PI3K, y la adición del inhibidor parece anular los efectos del ligando NRTN y restablecer el patrón original.

Las inmunocitoquímicas para GFAP mostraron una disminución en la expresión, y al igual que en todos los tratamientos con inhibidor, nuevamente se observó una deficiencia en la adquisición de la morfología estrellada de las células que expresan esta proteína. Sin embargo, a las 72 hpt las células parecen recuperar parcialmente dicha morfología, evidenciando que los efectos fueron menos persistentes que en los otros tratamientos. Nuevamente, estos resultados confirmaron los efectos inhibitorios de LY24002 sobre la polimerización de este filamento intermedio. Sin embargo, la observación de este efecto menos persistente sugiere que el factor NRTN restablece parcialmente la actividad y funcionalidad de esta proteína.

Al analizar la expresión génica de GFAP se observó una disminución respecto al tratamiento V en el que se adicionó NRTN sólo, y un patrón idéntico al hallado en el tratamiento II, en el que se adicionó el inhibidor sólo. Asimismo, la expresión de los genes apoptóticos Bcl-2 y Bax, mostraron un patrón similar al hallado en el tratamiento V, con niveles bajos las primeras 48 hpt y luego un aumento a las 72 hpt. Sin embargo, en este tratamiento este aumento fue mucho menor en comparación con la expresión hallada en el tratamiento V. Por lo tanto, el efecto del inhibidor parece contrarrestar parcialmente los efectos del factor NRTN sobre los genes Bcl-2, Bax y GFAP. Este resultado indica que se podrían revertir parcialmente algunos de los efectos nocivos inducidos por NRTN, y por lo tanto, que estos efectos dependen parcialmente de la vía PI3K.

Por último, el patrón de expresión de TRPa parece aumentar levemente a las 72 hpt, revirtiendo la inhibición observada en los tratamientos II y IV con adición de LY294002, y asemejándose al tratamiento control.

Los efectos descriptos en este tratamiento coinciden con los resultados hallados en ensayos sobre células de mamíferos, en donde la adición del inhibidor LY294002 anula los efectos inducidos por los factores GDNF o NRTN (Koeberle y Bähr 2008). Sin embargo, en este caso se revierten los efectos parcialmente y sólo para

algunos de los genes estudiados. Estos resultados evidencian que si bien NRTN parece actuar a través de la vía PI3K, no todos sus efectos se pueden explicar por acción de la misma, y deben estar involucradas otras vías de señalización, tal como se ha descrito que ocurre en mamíferos (Airaksinen y Saarma 2002; Alsina 2015; Fielder et al. 2018).

Teniendo en consideración todas las variantes analizadas podemos sintetizar los resultados obtenidos de la siguiente forma:

✓ La expresión de la proteína GFR α aumenta por la adición de GDNF, se mantiene constante luego de la adición de NRTN y disminuye por la adición del inhibidor de PI3K, tanto al agregarse sólo como en combinación con GDNF o NRTN. De esta forma, la estimulación de la expresión del receptor GFR α parece estar asociada a la inducción de su ligando GDNF pero no de NRTN, y ocurrir a través del segundo mensajero PI3K.

✓ GDNF y NRTN modulan la distribución de GFR α en el Sistema Nervioso Periférico de la larva. Ambos ligandos producen la concentración de GFR α en la zona del tubo digestivo, el equivalente al SNE de las larvas; en los brazos pre y post-orales; y adicionalmente NRTN también genera la concentración de GFR α en los ganglios laterales. Además, NRTN produce la concentración de GFR α en el órgano apical, el Sistema Nervioso Central de la larva.

✓ La adición del inhibidor de PI3K reduce la distribución de GFR α , por lo que tanto la inducción de la expresión de GFR α como la distribución de la misma, parecen estar influenciados por la vía PI3K.

✓ Los ligandos GDNF y NRTN generan la pérdida de la asimetría lateral en la expresión de GFR α , y este efecto no se altera con la adición del inhibidor de PI3K. Por lo tanto, ambos factores parecen ser capaces de eliminar o enmascarar las diferencias en la señalización celular entre el lado izquierdo y derecho de la larva por mecanismos independientes de la vía PI3K.

✓ A diferencia de lo descrito para células de mamíferos, los ligandos GFLs afectan la expresión de Syt1-1. La expresión de este gen específico de sistema nervioso, aumenta por la adición de GDNF o NRTN y disminuye por la adición del inhibidor de PI3K. Asimismo, al incluir tanto el ligando GDNF o NRTN junto con el

inhibidor de PI3K se revierten parcialmente los efectos hallados en los tratamientos de activación e inhibición y se restablece el patrón original hallado en el control. Por lo tanto, los cambios observados en la expresión de Syt1-1 y de su proteína parecen estar influenciados en forma directa o indirecta por la vía GDNF/GFR α /RET, y más específicamente, por el segundo mensajero PI3K.

✓ GDNF estimula expresión de Syt1-1 tanto en el órgano apical (Sistema Nervioso Central), como en la región del tubo digestivo (equivalente al SNE), NRTN actúa sobre Syt1-1 exclusivamente sobre el Sistema Nervioso Periférico de la larva, estimulando su expresión en los ganglios laterales y el tubo digestivo.

✓ La expresión de GFAP a lo largo del tiempo se mantiene estable en el tratamiento control y aumenta al adicionar tanto GDNF como NRTN, pero este último ejerce una mayor estimulación sobre la expresión GFAP. Estos ligandos podrían actuar a partir de la activación de la enzima PI3K que controla las acciones del ácido retinoico y de las citoquinas, y que a su vez estimulan la expresión de GFAP.

✓ Tanto la adición de GDNF como NRTN estimulan la expresión de GFAP en el tubo digestivo de la larva. Adicionalmente, NRTN también es capaz de estimular la expresión de esta proteína en el Sistema Nervioso Central de la larva.

✓ La adición del inhibidor de PI3K produce una disminución inicial en la expresión de GFAP que podría ser causada por la inhibición específica que ejerce el tratamiento sobre la PI3K. Posteriormente, el gran aumento en la expresión de GFAP podría indicar una respuesta fisiológica frente a la toxicidad del tratamiento, tal como ha sido demostrado que ocurre en células gliales de mamíferos frente a la neurodegeneración y se conoce como gliosis.

✓ La pérdida de la morfología estrellada en las células que expresan GFAP hallada en todos los tratamientos con inhibidor, parece ser producto de una deficiencia en la polimerización de GFAP, que no logra formar los filamentos intermedios y se acumula en el núcleo celular formando agregados.

✓ En el tratamiento con inhibidor y NRTN, los efectos sobre la expresión de GFAP y su polimerización se revierten parcialmente luego de 72 hpt. Estos resultados evidencian que el factor NRTN restablece parcialmente la actividad y funcionalidad de esta proteína.

✓ En los tratamientos con inhibidor se registró una gran mortalidad inicial y una baja supervivencia a lo largo del tiempo. En los tratamientos con adición de GDNF se registraron malformaciones en el tubo digestivo de los individuos que se profundizaron al combinarlas con el inhibidor. En los tratamientos con adición de NRTN se registró una mayor fragilidad en los brazos post-orales. Estos cambios morfológicos podrían ser el resultado de una sobre-estimulación o desbalance de las vías de señalización río debajo de estos ligandos.

✓ En todos los tratamientos farmacológicos aplicados se alteró la expresión del gen anti-apoptótico Bcl-2 y del gen pro-apoptótico Bax. La expresión del gen Bcl-2 fue estimulada por el factor NRTN, y disminuida tanto por el factor GDNF como por el inhibidor de PI3K. La expresión de Bax fue estimulada tanto por la adición de los factores GDNF y NRTN como por la adición del inhibidor. Estos resultados afectan el balance de la supervivencia celular favoreciendo la apoptosis, y junto con el aumento registrado para GFAP, sugieren que hay daño celular.

✓ La expresión de TRPa no se modifica por la adición de los factores GDNF y NRTN, pero disminuye en los tratamientos con inhibidor, por lo tanto la activación de este gen está influenciada por el segundo mensajero PI3K. La única excepción es el tratamiento con inhibidor y NRTN, en donde parecen revertirse los efectos inhibitorios y recuperar niveles similares al control.

Por otra parte, el desarrollo de un protocolo de micromanipulación y microablación, utilizando algunos elementos analógicos y otros artesanales, resultó exitoso y permitió estudiar el fenómeno de la regeneración con exposición farmacológica a los activadores de la vía de los GFLs en larvas de *A. dufresnii* con una mínima mortalidad.

La extraordinaria capacidad de regeneración de los equinodermos, tanto de organismos adultos como de los estadios larvales ya ha sido registrada en otras ocasiones (Vickery et al. 2001; Candia Carnevali 2006; Mashanov et al. 2008; Rubilar 2010). Sin embargo, no encontramos registros de regeneración en lesiones similares a las que se realizaron en este trabajo.

Dadas las características particulares de la microablación ejercida, con un tamaño de aproximadamente 10 μm y efectuada sobre uno de los brazos post-orales, el organismo pierde los cilios en la región afectada, y se genera un patrón de nado anormal y circular. Este comportamiento natatorio es producido por un desbalance entre los cilios activos del lado derecho e izquierdo de la larva y permite monitorear la regeneración mediante la observación bajo lupa. En otras investigaciones no se han registrado comportamientos de nado anormales en larvas en regeneración. Esto se debe a que la bisección realizada a las larvas fue completa, es decir, separando totalmente la región anterior y la posterior del organismo, pero sin afectar asimétricamente los cilios que generan la locomoción (Vickery y McClintock 1998).

Se ha determinado que luego de una bisección completa, las larvas de equinodermos son capaces de regenerar la mitad faltante de su organismo en un lapso de 12 a 14 días (Vickery y McClintock 1998). Adicionalmente, en este trabajo de tesis se encontró que luego de una pequeña lesión de aproximadamente 10 μm , las larvas de *A. dufresnii* son capaces de regenerar sus tejidos a un lapso mucho menor. Luego de la lesión y en sólo 24 h, se cierra la herida evitando la exposición a posibles patógenos; se restablece la arquitectura de los tejidos afectados, haciendo casi imperceptible la zona ablacionada; y se restablece el patrón de nado. Esta última característica, sugiere que no sólo ocurrió una cicatrización de la zona afectada sino que se restableció su funcionalidad y el sistema nervioso que controla el movimiento ciliar.

Debido a que la mortalidad en los estadíos larvales de los equinodermos se considera extremadamente alta (Young y Chia 1987), esta gran capacidad de regeneración sumada a la capacidad de clonación también descrita en estos estadíos (Eaves y Palmer 2003), podrían ser adaptaciones que permitan a una mayor cantidad de organismos alcanzar la metamorfosis para convertirse en organismos adultos (Vickery y McClintock 1998).

Al analizar por inmunocitoquímica la expresión de GFR α y 1E11 durante el proceso de regeneración larval sin adición farmacológica (tratamiento II), es notable un aumento en la expresión de ambas proteínas en la zona afectada, y en el caso de

GFR α el aumento también se observa en el ganglio lateral asociado al brazo lesionado. Temporalmente, la expresión de GFR α y 1E11 es alta a las 24 hpt, y luego se atenúa a lo largo del tiempo, coincidiendo con los eventos de regeneración morfológicos y funcionales observados, en donde la mayor actividad ocurre en las primeras 24 hpt.

El aumento en la marca de 1E11 durante la regeneración en larvas de *A. dufresnii* sugiere que el sistema nervioso se encuentra activo y recuperando las neuronas perdidas en la lesión. Asimismo, el sistema nervioso podría estar participando en la inducción de la regeneración de los tejidos lesionados, una función que ha sido descrita previamente en organismos adultos (Mashanov et al. 2008, 2015; San Miguel-Ruiz et al. 2009).

Por su parte, la sobre-expresión de GFR α en la zona lesionada del brazo post-oral y su ganglio asociado, parece indicar que este receptor y muy probablemente sus cascadas de señalización, tienen algún tipo de participación en el fenómeno de la regeneración. Además, resulta notable que la asimetría lateralidad habitual de expresión de esta proteína se mantenga durante la regeneración y que coincida, en todos los casos, la mayor expresión en el brazo lesionado.

Al estudiar la regeneración con la adición farmacológica del factor neurotrófico GDNF, uno de los ligandos de GFR α (tratamiento IV), se hallaron varias similitudes con lo descrito para las larvas en regeneración del tratamiento II. Entre ellas está el aumento en la expresión de GFR α en la zona lesionada y el mantenimiento de la lateralidad de dicha proteína que coincide con el lado de la lesión. Sin embargo, el patrón de marca es más difuso y abarca un territorio mayor alrededor de la zona en regeneración. Esta observación parece indicar que tanto la lesión como el tratamiento con GDNF inducen cambios en la expresión local de GFR α .

Por otro lado, la marca con anti-1E11 en este tratamiento fue menor a la hallada en la zona lesionada en el tratamiento II de regeneración y se detecta un aumento en la zona del tubo digestivo. Dicho aumento se asemeja a los resultados hallados con el mismo factor en los experimentos de activación e inhibición farmacológica de la vía GFLs/GFR α /RET de este capítulo. Por lo tanto, los efectos de

GDNF sobre la expresión de 1E11 parecen ser predominantes en el tubo digestivo y son casi imperceptibles en la región en regeneración.

Al estudiar la regeneración con la adición farmacológica del factor neurotrófico NRTN, otro ligando de GFR α (tratamiento VI), se observó nuevamente expresión de GFR α en la región lesionada. Sin embargo, en este caso la intensidad de la marca de GFR α en la zona afectada fue la menor registrada de los casos de regeneración analizados y se perdió la asimetría lateral en la expresión de esta proteína. Por lo tanto, NRTN no parece aumentar la expresión de GFR α en la zona lesionada ni en el resto de la larva, un resultado que coincide con lo observado en los experimentos de activación e inhibición farmacológica de la vía GFLs/GFR α /RET de este capítulo.

Al estudiar la expresión de 1E11 en este tratamiento nuevamente se observaron las características descritas previamente en los experimentos de activación e inhibición farmacológica de la vía GFLs/GFR α /RET de este capítulo con adición de NRTN. Por lo tanto, la adición de NRTN no parece tener un efecto inductor evidente sobre la expresión de 1E11 en la zona en regeneración.

Estos resultados podrían indicar que tanto GDNF como NRTN aceleran el proceso de regeneración, y por lo tanto, a las 24 hpt se observa una regeneración que ya ha terminado y tanto GFR α como 1E11 se encuentran disminuyendo.

La familia de los GFLs, a la que pertenecen los ligandos GDNF y NRTN, forma parte de la superfamilia de los TGF β , y como ya se mencionó, sus receptores GFR α y RET activan múltiples cascadas de señalización que modulan los procesos de supervivencia, multiplicación, diferenciación, etc. (Fielder et al. 2018). Existen importantes evidencias que señalan a los miembros de la superfamilia de los TGF β como candidatos en la inducción del proceso de regeneración, tanto durante la fase temprana del proceso en donde predominan los eventos de reparación y diferenciación, como en la fase tardía en donde predomina la proliferación y la diferenciación celular (Candia Carnevali et al. 1998; Patruno et al. 2001). Sin embargo, hasta la fecha no se habían registrado estudios de los GFLs y/o sus receptores durante el proceso de regeneración en equinodermos.

Un antecedente importante que parece coincidir con los resultados hallados en este trabajo, fue realizado en crinoideos adultos de la especie *Antedon mediterranea*. En este estudio se detectó que durante la regeneración de uno de los brazos de este equinodermo, ocurre un aumento local de la cantidad de ligando endógeno maduro TGF β -1, de su receptor endógeno y de una isoforma que no estaba presente en el tejido sano (Patrino et al. 2002). Los resultados hallados en los experimentos de regeneración larval de este trabajo sugieren que el receptor GFR α tiene cierta participación local durante el fenómeno de regeneración y que sus ligandos farmacológicos GDNF y NRTN modifican la expresión de dicho receptor. Adicionalmente, también se observa mediante el antígeno 1E11, la presencia del tejido nervioso en la zona afectada.

Estos resultados sugieren indicios relevantes sobre la participación de los GFLs y su cascada de señalización en el fenómeno de regeneración, ampliando el conjunto de moléculas inductoras conocido hasta la fecha. Sin embargo, aún quedan muchos interrogantes en los que será necesario profundizar para lograr un entendimiento integral sobre el fenómeno de la regeneración y la regulación que ejerce esta cascada de señalización.

Conclusiones del capítulo 4

Los ligandos farmacológicos GDNF y NRTN, que fueron sintetizados a partir de secuencias de mamíferos, son capaces de generar respuestas en las larvas de *A. dufresnii* y de producir algunos de los efectos hallados en mamíferos.

Las acciones de estos factores se localizan principalmente en la zona del órgano apical y el tubo digestivo, que se corresponden con el Sistema Nervioso Central y con el equivalente al SNE de las larvas.

Algunas de las respuestas obtenidas luego de la adición de GDNF o NRTN fueron similares y otras respuestas fueron diferentes, por lo que algunos de los mecanismos intracelulares de acción deben ser compartidos entre estos factores y otros diferentes.

Cada factor genera distintas respuestas en los diversos tejidos de las larvas, evidenciando que tanto GDNF como NRTN poseen características pleiotrópicas, y por lo tanto, que se encuentran asociados a múltiples vías de señalización intracelular.

Larvas de *A. dufresnii* con una pequeña lesión regeneran los tejidos restableciendo la funcionalidad de nado en sólo 24 h.

Durante el proceso de regeneración de la lesión inducida, se sobre-expresa el receptor GFR α en la zona afectada y el ganglio lateral más cercano, sugiriendo que su cascada de señalización tiene algún tipo de participación en este fenómeno.

La expresión del antígeno 1E11 aumenta levemente en la zona afectada, sugiriendo que el sistema nervioso se encuentra activo durante la regeneración.

La adición de los factores GDNF o NRTN en las larvas en regeneración modifica el patrón de GFR α y 1E11 hallado.

Discusión general

El desarrollo de un organismo pluricelular es un fenómeno complejo. Comienza luego de la fecundación con la formación de un cigoto, que a través del desarrollo embrionario y larval dará origen a un organismo completo, y se mantiene a lo largo de toda su vida, en fenómenos como la renovación celular, la metamorfosis y la regeneración (Gilbert 2000). En este contexto, la señalización intercelular mediada por los factores de crecimiento y/o factores neurotróficos, es crucial para la formación de patrones estructurales que guíen el desarrollo embrionario y larval, la organización del sistema nervioso y la regeneración (Weiskirchen 2009; Friedman 2012).

En esta tesis doctoral, se han abordado algunos aspectos de la biología del desarrollo del equinodermo *Arbacia dufresnii* (Echinodermata: Echinoidea). Inicialmente, se describió el desarrollo embrionario y larval de *A. dufresnii*. Los resultados obtenidos concordaron y profundizaron las descripciones previas realizadas para esta especie (Bernasconi 1942; Brogger 2005), a la vez que presentaron una considerable similitud con otras especies de equinoideos (Gianguzza y Bonaviri 2013). Luego se determinaron algunas de las condiciones más importantes para el cultivo en condiciones de laboratorio de estos organismos. Se determinó la concentración óptima de gametas femeninas y masculinas de *A. dufresnii*, que garantiza una fecundación eficiente en condiciones de laboratorio. Se eligió la temperatura de cultivo que permite un desarrollo embrionario y larval saludable y rápido. Y se evidenció que el origen de los óvulos presenta una fuerte influencia en el desarrollo de cada progenie, es decir, que en esta especie existe una fuerte herencia maternal. Con esta información se desarrolló un protocolo sencillo para la fecundación y el cultivo de embriones y larvas de *A. dufresnii* en condiciones de laboratorio. Este protocolo fue utilizado satisfactoriamente para la obtención de organismos que fueron el objeto de estudio en este trabajo. De esta forma, los aportes de este trabajo contribuyen al conocimiento de la biología durante los primeros estadíos de la especie, y se proporciona un método efectivo para su cultivo en condiciones de laboratorio. Esta metodología podría ser útil como una herramienta y punto de partida para futuros trabajos de investigación enfocados en estadíos embrionarios y larvales de esta especie u otras emparentadas.

A continuación, utilizando herramientas bioinformáticas y dos bases de datos construidas con transcriptomas de *A. dufresnii*, se buscaron, seleccionaron y caracterizaron secuencias génicas de la especie que podrían verse afectadas por la acción de la familia de factores neurotróficos GFLs. Los genes candidatos fueron Bcl-2, Bax, Syt1-1, TRPa, GFAP y GFR α , que se expresan en el sistema nervioso (Airaksinen y Saarma 2002; Südhof 2002; Luo et al. 2007; Hol y Pekny 2015; Polčic et al. 2015), y los genes Actina, Rpl8, GAPDH y EF1- α 1 que son comúnmente utilizados como genes constitutivos (Livak y Schmittgen 2001; Curina et al. 2017).

Las técnicas aplicadas involucraron alineamientos globales con una amplia variedad de secuencias en organismos filogenéticamente distantes, búsqueda de dominios y patrones proteicos característicos, y comparaciones de pares del conjunto de secuencias (Xiong 2006). Con esta información, se pudo determinar homología entre las secuencias de diferentes especies (Rost 1999), y se corroboró que las secuencias seleccionadas para *A. dufresnii* correspondan a cada gen candidato. Como resultado se obtuvieron las secuencias de *A. dufresnii* de todos los genes propuestos a excepción de GFR α . En este último caso, se utilizó una secuencia hallada en *Strongylocentrotus purpuratus* (NCBI XP_792667.3), un organismo emparentado a la especie de estudio. Sin embargo, posteriormente este gen tampoco pudo ser amplificado con los partidores diseñados a partir de la secuencia de *S. purpuratus*. Estas dificultades se deben muy posiblemente a la gran divergencia génica que presenta este gen a lo largo de la filogenia. Una de las características distintivas de GFR α es el patrón altamente conservado en la ocurrencia y posición del aminoácido cisteína (Airaksinen et al. 2006). Sin embargo, la secuencia aminoacídica circundante a la cisteína no se mantiene conservada, y dificulta tanto la tarea de búsqueda de secuencias candidatas, como del diseño de partidores. La utilización de la secuencia de *S. purpuratus* para el diseño de los partidores implicó cierta incertidumbre y finalmente no resultó adecuada. Una aproximación más eficiente para este tipo de genes, involucraría estudios más complejos que permitan dar un mayor peso a la ocurrencia y a la posición de las cisteínas, así como también a sus implicancias sobre

la estructura tridimensional de la proteína madura (Hätinen et al. 2007; Goodman et al. 2014).

La información obtenida mediante herramientas bioinformáticas, se utilizó para diseñar dos pares de partidores para cada gen candidato, que luego fueron útiles para estudiar la expresión génica de los mismos. Estos partidores podrían utilizarse en estudios posteriores ya que probaron ser eficientes para la amplificación y cuantificación de la expresión génica en *A. dufresnii*. Adicionalmente, las secuencias halladas para estos genes podrían ser revisadas y anotadas en bases de datos génicas de acceso público, siendo un aporte de utilidad para estudios posteriores en la misma especie y contribuyendo al conocimiento de la genética de *A. dufresnii*.

Posteriormente, se estudió el sistema nervioso en desarrollo de *A. dufresnii*. Para alcanzar este objetivo, se aplicaron técnicas de inmunocitoquímica utilizando los anticuerpos anti-1E11 y anti-GFSK como marcadores neuronales, el anticuerpo anti-GFAP como marcador glial y el anti-GFR α como marcador de células sensibles a la familia de factores neurotróficos GFLs; y técnicas de biología molecular para estudiar la expresión de los genes candidatos seleccionados mediante bioinformática.

La utilización del anticuerpo monoclonal anti-1E11 permitió observar la aparición de los componentes del sistema nervioso en larvas de *A. dufresnii* durante el periodo del desarrollo estudiado. Este anticuerpo marcó todas las estructuras neurales esperadas, coincidiendo en temporalidad, localización y morfología con descripciones previas realizadas en otras especies de equinodermos (Nakajima et al. 2004a, b; Nakano et al. 2006).

El anticuerpo policlonal anti-GFSK (Díaz-Miranda et al. 1992) presentó inmunomarcación específica y permitió identificar expresión del péptido GFSKLYFamide a lo largo del desarrollo, localizándose en algunas estructuras en formación del Sistema Nervioso Central y Periférico de la larva. Este péptido ha sido descrito sólo en equinodermos adultos (Díaz-Miranda et al. 1992; Abayomi y Boonsirm 2015), por lo que estos resultados representan la primer evidencia de su presencia en los estadíos larvales de equinodermos.

El anticuerpo monoclonal anti-GFAP permitió identificar células que expresan GFAP, una proteína específica de células gliales (Hol y Pekny 2015). Esta evidencia asociada a la morfología particular en las células marcadas, que coincide con las características de las células gliales (Cardone y Roots 1990), y la localización específica en la región que rodea al tubo digestivo, indican que podría tratarse de la presencia de células gliales en larvas de equinodermos. La presencia de Glía Radial en el sistema nervioso de los equinodermos es una de las características más sobresalientes que los equinodermos comparten con los cordados, sin embargo, hasta la fecha sólo se había reportado su presencia en organismos juveniles y adultos (Mashanov et al. 2009), y los resultados de este trabajo representan la primer evidencia de su presencia en los estadios larvales de equinodermos.

En conjunto, estos resultados describen por primera vez dos tipos celulares del sistema nervioso larval de los equinodermos. Las neuronas peptidérgicas que sintetizan GFSKLYFamide, y las células gliales, un tipo celular que sólo de ha descrito en vertebrados, y mas recientemente, en equinodermos adultos. Estos hallazgos aportan una visión mas profunda del desarrollo del sistema nervioso en larvas de otros equinodermos, a la vez que evidencian su gran complejidad.

El anticuerpo policlonal anti-GFR α , que marca específicamente al receptor de la vía de factores neurotróficos GFLs (Serra et al. 2005), dio resultados positivos tanto en embriones como en larvas de *A. dufresnii*. El patrón observado para la expresión de esta proteína, coincidió con las regiones en donde se encuentra el Sistema Nervioso Central y Periférico de la larva, pero delimitó un territorio más amplio que el hallado con el anticuerpo anti-1E11. Sorprendentemente, la expresión de esta proteína pareció concentrarse en las regiones que se encuentran en activo crecimiento en *A. dufresnii*, y a lo largo del desarrollo larval se volvió muy notorio un patrón diferencial de expresión entre el lado izquierdo y el derecho de la larva. Este hecho podría indicar la participación de GFR α en mecanismos de proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Airaksinen et al. 1999; Airaksinen y Saarma 2002; Fielder et al. 2018), y posteriormente, su participación en mecanismos formadores de asimetría lateral (Luo y Su 2012), que han sido asociados a la vía de señalización mediada por

los GFLs en vertebrados. Por lo tanto, estos resultados constituyen la primer evidencia experimental de la presencia del receptor de la vía de señalización de los GFLs en invertebrados deuterostomados, respaldando las descripciones *in silico* de Hatinen (2006), y sugiriendo la presencia de funciones conservadas filogenéticamente para esta familia de factores neurotróficos.

El análisis de la expresión de los genes de interés se realizó mediante la técnica de PCR cuantitativa y utilizando los partidores diseñados mediante bioinformática en esta tesis. Todos los genes candidatos propuestos, se pudieron amplificar satisfactoriamente a excepción de GFR α y Actina. En el caso del gen de Actina, los partidores no resultaron específicos para una sola isoforma de la proteína, debido a la gran similitud de secuencia entre sus diferentes isoformas (Perrin y Ervasti 2010).

En el caso GFR α , como ya se mencionó, los partidores no permitieron la amplificación de ningún transcrito, y esto probablemente se debió a que la secuencia utilizada para el diseño de los mismos provino de *S. purpuratus* y no fue lo suficientemente similar para amplificar el gen en *A. dufresnii*. En contraposición con este resultado, la expresión de su proteína sí pudo detectarse utilizando un anticuerpo específico desarrollado en mamíferos. Los resultados hallados en este trabajo, evidencian que si bien hay gran divergencia en la secuencia nucleotídica de esta proteína, existen algunas regiones que conservan filogenéticamente la estructura tridimensional de la proteína resultante.

Se ha descrito que durante el desarrollo, el fenómeno de la apoptosis tiene un rol fundamental en la morfogénesis (Penalosa et al. 2006). En concordancia con esto, durante el desarrollo larval de *A. dufresnii* se observaron variaciones en la expresión de los genes apoptóticos Bcl-2 y Bax a lo largo del tiempo analizado. La expresión de ambos genes fue alta en los embriones en estadios de gástrula, correlacionando con un conocido efecto protector frente a la apoptosis en esta etapa (Vega Thurber y Epel 2007). Posteriormente, se sabe que la apoptosis cobra mayor relevancia mientras el organismo se desarrolla (Roccheri et al. 2002), y consistentemente con ello, los transcritos de ambos genes disminuyeron abruptamente.

La expresión del gen TRPa, asociado a la captación de estímulos térmicos, presentó un máximo en el estadio de gástrula y luego disminuyó manteniéndose estable en los siguientes días analizados. La expresión del gen GFAP, asociado a la diferenciación de células especializadas del sistema nervioso, presentó un patrón similar al descrito para TRPa, con un máximo en el estadio de gástrula seguido de una disminución a lo largo del desarrollo hasta estabilizarse. En ambos casos, este patrón de expresión puede explicarse considerando la existencia de herencia materna de los transcritos que proporcionen una ventaja adaptativa para la supervivencia del organismo, como se ha demostrado que ocurre en varias especies de vertebrados e invertebrados (Tadros y Lipshitz 2009; Rauwerda et al. 2016; Musacchia et al. 2017). Adicionalmente, la inmunomarcación de la proteína GFAP presentó un patrón inverso, es decir, que mientras los transcritos para GFAP disminuyen a lo largo del desarrollo larval, la presencia de la proteína aumenta. Por lo tanto, los resultados hallados para la expresión de los genes TRPa y GFAP, junto a la inmunomarcación de la proteína GFAP, y los resultados hallados en el capítulo 1 de esta tesis sobre el desarrollo larval de distintas progenies, sugieren que en *A. dufresnii* existe una fuerte herencia maternal.

La expresión del gen Syt1-1, asociado a la diferenciación y maduración celular al fenotipo neuronal (Südhof 2002), mostró un aumento en tres etapas a lo largo del tiempo que quintuplicó sus valores entre el día 1 y 12. Este patrón de expresión génica concuerda con la aparición creciente de la proteína Syt1-1, evidenciada en las inmunocitoquímicas con el anticuerpo anti-1E11, y con el desarrollo y la maduración del sistema nervioso observado en las larvas. Debido a esta correlación hallada entre los transcritos y la proteína para este gen, concluimos que su expresión debe ocurrir *de novo* en la larva, es decir, que es de tipo endógena.

En conjunto, la información obtenida en este trabajo permitió caracterizar el sistema nervioso, conocer la expresión génica y/o la presencia y localización de ciertas proteínas específicas a lo largo de las primeras dos semanas de desarrollo larval en *A. dufresnii*. De esta forma, se generó una línea de base que nos permite entender cómo se desarrolla el sistema nervioso en condiciones de laboratorio, y que

luego será útil para entender cómo responde el organismo frente a estímulos neurotróficos farmacológicos.

Por último, se estudió en larvas de *A. dufresnii* de una semana de desarrollo los efectos que ejercen los factores neurotróficos GDNF y NRTN farmacológicos, miembros de los GFLs e inductores de la vía GFLs/GFR α /RET; los efectos que ejerce la molécula LY294002, un inhibidor parcial de dicha vía; y los efectos que ejercen GDNF y NRTN durante la regeneración de una fracción de tejido de estos organismos.

Los **factores neurotróficos** como GDNF y NRTN, son moléculas típicamente secretadas en forma limitante en un organismo y regulan varios aspectos de la función celular, como la supervivencia, la proliferación, la migración y la diferenciación (Byrne y Roberts 2009). Debido a su gran importancia, las mutaciones y/o desbalances en alguno de estos factores, en sus receptores o en sus segundos mensajeros intracelulares, puede ocasionar profundos efectos en el desarrollo de los órganos o de su función fisiológica (Byrne y Roberts 2009; Mina 2014). En larvas de *A. dufresnii*, la adición de los factores GDNF o NRTN, así como también del inhibidor LY294002 y las combinaciones entre ellos, influyeron sobre la expresión de todos los genes cuantificados, sobre la presencia y distribución de las proteínas analizadas y sobre la morfología y supervivencia de los organismos. Los resultados hallados en este trabajo, evidencian profundos efectos en los organismos expuestos que podrían ser consecuencia de una sobre-estimulación o desbalance de las vías de señalización de la cascada GFLs/GFR α /RET.

En vertebrados, las acciones de los GFLs son cruciales para el desarrollo y el mantenimiento de distintas poblaciones de neuronas del Sistema Nervioso Central (SNC) y del Sistema Nervioso Periférico (SNP), así como también, para la organogénesis de los riñones y la espermatogénesis (Airaksinen y Saarma 2002; Kallijärvi et al. 2012). En particular, se ha demostrado que la adición GDNF o NRTN en células precursoras del Sistema Nervioso Entérico (SNE) de rata favorece la supervivencia, la proliferación y el agrupamiento de las mismas dando como resultado una extensa red de neuronas y glía interconectadas (D'Anglemont de Tassigny et al.

2015). Las respuestas observadas en las larvas de *A. dufresnii* frente a la estimulación con estos factores, se localizaron principalmente en la zona del órgano apical y el tubo digestivo. Sorprendentemente, estas regiones se corresponden con el SNC, y el SNP, principalmente en la región que inerva el tubo digestivo de las larvas y es equivalente al SNE. Estos resultados aportan la primer evidencia de las acciones de los GFLs en equinodermos y sugieren que tanto en vertebrados como en larvas de equinodermos la familia de ligandos GFLs podría actuar sobre tejidos similares.

Algunas de las respuestas obtenidas en las larvas de *A. dufresnii* luego de la adición de GDNF o NRTN fueron similares entre sí y otras respuestas fueron diferentes. Este resultado sugiere que de manera similar a lo que ocurre en vertebrados, algunos de los mecanismos intracelulares activados por cada uno de los ligandos deben ser compartidos, mientras que otros mecanismos deben ser diferentes (Airaksinen y Saarma 2002; Fielder et al. 2018).

Por otra parte, se observó cada factor (GDNF o NRTN) generó distintas respuestas en los distintos tejidos de las larvas, evidenciando que cada uno posee efectos pleiotrópicos en *A. dufresnii*. Este resultado sugiere que ambas moléculas se encuentran asociadas a múltiples vías de señalización intracelular, una característica clásica que poseen los factores neurotróficos (Korsching 1993).

Por último, se estudió el fenómeno de la regeneración, y el efecto que ejercen estos factores neurotróficos durante este proceso. Para alcanzar este objetivo se practicaron microablaciones de una fracción de tejido en larvas de *A. dufresnii*, y se observó la recuperación en condiciones de laboratorio y en presencia o ausencia de los factores neurotróficos GDNF o NRTN.

Es importante destacar que en todas las clases de equinodermos, la regeneración es un fenómeno fisiológico común tanto en adultos como en larvas e incluso forma parte del ciclo reproductivo de algunas especies (Vickery et al. 2001; Candia Carnevali 2006; Mashanov et al. 2008; Rubilar 2010). Se ha determinado que luego de una bisección completa, las larvas de equinodermos son capaces de regenerar la mitad faltante de su organismo en un lapso de entre 12 y 14 días (Vickery

y McClintock 1998). Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo indican en larvas de *A. dufresnii* que se encuentran regenerando una porción más pequeña de su tejido este proceso ocurre en sólo 24h. En este corto periodo de tiempo, se cierra la herida, se reorganizan los tejidos y se recupera la funcionalidad de la zona afectada. Estos resultados complementan los clásicos trabajos realizados en larvas de la estrella de mar *Pisaster ochraceus* (Vickery y McClintock 1998), contribuyendo al conocimiento de un fenómeno muy común en equinodermos, pero poco estudiado en los estadios larvales por la complejidad metodológica que ello implica.

En las larvas de *A. dufresnii* en regeneración se observó un aumento de la presencia del receptor $GFR\alpha$ en la zona afectada y en el ganglio lateral más cercano, así como también un leve aumento de la presencia del marcador neuronal 1E11 en la zona afectada. Los resultados presentados en este trabajo, sugirieron que tal como se ha encontrado en equinodermos adultos, el sistema nervioso se encuentra activo durante dicho fenómeno (Mashanov et al. 2008, 2015; San Miguel-Ruiz et al. 2009). Mas importante aún, resulta el aumento en la marcación de $GFR\alpha$ en zonas específicas, que evidencia que esta cascada podría tener algún tipo de participación durante el proceso de regeneración.

En equinodermos adultos se ha descrito que durante el proceso de regeneración el tejido nervioso libera factores regulatorios que actúan tanto en forma paracrina como autocrina y que son cruciales para que la regeneración tisular suceda (Patruno et al. 2001, 2002; Thorndyke et al. 2001; Candia Carnevali 2006). Al analizar cualitativamente la respuesta de las larvas en regeneración expuestas a los factores GDNF o NRTN se observó una modificación en el patrón de marca hallado tanto para la proteína $GFR\alpha$ como en 1E11. En este contexto, el aumento observado en las regiones en regeneración de la presencia de $GFR\alpha$ y 1E11, junto a la modificación en el patrón de aparición de estos marcadores luego de la exposición a los factores neurotróficos, sugieren que la cascada de señalización GFLs/ $GFR\alpha$ /RET podría tener alguna participación y/o influencia en este fenómeno.

En conjunto, los resultados de este trabajo, indican que la exposición a los ligandos farmacológicos GFLs (GDNF y NRTN), que fueron sintetizados a partir de secuencias génicas de mamíferos (Lin et al. 1993; Kotzbauer et al. 1996), fueron capaces de generar respuestas en las larvas de *A. dufresnii*. Estas respuestas fueron registradas tanto en condiciones de cultivo normales como en condiciones de regeneración, y más importante aún, es que estos ligandos fueron capaces de producir algunos de los efectos descritos en mamíferos (Airaksinen y Saarma 2002; Fielder et al. 2018).

Este trabajo aporta la primer evidencia de los efectos de la activación farmacológica de la familia de factores neurotróficos GFLs de mamíferos sobre invertebrados. En investigaciones previas, se encontró que en el invertebrado protostomado *D. melanogaster*, la activación mediante técnicas moleculares de D-ret desencadena respuestas similares a las halladas en vertebrados. Sin embargo, el dominio extracelular de este receptor se encuentra menos conservado y es incapaz de interactuar con el complejo GDNF/GFR α ¹ de mamíferos (Abrescia et al. 2005; Hidalgo et al. 2011). Los hallazgos descritos en este trabajo, sugieren que a diferencia de lo encontrado en el invertebrado protostomado *D. melanogaster*, en el invertebrado deuterostomado *A. dufresnii*, los GFLs de mamíferos logran activar a ret, presumiblemente a través del receptor GFR α de equinodermos, y desencadenar importantes respuestas celulares. A partir de estos resultados y de las inmunocitoquímicas realizadas, podemos inferir que si bien la secuencia nucleotídica de GFR α posee gran divergencia a lo largo de la filogenia, la estructura tridimensional de los sitios de unión a los ligandos GDNF y NRTN, así como también, el sitio de reconocimiento del anticuerpo anti-GFR α utilizado, se encuentran conservadas y son capaces de interactuar con los ligandos de mamíferos, en contraposición a lo hallado en organismos más distantes como *D. melanogaster*.

Adicionalmente, estos resultados refuerzan la utilidad de los equinodermos como modelo animal para estudios de genética molecular, enfocados en la comprensión de los mecanismos moleculares del desarrollo de los Deuterostomados.

Sin embargo, aún quedan muchos interrogantes en los que será necesario profundizar para comprender cuales componentes de esta cascada de señalización se encuentran presentes en estos invertebrados deuterostomados, y cuáles son las respuestas que se asocian directamente a la misma.

Conclusiones generales

El desarrollo embrionario y larval de *Arbacia dufresnii* fue similar a otras especies descritas del mismo género, y se vió afectado por la temperatura, el tiempo y el origen de la progenie, sugiriendo una importante influencia maternal. Se pudieron determinar algunas condiciones que optimizan el cultivo en laboratorio de larvas de *A. dufresnii*.

El desarrollo del sistema nervioso larval presentó características similares a otras especies de erizos de mar evidenciadas a partir del marcador de neuronas 1E11. Adicionalmente, se encontró la presencia de neuronas peptidérgicas que expresan GFSKLYFamide, y de células con características de Glía Radial, que expresan GFAP. Estas moléculas sólo habían sido halladas en equinodermos adultos y evidencian la gran complejidad que tiene el sistema nervioso larval de los equinodermos.

Se observó una rápida recuperación tisular y funcional de la zona microablacionada que se encuentra en regeneración. Estas observaciones contribuyen al conocimiento de un fenómeno muy común en equinodermos, pero poco estudiado en larvas por la complejidad que ello implica.

Se hallaron secuencias génicas de nueve proteínas de *A. dufresnii*, correspondientes a proteínas específicas del sistema nervioso, proteínas que podrían verse afectadas por la acción de la familia de factores neurotróficos GFLs y proteínas constitutivas. Las secuencias halladas podrán ser revisadas y anotadas en bases de datos génicas contribuyendo a estudios posteriores.

La expresión de los genes seleccionados mostró variaciones a lo largo de los primeros 14 días post fecundación, y luego de la exposición a los ligandos farmacológicos GFLs de mamíferos (GDNF y NRTN) y/o el inhibidor LY294002, todos los genes modificaron su expresión. Tanto las larvas expuestas sanas como las que se encontraban en regeneración presentaron importantes respuestas en su morfología, supervivencia y en el patrón de las proteínas inmunodetectadas.

No fue posible hallar la secuencia nucleotídica de GFR α debido a la gran divergencia de este gen a lo largo de la filogenia. Sin embargo, la estructura

tridimensional de los sitios de unión a los ligandos GDNF y NRTN, así como también, el sitio de reconocimiento del anticuerpo anti-GFR α utilizado, se encuentran conservadas y son capaces de interactuar con los ligandos de mamíferos.

Algunos de los efectos registrados luego de la exposición farmacológica a GDNF, NRTN y/o el inhibidor LY294002 fueron similares a los descritos en mamíferos, en particular, sus acciones sobre tejidos similares como el SNC u órgano apical y el SNE de la larva.

