

Effect of stress on the ecophysiological response of the sand dollar *Dendraster excentricus* from northwestern Mexico

Efecto del estrés en la respuesta ecofisiológica de la galleta de mar *Dendraster excentricus* en el noroeste de México

Tatiana Olivares-Bañuelos, Salvador Figueroa-Flores, Eugenio Carpizo-Ituarte*

Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad Autónoma de Baja California,
Carretera Transpeninsular Ensenada-Tijuana No. 3917, Fraccionamiento Playitas,
Ensenada CP 22860, Baja California, México.

* Corresponding author. E-mail: ecarpizo@uabc.edu.mx, ecarpizo@gmail.com

ABSTRACT. In the Mexican Pacific, *Dendraster excentricus*, a common estuarine echinoderm, is subject to daily environmental variations in tidal fluxes. Little is known about its ecophysiological response when individuals are exposed to temperature and oxygen changes. This study evaluates their thermal stress response under normal and reduced oxygen conditions using the RNA/DNA ratio and *hsp70* gene expression. We exposed sand dollars to different temperature and oxygen conditions. Three experimental temperatures were similar to the ones that organisms experience during one annual cycle and two were considered extreme. Reduced oxygen conditions were considered when levels dropped below 4 mg L⁻¹. To estimate variations in the stress-induced RNA/DNA ratio, we determined the value for males and females during a daily cycle. We also analyzed the *hsp70* expression. Under stress conditions, a significant decrease was observed in the RNA/DNA ratios. The lowest values were detected after 6 h under normoxic conditions and high temperatures seemed to induce a major effect on the RNA/DNA ratios during the first hour of stress. Analysis of the *hsp70* expression showed significant differences. According to our results, thermal and reduced oxygen stress induces a reduction in the general metabolism of the organisms. These metabolic changes were observed by the decrease in the RNA/DNA ratios and expression levels of *hsp70* (at high temperatures). We conclude that RNA/DNA ratios are a useful ecophysiological tool to evaluate the effect of particular stressors on the physiology of *D. excentricus*, and seem to be more sensitive to oxygen levels than to thermal stress, in contrast to the *hsp70* expression, which was more sensitive to extreme temperatures.

Key words: stress, reduced oxygen, molecular markers, RNA/DNA, *hsp70* gene.

RESUMEN. En el Pacífico mexicano, *Dendraster excentricus* es un equinodermo común en estuarios y está sujeto a variaciones ambientales por el flujo de marea. Poco se conoce de su respuesta ecofisiológica cuando es expuesta a cambios de temperatura y oxígeno. Este estudio evalúa su respuesta al estrés térmico en condiciones normales y de oxígeno reducido, utilizando como indicadores el índice de ARN/ADN y la expresión del gen *hsp70*. Se expusieron las galletas de mar a diferentes temperaturas y niveles de oxígeno. Tres de las temperaturas experimentales fueron comunes a las que los organismos experimentan durante un ciclo anual y dos de ellas se consideran extremas. Se consideraron condiciones de oxígeno reducido en niveles por debajo de 4 mg L⁻¹. Para estimar las variaciones inducidas por estrés en el índice de ARN/ADN, determinamos su valor en machos y hembras durante un ciclo diario. Además, analizamos la expresión del gen *hsp70*. En condiciones de estrés, se observó un decremento significativo en los índices de ARN/ADN. Los valores más bajos se detectaron después de 6 h en condiciones normales de oxígeno y las temperaturas altas parecieron inducir un mayor efecto en los índices durante la primera hora de estrés. El análisis de la expresión de *hsp70* mostró diferencias significativas. Según nuestros resultados, el estrés térmico y por oxígeno induce una reducción general del metabolismo de los organismos. Estos cambios metabólicos se observaron en el decremento de los índices de ARN/ADN y en los niveles de la expresión de *hsp70* (a altas temperaturas). Se concluye que los índices de ARN/ADN son una herramienta útil para entender la respuesta ecofisiológica en *D. excentricus* y parecen más sensibles a los niveles de oxígeno que al estrés térmico, en contraste con la expresión de *hsp70* que resultó más sensible a las temperaturas extremas.

Palabras clave: estrés, oxígeno reducido, marcadores moleculares, ARN/ADN, gen *hsp70*.

INTRODUCTION

Estuarine organisms are constantly exposed to changes in salinity, pH, temperature, and dissolved oxygen over the tidal cycle. To survive in these conditions, plants and animals must be able to respond quickly to these drastic changes in environmental factors. Temperature and dissolved oxygen are two important factors that define the adaptation of species to these unique environmental conditions. Estuaries are likely to

INTRODUCCIÓN

Los organismos estuarinos están constantemente expuestos a cambios de salinidad, pH, temperatura y oxígeno disuelto durante un ciclo mareal. Para sobrevivir en estas condiciones, las plantas y los animales deben ser capaces de responder rápidamente a estos cambios drásticos en los factores ambientales. La temperatura y el oxígeno disuelto son dos factores importantes que definen la adaptación de las

be influenced by many aspects of climate change (Boesch *et al.* 2000) and the amount of dissolved oxygen in an estuary is probably one of the major factors determining the type and abundance of organisms that can live there. Temperature fluctuation, on the other hand, is one of the main drivers of species distribution (Bianchi and Allison 2009). Several reports indicate that thermal tolerance differs among species depending on the range of temperature in their habitat, and according to Peck and Conway (2000), tolerance windows are wider in tropical and temperate species than in polar stenotherms.

The common sand dollar *Dendraster excentricus* (Eschscholtz 1831) inhabits the tidal flats of coastal lagoons and the shallow subtidal zone along the west coast of the United States and the peninsula of Baja California (Mexico). It is abundant and mature individuals are found all year round at Punta Banda Estuary (Olivares-Bañuelos *et al.* 2012). This ectothermic species is adapted to and depends on the maintenance of the characteristic temperature window of their natural environment (Pörtner 2002), and it is capable of tolerating the brackish waters of estuaries by adapting its behavior. Although sand dollars are exposed to a continuous exchange of water in their habitat, much of the time (including low tide cycles) they are partially buried and their spines cannot continually wave back and forth to get regular amounts of dissolved oxygen (Lane and Lawrence 1979). Moreover, it has been shown that starvation and lack of oxygen causes, in some sand dollar species, modifications in their metabolism due to the physical conditions and the physiological state of the organism (Lane and Lawrence 1979).

Temperature and hypoxia have been well documented as metabolic stressors in many habitats and species. Nevertheless, little is known about the effects of these stressors on sand dollars inhabiting estuaries on the Pacific coast of northern Mexico. The goal of this study was to test the response of *D. excentricus* to a range of temperatures and low oxygen levels using the RNA/DNA ratio and *hsp70* gene expression as molecular markers of its ecophysiological response. The *hsp70* gene encodes a stress-inducible protein that serves as molecular chaperone for the activity of key regulatory proteins, cell proliferation, stress resistance, and apoptosis (Palotai *et al.* 2008, Gupta *et al.* 2010). The highly conserved *hsp70* protein is present at low levels in many cells and is highly induced by stress, regardless of the stage of the cell cycle (Hang and Fox 1996).

Nucleic acid determination in marine organisms has attracted special attention because of the relationship between the RNA/DNA ratios and growth rate of a variety of marine organisms, including phytoplankton, bacteria, invertebrates, and fish (Dell'Anno *et al.* 1998). The amount of RNA in a cell varies in proportion to protein synthesis, whereas DNA concentrations remain fairly constant, even during starvation. Thus, RNA/DNA is an indicator of the protein-synthesizing potential of a cell (Henshaw *et al.* 1971). The RNA/DNA ratio was first proposed 38 years ago

especies a estas condiciones ambientales únicas. Es probable que los esteros resulten afectados por varios aspectos del cambio climático (Boesch *et al.* 2000), y la cantidad de oxígeno disuelto en un estero es uno de los principales factores que determina el tipo y la abundancia de organismos que pueden vivir ahí. La fluctuación de temperatura, por otro lado, es uno de los principales factores que determina la distribución de especies (Bianchi y Allison 2009). Varios estudios indican que la tolerancia térmica difiere entre especies según el intervalo de temperatura en sus hábitats, y Peck y Conway (2000) mencionan que la ventana de tolerancia es mayor en las especies tropicales y templadas que en los organismos estenotermos polares.

La galleta de mar *Dendraster excentricus* (Eschscholtz 1831) habita la zona submareal somera y la zona intermareal de lagunas costeras a lo largo de la costa occidental de los Estados Unidos y la península de Baja California (México). En el estero de Punta Banda, esta especie es abundante y se encuentran individuos maduros durante todo el año (Olivares-Bañuelos *et al.* 2012). Esta especie ectotérmica se adapta a y depende de que se mantenga el intervalo de temperatura característico de su ambiente natural (Pörtner 2002), y ha podido adaptar su comportamiento para tolerar aguas salobres. Aunque las galletas de mar están sujetas a un intercambio de agua continuo en su hábitat, durante gran parte del tiempo (inclusive durante la marea baja) se encuentran parcialmente enterradas y sus espinas no pueden ondear continuamente para obtener cantidades regulares de oxígeno disuelto (Lane y Lawrence 1979). Además, se ha mostrado que, en algunas especies de galleta de mar, la inanición y falta de oxígeno provocan modificaciones en su metabolismo debido a las condiciones físicas y al estado fisiológico del organismo (Lane y Lawrence 1979).

A pesar de que ha sido bien documentado que la temperatura y la hipoxia actúan como estresores metabólicos en muchos hábitats y varias especies, poco se sabe de los efectos de estos estresores en las galletas de mar que habitan en la costa del Pacífico del norte de México. El objetivo de este trabajo fue determinar la respuesta de *D. excentricus* a un intervalo de temperaturas y niveles bajos de oxígeno usando el índice de ARN/ADN y la expresión del gen *hsp70* como marcadores moleculares de su respuesta ecofisiológica. El gen *hsp70* codifica una proteína inducible por estrés que funciona como chaperón molecular de la actividad de las proteínas reguladoras clave, la proliferación celular, resistencia al estrés y apoptosis (Palotai *et al.* 2008, Gupta *et al.* 2010). La proteína *hsp70* se encuentra en niveles bajos en muchas células y es altamente inducible por estrés, independientemente de la fase del ciclo celular (Hang y Fox 1996).

