

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

**CARACTERIZACIÓN CELULAR Y MOLECULAR  
DE LA RESPUESTA INMUNE EN EL ERIZO ANTÁRTICO  
(*Sterechinus neumayeri*)**

**Fernanda Eliana Ovando Pacheco**

Dr. Marcelo González  
**Director de Tesis**

Dra. Valeria Latorre  
**Co-Directora de Tesis**

**2009**

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

**CARACTERIZACIÓN CELULAR Y MOLECULAR  
DE LA RESPUESTA INMUNE EN EL ERIZO ANTÁRTICO  
(*Sterechinus neumayeri*)**

**Fernanda Eliana Ovando Pacheco**

Dr. Marcelo González  
**Director de Tesis**

Dra. Valeria Latorre  
**Co-Directora de Tesis**

**2009**

**CARACTERIZACIÓN CELULAR Y MOLECULAR  
DE LA RESPUESTA INMUNE EN EL ERIZO ANTÁRTICO  
(*Sterechinus neumayeri*)**

Por

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 CELULAR Y MOLECULAR  
DE LA RESPUESTA INMUNE EN EL ERIZO ANTÁRTICO  
(*Sterechinus neumayeri*)**

Tesis presentada para optar al Título de Biólogo Marino

Fernanda Eliana Ovando Pacheco

Punta Arenas, noviembre 2009

## RESUMEN

La respuesta inmune innata, es la primera línea de defensa contra la infección. Las células del sistema inmune innato reconocen un patrón molecular común y constante de la superficie de los microorganismos denominado patrón molecular asociado a patógenos conocidos como PAPMs (Pathogens Associated Molecular Pathern), a través de los receptores de reconocimiento de patrones PRR (Pattern Recognition Receptor).

El propósito de este estudio fue caracterizar la respuesta inmunitaria en celomocitos en el erizo antártico (*Sterechinus neumayeri*) a nivel celular y molecular. Para ello se estimularon veinte erizos con una mezcla de bacterias y levaduras muertas por calor. Las muestras fueron colectadas desde el fluido celómico luego de las 24 y 48 horas post estimulación.

A través de la estimulación de los erizos, se confirmó la presencia de cuatro tipos de celomocitos, entre ellos: fagocitos, células esferoidales incoloras, células esferoidales rojas y células vibrátiles. A nivel celular, el sistema inmunitario respondería positivamente en los erizos estimulados con bacterias, demostrándolo con un aumento en el número de celomocitos totales y células esferoidales rojas luego de las 24 horas post estimulación, ya que luego de las 48 horas tienden a una estabilización. Contrariamente en los erizos estimulados con levaduras, no se observó un cambio en el número de celomocitos. Este fenómeno fue corroborado a nivel molecular, en los erizos estimulados con bacterias con el aumento y la disminución en la expresión del ARNm de los tres genes en estudio: actina, factor inflamatorio alogénico tipo 1 y metalotioneína, luego de las 24 y 48 horas respectivamente, situación contraria a los erizos estimulados con levaduras donde no se observó un aumento en la expresión del ARNm. La diferencia en la respuesta celular, entre las bacterias y levaduras se puede deber a la presencia de los distintos PAMPs, que generan una respuesta inmunitaria diferente para estos dos agentes extraños.

Adicionalmente, el gen factor allogénico tipo 1 (AIF-1) fue identificado y clonado desde los celomocitos del erizo antártico. La longitud total del ADNc de Sn AIF-1 fue de 648 pb y codifica una proteína de 151 aminoácidos, que presenta en su estructura dos sitios biológicamente activos, denominados motivos EF-hand. La clonación del Sn AIF-1 muestra un porcentaje de identidad entre un 38 y un 64% deducido desde las secuencias aminoacídicas de AIF-1 publicadas en invertebrados y vertebrados. La transcripción del ARNm en celomocitos de Sn AIF-1 estimulado con bacterias fue examinada por RT-PCR. La expresión del ARNm de Sn AIF-1 aumentó significativamente luego de las 24 horas post estimulación. Considerando que es el primer reporte en este gen, en relación a la respuesta inmunitaria en un invertebrado marino. La conservación de la estructura a nivel evolutivo y la relación filogenética con otras proteínas AIF-1, podría ser considerada como una molécula esencial en la respuesta inmune en el contexto de la proliferación de las células.

## AGRADECIMIENTOS

Cuando me propuse la meta de obtener mi título universitario y veo día a día que ya se acerca el momento en que uno de de mis sueños más importantes se hará realidad, es imposible no recordar a todas esas personas que de una u otra manera han estado a mi lado durante estos cinco años.