Se observó que cada factor (GDNF o NRTN) generó distintas respuestas en los distintos tejidos de las larvas de *A. dufresnii*, y que algunas de las respuestas provocadas por cada uno de estos factores fueron similares, mientras que otras fueron diferentes. Estos efectos pleiotrópicos son típicos de los factores neurotróficos de vertebrados.

Por lo tanto, este trabajo aporta la primer evidencia de los efectos de la activación farmacológica de la familia de factores neurotróficos GFLs de mamíferos sobre invertebrados. A diferencia de lo encontrado en el invertebrado protostomado *D. melanogaster*, en el invertebrado deuterostomado *A. dufresnii*, los GFLs de mamíferos logran activar a ret, presumiblemente a través del receptor GFR α de equinodermos, y desencadenar importantes respuestas celulares.

Bibliografía

- Abayomi A, Boonsirm W (2015) Expression of GFSKLYFamide-like neuropeptide in the digestive system of the sea cucumber *Holothuria scabra* (Echinodermata). *African J Biotechnol* 14:2124–2129.
- Abbott NJ, Williamson R, Maddock L (1995) *Cephalopod neurobiology : neuroscience studies in squid, octopus, and cuttlefish*. Oxford University Press
- Abrescia C, Sjöstrand D, Kjaer S, Ibáñez CF (2005) *Drosophila* RET contains an active tyrosine kinase and elicits neurotrophic activities in mammalian cells. *FEBS Lett* 579:3789–3796.
- Adams DK, Sewell MA, Angerer RC, Angerer LM (2011) Rapid adaptation to food availability by a dopamine-mediated morphogenetic response. *Nat Commun* 2:592.
- Adams JM, Cory S (2007) The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 26:1324-1337
- Adoutte A, Balavoine G, Lartillot N, et al (2000) The new animal phylogeny: reliability and implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:4453–4456.
- Airaksinen MS, Holm L, Hättinen T (2006) Evolution of the GDNF family ligands and receptors. *Brain Behav Evol* 68:181–190.
- Airaksinen MS, Saarma M (2002) The GDNF family: Signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci* 3:383–394.
- Airaksinen MS, Titievsky A, Saarma M (1999) GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant? *Mol Cell Neurosci* 13:313–325.
- Alexander SPH, Martie A, Peters JA (2011) Guide to receptors and channels (GRAC). *Br J Pharmacol* 164:S1–S324
- Alsina FC (2015) Regulación negativa de las señales inducidas por los factores neurotróficos y sus receptores en neuronas en desarrollo. Facultad de Cs Nat y Exactas. Universidad de Buenos Aires.
- Alvarado AS, Tsonis PA (2006) Bridging the regeneration gap: genetic insights from diverse animal models. *Nat Rev Genet* 7:873–884.
- Alvarado JJ, Solís-Marín FA (2013) Echinoderm research and diversity in Latin America. En: Alvarado JJ, Solís-Marín FA (eds) *Echinoderm research and diversity in Latin America*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Angerer LM, Angerer RC (2000) Animal-vegetal axis patterning mechanisms in the early sea urchin embryo. *Dev Biol* 218: 1-12.
- Angerer LM, Yaguchi S, Angerer RC, Burke RD (2011) The evolution of nervous system patterning: insights from sea urchin development. *Development* 138:3613–3623.

- Aouacheria A, Rech De Laval V, Combet C, Hardwick JM (2013) Evolution of Bcl-2 homology (BH) motifs-homology versus homoplasy Spotting diversity in the Bcl-2 portrait gallery. *Trends Cell Biol* 23:103–111.
- Appeltans W, Ahyong ST, Anderson G, et al (2012) The magnitude of global marine species diversity. *Curr Biol* 22:2189–2202.
- Arizzi Novelli A, Argese E, Tagliapietra D, et al (2002) Toxicity of tributyltin and triphenyltin to early life-stages of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea). *Environ Toxicol Chem* 21:859–864.
- Attwood T, Parry-Smith D (1999) *Introduction to Bioinformatics*. Pearson Education India.
- Autenrieth F, Isralewitz B, Luthey-Schulten Z, et al. (2005) *Bioinformatics and sequence alignment*. University of Illinois at Urbana-Champaign.
- Baloh RH, Enomoto H, Johnson EM, Milbrandt J (2000) The GDNF family ligands and receptors — implications for neural development. *Curr Opin Neurobiol* 10:103–110.
- Baloh RH, Gorodinsky A, Golden JP, et al (1998a) GFR3 is an orphan member of the GDNF neurturin persephin receptor family. *Neurobiology* 95:5801-5806.
- Baloh RH, Tansey MG, Golden JP, et al (1997) TrnR2, a novel receptor that mediates neurturin and GDNF signaling through Ret. *Neuron* 18:793–802.
- Baloh RH, Tansey MG, Lampe PA, et al (1998b) Artemin, a novel member of the GDNF ligand family, supports peripheral and central neurons and signals through the GFRalpha3-RET receptor complex. *Neuron* 21:1291–302.
- Bandell M, Story GM, Hwang SW, et al (2004) Noxious Cold Ion Channel TRPA1 Is Activated by Pungent Compounds and Bradykinin. *Neuron* 41: 849-57
- Barbacid M (1995) Neurotrophic factors and their receptors. *Curr Opin Cell Biol* 7:148–155.
- Barde YA (1994) Neurotrophic factors: An evolutionary perspective. *J Neurobiol* 25:1329–1333.
- Beer A-J, Moss C, Thorndyke M (2001) Development of Serotonin-like and SALMFamide-like immunoreactivity in the nervous system of the sea urchin *Psammechinus miliaris*. *Biol Bull* 200:268–280.
- Bernasconi I (1942) Primeros estados larvales de *Arbacia dufresnei* (Blv.). *Physis*, 19(53): 305-317.
- Bernasconi I (1966) Los Equinodermos recolectados por el Walther Herwig en el Atlántico Sudoeste. *Hidrobiologia* 3:289-334.

- Bespalov MM, Saarma M (2007) GDNF family receptor complexes are emerging drug targets. *Trends Pharmacol Sci* 28:68–74.
- Bespalov MM, Sidorova YA, Tumova S, et al. (2011) Heparan sulfate proteoglycan syndecan-3 is a novel receptor for GDNF, neurturin, and artemin. *J Cell Biol* 192:153–169.
- Bier E, De Robertis EM (2015) Embryo development. BMP gradients: A paradigm for morphogen-mediated developmental patterning. *Science* 348: 5838.
- Bigatti G, Marzinelli EM, Cledón M, Penschaszadeh PE (2004) Gonadal cycle of *Pseudechinus magellanicus* (Philippi, 1857) (Echinoidea: Temnopleuridae) from Patagonia, Argentina. En: Heinzeller & Nebelsick (ed) *Echinoderm*. Taylor & Francis Group, Munich.
- Bisgrove BW, Burke RD (1986) Development of serotonergic neurons in embryos of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus* (serotonergic/ neural development /embryo /echinoid). *Develop Growth Differ* 28: 569-574.
- Bishop CD, Brandhorst BP (2007) Development of nitric oxide synthase-defined neurons in the sea urchin larval ciliary band and evidence for a chemosensory function during metamorphosis. *Dev Dyn* 236:1535–1546.
- Bishop CD, Hall BK (2009) Sniffing out new data and hypotheses on the form, function, and evolution of the echinopluteus post-oral vibratile lobe. *Biol Bull* 216:307–321.
- Bloom SE, Muscarella DE, Lee MY, Rachlinski M (1998) Cell death in the avian blastoderm: Resistance to stress-induced apoptosis and expression of anti-apoptotic genes. *Cell Death Differ* 5:529–538.
- Bonduriansky R, Day T (2009) Nongenetic inheritance and its evolutionary implications. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 40:103–125.
- Bork P, Koonin E V (1996) Protein sequence motifs. *Curr Opin Struct Biol* 6:366–376.
- Bothwell M (2014) NGF, BDNF, NT3, and NT4. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Bothwell M (2006) Evolution of the neurotrophin signaling system in invertebrates. *Brain Behav Evol* 68:124–132.
- Brauchi S (2006) A hot-sensing cold receptor: C-terminal domain determines thermosensation in transient receptor potential channels. *J Neurosci* 26:4835–4840.
- Bressan M, Marin M, Brunetti R (1995) Influence of temperature and salinity on embryonic development of *Paracentrotus lividus* (Lmk, 1816). *Hydrobiologia* 304:175–184.
- Brockes JP (1997) Amphibian limb regeneration: rebuilding a complex structure. *Science* 276:81–87

- Brogger M (2005) Biología reproductiva del erizo verde *Arbacia dufresnii* (Blainville, 1825) en costas del Golfo Nuevo, Patagonia. Fac Ciencias Nat y Exactas. Universidad de Buenos Aires.
- Brogger MI, Gil DG, Rubilar T, et al. (2013) Echinoderms from Argentina: biodiversity, distribution and current state of knowledge. En: Alvarado JJ, Solís-Marín FA (eds) Echinoderm research and diversity in Latin America. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Brogger MI, Martínez MI, Penchaszadeh PE (2010) Reproduction of the sea urchin *Arbacia dufresnii* (Echinoidea: Arbaciidae) from Golfo Nuevo, Argentina. J Mar Biol Assoc UK 90:1405–1409.
- Bronstein O, Loya Y (2015) Photoperiod, temperature, and food availability as drivers of the annual reproductive cycle of the sea urchin *Echinometra* sp. from the Gulf of Aqaba (Red Sea). Coral Reefs 34:275–289.
- Brooks JM, Wessel GM (2003) Selective transport and packaging of the major yolk protein in the sea urchin. Dev Biol 261:353–370.
- Buitrago E, Lodeiros Seijo C (2005) Producción de larvas y postlarvas del erizo verdiblanco del Caribe *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea) en condiciones de cultivo. Rev Biol Trop 53:319–328
- Buj-Bello A, Adu J, Piñón LG, et al. (1997) Neurturin responsiveness requires a GPI-linked receptor and the Ret receptor tyrosine kinase. Nature 387:721–724.
- Burke RD (1978) The structure of the nervous system of the pluteus larva of *Strongylocentrotus purpuratus*. Cell Tissue Res 191:233–247.
- Burke RD (1983) The structure of the larval nervous system of *Pisaster ochraceus* (Echinodermata: Asteroidea). J Morphol 178:23–35.
- Burke RD, Angerer LM, Elphick MR, et al. (2006a) A genomic view of the sea urchin nervous system. Dev Biol 300:434–460.
- Burke RD, Moller DJ, Krupke OA, Taylor VJ (2014) Sea urchin neural development and the metazoan paradigm of neurogenesis. Genes 52:208–221
- Burke RD, Osborne L, Wang D, et al. (2006b) Neuron-specific expression of a synaptotagmin gene in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. J Comp Neurol 496:244–251.
- Byrne JH, Roberts JL (2009) From molecules to networks: an introduction to cellular and molecular neuroscience. Academic Press/Elsevier.
- Byrne M, Ho M, Selvakumaraswamy P, et al. (2009) Temperature, but not pH, compromises sea urchin fertilization and early development under near-future climate change scenarios. Proc R Soc B Biol Sci 276:1883–1888.

- Byrne M, Nakajima Y, Chee FC, Burke RD (2007) Apical organs in echinoderm larvae: insights into larval evolution in the Ambulacraria. *Evol Dev* 9:432–445.
- Byrne M, Przeslawski R (2013) Multistressor impacts of warming and acidification of the ocean on marine invertebrates' life histories. *Integr Comp Biol* 53:582–596.
- Byrne M, Selvakumaraswamy P, Ho MA, et al. (2011) Sea urchin development in a global change hotspot, potential for southerly migration of thermotolerant propagules. *Deep Sea Res Part II Top Stud Oceanogr* 58:712–719.
- Byrne M, Sewell MA, Prowse TAA (2008) Nutritional ecology of sea urchin larvae: Influence of endogenous and exogenous nutrition on echinopluteal growth and phenotypic plasticity in *Tripneustes gratilla*. *Funct Ecol* 22:643–648.
- Candia Carnevali MD (2006) Regeneration in Echinoderms: repair, regrowth, cloning. *Invertebr Surviv J* 3:64–76.
- Candia Carnevali MD, Bonasoro F (2001) Introduction to the biology of regeneration in echinoderms. *Microsc Res Tech* 55:365–368.
- Candia Carnevali MD, Bonasoro F, Patruno M, Thorndyke MC (1998) Cellular and molecular mechanisms of arm regeneration in crinoid echinoderms: The potential of arm explants. *Dev Genes Evol* 208:421–430.
- Cannan RK (1927) Echinochrome. *Biochem J* 21:184–89
- Carballeira C, Martín-Díaz L, DelValls TA (2011) Influence of salinity on fertilization and larval development toxicity tests with two species of sea urchin. *Mar Environ Res* 72:196–203.
- Cardone B, Roots BI (1990) Comparative immunohistochemical study of glial filament proteins (glial fibrillary acidic protein and vimentin) in goldfish, octopus, and snail. *Glia* 3:180–192.
- Carlson BM (2007) Principles of regenerative biology. Elsevier/Academic
- Carroll SB, Grenier JK, Weatherbee SD (2005) From DNA to diversity : molecular genetics and the evolution of animal design, 2nd ed. Blackwell Pub.
- Castro K, Epherra L, Raffo MP y Rubilar T (2013) Variación en la dieta del erizo verde *Arbacia dufresnii* en presencia del alga invasora *Undaria pinnatifida* en el Golfo San José, Patagonia Argentina. II Congreso Latinoamericano de Equinodermos. Sao Sebastian, Brasil.
- Caterina MJ (2006) Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation. *AJP Regul Integr Comp Physiol* 292:R64–R76.
- Chee F, Byrne M (1999) Development of the larval serotonergic nervous system in the sea star *Patiriella regularis* as revealed by confocal imaging. *Biol Bull* 197:123–131.

- Chen W-J, Liem RKH (1994) The endless story of the glial fibrillary acidic protein. *J Cell Sci* 107:2299–2311
- Chen Z, Chai Y, Cao L, et al. (2001) Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes survival and induces differentiation through the phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathway respectively in PC12 cells. *Neuroscience* 104:593–598.
- Choi JS, Park C (2012) Immunoreactive detection of glial fibrillary acidic Protein (GFAP) from the brain of *Bombyx mori*. *Biomed Res* 23: 31-35.
- Cisternas PA, Byrne M (2003) Peptidergic and serotonergic immunoreactivity in the metamorphosing ophiopluteus of *Ophiactis resiliens* (Echinodermata, Ophiuroidea). *Invertebr Biol* 122:177–185.
- Clapham DE (2003) TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426:517–524.
- Clarkson ED, Zawada WM, Freed CR (1997) GDNF improves survival and reduces apoptosis in human embryonic dopaminergic neurons in vitro. *Cell Tissue Res* 289:207–210.
- Clarkson ED, Zawada WM, Freed CR (1995) GDNF reduces apoptosis in dopaminergic neurons in vitro. *Neuroreport* 7:145–149.
- Cobb JLS (1987) Neurobiology of the Echinodermata. En: Ali MA (ed). *Nervous Systems in Invertebrates*. Springer US, Boston.
- Cordero-Morales JF, Gracheva EO, Julius D (2011) Cytoplasmic ankyrin repeats of transient receptor potential A1 (TRPA1) dictate sensitivity to thermal and chemical stimuli. *Proc Natl Acad Sci* 108:E1184–E1191.
- Craxton M (2004) Synaptotagmin gene content of the sequenced genomes. *BMC Genomic* 5:43.
- Cruz-Reyes J, Tata JR (1995) Cloning, characterization and expression of two *Xenopus* Bcl-2-like cell-survival genes. *Gene* 158:171–179.
- Curina A, Termanini A, Barozzi I, et al. (2017) High constitutive activity of a broad panel of housekeeping and tissue-specific cis-regulatory elements depends on a subset of ETS proteins. *Genes Dev* 31:399–412.
- Czihak G (1975) *The sea urchin embryo : biochemistry and morphogenesis*. Springer Berlin Heidelberg.
- D'Anglemont de Tassigny X, Pascual A, Lopez-Barneo J (2015) GDNF-based therapies, GDNF-producing interneurons, and trophic support of the dopaminergic nigrostriatal pathway. Implications for Parkinson's disease. *Front Neuroanat* 9:1–15.
- Dahl D, Crosby CJ, Sethi JS, Bignami A (1985) Glial fibrillary acidic (GFA) protein in vertebrates: Immunofluorescence and immunoblotting study with monoclonal and polyclonal antibodies. *J Comp Neurol* 239:75–88.

- Davis S, Aldrich T, Valenzuela D, et al. (1991) The receptor for ciliary neurotrophic factor. *Science* (80) 253:59–63.
- Denny MW, Nelson EK, Mead KS (2002) Revised estimates of the effects of turbulence on fertilization in the purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *Biol Bull* 203:275–277.
- Díaz-Balzac CA, Lázaro-Peña MI, Vázquez-Figueroa LD, et al. (2016) Holothurian nervous system diversity revealed by neuroanatomical analysis. *PLoS One* 11:e0151129.
- Díaz-Balzac CA, Vázquez-Figueroa LD, García-Arrarás JE (2014) Novel markers identify nervous system components of the holothurian nervous system. *Invertebr Neurosci* 14:113–125.
- Díaz-Miranda L, Blanco RE, García-Arrarás JE (1995) Localization of the Heptapeptide GFSKLYFamide in the sea cucumber *Holothuria glaberrima* (Echinodermata): A light and electron microscopic study. *Neurosci Lett* 197:637–640.
- Díaz-Miranda L, Pardo-Reoyo CF, Martínez R, García-Arrarás JE (1996) Galanin-like immunoreactivity in the sea cucumber *Holothuria glaberrima*. *Cell Tissue Res* 286:385–391.
- Díaz-Miranda L, Price DA, Greenberg MJ, et al. (1992) Characterization of two novel neuropeptides from the sea cucumber *Holothuria glaberrima*. *Biol Bull* 182:241–247.
- Díaz de Vivar ME, Zárate E, Avaro M, et al. (2011) Perfil lipídico de las gametas de *Arbacia dufresnii* (Blanville, 1825) (Echinodermata: Echinoidea) en Bahía Nueva. I Congreso Latinoamericano de Echinodermos. Puerto Madryn.
- Dieffenbach CW, Lowe TMJ, Dveksler GS (1993) General concepts for PCR Primer design. *Genome Res* 3:S30-S37.
- Doerner JF, Nter Gisselmann G, Hatt H, Wetzel CH (2007) Transient receptor potential channel A1 is directly gated by calcium ions. *J Biol Chem* 282: 13180-13189.
- Dolan J, Walshe K, Alsbury S, et al. (2007) The extracellular Leucine-Rich Repeat superfamily; a comparative survey and analysis of evolutionary relationships and expression patterns. *BMC Genomics* 8:320.
- Dos Santos PC, Gehlen G, Faccioni-Heuser MC, Achaval M (2005) Detection of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and vimentin (Vim) by immunoelectron microscopy of the glial cells in the central nervous system of the snail *Megalobulimus abbreviatus*. *Acta Zool* 86:135–144.
- Dugaiczky A, Haron JA, Stone EM, et al. (1983) Cloning and sequencing of a deoxyribonucleic acid copy of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase messenger ribonucleic acid isolated from chicken muscle. *Biochemistry* 22:1605–1613.

- Dunne JF, Javois LC, Huang LW, Bode HR (1985) A subset of cells in the nerve net of *Hydra oligactis* defined by a monoclonal antibody: Its arrangement and development. *Dev Biol* 109:41–53.
- Durbec PL, Marcos-Gutierrez C V., Kilkenny C, et al. (1996a) GDNF signalling through the Ret receptor tyrosine kinase. *Nature* 381:789–793.
- Durbec PL, Larsson-Blomberg LB, Schuchardt A, et al. (1996b) Common origin and developmental dependence on c-ret of subsets of enteric and sympathetic neuroblasts. *Development* 122:349-358.
- Dyachuk V, Odintsova N (2013) Larval myogenesis in Echinodermata: conserved features and morphological diversity between class-specific larval forms of Echinoidae, Asteroidea, and Holothuroidea. *Evol Dev* 15:5–17.
- Dygalo NN, Kalinina TS, Bulygina V V., Shishkina GT (2012) Increased expression of the anti-apoptotic protein Bcl-xL in the brain is associated with resilience to stress-induced depression-like behavior. *Cell Mol Neurobiol* 32:767–776.
- Eaves AA, Palmer AR (2003) Widespread cloning in echinoderm larvae. *Nature* 425:146.
- Ebert TA (1968) Growth rates of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* related to food availability and spine abrasion. *Ecology* 49:1075–1091.
- Eckert GL (1998) Larval development, growth and morphology of the sea urchin *Diadema antillarum*. *Bull Mar Sci* 63:443–451.
- Eddy EM, Shapiro BM (1979) Membrane events of fertilization in the sea urchin. *Scan Electron Microsc* 287–297.
- Eigenbrot C, Gerber N (1997) X-ray structure of glial cell-derived neurotrophic factor at 1.9 Å resolution and implications for receptor binding. *Nat Struct Biol.* 4: 435-438.
- Eisenberg E, Levanon EY (2013) Human housekeeping genes, revisited. *Trends Genet* 29:569–574.
- Elphick MR, Newman SJ, Thorndyke MC (1995) Distribution and action of SALMFamide neuropeptides in the starfish *Asterias rubens*. *J Exp Biol* 198:2519-2525.
- Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL (2000) Glial fibrillary acidic protein: GFAP-Thirty-One Years (1969–2000). *Neurochemical Res* 25:1439–1451.
- Enomoto H (2005) Regulation of neural development by glial cell line-derived neurotrophic factor family ligands. *Anat Sci Int* 80:42–52.
- Enomoto H, Araki T, Jackman A, et al. (1998) GFR alpha1-deficient mice have deficits in the enteric nervous system and kidneys. *Neuron* 21:317–24.

- Epherra L (2016) Evaluación del impacto de invertebrados herbívoros nativos sobre el alga invasora *Undaria pinnatifida*: *Arbacia dufresnii* (Echinodermata: Echinoidea) como modelo de estudio. Universidad Nacional de Mar del Plata.
- Epherra L (2010) Ciclo bioquímico del erizo verde *Arbacia dufresnii* (Blainville, 1825), en costas del Golfo Nuevo, Patagonia. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Puerto Madryn.
- Epherra L, Gil D, Rubilar T, et al. (2015a) Temporal and spatial differences in the reproductive biology of the sea urchin *Arbacia dufresnii*. *Mar Freshw Res* 66:329–342.
- Epherra L, Crespi-Abril A, Meretta PE, et al. (2015b) Morphological plasticity in the Aristotle's lantern of *Arbacia dufresnii* (Phyrosomatoida: Arbaciidae) off the Patagonian coast. *Rev Biol Trop* 63:339-351.
- Epp L, Tardent P (1978) The distribution of nerve cells in *Hydra attenuata* Pall. *Wilhelm Roux's Arch Dev Biol* 185:185–193.
- Esteves JL, De Vido de Mattio N, Cejas JJ, et al. (1981) Evolución de los parámetros químicos y biológicos en el área de Bahía Nueva (Golfo Nuevo). *Centro Nac Patagónico* 57:1–25.
- Esteves JL, Santinelli N, Sastre V, et al. (1992) A toxic dinoflagellate bloom and PSP production associated with upwelling in Golfo Nuevo, Patagonia, Argentina. *Hydrobiologia* 242:115–122.
- Ettensohn CA (2017) Sea urchins as a model system for studying embryonic development. Elsevier Inc.
- Ettensohn CA, Wray GA, Wessel GM (2004) The invertebrate deuterostomes: An introduction to their phylogeny, reproduction, development, and genomics. *Methods Cell Biol* 2004:1–13.
- Exley GE, Tang C, McElhinny AS, Warner CM (1999) Expression of caspase and Bcl-2 apoptotic family members in mouse preimplantation embryos. *Biol Reprod* 61:231–239.
- Fenaux L, Strathmann MF, Strathmann RA (1994) Five tests of food-limited growth of larvae in coastal waters by comparisons of rates of development and form of echinoplutei. *Limnol Oceanogr* 39:84–98.
- Ferretti P, Géraudie J (1998) Cellular and molecular basis of regeneration : from invertebrates to humans. New York : Wiley.
- Fielder GC, Yang TW-S, Razdan M, et al. (2018) The GDNF Family: a role in cancer? *Neoplasia* 20:99–117.
- Foltz KR, Adams NL, Runft LL (2004) Echinoderm eggs and embryos: procurement and culture. *Methods Cell Biol* 74:39–74.

- Friedman W (2012) Growth factors. En: Brady ST, Siegel GJ, Albers RW, et al. (eds) Basic Neurochemistry. Elsevier.
- Fujisawa H (1989) Differences in temperature dependence of early development of sea urchins with different growing seasons. Biol Bull 176:96–102.
- Fujisawa H (1995) Variation in embryonic temperature sensitivity among groups of the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*, which differ in their habitats. Zoolog. Sci. 12:583–589.
- García-Arrarás JE, Rojas-Soto M, Jiménez LB, Díaz-Miranda L (2001) The enteric nervous system of echinoderms: unexpected complexity revealed by neurochemical analysis. J Exp Biol 204:865–873.
- Garner S, Zysk I, Byrne G, et al. (2016) Neurogenesis in sea urchin embryos and the diversity of deuterostome neurogenic mechanisms. Development 143:286–297.
- George S (1996) Oceanologica acta. Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS.
- George SB, Cellario C, Fenaux L (1990) Population differences in egg quality of *Arbacia lixula* (Echinodermata: Echinoidea): proximate composition of eggs and larval development. J Exp Mar Bio Ecol 141:107–118.
- George SB, Lawrence JM, Lawrence AL, et al. (2001) Carotenoids in the adult diet enhance egg and juvenile production in the sea urchin *Lytechinus variegatus*. Aquaculture 199:353–369.
- Gershon MD (1997) Genes and lineages in the formation of the enteric nervous system. Curr Opin Neurobiol 7:101–109.
- Ghribi O, Herman MM, Forbes MS, et al. (2001) GDNF protects against aluminum-induced apoptosis in rabbits by up regulating Bcl-2 and Bcl-XL and inhibiting mitochondrial Bax translocation. Neurobiol Dis 8:764–773.
- Gianguzza P, Bonaviri C (2013) *Arbacia*. En: Lawrence JM (ed) Sea urchin: Biology and Ecology. Elsevier.
- Gilbert SF (2000) Developmental biology. Sinauer Associates.
- Giudice G (1986) The sea urchin embryo: a developmental biological system. Springer Verlag, Berlin.
- Gómez-Merino FC, Silva-Rojas HV, Pérez-Rodríguez P (2010) Bioinformática: Aplicaciones. Colegio de Postgraduados. Mexico.
- Goodman KM, Kjær S, Beuron F, et al. (2014) RET recognition of GDNF-GFR α 1 ligand by a composite binding site promotes membrane-proximal self-association. Cell Rep 8:1894–1904.

- Goodrich JT, Bernd P, Sherman D, Gershon MD (1980) Phylogeny of enteric serotonergic neurons. *J Comp Neurol* 190:15–28.
- Gracheva EO, Ingolia NT, Kelly YM, et al. (2010) Molecular basis of infrared detection by snakes. *Nature* 464:1006–1011.
- Grandl J, Kim SE, Uzzell V, et al. (2010) Temperature-induced opening of TRPV1 ion channel is stabilized by the pore domain. *Nat Neurosci* 13:708–714.
- Gunning PW, Ghoshdastider U, Whitaker S, et al. (2015) The evolution of compositionally and functionally distinct actin filaments. *J Cell Sci* 128: 2009–2019.
- Gustafson T, Ryberg E, Treufeldt R (1972) Acetylcholine and contractile activity in the echinopluteus. A study of the cellular basis of larval behaviour. *Acta Embryol Exp (Palermo)* 2:199–223.
- Hahn M, Bishop J (2001) Expression pattern of *Drosophila* ret suggests a common ancestral origin between the metamorphosis precursors in insect endoderm and the vertebrate enteric neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:1053–1058.
- Hamada FN, Rosenzweig M, Kang K, et al. (2008) An internal thermal sensor controlling temperature preference in *Drosophila*. *Nature* 454:217–220.
- Hamakawa, Toshiro Woodin MA, Bjorgum MC, Painter SD, et al. (1999) Excitatory synaptogenesis between identified *Lymnaea* neurons requires extrinsic trophic factors and is mediated by receptor tyrosine kinases. *J Neurosci* 19:9306–9312.
- Hamburger V (1934) The effects of wing bud extirpation on the development of the central nervous system in chick embryos. *J Exp Zool* 68:449–494.
- Hamilton JF, Morrison PF, Chen MY, et al. (2001) Heparin confusion during convection-enhanced delivery (CED) increases the distribution of the glial-derived neurotrophic factor (GDNF) ligand family in rat striatum and enhances the pharmacological activity of neurturin. *Exp Neurol* 168:155–161.
- Hanbury R, Ling ZD, Wu J, Kordower JH (2003) GFAP knockout mice have increased levels of GDNF that protect striatal neurons from metabolic and excitotoxic insults. *J Comp Neurol* 461:307–316.
- Hanukogle I, Tanese N, Fuchs E (1983) Complementary DNA sequence of a human cytoplasmic actin. *J Mol Biol* 163:673–678.
- Harrington LH, Walker CW, Lesser MP (2007) Stereological analysis of nutritive phagocytes and gametogenic cells during the annual reproductive cycle of the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Invertebr Biol* 126:202–209.
- Hart MW (1991) Particle captures and the method of suspension feeding by echinoderm larvae. *Biol Bull* 180:12–27.

- Hartenstein V, Stollewerk A (2015) The evolution of early neurogenesis. *Dev Cell* 32:390–407.
- Hartline DK (2011) The evolutionary origins of glia. *Glia* 59:1215–1236.
- Harvey EB (1956) *The American Arbacia and other sea urchins*. Princeton University Press, Princeton.
- Harvey EB, Anderson TF (1943) The spermatozoon and fertilization membrane of *Arbacia punctulata* as shown by the electron microscope. *Biol Bull* 85:151–156.
- Hashino E, Shero M, Junghans D, et al. (2001) GDNF and neurturin are target-derived factors essential for cranial parasympathetic neuron development. *Development* 128:95–105.
- Hätinen T, Holm L, Airaksinen MS (2007) Loss of neurturin in frog-Comparative genomics study of GDNF family ligand-receptor pairs. *Mol Cell Neurosci* 34:155–167.
- Hayashi T (1946) Dilution medium and survival of the spermatozoa of *Arbacia punctulata*. II. Effect of the medium on respiration. *Biol Bull* 90:177–187.
- Heath JK (2001) Growth Factors. En: *Encyclopedia of Genetics*. Elsevier.
- Heger A, Wilton CA, Sivakumar A, Holm L (2005) ADDA: A domain database with global coverage of the protein universe. *Nucleic Acids Res* 33: d188-d191.
- Hellmich HL, Kos L, Cho ES, et al. (1996) Embryonic expression of glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) suggests multiple developmental roles in neural differentiation and epithelial-mesenchymal interactions. *Mech Dev* 54:95–105.
- Hempstead BL (2014) *Deciphering proneurotrophin actions*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Hendler G, Miller JE, Pawson DL, Kier PM (1995) *Sea stars, sea urchins, and allies : echinoderms of Florida and the Caribbean*. Smithsonian Institution Press.
- Hernández K, Myers LG, Bowser M, Kidd T (2015) Genetic tools for the analysis of *Drosophila* stomatogastric nervous system development. *PLoS One* 10:e0128290.
- Herrera E, Galindo R, Díaz IJ, Vargas L (2008) Los canales TRP y su participación en la termotransducción. *Rev Salud UIS* 40: 110-19.
- Herrera F, Chen Q, Schubert D (2010) Synergistic effect of retinoic acid and cytokines on the regulation of glial fibrillary acidic protein expression. *J Biol Chem* 285:38915–38922.
- Heuckeroth RO, Enomoto H, Grider JR, et al. (1999) Gene targeting reveals a critical role for neurturin in the development and maintenance of enteric, sensory, and parasympathetic neurons. *Neuron* 22:253–263.
- Heuckeroth RO, Lampe PA, Johnson EM, Milbrandt J (1998) Neurturin and GDNF promote proliferation and survival of enteric neuron and glial progenitors in vitro. *Dev Biol* 200:116–129.

- Hibino T, Loza-Coll M, Messier C, et al. (2006) The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome. *Dev Biol* 300:349–365.
- Hidalgo A, Kato K, Sutcliffe B, et al. (2011) Trophic neuron-glia interactions and cell number adjustments in the fruit fly. *Glia* 59:1296–1303.
- Hinegardner RT (1969) Growth and development of the laboratory cultured sea urchin. *Biol Bull* 137:465–475.
- Hinman VF, Burke RD (2018) Embryonic neurogenesis in echinoderms. *Rev Dev Biol* 7:1–15.
- Hoadley L (1934) The relation between the position of the female pronucleus and the polar bodies in the unfertilized egg of *Arbacia punctulata*. *Biol Bull* 67:220–222.
- Hoekstra LA, Moroz LL, Heyland A (2012) Novel insights into the echinoderm nervous system from histaminergic and fmrfamnergic-like cells in the sea cucumber *Leptosynapta clarki*. *PLoS One* 7:e44220.
- Hol EM, Capetanaki Y (2017) Type III intermediate filaments desmin, glial fibrillary acidic protein (GFAP), vimentin, and peripherin. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 9:1–18.
- Hol EM, Pekny M (2015) Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Curr Opin Cell Biol* 32:121–130.
- Holland LZ, Holland ND (1999) Chordate origins of the vertebrate central nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 9:596–602.
- Holland LZ, Laudet V, Schubert M (2004) The chordate amphioxus: an emerging model organism for developmental biology. *Cell Mol Life Sci* 61:2290–2308.
- Honma Y, Araki T, Gianino S, et al. (2002) Artemin is a vascular-derived neurotropic factor for developing sympathetic neurons. *Neuron* 35:267–282.
- Huang P, Li Y, Lv Z, et al. (2017) Comprehensive attenuation of IL-25-induced airway hyperresponsiveness, inflammation and remodelling by the PI3K inhibitor LY294002. *Respirology* 22:78–85.
- Huang XY, Barrios LAM, Vonkhorporn P, et al. (1989) Genomic organization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene family of *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol* 206:411–424.
- Hwang SPL, Chen CA, Peng MY, Chen CP (2003) Evolutionary conservation of the bone morphogenetic protein 2/4 gene between diploblastic and triploblastic metazoans. *Zool Stud* 42:227–234.
- Hyman L (1955) *The invertebrates. Echinodermata: the coelomate Bilateria*. McGraw-Hill, New York.

- Ibáñez CF (1998) Emerging themes in structural biology of neurotrophic factors. *Trends Neurosci* 21:438–444.
- Ibáñez CF, Andressoo JO (2017) Biology of GDNF and its receptors - Relevance for disorders of the central nervous system. *Neurobiol Dis* 97:80–89.
- Igaki T, Miura M (2004) Role of Bcl-2 family members in invertebrates. *BBA-Molecular Cell Res* 1644: 73-81
- Jaaro H, Fainzilber M (2006) Building complex brains-missing pieces in an evolutionary puzzle. *Brain Behav Evol* 68:191–195.
- Jahn R, Lang T, Südhof TC (2003) Membrane fusion. *Cell* 112:519–533.
- Jékely G (2013) Global view of the evolution and diversity of metazoan neuropeptide signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:8702–8707.
- Jessen KR, Mirsky R (1980) Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein. *Nature* 286:736–737.
- Jiang H, Fan D, Zhou G, et al. (2010) Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor (LY294002) induces apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma *in vitro* and *in vivo*. *J Exp Clin Cancer Res* 29:1–7.
- Jing S, Wen D, Yu Y, et al. (1996) GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. *Cell* 85:1113–1124.
- Johnson LG, Babcock RC (1994) Temperature and the larval ecology of the crown of thorns starfish, *Acanthaster planci*. *Biol Bull* 187:304–308.
- Johnson RW, White JD, Walker EC, et al. (2014) Myokines (muscle-derived cytokines and chemokines) including ciliary neurotrophic factor (CNTF) inhibit osteoblast differentiation. *Bone* 64:47–56.
- Jonczyk E, Gilron G, Zajdlik B (2001) Sea urchin fertilization assay: An evaluation of assumptions related to sample salinity adjustment and use of natural and synthetic marine waters for testing. *Environ Toxicol Chem* 20:804-809.
- Jordt S-E, Tominaga M, Julius D (2000) Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proc Natl Acad Sci* 97:8134–8139.
- Junier MP, Suzuki F, Onteniente B, Peschanski M (1994) Target-deprived CNS neurons express the NGF gene while reactive glia around their axonal terminals contain low and high affinity NGF receptors. *Mol Brain Res* 24:247–260.
- Kale J, Osterlund EJ, Andrews DW (2017) Bcl-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ* 25:65–80.

- Kallijärvi J, Stratoulas V, Virtanen K, et al. (2012a) Characterization of *Drosophila* GDNF receptor-like and evidence for its evolutionarily conserved interaction with neural cell adhesion molecule (NCAM). *Plos One* 7:e51997.
- Kang K, Pulver SR, Panzano VC, et al. (2010) Analysis of *Drosophila* TRPA1 reveals an ancient origin for human chemical nociception. *464*:597–600.
- Katow H, Katow T, Yoshida H, et al. (2016) Immunohistochemical and ultrastructural properties of the larval ciliary band-associated strand in the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Front Zool* 13:1-14.
- Katow H, Suyemitsu T, Ooka S, et al. (2010) Development of a dopaminergic system in sea urchin embryos and larvae. *J Exp Biol* 213:2808–2819.
- Keats DW, Steele DH, South GR (1984) Depth-dependent reproductive output of the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis* (O.F. Müller), in relation to the nature and availability of food. *J Exp Mar Bio Ecol* 80:77–91.
- Kibbe WA (2007) OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res* 35:43–46.
- Kingsley DM (1994) The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 8:133–146.
- Kino S (2010) Reproduction and early life history of sea urchins, *Arbacia dufresnei* and *Pseudechinus magellanicus*, in Chiloe Island and Reloncavi sound, Chile. *Aquaculture Sci* 58:65-73
- Klein RD, Sherman D, Ho WH, et al. (1997) A GPI-linked protein that interacts with ret to form a candidate neurturin receptor. *Nature* 387:717–721.
- Koeberle PD, Bähr M (2008) The upregulation of GLAST-1 is an indirect antiapoptotic mechanism of GDNF and neurturin in the adult CNS. *Cell Death Differ* 15:471–483.
- Korsching S (1993) The neurotrophic factor concept: a reexamination. *J Neurosci* 13:2739–2748.
- Kosten TA, Galloway MP, Duman RS, et al. (2008) Repeated unpredictable stress and antidepressants differentially regulate expression of the Bcl-2 family of apoptotic genes in rat cortical, hippocampal, and limbic brain structures. *Neuropsychopharmacology* 33:1545–1558.
- Kotzbauer PT, Lampe PA, Heuckeroth RO, et al. (1996) Neurturin, a relative of glial-cell-line-derived neurotrophic factor. *Nature* 384:467–470.
- Kroh A, Mooi R (2011) World Echinoidea Database. <http://www.marinespecies.org/echinoidea/>

- Lacalli TC, Gilmour THJ, West JE (1990) Ciliary band innervation in the bipinnaria larva of *Piaster ochraceus*. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 330:371–390.
- Larrain A, Mutschke E, Riveros A, Solar E (1999) Preliminary report on Echinoidea and Asteroidea (Echinodermata) of the Joint Chilean-German-Italian Magellan “Victor Hensen” Campaign, 17 October - 25 November 1991. *Sci Mar* 63:433–438.
- Lasi M, Pauly B, Schmidt N, et al. (2010) The molecular cell death machinery in the simple cnidarian *Hydra* includes an expanded caspase family and pro- and anti-apoptotic Bcl-2 proteins. *Apoptosis in Hydra* 812:812–825.
- Latorre M, Epherra L, Rubilar T, Pérez Gallo S, Gil DG, Tolosano J P de WC& D de VM (2012) Composición bioquímica, análisis energético y esfuerzo reproductivo de una población de *Arbacia dufresnii* (Blainville, 1825) (Echinodermata: Echinoidea) del Golfo San Jorge, Argentina. VIII Jornadas Nacional de Ciencias del Mar. Comodoro Rivadavia. UNPSJB.
- Lawrence JM (2013) *Sea urchins : biology and ecology*, 3rd edn. Academic press.
- Lawrence JM, Guille A (1982) Organic composition of tropical, polar and temperate-water echinoderms. *Comp Biochem Physiol Part B* 72:283–287.
- Le Douarin NM, Renaud D, Teillet MA, Le Douarin GH (1975) Cholinergic differentiation of presumptive adrenergic neuroblasts in interspecific chimeras after heterotopic transplantations. *Proc Natl Acad Sci USA* 72:728–732.
- Le Douarin NM, Teillet M-AM (1974) Experimental analysis of the migration and differentiation of neuroblasts of the autonomic nervous system and of neurectodermal mesenchymal derivatives, using a biological cell marking technique. *Dev Biol* 41:162–184.
- Le Douarin NM, Teillet MA (1973) The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. *J Embryol Exp Morphol* 30:31–48.
- Ledda F, Paratcha G (2016) Assembly of neuronal connectivity by neurotrophic factors and leucine-rich repeat proteins. *Front Cell Neurosci* 10:1–10.
- Ledda F, Paratcha G, Sandoval-Guzmán T, Ibáñez CF (2007) GDNF and GFR α 1 promote formation of neuronal synapses by ligand-induced cell adhesion. *Nat Neurosci* 10:293–300.
- Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL (2001) Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294:1945–8.
- Lemire M, Himmelman JH Relation of food preference to fitness for the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Mar Biol* 127:73–78.
- Lenhoff SG (1986) *Hydra and the birth of experimental biology, 1744 : Abraham Trembley's Mémoires concerning the polyps / by Sylvia G. Lenhoff and Howard M. Lenhoff* Trove. Pacific Grove, CA : Boxwood Press.