La detección de ácidos nucleicos en organismos marinos ha atraído particular interés debido a la relación entre el índice de ARN/ADN y la tasa de crecimiento de varios organismos marinos, incluyendo fitoplancton, bacterias, invertebrados y peces (Dell'Anno *et al.* 1998). La cantidad de ARN en una célula varía en función de la síntesis de proteínas,

as a biochemical indicator of the physiological and nutritional state. It has been used to explore the stress response in different taxa and has been applied successfully as an indicator of nutritional condition and growth in marine organisms (Chícharo and Chícharo 2008). This metabolic parameter has been used to study the toxic effects of pharmaceutical products (Li *et al.* 2010), pyrethroid insecticides (Kumar *et al.* 2008), and metal mining (Driedger *et al.* 2009) on the growth of exposed fishes. The RNA/DNA ratio has also been analyzed in mussels to assess the biological effects of environmental pollution in areas with anthropogenic impact (Revankar and Shyama 2009, Tsangaris *et al.* 2010).

In the present study we determine the RNA/DNA ratio and the *hsp70* expression of *D. excentricus* after thermal stress treatments under both normal and reduced oxygen conditions. These results could be of interest to gain a better understanding of how organisms in estuaries would respond to different temperature and oxygen regimes under the present ocean change scenario.

MATERIALS AND METHODS

Sampling and maintenance of organisms

Adult sand dollars (*D. excentricus*) were collected from Punta Banda Estuary in Baja California, Mexico. The estuary is located along the southeastern margin of Todos Santos Bay (31°42'–31°47' N, 116°37'–116°39' W). Organisms were collected during low tide and transported in buckets containing seawater to the laboratory. Air and water temperatures and dissolved oxygen were recorded at the sampling site. Sand dollars were kept in aquaria at around 20 °C, provided with aeration, running seawater, and a 5-cm bed of sand from the estuary on the bottom of the aquaria. Organisms were exposed daily to a 12/12 h (light/dark) photoperiod and remained in the aquaria for 48 h, until used in the experiments. The mean wet weight of the 150 sand dollars used was 22.30 ± 0.61 g, and their mean size was 6.50 ± 0.06 cm ($P = 0.6612$). No significant differences were observed in the size of the experimental sand dollars used for the different experiments or treatments.

Experimental procedure

At the beginning of each experiment, organisms were weighed and measured across their widest side with a caliper. A first experiment was performed to establish the basal value of the RNA/DNA ratio of adult sand dollars and determine the variation of this ratio in a 48-h period during two daily cycles. Twenty organisms were randomly selected and labeled; they were placed in plastic containers (four per container) with aeration and 3 cm of sand from the estuary. The plastic containers were filled with 1.5 L of UV-treated, filtered seawater at 20 °C. Sand dollars remained there for 48 h (initiating between 9:00 and 10:00 AM). Tissue samples

mientras que las concentraciones de ADN permanecen relativamente constantes, incluso durante la inanición. Así, la relación ARN/ADN es un indicador del potencial de una célula de sintetizar las proteínas (Henshaw *et al.* 1971). El índice de ARN/ADN fue propuesto hace 38 años como un indicador bioquímico del estado fisiológico y nutricional. Se ha usado para investigar la respuesta del estrés en diferentes taxones y se ha aplicado con éxito como un indicador del estado nutricional y el crecimiento de organismos marinos (Chícharo y Chícharo 2008). Este parámetro metabólico ha sido utilizado para estudiar los efectos tóxicos de productos farmacéuticos (Li *et al.* 2010), insecticidas piretroides (Kumar *et al.* 2008) y la minería de metales (Driedger *et al.* 2009) en el crecimiento de peces expuestos. La relación ARN/ADN también ha sido analizada para evaluar los efectos biológicos de la contaminación ambiental en áreas que han sido impactadas antropogénicamente (Revankar y Shyama 2009, Tsangaris *et al.* 2010).

En el presente trabajo se determina el índice de ARN/ADN y la expresión de *hsp70* de *D. excentricus* después de tratamientos de estrés térmico en condiciones normales y de oxígeno reducido. Los resultados permitirán un mejor entendimiento de la respuesta de los organismos que habitan en los esteros a diferentes regímenes de temperatura y oxígeno en el actual escenario de cambio climático.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo y mantenimiento de los organismos

Se recolectaron organismos adultos de *D. excentricus* en el estero de Punta Banda en Baja California, México. El estero se ubica en el margen sudoriental de la bahía de Todos Santos (31°42'–31°47' N, 116°37'–116°39' W). Los organismos fueron recolectados durante la marea baja y transportados en cubetas con agua de mar al laboratorio. En el sitio de muestreo, se registraron el oxígeno disuelto y la temperatura del aire y del agua. Las galletas de mar se colocaron en acuarios y se mantuvieron a una temperatura de ~20 °C, con aireación y flujo constante de agua de mar. En el fondo de los acuarios se colocó una capa de 5 cm de arena del estero. Los organismos fueron expuestos a un fotoperiodo de 12/12 h (luz/oscuridad) y permanecieron en los acuarios durante 48 h, hasta ser usados en los experimentos. El peso fresco promedio de las 150 galletas de mar utilizadas fue 22.30 ± 0.61 g y su tamaño promedio fue 6.50 ± 0.06 cm ($P = 0.6612$). No se observaron diferencias significativas en el tamaño de los organismos experimentales empleados en los distintos experimentos o tratamientos.

Procedimiento experimental

Al principio de cada experimento, los organismos fueron pesados y medidos por su parte más ancha con un calibrador vernier. Se realizó un primer experimento para establecer el

were taken from the aboral spines of each sand dollar at the beginning of the experiment (time zero). Previous extractions from spines of the sand dollar aboral region proved to be suitable to obtain high-quality nucleic acids with TRIzol reagent. After time zero, consecutive tissue samples were taken at 6, 12, 24, 30, and 48 h. All samples were processed with TRIzol reagent as described below. At the end of the experiment, sand dollars were sexed and we recorded 10 males and 10 females. Sex was determined based on the gametes released after spawning was induced by injecting 0.5 mL of a 0.53 M solution of KCl through the peristomial membrane of each individual (see Hinegardner 1969, Carpizo-Ituarte *et al.* 2002). Once the gametes were obtained, sand dollars were returned to the aquaria to allow them to recover from stress.

In a second experiment, we tested thermal response using 75 organisms under normoxic conditions. We used 15 organisms distributed in five temperature treatments, and we replicated each treatment five times. Water oxygenation was provided by continuous aeration. Dissolved oxygen levels varied between 8.68 and 4.99 mg L⁻¹, depending on the experimental temperature of each group.

In a third experiment, we exposed 75 sand dollars to thermal stress and reduced oxygen levels, and each treatment was replicated five times. In this experiment, no aeration was provided. The effect of reduced oxygen was considered when levels fell below 4 mg L⁻¹ (dissolved oxygen was 3.65 to 2.03 mg L⁻¹) as a consequence of leaving the experimental organisms without air flux.

In both the second and third experiments, sand dollars were exposed to four stressing temperatures (4, 13, 26, and 29 °C), and 20 °C was used as the control temperature. The temperatures tested were selected based on the records for Punta Banda Estuary which indicate that the annual temperature range is 14 to 25 °C (López-Rasgado and Herzka 2009): 13 °C, just one degree below the minimum reported, was selected as a low temperature; 26 °C is one degree higher than the maximum reported in the area; and 4 and 29 °C were selected as two extreme temperatures that are possibly never experienced by the organisms in their natural habitat. Temperatures for all treatments, including the control, were set using a heater (Titanium Tube, Axis Inc.) submerged in each plastic container. Three sand dollars per treatment were introduced into plastic containers containing 3 cm of sand from the estuary and 1.5 L of filtered seawater, and the heater was turned on; time zero was considered once each container reached the desired temperature. After 1, 3, and 6 h of stress treatment, aboral spine samples of each organism were cut off and processed individually. Temperature and dissolved oxygen were recorded at each time. Once the experiments concluded, organisms were returned to Punta Banda Estuary.

Nucleic acid extraction

Total DNA and RNA were extracted using TRIzol reagent following the manufacturer's instructions

valor basal del índice de ARN/ADN de las galletas de mar adultas y determinar la variación de este índice. Veinte organismos fueron seleccionados al azar y etiquetados, y se colocaron en contenedores de plástico (cuatro por contenedor) con aireación y 3 cm de arena del estero. Los contenedores se llenaron con 1.5 L de agua de mar tratada con UV y filtrada a 20 °C. Los organismos permanecieron ahí durante 48 h (iniciando entre 9:00 y 10:00 AM). Se tomaron muestras de tejido de las espinas aborales al principio del experimento (tiempo cero). Extracciones anteriores de las espinas de la región aboral de galletas de mar resultaron ser adecuadas para obtener ácidos nucleicos de alta calidad con el reactivo TRIzol. Después del tiempo cero, se tomaron muestras consecutivas de tejido a las 6, 12, 24, 30 y 48 h. Todas las muestras fueron procesadas con el reactivo TRIzol como se describe más adelante. Al final del experimento, se determinó el sexo de los organismos y se registraron 10 machos y 10 hembras. El sexo se determinó a partir de los gametos liberados después de inducir al desove mediante la inyección de 0.5 mL de una solución de KCl 0.53 M a través de la membrana peristomial (ver Hinegardner 1969, Carpizo-Ituarte *et al.* 2002). Después de obtener los gametos, los organismos fueron regresados a los acuarios para permitirles recuperar del estrés.

En un segundo experimento, se investigó la respuesta térmica de 75 organismos en condiciones normóxicas. Se usaron 15 organismos en cinco tratamientos térmicos y cada tratamiento se replicó cinco veces. La oxigenación del agua se realizó mediante aireación constante. Los niveles de oxígeno disuelto variaron entre 8.68 y 4.99 mg L⁻¹, dependiendo de la temperatura experimental de cada tratamiento.

En un tercer experimento, se sometieron 75 galletas de mar a estrés térmico y niveles reducidos de oxígeno; cada tratamiento se replicó cinco veces. En este experimento no se proporcionó aireación. El efecto de oxígeno reducido se consideró cuando los niveles fueron inferiores a 4 mg L⁻¹ (oxígeno disuelto de 3.65 a 2.03 mg L⁻¹) como consecuencia de dejar los organismos experimentales sin flujo de aire.