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Marcelo González, Jefe Departamento Científico (DECIEN), por haber confiado en mis capacidades y darme la oportunidad de integrarme a su equipo de trabajo. Al 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”, por otorgarme el financiamiento de esta tesis. A todo el grupo de trabajo que conforma el Laboratorio de Biorrecursos (INACH), integrado por: Marcelo González, Carla Gimpel, Geraldine Asencio y Eva Ogue, por entregarme los conocimientos técnicos moleculares básicos, por sus consejos y apoyo incondicional, sobre todo de Carla y Geraldine en momentos de dificultad profesional y emocional. A todo el personal del Instituto Antártico Chileno (INACH) por el respeto y acogida en su lugar de trabajo. Además quiero agradecer al Laboratorio de Genética Molecular Marina (CEQUA), integrado por Carlos Olavaria, Ema NewCombe, César Cárdenas y Mauricio Palacios, por su simpatía y amistad. Sobre todo a Carlos por confiar en mis capacidades, por sus consejos, por entregarme sus conocimientos y por darme fuerzas y aliento en cada momento para continuar.

A mis profesores de carrera, por entregarme sus conocimientos y exigencia durante estos cinco años y formarme profesionalmente. A todos ello muchas gracias.

Pero no puedo olvidarme de aquellas personitas más importantes que estuvieron conmigo y me apoyaron en toda esta larga trayectoria. MIS MEJORES AMIGAS: Tania Figueroa y Tamara Valle. A ellas MIL GRACIAS!!! Por su

amistad, simpatía y carisma. Aún recuerdo que no tuvimos “*feeling*” ja ja ja cuando nos encontramos por primera vez en este nuevo mundo, pero el tiempo nos unió y afiató cada vez más esta linda amistad. Son tantos los momentos que hemos vivido juntas que sería imposible nombrarlos, pero sé que todos ellos quedarán en nuestros recuerdos y sobre todo en nuestro corazón. Gracias mis amigas, que muchas veces siento que la palabra es pequeña en comparación a lo que siento por ustedes, gracias por estar en mis alegrías y en mis tristezas, en mis logros y caídas que muchas de ellas las vivimos juntas y supimos celebrar como también seguir adelante con ese espíritu de esfuerzo y valentía que nos caracteriza. Las QUIERO DEMASIADO.

A mi pololo Rodrigo Pérez, por su amor, cariño y amistad. Por confiar en mí y por darme la oportunidad de conocer a esa linda y sensible persona que eres. Gracias por la alegría que me entregas cada día y la fuerza que me das para seguir adelante, gracias por no detener mis sueños y por seguir las locuras que a veces se me ocurren, gracias por estar conmigo cada vez que lo necesito.

Así como le agradezco a mis mejores amigas, también quiero agradecer a todos mis compañeros de carrera por todos los momentos que vivimos juntos, el valor de continuar en la universidad y por la lucha incondicional por mejorar cada vez más nuestra carrera.

A “*The Dark Group*”, integrado por: José Luis Días, conocido como “El Pelao”, Danilo Lobos, Tania Figueroa, Tamara Valle y quien relata, por estar unidos en este gran desafío y por ayudarnos mutuamente a quitarnos el “*stress*”: viendo películas y comiendo algo rico, jugando “Wii”, paseando en camioneta por Punta Arenas y haciendo locuras para reírnos un rato jajaja. Los quiero a todos y espero que nuestra amistad perdure por mucho tiempo más.

A mi familia primero a mis padres: Santiago y Mary, por traerme al mundo y por entregarme su amor incondicional y por haber formado la persona que soy hoy en día. A mi hermana mayor Karina, nunca te lo he dicho pero eres mi



segunda mamá, gracias por tu amor, por estar siempre conmigo y por apoyarme en todas las decisiones que he tomado en mi vida y a mi hermano menor Nelson, por tu amor y cariño.

Gracias a mis abuelos: Manuel y Teresa y a mi tía María Eliana, por acogerme en su casa durante estos cinco años, por darme su amor y preocupación de que nada me falte. Ustedes y mis amigas son los que han visto todo lo que he vivido y lo que me ha costado llegar hasta aquí. Finalmente a todo el resto de la familia que siempre se ha preocupado por mí todo este tiempo. A mi mamá (bis abuela) y a mi tía Eliana por su amor y preocupación, por sus sabios consejos y por ayudarme cuando lo necesité.

Gracias a todos ustedes, porque sin su pequeño granito de confianza y amor, no estaría logrando este sueño que cumpla hoy.