- Lennarz WJ, Vacquier VD (1982) Sea urchin fertilization. HIMB Education Program.
- Lessios HA, Lockhart S, Collin R, et al. (2012) Phylogeography and bindin evolution in *Arbacia*, a sea urchin genus with an unusual distribution. *Mol Ecol* 21:130–144.
- Levitan DR (1991) Influence of body size and population density on fertilization success and reproductive output in a free-spawning invertebrate. *Biol Bull* 181:261–268.
- Levitan DR, Sewell MA, Chia FS (1991) Kinetics of fertilization in the sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus*: interaction of gamete dilution, age, and contact time. *Biol Bull* 181:371–378.
- Li X, Peng C, Li L, et al. (2007) Glial cell-derived neurotrophic factor protects against proteasome inhibition-induced dopamine neuron degeneration by suppression of endoplasmic reticulum stress and caspase-3 activation. *Journals Gerontol Ser A Biol Sci Med Sci* 62:943–950.
- Li Z, Wang B, Wu X, et al. (2005) Identification, expression and functional characterization of the GRAL gene. *J Neurochem* 95:361–376.
- Liao M, Cao E, Julius D, et al. (2011) Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo- microscopy. *Nature* 139:101–108.
- Lillie FR (1915) Studies of fertilization. *Biol Bull* 28:229–251.
- Lin LF, Doherty DH, Lile JD, et al. (1993) GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 260:1130–1132.
- Lindahl M, Poteryaev D, Yu L, et al. (2001) Human glial cell line-derived neurotrophic factor receptor alpha 4 is the receptor for persephin and is predominantly expressed in normal and malignant thyroid medullary cells. *J Biol Chem* 276:9344–9351.
- Lindahl M, Timmusk T, Rossi J, et al. (2000) Expression and alternative splicing of mouse *gfra4* suggest roles in endocrine cell development. *Mol Cell Neurosci* 15:522–533.
- Lindholm P, Saarma M (2010) Novel CDNF/MANF family of neurotrophic factors. *Dev Neurobiol* 70:360–371
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25:402–408.
- Logan A, Berry M, Gonzalez AM, et al. (1994) Effects of transforming growth factor β 1, on scar production in the injured central nervous system of the rat. *Eur J Neurosci* 6:355–363.
- Loughlin SE, Fallon JH (1993) Neurotrophic factors. Academic Press
- Lowe CJ, Wu M, Salic A, et al. (2003) Anteroposterior patterning in hemichordates and the origins of the chordate nervous system. *Cell* 113:853–65.

- Lu P, Jones L, Snyder E, Tuszynski M (2003) Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury. *Exp Neurol* 181:115–129.
- Luo W, Wickramasinghe SR, Savitt JM, et al. (2007) A hierarchical NGF signaling cascade controls Ret-Dependent and Ret-Independent events during development of nonpeptidergic DRG neurons. *Neuron* 54:739–754.
- Luo YJ, Su YH (2012) Opposing nodal and bmp signals regulate left-right asymmetry in the sea urchin larva. *PLoS Biol* 10:e1001402.
- Mably JD, Das P, Akbareian SE, et al. (2011) GDNF is mitogenic, neurotrophic, and chemoattractive to enteric neural crest cells in the embryonic colon. *Dev Dyn* 240:1402–1411.
- Mackie GO, Spencer AN, Strathmann R (1969) Electrical activity associated with ciliary reversal in an echinoderm larva. *Nature* 223:1384–1385.
- Mariga A, Mitre M, Chao M V. (2017) Consequences of brain-derived neurotrophic factor withdrawal in CNS neurons and implications in disease. *Neurobiol Dis* 97:73–79.
- Märkel K, Röser U (1991) Ultrastructure and organization of the epineural canal and the nerve cord in sea urchins (Echinodermata, Echinoidea). *Zoomorphology* 110:267–279.
- Marlow H, Tosches M, Tomer R, et al. (2014) Larval body patterning and apical organs are conserved in animal evolution. *BMC Biol* 12:17.
- Marshall DJ (2008) Transgenerational plasticity in the sea: Context-dependent maternal effects across the life history. *Ecology* 89:418–427.
- Martin P (2004) Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis. *Development* 131:3021–3034.
- Martin WF, Cerff R (2017) Physiology, phylogeny, early evolution, and GAPDH. *Protoplasma* 254:1823–1834.
- Maruyama T, Nara K, Yoshikawa H, et al. (2007) Txk, a member of the non-receptor tyrosine kinase of the Tec family, forms a complex with poly (ADP-ribose) polymerase 1 and elongation factor 1 α and regulates interferon- γ gene transcription in Th1 cells. *Clin Exp Immunol* 147:164–175.
- Marzinelli EM, Bigatti G, Giménez J, Penchaszadeh PE (2006) Reproduction of the sea urchin *Pseudechinus magellanicus* (Echinoidea: Temnopleuridae) from Golfo Nuevo, Argentina. *Bull Mar Sci* 79:127–136.
- Mashanov V, Zueva O (2018) Radial Glia in Echinoderms. *Dev Neurobiol* dneu.22659.

- Mashanov V, Zueva O, Rubilar T, et al. (2016) Echinodermata. En: Schmidt-Rhaesa A, Harzsch S, Purschke G (eds) Structure and evolution of invertebrate nervous systems. Oxford University Press.
- Mashanov VS, Dolmatov IY, Heinzeller T (2005) Transdifferentiation in holothurian gut regeneration. *Biol Bull* 209:184–93.
- Mashanov VS, García-Arrarás JE (2011) Gut regeneration in holothurians: a snapshot of recent developments. *Biol Bull* 221:93–109
- Mashanov VS, Zueva OR, Garcia-Arraras JE (2015) Expression of pluripotency factors in echinoderm regeneration. *Cell Tissue Res* 359:521–536.
- Mashanov VS, Zueva OR, García-Arrarás JE (2014) Transcriptomic changes during regeneration of the central nervous system in an echinoderm. *BMC Genomics* 15:357.
- Mashanov VS, Zueva OR, Heinzeller T (2008) Regeneration of the radial nerve cord in a holothurian: A promising new model system for studying post-traumatic recovery in the adult nervous system. *Tissue Cell* 40:351–372
- Mashanov VS, Zueva OR, Heinzeller T, et al. (2009) The central nervous system of sea cucumbers (Echinodermata: Holothuroidea) shows positive immunostaining for a chordate glial secretion. *Front Zool* 6:1–15.
- Mashanov VS, Zueva OR, Heinzeller T, Dolmatov IY (2006) Ultrastructure of the circumoral nerve ring and the radial nerve cords in holothurians (Echinodermata). *Zoomorphology* 125:27–38.
- Mason DY, Micklem K, Jones M (2000) Double immunofluorescence labelling of routinely processed paraffin sections. *J Pathol* 191:452–461.
- Masure S, Cik M, Hoefnagel E, et al. (2000) Mammalian GFR α -4, a divergent member of the GFR α family of coreceptors for glial cell line-derived neurotrophic factor family ligands, is a receptor for the neurotrophic factor persephin. *J Biol Chem* 275:39427–39434.
- Matsuoka Y, Nishizawa K, Yano T, et al. (1992) Two different protein kinases act on a different time schedule as glial filament kinases during mitosis. *The EMBO Journal* 11: 2895-2902.
- McClary D, Barker M (1998) Reproductive isolation? Interannual variability in the timing of reproduction in sympatric sea urchins, genus *Pseudechinus*. *Invertebr Biol* 117:175.
- McClay DR (2011) Evolutionary crossroads in developmental biology: sea urchins. *Development* 138:2639–2648.
- McClendon JF (1912) Echinochrome, a red substance in sea urchins. *J Biol Chem* 11: 435-441.

- McClintock JB, Hopkins T, Watts SA, Marion K (1990) The biochemical and energetic composition of somatic body components of echinoderms from the northern Gulf of Mexico. *Comp Biochem Physiol Part A* 95:529–532.
- McClintock JB, Pearse JS (1987) Biochemical composition of antarctic echinoderms. *Comp Biochem Physiol Part B* 86:683–687.
- McCullagh P (1984) Generalized linear models. *Eur J Oper Res* 285–292.
- Meidel SK, Yund PO (2001) Egg longevity and time-integrated fertilization in a temperate sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Biol Bull* 201:84–94.
- Mercier A, Hamel JF (2009) Endogenous and exogenous control of gametogenesis and spawning in echinoderms. En: Annie M, Jean-Francois H (eds) *Advances in Marine Biology*. Elsevier, Amsterdam.
- Messing A, Head MW, Galles K, et al. (1998) Fatal encephalopathy with astrocyte inclusions in GFAP transgenic mice. *Am J Pathol* 152:391–398.
- Metaxas A (2013) *Larval ecology of echinoids*. Elsevier.
- Metchnikoff E (1893) *Lectures on the comparative pathology of inflammation: delivered at the Pasteur Institute in 1891*, Trübner. London.
- Milbrandt J, de Sauvage FJ, Fahrner TJ, et al. (1998) Persephin, a novel neurotrophic factor related to gdnf and neurturin. *Neuron* 20:245–253.
- Miljkovic-Licina M, Gauchat D, Galliot B (2004) Neuronal evolution: analysis of regulatory genes in a first-evolved nervous system, the hydra nervous system. *Biosystems* 76:75–87.
- Mina M (2014) *Growth factors: biochemical signals for tissue engineering*. biochemical signals for tissue engineering. Elsevier Inc.
- Mirabeau O, Joly JS (2013) Molecular evolution of peptidergic signaling systems in bilaterians. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:E2028-2037.
- Moein S, Javanmard SH, Abedi M, et al. (2017) Identification of appropriate housekeeping genes for gene expression analysis in long-term hypoxia-treated kidney cells. *Adv Biomed Res* 6:15.
- Molliver DC, Radeke MJ, Feinstein SC, Snider WD (1995) Presence or absence of TrKA protein distinguishes subsets of small sensory neurons with unique cytochemical characteristics and dorsal horn projections. *J Comp Neurol* 361:404–416.
- Moore MW, Klein RD, Fariñas I, et al. (1996) Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature* 382:76–79.
- Morgan BJT (1982) Modelling polyspermy. *Biometrics* 38:885.

- Moss C, Burke RD, Thorndyke MC (1994) Immunocytochemical localization of the neuropeptide S1 and serotonin in larvae of the starfish *Pisaster ochraceus* and *Asterias rubens*. *J Mar Biol Assoc UK* 74:61-71.
- Muneoka K, Bryant S V (1982) Evidence that patterning mechanisms in developing and regenerating limbs are the same. *Nature* 298:369-371.
- Murabe N, Hatoyama H, Hase S, et al. (2008) Neural architecture of the brachiolaria larva of the starfish, *Asterina pectinifera*. *J Comp Neurol* 509:271-282.
- Musacchia F, Vasilev F, Borra M, et al. (2017) *De novo* assembly of a transcriptome from the eggs and early embryos of *Astropecten aranciacus*. *PLoS One* 12:1-28.
- Muscarella DE, Rachlinski MK, Bloom SE (1998) Expression of cell death regulatory genes and limited apoptosis induction in avian blastodermal cells. *Mol Reprod Dev* 51:130-142.
- Myers L, Perera H, Alvarado MG, Kidd T (2018) The *Drosophila* Ret gene functions in the stomatogastric nervous system with the Maverick TGF β ligand and the Gfrl co-receptor. *Development* 145:dev.157446.
- Nakajima Y, Humphreys T, Kaneko H, Tagawa K (2004a) Development and neural organization of the tornaria larva of the hawaiian hemichordate, *Ptychodera flava*. *Zool Sci* 21:69-78.
- Nakajima Y, Kaneko H, Murray G, Burke RD (2004b) Divergent patterns of neural development in larval echinoids and asteroids. *Evol Dev* 6:95-104.
- Nakano H, Murabe N, Amemiya S, Nakajima Y (2006) Nervous system development of the sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Dev Biol* 292:205-212.
- Naveilhan P, Baudet C, Mikaelis A, et al. (1998) Expression and regulation of GFR3, a glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor. *Proc Natl Acad Sci* 95:1295-1300.
- Newcombe E, Cárdenas C, Geange S (2012) Green sea urchins structure invertebrate and macroalgal communities in the Magellan Strait, southern Chile. *Aquat Biol* 15:135-144.
- Newfeld SJ, Wisotzkey RG, Kumar S (1999) Molecular evolution of a developmental pathway: Phylogenetic analyses of transforming growth factor-beta family ligands, receptors and Smad signal transducers. *Genetics* 152:783-795.
- Newman SJ, Elphick MR, Thorndyke MC (1995) Tissue distribution of the SALMFamide neuropeptides S1 and S2 in the starfish *Asterias rubens* using novel monoclonal and polyclonal antibodies. *Nervous and locomotory systems. Proceedings Biol Sci* 261:139-145.
- Nielsen J, Gotfryd K, Li S, et al. (2009) Role of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)-neural cell adhesion molecule (NCAM) interactions in induction of neurite outgrowth and identification of a binding site for NCAM in the heel region of GDNF. *J Neurosci* 29:11360-11376.

- Nishino J, Mochida K, Ohfuji Y, et al. (1999) GFR α 3, a component of the artemin receptor, is required for migration and survival of the superior cervical ganglion. *Neuron* 23:725–736.
- Nissen P, Kjeldgaard M, Thirup S, et al. (1995) Crystal structure of the ternary complex of Phe-tRNAPhe, EF-Tu, and a GTP analog. *Science* 270:1464–1472.
- Northcutt RG (2012) Evolution of centralized nervous systems: Two schools of evolutionary thought. *PNAS* 109:10626–10633.
- O'Connor C, Mulley JC (1977) Temperature effects on periodicity and embryology, with observations on the population genetics, of the aquacultural echinoid *Heliocidaris tuberculata*. *Aquaculture* 12:99–114.
- O'Connor MI, Bruno JF, Gaines SD, et al. (2007) Temperature control of larval dispersal and the implications for marine ecology, evolution, and conservation. *Proc Natl Acad Sci* 104:1266–1271.
- Ocklenburg S, Güntürkün O (2012) Hemispheric asymmetries: The comparative view. *Front Psychol* 3:1–9.
- Oppenheim RW (1991) Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 14:453–501.
- Ozkan K, Eralp L, Kocaoglu M, et al. (2007) Growth factors. En: Brady ST, Siegel GJ, Albers RW, et al. (eds) *Basic Neurochemistry*. Elsevier.
- Pachnis V, Mankoo B, Costantini F (1993) Expression of the c-ret proto-oncogene during mouse embryogenesis. *Development* 119:1005–1017.
- Palgi M, Lindstrom R, Peranen J, et al. (2009) Evidence that DmMANF is an invertebrate neurotrophic factor supporting dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci* 106:2429–2434.
- Paniagua R, Nistal M, Sesma P, et al. (2017) *Biología celular y molecular*. McGraw-Hill Education, Aravaca (Madrid).
- Paratcha G, Ledda F (2008) GDNF and GFR α : a versatile molecular complex for developing neurons. *Trends Neurosci* 31:384–391.
- Paratcha G, Ledda F, Baars L, et al. (2001) Released GFR α 1 potentiates downstream signaling, neuronal survival, and differentiation via a novel mechanism of recruitment of c-Ret to lipid rafts. *Neuron* 29:171–184.
- Paratcha G, Ledda F, Ibáñez CF (2003) The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands. *Cell* 113:867–879.
- Parra M, Rubilar T, Latorre M, et al. (2015) Nutrient allocation in the gonads of the sea urchin *Arbacia dufresnii* in different stages of gonadal development. *Invertebr Reprod Dev* 59:26–36.

- Pasquin S, Sharma M, Gauchat JF (2015) Ciliary neurotrophic factor (CNTF): New facets of an old molecule for treating neurodegenerative and metabolic syndrome pathologies. *Cytokine Growth Factor Rev* 26:507–515.
- Pastor CT, Bala LO (1995) Estudios de base en la bahía de Puerto Madryn (Golfo Nuevo, Chubut): parámetros químicos. *Nat Patagónica* 3:41–56.
- Patapoutian A, Peier AM, Story GM, Viswanath V (2003) Thermotrp channels and beyond: Mechanisms of temperature sensation. *Nat Rev Neurosci* 4:529–539.
- Patruno M, Smertenko A, Candia Carnevali MD, et al. (2002) Expression of transforming growth factor beta-like molecules in normal and regenerating arms of the crinoid *Antedon mediterranea*: immunocytochemical and biochemical evidence. *Proc Biol Sci* 269:1741–1747.
- Patruno M, Thorndyke MC, Candia Carnevali MD, et al. (2001) Growth factors, heat-shock proteins and regeneration in echinoderms. *J Exp Biol* 204:843–848.
- Paulay G, Boring L, Strathmann RR (1985) Food limited growth and development of larvae: Experiments with natural sea water. *J Exp Mar Bio Ecol* 93:1–10.
- Paulsen CE, Armache JP, Gao Y, et al. (2015) Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms. *Nature* 520:511–17.
- Pearse JS, Cameron RA (1991) Reproduction of marine invertebrates. Echinoderms and Lophophorates. Boxwood Press, Pacific Groove, California.
- Pearse JS, Eernisse DJ, Pearse VB, Beauchamp KA (1986) Photoperiodic regulation of gametogenesis in sea stars, with evidence for an annual calendar independent of fixed daylength. *Integr Comp Biol* 26:417–431.
- Pearse JS, Giese AC (1966) The organic constitution of several benthonic invertebrates from McMurdo sound, Antarctica. *Comp Biochem Physiol* 18:47–57.
- Pearse JS, Walker CW (1986) Photoperiodic regulation of gametogenesis in a North Atlantic sea star, *Asterias vulgaris*. *Int J Invertebr Reprod Dev* 9:71–77.
- Pechenik JA (1999) On the advantages and disadvantages of larval stages in benthic marine invertebrate life cycles. *Mar Ecol Prog Ser* 177:269–297.
- Penaloza C, Lin L, Lockshin RA, Zakeri Z (2006) Cell death in development: Shaping the embryo. *Histochem Cell Biol* 126:149–158.
- Penchaszadeh P, Lawrence JM (1998) *Arbacia dufresnei* (Echinodermata: Echinoidea): A carnivore in Argentinian waters. En: Candia Carnevali MD, Bonasoro F (eds). *Balkema. Echinoderm Res.*

- Penchaszadeh PE, Bigatti G, Miloslavich P, et al. (2004) Feeding of *Pseudechinus magellanicus* (Philippi, 1857) (Echinoidea: Temnopleuridae) in the SW Atlantic Coast (Argentina). *Ophelia* 58:91–99.
- Pennington JT (1985) The ecology of fertilization of echinoid eggs: the consequences of sperm dilution, adult aggregation, and synchronous spawning. *Biol Bull* 169:417–430.
- Pentreath VW, Cobb JL (1972) Neurobiology of Echinodermata. *Biol Rev Camb Philos Soc* 47:363–392.
- Pera MF, Tam PPL (2010) Extrinsic regulation of pluripotent stem cells. *Nature* 465:713–720.
- Perea D, Guiu J, Hudry B et al. (2017) Ret receptor tyrosine kinase sustains proliferation and tissue maturation in intestinal epithelia. *EMBO J* 36:3029–3045.
- Pérez AF, Gil DG, Rubilar T (2014) Echinodermata. En: Calcagno JA (ed) *Los Invertebrados Marinos*. Fundación de Historia Natural Félix de Azara. Vazquez Mazzini, Buenos Aires.
- Perrin BJ, Ervasti JM (2010) The actin gene family: Function follows isoform. *Cytoskeleton* 67:630–634.
- Pezet S, McMahon SB (2006) Neurotrophins: mediators and modulators of pain. *Annu Rev Neurosci* 29:507–538.
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP (2004) Product allocation to different types of distribution center in retail logistics networks. *Biotechnol Lett* 26:509–515.
- Pichel JG, Shen L, Sheng HZ, et al. (1996) Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. *Nature* 382:73–76.
- Polčič P, Jaká P, Mentel M (2015) Yeast as a tool for studying proteins of the Bcl-2 family. *Microb Cell* 2:74.
- Pomeranz HD, Rothman TP, Gershon MD (1991) Colonization of the post-umbilical bowel by cells derived from the sacral neural crest: direct tracing of cell migration using an intercalating probe and a replication-deficient retrovirus. *Development* 111: 647–655.
- Pörtner HO, Farrell AP (2008) Ecology: physiology and climate change. *Science* (80) 322:690–692.
- Priestley J V, Michael GJ, Averill S, et al. (2002) Regulation of nociceptive neurons by nerve growth factor and glial cell line derived neurotrophic factor. *Can J Physiol Pharmacol* 80:495–505.
- Prowse TAA, Falkner I, Sewell MA, Byrne M (2009) Long-term storage lipids and developmental evolution in echinoderms. *Evol Ecol Res* 11:1069–1083.

- Purves D (1988) *Body and brain : a trophic theory of neural connections*. Harvard University Press.
- R Core Team (2014) *R: A language and environment for statistical*.
- Raftery LA, Sutherland DJ (1999) TGF-beta family signal transduction in *Drosophila* development: from Mad to Smads. *Dev Biol* 210:251-268.
- Rahman MA, Rahman SM, Uehara T (2001) Effects of gamete dilution, age and contact time on fertilization success in the tropical sea urchin, *Echinometra mathaei*. *JCRS* 3:1-12.
- Rahman MA, Yusoff FM, Arshad A, et al. (2012) Embryonic, larval, and early juvenile development of the tropical sea urchin, *Salmacis sphaeroides* (Echinodermata: Echinoidea). *Sci World J* 2012:1-9.
- Rahman MA, Yusoff FM, Arshad A, Amin SMN (2016) Impacts of gamete concentration, age and contact time on the fertilization success in the tropical species of white sea urchin, *Salmaciella dussumieri*. *J Environ Biol* 37:647-656.
- Ralton JE, Lu X, Hutcheson AM, Quinlan RA (1994) Identification of two N-terminal non-alpha-helical domain motifs important in the assembly of glial fibrillary acidic protein. *J Cell Sci* 107, 107:1935-1948.
- Ramoshebi LN, Matsaba TN, Teare J, et al. (2002) Tissue engineering: TGF-beta superfamily members and delivery systems in bone regeneration. *Expert Rev Mol Med* 4:1-11.
- Rauwerda H, Wackers P, Pagano JFB, et al. (2016) Mother-specific signature in the maternal transcriptome composition of mature, unfertilized zebrafish eggs. *PLoS One* 11:1-20.
- Reichardt LF (2006) Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 361:1545-1564.
- Rentzsch F, Layden M, Manuel M (2017) The cellular and molecular basis of cnidarian neurogenesis. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 6:e257.
- Repolho TFB da R, Helena Costa M, de Jesus Luís O, et al. (2011) Broodstock diet effect on sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) endotrophic larvae development: Potential for their year-round use in environmental toxicology assessment. *Ecotoxicol Environ Saf* 74:584-592.
- Reuter KE, Levitan DR (2010) Influence of sperm and phytoplankton on spawning in the echinoid *Lytechinus variegatus*. *Biol Bull* 219:198-206.
- Rivas AL, Pisoni JP, Dellatorre FG (2016) Thermal response to the surface heat flux in a macrotidal coastal region (Nuevo Gulf, Argentina). *Estuar Coast Shelf Sci*. 176:117-123.
- Robertson AJ, Croce J, Carbonneau S, et al. (2006) The genomic underpinnings of apoptosis in *Strongylocentrotus purpuratus*. *Dev Biol* 300:321-334.

- Roccheri MC, Tipa C, Bonaventura R, Matranga V (2002) Physiological and induced apoptosis in sea urchin larvae undergoing metamorphosis. *Int J Dev Biol* 46:801–806.
- Rock MO, Davis-Berg EC, Wilson BA (2011) Development of the sea urchin *Arbacia punctulata* in the presence of the environmental toxin sodium hypochlorite. *J Environ Prot (Irvine, Calif)* 2:1127–1133.
- Rosenzweig M, Brennan KM, Tayler TD, et al. (2005) The *Drosophila* ortholog of vertebrate TRPA1 regulates thermotaxis. *Genes Dev* 19:419–424.
- Rossi J, Luukko K, Poteryaev D, et al. (1999) Retarded growth and deficits in the enteric and parasympathetic nervous system in mice lacking GFR α 2, a functional neurturin receptor. *Neuron* 22:243–252.
- Rossi J, Tomac A, Saarma M, Airaksinen MS (2000) Distinct roles for GFR α 1 and GFR α 2 signalling in different cranial parasympathetic ganglia in vivo. *Eur J Neurosci* 12:3944–3952.
- Rost B (1999) Twilight zone of protein sequence alignments. *Protein Eng Des Sel* 12:85–94.
- Ruben Cabrera J, Sanchez-Pulido L, Rojas AM, et al. (2006) Gas1 is related to the glial cell-derived neurotrophic factor family receptors and regulates ret signaling. *J Biol Chem* 281:14330–14339.
- Rubilar T (2010) Morfología del sistema nervioso y regeneración en el asteroideo fisíparo *Allostichaster capensis*. Universidad Nacional del Comahue. Bariloche.
- Rubilar T, Crespi-Abril A (2017) Does Echinoderm research deserve an ethical consideration? *Rev Biol Trop* 65:11–22.
- Rubilar T, Díaz de Vivar ME, Pastor de Ward CT (2008) Biochemical composition of body compartments during the reproductive cycle of the starfish *Allostichaster capensis* in Patagonia, Argentina. *Rev Biol Trop* 56:351–360.
- Rubilar T, Epherra L, Deias-Spreng J, et al. (2016) Ingestion, absorption and assimilation efficiencies, and production in the sea urchin *Arbacia dufresnii* fed a formulated feed. *J Shellfish Res* 35: 1083–1093.
- Rubilar T, Meretta P, Cledón M (2015) Regeneration rate after fission in the fissiparous sea star *Allostichaster capensis* (Asteroidea). *Rev Biol Trop* 63:1–8.
- Rubilar T, Pastor C, Díaz de Vivar E (2005) Timing of fission in the starfish *Allostichaster capensis* (Echinodermata: Asteroidea) in laboratory. *Rev Biol Trop* 53:299–303.
- Ruppert EE, Fox RS, Barnes RD (2004) Invertebrate zoology: a functional evolutionary approach. Thomson-Brooks/Cole, Belmont, CA.

- Saito S, Hamanaka G, Kawai N, et al. (2017) Characterization of TRPA channels in the starfish *Patiria pectinifera*: Involvement of thermally activated TRPA1 in thermotaxis in marine planktonic larvae. *Sci Rep* 7:1–14.
- Saló E, Baguñà J (1984) Regeneration and pattern formation in planarians. I. The pattern of mitosis in anterior and posterior regeneration in *Dugesia tigrina*, and a new proposal for blastema formation. *J Embryol Exp Morphol* 83:63–80.
- Saló E, Baguñà J (2002) Regeneration in planarians and other worms: New findings, new tools, and new perspectives. *J Exp Zool* 292:528–539.
- San Miguel-Ruiz JE, Maldonado-Soto AR, García-Arrarás JE (2009) Regeneration of the radial nerve cord in the sea cucumber *Holothuria glaberrima*. *BMC Dev Biol* 9:3.
- Sánchez MP, Silos-Santiago I, Frisén J, et al. (1996) Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. *Nature* 382:70–73.
- Sanicola M, Hession C, Worley D, et al. (1997) Glial cell line-derived neurotrophic factor-dependent RET activation can be mediated by two different cell-surface accessory proteins. *Proc Natl Acad Sci* 94:6238–6243.
- Saraswati S, Adolfsen B, Littleton JT (2007) Characterization of the role of the Synaptotagmin family as calcium sensors in facilitation and asynchronous neurotransmitter release. *PNAS* 104:14122–27.
- Sasikumar AN, Goss Kinzy T (2012) The many roles of the eukaryotic elongation factor 1 complex. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 3:543–555.
- Satterlie RA (2015) Cnidarian nerve nets and neuromuscular efficiency. *Integr Comp Biol* 55:1050–1057.
- Saudemont A, Haillet E, Mekpoh F, et al. (2010) Ancestral regulatory circuits governing ectoderm patterning downstream of nodal and BMP2/4 revealed by gene regulatory network analysis in an Echinoderm. *PLoS Genet* 6:1–31.
- Sawada H, Ibi M, Kihara T, et al. (2000) Neuroprotective mechanism of glial cell line-derived neurotrophic factor in mesencephalic neurons. *J Neurochem* 74:1175–1184.
- Schmidt-Rhaesa A, Harzsch S, Purschke G (2015) Structure and evolution of invertebrate nervous systems. Oxford University Press.
- Schueler-Furman O, Glick E, Segovia J, Linial M (2006) Is GAS1 a co-receptor for the GDNF family of ligands? *Trends Pharmacol Sci* 27:72–77.
- Schwarz TL (2004) Synaptotagmin promotes both vesicle fusion and recycling Thomas. 101:16401–16402.

- Sconzo G, Geraci F, Melfi R, et al. (1997) Sea urchin HSF activity in vitro and in transgenic embryos. *Biochem Biophys Res Commun* 240:436–441.
- Serbedzija GN, Burgan S, Fraser SE, Bronner-Fraser M (1991) Vital dye labelling demonstrates a sacral neural crest contribution to the enteric nervous system of chick and mouse embryos. *Development* 111: 857-866.
- Serra MP, Quartu M, Mascia F, et al. (2005) Ret, GFRalpha-1, GFRalpha-2 and GFRalpha-3 receptors in the human hippocampus and fascia dentata. *Int J Dev Neurosci* 23:425–438.
- Sewell MA (2005) Utilization of lipids during early development of the sea urchin *Evechinus chloroticus*. *Mar Ecol Prog Ser* 304:133–142.
- Sewell MA, Young CM (1999) Temperature limits to fertilization and early development in the tropical sea urchin *Echinometra lucunter*. *J Exp Mar Bio Ecol* 236:291–305.
- Sheppard Brennand H, Soars N, Dworjanyn SA, et al. (2010) Impact of ocean warming and ocean acidification on larval development and calcification in the sea urchin *Tripneustes gratilla*. *PLoS One* 5:1–7.
- Shepherd IT, Pietsch J, Elworthy S, et al. (2004). Roles for GFR α 1 receptors in zebrafish enteric nervous system development. *Development* 131:241-249.
- Shi Y, Liang VC (1994) Cloning and characterization of the ribosomal protein L8 gene from *Xenopus laevis*. *BBA- Gene Structure and Expression* 1217:227–228.
- Sinigaglia C, Busengdal H, Leclère L, et al. (2013) The bilaterian head patterning gene six3/6 controls aboral domain development in a cnidarian. *PLoS Biol* 11:e1001488.
- Skaper SD, Selak I, Manthorpe M, Varon S (1984) Chemically defined requirements for the survival of cultured 8-day chick embryo ciliary ganglion neurons. *Brain Res* 302:281–290.
- Soba P, Han C, Zheng Y, et al. (2015) The Ret receptor regulates sensory neuron dendrite growth and integrin mediated adhesion. *Elife* 4:e05491.
- Soler RM, Dolcet X, Encinas M, et al. (1999) Receptors of the glial cell line-derived neurotrophic factor family of neurotrophic factors signal cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in spinal cord motoneurons. *J Neurosci* 19:9160-9169.
- Stahl N, Yancopoulos GD (1994) The tripartite CNTF receptor complex: Activation and signaling involves components shared with other cytokines. *J Neurobiol* 25:1454–1466.
- Stampfli NC, Knillmann S, Liess M, et al. (2013) Two stressors and a community - Effects of hydrological disturbance and a toxicant on freshwater zooplankton. *Aquat Toxicol* 127:9–20.
- Staver JM, Strathmann RR (2002) Evolution of fast development of planktonic embryos to early swimming. *Biol Bull* 203:58–69.

- Steinkamp M, Geerling I, Seufferlein T, et al. (2003) Glial-derived neurotrophic factor regulates apoptosis in colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 124:1748-1757.
- Stenzel P, Angerer LM, Smith BJ, et al. (1994) The univogene encodes a member of the transforming growth factor- β superfamily with restricted expression in the sea urchin embryo. *Dev. Biol.* 166:149–158.
- Strathmann MF (1987) Reproduction and development of marine invertebrates of the northern Pacific coast: data and methods for the study of eggs, embryos, and larvae. University of Washington Press.
- Strathmann RR. (1971) The feeding behavior of planktotrophic echinoderm larvae: Mechanisms, regulation, and rates of suspension feeding. *J Exp Mar Bio Ecol* 6:109–160.
- Strathmann RR (2014) Culturing larvae of marine invertebrates. En: Carroll DJ, Stricker SA. *Developmental biology of the sea urchin and other marine invertebrates*. Humana Press, Totowa, NJ.
- Strathmann RR (1975) Larval feeding in echinoderms. *Am Zool* 15:717–730.
- Strathmann RR (2007) Time and extent of ciliary response to particles in a non-filtering feeding mechanism. *Biol Bull* 212:93–103.
- Südhof TC (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* 27:509–547.
- Südhof TC (2002) Synaptotagmins: Why So Many? *J Biol Chem* 277:7629–7632.
- Sugaya R, Ishimaru S, Hosoya T, et al. (1994) A *Drosophila* homolog of human proto-oncogene ret transiently expressed in embryonic neuronal precursor cells including neuroblasts and CNS cells. *Mech Dev* 45:139–145.
- Sutherby J, Giardini JL, Nguyen J, et al. (2012) Histamine is a modulator of metamorphic competence in *Strongylocentrotus purpuratus* (Echinodermata: Echinoidea). *BMC Dev Biol* 12:14.
- Sutton BR, Davletov BA, Berghuis AM, et al. (1995) Structure of the first C2 domain of Synaptotagmin I: A novel Ca²⁺/Phospholipid-binding fold. *Cell* 80: 929-938.
- Swalla BJ, Smith AB (2008) Deciphering deuterostome phylogeny: molecular, morphological and palaeontological perspectives. *Philos Trans R Soc Lond B* 363:1557–1568.
- Tadros W, Lipshitz HD (2009) The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Development* 136:3033–3042.
- Takahashi M (2001) The GDNF/RET signaling pathway and human diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 12:361–373.

- Tang MJ, Worley D, Sanicola M, Dressler GR (1998) The RET-glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) pathway stimulates migration and chemoattraction of epithelial cells. *J Cell Biol* 142:1337–1345.
- Taylor EW, Jordan D, Coote JH (1999) Central control of the cardiovascular and respiratory systems and their interactions in vertebrates. *Physiol Rev* 79:855–916.
- Terasaki M (2013) Imaging of echinoderm fertilization. *Mol Biol Cell* 9:1609–1612.
- Teso SV, Bigatti G, Casas GN, et al. (2009) Do native grazers from Patagonia, Argentina, consume the invasive kelp *Undaria pinnatifida*. *Rev del Mus Argentino Cs Nat Bernardino Rivadavia* 11:7–14.
- Thompson RJ (1983) The relationship between food ration and reproductive effort in the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Oecologia* 56:50–57.
- Thorndyke MC, Candia-Carnevali MD (2001) Regeneration neurohormones and growth factors in echinoderms. *Can J Zool* 79:1171–1208.
- Thorndyke MC, Chen W-C, Beesley PW, et al. (2001) Molecular approach to echinoderm regeneration. *Microsc Res Tech* 55:474–485.
- Thorndyke MC, Crawford BD, Burke RD (1992) Localization of a SALMFamide neuropeptide in the larval nervous system of the sand dollar *Dendraster excentricus*. *Acta Zool* 73:207–212.
- Thouveny Y. (1998) Regeneration through phylogenesis. *Cell Mol basis Regen* 9–44.
- Tracey WD, Wilson RI, Laurent G, Benzer S (2003) Painless, a *Drosophila* gene essential for nociception. *Cell* 113:261–273.
- Trupp M, Arenas E, Fainzilber M, et al. (1996) Functional receptor for GDNF encoded by the C-ret proto-oncogene. *Nature* 381:785–789.
- Trupp M, Raynoschek C, Belluardo N, Ibáñez CF (1998) Multiple GPI-anchored receptors control GDNF-dependent and independent activation of the c-Ret receptor Tyrosine Kinase. *Mol Cell Neurosci* 11:47–63.
- Tsybko AS, Il'chibaeva TV, Naumenko VS (2015) The effects of the glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) on the levels of mRNA of apoptotic genes Bax and Bcl-xl in the brain of mice genetically predisposed to pathological behavior. *Russ J Genet Appl Res* 5:407–412.
- Turbeville JM, Schulz JR, Raff RA (1994) Deuterostome phylogeny and the sister group of the chordates: evidence from molecules and morphology. *Mol Biol Evol* 11:648–655.
- Unuma T, Sakai Y, Agatsuma Y, et al. (2015) Sea urchin aquaculture in Japan. En: Brown NP, Eddy SD. *Echinoderm Aquaculture*. John Wiley & Sons, INC.

- Vadas RL (1977) Preferential feeding: an optimization strategy in sea urchins. *Ecol Monogr* 47:337–371.
- Valero-Gracia A, Petrone L, Oliveri P, et al. (2016) Non-directional photoreceptors in the pluteus of *Strongylocentrotus purpuratus*. *Front Ecol Evol* 4:1–12.
- Van Kesteren RE, Fainzilber M, Hauser G, et al. (1998) Early evolutionary origin of the neurotrophin receptor family. *The EMBO journal* 17:2534–2542.
- Vaughn D, Strathmann RR (2008) Predators induce cloning in echinoderm larvae. *Science* 319:1503.
- Vega Thurber R, Epel D (2007) Apoptosis in early development of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *Dev Biol* 303:336–346.
- Viana F, De la Peña E, Belmonte C (2002) Specificity of cold thermotransduction is determined by differential ionic channel expression. *Nat Neurosci* 5:254–260.
- Vickery M, McClintock J (2000) Effects of food concentration and availability on the incidence of cloning in planktotrophic larvae of the sea star *Pisaster ochraceus*. *Biol Bull* 199:298–304.
- Vickery MCL, Vickery MS, McClintock JB, Amsler CC (2001) Utilization of a novel deuterostome model for the study of regeneration genetics: molecular cloning of genes that are differentially expressed during early life stages of larval sea star regeneration. *Gene* 262:73–80.
- Vickery MS, McClintock JB (1998) Regeneration in metazoan larvae. *Nature* 394:140.
- Vickery MS, Vickery MCL, McClintock JB (2002) Morphogenesis and organogenesis in the regenerating planktotrophic larvae of asteroids and echinoids. *Biol Bull* 203:121–133.
- Viehweg J, Naumann WW, Olsson R (1998) Secretory radial glia in the ectoneural system of the sea star *Asterias rubens* (Echinodermata). *Acta Zool* 79:119–131.
- Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 269:5241–5248.
- Voets T, Nilius B (2003) TRPs Make Sense. *J Membr Biol* 192:1–8.
- Volynski KE, Krishnakumar SS (2018) Synergistic control of neurotransmitter release by different members of the synaptotagmin family. *Curr Opin Neurobiol* 51:154–162.
- Von Bartheld CS (2006) Evolution of neurotrophic factors: Preface with a historical perspective. *Brain Behav Evol* 68:121–123.
- Wadman M (2005) The healing touch. *Nature* 436:1079–1080.

- Walker CW, Lesser MP (1998) Manipulation of food and photoperiod promotes out-of-season gametogenesis in the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*: implications for aquaculture. *Mar Biol* 132:663–676.
- Walker CW, Lesser MP, Unuma T (2013) Sea urchin gametogenesis structural, functional and molecular genomic biology. *Dev Aquac Fish Sci* 38:25–43.
- Wang CY, Yang F, He XP, et al. (2002) Regulation of neuromuscular synapse development by glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin. *J Biol Chem* 277:10614–10625.
- Wang Y, Jiang Y, Meyering-Voss M, et al. (1997) Crystal structure of the EF-Tu EF-Ts complex from *Thermus thermophilus*. *Nat Struct Biol* 4:650–656.
- Wei Z, Angerer RC, Angerer LM (2011) Direct development of neurons within foregut endoderm of sea urchin embryos. *Proc Natl Acad Sci* 108:9143–9147.
- Wei Z, Yaguchi J, Yaguchi S, et al. (2009) The sea urchin animal pole domain is a Six3-dependent neurogenic patterning center. *Development* 136:1179–1189.
- Weiskirchen R, Meurer SK, Gressner OA, et al. (2009) BMP-7 as antagonist of organ fibrosis. *Front Biosci* 14:4992-5012.
- Weiss A, Attisano L (2013) The TGFbeta superfamily signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2:47–63.
- Weissman IL (2000) Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 100:157–168.
- Widenfalk J, Lundströmer K, Jubran M, et al. (2001) Neurotrophic factors and receptors in the immature and adult spinal cord after mechanical injury or kainic acid. *J Neurosci* 21:3457–3475.
- Widenfalk J, Nosrat C, Tomac A, et al. (1997) Neurturin and glial cell line-derived neurotrophic factor receptor-beta (GDNFR-beta), novel proteins related to GDNF and GDNFR-alpha with specific cellular patterns of expression suggesting roles in the developing and adult nervous system and in peripheral organs. *J Neurosci* 17:8506–8519.
- Williams D, Anderson D (1975) The reproductive system, embryonic development, larval development and metamorphosis of the sea urchin *Heliocidaris erythrogramma* (Val.) (Echinoidea : Echinometridae). *Aust J Zool* 23:371-403.
- Wong JL, Wessel GM (2004) Major components of a sea urchin block to polyspermy are structurally and functionally conserved. *Evol Dev* 6:134–153.
- Worley DS, Pisano JM, Choi ED, et al. (2000) Developmental regulation of GDNF response and receptor expression in the enteric nervous system. *Development* 127:4383–4393.
- Xiong J (2006) *Essential Bioinformatics*. Cambridge University Press.