Tanto en el segundo experimento como en el tercero, las galletas de mar fueron sometidas a cuatro temperaturas experimentales (4, 13, 26 y 29 °C), y se usó 20 °C como la temperatura control. Las temperaturas probadas fueron seleccionadas con base en registros para el estero de Punta Banda que indican que el intervalo de temperatura anual es de 14 a 25 °C (López-Rasgado y Herzka 2009): 13 °C, sólo un grado por debajo de la mínima registrada, se seleccionó como una temperatura baja; 26 °C es sólo un grado mayor que la máxima documentada para la zona; y 4 y 29 °C se seleccionaron como dos temperaturas extremas a las que probablemente nunca están expuestas los organismos en su hábitat natural. La temperatura en todos los tratamientos se controló mediante un calentador (Titanium Tube, Axis Inc.) sumergido en cada contenedor de plástico. Se colocaron tres galletas de mar por tratamiento dentro de los contenedores de plástico provistos de 3 cm de arena del estero y 1.5 L de agua

(Invitrogen, Carlsbad, CA). Tissue homogenization was performed on ice with the aid of a Teflon rod. Following extractions, absorbances at 260 and 280 nm were measured using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Biolab, Mulgrave, VIC, Australia) to determine the quality and quantity of nucleic acids; with the values obtained, RNA/DNA ratios were estimated. To verify that DNA was not lost with the TRIzol method, we precipitated the possible remaining DNA with 3M NaOAc and ethanol from the sub-products of the RNA extraction; precipitated samples were then quantified using the NanoDrop spectrophotometer. Our results showed that $98.45 \pm 0.228\%$ of genomic DNA was extracted with TRIzol reagent, meaning that we lost only $1.55 \pm 0.228\%$ of the total DNA with this extraction method. Given the advantage of obtaining nucleic acids (DNA and RNA) from the same tissue sample, we consider the TRIzol method to be an excellent option for extracting sufficient and good quality nucleic acids to calculate the RNA/DNA ratios.

Retro-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

RNA was extracted from the adult sand dollars using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) as described before, and used to synthesize the first complementary strand of DNA with SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA) and oligo-dT primer (Amersham, Piscataway, NJ) according to protocols supplied by the manufacturers. Briefly, in a total reaction volume of 20 μ L, 0.8 μ g of total RNA was added to 250 nM of oligo(dT)₂₀ and 10 mM of each dNTP; the mix was heated for 5 min at 65 °C and incubated 5 min on ice. After that, we added 1 $\times$ First-Strand Buffer, 10 U RNase Inhibitor, 50 mM DTT, and 200 U of SuperScript III reverse transcriptase. The reaction was then incubated at 50 °C for 60 min, followed by 15 min at 70 °C to inactivate the enzyme. Complementary DNA (cDNA) was amplified by PCR with oligonucleotide primers for the *hsp70* gene; primer sequence was kindly provided by Dr. Gretchen Hofmann (Marine Science Institute, University of California Santa Barbara) to amplify a 89 bp fragment: forward, 5'-AAGATATGAGGTCCAACCCAAGAT-3'; reverse, 5'-TGTC AAGCAGTGCTTCAGCA-3'.

The PCR mixture contained sterile distilled water, 0.1 μ L cDNA, PCR buffer, 2.5 mM MgSO₄, 0.5 mM dNTP, 1.0 U *Tfi* DNA polymerase, and sense and antisense primers (2.0 and 0.8 μ M, respectively). PCR reactions were performed in a Swift MiniPro Thermal Cycler (Esco Global, Esco Technologies, PA). The following conditions were used for PCR: 35 cycles of denaturation at 94 °C for 20 s, annealing at 55 °C for 20 s, and extension at 72 °C for 20 s. In each experimental run, negative controls (without cDNA) were used. To each tube containing PCR product, 2 μ L of loading buffer were added. The products and the DNA ladder were loaded onto a 2.0% agarose gel placed in an electrophoresis tank containing Tris-Acetate-EDTA (TAE) buffer. Then electrophoresis was conducted at 75 V

de mar filtrada, y se prendió el calentador; el tiempo cero se refiere al momento que se alcanzó la temperatura deseada en cada contenedor. Después de 1, 3 y 6 h de tratamiento, se cortaron muestras de las espinas aborales de cada organismo que se procesaron individualmente, y se registraron la temperatura y el oxígeno disuelto. Al concluir los experimentos, los organismos fueron regresados al estero de Punta Banda.

Extracción de ácidos nucleicos

Se extrajeron ARN y ADN total con el reactivo TRIzol siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA). La homogenización del tejido se realizó sobre hielo con la ayuda de una varilla de teflón. Después de las extracciones, se midió la absorbancia a 260 y 280 nm con un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Biolab, Mulgrave, VIC, Australia) para determinar la calidad y cantidad de los ácidos nucleicos; con los valores obtenidos se estimaron los índices de ARN/ADN. Para verificar que no se perdió ADN con el método de TRIzol, se precipitó el posible ADN restante con NaOAc 3M y etanol de los subproductos de la extracción de ARN, y posteriormente se cuantificaron las muestras precipitadas con el espectrofotómetro NanoDrop. Según los resultados, se extrajo $98.45 \pm 0.228\%$ del ADN con el reactivo TRIzol, lo que indica que se perdió sólo $1.55 \pm 0.228\%$ del ADN total con este método de extracción. Dada la ventaja de obtener ácidos nucleicos (ADN y ARN) de la misma muestra de tejido, consideramos que el método de TRIzol es una excelente opción para extraer una cantidad suficiente de ácidos nucleicos de buena calidad para calcular los índices de ARN/ADN.

Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR por sus siglas en inglés)

Se extrajo ARN de las galletas de mar adultas con el reactivo TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) como se describe arriba, y se usó para sintetizar el primer filamento complementario de ADN mediante la transcriptasa reversa SuperScript III (Invitrogen, Carlsbad, CA) y el cebador oligo-dT (Amersham, Piscataway, NJ) siguiendo los protocolos proporcionados por los fabricantes. Brevemente, en un volumen de reacción total de 20 μ L, se añadió 0.8 μ g de ARN total a 250 nM de oligo(dT)₂₀ y 10 mM de cada dNTP; la mezcla se calentó durante 5 min a 65 °C y se incubó durante 5 min sobre hielo. Subsecuentemente, se adicionaron First-Strand Buffer (1 $\times$), 10 U del inhibidor de la RNasa, 50 mM de DTT y 200 U de la transcriptasa reversa SuperScript III. La reacción se incubó a 50 °C durante 60 min y luego a 70 °C durante 15 min para inactivar la enzima. Se amplificó el ADN complementario (ADNc) mediante PCR con cebadores oligonucleótidos para el gen *hsp70*; la secuencia del cebador fue amablemente proporcionada por la Dra. Gretchen Hofmann (Marine Science Institute, Universidad de California, Santa Barbara) para

for 45 min and bands were detected by using an imaging system (Benchtop UV Transilluminator, UVP, CA).

Densitometric quantification of bands

PCR product bands were photo-documented with a 8.1 megapixel Sony digital camera (Sony Corporation, Tokyo, Japan) and the average intensity of the bands was analyzed using ImageJ 1.44p software (National Institutes of Health, USA). Data were collected in terms of percentage intensity of *hsp70* in experimental treatments (4, 13, 26, and 29 °C) compared to the percentage intensity of *hsp70* in the control treatment (20 °C) to which a value of 100% of expression was assigned.

Statistical methods

All data were analyzed with the D'Agostino-Pearson (omnibus K2 test) normality test. After each experiment, RNA/DNA ratios and *hsp70* data were analyzed by a non-parametric Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparison test (95% confidence intervals). Analyses were carried out using GraphPad Prism v5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). In figure 1, data are expressed as mean values ($\pm$ SEM) of 10 individuals; for the rest of the figures, data are expressed as mean values of five replicate treatments ($n = 5$).

RESULTS

The daily variation of the RNA/DNA ratios between adult male and female *D. excentricus* showed no statistical differences (Dunn's multiple comparison test, $\alpha = 0.05$) for a period of two days (fig. 1); however, a decrease in the values was observed for the first 24 h in the female ratio. The mean RNA/DNA ratio ($\pm$ SEM) at the beginning of the experiment (hour zero) was 1.603 ± 0.183 for females and 1.353 ± 0.068 for males. Subsequent sampling and analysis of sand dollar nucleic acids showed no significant variations in these ratios after 6 h (females = 1.667 ± 0.295 ; males = 1.447 ± 0.213), 12 h (females = 1.221 ± 0.173 ; males = 1.451 ± 0.221), 24 h (females = 1.011 ± 0.126 ; males = 1.403 ± 0.091), 30 h (females = 1.345 ± 0.175 ; males = 1.063 ± 0.027), or 48 h (females = 1.605 ± 0.306 ; males = 1.563 ± 0.202).

Once we knew the daily variation of the RNA/DNA ratios under laboratory conditions, we tested the thermal stress response of *D. excentricus* under either normoxic or reduced oxygen conditions. Mean values of the RNA/DNA ratios obtained in these experiments were lower compared with the ones obtained during the daily cycle (fig. 2). After 1 h of thermal stress under normoxic conditions, significant differences were observed at 26 °C versus the control group at 20 °C ($P < 0.01$) (fig. 2a). Under reduced oxygen conditions at 4 °C, we also observed significant changes at this temperature versus the control group at 20 °C ($P < 0.01$) (fig. 2b).

amplificar un fragmento de 89 pb: hacia adelante, 5'-AAGATATGAGGTCCAACCCAAGAT-3'; hacia atrás, 5'-TGTC AAGCAGTGCTTCAGCA-3'.

La mezcla de PCR consistió de agua destilada estéril, 0.1 μ L de ADNc, tampón de PCR, 2.5 mM de $MgSO_4$, 0.5 mM de dNTP, 1.0 U de *Tfi* ADN polimerasa, y cebadores sentido y antisentido (2.0 y 0.8 μ M, respectivamente). Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador (Swift MiniPro Thermal Cyclor, Esco Global, Esco Technologies, PA). Las condiciones de amplificación fueron 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 20 s, hibridación a 55 °C durante 20 s y extensión a 72 °C durante 20 s. En cada corrida experimental se usaron controles negativos (sin ADNc). Se añadió 2 μ L de tampón de carga a cada tubo con producto de la PCR. Los productos y la escalera de ADN se cargaron en un gel de agarosa (2.0%) colocado en un tanque de electroforesis con tampón Tris-acetato-EDTA (TAE). La electroforesis se realizó a 75 V durante 45 min y las bandas se detectaron mediante un transiluminador (Benchtop UV Transilluminator, UVP, CA).

