

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

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

Tania Carolina Figueroa Delgado

Dr. Marcelo González
Director de Tesis

Dra. María Soledad Astorga
Co-Directora de Tesis

2009

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

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

Tania Carolina Figueroa Delgado

Dr. Marcelo González
Director de Tesis

Dra. María Soledad Astorga
Co-Directora de Tesis

2009

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

Por Tania Carolina Figueroa Delgado

Departamento de Ciencias y Recursos Naturales

Fecha: noviembre de 2009

Aprobado Comisión de Calificación

Decano

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

2009

UNIVERSIDAD DE MAGALLANES
FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Ciencias y Recursos Naturales

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

Tesis presentada para optar al Título de Biólogo Marino

Tania Carolina Figueroa Delgado

Punta Arenas, noviembre 2009

RESUMEN

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

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

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

AGRADECIMIENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tania

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN

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

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

ÍNDICE DE FIGURAS

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

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

ÍNDICE DE TABLAS

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

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