- Yabu T, Kishi S, Okazaki T, Yamashita M (2001) Zebrafish Embryo. 47:39–47.
- Yamada K, Mihashi K (1998) Temperature-independent period immediately after fertilization in sea urchin eggs. Biol Bull 195:107–111.
- Yao R, Cooper GM (1995) Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. Science 267:2003–2006.
- Yoshihama M, Uechi T, Asakawa S, et al. (2002) The human ribosomal protein genes: Sequencing and comparative analysis of 73 genes. Genome Res 12:379–390.
- Youle RJ, Strasser A (2008) The Bcl-2 protein family: Opposing activities that mediate cell death. Nat Rev Mol Cell Biol 9:47–59.
- Young CM, Chia FS (1987) Reproduction of Marine Invertebrates. Boxwood, Pacific Grove,
- Young HM, Hearn CJ, Farlie PG, et al. (2001) GDNF Is a Chemoattractant for enteric neural cells. Dev Biol 229:503–516.
- Zaixso HE, Lizarralde ZI (2000) Distribución de equinodermos en el golfo San José y sur del golfo San Matías (Chubut, Argentina). Rev Biol Mar Oceanogr 35:127–145.
- Zar JH (1984) Bioestatistical analysis. Prentice Hall, New York.
- Zárate E, Díaz de Vivar M, Avaro M, et al. (2016) Sex and reproductive cycle affect lipid and fatty acid profiles of gonads of *Arbacia dufresnii* (Echinodermata: Echinoidea). Mar Ecol Prog Ser 551:185–199.
- Zhu B, Pennack JA, McQuilton P, et al. (2008) *Drosophila* neurotrophins reveal a common mechanism for nervous system formation. PLoS Biol 6:2476–2495.
- Zizer E, Steinkamp M, Gundel H, et al. (2012) GDNF protects enteric glia from apoptosis: evidence for an autocrine loop. BMC Gastroenterol 12:6.

Anexo capítulo 1

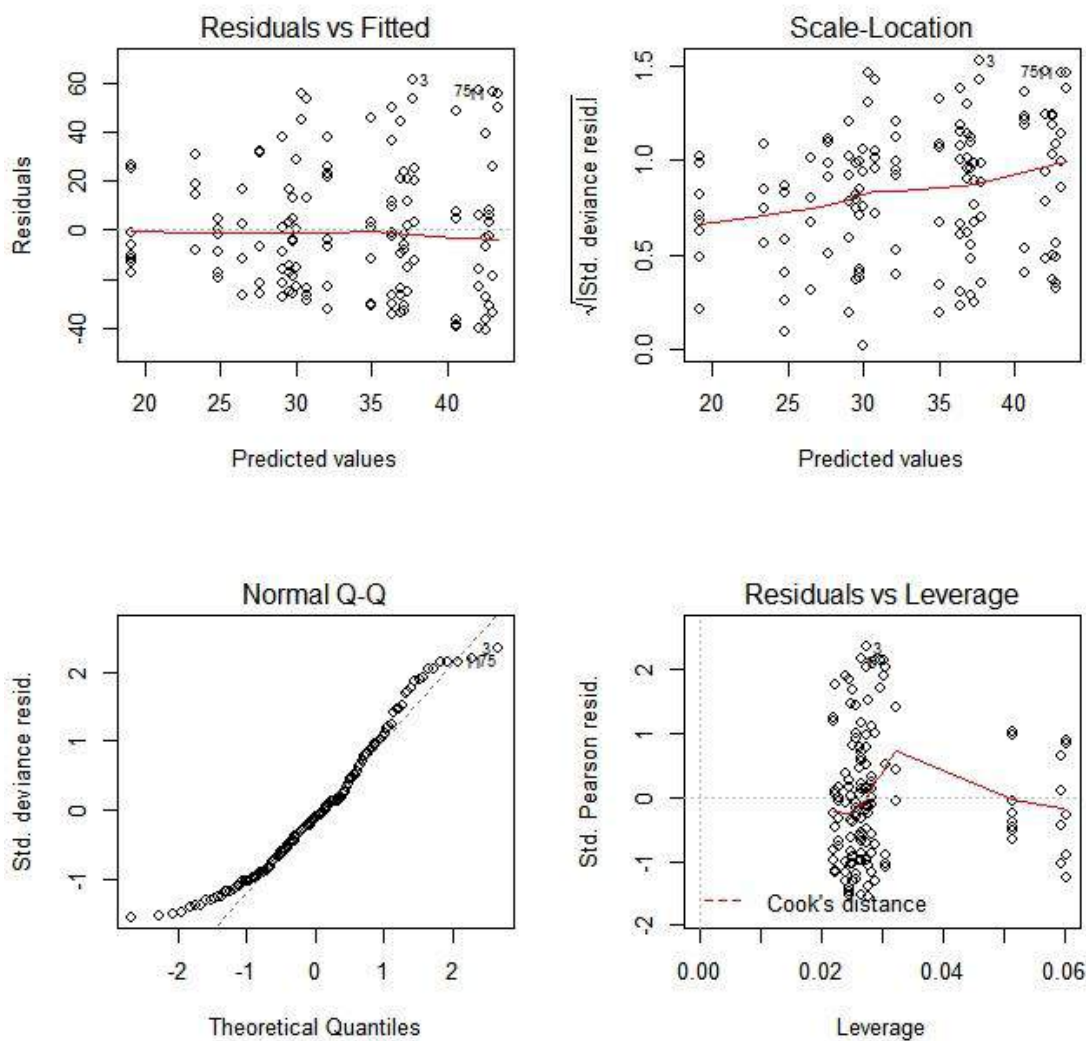


Figura 1.15. Residuales del Modelo 7. A) Valores residuales vs Valores predichos. B) Varianza de los valores predichos. C) Distribución Normal de los residuales. D) Distancia de Cook de los residuales.

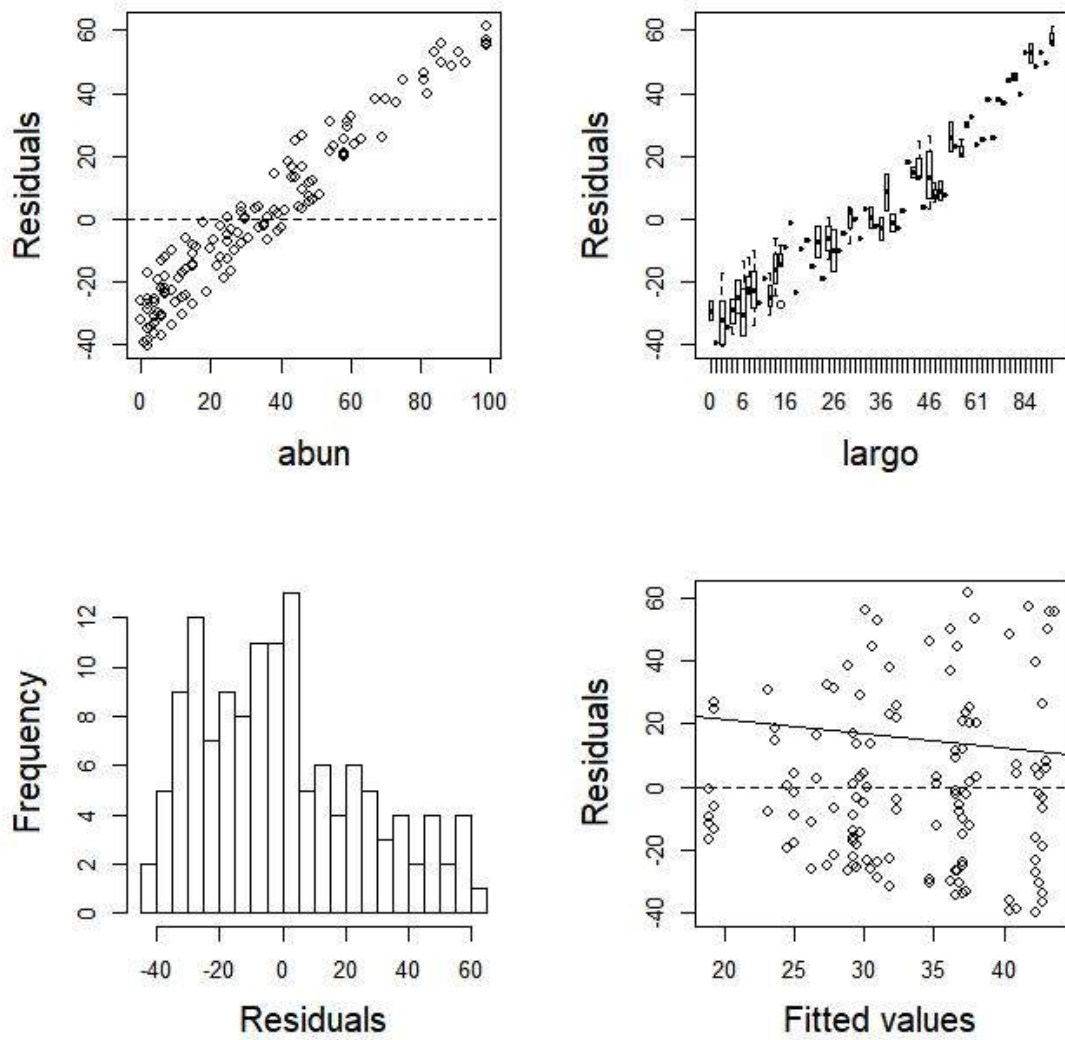


Figura 1.16. Residuales del Modelo 7. A) Valores residuales. B) Varianza de los residuales. C) Distribución de los residuales ajustados a la distribución Gamma. D) Residuales frente a valores ajustados.

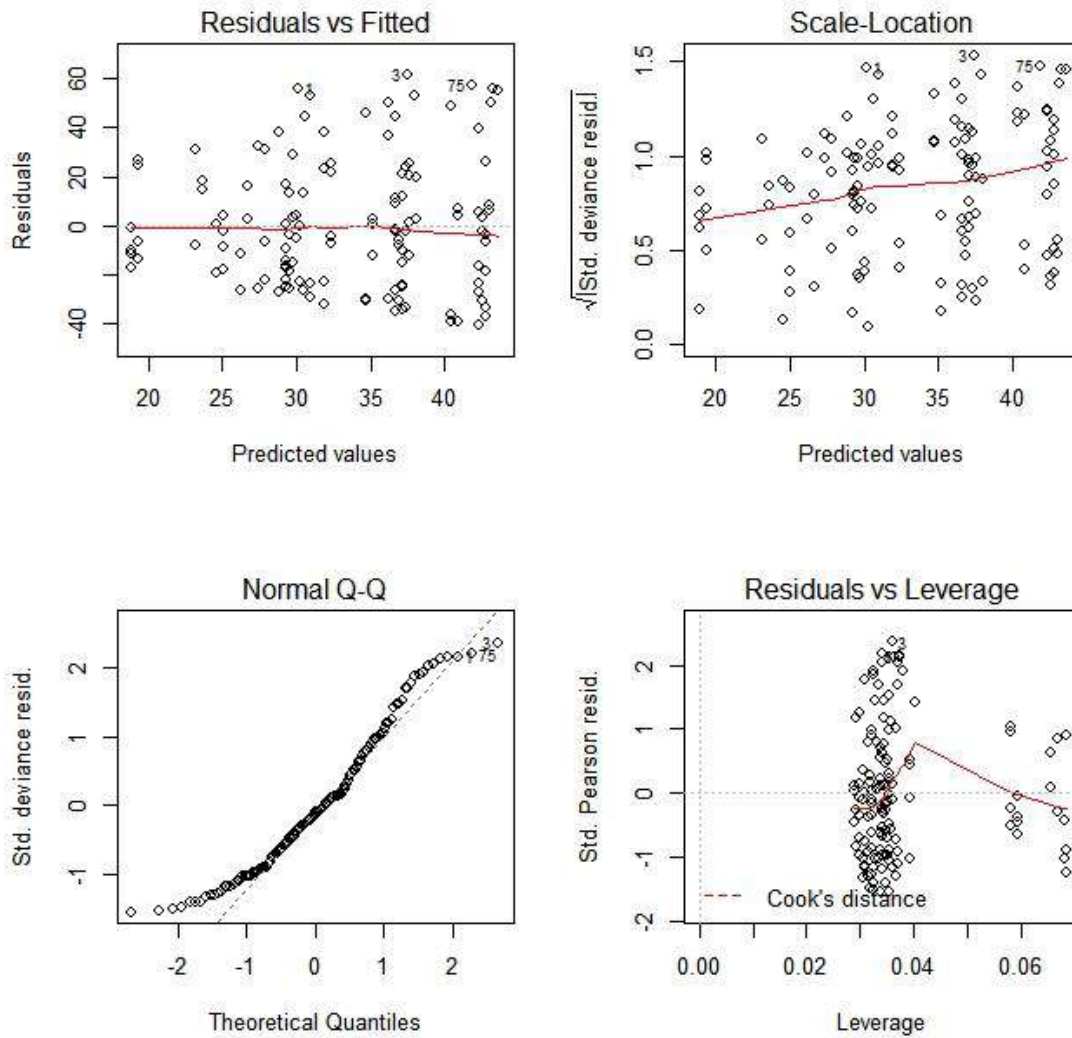


Figura 1.17. Residuales del Modelo 11. A) Valores residuales vs Valores predichos. B) Varianza de los valores predichos. C) Distribución Normal de los residuales. D) Distancia de Cook de los residuales.

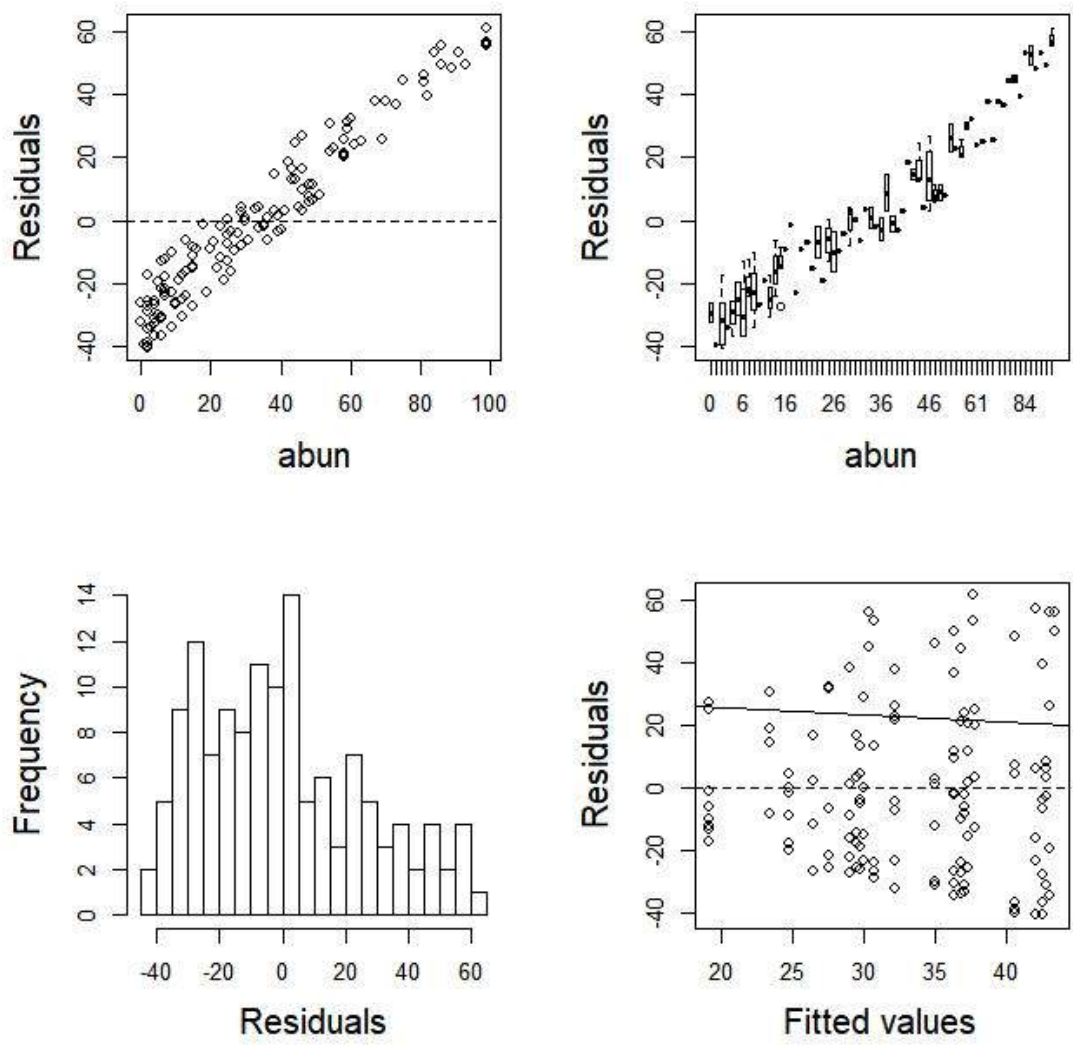


Figura 1.18. Residuales del Modelo 11. A) Valores residuales. B) Varianza de los residuales. C) Distribución de los residuales ajustados a la distribución Gamma. D) Residuales frente a valores ajustados.

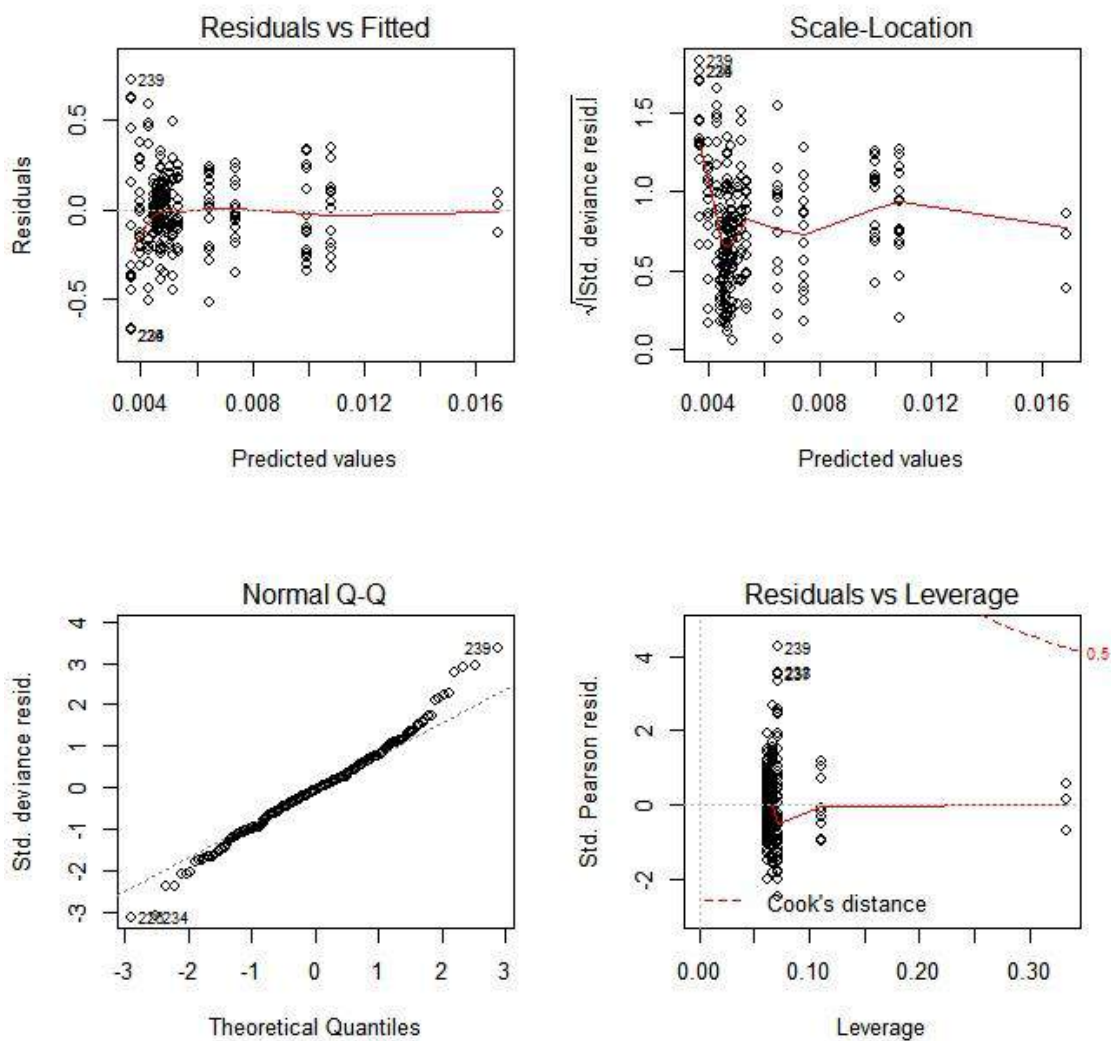


Figura 1.19. Residuales del Modelo 8. A) Valores residuales vs Valores predichos. B) Varianza de los valores predichos. C) Distribución Normal de los residuales. D) Distancia de Cook de los residuales.

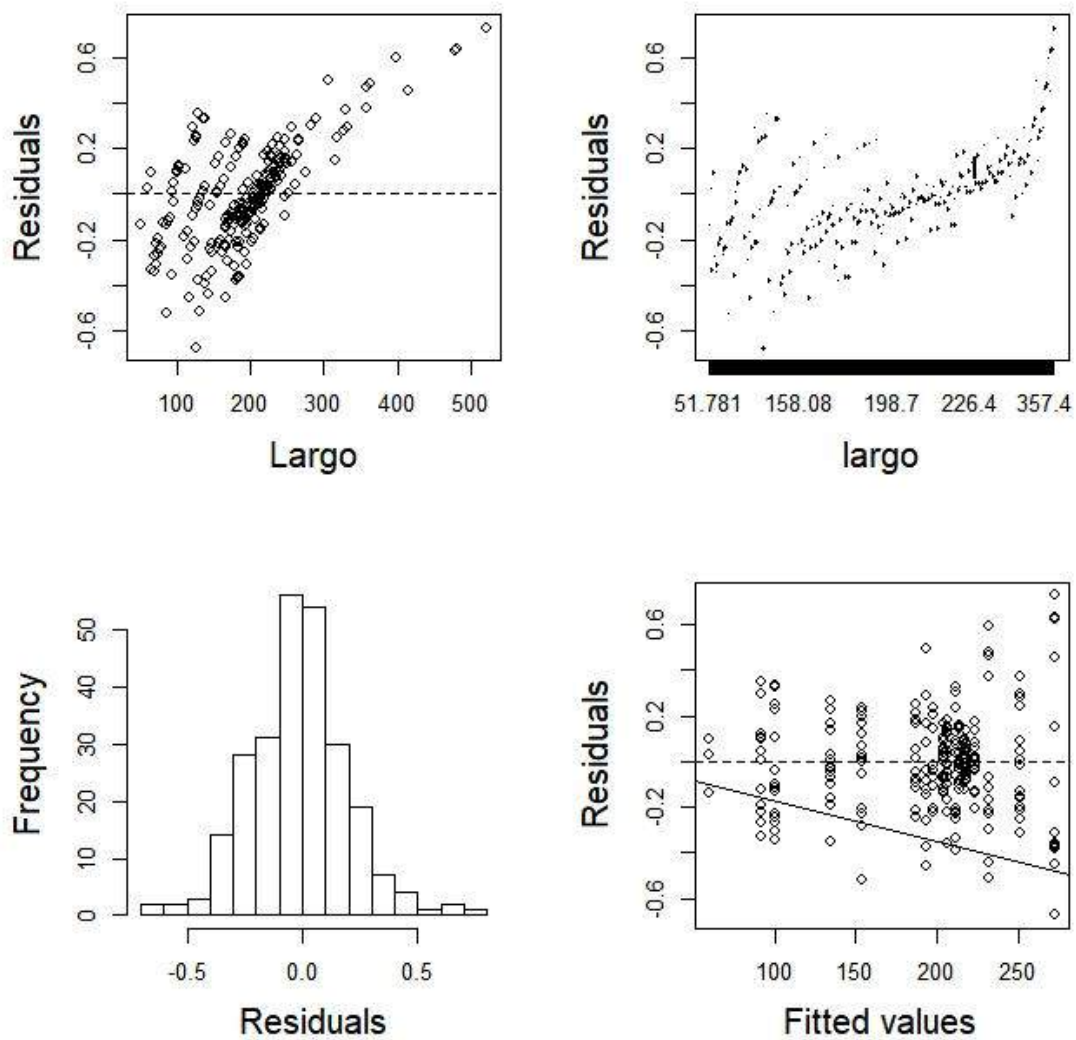


Figura 1.20. Residuales del Modelo 8. A) Valores residuales. B) Varianza de los residuales. C) Distribución de los residuales ajustados a la distribución Gamma. D) Residuales frente a valores ajustados.

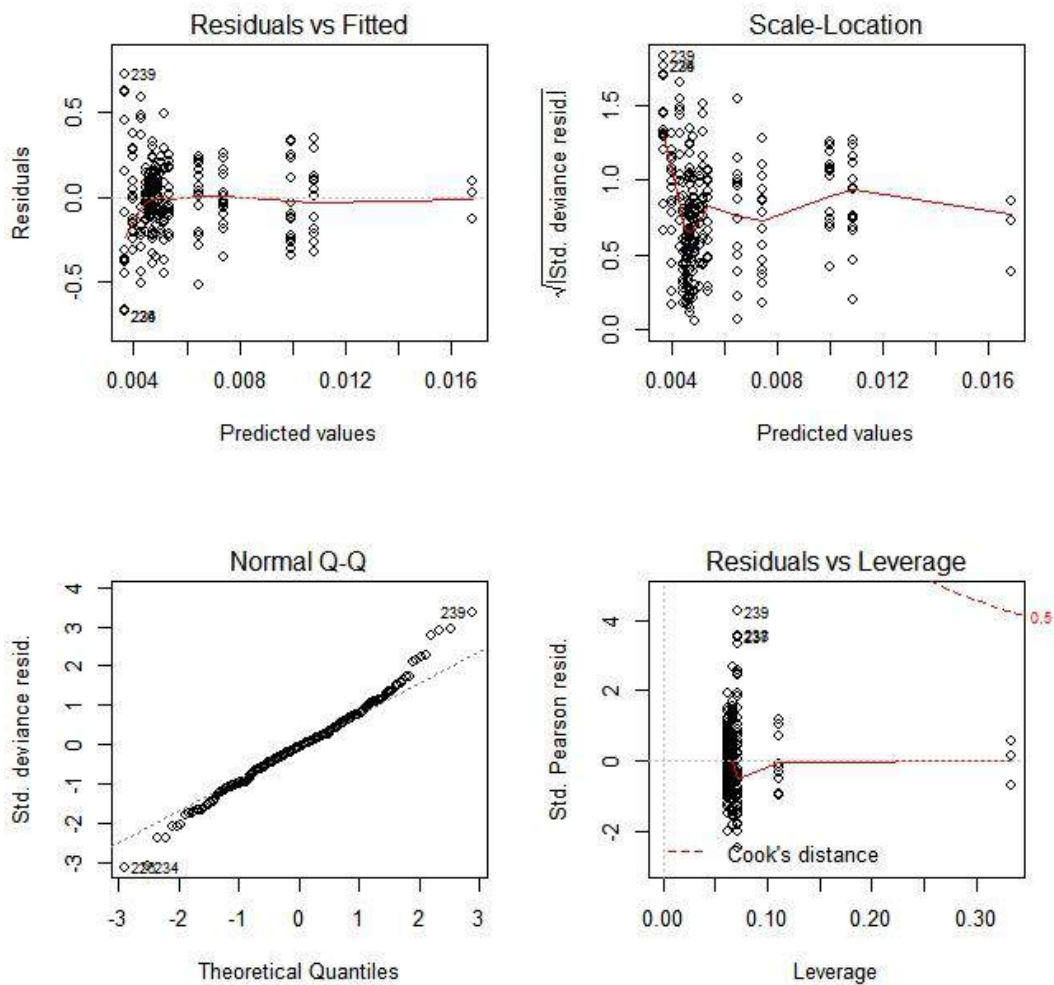


Figura 1.21. Residuales del Modelo .9. A) Valores residuales vs Valores predichos. B) Varianza de los valores predichos. C) Distribución Normal de los residuales. D) Distancia de Cook de los residuales.

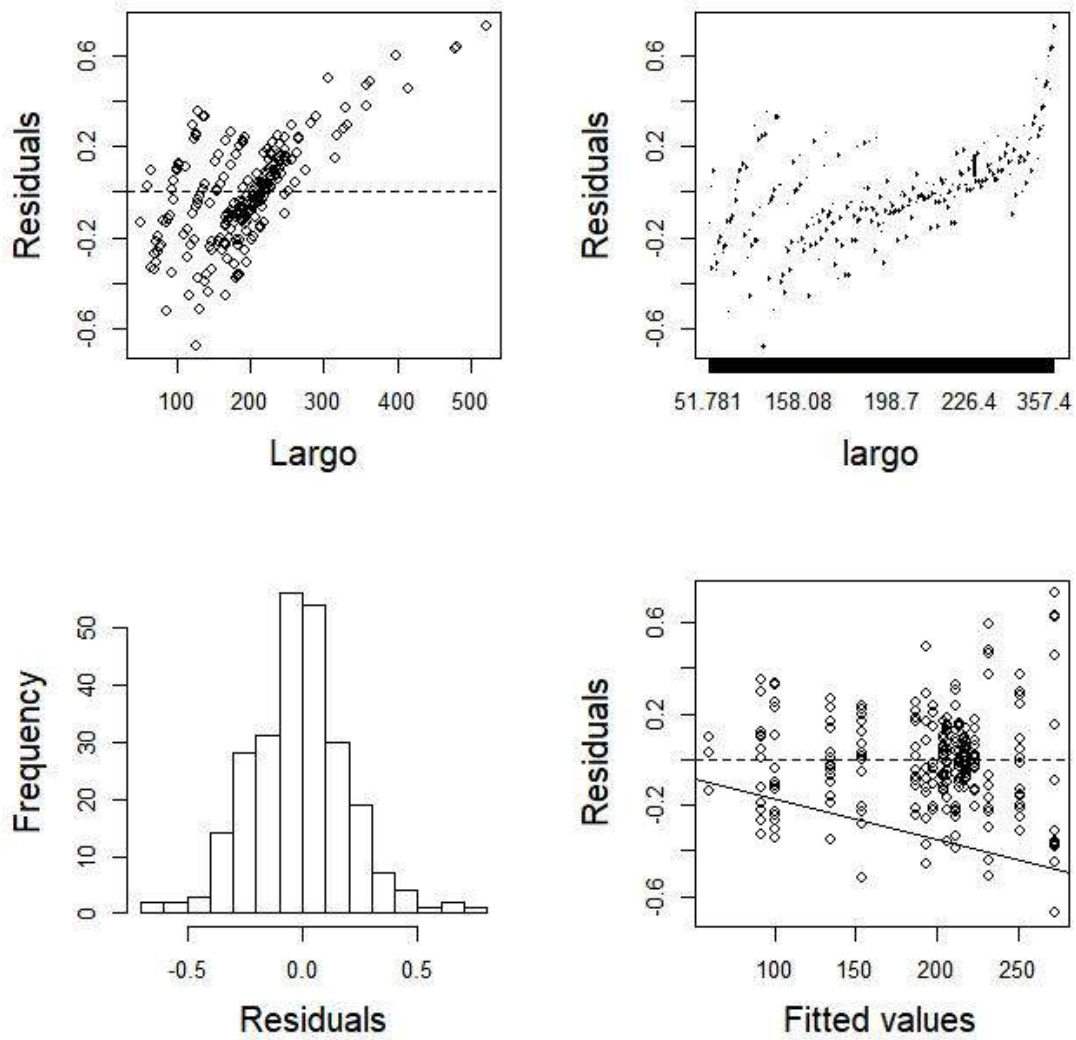


Figura 1.22. Residuales del Modelo 9. A) Valores residuales. B) Varianza de los residuales. C) Distribución de los residuales ajustados a la distribución Gamma. D) Residuales frente a valores ajustados.

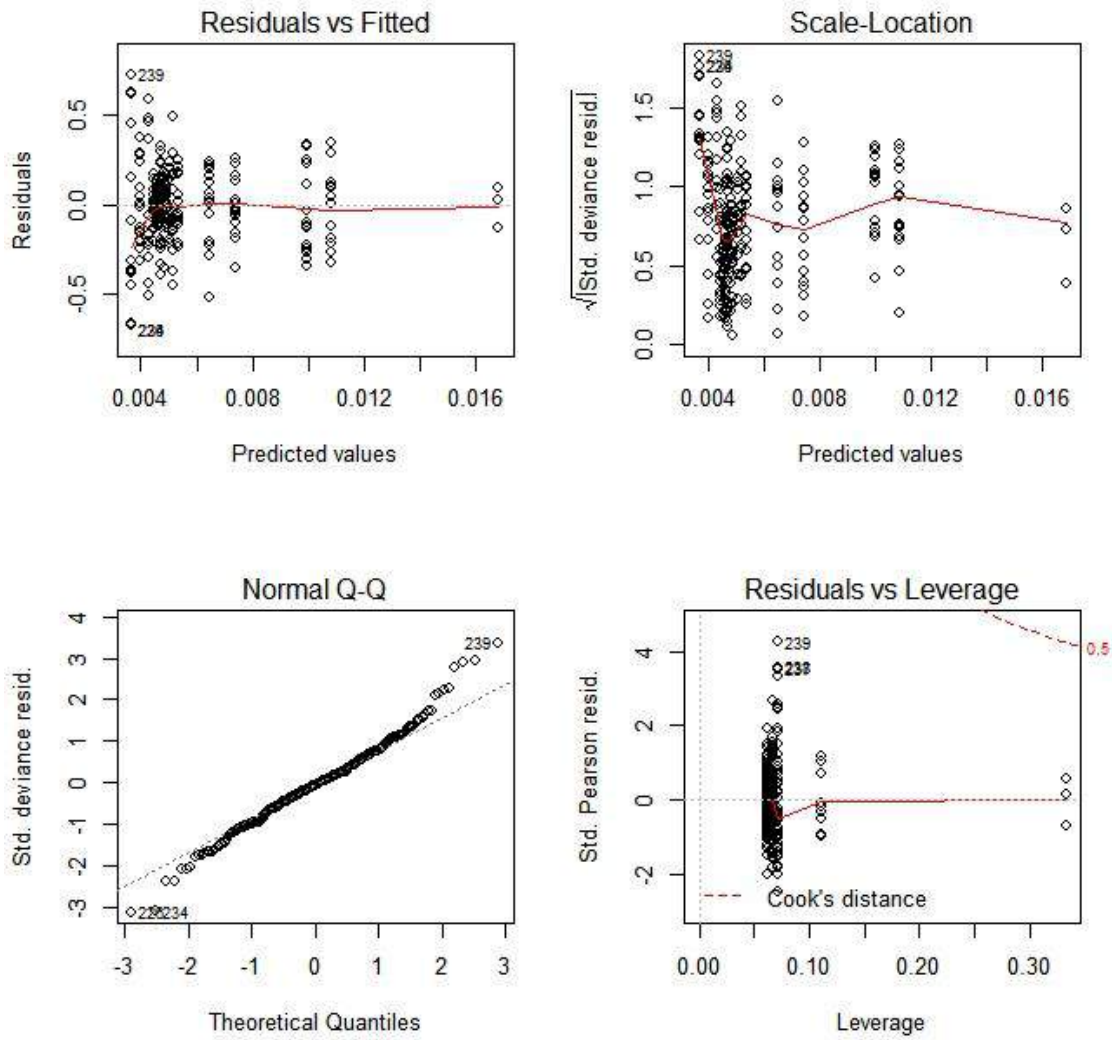


Figura 1.23. Residuales del Modelo 12. A) Valores residuales vs Valores predichos. B) Varianza de los valores predichos. C) Distribución Normal de los residuales. D) Distancia de Cook de los residuales.

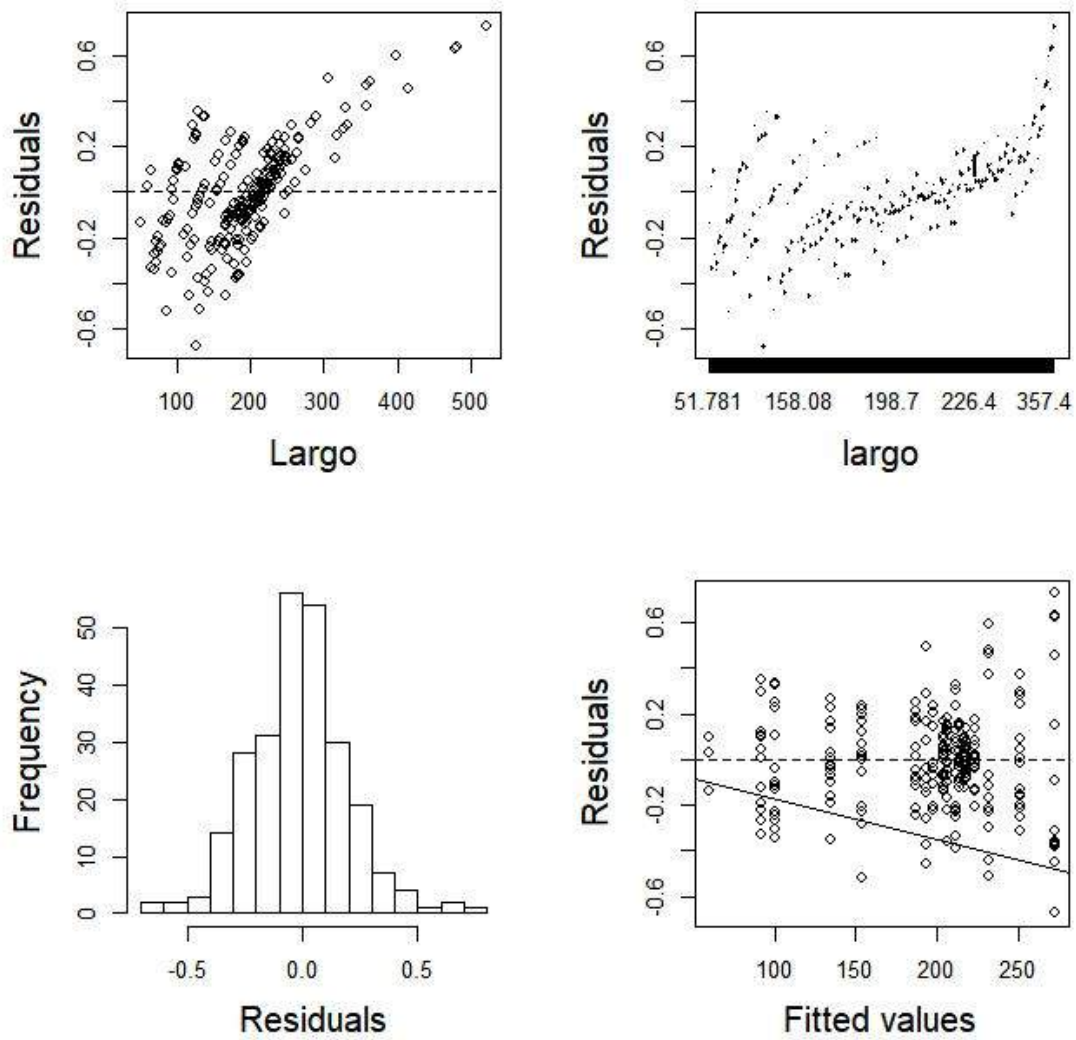


Figura 1.24. Residuales del Modelo 12. A) Valores residuales. B) Varianza de los residuales. C) Distribución de los residuales ajustados a la distribución Gamma. D) Residuales frente a valores ajustados.

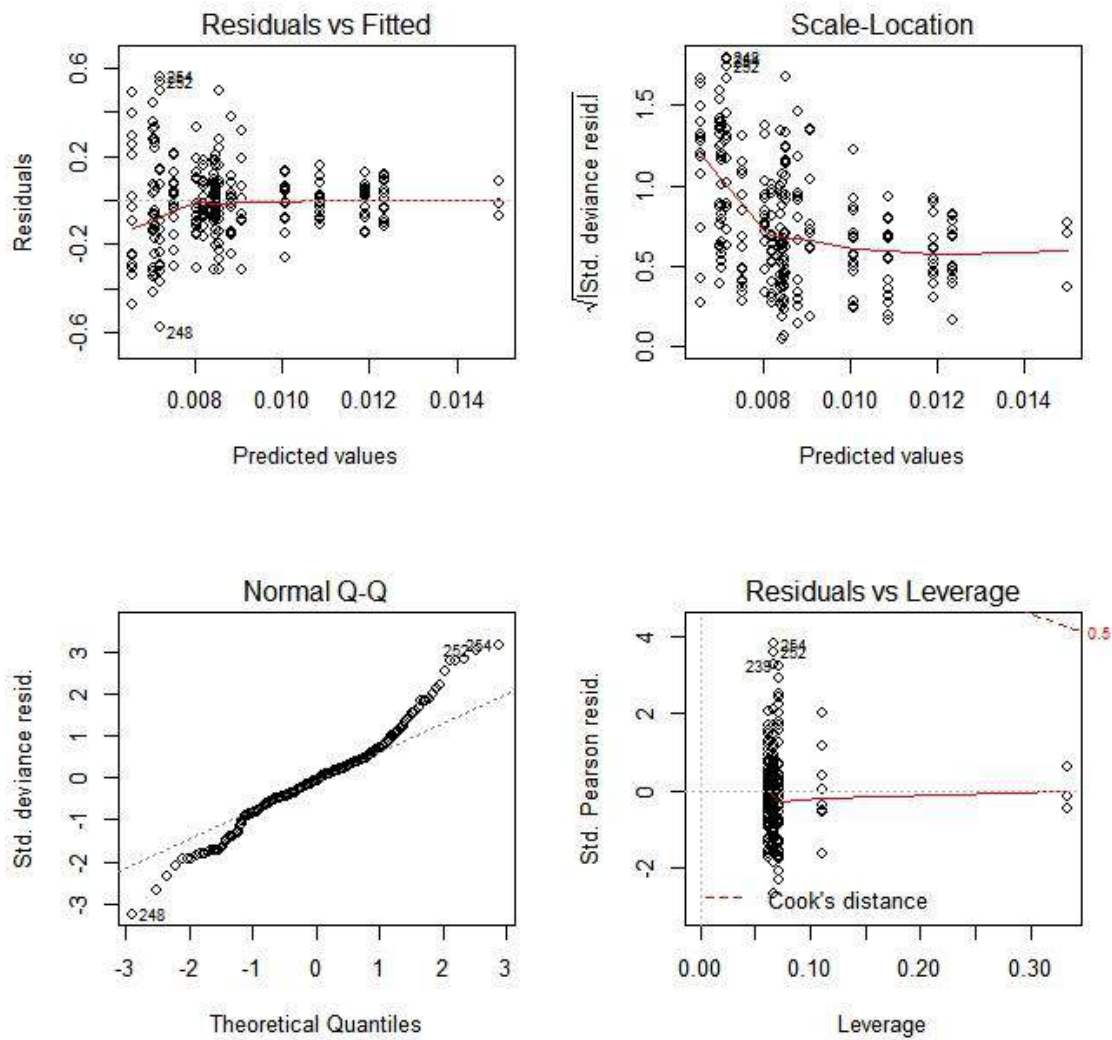


Figura 1.25. Residuales del Modelo 8. A) Valores residuales vs Valores predichos. B) Varianza de los valores predichos. C) Distribución Normal de los residuales. D) Distancia de Cook de los residuales.