Cuantificación densitométrica de las bandas

Las bandas de los productos PCR fueron fotodocumentadas con una cámara digital Sony de 8.1 megapíxeles (Sony, Tokio, Japón) y la intensidad promedio de las bandas fue analizada con el programa ImageJ 1.44p (National Institutes of Health, EUA). Los datos fueron recogidos en términos del porcentaje de intensidad de *hsp70* en los tratamientos experimentales (4, 13, 26 y 29 °C) en comparación con el porcentaje de intensidad de *hsp70* en el tratamiento control (20 °C) que fue asignado un valor de 100% de expresión.

Métodos estadísticos

Todos los datos fueron analizados con la prueba de normalidad de D'Agostino-Pearson (omnibus K2). Después de cada experimento, se analizaron los índices de ARN/ADN y los datos de *hsp70* con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y la prueba de comparaciones múltiples de Dunn (intervalos de confianza de 95%). Los análisis se realizaron con el programa GraphPad Prism v5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). En la figura 1, los datos se expresan como valores medios ($\pm$ error estándar de la media) de 10 individuos. En las demás figuras, los datos se expresan como valores medios de cinco tratamientos replicados ($n = 5$).

RESULTADOS

La variación diaria de los índices de ARN/ADN entre machos y hembras adultas de *D. excentricus* no mostró diferencias estadísticas (prueba de comparaciones múltiples de Dunn, $\alpha = 0.05$) durante un periodo de dos días (fig. 1); sin embargo, en el índice de las hembras, se observó una disminución de los valores en las primeras 24 h. El índice medio

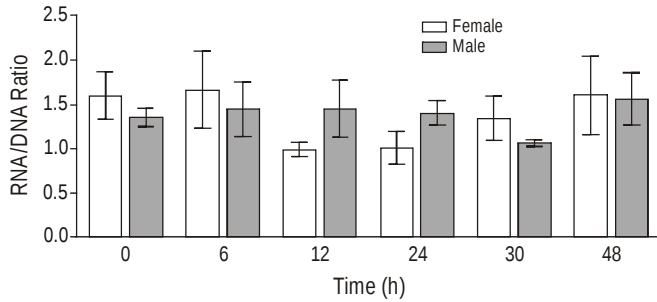


Figure 1. Daily variation in the RNA/DNA ratios for adult male and female *Dendraster excentricus* during a 48-h period. Sample size was 10 males and 10 females. The Kruskal-Wallis test together with Dunn's multiple comparison test (95% confidence interval) showed no significant differences between genders or the time at which the samples were taken (hour 0, 6, 12, 24, 30, and 48). Data shown represent the mean ($\pm$ SEM).

Figura 1. Variación diaria del índice de ARN/ADN para machos y hembras de *Dendraster excentricus* durante un periodo de 48 h. Se analizaron muestras de 10 machos adultos y 10 hembras adultas. La prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de comparaciones múltiples de Dunn (intervalo de confianza de 95%) no mostraron diferencias entre los géneros o la hora de muestreo (hora 0, 6, 12, 24, 30 y 48). Los datos representan la media $\pm$ error estándar de la media.

After 3 h of treatment, the RNA/DNA ratios showed values below 0.70 (fig. 2c–d). Significant differences were observed at 13 °C under reduced oxygen conditions versus the control group ($P < 0.05$) (fig. 2d).

After sand dollars were stressed for 6 h, we observed significant differences in the RNA/DNA ratios between temperature groups. Under normoxic conditions, differences between the control versus the 26 and 29 °C experimental treatments were detected ($P < 0.05$ for both) (fig. 2e). Under reduced oxygen conditions, no significant differences were observed between the thermo-stressed organisms and the control group at 20 °C, but considerable increases in the RNA/DNA ratio were detected at 13 and 26 °C compared with the control group at 20 °C.

Variations in the above RNA/DNA ratios indicate that *D. excentricus* responded to stressors to which it was exposed. To corroborate this observation, we analyzed the relative gene expression of *hsp70*, a well-documented gene involved in cellular primary response under stress conditions; *hsp70* mRNA levels in extracts of aboral spines obtained from stressed sand dollars were determined by semi-quantitative PCR. The standard error and standard deviation were consistently low, indicating that the reverse transcriptase and PCR components of the assay were highly reproducible. After 1 h of stress under normoxic conditions, the treatment at 4 °C showed a decrease in *hsp70* mRNA levels by $25 \pm 3.7\%$ ($P > 0.100$) compared with the control group at 20 °C (fig. 3a). Conversely, after the same exposure time under reduced oxygen conditions, the highest stressing temperature of 29 °C induced a significant *hsp70* mRNA increase of $27 \pm 5.09\%$ ($P = 0.013$) versus the control group

de ARN/ADN ($\pm$ error estándar de la media) al principio del experimento (hora cero) fue 1.603 ± 0.183 para las hembras y 1.353 ± 0.068 para los machos. En los análisis subsecuentes de los ácidos nucleicos de las galletas de mar no se observaron variaciones significativas en los índices después de 6 h (hembras = 1.667 ± 0.295 ; machos = 1.447 ± 0.213), 12 h (hembras = 1.221 ± 0.173 ; machos = 1.451 ± 0.221), 24 h (hembras = 1.011 ± 0.126 ; machos = 1.403 ± 0.091), 30 h (hembras = 1.345 ± 0.175 ; machos = 1.063 ± 0.027), y 48 h (hembras = 1.605 ± 0.306 ; machos = 1.563 ± 0.202).

Una vez conocida la variación diaria de los índices de ARN/ADN en condiciones de laboratorio, se investigó la respuesta al estrés térmico de *D. excentricus* en condiciones ya sea normóxicas o de oxígeno reducido. Los valores medios de los índices de ARN/ADN obtenidos en estos tratamientos fueron menores comparados con los obtenidos durante el ciclo diario (fig. 2). Después de 1 h de estrés térmico en condiciones normóxicas, se observaron diferencias significativas entre el tratamiento a 26 °C y el tratamiento control a 20 °C ($P < 0.01$) (fig. 2a). En condiciones de oxígeno reducido, también se observaron diferencias significativas entre el tratamiento a 4 °C y el tratamiento control a 20 °C ($P < 0.01$) (fig. 2b).

Después de 3 h de tratamiento, los índices de ARN/ADN mostraron valores inferiores a 0.70 (fig. 2c–d). En condiciones de oxígeno reducido, se observaron diferencias significativas entre el tratamiento a 13 °C y el tratamiento control ($P < 0.05$) (fig. 2d).

Después de 6 h, se observaron diferencias significativas entre los índices de ARN/ADN de los organismos expuestos a distintas condiciones de estrés térmico. En condiciones normóxicas, se observaron diferencias entre el tratamiento control a 20 °C y los tratamientos a 26 y 29 °C ($P < 0.05$ para ambos) (fig. 2e). En condiciones de oxígeno reducido, no se observaron diferencias entre los organismos expuestos a condiciones de estrés térmico y el grupo control, pero se observó un incremento considerable en el índice de ARN/ADN de los organismos expuestos a 13 y 26 °C en comparación con el grupo control.

Las variaciones en estos índices de ARN/ADN indican que *D. excentricus* respondió a las condiciones de estrés al que fue expuesta. Para corroborar esta observación, se analizó la expresión relativa del gen *hsp70*, un gen bien estudiado involucrado en la respuesta celular primaria al estrés. Los niveles de ARNm *hsp70* en los extractos de las espinas aborales obtenidas de los organismos estresados fueron determinados mediante PCR semicuantitativa. El error estándar y la desviación estándar fueron consistentemente bajos, lo que indica que la transcriptasa reversa y los componentes de la PCR fueron altamente reproducibles. Después de 1 h de estrés en condiciones normóxicas, el tratamiento a 4 °C mostró una disminución de $25 \pm 3.7\%$ ($P > 0.100$) en los niveles de ARNm *hsp70* en comparación con el tratamiento control a 20 °C (fig. 3a). Al contrario, después de 1 h de estrés en condiciones de oxígeno reducido, en el tratamiento a 29 °C

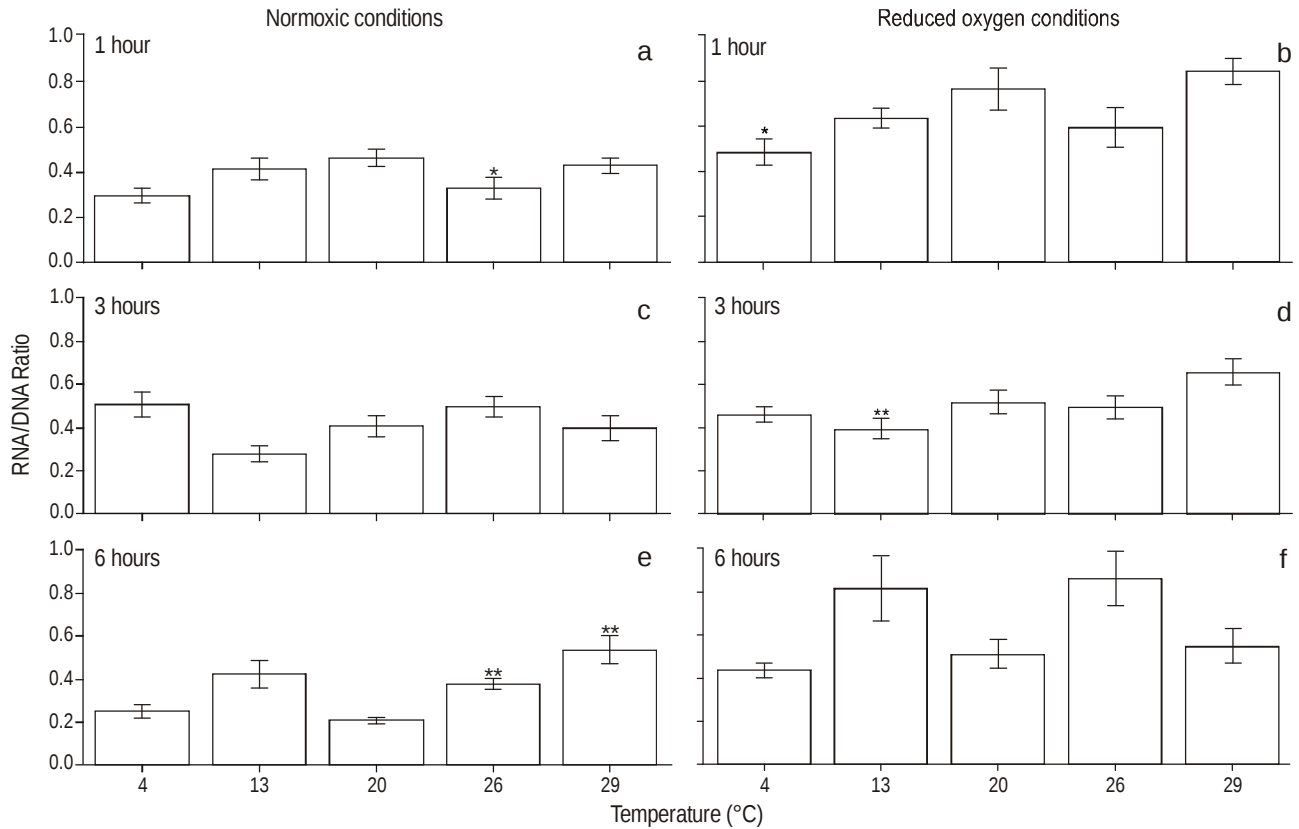


Figure 2. RNA/DNA ratios in stressed adult *Dendraster excentricus*. Sand dollars were stressed during 1, 3, or 6 h using four experimental temperatures (4, 13, 26, and 29 °C), under normoxic (a, c, e) or reduced oxygen (b, d, f) conditions. For each stress condition, the ratio of the control group (20 °C) was analyzed to compare the experimental treatments. Bars represent the mean of 15 individuals ($\pm$ SEM). Significant differences are shown above the bars and the asterisk indicates differences between the control and experimental temperatures under normoxic or reduced oxygen conditions independently: * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