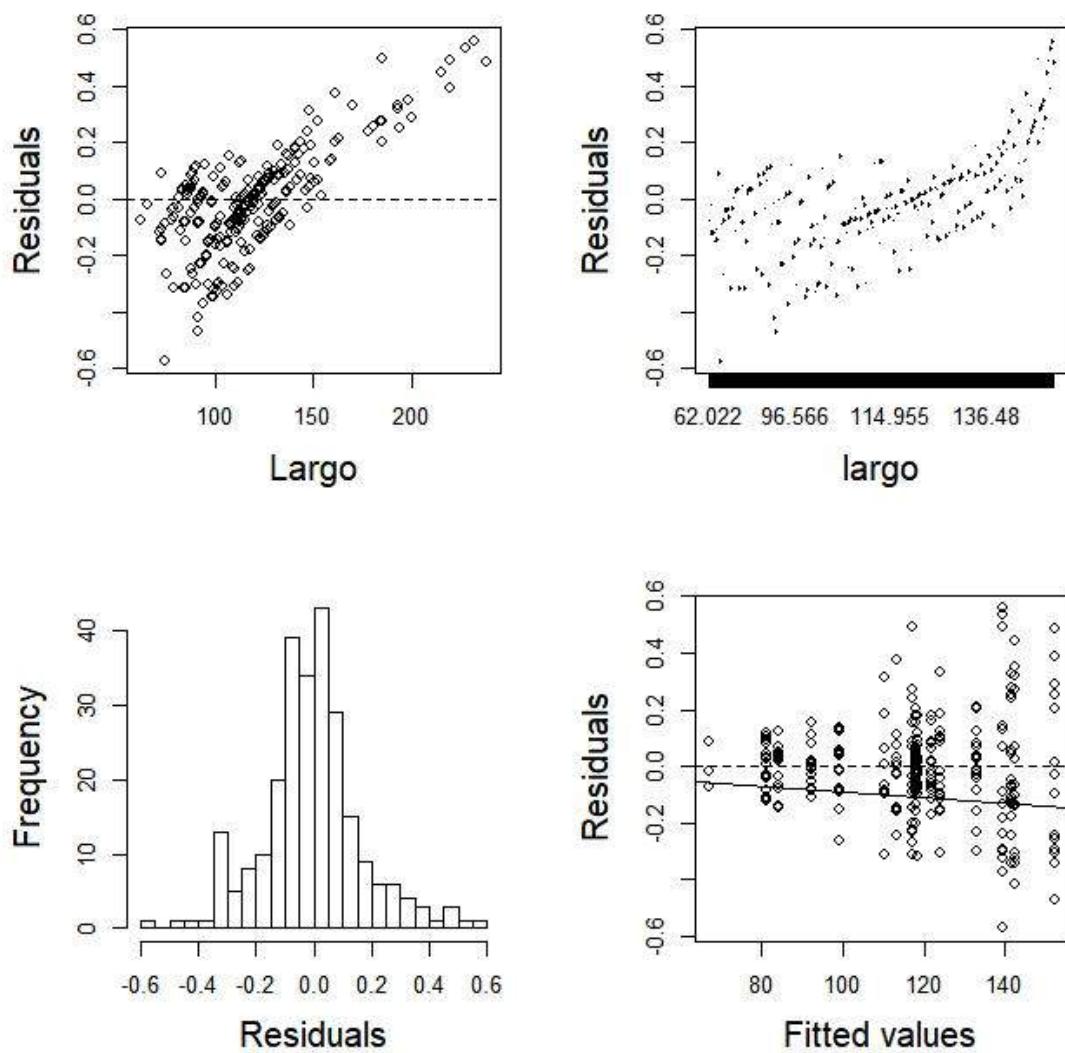


Figura 1.26. Residuales del Modelo 8. A) Valores residuales. B) Varianza de los residuales. C) Distribución de los residuales ajustados a la distribución Gamma. D) Residuales frente a valores ajustados.

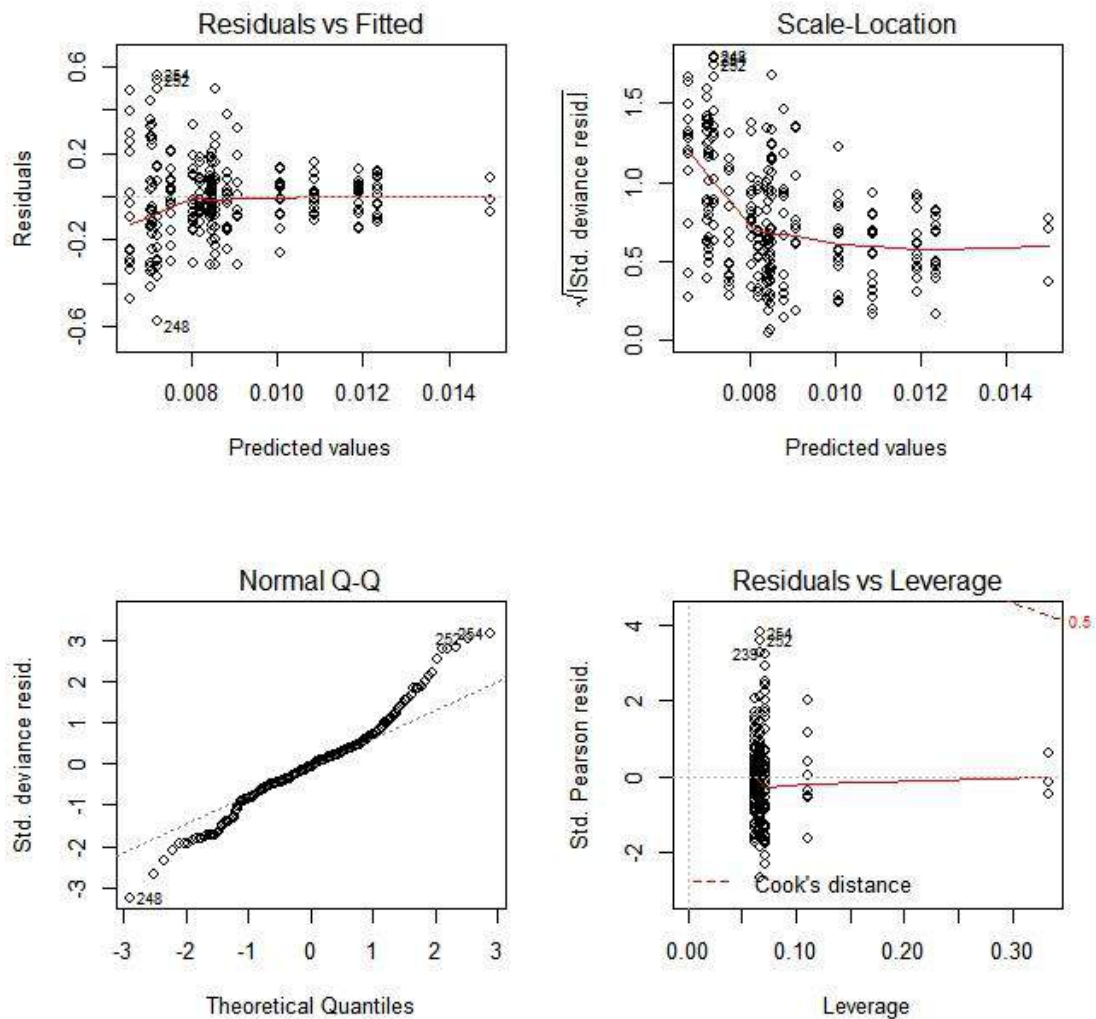


Figura 1.27. Residuales del Modelo 9. A) Valores residuales vs Valores predichos. B) Varianza de los valores predichos. C) Distribución Normal de los residuales. D) Distancia de Cook de los residuales.

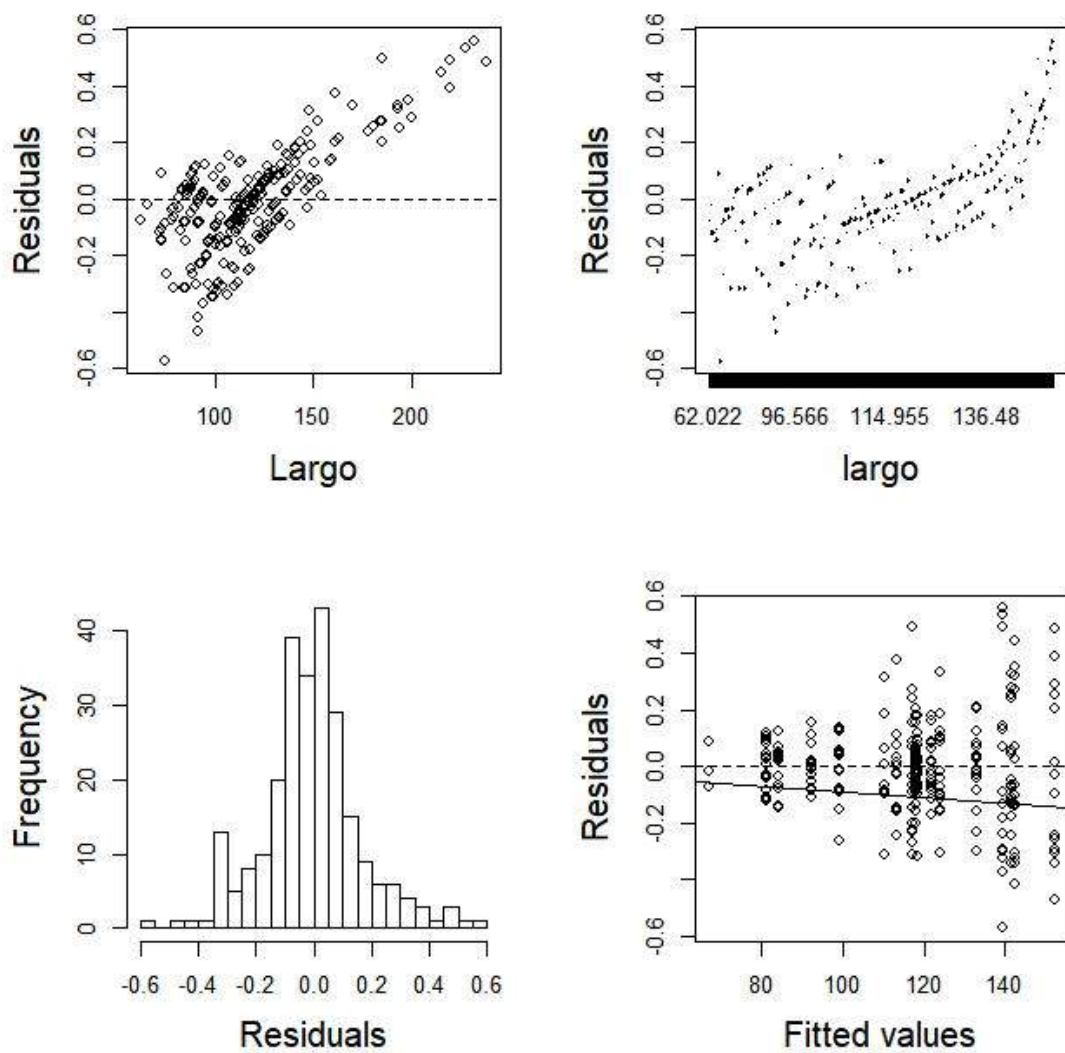


Figura 1.28. Residuales del Modelo 9. A) Valores residuales. B) Varianza de los residuales. C) Distribución de los residuales ajustados a la distribución Gamma. D) Residuales frente a valores ajustados.

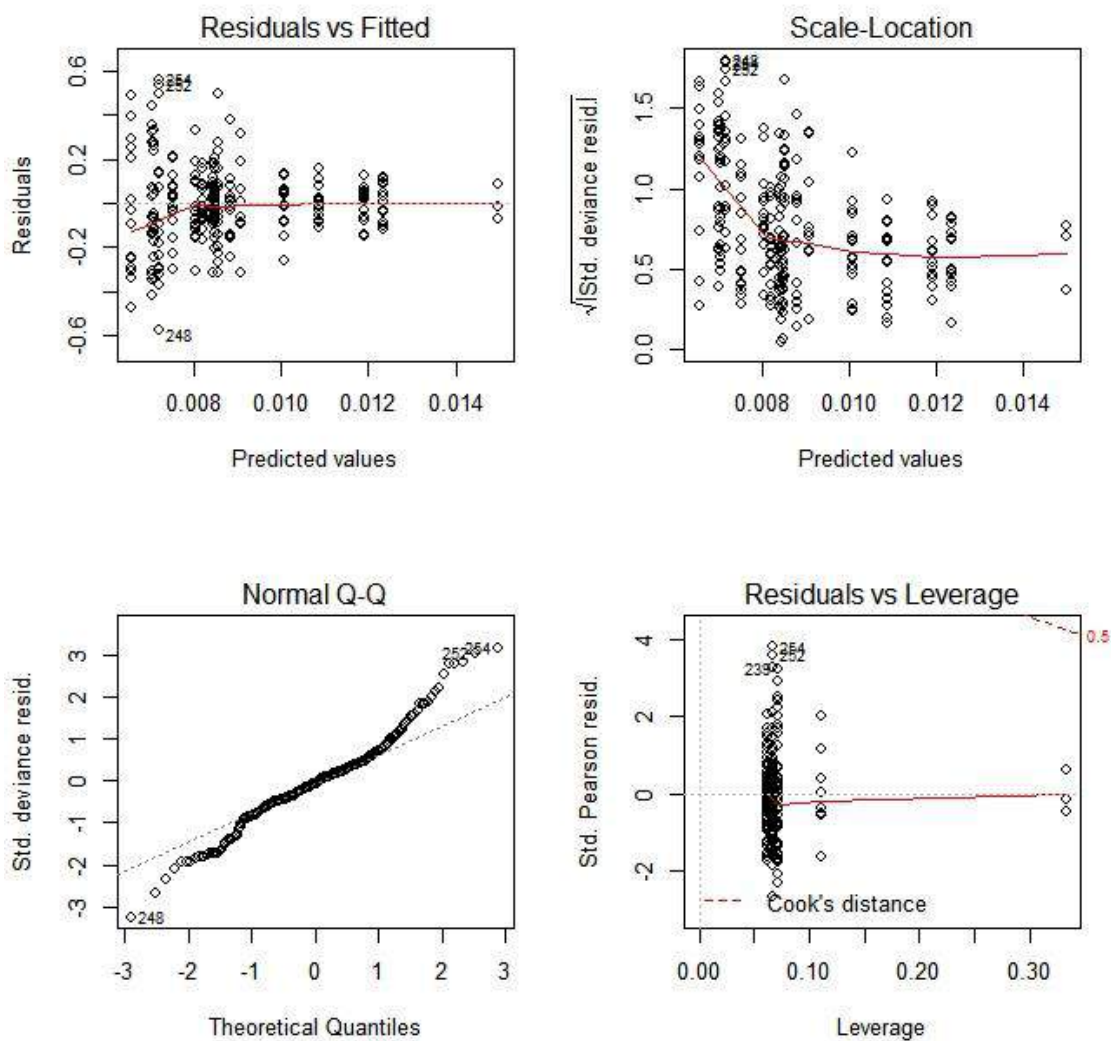


Figura 1.29. Residuales del Modelo 12. A) Valores residuales vs Valores predichos. B) Varianza de los valores predichos. C) Distribución Normal de los residuales. D) Distancia de Cook de los residuales.

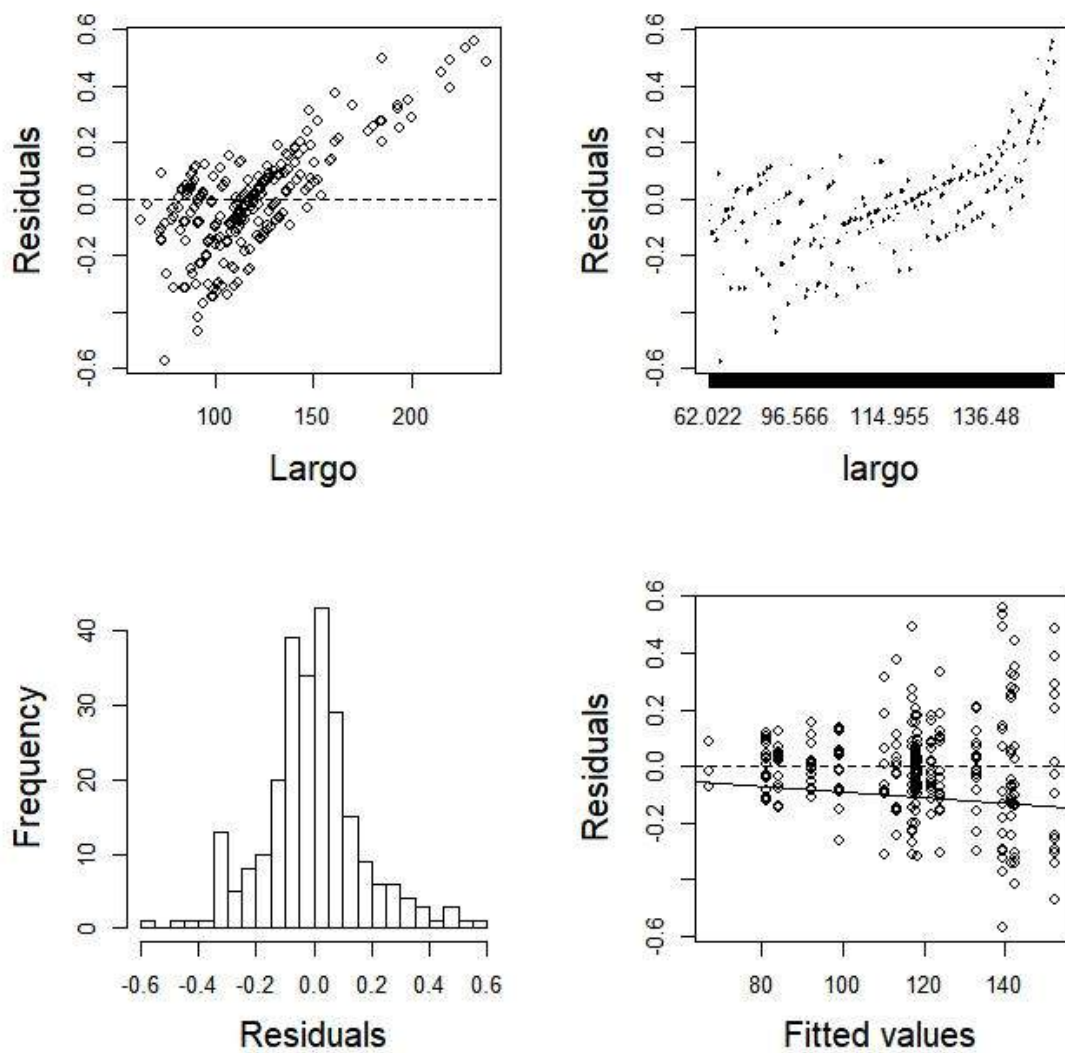


Figura 1.30. Residuales del Modelo 12. A) Valores residuales. B) Varianza de los residuales. C) Distribución de los residuales ajustados a la distribución Gamma. D) Residuales frente a valores ajustados.

Anexo capítulo 2

Tabla 2.13: Códigos de identificación de las secuencias utilizadas para los alineamientos.

GEN	Código de secuencia	Base de datos utilizada	Especie	Clase taxonómica
GFRα	P56159	Uniprot	<i>Homo sapiens</i>	Mamífero
	P97785	Uniprot	<i>Mus musculus</i>	Mamífero
	A7YY41	Uniprot	<i>Bos taurus</i>	Mamífero
	O13156	Uniprot	<i>Gallus gallus</i>	Ave
	AGY14507.1	NCBI	<i>Scyliorhinus canicula</i>	Pez Cartilaginoso
	NP_001096555.1	NCBI	<i>Xenopus tropicalis</i>	Anfibio
	XP_022094102.1	NCBI	<i>Acanthaster planci</i>	Equinodermo
	XP_792667.3	NCBI	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	Equinodermo
	NP_001247207.1	NCBI	<i>Drosophila melanogaster</i>	Insecto
	KRX17289.1	NCBI	<i>Trichinella nelsoni</i>	Nematodo
BCL2	P10415	Uniprot	<i>Homo sapiens</i>	Mamífero
	O02718	Uniprot	<i>Bos taurus</i>	Mamífero
	XP_018123221.1	NCBI	<i>Xenopus laevis</i>	Anfibio
	XP_020385332.1	NCBI	<i>Rhincodon typus</i>	Pez Cartilaginoso
	XP_002740789.2	NCBI	<i>Saccoglossus kowalevskii</i>	Hemicordado
	DN24175_c0_g1_i1 _(-2)_GD	Transcriptoma local	<i>Arbacia dufresnii</i>	Equinodermo
	XP_787479.3	NCBI	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	Equinodermo
	PIK47408.1	NCBI	<i>Apostichopus japonicus</i>	Equinodermo
	CDW54906.1	NCBI	<i>Trichuris trichiura</i>	Nematodo
	AAF26841.1	NCBI	<i>Drosophila melanogaster</i>	Insecto
Bax	Q07812	Uniprot	<i>Homo sapiens</i>	Mamífero
	O02703	Uniprot	<i>Bos taurus</i>	Mamífero
	XP_020788830.1	NCBI	<i>Boleophthalmus pectinirostris</i>	Pez Óseo
	Q6P4Y4	Uniprot	<i>Xenopus tropicalis</i>	Anfibio
	XP_006822173.1	NCBI	<i>Saccoglossus kowalevskii</i>	Hemicordado
	DN26034_c6_g2_i1 _GD	Transcriptoma local	<i>Arbacia dufresnii</i>	Equinodermo
	XP_022082473.1	NCBI	<i>Acanthaster planci</i>	Equinodermo
	XP_011667030.1	NCBI	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	Equinodermo
	XP_022291806.1	NCBI	<i>Crassostrea virginica</i>	Molusco
	TRPa	O75762	Uniprot	<i>Homo sapiens</i>
A0A221ZRZ9		Uniprot	<i>Bos taurus</i>	Mamífero
XP_007885526.1		NCBI	<i>Callorhinchus milii</i>	Pez Cartilaginoso
NP_001121434.1		NCBI	<i>Xenopus tropicalis</i>	Anfibio
XP_006812882.1		NCBI	<i>Saccoglossus kowalevskii</i>	Hemicordado
XP_797912.2		NCBI	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	Equinodermo
DN18410_C0_g2_i 1 (-1)_ESO		Transcriptoma local	<i>Arbacia dufresnii</i>	Equinodermo
BAX76613.1		NCBI	<i>Patiria pectinifera</i>	Equinodermo
XP_022091399.1		NCBI	<i>Acanthaster planci</i>	Equinodermo

GEN	Código de secuencia	Base de datos utilizada	Especie	Clase taxonómica
	XP_022289770.1	NCBI	<i>Crassostrea virginica</i>	Molusco
	Q7Z020	Uniprot	<i>Drosophila melanogaster</i>	Insecto
GFAP	P14136	Uniprot	<i>Homo sapiens</i>	Mamífero
	Q28115	Uniprot	<i>Bos taurus</i>	Mamífero
	P03995	Uniprot	<i>Mus musculus</i>	Mamífero
	AAH45052.2	NCBI	<i>Xenopus laevis</i>	Anfibio
	Q58EE9	Uniprot	<i>Danio rerio</i>	Pez Oseo
	XP_002734960.1	NCBI	<i>Saccoglossus kowalevskii</i>	Hemicordado
	CAB43342.1	NCBI	<i>Astropecten brasiliensis</i>	Equinodermo
	DN18209_c0_g1_i1 _(+3)_ESO	Transcriptoma local	<i>Arbacia dufresnii</i>	Equinodermo
	C96827_g1_i3_(-2)	Transcriptoma local	<i>Arbacia lixula</i>	Equinodermo
	NP_999665.1	NCBI	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	Equinodermo
	XP_022106034.1	NCBI	<i>Acanthaster planci</i>	Equinodermo
	AAC41561.1	NCBI	<i>Onchocerca volvulus</i>	Nematodo
	XP_022326791.1	NCBI	<i>Crassostrea virginica</i>	Molusco
	CAA53480.1	NCBI	<i>Drosophila melanogaster</i>	Insecto
	Syt1	P21579	Uniprot	<i>Homo sapiens</i>
P48018		Uniprot	<i>Bos taurus</i>	Mamífero
XP_007893546.1		NCBI	<i>Callorhinchus milii</i>	Pez Cartilaginoso
XP_018081717.1		NCBI	<i>Xenopus laevis</i>	Anfibio
NP_001161667.1			<i>Saccoglossus kowalevskii</i>	Hemicordado
DN15218_c0_g1_i1 _(-2)_ESO		Transcriptoma local	<i>Arbacia dufresnii</i>	Equinodermo
XP_022111825.1		NCBI	<i>Acanthaster planci</i>	Equinodermo
NP_001159462.1		NCBI	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	Equinodermo
ABA29124.1		NCBI	<i>Lytechinus variegatus</i>	Equinodermo
XP_009065903.1		NCBI	<i>Lottia gigantea</i>	Molusco
NP_001022129.1		NCBI	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Nematodo
P21521		Uniprot	<i>Drosophila melanogaster</i>	Insecto
RPL8		P62917	Uniprot	<i>Homo sapiens</i>
	Q3T0S6	Uniprot	<i>Bos taurus</i>	Mamífero
	Q6P0V6	Uniprot	<i>Danio rerio</i>	Pez Óseo
	P41116	Uniprot	<i>Xenopus laevis</i>	Anfibio
	XP_002740227.1	NCBI	<i>Saccoglossus kowalevskii</i>	Hemicordado
	DN11066_C0_g1_i 1 (-3)_GD	Transcriptoma local	<i>Arbacia dufresnii</i>	Equinodermo
	XP_022093396.1	NCBI	<i>Acanthaster planci</i>	Equinodermo
	XP_796001.1	NCBI	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	Equinodermo
	CAC93850.1	NCBI	<i>Paracentrotus lividus</i>	Equinodermo
	PIK56328.1	NCBI	<i>Apostichopus japonicus</i>	Equinodermo
	ABO26687.1	NCBI	<i>Haliotis discus discus</i>	Molusco
	XP_022344048.1	NCBI	<i>Crassostrea virginica</i>	Molusco
	Q9V3G1	Uniprot	<i>Drosophila melanogaster</i>	Insecto
	Q9XVF7	Uniprot	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Nematodo

GEN	Código de secuencia	Base de datos utilizada	Especie	Clase taxonómica
GAPDH	P04406	Uniprot	<i>Homo sapiens</i>	Mamífero
	P10096	Uniprot	<i>Bos taurus</i>	Mamífero
	P51469	Uniprot	<i>Danio rerio</i>	Pez Óseo
	Q5XJ10	Uniprot	<i>Xenopus laevis</i>	Anfibio
	XP_002733494.1	NCBI	<i>Saccoglossus kowalevskii</i>	Hemicordado
	XP_780116.2	NCBI	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	Equinodermo
	XP_022101615.1	NCBI	<i>Acanthaster planci</i>	Equinodermo
	AOT99463.1	NCBI	<i>Sterechinus neumayeri</i>	Equinodermo
	DN27358_C5_g1_i 2 (+3)_GD	Transcriptoma local	<i>Arbacia dufresnii</i>	Equinodermo
	P07486	Uniprot	<i>Drosophila melanogaster</i>	Insecto
	P17330	Uniprot	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Nematodo
	AJA37895.1	NCBI	<i>Littorina littorea</i>	Molusco
EF1- α 1	P68104	Uniprot	<i>Homo sapiens</i>	Mamífero
	P68103	Uniprot	<i>Bos taurus</i>	Mamífero
	Q92005	Uniprot	<i>Danio rerio</i>	Pez Óseo
	P17508	Uniprot	<i>Xenopus laevis</i>	Anfibio
	XP_022088858.1	NCBI	<i>Acanthaster planci</i>	Equinodermo
	DN26884_C0_g4_i 1 (-1)_GD	Transcriptoma local	<i>Arbacia dufresnii</i>	Equinodermo
	NP_001116969.1	NCBI	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	Equinodermo
	BAJ23935.1	NCBI	<i>Pseudocentrotus depressus</i>	Equinodermo
	P08736	Uniprot	<i>Drosophila melanogaster</i>	Insecto
	P53013	Uniprot	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Nematodo
	BAD15289.1	NCBI	<i>Crassostrea gigas</i>	Molusco
	ACTINA	P60709	Uniprot	<i>Homo sapiens</i>
P60712		Uniprot	<i>Bos taurus</i>	Mamífero
O93400		Uniprot	<i>Xenopus laevis</i>	Anfibio
XP_020376146.1		NCBI	<i>Rhincodon typus</i>	Pez Cartilaginoso
NP_001158422.1		NCBI	<i>Saccoglossus kowalevskii</i>	Hemicordado
DN24362_C0_g1_i 22 (+2)_ESO		Transcriptoma local	<i>Arbacia dufresnii</i>	Equinodermo
XP_022096724.1		NCBI	<i>Acanthaster planci</i>	Equinodermo
BAO20877.1		NCBI	<i>Patiria pectinifera</i>	Equinodermo
NP_999634.1		NCBI	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	Equinodermo
DN_24362_C0_g1_i 22 (+2)		Transcriptoma local	<i>Sterechinus neumayeri</i>	Equinodermo
P10987		Uniprot	<i>Drosophila melanogaster</i>	Insecto
P10984		Uniprot	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Nematodo
AVN67034.1		NCBI	<i>Diplodon chilensis</i>	Molusco

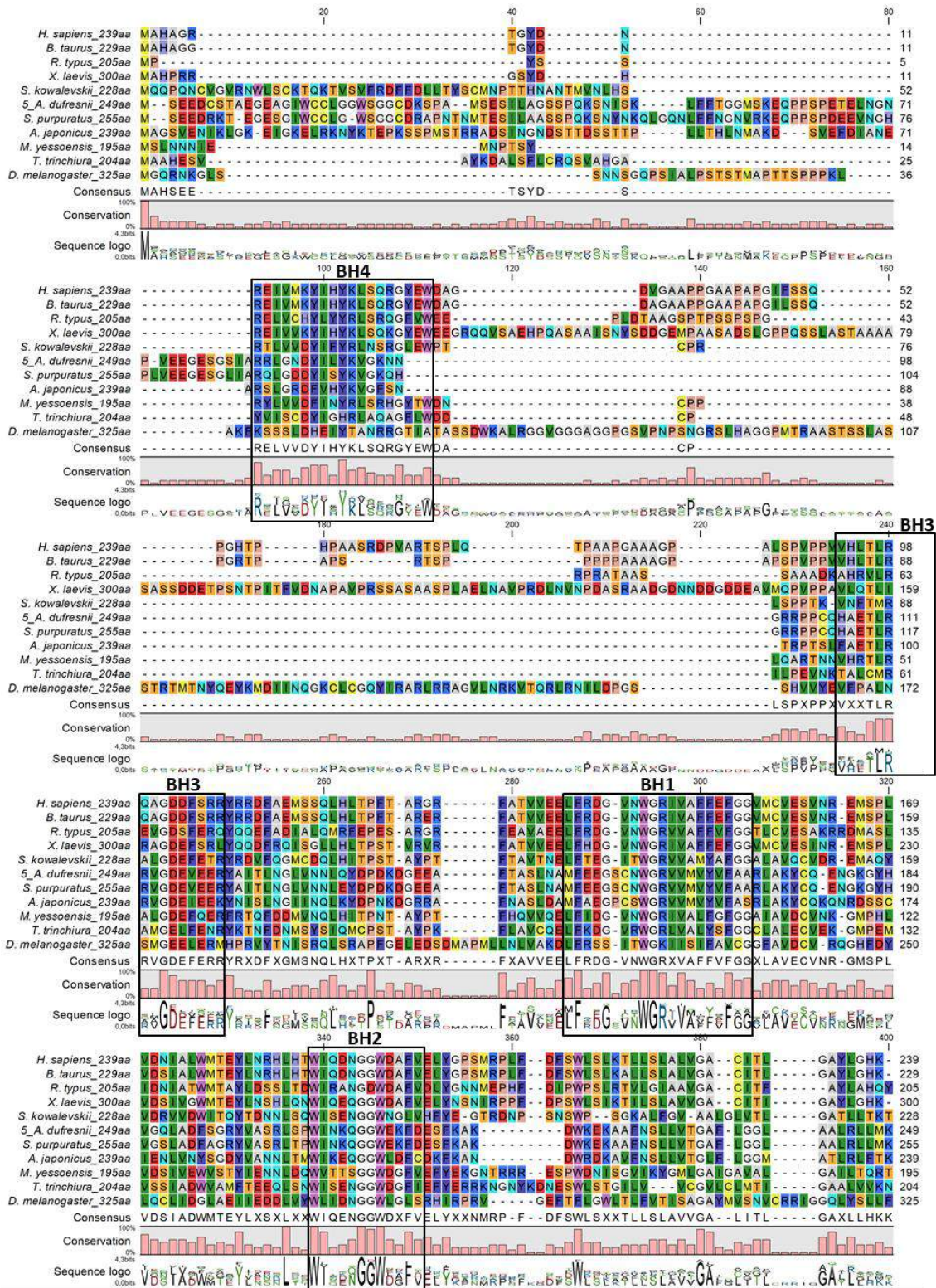


Figura 2.14. Alineamiento múltiple entre secuencias aminoacídicas de Bcl-2. Los recuadros indican los dominios BH1, BH2, BH3 y BH4 según los patrones consenso de PROSITE.

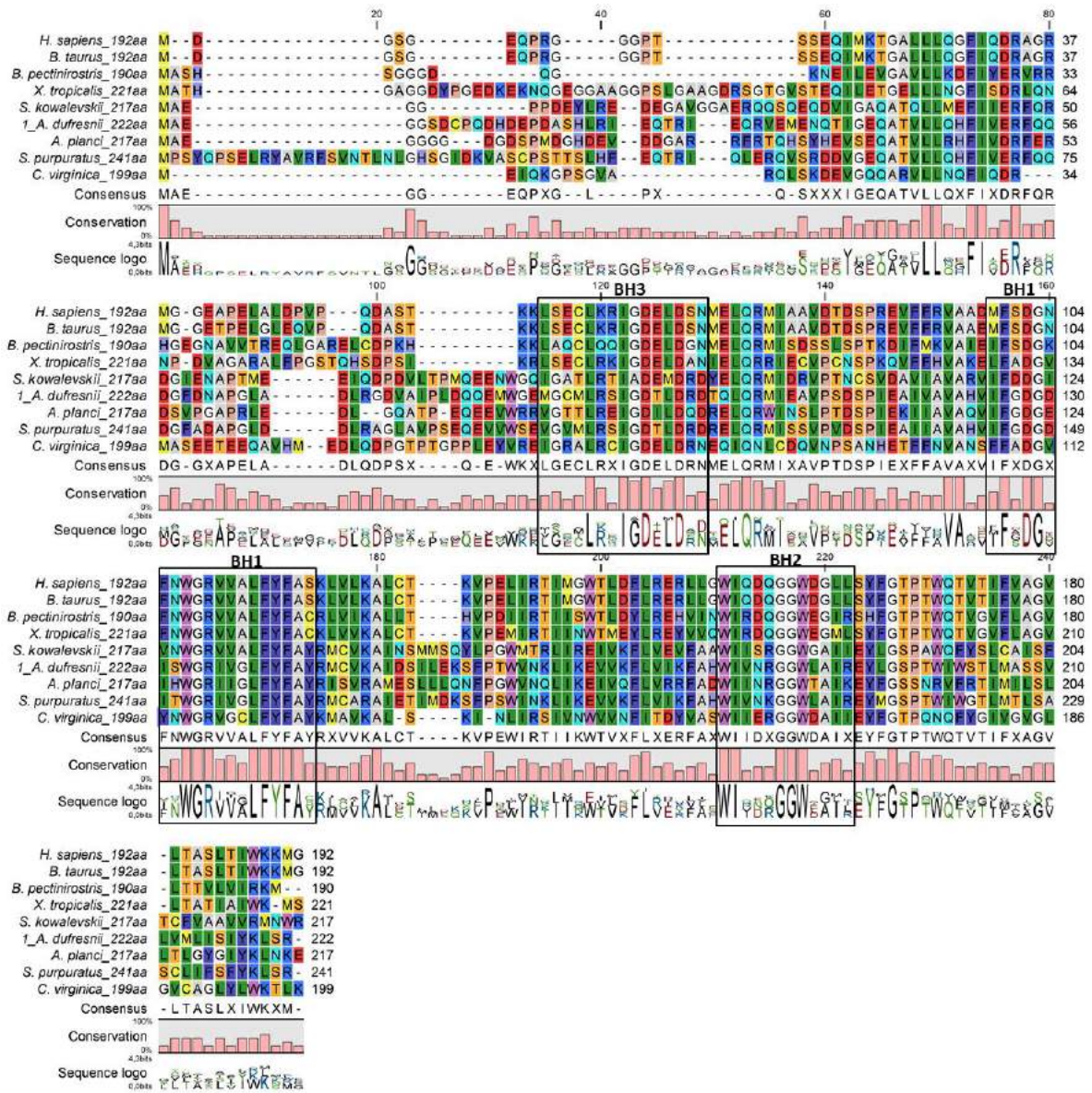
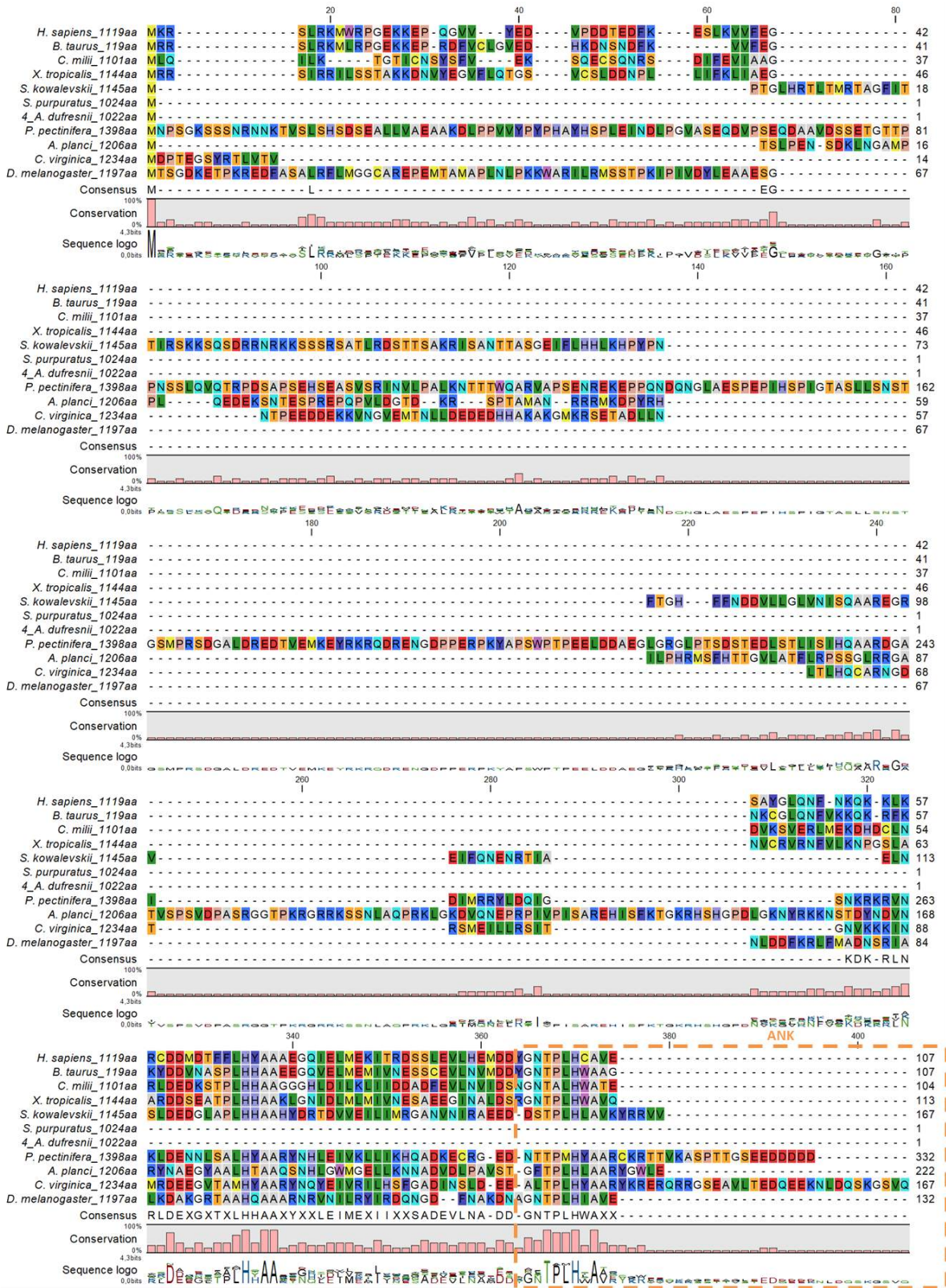
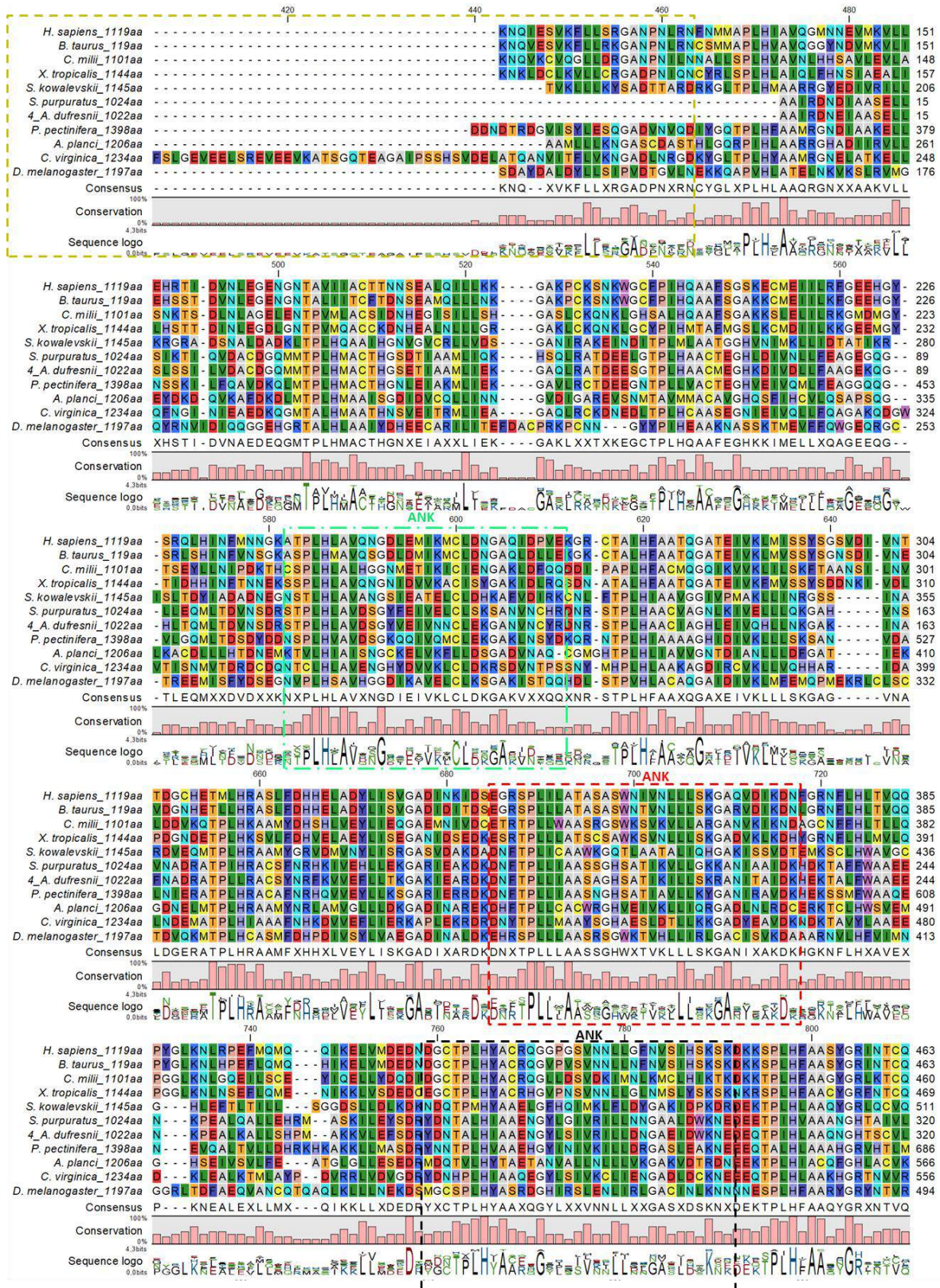
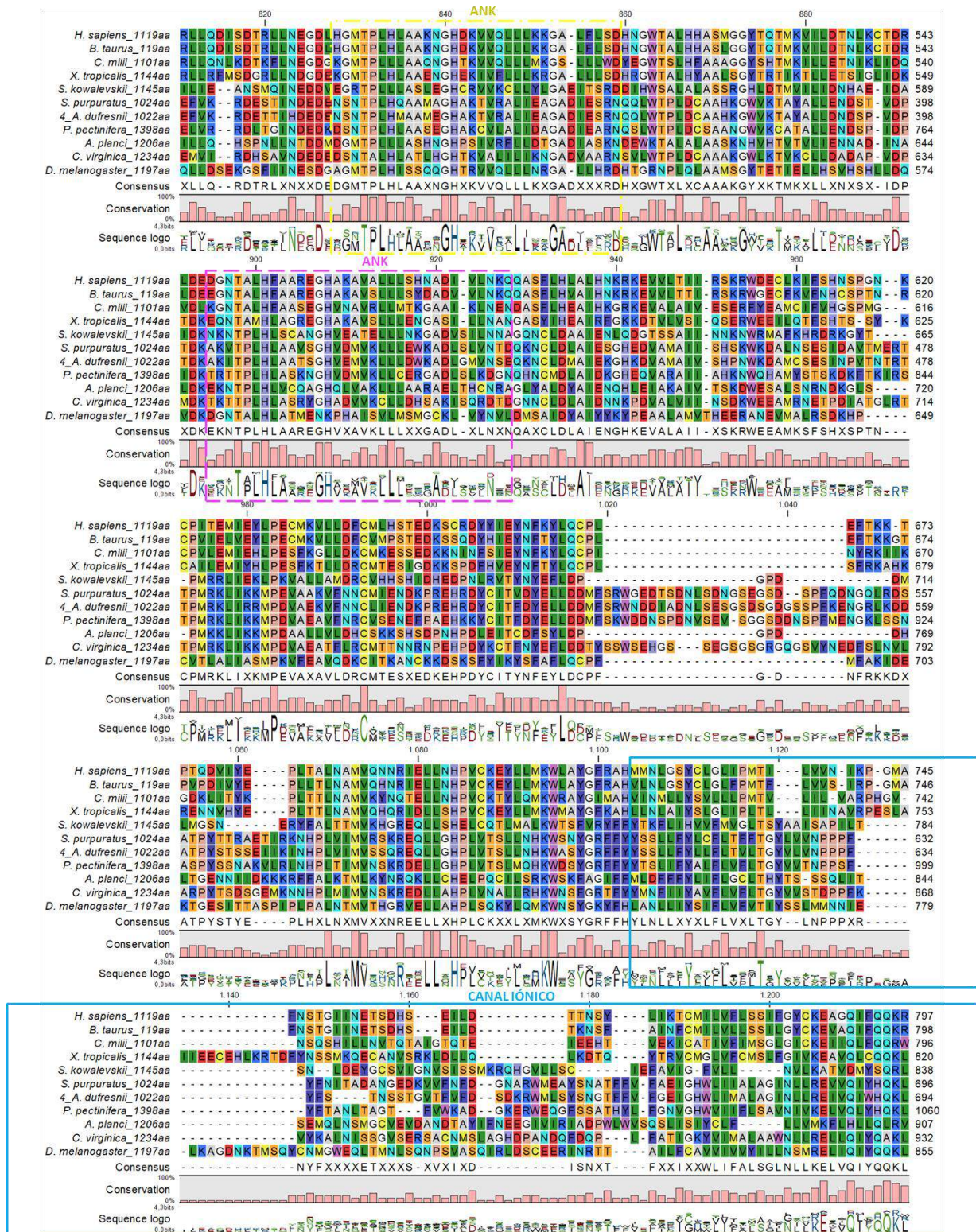


Figura 2.15. Alineamiento múltiple entre secuencias aminoacídicas de Bax. Los recuadros indican los dominios BH1, BH2 y BH3 que se ajustan a los patrones consenso de PROSITE.







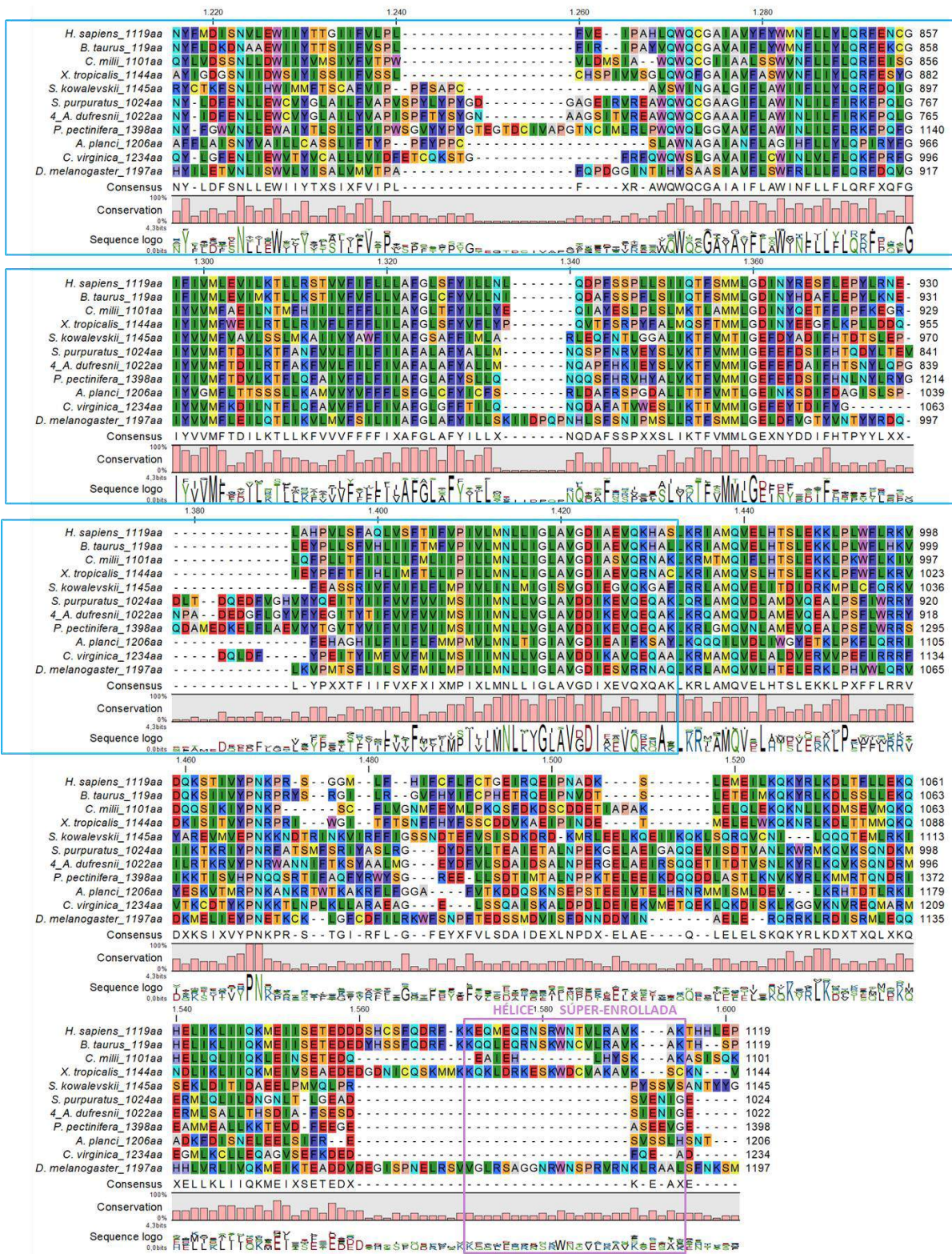
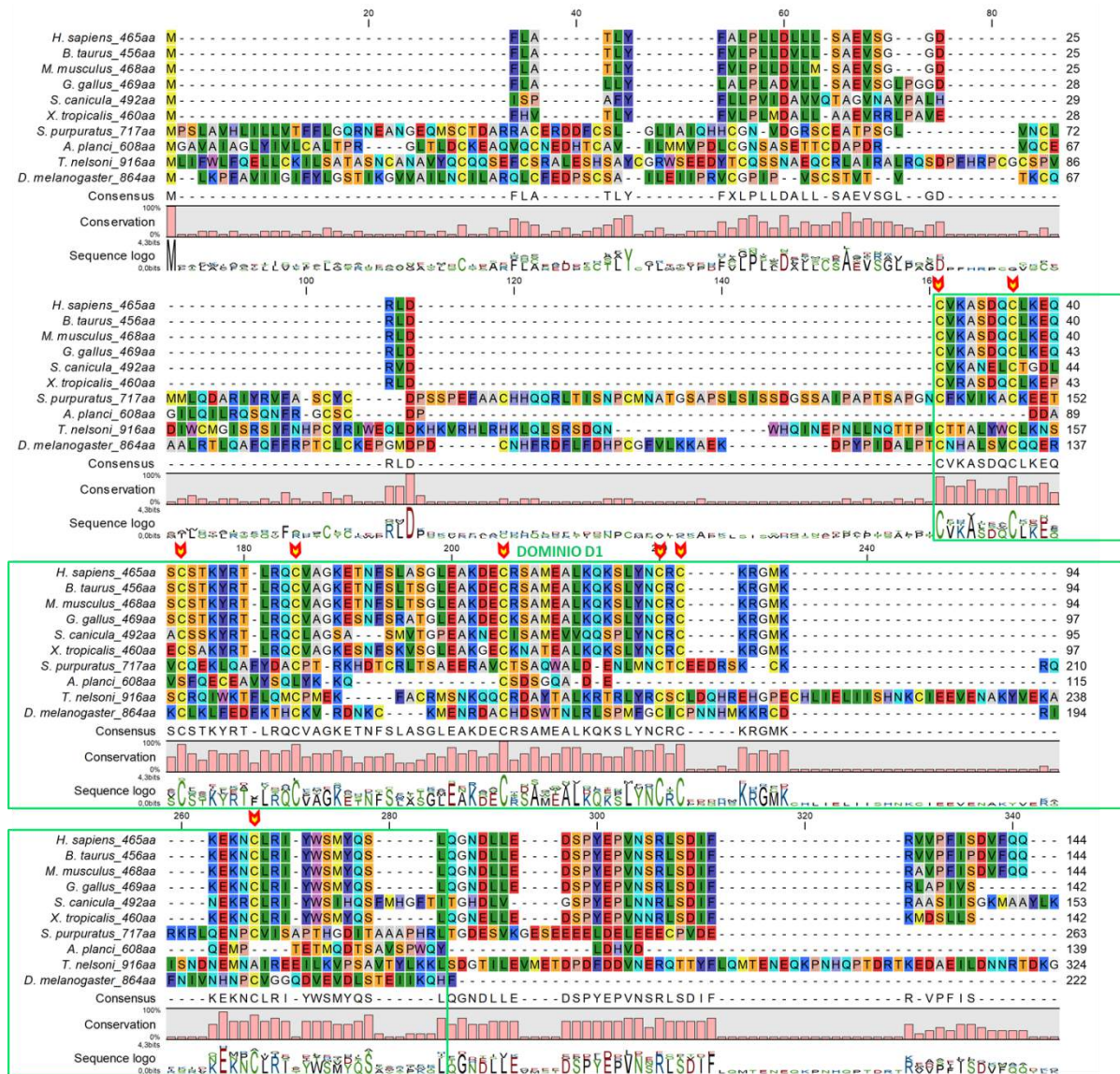
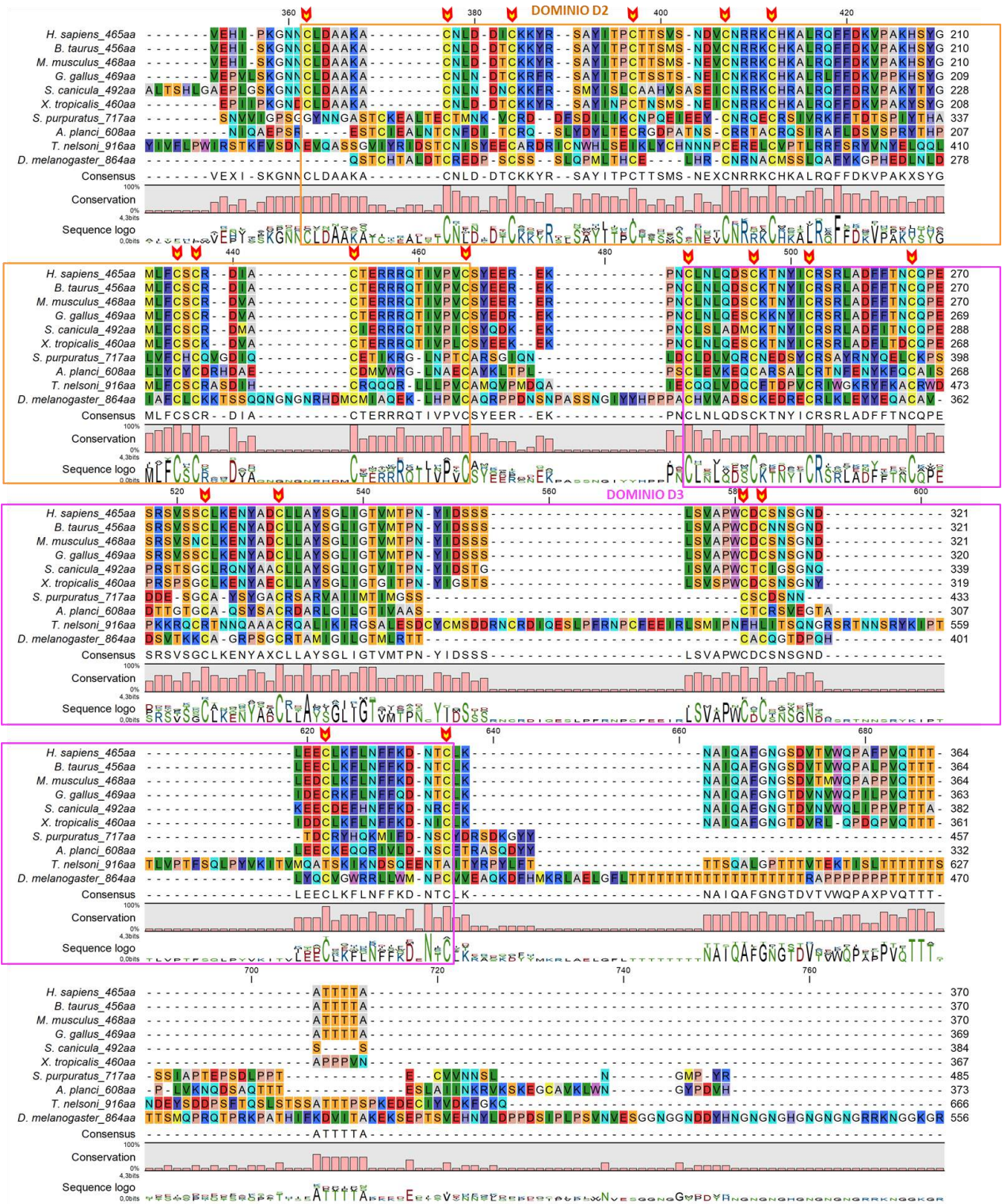


Figura 2.16: Alineamiento múltiple entre secuencias aminoacídicas de TRPA. Los recuadros de línea punteada indican los seis dominios ANK, los recuadros con línea continua indican el canal iónico (azul) y el dominio de hélice superenrollada (violeta) según la base de datos Pfam.





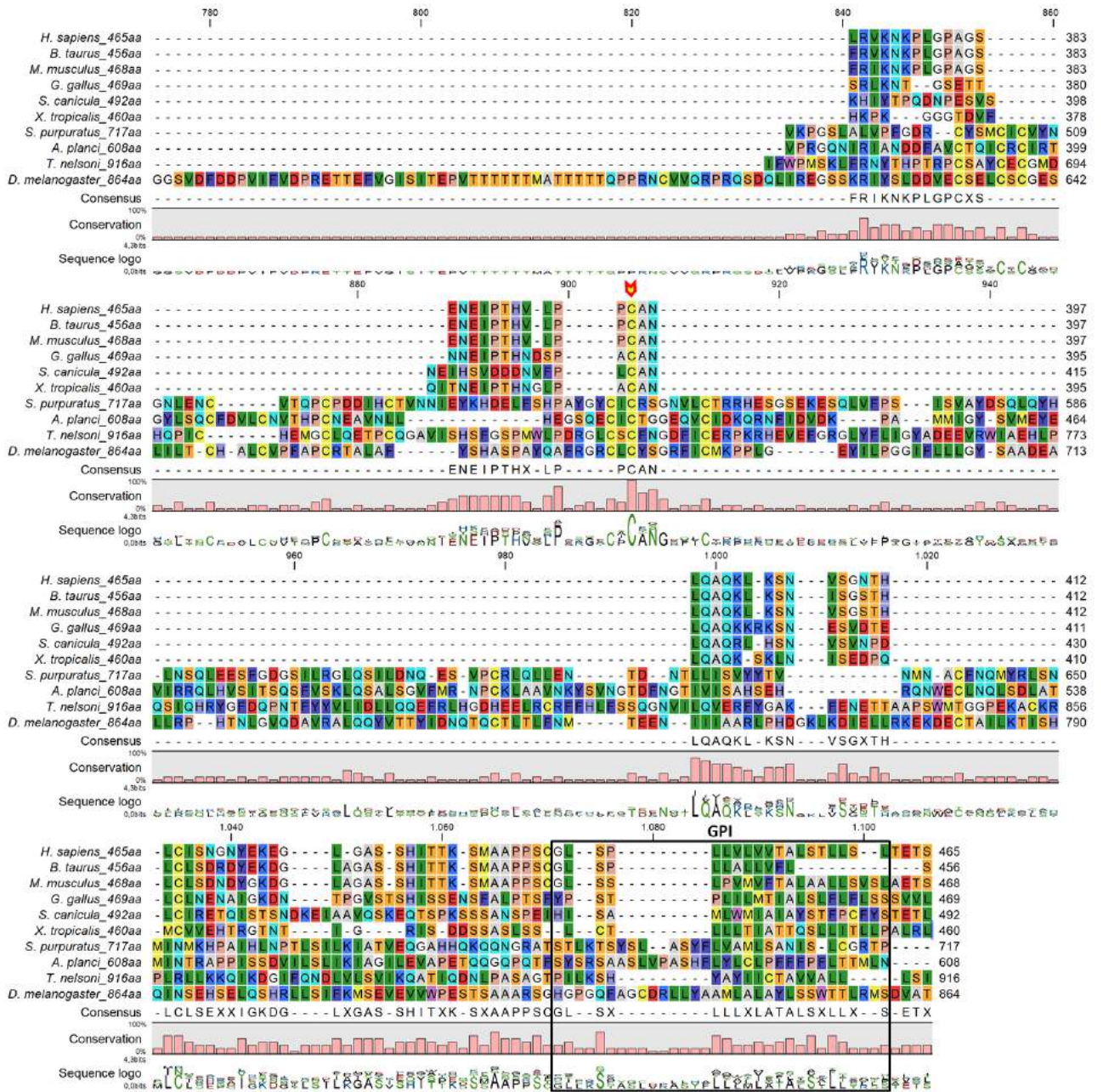
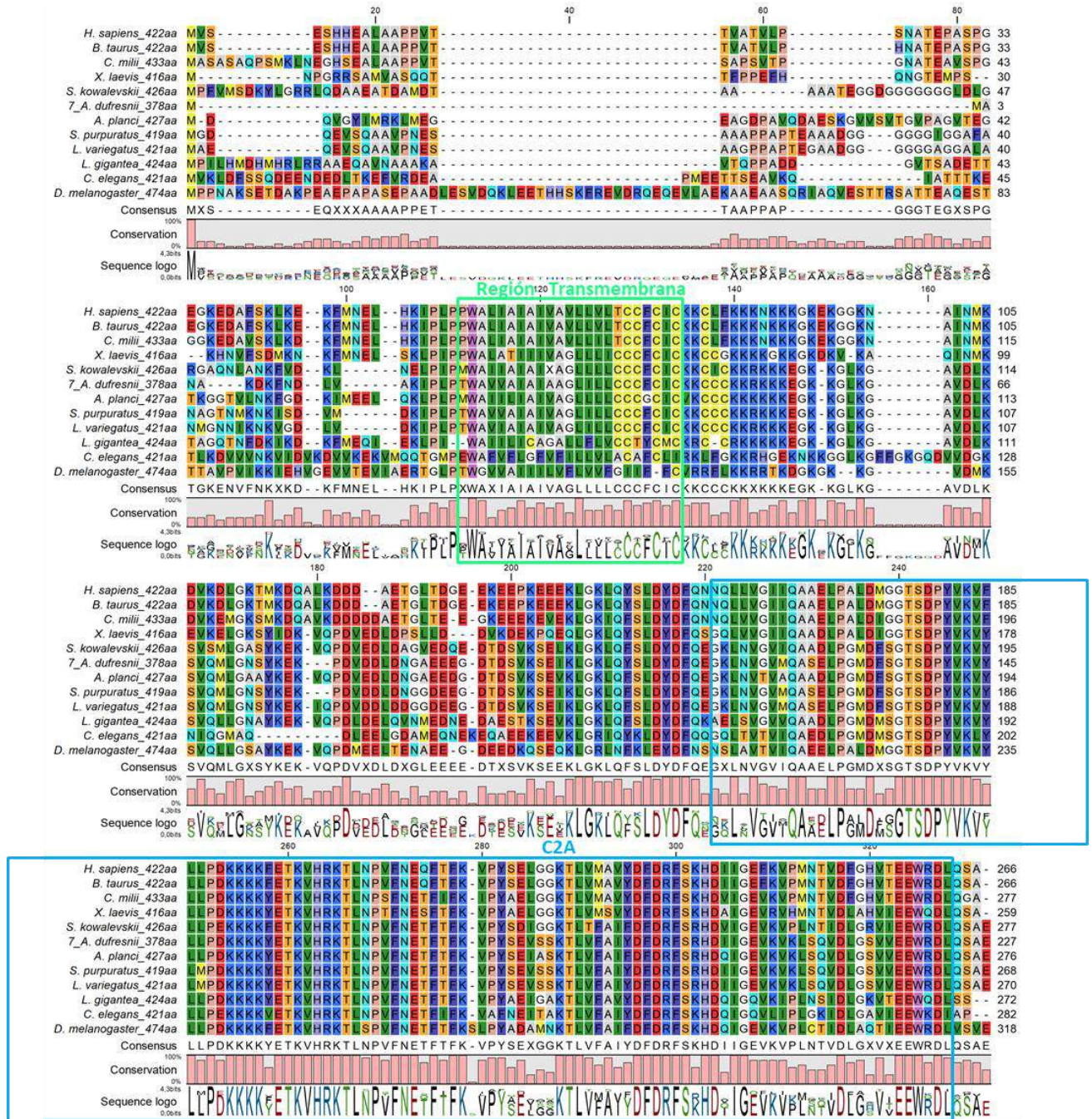


Figura 2.17. Alineamiento múltiple entre secuencias aminoacídicas de GFR α . Los recuadros indican los dominios D1, D2, D3 y la región de anclaje por un GPI (Glicosilfosfatidilinositol). Las puntas de flecha (rojo y amarillo) indican las cisteínas conservadas en todas las secuencias.



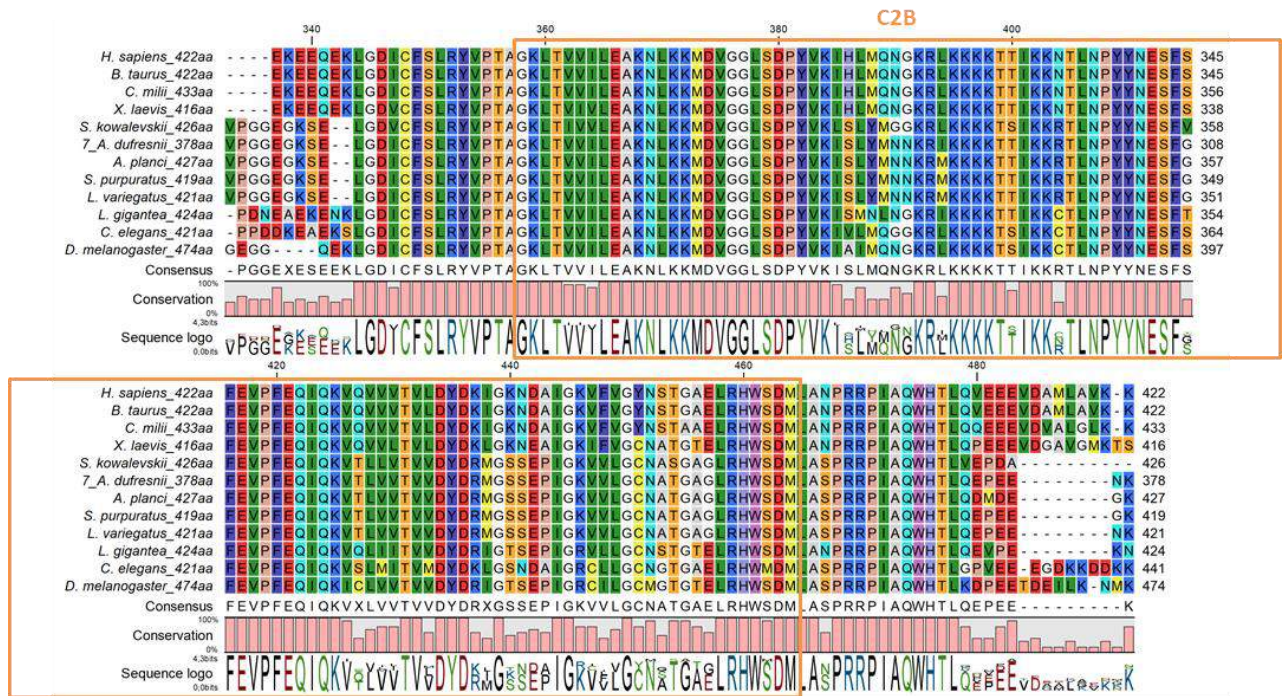
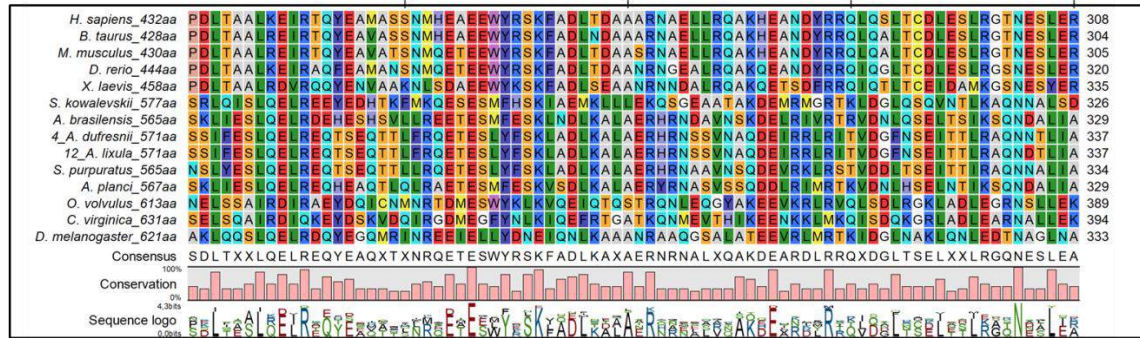
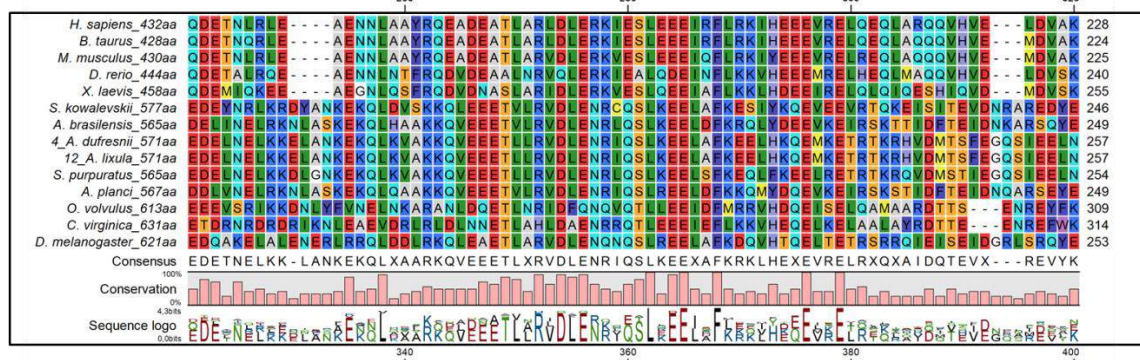
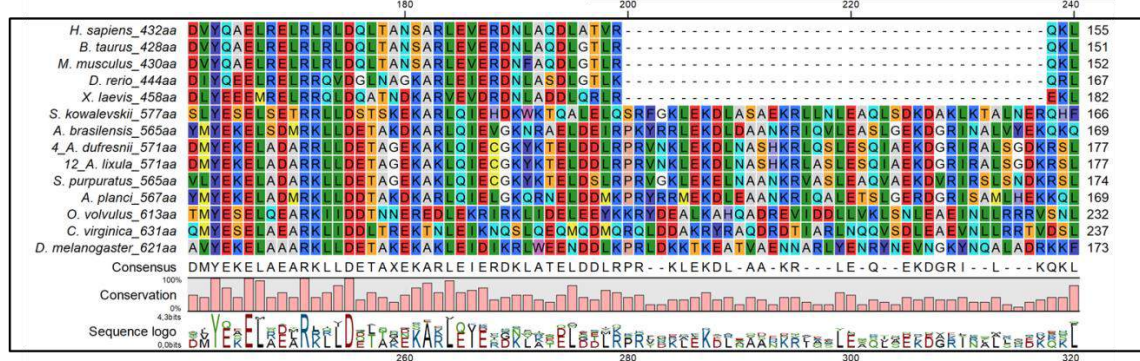
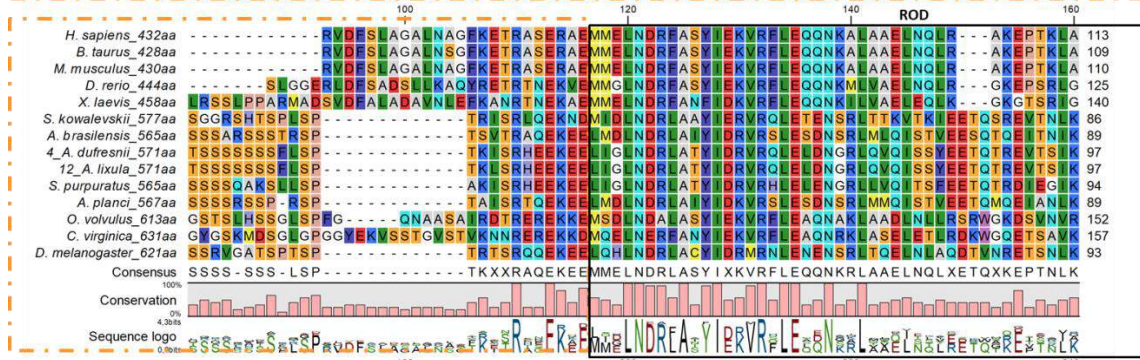
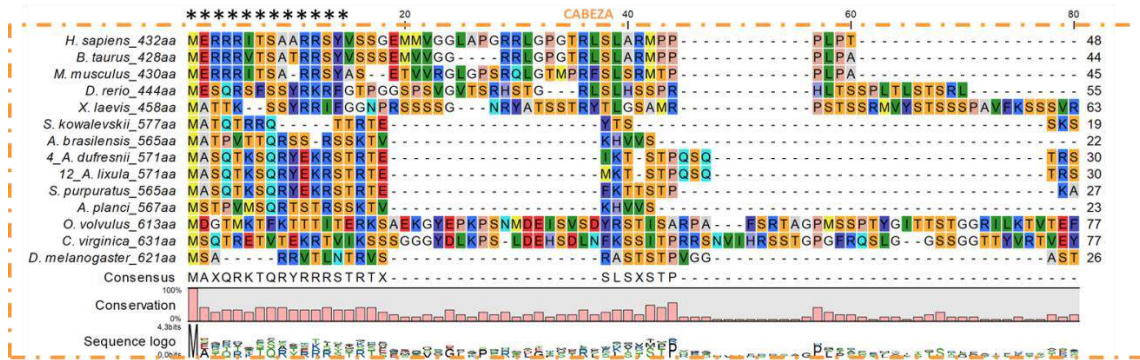


Figura 2.18. Alineamiento múltiple entre secuencias aminoacídicas de Syt1. Los recuadros indican los dominios transmembrana (amarillo), C2A (azul), y C2B (naranja), según las bases de datos PROSITE y Pfam.



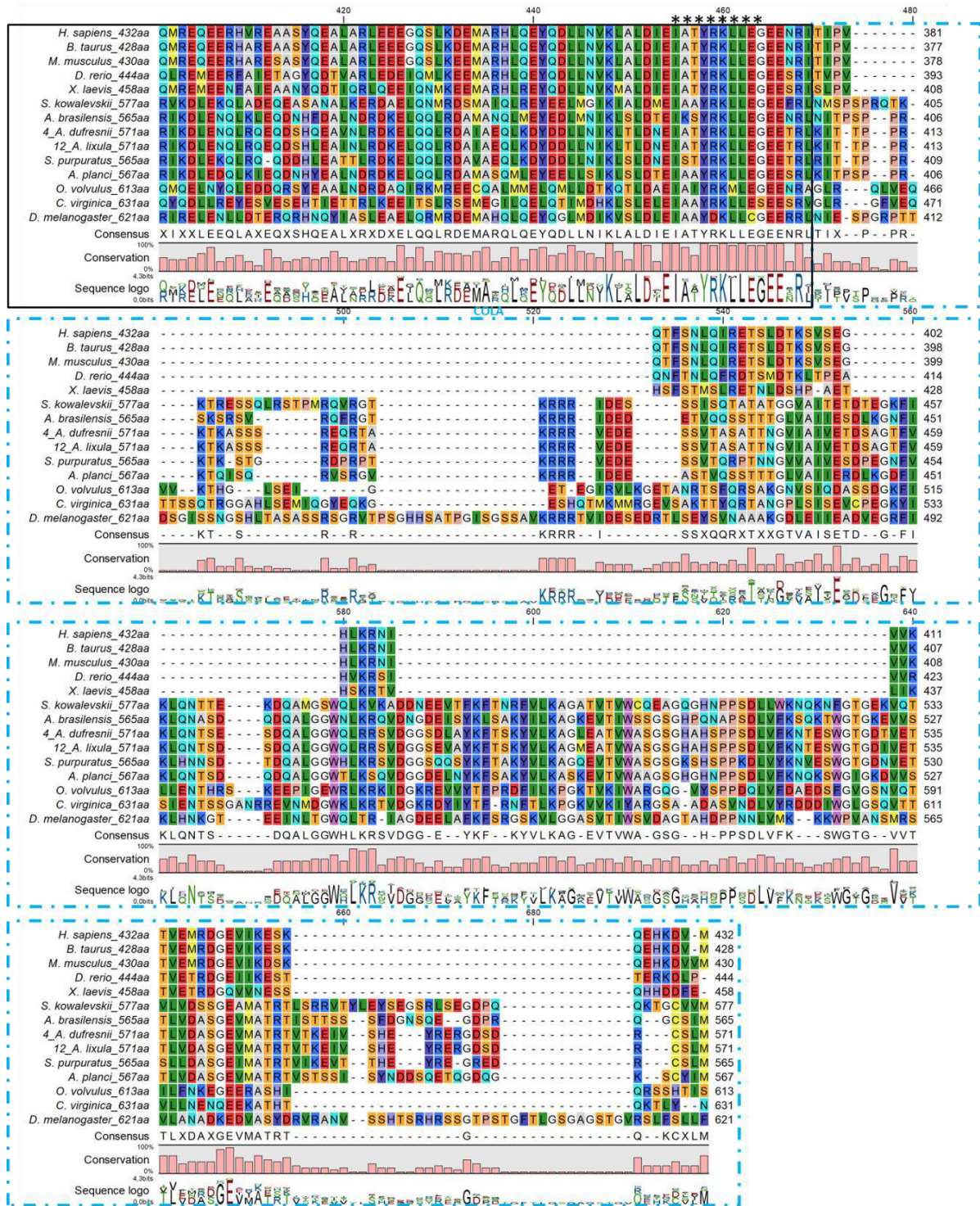


Figura 2.19. Alineamiento múltiple entre secuencias aminoacídicas de GFAP. Los recuadros indican la región de la cabeza, la región ROD y la región de la cola. Con * se indican los patrones consenso de los dominios correspondientes.

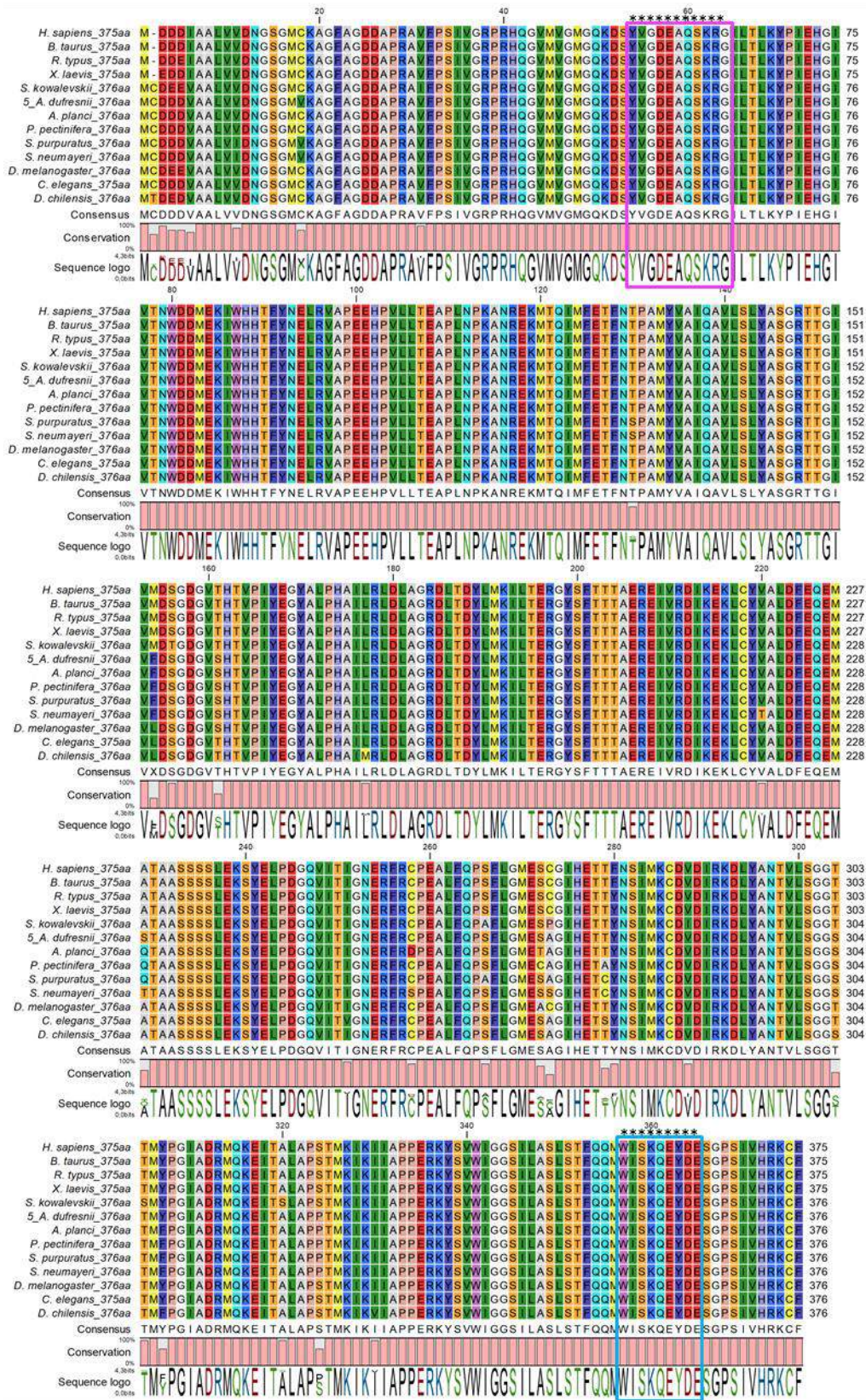


Figura 2.20. Alineamiento múltiple entre secuencias aminoacídicas de Actina. Los recuadros con asterisco indican el patrón consenso 1 (fucsia) y el patrón consenso 2 (azul), según la base de datos PROSITE.