Figura 2. Índices de ARN/ADN en adultos de *Dendraster excentricus* sometidos a estrés durante 1, 3 ó 6 h en cuatro temperaturas experimentales (4, 13, 26 y 29 °C), en condiciones normóxicas (a, c, e) o de oxígeno reducido (b, d, f). Para cada condición de estrés, se compararon los tratamientos experimentales con el tratamiento control (20 °C). Las barras representan la media de 15 individuos ($\pm$ error estándar de la media). Las diferencias significativas se muestran arriba de las barras y el asterisco indica las diferencias entre las temperaturas experimentales y la temperatura control en condiciones normóxicas o de oxígeno reducido independientemente: * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

(fig. 3b). When sand dollars were thermo-stressed for 3 h under normoxic conditions (fig. 3c), the low temperature of 4 °C stimulated *hsp70* mRNA levels by $12 \pm 2.371\%$ ($P > 0.100$), the same as in the 26 °C treatment, which increased by $35 \pm 12.98\%$ ($P > 0.100$) compared with the control treatment at 20 °C. At this time, no significant differences were observed under reduced oxygen conditions. Nevertheless, after 6 h of thermal stress, a single significant *hsp70* mRNA decrease of $15 \pm 3.63\%$ ($P > 0.100$) was detected when organisms were under reduced oxygen conditions at 29 °C (fig. 3f).

DISCUSSION

Our results showed specific changes as a result of temperature, oxygen levels, and time of exposure to stressors in both molecular markers evaluated (RNA/DNA ratios and *hsp70* mRNA levels).

(la mayor temperatura probada) se observó un aumento de $27 \pm 5.09\%$ ($P = 0.013$) en los niveles de ARNm *hsp70* en comparación con el tratamiento control (fig. 3b). Después de 3 h de estrés en condiciones normóxicas (fig. 3c), en los tratamientos a 4 °C (la temperatura más baja) y 26 °C los niveles de ARNm *hsp70* incrementaron $12 \pm 2.371\%$ ($P > 0.100$) y $35 \pm 12.98\%$ ($P > 0.100$), respectivamente, en comparación con el tratamiento control. En condiciones de oxígeno reducido, no se observaron diferencias significativas después de 3 h de tratamiento. Después de 6 h, sin embargo, en condiciones de oxígeno reducido, se observó sólo una disminución significativa de $15 \pm 3.63\%$ ($P > 0.100$) en los niveles de ARNm *hsp70* en el tratamiento a 29 °C (fig. 3f).

DISCUSIÓN

Nuestros resultados muestran cambios específicos relacionados con la temperatura, los niveles de oxígeno y el

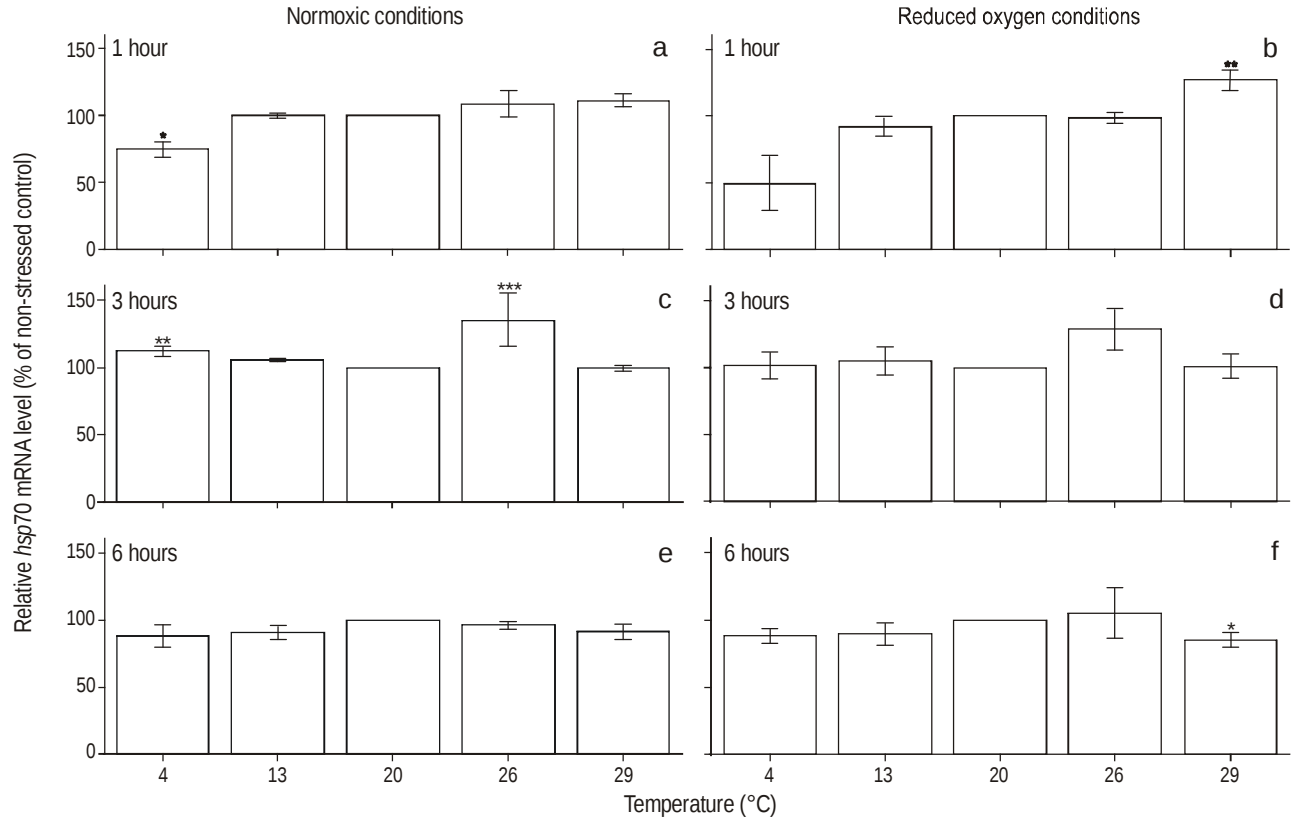


Figure 3. Relative *hsp70* gene expression in stressed adult *Dendraster excentricus*. Sand dollars were stressed during 1, 3, or 6 h using four experimental temperatures (4, 13, 26, and 29 °C), under normoxic (a, c, e) or reduced oxygen (b, d, f) conditions. Semi-quantitative PCR reactions, with specific *hsp70* primers, were done for all tested groups. Each condition signal was quantified by densitometry and expressed as a relative value to that of the control (20 °C), which was set at 100%. Bars represent the mean of five individual treatments (± SEM). Significant differences are shown above the bars and the asterisk indicates differences between the control and experimental temperatures under normoxic or reduced oxygen conditions independently: * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

Figura 3. Expresión relativa del gen *hsp70* en adultos de *Dendraster excentricus* sometidos a estrés durante 1, 3 ó 6 h en cuatro temperaturas experimentales (4, 13, 26 y 29 °C), en condiciones normóxicas (a, c, e) o de oxígeno reducido (b, d, f). Se realizaron reacciones semicuantitativas de PCR, con cebadores específicos de *hsp70*, para todos los tratamientos. Cada señal de condición fue cuantificada mediante densitometría y expresada como un valor relativo al del control (20 °C), que fue asignado un valor de 100%. Las barras representan la media de cinco tratamientos individuales (± error estándar de la media). Las diferencias significativas se muestran arriba de las barras y el asterisco indica las diferencias entre las temperaturas experimentales y la temperatura control en condiciones normóxicas o de oxígeno reducido independientemente: * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

For the daily cycle of the RNA/DNA ratios, we found ratios with values ranging from 1.011 to 1.667 (fig. 1). These values are similar to the ones that have been reported for several species of marine organisms, including echinoderms (see table 1).

As shown in our first experiment, the RNA/DNA ratios during the first 48 h are not related to either the gender or the time of the daily cycle; however, females were apparently more sensitive. Nevertheless, these results indicate that it is possible to indistinctly use either male or female sand dollars when working with RNA/DNA ratios as biomarkers of a stress response. Considering the results obtained during our first experiment with RNA/DNA ratios, we know that thermo-stressed sand dollars presented lower RNA/DNA ratios than the characteristic ratios observed in adult organisms during a daily cycle without stress.

tiempo de exposición a condiciones de estrés en ambos marcadores moleculares evaluados (índice de ARN/ADN y nivel de ARNm *hsp70*).

En el ciclo diario de los índices de ARN/ADN, los valores variaron de 1.011 a 1.667 (fig. 1). Estos valores son similares a los documentados para varias especies de organismos marinos, incluyendo los equinodermos (ver tabla 1).

El primer experimento mostró que, durante las primeras 48 h, los índices de ARN/ADN no se relacionan ni con el género ni con la hora del ciclo diario; sin embargo, aparentemente las hembras son más sensibles. Estos resultados indican que es posible usar indistintamente machos o hembras de *D. excentricus* cuando se usa el índice de ARN/ADN como biomarcador de una respuesta al estrés. En nuestro primer experimento con el índice de ARN/ADN, los organismos expuestos a estrés térmico presentaron menores índices de

Table 1. Values of the RNA/DNA ratios reported for several species of marine organisms, including the results obtained for the sand dollar *Dendraster excentricus* in the present work.**Tabla 1.** Valores de los índices de ARN/ADN documentados para varias especies de organismos marinos, incluyendo los resultados obtenidos para la galleta de mar *Dendraster excentricus* en el presente trabajo.