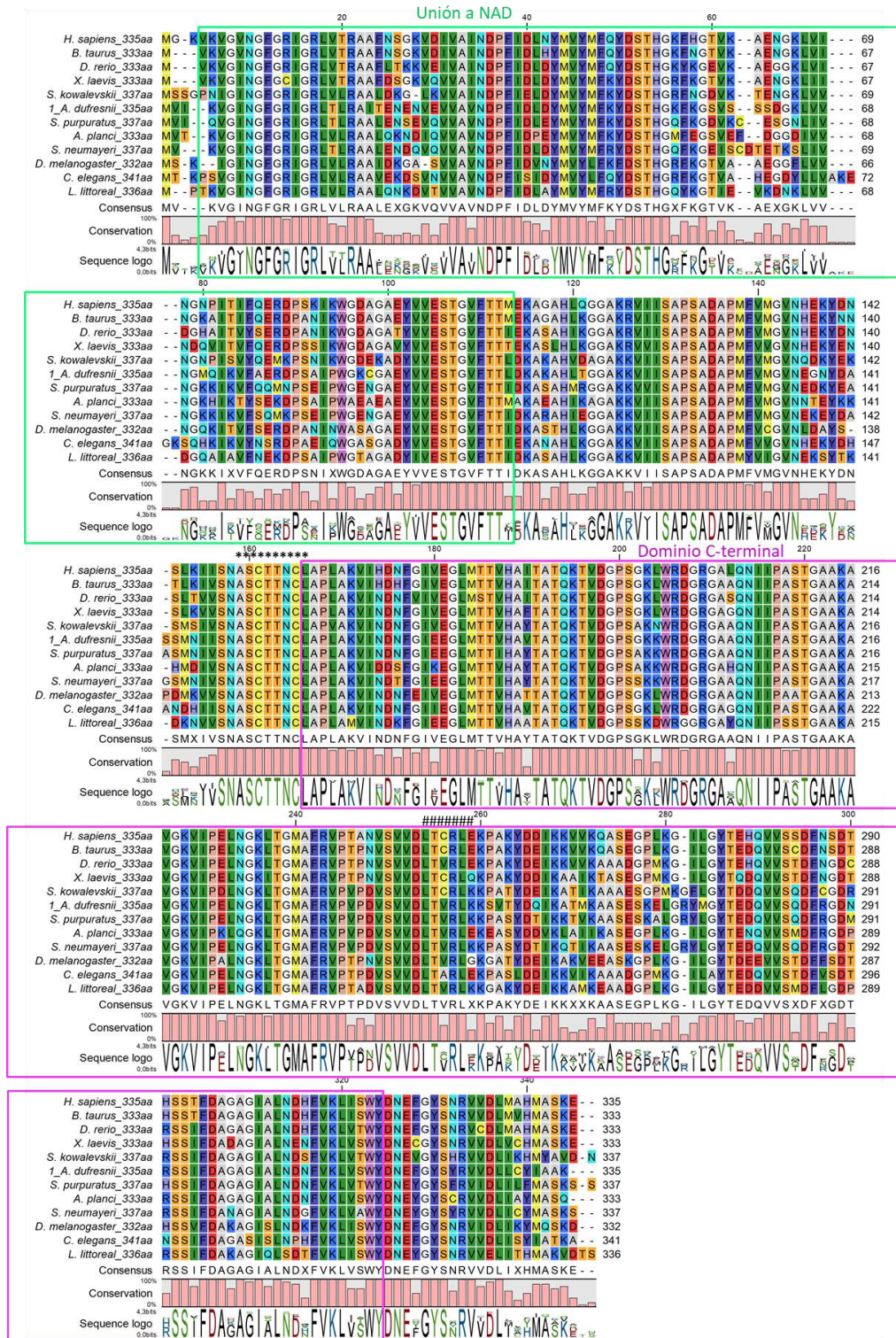


Figura 2.21. Alineamiento múltiple entre secuencias aminoacídicas de GAPDH. Los recuadros indican los dominios de unión a NAD (verde) y C-terminal (fucsia). Los símbolos asterisco indican la zona del sitio activo, y los numerales el sitio de nitrosilación de la cisteína, según la base de datos PROSITE.

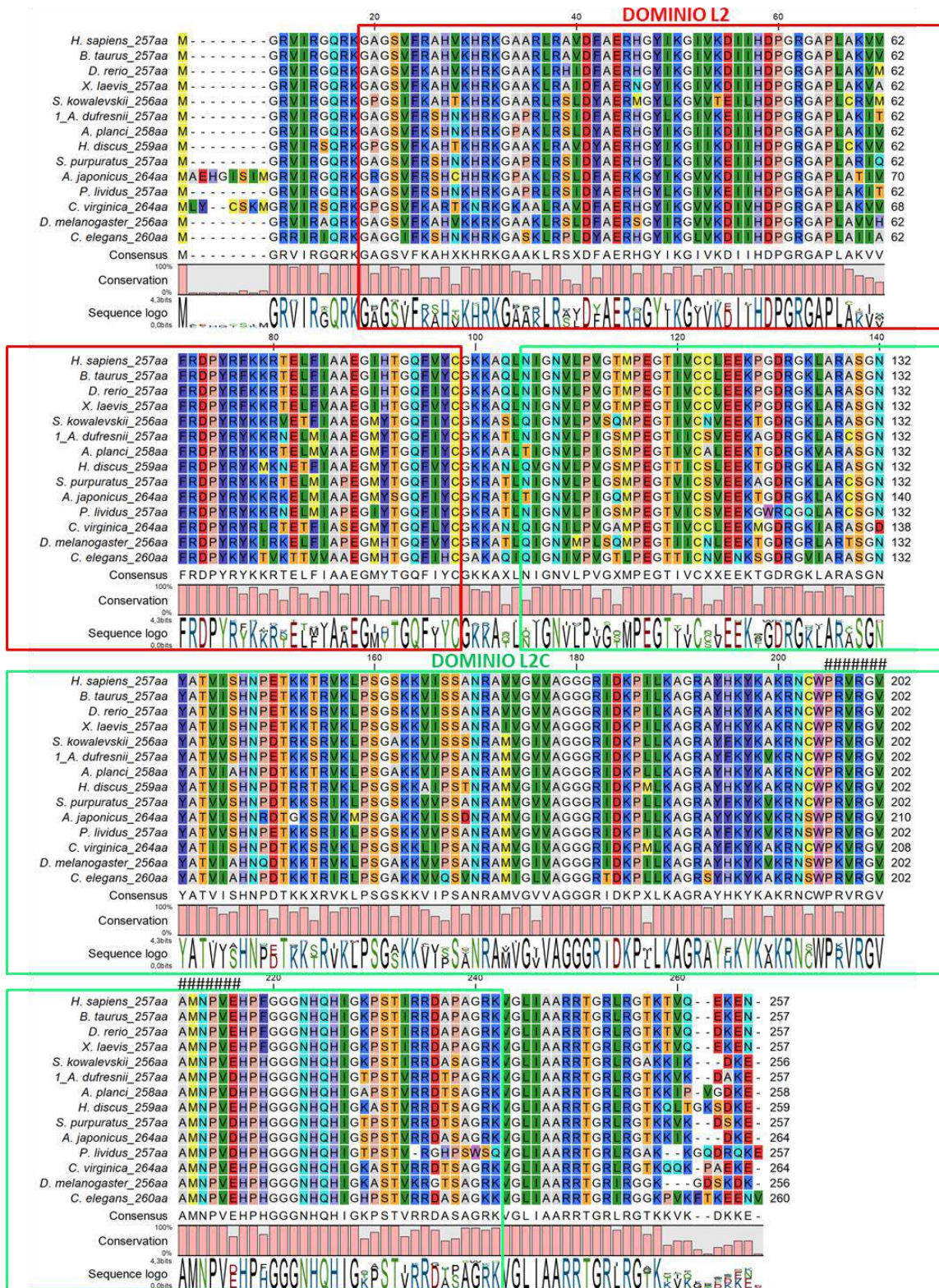
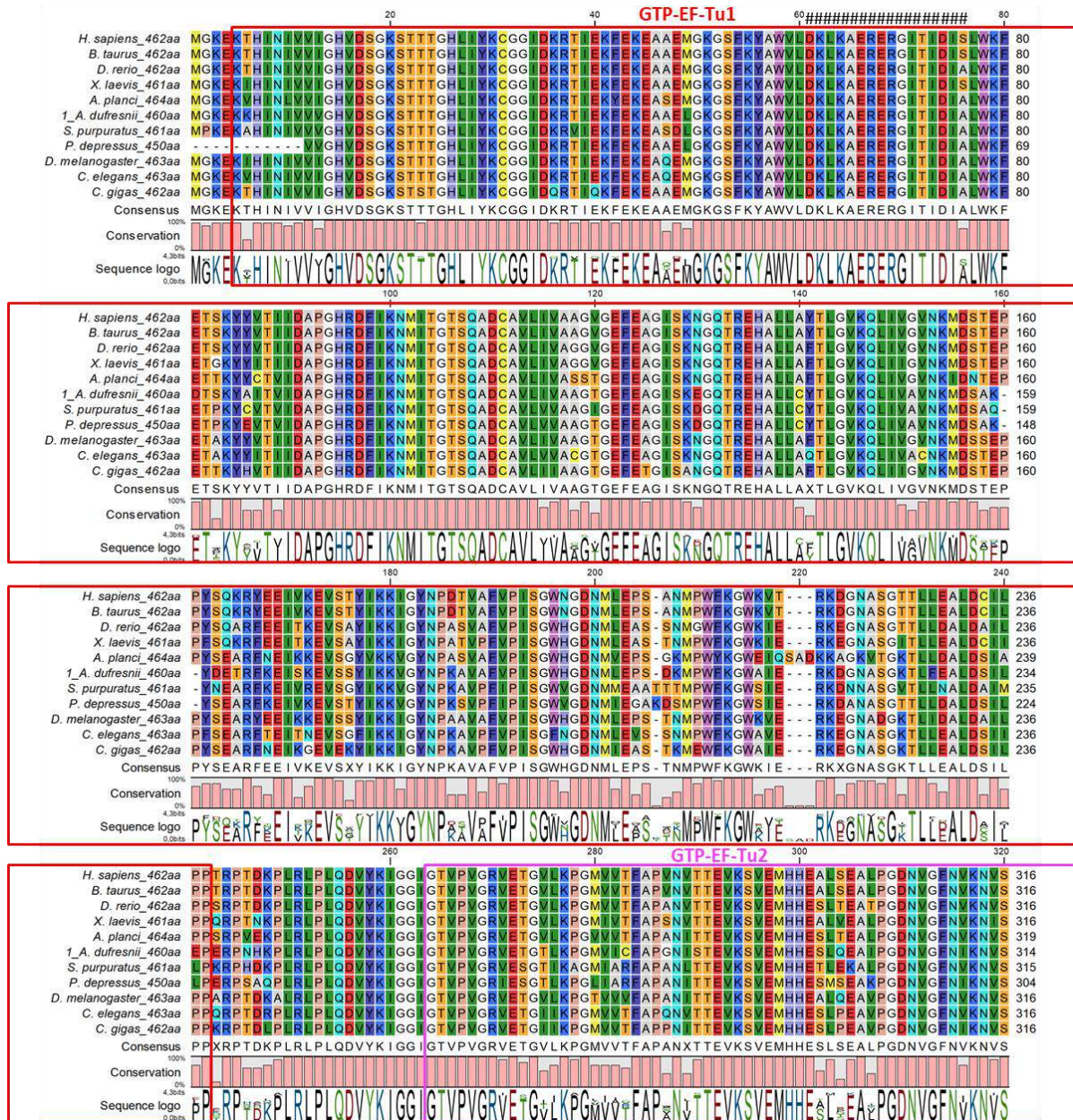


Figura 2.22. Alineamiento múltiple entre secuencias aminoacídicas de RPL8. Los recuadros indican el dominio L2 (rojo) y L2C (verde). Con el símbolo numeral se indica el patrón consenso PS00467.



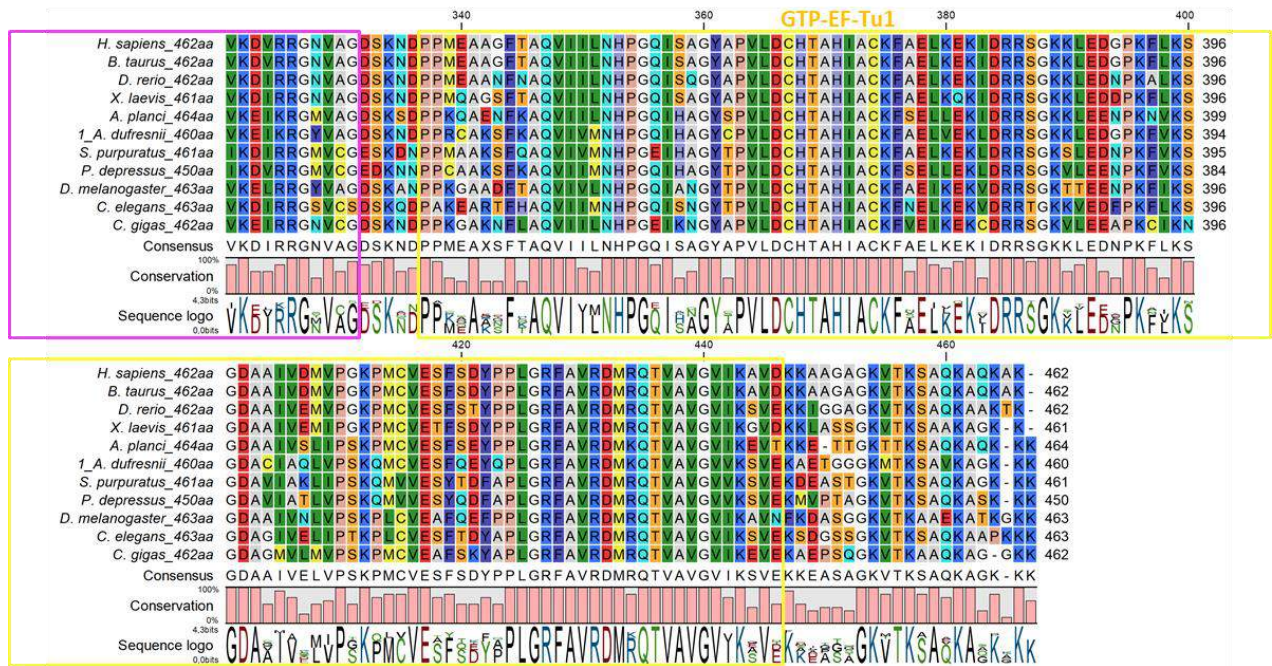


Figura 2.23. Alineamiento múltiple entre secuencias aminoacídicas de EF1- α . Los recuadros indican los tres dominios característicos, y los símbolos numeral indican el patrón consenso, según la base de datos PROSITE.

cacgaaacagacttgcgaaatacaacgccgtgtcagcgcagcttgtgtatagatctacat
 acaaatttgaattcattctgcacactagttccttgccaacgacttgctggttgcgagaatc
 ggaggagctcacagtcccagtgctga**atg**agtgaggaagattgttcgcactgcagaagg
 M S E E D C S T A E G
 gaggcaggcatatgggtgctgtccttgggtgg**atggtcgggtggatgtgacaa**atctccagcc
 E A G I W C C L G G W S G G C D K S P A
 atgtcggaatcaatacttgccggttcttctcctcagaaaagcaatatttccaagttgttc
 M S E S I L A G S S P Q K S N I S K L F
 ttcaccgggtg**gaatgtcgaaggaacagccg**ccagcccggagacggagctgaacggtaac
 F T G G M S K E Q P P S P E T E L N G N
 ccggtggaggaaggggagtcgggatctattgctcggcggccttgggaatgactatattttg
 P V E E G E S G S I A **R R L G N D Y I L**
 taaaagtagggaagaacaatggtcgctgcaccgccttgtcagcatgcagaaacgctgagg
Y K V G K N N G R R P P C Q **H A E T L R**
 agggttggggatgaagtagaggaacgatacgcattactctgaatggactcgtgaacaat
R V G D E V E E R Y A I T L N G L V N N
 ttgcaatatgatccagacaaagatggagaggaggcattcacagcaagtttgaatgccatg
 L Q Y D P D K D G E E A F T A S L N A **M**
 tttgaagaaggatcatgtaactggggctgtgtagtaatgggtgtatgtgttt**gcagccgt**
F E E G S C N W G R V V M V Y V F A A R
cttgcaaaagtattgtcaagaaaatggaaaaggttaccatggttgacaattggcagacttt
 L A K Y C Q E N G K G Y H V G Q L A D F
 tcaggacgttatgtcgcacaaagattatcgccttggattaataagcaaggaggatgggaa
 S G R Y V A S R L S P **W I N K Q G G W E**
 aagtttgatgagagcttcaaagcaaaag**actggaaggagaaggcagcat**tcaactcactc
K F D E S F K A K D W K E K A A F N S L
 ctgtaacaggagctttccttggggacttgcagccttggagttactcatgaaa**tag**tcc
 L V T G A F L G G L A A L R L L M K -
 agactgtcagcagaattataagtgactaatatttttatttcgcctgagggttagaagccc
 aaacgaatgagctgaactttgaaggatgcagtagccgcagcaacccccgaagtattgtgtg
 tggaaaagttttggcgagagaagagttgagacaactggataaaatgtgcttcgtgatgtc
 atcagaagacgcgagtgtttctccgaccaggataacaaccagcaatacaacgcaccattc
 aacttgttttatcaacgcacgtccttggcattccttgtctgggggggaattcctgact
 attgttattttgtaacgcgatcaatttaataataatgccttagtatttgtagcgtcttaa
 cctcctttcatttggatctacggacatatgtttactattccaagagataaagatgttata
 gagagaggaggaagaagctgactgaagattgaagaggcatggaagatgcttgagtcatga
 taactactgccaatattctgtacagacagagcttcttattaacatagaaaagtgttttgt
 gacatgatattataaattatttacctgtgagcttttatttttagtattgtattggttttgc
 aaaggtagtgaagggcactgatgagcttacttgatcattaattttgagaaaaattac
 acattttgaagagaagaatggaaaaagagaaagacacattgttaacattttgacaaaatg
 tgtttttgtttgtggacattgtaattgcataaagagcaggcattaacttcaaactct
 attgactgggaaactaatgaaaattgtgacgagaccagtcgggtgccttttatctgcgagt
 caacttttcaggggtggttgtcagtttgtctgaagttctgaacggggaataaaggattac
 tgcgtaatgggttgctcatcaccttcaaattgtactagtgggtggcagaatgccaggcaga
 ggtggattttaaactgattgtattgttgtaaacatgtatgcttgcagtttatacccttct
 atatcattataaattcgggtgcagaatgcgcttgttactaaaatgcttgggttggcatctttt
 gccaaaatcttgtggtgaggagtgttttgcaagtgatgcaagtattttgtttatcgatgc
 tttttcaaggcaattatgacagtgaaatgaacagtaagcaaaaatacatgtgtgtcatgcta
 cttgcagaaccaagcaagctcattatatttagcagctgaaactaaaatttcataactta

tgtc gatg acttgtgttggttgatgtgtgatgggtggtgtttacatgtatgtgtgcaaatc
cagcccttgtgttatactatcagagtttataatgaattattcttgggaaagtacatatagt
tatctcttttctgttaccatgataattgacaacacagcagcaaaattatgtgatttcaaat
gcttggtgagaaaatatacagtatatgtatcacacatatgtgtgttaacatgacatgggt
tagtttctttttgtttcaaaattttgatggttaggtacgtgtatcccatggtcagattgg
cattttatcttgtcagtcataattctgtttcgattcgaatacaactagctccaacaaata
caatcctttctttttttaccgcgataataaagaagcatgcagtaaagcgcttactaaa
tgtgtgggttttatatgtgcgcaacaagcaactatcagtaactttgtaaattgagttcat
ggatggaatggttggactcgggtgtggatattttcttccatgggatcgtcatttatagat
gtgtaagggtgtaaccatgcattttaaatattactggaagttgaagtttgcacatttcata
cccctcccatttctactgattgttacaatgttacaatacacaacttatgtagatttttgt
ttttgttctagcgttgcataaggttttgtgggtgatgtgttttcttcatgacatgatcgta
ttgtagtacctgtaccagtgactgtctgtaataaaaaagaccacttttagagtcgaaaa
cgaagcaaaaagcagctctctaataatgatagattagacaaatcatgtaggcattgtgggag
ggtgaaagctctttcaaaccaaactaaactttaacatctcctccagtaactatacatt
caagtatctagcaagcatgctgtgcaaaaatgctagcagatgttttagaggaaatagctcc
ataatgcattttgtgtacatggactgactgtacaagccttcatgcatacatgtatgcatgc
gagcaatctgtacttgcgttagcagaggtcacacacatactgctaacgctgggtgtgtgta
tgtgtgtttgaatgcacaatacacactggagcagtgatcctgaatgtatgagactccac
tatacacacaccgttcaaaaagtgtatagtgtatagcgcactcgacttgcctgcacaatac
atgtacacagtaactacgggttgcctcggggctgcgtgggaggatataaaa
gataaaagggttcattttttaaggggcagcttttgtgcgcgctcattccagccagtggg
tctattgtgcaaacctgacatgcctcgtttacattgtacacgagggttgaccttacagtg
tattgagtgcaactgtacaatgcttgggatccatggagcttttgcacagttggtacatgca
aagtttgtccatgtgctagaacgtacatgaacatgtgcaactttattagtgtctgtatgtg
ataacttcacaaggactgatatagacatgtaaaaggaaccgcaacagaaatctatgtcaa
acttgtacaacagtcacaagacagcttacaacatgcacaatttcaccttgtacgtgtgc
tagaaatgaaaggcatttcaaaaagcagtgaggggagtgaaaaattcttcgctctgccatg
tattttttattcataaattgaatcgaaacaaacggaaattcactgtgctgcacacacatac
cacagggttgttgttctgttctgggtgtacattgagatctattcagttggaagctatacac
atacatgtacatgttttttttcatggtcctttacatttgaaaaaaaaaagatcaaacatc
agtaaaactactccgtttgagtgctggaaaacccatgagtagaacgagagaagggagaa
aaaaaaggggaattgaggaaggaaattattcatttgagaacttgaggtttggagctgtgc
caacccttagatagctgggagttttggtcaatagtctgggttgttctttaccgtgaaca
aagctcccctttatgatggcggggaaaaccaataattaatgtgctacatgtacatgat
gtcacgaatcctgggtgtccatgtgtggtgtgtatgctggtagtttggggtaactttcactg
aattaagtttgtctgttcttttgatgagggcagcaacgtaacctatttcggggacactt
tgagggcagtgcaattgaattgtgggttgtttcctgggaatacacatgtatgtgttcatgt
acaatacagcagtgatcatgtccatacgggtggtccttcaaaaaggatgtctccgagctc
ccattcataattcatttcttgcacgttttttttacattacatcccggatgatgccta
ggaaatacgtgtaggaaatccaacagcatgaccaaagtcaagttgctgcttaaatctact
catttctgtgtggtgcaagaaatgcaaccattcagtagcttaataattaacagcctcattca
gccacttttcatatcatatgatttcattcagttttgttgttttgtggagtgcaattgtc
agtttgttagtttccgtctttttgatattgatcagttttgttgttttgatgtatttttgggt
tgaaagttccatgttttctgaaggactgagtcacaacattgttagtgctctgctgtgcagt
ggtgaccgtgtgcatcgtgttgggtggatagtagataattttctcaaaaagtattgcaaca
ttttgttttgatgtcatgttctcagctggagtcagtcagtcgacgcttgagatacccca
attattgtgatggctttctttaaaccgtgatatgatacaagagtgatatttttataccttc
aaaacctgtgttaataatcagacaagatattgcacattactgaacattttactttatgta

atagaatagcattacaatgagaaatatgtactacagaaaaaacttacatttttatatga
 aagttctcccttcatttgcataatttatgtatcatattcaactacacatacgattgttat
 atggatctgcatttatttaaacattttacgacacttttaaacataatgtttttgcctttta
 agtggacaaattaatcctttgttaaaccgaaaagccttttgataatgtgtatcagggagta
 tcgttttcattgacaacagtaaaacttttggttgcatattctcattcctttatcacttggt
 cagcgtacatgtacctctacattatgtacagtgtgtgtgcagatctgtacacattatgt
 aacatgcagtataaacttgtaaattaacagatgactatatgattttatgaaagaga

Figura 2.24. Secuencia para el gen Bcl-2 en la especie *A. dufresnii*. Con minúsculas se indica la secuencia nucleotídica, y sobre ésta se indica el ORF en negro y los dos pares de partidores Fw1 y Rv1 con amarillo y Fw2 y Rv2 con celeste. Con letras mayúsculas se indica la secuencia aminoacídica completa y sobre ésta se delimitan con color los dominios característicos BH4 (fucsia), BH3 (verde), BH1 (rojo), y BH2 (naranja) de la proteína obtenidos utilizando PROSITE.

.....cgacactatc
 ttcaattactctgatgaattagtcacatctcgtcacattttcatataggaagagctgaaaac
 agcgtagcccacagagccagagcaagagattgtacgctccttgattagagtcacagtata
 ttccaagaattgata
atggctgaagggggatcagactgccacaagatcatgatgagccagatgcatcgcacatctg
 M A E G G S D C P Q D H D E P D A S H L
 cgaatcgagc**agacgaggattgagcaacgag**tggaaatggagaaccaaacgattggcgag
 R I E Q T R I E Q R V E M E N Q T I G E
 caggccactgtgcttctacaacactttatcgtggag**cggtttcaacaggatgggtttgac**
 Q A T V L L Q H F I V E R F Q Q D G F D
aacgcccccggtctagcggacctgaggggggacgtggctatccccttagaccagcaggag
 N A P G L A D L R G D V A I P L D Q Q E
 atgtggggagagatgggttgcacgctcaggagcgcggggacacgctggacagagataca
 M W G E M G C M L R S I G D T L D R D T
 cagctacagaggatg**atagaggcagttccttcggact**cgccgatagaagcaattgtggcc
 Q L Q R M I E A V P S D S P I E A I V A
 gtagctcatgtcatctttggagacggagacatctcatggggcagaatagtaggcctcttc
 V A H V I F G D G D I S W G R I V G L F
 tacttcgcttacaggatgtgtgtgaaggcaatagactcaatactggagaaaagttttccg
Y F A Y R M C V K A I D S I L E K S F P
 acctgggtcaacaagctcatcaagaagtgggtcaagttcctgggtcatcaagtttgctcat
 T W V N K L I K E V V K F L V I K F A H
 tggatcgtcaacaggggaggatggctggccatccgggaataccttggttctcctacctgg
W I V N R G G W L A I R E Y L G S P T W
 atctggagcaccctgatggcctcctcagtccttagtcatgttgatctccatctacaaactc
 I W S T L M A S S V L V M L I S I Y K L
 agtaggt**tga**aatggatcc
 S R -

Figura 2.25. Secuencia para el gen Bax en la especie *A. dufresnii*. Con minúsculas se indica la secuencia nucleotídica, y sobre ésta se indica el ORF en negro y los dos pares de partidores Fw1 y Rv1 con amarillo y Fw2 y Rv2 con celeste. Con letras mayúsculas se indica la secuencia aminoacídica completa y sobre ésta con color se delimitan los dominios característicos BH3 (verde), BH1 (rojo), y BH2 (naranja) de la proteína obtenidos utilizando Pfam.

tacacaagatctatatatccccctcatcttttgcttttgataatacattcatgtaattttg
ctttatcgtatcaaggttgcggaattacctggagatgagcccacagccaatggcacagag
gaggcagagagtgtcatcctgttcctggagtctaaggagctgatgtgaactgccaggac
atctatggggtcacaccgctgcac**atg**gctgccattcgagacaatgaaattgccgcaagt
M A A I R D N E I A A S
gagctgctcagtctcagcagtatcctggtggatgcatgcatggcagatgatgacgct
E L L S L S S I L V D A C D G Q M M T P
ctacacatggcctgcacccacggtagcagaccattgctgccatgctcattgagaagggg
L H M A C T H G S E T I A A M L I E K G
gccagctgagggccacagatgaggagtcaggcaccctttgcatgccgctgcatggag
A Q L R A T D E E S G T P L H A A C M E
ggccacaaggacattgtggacctgctgtttgctgcgggcgagaagcagggccacct**cacg**
G H K D I V D L L F A A G E K Q G H L T
cagatgttgacggatgtgaacagtgaccgcagcacaccactacatctggctgttgacagt
Q M L T D V N S D R **S T P L H L A V D S**
ggctacgtagagatagtgaacaactgtttgagagaagggggctaattgtgaactgttacgct
G Y V E I V N N C L E K G A N V N C Y R
gacaaccgtagcacccccctccacgctgctgcb**attgctggggcacctggagat**cgctgcag
D N R S T P L H A A C I A G H L E I V Q
cacctgctcaacaagggggccaagatcaatgccttcaatgcagaccgagccacaccctc
H L L N K G A K I N A F N A D R A T P L
ctccgggcatgctcctacaacaggttcaaggttggtggagttcctcctcaccaaaggagcc
L R A C S Y N R F K V V E F L L T K G A
aagatcgaggctagagacaaggacaatttcacgccgctgctgatcgagcaagcgccggc
K I E A R D K **D N F T P L L I A A S A G**
cacagcgccaccatcaagatcctgctgagcaagcgggccaacatcacggccatcgacaag
H S A T I K g I L L S K R A N I T A I D K
cacgagaagaccgccctcttttgggcagcagaggaga**acaagccagaggcacttaagg**cc
H E K T A L F W A A E E N K P E A L K A
ctactctcacaccaatggcgaagaaagtctgaggttcagcgatcgctatgacaacaca
L L S H P M A K K V L E F S D R **Y D N T**
gctctgcacattgcgccgaaaacggatatcttagcattgtcaggattctgcb**tgataac**
A L H I A A E N G Y L S I V R I L L D N
ggagcggagatagactggaagaatgaggatgaacagacaccattcatcttgagctcag
G A E I D W K N E D E Q T P I H L A A Q
aatggccacacatcgtgtgtgctcgagtttgtaagagagacgagaccaccattcacgat
N G H T S C V L E F V K R D E T T I H D
gaggatgagaacttaacacaccctccacatggccgctatggaaggccatgctaagacg
E D E **N S N T P L H M A A M E G H A K T**
gtccgtgccctcattgaggctggagcggacatcgaatccaggaatcagcagctgtggacc
V R A L I E A G A D I E S R N Q Q L W T
cctcttgattgtgcagctcacaaggatgggtgaagactgcctatgccttgtagacaac
P L D C A A H K G W V K T A Y A L L D N
gacagcccggctgcacccacagataaagctaagatcaccctctgcatctggctgcaacc
D S P V D P T D K **A K I T P L H L A A T**
agtggctcatgtggagatggcgaagctgctgctggactggaaggccgatcttgggatggtc
S G H V E M V K L L L D W K A D L G M V
aactctgagcagaagaactgtctggacatggccatagagaagggccacaaggatgttgcc
N S E Q K N C L D M A I E K G H K D V A

atggcaattgtgagtcaccctaactggaaggatgccatgtgctctgaaagcattaaccct
M A I V S H P N W K D A M C S E S I N P
gtcaccaacaccaggaccacgcccatgaggaagctcatccgcagaatgccagatgtggca
V T N T R T T P M R K L I R R M P D V A
gagaaggtccttcaacaactgcctgatcgagaacgacaaaaccccgggagcacagggactac
E K V F N N C L I E N D K P R E H R D Y
tgcattcacctttgactacgagctcctcgcagacatgttctcccgttggaacgatgacata
C I T F D Y E L L D D M F S R W N D D I
gcagataatgttgcagaaagtgggctcagattctggcgacggatcatcaccattcaaagag
A D N L S E S G S D S G D G S S P F K E
aacggccgcctcaaagatgatgccacaccctactccacttccctcagagattattaagata
N G R L K D D A T P Y S T S S E I I K I
aaccatcccctcgtcataatggtcagctcccagcgtgagcaacttctggggccaccctg
N H P L V I M V S S Q R E Q L L G H P L
gtcaccagcctactcaaccacaagtgggcccagctatggctcgttcttctactactcttct
V T S L L N H K W A S Y G R F F Y Y S S
ctccttttctacctccttcttccctcaccgtgctcaccggctacgtcttgggtcaaccggccc
L L F Y L L F L T V L T G Y V L V N P P
cccttctacttccagcaccaactcctccaccggcgtcacctttgtctttgacagcgacaag
P F Y F S T N S S T G V T F V F D S D K
cgctggatgctgtcctacagcaatggcaccttcttctcgtctttggggagattgggactgg
R W M L S Y S N G T F F V F G E I G H W
ctgatcatggcctggcagggataaacctgctgagagagattgttcagatctggcatcag
L I M A L A G I N L L R E I V Q I W H Q
aagcttaactacattgactttgaaaacctgctggagtggtgctctatggcctggcaatc
K L N Y I D F E N L L E W C V Y G L A I
ttgatgtcgcccccatcagtcctttcacttacagctacgggaatgctgctggcagcatc
L Y V A P I S P F T Y S Y G N A A G S I
actgtcagggaggcatggcagtggtgctggggcggcagccatcttcttagcctggatc
T V R E A W Q W Q C G A A A I F L A W I
aatctcattctctttatccgcaagttcccacagctgggtatctatgttgatgtttacc
N L I L F I R K F P Q L G I Y V V M F T
gacatcttgagaacatttgccaagtttggtgctcttcatcctcttcattgtggcgttt
D I L R T F A K F V V L F I L F I V A F
gctctggccttctatgcctgctcatgaaccaggcgccgttccacaagattgagtactcc
A L A F Y A L L M N Q A P F H K I E Y S
ctggtgaagacctttgtcatgatgatcggtgagtttgagtttgacgccatctttcacacc
L V K T F V M M I G E F E F D A I F H T
tccaactacctccagcccggtaaccagccgacgaggacgggttcccttggttatgtcttc
S N Y L Q P G N P A D E D G F L G Y V F
tacgagggatcacctacaccatcttctggttctttggtgcatcatgtcgatcatcatc
Y E G I T Y T I F V V F V V I M S I I I
atgaacttactgggttggtctggcagtagatgatatcaaggaggttcaggagcaagccaaa
M N L L V G L A V D D I K E V Q E Q A K
ctaaagcgacaggctatgcaggttgacctggccatggagggtccaggaggcccttccctcc
L K R Q A M Q V D L A M E V Q E A L P S
ttcctctggcgccgctacatcctcaggaccaagagggtctaccccaaccgatgggccaac
F L W R R Y I L R T K R V Y P N R W A N
aacatcttcacaaagtcctacgccccctcatggggaatacgcactttgtgctgtccgac

N I F T K S Y A A L M G E Y D F V L S D
gccatcgattccgcacctcaaccagaaaggggtgagctggcagagatccgggtcacagcag
A I D S A L N P E R G E L A E I R S Q Q
gagaccatcacggacacagtgtccaacctcaagtaccggctcaagcaggtcaagtctcag
E T I T D T V S N L K Y R L K Q V K S Q
aatgaccgcatggagcgcgatgctctctgccttgctcacacacagcgcacatcgcattcagc
N D R M E R M L S A L L T H S D I A F S
gagtcagactccatcgcagaacattggggaa**tga**tgagagaaaaggcaggaattcctctgt
E S D S I E N I G E -
ctcaccagtcggagatggagaacagattgtcattaaagttttgcatatatctgtctgca
ccctccagcagtgaggttaaggggacctcctcaattaaaggggtaagggggggggggg
ggt

Figura 2.26. Secuencia para el gen TRPA en la especie *A. dufresnii*. Con minúsculas se indica la secuencia nucleotídica, y sobre ésta se indica el ORF en negro y los dos pares de partidores Fw1 y Rv1 con amarillo y Fw2 y Rv2 con celeste. Con letras mayúsculas se indica la secuencia aminoacídica completa y sobre ésta con color se delimitan los dominios característicos ANK (naranja) y el canal iónico (verde) de la proteína obtenidos utilizando Pfam.

ctcgtctctctccctaccaccaccatcatcaccatcatcaataaaagatgcattaagtat
cggagggagatgagaagcttgctggtgggagaggtgctgcatacaacttattactggacacc
ataagcttagcgtgggagcagatccatttgccatcttcccaacaacacagccgccatttatac
accacgactgtgtttgtctgcatcaggcttggtatgtaaaaagcagacaacatgtagagca
ggcatattccgctttgcaacaggtcgtcgttagcatgggtcagtgacaactcattgaatcc
ttacatggaaaaatgcattgattaggagaggaaaggaggcgtgctaagaaacaagatg
gaggagtcaacccttaaaaaacgatcaacgatgatgccttctcagtgagatcgattacca
cctattatcacgcgtaggcgggaaggttgttgtcgaacctagcagcagctgggtgagagaag
gtcgtgacgtatactttgctctcagatttgtccctcttcagaatcaaaagaaacgccgt
tgccaagatcttgatgactcttgtatttgcgtcaccacacgacttcatgagagttgggggt
gaagagttggactgaagaccattcacagtc**atg**ccatctttggcggtacacctcatcttg
M P S L A V H L I L
ctcgtgacatttttcttaggtcagagaaatgaggctaatggggagcagatgtcatgcacg
L V T F F L G Q R N E A N G E Q M S C T
gatgcccgctcgcgcatgtgaaagagatgatttctgtagcttgggactcattgctatccaa
D A R R A C E R D D F C S L G L I A I Q
catcaactgcgga**aacgtggatggtcgggtcatgt**gaagcaacgccctcaggccttggtaac
H H C G N V D G R S C E A T P S G L V N
tgtctgatgatgttacaagacgctaggatataatagagtctttgctagctgctactgagac
C L M M L Q D A R I Y R V F A S C Y C D
ccgtccagccccgagtttgagcagatgccatcatcagcaacg**tctgaccatctccaatccg**
P S S P E F A A C H H Q Q R L T I S N P
tgcatgaacgctacaggttcagctccttcaactgtcaatctcctccgatggggtcgtcggca
C M N A T G S A P S L S I S S D G S S A
atacctgcgccaacatccgcaccaggttaactgcttcaaagttatcaaggcatgcaaggaa
I P A P T S A P G N C F K V I K A C K E
gagacggctctgccaggagaaactgcaggccttctacgatgcttgtcctacgcgcaagcac

E T V C Q E K L Q A F Y D A C P T R K H
gacacatgcagattgacgtccgcccagggaacgcgctgtctgcacgtcagcacagtgggcc
D T C R L T S A E E R A V C T S A Q W A
ttagatgagaatctcatgaactgcacttgccaagaagacaggagtaaagcacaacgacag
L D E N L M N C T C E E D R S K C K R Q
agaaagcggcttcaagagaaccctgctcatttcagctccaaccacggggacatcaca
R K R L Q E N P C V I S A P T H G D I T
gcggtgcacctcatagacttactgggtgatgagtctgttaagggcgaatcagaggaggag
A A A P H R L T G D E S V K G E S E E E
gaactagacgagcttgaggaggaatgcccgggtggatgaaagtaacgtgggtcattggacca
E L D E L E E E C P V D E S N V V I G P
agtgggggttacaacaatggagcaggtacgtgcaaggaagcctgaccgagtgacgatg
S G G Y N N G A S T C K E A L T E C T M
aacaagtatgccgtgatgacttttagcgacatcctcatcaagtgcaaccgcaagaaatc
N K V C R D D F S D I L I K C N P Q E I
gaagagtactgcaaccgcccaggagtgctgcaagcatagtcgcaagttctttacggacaca
E E Y C N R Q E C R S I V R K F F T D T
tcgccgatctacactcagccttgggtgttttgccattgccaggtaggcgacatacagtg
S P I Y T H A L V F C H C Q V G D I Q C
gagacgatcaagagaggactcaatcctacctgcccgatcagggatccagaacctggac
E T I K R G L N P T C A R S G I Q N L D
tgccctggacctggtccaacgctgcaatgaagactcatactgcaggtcagcttacaggaa
C L D L V Q R C N E D S Y C R S A Y R N
taccaggagctatgtaagccttcagacgatgagagcggttggtgcctacagctacgggtgcc
Y Q E L C K P S D D E S G C A Y S Y G A
tgtcgggtctgctcgggtagctattatcatgaccatcatgggatcaagttgttctctgtgat
C R S A R V A I I M T I M G S S C S C D
agcaacaacactgactgtcgtatcaccagaagatgatctttgacaattcctgttacgac
S N N T D C R Y H Q K M I F D N S C Y D
cgctccgacaaagggttactactcctccatcgcacactactgaaccatccgatctacctct
R S D K G Y Y S S I A P T E P S D L P P
accgagtgcggtgtcaataacagcctgaacggaatgccgtacagagtcaagccgggatcc
T E C V V N N S L N G M P Y R V K P G S
ctcgtcttgggtccttttgggtgatagatgctactcaatgtgcatctgtgtttacaatgga
L A L V P F G D R C Y S M C I C V Y N G
aacctggagaattgctgactcagccttgtccggacgacattcattgcacagtcaacaac
N L E N C V T Q P C P D D I H C T V N N
attgaatataaacatgatgagctcttttctcaccggcgtatggatattgcatctgtagg
I E Y K H D E L F S H P A Y G Y C I C R
tctggtaacgtgctgtgtacaagaagacacgagtcgggttcagaaaagagtcacagcta
S G N V L C T R R H E S G S E K E S Q L
gtatttccgagcatcagcgtagcctatgacagtcagcttcagtatcatctgaactcacag
V F P S I S V A Y D S Q L Q Y H L N S Q
ctggaggaatcgtttggagatggatctatcctcaggggtctacagagcatcttagataat
L E E S F G D G S I L R G L Q S I L D N
caggaatcgggtcccctgcccattgcagctcttggagaatacagacaacactcttctaata
Q E S V P C R L Q L L E N T D N T L L I
tccgtgtactacacgggttaatatgaatgcgtgcttcaaccagatgtacagattatccaac
S V Y Y T V N M N A C F N Q M Y R L S N

```

atgatcaacatgaagcaccgcgatcacatttgaacccccaccctcagcatcctgaagatc
M I N M K H P A I H L N P T L S I L K I
gccacggtggagcagggagcgcacatcctcaaaagcaacaaaacggaagagcaacatcgact
A T V E Q G A H H Q K Q Q N G R A T S T
cttaaaacatcatattcactcgcgctcatattttctcgtggcaatggtgagcgcctaatatt
L K T S Y S L A S Y F L V A M L S A N I
tcactgtgcggcaggacccttgaatacacgtgaagtaaacacaaacaaaaaatctccttc
S L C G R T P -
agttgatctggacagatgtcccactgcagaataaggagcgcacatcacccaaagtagcgaaa
agacaagcgccatccactcttcaaacatcatatccatctgacatcatcatcttcattacc
atcatgtgacggccaaagccgaggtggagtacattccactattaacgttacttggtttgt
tcaatcatgacttttaggaaagccttctctaatttaagaataaagattgcaagtaataaat
tgtttgagcgtcggccccctttttggcaga
    
```