Marine sample	RNA/DNA value	Reference
Marine sediments	0.004–2.2	Dell’Anno <i>et al.</i> (1998)
Plaice larvae, <i>Pleuronectes platessa</i>	0.0644–3.5	Hovenkamp (1990)
Juvenile green turtles, <i>Chelonia mydas</i>	0.066–0.816	Roark <i>et al.</i> (2009)
Adult sand dollars, <i>Dendraster excentricus</i>	0.210–1.667	This study
Copepod, <i>Calanus finmarchicus</i>	0.252–5.33	Wagner <i>et al.</i> (1998)
Starved herring larvae, <i>Clupea harengus</i>	0.4–1.0	Folkvord <i>et al.</i> (1996)
Scleractinian corals	0.60–1.04	Meesters <i>et al.</i> (2002)
Sand lance, <i>Ammodytes americanus</i>	0.7–12.2	Buckley <i>et al.</i> (1984)
Starved bivalve postlarvae, <i>Ruditapes decussatus</i>	1.0–1.5	Chícharo and Chícharo (1995)
Individual whitefish larvae, <i>Coregonus</i> spp.	1.2–2.0	Steinhart and Eckmann (1992)
Individual fish larvae	1.28 ± 0.13	Clemmesen (1993)
Pooled fish larvae homogenate	1.34 ± 0.12	Clemmesen (1993)
Fish larvae, <i>Melanogrammus aeglefinus</i>	1.4–3.7	Caldarone (2005)
Starved crustaceans	1.5	Dahlhoff (2004)

We observed the lowest values of RNA/DNA ratios in the experiments where *D. excentricus* was thermo-stressed under normoxic conditions, regardless of the time of exposure. A significant decrease between the control treatment and the experimental low-temperature treatments was observed under reduced oxygen conditions after 1 h (46% decrease at 4 °C) and 3 h (24% decrease at 13 °C) of exposure. Similar results have been reported for other marine invertebrates from summer to winter, when temperatures drop (Marsh *et al.* 2001, Fraser *et al.* 2002). Particularly, in the Antarctic sea urchin *Sterechninus neumayeri* (Marsh *et al.* 2001) and the limpet *Nacella concinna* (Fraser *et al.* 2002), protein synthesis rates decreased by 52%, RNA concentrations decreased by 55% and RNA/protein ratios decreased by 68%, while RNA translational efficiencies were low and highly variable.

Interestingly, after only 6 h of stress under normoxic conditions, the RNA/DNA ratio values presented significant increases at 26 °C (80% increase) and 29 °C (155% increase) relative to the control group. Apparently, the RNA/DNA ratios are more sensitive to oxygen conditions than those prone to stress by temperature.

During low tide, sand dollars are exposed to extreme temperatures (higher or lower) in their natural habitat for about 3 h than those found during most of the day. It is possible that these temperature changes have been acting as a stress factor and that these organisms have adapted to these kinds of temperature changes. This adaptive response would explain the small differences among temperature treatments after 3 h of stress. Our results show that significant variations occurred after the first hour of stress (when the sand dollars have to respond to survive) or after a prolonged stress time (when the organisms are responding to extended periods of stress). It

ARN/ADN que los índices característicos de organismos adultos que no fueron sometidos a estrés durante un ciclo diario.

Se observaron los valores más bajos de la relación ARN/ADN en los experimentos donde *D. excentricus* fue expuesto a estrés térmico en condiciones normóxicas, independientemente del tiempo de exposición. En condiciones de oxígeno reducido, se observó una disminución significativa entre los tratamientos experimentales a bajas temperaturas y el tratamiento control después de 1 h (disminución de 46% a 4 °C) y 3 h (disminución de 24% a 13 °C) de exposición. Se han obtenido resultados similares para otros invertebrados marinos de verano a invierno, cuando baja la temperatura (Marsh *et al.* 2001, Fraser *et al.* 2002). En particular, en el erizo de mar *Sterechninus neumayeri* (Marsh *et al.* 2001) y la lapa *Nacella concinna* (Fraser *et al.* 2002), las tasas de síntesis de proteínas disminuyeron un 52%, las concentraciones de ARN disminuyeron un 55% y los valores de ARN/proteína disminuyeron un 68%, mientras que las eficiencias de traducción de ARN fueron bajas y muy variables.

Es interesante notar que en condiciones normóxicas, después de sólo 6 h de estrés, los índices de ARN/ADN incrementaron significativamente en los tratamientos a 26 °C (incremento de 80%) y 29 °C (incremento de 155%) en relación con el tratamiento control. Aparentemente, los índices de ARN/ADN son más sensibles a condiciones de oxígeno que a estrés térmico.

En su hábitat natural, durante la marea baja las galletas de mar están expuestas durante unas 3 h a temperaturas extremas (mayores o menores) que el resto del día. Es posible que estos cambios de temperatura han actuado como un factor de estrés y que estos organismos se han adaptado a estos

has been reported that under stressful conditions, like starvation or elevated temperatures, echinoderms and mollusks present a lower metabolism (Siikavuopio *et al.* 2008, Joyner-Matos *et al.* 2009). In *D. excentricus*, our results could indicate metabolic acclimatization because organisms were collected during the summer, when temperatures in Punta Banda Estuary vary from 18 to 25 °C, with a mean temperature of around 20 °C (López-Rasgado and Herzka 2009), but never reach the extreme temperatures tested here.

In addition to reports on the effect of stress on metabolic depression, other studies have documented specific overexpression of certain genes and proteins, related to the primary response to stress at a cellular level. An increase in the expression of specific mRNA stress chaperones in sea urchin (Matranga *et al.* 2002), oyster (Farcy *et al.* 2009), amphioxus (Liu *et al.* 2009), bivalves (Kim *et al.* 2009), and lobsters (Spees *et al.* 2002) has been reported. All cells respond to heat and other physiological stressors by the production of heat shock proteins (Hsps) that act as chaperone molecules, binding to and assisting the folding of other proteins (Browne *et al.* 2007). Our results, measuring the relative expression of *hsp70* mRNA by RT-PCR after 1, 3, and 6 h of continuous stress, corroborate that the levels of 70-kDa Hsps (Hsp70) change with physiological stress as mentioned by Lancaster and Febbraio (2005). We noticed a significant decrease in *hsp70* levels after 1 h of stress at 4 °C under normoxic conditions, as well as after 1 h at 4 °C and after 6 h at 29 °C under reduced oxygen conditions. Similar results have been reported in sea cucumbers, where a down-regulation of Hsp70 was observed during recovery after a sublethal heat shock (Dong *et al.* 2010). Moreover, significant increases in this stress response gene were detected after 1 and 3 h under normoxic and reduced oxygen conditions. Numerous studies have documented the presence of both the constitutive form and stress-inducible form of Hsp70 in echinoderms (Giudice *et al.* 1999), although the latter is not present under normal conditions and only appears after metabolic stress (Geraci *et al.* 2004). In *Drosophila*, a short heat treatment produced a strong induction of Hsps and a sharp reduction in synthesis of regular proteins (DiDomenico *et al.* 1982). An increase in antioxidant enzymes like superoxide dismutase has also been observed in the coral *Pocillopora verrucosa* (Rodríguez-Troncoso *et al.* 2013) and the red crab *Pleuroncodes planipes* (Martínez-Canto *et al.* 2013). This pattern can be maintained during the first 90 min of stress recovery, but with continued stress, synthesis of normal proteins gradually increases and synthesis of Hsps decreases (DiDomenico *et al.* 1982). It has also been reported that the half-life of Hsp70 of the sea cucumber is rather short (<3 days) (Dong *et al.* 2010), and that the stability of *hsp70* mRNA is dependent on the cellular state and temperature in chicken (Theodorakis *et al.* 1988). Heat shock has a marked effect on the stability of *hsp70* mRNA, and the half-life of this mRNA increases at least 10-fold upon stress generated by heat shock (Dong *et al.* 2010).

cambios de temperatura. Esta respuesta adaptativa explicaría las pequeñas diferencias entre los tratamientos después de 3 h de estrés térmico. Nuestros resultados muestran que se presentaron variaciones significativas después de la primera hora de estrés (cuando los organismos tienen que responder para sobrevivir) o después de un tiempo prolongado de estrés (cuando los organismos están respondiendo a periodos largos de estrés). Se ha documentado que en condiciones estresantes, como inanición y temperaturas elevadas, los equinodermos y moluscos presentan una tasa metabólica más baja (Siikavuopio *et al.* 2008, Joyner-Matos *et al.* 2009). Nuestros resultados para *D. excentricus* pueden indicar una aclimatación metabólica ya que los organismos fueron recolectados en el verano, cuando las temperaturas en el estero de Punta Banda varían de 18 a 25 °C, con una temperatura promedio de ~20 °C (López-Rasgado y Herzka 2009), pero nunca alcanzan las temperaturas extremas probadas aquí.