Figura 2.27. Secuencia para el gen GFR α en la especie *S. purpuratus*. Con minúsculas se indica la secuencia nucleotídica, y sobre ésta se indica el ORF en negro y los dos pares de partidores Fw1 y Rv1 con amarillo y Fw2 y Rv2 con celeste. Con letras mayúsculas se indica la secuencia aminoacídica completa y sobre ésta con color se delimitan los dominios D1 (verde), D2 (naranja) y D3 (fucsia) obtenidos utilizando Pfam.

```

caactccaaggtcaatgagatgatggcgaacgctaagacaagttcaacgacctcgtcgca
M M A N A K D K F N D L V A
aagattcctcttccaacctggggcagtcgctcgccattgccatcgccgcccggccttatactc
K I P L P T W A V V A I A I A A G L I L
ctctgctggttgccttctgtatttgtaaaaagtggtgctgtaaaaagaggaaaaagaaggag
L C C C F C I C K K C C C K K R K K K E
ggaaagaaggggttgaaggagccgctcgacctcaagagtgttcagatgctggggcaacagc
G K K G L K G A V D L K S V Q M L G N S
tacaaggagaagcccgatggtgatgatctagataatggagccgaggaggagggggataacc
Y K E K P D V D D L D N G A E E E G D T
gactccgtaagtctgagatcaagctcggcaaacctcaataactctctggactacgatttt
D S V K S E I K L G K L Q Y S L D Y D F
caggaaggaaagctcaatggttgggtcatgcaagcgtcgggaattgccgggatggacttt
Q E G K L N V G V M Q A S E L P G M D F
tcggggagctccgatccatgatgtcaaggtttacctcttacctgacaagaagaagaagtac
S G T S D P Y V K V Y L L P D K K K K Y
gagaccaaagtccaagaaagaccctcaaccagctctttaaagcagaccttcacgtttaag
E T K V H R K T L N P V F N E T F T F K
gtgccctacagcagaggtgtccagcaagacgctgggtctttgccatctacgactttgaccgc
V P Y S E V S S K T L V F A I Y D F D R
ttctcgcgccatgacatcatcggggaggtcaaggtcaagctgagccaggtggactttgggc
F S R H D I I G E V K V K L S Q V D L G
agtgtggtggaggaatggagagatctacagagcgcagaagttccgggggggtgagggcaag
S V V E E W R D L Q S A E V P G G E G K
tccgaactgggagacatctgcttctcgtcgcgtacgtcccgactgcggggcaactgacc
S E L G D I C F S L R Y V P T A G K L T
    
```

```

gtggtcattctggaggccaagaacctcaagaagatggacgtcggcgggtctctcagatcca
V V I L E A K N L K K M D V G G L S D P
tatgtgaagatttccctctacatgaacaacaagaggataaagaagaagaagaccaccatc
Y V K I S L Y M N N K R I K K K K T T I
agaagaggacgttgaatccttactacaacgaatcattcggcgttgagggtgccgtttgaa
K K R T L N P Y Y N E S F G F E V P F E
cagatccagaaagtgacgctggtggtgactgtggttagactatgatcgcatgggcagcagc
Q I Q K V T L V V T V V D Y D R M G S S
gaacctatcggcaaagtgggtgcttggatgcaatgccacggggggcgggactccgtcactgg
E P I G K V V L G C N A T G A G L R H W
agcgacatgctggcgtcgccacggcgaccaatcgcccaatggcacacactccaagaacc
S D M L A S P R R P I A Q W H T L Q E P
gaagaaaacaagttagacggcctt
E E N K -
    
```

Figura 2.28. Secuencia para el gen Synaptotagmina en la especie *A. dufresnii*. Con minúsculas se indica la secuencia nucleotídica, y sobre ésta se indica el ORF en negro y los dos pares de partidores Fw1 y Rv1 con amarillo y Fw2 y Rv2 con celeste. Con letras mayúsculas se indica la secuencia aminoacídica completa y sobre ésta con color se delimitan la región transmembrana (verde), y los dominios característicos de la proteína C2A (rojo) y C2B (naranja), obtenidos utilizando Pfam y PROSITE.

```

gaagcttccccgcacagcggcatccgcgtaccgcgccaatattttgtacagtcaggattcgtt
tgtttttgtggaatagaaacgtgaaggaatcattggcgtctcaaactaagagccagagggtac
M A S Q T K S Q R Y
gagaagcgatccaccaggaccgaaattaagacttctaccctcagtctcagactcgatct
E K R S T R T E I K T S T P Q S Q T R S
acctcttcttctgctcttcttcttcttcttctgagcccagcgaataatctccaggcatgaggaa
T S S S S S S S F L S P T K I S R H E E
aaggaagagttgattggactcaatgatcgtctggcgacgtacattgatcgagtcaggcctcaa
K E E L I G L N D R L A T Y I D R V R Q
ctcgagctcgataatggccgacttcagggtccagatttcttcatacgaagaaaccagaca
L E L D N G R L Q V Q I S S Y E E T Q T
cgagaagttaccagtatcaaggatatgtatgagaaagaattggctgatgcaagacgactt
R E V T S I K D M Y E K E L A D A R R L
ctggatgaaactgctggtgaaaaggccaaattacagatcgagtggtgggaaatacaagacg
L D E T A G E K A K L Q I E C G K Y K T
gagccttgaatgacactgacccaagagtgatacaaaacttgagaaggacttgaatgcatccac
E L D D L R P R V N K L E K D L N A S H
aagcgctgcaatcgctggagtcacagattgcccgagaaggatggaggatccgggctctg
K R L Q S L E S Q I A E K D G R I R A L
tccggggacaagcgtcttttgaagacgaacttaacgagctcaagaaggagcttgctaac
S G D K R S L E D E L N E L K K E L A N
aaggagaagcagctcaaggtggccaagaacaggttgaggaggagactctgctccgtgtg
K E K Q L K V A K K Q V E E E T L L R V
gacctggagaaccggatccagagcctcaaagaggagctggcattcaaggaggagctccac
D L E N R I Q S L K E E L A F K E E L H
    
```

aaacaggagatgaagg**agactcgcaccaaacgccat**gtggacatgacttcattcagagggc
 K Q E M K E T R T K R H V D M T S F E G
 cagagcatcgaggagctgaacagctccatcctttgagagcctccaggagctcagggagcag
 Q S I E E L N S S I F E S L Q E L R E Q
 acgtctgaacagaccaccctgttccgacaggagacagagtcctctacttcagcaagctg
 T S E Q T T L F R Q E T E S L Y F S K L
 gctgatctgaaggccttggctgagcgtcaccgaaacagctccgtgaacgccaggatgag
 A D L K A L A E R H R N S S V N A Q D E
 atccgtcgcctgcgcatcaccgtggacggattcaactctgagatcaccacgctccgcgcc
 I R R L R I T V D G F N S E I T T L R A
 cagaacaacaccctgattgcgcggatcaaggacctggagaaccagctgcgccaggagcag
 Q N N T L I A R I K D L E N Q L R Q E Q
 gactcccaccaggaagccgtcaacctgcgggacaaggagctgcagcagctccgggacgcc
 D S H Q E A V N L R D K E L Q Q L R D A
 atcgccgagcagctcaaggactacgacgacctgctcaacatcaagctcaccctggacaac
 I A E Q L K D Y D D L L N I K L T L D N
 gagatcgccacctaccgcaagctgctggaggggtgaggagaccaggttgaagatcaccacg
 E I A T Y R K L L E G E E T R L K I T T
 cctcctcgcaagaccaaggcgtcttcatcccgtgagcagcgaacggccaagcgtcgccgc
 P P R K T K A S S S R E Q R T A K R R R
 gtggaggacgagtcacagcgtcacagcaagcgaaccaccaacggggatcgccatcgtc
 V E D E S S V T A S A T T N G V I A I V
 gagaccgactctgctgggaccttggtaagctgcagaacacgtccgagtcggaccaggcg
 E T D S A G T F V K L Q N T S E S D Q A
 ctggggggctggcagctgaggcgcagcgtggacggggcagcagatctagcctacaagttc
 L G G W Q L R R S V D G G S D L A Y K F
 acctccaagtacgtgctcaaggcggggcttgaggccacggctctgggcctcggggagcggg
 T S K Y V L K A G L E A T V W A S G S G
 cagcccactccccgcctcggacctcgtcttcaagaacacagagagctggggcactggc
 H A H S P P S D L V F K N T E S W G T G
 gacacggtggagaccaccctggtcgatgcttcaggcaggtgatggcaactcgtactgtg
 D T V E T T L V D A S G E V M A T R T V
 accaaggaaattgtatcgacaggtacagagagagaggagattctgatcgatgcagcctg
 T K E I V S H E Y R E R G D S D R C S L
 atg**taa**agttgggacggagtgagattgtgacctgagcactacgttttttttaaactctt
 M -
 gtagaaagcaacattaccaggaatgtatcctcatatcactgatcaaggtgattttaagag
 tagtttttgtacaaagtttataggcgtggtgtagtgactgtaacttaactaactaagt
 cattgtaattatcttaagtttttaagtcactgaccactcaacgcacttttgattggctaaa
 agaagattctgttagggaatgggaagcgatacttattgagtgttcattacaggaaacttt
 aggcacgagagctttttgtatgtggtggtatgtattggtaaatggcatggcgcatacacat
 cagtgaaaattgaaatgtctatagattatagaagatgcacaggtatgaaatcttttagaaa
 aattctgcaattaagtttatattattgccagatttaattgctaggcgggcacactaaatg
 cagcaggcaaatcattttgcatgataaccagacttaaagagctaccggtatgcagtaaaa
 cagagtagatgataagaaattttctttatcttgtataaggcatgatgaggcactaattgtc
 tattcatttttttaatttgtggtgctgtattttttagttttactctcaattatctttgtct
 ttagaatccatgtattaaacttttagtctcagctgcaaggagtagtggtatgccagcgcag
 gtctcttttttaacatacatgtatttgcctagttttcttgtttctgtgtaattgcaattggg
 gtctgtgtaccatattatgctgtttctcagtttaaacttttgattttttttaaactcatg

aagaaagatattccctttaccaataaacagatcaatgtttctttctttttctctctgagc
ataaattttaattctatgaaaaagatgtattgactgacatcctgcattgaaatcccctt
tgaatgattttgaaacttgctatcagtaatttatcagagtaaatacagagtttattccaca
caaataatacagcagcatgtctgactcaggctgaccaatcaaacagacagaattgttgt
catctcaaaacaggctgaaagtttttttcttcgttttttccattttgtgcatcaaag
agctgctttatttgctcatatttggtgcatggtgcatgggtatagtttcagagaaatgt
tctaaattcaattttgacttgataacttttggaatgatatgtgtaataactaaaaagaa
tagggaaaatgatgccagaagatgatttaggttgtgttcttgttgttctgctttgtttatt
cccttttagtttaaaagcttgagttgattttttctgaaatatttgaaataagtgttttta
cctattcttttaatactactttggttccattattcaccaatatgacatatatgtaaatta
actacttaaaacctgtctttgagcagtaagcacccaaaaagtacggaggcaattacttc
tatagattaaaatatcatttctcatgccctagtaccggatctcttttttggttagaggt
taaaatctaagaggcaaactgcatacagcaatcaaaatcaaactatgtactagcagtg
ttataaaaggggagaggggaatgagcgtatgaaatacagtatatttgtataaacaatcatg
gcaggtaaatctgtagatgctgtttatatatgcttaattgggtgaaggcatgggaatgtc
atagtggtgctgcgcacatctctttatgcagagtgctcttggaatggggcagagttgattttt
catgtgaattgacaatgaaaggaaaaagaatttaaaaaaatgttgagtgcgtttttta
aaaatattagttgacatggtaagacttatatagtcgtaaatttagaataagcatgatttt
agtctcgtgacttaagtgttcatttataagggacttagataatcaattgatgaaatctt
catcgtaaataatttgagcaaatgcccttatattttggtaggatgtgtttatgttctcgt
ggtattgctcatgggtcttgtcatacaaaagggtgacatttttagcagggtgttatttgtt
tattcttttaataattcctaattctgaaaatatagctaaacaatcatagccatattgttgc
cactcataaactgattgcatgaaataatgcttcttgttacaccagaaatgaaatttaaga
caatcttaaaaagatattttaactacatttaatacgggttgattccaatgtgaaaagactg
tttggtttatgcagaccattgaaaaaatggcagattggctgagaccatttttatgtgtc
gaggttcaaagaacttcaagtcagatgaagaatgggtgtgctccagattgtaagtactcac
ttgcgatcaaaatataacaatataaaaccaattgaaatttatttctcaaattaattgtt
agattatccatgctactagtgaacactcgagcacattttagtagtcatagcacacaacttta
gcaagggttactgtatgtaaaactgtaatgtcaatgtagggttttaaggtactctgtg
ttagattaaatagttatacaggaattaaaaactcaagtattacgtataagctacacattg
tgaattgataagatacatgtgacaaaaaaataataactgcattgattcttaacagtggg
tgatctatggggtaacaatataccagaggcttggaagagtggttttcatataccggta
tgtgtatttaaaagctcaacaagttgactctaaaacagttttatttgtgaccattgaa
ttttatgtgtttttcttgaagcctcaggctcataggctcgggtgggtaaaaaaaaatttgc
tgcatcaaaatatcatgtctccccatttgggacgaaaagccaaattatgggtgagtgtatg
gtgattgaaatgtttctactcgtgaatgaatcatgtgaacggactgtgattcaaacatg
tggacttatttttatatgggtagtttagtactactgtgacgcaggacttaaagctcatatt
tgagtgtgtttgattcttgtgtgtatagttcttgcagagggcattgcccttttagatca
tgtgaaataaaccagtgatttgggtgaaacagtaagttcataaatgtgagatattcattgt
gatattaccacttttaccatgcattttttttctcaatctagaggagggttttggaggc
tgaaaatcattattttatgtcgaattttcaacccaaaaatcccttgagggaatactgatt
acagatgtaaagcgttgtattctattgagattgtgggccaagtgagaaaacttgcatc
catcagcaaacctcatataaatcagtgcaaagacacatagagtcaatcttagttcttag
ataccaatacatgtatctgcctattaagtagcgtatagttcatttgaggctccgcttctca
ttcagaaattgggtatgacatcttgccatcatctctgtgagagaaatatggcatccaatca
tgaaaaatgatgtcatgttctgtctgcttattatcttgcattggttccaacatgaaaagaa
gatcacatgaccagctcaaagcattttgcatgttttttactgtgttgatataccaag
gaaactgatatactagtagcatgtaagggtattattattgagtgtgcttaggaatattt
ttccctgatattgaaatgtacgcagtgcatggctctctcagcagaagctggcatttttgc

```

ttttgcaatTTTgcaatTTTgcaattcagatcgcaagatccatgatatgatgtctccagta
TTTTacctTTtaatgatgtcaggaacaataacaatatgtatagttcTTTcagtgtgatt
ctgggtgTTaagctTTTggTTTgtaacaattcgtattcagTTtagtaatgtaactTgaac
tagtgtacactaatatcTaaacataagggttgactgtagTTTcTaaTaaactacagaggTT
tgattTccaagctcTTgatgataatgTTTgTTTgagctatctctactcaagTTTataca
atgggTTTgatgTTgTTgTTTgTTTgcaaatcatgtgTTTcTTTctgagaaatctaaa
aacatgatattTTTgCCctgacctgattataatcatattgtctgtgCCCCaactTgatgat
catgtgtaccaaaaaattgCCatgatattTcactgTTTgataaacaagggtatgtaTTTT
caataaaaagaagagcagTTTccataaaaaaaaa
    
```

Figura 2.29. Secuencia para el gen GFAP en la especie *A. dufresnii*. Con minúsculas se indica la secuencia nucleotídica, y sobre ésta se indica el ORF en negro y los dos pares de partidores Fw1 y Rv1 con amarillo y Fw2 y Rv2 con celeste. Con letras mayúsculas se indica la secuencia aminoacídica completa y sobre ésta con color se delimita el dominio central ROD (rojo) de la proteína, quedando además delimitados el extremo N-terminal que corresponde al dominio de la cabeza y el extremo C-terminal o dominio de la cola del filamento.

```

gaggcgtacgatgccaccaaattTgtccttatatggTcaaatatgctacacgtactccgg
tgccaatattataataacaggcatgTTcctTgcagagagcatcattccaactTcaagcaag
ccaactcacaggTggTgtaacctcTTctctcTccctTtcggTaaagtctTggaaatctact
acaattTtgcgagctcatctcTtgactTtactgcagaaaatagcgtTataccatagga
tcaagcattgcgtgtagcgtTtTgtgaagtgagTgcagTgcggtatctgatacgaatgctTg
TTTgtgaggTTTtattTtagctctctatctctgaactTtgggTtattTatttagctgTT
aagaaattgcactTtatattTgtagatgTgTTtatatgcaatagTTgattcatagTTcaag
TtggaaagctTgatcgcttatccagTTTgtcTTTctcTccaagTTtagctcgcatagggatt
gctagtattactgcgcgcagccacctgTTtaatgccacgcccccaattTcaccatgtgca
TgcgctTgattcTtaccCGctcagccgTTTggccgatcTtaattcacgaagTTTTTTT
tattaaatcgtgCGTTTcaggcgggactggTTTcaggagTaatctgTtatgaattaatag
TtGtaagatctcgtatggTtatgatggtacatgtgTtgagatggTgaaattataacctgg
ctagtGcaattacggattcaaataaagactTgcagatgagcagcatgcctccattTTT
caattTcacgcacgaagggaattataatgtgTtTtgctagcaacgTTTcTcctcgtgTT
ctgTtTaaaaatgTtattgTtggTtctgTtTtattTtTgctattTaaagTTTcacgTtcc
gcctgtaccgTatattgcatcgggcagTTTtTcTTtgaccatcatgctTtgaattggcca
aaaaccaaaaggcatcattattTtactctggTtTtgccattTgaaattgtctcggccaagt
aaagatgagcacaagagcgaacagcattgtcaatcgTatggaattcgccatatcggtcG
agctaagggagTgggctcGctaaaagcggcactctcattattgacattggatattTaaat
gatgcagacaacagcgtcatgctattTgtgagatcgtcTtccattggataatccgcagggg
ccacagccccgcactgcatgcataattaatcgggTtTtccgacgccattcataacagTtC
gcgcCGctgtggcGcatggccttatatgggTatggggcgtggcaaatgctgagTcagTgc
gcatgggGcGcatgcaacctgTtTgcccgaacgactgcGcatgcgaaatgggagTgggGcGc
aagggatgcggcatgccccgaacacatgtatgTtTccctcactaggatctgtactTgtgt
ccaagctcTtgtcagcGcacttattcagcattgtcctTtacattgtattTctattggcGc
gtTtccTtgacagaataaacaAAAAaacaatcaatcatgtgtgacgatgatgTtggcGct
C S L T E - T K N K S I M C D D D V A A
ctgtcgtTgacaacggatccggTatggTgaaggccggattcgcCGgagacgatgcccc
L V V D N G S G M V K A G F A G D D A P
    
```

```

agggccgtcttcccatccatcgtcggcagacccccgtcaccagggtgtcatggtcggcatg
R A V F P S I V G R P R H Q G V M V G M
ggacagaaggacagctacgtcggagacgaggctcagagcaagaggggtatcctcacctg
G Q K D S Y V G D E A Q S K R G I L T L
aagtacccattgagcacggaatcgtagtaactgggacgacatggagaagatctggcat
K Y P I E H G I V T N W D D M E K I W H
cacaccttctacaatgagctccgtgtggccccagaagagcacctgtacttctgactgag
H T F Y N E L R V A P E E H P V L L T E
gctcccccttaaccccaaggctaaccgtgagaagatgaccagatcatgttcgagaccttc
A P L N P K A N R E K M T Q I M F E T F
aacactcctgctatgtacgttgcaatccaggctgtgctctctctgtacgcatctggacgt
N T P A M Y V A I Q A V L S L Y A S G R
accactggatcgtgtttgactctggtgatgggttttctcacaccgtacccatctatgag
T T G I V F D S G D G V S H T V P I Y E
ggatacgcctcccccatgccatccttcgtttgacttggctggacgtgacttgacagat
G Y A L P H A I L R L D L A G R D L T D
tacctcatgaagatcctcaccgagcgtggataactctttcaccaccactgccgagcgtgaa
Y L M K I L T E R G Y S F T T T A E R E
attgttcgtgacatcaaggagaagctttgctacgttgctttggacttcgaacaggagatg
I V R D I K E K L C Y V A L D F E Q E M
tccacagctgccagcagctcaagtttgagaagagctatgagcttctgacggacaggtc
S T A A S S S S L E K S Y E L P D G Q V
atcacaatcggcaacgagcgtttccgatgccccgaggctctcttccaaccagcttcttg
I T I G N E R F R C P E A L F Q P S F L
ggatggagtctgctggatccacgagaccacctacaactccatcatgaagtgcgatggt
G M E S A G I H E T T Y N S I M K C D V
gacatccgtaaggatctctacgccaacaccgtcctctcaggtggtagcacaatgtaccct
D I R K D L Y A N T V L S G G S T M Y P
ggatttgccgaccgtatgcagaaggagatcacagccttggccccaccacaatgaagatc
G I A D R M Q K E I T A L A P P T M K I
aagatcattgctcctccagagaggaaataactctgtatggatcgggtggctccatcctcgt
K I I A P P E R K Y S V W I G G S I L A
tctctctccaccttccaacagatgtggatctccaagcaagaatacgcgaatctgggtcca
S L S T F Q Q M W I S K Q E Y D E S G P
tccatcgtccatcgcaaatgcttttaagcaaaaagaaactagtgttattttgtgtctgt
S I V H R K C F - A K R N - C L F C V C
acttaatccatccaaactgaacctaatcctgatcatgcatacattattgt

```

Figura 2.30. Secuencia para el gen Actina en la especie *A. dufresnii*. Con minúsculas se indica la secuencia nucleotídica, y sobre ésta se indica el ORF en negro y los dos pares de partidores Fw1 y Rv1 con amarillo y Fw2 y Rv2 con celeste. Con letras mayúsculas se indica la secuencia aminoacídica completa y sobre ésta con color fucsia se delimitan los dos patrones consenso característicos de la proteína obtenidos utilizando PROSITE.

atcgcatcatatcatcatccggtggcagatcagcaccatttcatctcatccctgtaaggaa
 cacaaactcccattcatc**atg**gtcatcaaggttggaaatcaatggctttggccgcatcggg
 M V I K V G I N G F G R I G
 cgctgacgctgagggcaatcactgagaacgagaatgtggaggtggt**gccgtcaacgat**
 R L T L R A I T E N E N V E V V A V N D
cccttcattgacctggactacatggtgtacatggttcaagtatgactccactcacggcaag
 P F I D L D Y M V Y M F K Y D S T H G K
 ttcaagggctccgtctcctcaagcgatggcaagctgg**tcgtcaacgggatgcagatca**aa
 F K G S V S S S D G K L V V N G M Q I K
 gtattcgcgtgagcgggaccctagcgcgatcccgtggggcaagtgtggagctgagtacgtg
 V F A E R D P S A I P W G K C G A E Y V
 gttgaatcgacgggtgtgttcaccaccctagacaaggccaaggctcacctcaccggggggg
 V E S T G V F T T L D K A K A H L T G G
 gccagaaggtcatcatctccgccccctcggccgacgcacccatgtttgtcatgggcgtc
 A K K V I I S A P S A D A P M F V M G V
 aacgagggaaactacgacgcaagctccatgaacatcatcagcaacgcttccgtgcaccacc
 N E G N Y D A S S M N I I S N A S C T T
 aactgtctggccccctctg**gccaaaggtgatcaacgacaac**tttggcattgaggagggactg
 N C L A P L A K V I N D N F G I E E G L
 atgaccaccgtacacgcagtcactgccaccagaagaccgtcg**atggaccagcggaag**
 M T T V H A V T A T Q K T V D G P S G K
aaatggcgtgatggctcgtggagcagcacaacatcatccctgcatccaccgggggctgcc
 K W R D G R G A A Q N I I P A S T G A A
 aaggctgtgggcaaagtcatcccagaactcaacgggaaactgaccggcatggcattccgt
 K A V G K V I P E L N G K L T G M A F R
 gtccctgtccccgacgtgtcgggtggtcgacctgactgtccgtctcaagaagagcgtcacc
 V P V P D V S V V D L T V R L K K S V T
 tatgaccagatcaaggccacgatgaaggccgcgtcagagtccaaggagcttggacgctac
 Y D Q I K A T M K A A S E S K E L G R Y
 atggggtacaccgaggaccagggttgtctctcaggatttccgtggagataatcgctccagc
 M G Y T E D Q V V S Q D F R G D N R S S
 atctttgacgcaggtgctggcatcgccctcaacgacaactttgtcaagctcgtctcctgg
 I F D A G A G I A L N D N F V K L V S W
 tacgacaacgagttcgggtacagctaccgcgttgttgacttgttatgctacattgcagca
 Y D N E F G Y S Y R V V D L L C Y I A A
 aag**taa**tctggcagtcaggaatatagcccagagaaccgggaaacctggaacatgaatctc
 K -
 agctgcatctttaaaccaggacttcatctgccgtagtaacatataatctgaaaaacttata
 tgattgtaaccattcacgcaagatgcgacacattactatgagaactgagcttccagtttc
 ccctaaaataaaaagaacttgattttaaagtgtgatgtcaaaatatccctgaattgtcttgta
 gcacaagctaacaaaatatatactattattcatgtaaactggttgaatgatatcagcaaa
 tgtttaaattctcaactcacattttaccctatttccagtatctgtgttcctaggaatgag
 agagctagcgtatccaccatatactgctttcagtgaaacttgactcccttgtaatttca
 tgtgtgtgtttgagtgatctatggagtagtgatggggatagatgtgcttgttgtttat
 ctatctattgggtcattagatatggtggcacgtgtgctgtggttggggaaaatgcgaaag
 cactgattaatattgaattttatctgaaaaggcagtacaagtaaaaaatgaagtgttgtg
 tgaggagataagttatatagttgatgcagcaattatgttgtttgttaaaaattcttatat
 aaaagctcatggagcttgcagttgaaactgttttgaagtttaacttccagaggcagaatt
 aaagcattaaactttactatgtgtttaattcgtttttgtatcagtgactcacttatttg

tagaatgttcctaataatggtataatcgtaatttcacaaaacaaggaggaaataccagtgaat
 tgggttaacattgctatacagtaccacatttctatggtgtacttatctcagtagccccaag
 taccattgtaatgctgacttaatctcaataaactatttagaaagaaaaaaaaa

Figura 2.31. Secuencia para el gen GAPDH en la especie *A. dufresnii*. Con minúsculas se indica la secuencia nucleotídica, y sobre ésta se indica el ORF en negro y los dos pares de partidores Fw1 y Rv1 con amarillo y Fw2 y Rv2 con celeste. Con letras mayúsculas se indica la secuencia aminoacídica completa y sobre ésta con color se delimitan los dominios característicos de la proteína, el dominio de unión a NAD (naranja) y el C-terminal (verde), obtenidos utilizando PROSITE.

tctatggtgaagatctcaccatggggtcagatgacccgtggacagcgtaagggagctggtag
 M G R V I R G Q R K G A G S
 gtcttcaggtcgcacaaacacaggaagggcgccccaaggctgctccatcgaacttt
 V F R S H N K H R K G A P R L R S I D F
 gccgagcgtcatggctacctcaaggaatcgtgaaggaaatcatccacgacccccggctcgt
 A E R H G Y L K G I V K E I I H D P G R
 ggtgctcccctggccaagatcacattccgtgaccctaccgctacaagaagcgcaacgag
 G A P L A K I T F R D P Y R Y K K R N E
 ctgatgatcgctgcagagggcatgtacaccggacagttcatctactgtggaaagaaagcc
 L M I A A E G M Y T G Q F I Y C G K K A
 accctcaacatcggcaacgtgctccccatcggcagcatgcccgaggaaccatcatctgc
 T L N I G N V L P I G S M P E G T I I C
 tccgtggaggagaaggctggtgaccgcggcaagctggctcgtgctcgggcaactacgcc
 S V E E K A G D R G K L A R C S G N Y A
 accgtggtctcccacaaccagagaccaagaagtcccgcgtcaagctcccctctggctcc
 T V V S H N P E T K K S R V K L P S G S
 aagaagtggtcccatctgccaacagggccatggctcggagtggttagctggcgggtggcgt
 K K V V P S A N R A M V G V V A G G G R
 atcgacaagcccctgctgaaggccggcgcgctacttcaagtacaaggtcaagcgtaac
 I D K P L L K A G R A Y F K Y K V K R N
 tgctggccgcgctgctggtgtggccatgaaccccgctggaccatccccacggaggaggt
 C W P R V R G V A M N P V D H P H G G G
 aaccaccagcatatcggtagcctctactgtcaggagagacaccccagctggacgcaag
 N H Q H I G T P S T V R R D T P A G R K
 gtcggtctgatcgctgcccgcgcaccggctgcctgctgcggaaccaagaaggtcaaggac
 V G L I A A R R T G R L R G T K K V K D
 gccaaaggaaatagacgtggacattacgacgtgacaaagaaagtcaataaaaaatgtgcaa
 A K E -
 aatctcacaccacattcttctcccccatctt

Figura 2.32. Secuencia para el gen RPL8 en la especie *A. dufresnii*. Con minúsculas se indica la secuencia nucleotídica, y sobre ésta se indica el ORF en negro y los dos pares de partidores Fw1 y Rv1 con amarillo y Fw2 y Rv2 con celeste. Con letras mayúsculas se indica la secuencia aminoacídica completa y sobre ésta con color se delimitan los dominios característicos de la proteína L2 (rojo) y L2C (verde), obtenidos utilizando Pfam y PROSITE.

agccgagagcatagttgcagtttagtcacttttcttctgtctcagcgcacatctaaacctcg
 H S C S - S L F F C L S D I - T S
 cacagcacc**atg**ggaaaggaaaagaagcacatcaacattgtggtcgttgggtcacgtcgac
 H S T M G K E **K K H I N I V V V G H V D**
 tctggcaagtgcaccacga**ccggccatctcatctacaagt**gcggtggcatcgacaagcga
S G K S T T T G H L I Y K C G G I D K R
 accatcgagaagttcgagaaggaggccgcagagcttggcaagggtcgtt**caagtatgcca**
T I E K F E K E A A E L G K G S F K Y A
tgggtgttggacaagctgaaggcagagcgtgaacgtggcatcaccatcgacatcgctctc
W V L D K L K A E R E R G I T I D I A L
 tggaaagtttg**acaccagcaagtatgccatcac**tgatcgcgatgccccgggccatcgatgat
W K F D T S K Y A I T V I D A P G H R D
 ttcatcaagaacatgatcacaggcacctcgcagggtgactgcgccgtcctgatcgtggca
F I K N M I T G T S Q A D C A V L I V A
 gctggtaccggagagtttgaggccggcatctccaaggagggccagaccgcgagcacgcc
A G T G E F E A G I S K E G Q T R E H A
 ctcttgtgttacacgctggggtgaagcagctcatcgtagccgtcaacaagatggacagt
L L C Y T L G V K Q L I V A V N K M D S
 gccaaagtacgacgagaccggttccaaggagatcagcaaggaggtgctgcctacatcaag
A K Y D E T R F K E I S K E V S S Y I K
 aaggctcggctacaaccccaaggcgggtggtttcgtccccatctccggatggcacggagac
K V G Y N P K A V A F V P I S G W H G D
 aacatggtggagccctctgacaagatgccgtggttcaagggatgggccatcgagcgaag
N M L E P S D K M P W F K G W A I E R K
 gatgggaacgccagcgggaagactctctttgaagcgtggactccatcctggagccagag
D G N A S G K T L F E A L D S I L E P E
 aggcccaaccacaaacctctccgcctccctctgcaggacgtctacaagatcggcgggtatt
 R P N H K P L R L P L Q D V Y K I G G I
 ggcacagttccagtgggccgtgtggagactggcaccctgaaaccgggtatgggtcatctgc
G T V P V G R V E T G T L K P G M V I C
 tttgcccccggtaacatctccactgaggtcaagtcgggtggagatgcaccacgagtccttg
F A P G N I S T E V K S V E M H H E S L
 caggaggccattcctggggacaacgtcggcttcaacatcaagaacgtctccgtcaaggag
Q E A I P G D N V G F N I K N V S V K E
 atcaagcgaaggctacgtcgcaggagactccaagaacgaccgcgagatgtgcaaaatcc
I K R G Y V A G D S K N D P P R C A K S
 ttcaaggctcaggtcattgtgatgaaccaccctggccagatccacgcgggtactgtcca
F K A Q V I V M N H P G Q I H A G Y C P
 gtgctggactgccacaccgccacatcgctgcaagtttgccgagcttgtggagaagctt
V L D C H T A H I A C K F A E L V E K L
 gaccgtcgggtctggcaagaagctggaggatggtcccaagtttgtcaagagcggatgatgcc
D R R S G K K L E D G P K F V K S G D A
 tgcacgctcagctggtgcctccaagcagatgtgctggagtccttccaggagtaccag
C I A Q L V P S K Q M C V E S F Q E Y Q
 cactgggcccgtttgccgtgcgcgacatgaagcagaccgtcgcctggtggcgtgggtcaag
P L G R F A V R D M K Q T V A V G V V K
 tccgtggagaaggccgagactggaggaggcaagatgaccaagtctgctgtcaaggccggc

S V E K A E T G G G K M T K S A V K A G
 aagaagaaa tgaatggcattctgtagcccaaggcccacacaagcactcgccactaccacca
 K K K -
 ctctccaactgggtccgccttccctttatcaaccctctcaaggagatcgcaccgaggtctc
 cgtctgccaatgcttcttgaaaagatgaaaaccagagaatacgtaggttgctgggtgtag
 gcatcaccatgacacctgcaaaacaactcaagctaataactcttcacttgccactcctag
 acaagatgtagttaggcttactagcatctgtttctcccatggacactatcacaacaaatt
 aaagtcatgattttacatctgtggtgcatcatgaaaagaaaagatgcatgatttcatcaggca
 taagcttgcacccgtccagtggaattgatgtgggtggtgttttatccttaattctcatgc
 ttacgcttggtttttattcttgacgtgacagaatcgtgcacgcaaaacttgatgtagttg
 aagcaaccaaagcacaatacactacacagagaaaaagttcttgaaagcaaactagttcat
 catattcattgtggacttgcttctttttgggtgaacaaatgtactcacatctatttaattt
 gtatgtaaataaaaaagtgcatgccttggaataaatacatgtattccataactgtaca
 acatcgtctgggtgttcaatgcttattctacaatggttgtgcagatggaagaggaataactgt
 aatcgtggttacttttactgtattttcaatttttcgcaaatgctcctaaatccgcaaaaacta
 aaacaacatttcaatgattgttctttcctttggtgcaagcatacaat

Figura 2.33. Secuencia para el gen EF1- α 1 en la especie *A. dufresnii*. Con minúsculas se indica la secuencia nucleotídica, y sobre ésta se indica el ORF en negro y los dos pares de partidores Fw1 y Rv1 con amarillo y Fw2 y Rv2 con celeste. Con letras mayúsculas se indica la secuencia aminoacídica completa y sobre ésta con color se delimitan los dominios característicos de la proteína EF-Tu1 (rojo), EF-Tu2 (fucsia) y EF-Tu3 (naranja), obtenidos utilizando PROSITE.

Anexo capítulo 3

Fijación para Inmunocitoquímica

Embriones y larvas de *A. dufresnii* se fijaron a los 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, y 14 dpf.

Dado a que en estos organismos algunos de los epítopes resultaron muy sensibles a la fijación tradicional, se practicaron diversas técnicas y se eligió una fijación suave con la que se obtuvieron buenos resultados. La misma se describe a continuación:

1. Colocar a los organismos con su medio acuoso en un filtro de aproximadamente 50µm, y eliminar la mayor parte del líquido.
2. Fijar los organismos en solución de Paraformaldehído (PFA) frío al 4%. Esta solución puede prepararse con hasta un mes de anticipación y mantenerse a -20°C. Una vez descongelada debe utilizarse o mantenerse a 4°C hasta por una semana.
3. Descartar el PFA y deshidratar el tejido con una solución de Etanol/PBS en concentraciones crecientes:
 - a. Etanol 30% 5 minutos
 - b. Etanol 50% 5 minutos
 - c. Etanol 70% 5 minutos
4. Almacenar a -20°C por hasta 2 meses.

Protocolo de Inmunocitoquímica

- | | |
|---|------------|
| 1. Etanol 70% | 5 minutos |
| 2. Etanol 50% | 5 minutos |
| 3. Etanol 30% | 5 minutos |
| 4. PBS + 0.1% Tween-20 | 10 minutos |
| 5. PBS + 0.1% Tween-20 | 10 minutos |
| 6. PBS + 0.1% Tween-20 | 10 minutos |
| 7. Anticuerpo primario en PBS + 0.1% Tween-20 + 2.5% Suero de Burro | 24hs a 4°C |
| 8. PBS + 0.1% Tween-20 | 10 minutos |
| 9. PBS + 0.1% Tween-20 | 10 minutos |

- | | |
|--|-----------------------------|
| 10. PBS + 0.1% Tween-20 | 10 minutos |
| 11. Anticuerpo secundario en PBS + 0.1% Tween-20 + 2.5% Suero de Burro | 3 hs a temperatura ambiente |
| 12. PBS + 0.1% Tween-20 | 10 minutos |
| 13. PBS + 0.1% Tween-20 | 10 minutos |
| 14. PBS + 0.1% Tween-20 | 10 minutos |
| 15. Hoescht | 10 minutos |
| 16. PBS + 0.1% Tween-20 | 5 minutos |
| 17. PBS + 0.1% Tween-20 | 5 minutos |
| 18. PBS + 0.1% Tween-20 | 5 minutos |
| 19. PBS + 0.1% Tween-20 | 5 minutos |
| 20. Montar con fluoromount antifading sobre portaobjetos silanizados y dejar secar por 24hs. | |

Hoescht (bis Bensimide)

Solución stock: 5, 6 mg/10ml H₂O bidestilada, conservado a -20°C.

Solución de trabajo: 1µl de solución stock en 5000µl de PBS.

Preparación de 1 litro de PBS 10X (solución madre)

1. Pesar las sales y colocarlas en un recipiente

NaCl	80.6g
KCl	2.2g
Na ₂ HPO ₄	11.5g
KH ₂ PO ₄	2.0g
2. Añadir 800ml de dH₂O y mezclar con agitador magnético hasta diluir las sales.
3. Ajustar a pH 7,4 añadiendo pequeñas alícuotas de HCl 1M y NaOH 10M.
4. Llevar a volumen final con dH₂O.
5. Almacenar a 4°C.
6. Solución de uso PBS 1X: Diluir una parte de PBS 10X en 9 partes de dH₂O.

Preparación de Paraformaldehído 4%

1. Calentar 80 ml de agua destilada a 50-55°C.
2. Agregar 4g de Paraformaldehído
3. Mezclar con agitador magnético durante 30-60 minutos hasta que la solución se vuelva cristalina. Mantener la temperatura entre 50-55°C, de ser necesario agregar 1 o 2 lentejas de NaOH para solubilizar el Paraformaldehído.
4. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
5. Ajustar a pH 7,4
6. Agregar 10ml de PBS 10x
7. Llevar a volumen de 100 ml con agua destilada.
8. Fraccionar y mantener a -20°C hasta un mes o a 4°C por una semana.

Método de preparado de portaobjetos

Solución para Silanizar

480ml de Acetona + 20ml de Silane (3-aminopropil-trietoxilane).

1. Colocar los portaobjetos en 1N HCl por 24hs y luego enjuagarlos varias veces con agua destilada.
2. Colocar los vidrios 30 minutos sumergidos en la solución para silanizar.
3. Enjuagar 3 veces con agua desmineralizada.
4. Dejar secar a temperatura ambiente.
5. Se puede utilizar la solución mientras se mantenga transparente. Una vez oxidada se vuelve color ámbar y se debe descartar.