Además del efecto del estrés en la depresión metabólica, se ha documentado la sobreexpresión de ciertos genes y proteínas, relacionada con la respuesta primaria al estrés a nivel celular. Se ha observado un aumento de chaperones específicos de estrés de ARNm en erizos de mar (Matranga *et al.* 2002), ostiones (Farcy *et al.* 2009), anfioxos (Liu *et al.* 2009), bivalvos (Kim *et al.* 2009) y langostas (Spees *et al.* 2002). Todas las células responden al calor y otros agentes de estrés fisiológico mediante la producción de proteínas de choque térmico (Hsps) que actúan como chaperonas moleculares, uniéndose a y asistiendo en el plegamiento de otras proteínas (Browne *et al.* 2007). Nuestros resultados de la medición de la expresión relativa de ARNm *hsp70* mediante RT-PCR después de 1, 3 y 6 h de estrés continuo, corroboran que los niveles de las Hsps de 70 kDa (Hsp70) cambian con el estrés fisiológico, como lo mencionan Lancaster y Febbraio (2005). Se observó una disminución significativa en los niveles de *hsp70* después de 1 h de estrés a 4 °C en condiciones normóxicas, así como después de 1 h a 4 °C y después de 6 h a 29 °C en condiciones de oxígeno reducido. Se han obtenido resultados similares para pepinos de mar, observándose una regulación decreciente de las Hsp70 durante la recuperación después de un choque térmico subletal (Dong *et al.* 2010). Además, se observaron aumentos significativos de este gen después de 1 y 3 h en condiciones normóxicas y de oxígeno reducido. Varios trabajos han documentado la presencia de tanto la forma constitutiva como la forma inducible de Hsp70 en equinodermos (Giudice *et al.* 1999), aunque la segunda no está presente en condiciones normales y sólo aparece después de estrés metabólico (Geraci *et al.* 2004). En *Drosophila*, un tratamiento térmico corto resultó en una fuerte inducción de Hsps y una fuerte disminución de la síntesis de proteínas normales (DiDomenico *et al.* 1982). Asimismo, se ha observado un aumento de las enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa en el coral *Pocillopora verrucosa* (Rodríguez-Troncoso *et al.* 2013) y en la langostilla *Pleuroncodes planipes* (Martínez-Canto *et al.* 2013). Este patrón puede mantenerse durante los primeros

Stressed organisms are required to respond quickly to rapidly changing environmental conditions, particularly in estuarine environments. To do this, they decrease the synthesis of many cellular molecules to focus their production on chaperone proteins. It is possible that sand dollars, under extreme temperatures, focus their energy on producing chaperone molecules to cope with the stressful conditions; however, the reduction in their general metabolism is greater than the chaperone synthesis and, consequently, we observed a lower value in the RNA/DNA ratio. It is important to mention that all the sand dollars stressed during the experiments survived until the end of the experimental period, which indicates the phenotypic plasticity of these organisms to resist temperature changes during short periods of time.

When the sand dollars were exposed to unusual temperatures (4 and 29 °C) during the longest experimental period (6 h) of our treatments, we observed differences in the RNA/DNA ratios between normoxic and reduced oxygen conditions. Even between treatments with normal and reduced oxygen conditions, significant variations were detected after this exposure time. We believe that this result is a consequence of the long exposure time (6 h) combined with the low oxygen conditions. It is important to mention that no differences in oxygen concentration were detected between the control and experimental treatments during the experiments. After 6 h in the reduced oxygen experiment, the mean oxygen concentration was 2.87 mg L⁻¹, which is lower than the minimum suggested levels (~3 mg L⁻¹). Therefore, the observed increase in RNA/DNA ratios in the 13 and 26 °C treatments after 6 h could be the product of the synergistic effect of three stressors: temperature, exposure time, and low oxygen levels. Also, this thermal window could represent the lower and higher thermal response capacity of the sand dollar under the experimental conditions tested. The synergistic effect of several stress factors has been observed in oysters; for example, elevated temperatures and cadmium levels modified their energy metabolism (Lannig *et al.* 2006). In our work, we consider that the oxygen concentration after 6 h could have a synergistic effect potentiating the thermal stress suffered by the organisms. Moreover, the close relationship between *hsp70* and stress tolerance indicated that these stressors could enhance *Hsp70* levels, which consequently enhanced the tolerance of the sand dollars against subsequent stress, as was reported for thermo-stressed sea cucumbers (Dong *et al.* 2010).

Our results using the RNA/DNA ratio as a biomarker showed that this ratio can be used as a stress indicator for *D. excentricus*, particularly when evaluating stress associated with oxygen conditions, in contrast to *hsp70*, which was more sensitive to the extreme temperatures tested. The present results add to the molecular literature showing that RNA/DNA ratios have been used successfully as ecophysiological indicators in marine organisms. Moreover, our results constitute a first step toward understanding the effects of temperature and oxygen changes in adult *D. excentricus*. Future in-detail gene expression analyses are necessary; the

90 min de recuperación del estrés sufrido, pero en condiciones de estrés continuo, gradualmente incrementa la síntesis de proteínas normales y disminuye la síntesis de *Hsps* (DiDomenico *et al.* 1982). También se ha documentado que la vida media de las *Hsp70* del pepino de mar es bastante corta (<3 días) (Dong *et al.* 2010), y que en pollos, la estabilidad de ARNm *hsp70* depende de la temperatura y el estado celular (Theodorakis *et al.* 1988). Los choques térmicos tienen un fuerte efecto en la estabilidad de ARNm *hsp70*, y la vida media de ARNm aumenta al menos 10 veces con el estrés generado por los choques térmicos (Dong *et al.* 2010).

Los organismos expuestos a estrés necesitan responder rápidamente a los cambios en las condiciones ambientales, especialmente en ambientes estuarinos. Para hacer esto, disminuyen la síntesis de varias moléculas celulares para enfocarse en la producción de proteínas chaperonas. Es posible que las galletas de mar, en temperaturas extremas, canalizan su energía a la producción de moléculas chaperonas para enfrentar las condiciones estresantes; sin embargo, la reducción de su metabolismo general es mayor que la síntesis de las chaperonas y, consecuentemente, se observó un valor más bajo en el índice de ARN/ADN. Es importante mencionar que todas las galletas de mar expuestas a estrés durante los experimentos sobrevivieron hasta el final del periodo experimental, lo que demuestra la plasticidad fenotípica de estos organismos a resistir cambios de temperatura durante periodos cortos de tiempo.

Cuando las galletas de mar fueron expuestas a temperaturas extremas (4 y 29 °C) durante el periodo experimental más largo (6 h) de nuestros tratamientos, se observaron diferencias en los índices de ARN/ADN entre las condiciones normóxicas y de oxígeno reducido. También se detectaron variaciones significativas después de este tiempo de exposición entre los tratamientos con condiciones normales y de oxígeno reducido. Consideramos que este resultado se debe al largo tiempo de exposición (6 h) en combinación con los niveles bajos de oxígeno. Cabe mencionar que no se detectaron diferencias en la concentración de oxígeno entre los tratamientos control y experimentales durante los experimentos. Después de 6 h en condiciones de oxígeno reducido, la concentración media de oxígeno fue 2.87 mg L⁻¹, por debajo de los niveles mínimos sugeridos (~3 mg L⁻¹). Por lo tanto, el aumento en los índices de ARN/ADN en los tratamientos a 13 y 26 °C después de 6 h podría ser producto del efecto sinérgico de tres factores de estrés: temperatura, tiempo de exposición y niveles bajos de oxígeno. Asimismo, esta ventana térmica podría representar la menor y mayor capacidad de respuesta de *D. excentricus* en las condiciones experimentales probadas. Se ha observado el efecto sinérgico de varios factores de estrés en los ostiones; por ejemplo, elevadas temperaturas y concentraciones de cadmio modifican su metabolismo energético (Lannig *et al.* 2006). En el presente trabajo, consideramos que la concentración de oxígeno después de 6 h podría tener un efecto sinérgico al generar el estrés térmico de los organismos. Además, la relación cercana entre *hsp70* y la tolerancia al estrés indica que estos factores de

battery of genes involved in the physiological condition generated by uncommon habitat temperatures determines to what extent Pacific sand dollars will adapt to the future conditions of their habitat in the ocean change scenario.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Universidad Autónoma de Baja California (UABC, internal project No. 533 to ECI) and by the Secretaría de Educación Pública (PIFI program). We thank all the members of the Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo (IIO-UABC) for their help and in particular we would like to thank Roberto Escobar-Fernández for his help in maintaining the organisms.

REFERENCES

- Bianchi TS, Allison MA. 2009. Large-river delta-front estuaries as natural "recorders" of global environmental change. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 8005–8092.
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0812878106>
- Boesch DF, Field JC, Scavia D (editors). 2000. The Potential Consequences of Climate Variability and Change on Coastal Areas and Marine Resources: Report of the Coastal Areas and Marine Resources Sector Team, US National Assessment of the Potential Consequences of Climate Variability and Change, US Global Change Research Program. NOAA Coastal Ocean Program Decision Analysis Series No. 21, Silver Spring, MD, 163 pp.
- Browne CL, Swan JB, Rankin EE, Calvert H, Griffiths S, Tylell M. 2007. Extracellular heat shock protein 70 has novel functional effects on sea urchin eggs and coelomocytes. *J. Exp. Biol.* 210: 1275–1287.
<http://dx.doi.org/10.1242/jeb.02743>
- Buckley LJ, Turner SI, Halavik TA, Smigielski AS, Drew SM, Laurence GC. 1984. Effects of temperature and food availability on growth, survival, and RNA-DNA ratio of larval sand lance (*Ammodytes americanus*). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 15: 91–97.
- Caldarone EM. 2005. Estimating growth in haddock larvae *Melanogrammus aeglefinus* from RNA:DNA ratios and water temperature. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 293: 241–252.
<http://dx.doi.org/10.3354/meps293241>
- Carpizo-Ituarte E, Salas-Garza A, Parés-Sierra G. 2002. Induction to metamorphosis of three species of sea urchins (*Strongylocentrotus* spp.) with KCl and its application in the production of juveniles. *Cienc. Mar.* 28: 157–166.
- Chícharo LM, Chícharo MA. 1995. The RNA/DNA ratio as a useful indicator of the nutritional condition in juveniles of *Ruditapes decussatus*. *Sci. Mar.* 59 (Supl. 1): 95–101.
- Chícharo MA, Chícharo L. 2008. RNA:DNA ratio and other nucleic acid derived indices in marine ecology. *Int. J. Mol. Sci.* 9: 1453–1471.
<http://dx.doi.org/10.3390/ijms9081453>
- Clemmesen C. 1993. Improvements in the fluorimetric determination of the RNA and DNA content of individual marine fish larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 100: 177–183.
- Dahlhoff EP. 2004. Biochemical indicators of stress and metabolism: Applications for marine ecological studies. *Annu. Rev. Physiol.* 66: 183–207.
<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.physiol.66.032102.114509>
- Dell'Anno A, Fabiano M, Duineveld GCA, Kok A, Danovaro R. 1998. Nucleic acid (DNA, RNA) quantification and RNA/DNA ratio determination in marine sediments: Comparison of spectrophotometric, fluorometric, and high-performance liquid chromatography methods and estimation of detrital DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3238–3245.
- DiDomenico BJ, Bugaisky GE, Lindquist S. 1982. Heat shock and recovery are mediated by different translational mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 6181–5.
- Dong Y-W, Ji T-T, Meng X-L, Dong S-L, Sun W-M. 2010. Difference in thermotolerance between green and red color variants of the Japanese sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka: Hsp70 and heat-hardening effect. *Biol. Bull.* 218: 87–94.
- Driedger K, Weber LP, Rickwood CJ, Dubé MG, Janz DM. 2009. Overwinter alterations in energy stores and growth in juvenile fishes inhabiting areas receiving metal mining and municipal wastewater effluents. *Environ. Toxicol. Chem.* 28: 296–304.
<http://dx.doi.org/10.1897/08-028.1>
- Farcy E, Voiseux C, Lebel J-M, Fiévet B. 2009. Transcriptional expression levels of cell stress marker genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to acute thermal stress. *Cell Stress Chaperones* 14: 371–80.
<http://dx.doi.org/10.1007/s12192-008-0091-8>

estrés podrían haber aumentado los niveles de Hsp70, lo que consecuentemente aumentó la tolerancia de las galletas de mar al estrés subsecuente, al igual que se documentó para los pepinos de mar expuestos a estrés (Dong *et al.* 2010).

Nuestros resultados indican que el índice de ARN/ADN puede ser usado como un biomarcador de estrés para *D. excentricus*, especialmente cuando se evalúa el estrés asociado con condiciones de oxígeno, en contraste con la expresión de *hsp70* que fue más sensible a las temperaturas extremas probadas. Este trabajo contribuye a la literatura molecular que muestra el uso exitoso de los índices de ARN/ADN como indicadores ecofisiológicos en organismos marinos. Nuestro estudio constituye un primer esfuerzo por entender los efectos de los cambios de temperatura y oxígeno en organismos adultos de *D. excentricus*. Se requieren mayores estudios detallados de la expresión de genes; la batería de genes involucrados en la condición fisiológica generada por temperaturas ambientales inusuales determina el grado de adaptación de las galletas de mar del noroeste de México a las futuras condiciones de su hábitat en el escenario de cambio climático.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por la Universidad Autónoma de Baja California (UABC, proyecto interno No. 533 a ECI) y por la Secretaría de Educación Pública (Programa Integral de Fortalecimiento Institucional). Agradecemos la ayuda proporcionada por todos los miembros del Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo (IIO-UABC) y en especial a Roberto Escobar-Fernández su ayuda en el mantenimiento de los organismos.

Traducido al español por Christine Harris.

- Folkvord A, Ystanes L, Johannessen A, Moksness E. 1996. RNA:DNA ratios and growth of herring (*Clupea harengus*) larvae reared in mesocosms. *Mar Biol.* 126: 591–602.
<http://dx.doi.org/10.1007/BF00351326>
- Fraser KPP, Clarke A, Peck LS. 2002. Low-temperature protein metabolism: Seasonal changes in protein synthesis and RNA dynamics in the Antarctic limpet *Nacella concinna* Strebel 1908. *J. Exp. Biol.* 205: 3077–86.
- Geraci F, Pinsino A, Turturici G, Savona R, Giudice G, Sconzo G. 2004. Nickel, lead, and cadmium induce differential cellular responses in sea urchin embryos by activating the synthesis of different HSP70s. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322: 873–877.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.08.005>
- Giudice G, Sconzo G, Roccheri MC. 1999. Studies on heat shock proteins in sea urchin development. *Dev. Growth Differ.* 41: 375–380.
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1440-169x.1999.00450.x>
- Gupta SC, Sharma A, Mishra M, Mishra RK, Chowdhuri DK. 2010. Heat shock proteins in toxicology: How close and how far? *Life Sci.* 86: 377–384.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2009.12.015>
- Hang H, Fox MH. 1996. Levels of 70-kDa heat shock protein through the cell cycle in several mammalian lines. *Cytometry* 25: 367–373.
[http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0320\(19961201\)25:4<367::AID-CYTO8>3.0.CO;2-A](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19961201)25:4<367::AID-CYTO8>3.0.CO;2-A)
- Henshaw E, Hirsch C, Morton B, Hiatt H. 1971. Control of protein synthesis in mammalian tissues through changes in ribosome activity. *J. Biol. Chem.* 246: 436–446.
- Hinegardner RT. 1969. Growth and development of the laboratory cultured sea urchin. *Biol. Bull.* 137: 465–475.
- Hovenkamp F, Witte JIJ. 1991. Growth, otolith growth and RNA/DNA ratios of larval plaice *Pleuronectes platessa* in the North Sea 1987 to 1989. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 70: 105–116.
- Joyner-Matos J, Andrzejewski J, Briggs L, Baker SM, Downs CA, Julian D. 2009. Assessment of cellular and functional biomarkers in bivalves exposed to ecologically relevant abiotic stressors. *J. Aquat. Anim. Health* 21: 104–116.
<http://dx.doi.org/10.1577/H08-066.1>
- Kim M, Ahn I-Y, Kim H, Cheon J, Park H. 2009. Molecular characterization and induction of heat shock protein 90 in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica*. *Cell Stress Chaperones* 14: 363–370.
<http://dx.doi.org/10.1007/s12192-008-0090-9>
- Kumar A, Sharma B, Pandey RS. 2008. Cypermethrin and lambda-cyhalothrin induced alterations in nucleic acids and protein contents in a freshwater fish, *Channa punctatus*. *Fish Physiol. Biochem.* 34: 331–338.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10695-007-9192-z>
- Lancaster GI, Febbraio MA. 2005. Mechanisms of stress-induced cellular HSP72 release: Implications for exercise-induced increases in extracellular HSP72. *Exerc. Immunol. Rev.* 11: 46–52.
- Lane J, Lawrence J. 1979. Gonadal growth and gametogenesis in the sand dollar *Mellita quinquesperforata* (Leske 1778). *Biol. Bull.* 157: 275–287.
- Lannig G, Flores JF, Sokolova IM. 2006. Temperature-dependent stress response in oysters, *Crassostrea virginica*: Pollution reduces temperature tolerance in oysters. *Aquat. Toxicol.* 79: 278–287.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.06.017>
- Li Z-H, Zlabek V, Velisek J, Grabic R, Machova J, Randak T. 2010. Physiological condition status and muscle-based biomarkers in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), after long-term exposure to carbamazepine. *J. Appl. Toxicol.* 30: 197–203.
<http://dx.doi.org/10.1002/jat.1482>
- Liu Z, Sun Y, Liu N, Fan N, Zhang S. 2009. Characterization, expression, and response to stress of p8 gene in amphioxus. *Fish Shellfish Immunol.* 27: 407–413.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2009.06.011>
- López-Rasgado F, Herzka S. 2009. Assessment of habitat quality for juvenile California halibut (*Paralichthys californicus*) in a seasonally arid estuary. *Fish Bull.* 107: 343–358.
- Marsh AG, Maxson RE, Manahan DT. 2001. High macromolecular synthesis with low metabolic cost in Antarctic sea urchin embryos. *Science* 291: 1950–1952.
<http://dx.doi.org/10.1126/science.1056341>
- Martínez-Canto O, Olguín-Monroy NO, de Anda-Montañez JA, Zenteno-Savín T. 2013. Spatial and temporal variability of oxidative stress indicators in the red crab (*Pleuroncodes planipes*) from the west coast of the Baja California Peninsula, Mexico. *Cienc. Mar.* 39: 41–53.
<http://dx.doi.org/10.7773/cm.v39i1.2153>
- Matranga V, Bonaventura R, Di Bella G. 2002. Hsp70 as a stress marker of sea urchin coelomocytes in short term cultures. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 48: 345–9.
- Meesters EH, Nieuwland G, Duineveld GCA, Kok A, Bak RPM. 2002. RNA/DNA ratios of scleractinian corals suggest acclimatisation/adaptation in relation to light gradients and turbidity regimes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 227: 233–239 (2002).
<http://dx.doi.org/10.3354/meps227233>
- Olivares-Bañuelos T, Figueroa-Flores S, Carpizo-Ituarte E. 2012. Gonad index and larval development of the sand dollar *Dendraster excentricus* (Echinodermata; Echinoidea) in Baja California, Mexico. *Cienc. Mar.* 38: 411–425.
- Palotai R, Szalay MS, Csermely P. 2008. Chaperones as integrators of cellular networks: Changes of cellular integrity in stress and diseases. *IUBMB Life* 60:10–18.
<http://dx.doi.org/10.1002/iub.8>
- Peck L, Conway L. 2000. The myth of metabolic cold adaptation: Oxygen consumption in stenothermal Antarctic bivalves. In: Harper E, Taylor J, Crame J (eds.), *The Evolutionary Biology of the Bivalvia*. Geological Society Special Publication, London, pp. 441–450.
- Pörtner H. 2002. Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: Systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comp. Biochem. Physiol.* 132: 739–761.
- Revankar PR, Shyama SK. 2009. Genotoxic effects of monocrotophos, an organophosphorous pesticide, on an estuarine bivalve, *Meretrix ovum*. *Food Chem. Toxicol.* 47: 1618–1623.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2009.04.010>
- Roark AM, Bjørndal KA, Bolten AB, Leeuwenburgh C. 2009. Biochemical indices as correlates of recent growth in juvenile green turtles (*Chelonia mydas*). *Ecology* 376: 59–67.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2009.06.004>
- Rodríguez-Troncoso AP, Carpizo-Ituarte E, Cupul-Magaña A. 2013. Oxidative damage associated with thermal stress in *Pocillopora verrucosa* from the Mexican Pacific. *Cienc. Mar.* 39: 113–118.
- Siikavuopio SI, Mortensen A, Christiansen JS. 2008. Effects of body weight and temperature on feed intake, gonad growth and oxygen consumption in green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Aquaculture* 281: 77–82.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.05.033>
- Spees JL, Chang SA, Snyder MJ, Chang ES. 2002. Thermal acclimation and stress in the American lobster, *Homarus americanus*: Equivalent temperature shifts elicit unique gene

- expression patterns for molecular chaperones and polyubiquitin. *Cell Stress Chaperones* 7: 97–106.
- Steinhart M, Eckmann R. 1992. Evaluating the nutritional condition of individual whitefish (*Coregonus* spp.) larvae by the RNA/DNA ratio. 40: 791–799.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8649.1992.tb02625.x>
- Theodorakis NG, Banerji SS, Morimoto RI. 1988. HSP70 mRNA translation in chicken reticulocytes is regulated at the level of elongation. *J. Biol. Chem.* 263: 14579–85.
- Tsangaris C, Kormas K, Stroglyoudi E, Hatzianestis I, Neofitou C, Andral B, Galgani F. 2010. Multiple biomarkers of pollution effects in caged mussels on the Greek coastline. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 151: 369–378.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.12.009>
- Wagner M, Durbin E, Buckley L. 1998. RNA:DNA ratios as indicators of nutritional condition in the copepod *Calanus finmarchicus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 162: 173–181.
<http://dx.doi.org/10.3354/meps162173>

Received November 2013,

Accepted May 2014.