Fernanda

## ÍNDICE GENERAL

<b>1. <u>INTRODUCCIÓN</u></b>	<b>1</b>
1.1 Planteamiento	1
1.2 Antecedentes sobre la especie biológica en estudio	3
1.3 Sistema Inmunitario	4
1.4 Sistema Inmunitario en Invertebrados	7
1.5 Sistema Inmunitario en el Erizo	11
1.5.1 Sistema Inmunitario en el erizo modelo <i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	14
1.6 Primer genoma secuenciado en equinodermos	17
<b>2. <u>OBJETIVO E HIPÓTESIS DE TRABAJO</u></b>	<b>19</b>
<b>3. <u>METODOLOGÍA</u></b>	<b>20</b>
3.1 Área de muestreo	20
3.2 Obtención de muestras y estimulación <i>in situ</i>	21
3.3 Obtención y conteo de celomocitos	22
3.4 Análisis de extracción de ARN y reacción de retrotranscripción	22
3.4.1 Extracción de los ARNs totales	22
3.4.2 Cuantificación de los ARNs totales	24
3.4.3 Reacción de la retrotranscripción (RT)	25
3.5 Análisis de la expresión de genes	25
3.5.1 Análisis de expresión génica mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	27

3.6 Clonaje y secuenciación del ADNc del factor alogénico inflamatorio de tipo 1 (AIF-1) del erizo antártico <i>Sterechinus neumayeri</i>	28
3.6.1 Estrategia de amplificación por PCR del gen AIF-1	28
3.6.2 Clonación del ADNc de AIF-1 del erizo antártico <i>Sterechinus neumayeri</i>	31
3.6.3 Secuenciación y análisis del ADNc de AIF-1 del erizo antártico <i>Sterechinus neumayeri</i>	32
3.7 Análisis estadísticos	33
<b>4. <u>RESULTADOS</u></b>	<b>34</b>
4.1 Conteo y función en el sistema inmunitario de los celomocitos en el erizo antártico <i>Sterechinus neumayeri</i>	34
4.2 Expresión de genes en celomocitos de <i>Sterechinus neumayeri</i>	37
4.2.1 Análisis de expresión génica por PCR en celomocitos de erizos estimulados con bacterias y levaduras	38
4.3 Clonación y secuenciación del ADNc de AIF-1 del erizo antártico <i>Sterechinus neumayeri</i>	42
<b>5. <u>DISCUSIÓN</u></b>	<b>48</b>
5.1 Conteo y función en el sistema inmunitario de los celomocitos en el erizo antártico <i>Sterechinus neumayeri</i>	48
5.2 Expresión de genes en celomocitos de <i>Sterechinus neumayeri</i>	53
5.2.1 Modificación de la expresión de genes en celomocitos estimulados con bacterias y levaduras	55
5.3 Clonación y Secuenciación del ADNc de AIF-1 del erizo antártico <i>Sterechinus neumayeri</i>	58
<b>6. <u>CONCLUSIÓN</u></b>	<b>61</b>
<b>7. <u>BIBLIOGRAFÍA</u></b>	<b>63</b>
<b>8. <u>ANEXOS</u></b>	<b>77</b>
8.1 Abreviaturas y Siglas	77



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> <i>Sterechinus neumayeri</i> (Erizo Antártico)	3
<b>Figura 2</b> Componentes del sistema inmune innato y adaptativo	6
<b>Figura 3</b> Reconocimiento del microorganismo a través de los PAMP, mediante los PRR(A). Representación esquemática de la estructura de un TLR (B)	9
<b>Figura 4</b> Tipos de celomocitos en el erizo modelo <i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	16
<b>Figura 5</b> Península Antártica	20
<b>Figura 6</b> Jaula en la cual fueron colocados los erizos para la realización de la estimulación <i>in situ</i> (A). Mapa satelital de la Bahía Maxwell (B)	21
<b>Figura 7</b> Secuencia original de ADNc de AIF-1 del erizo modelo <i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	29
<b>Figura 8</b> Secuencia de ADNc de AIF-1 que deriva de la secuencia original del ADNc de AIF-1 del erizo modelo <i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	30
<b>Figura 9</b> Tipos de celomocitos en el erizo antártico <i>Sterechinus neumayeri</i>	34
<b>Figura 10</b> Celomocitos totales (A) y células esferoidales rojas (B), en erizos estimulados con bacterias muertas por calor	35
<b>Figura 11</b> Celomocitos totales (A) y células esferoidales rojas (B), en erizos estimulados con levaduras	36
<b>Figura 12</b> Expresión de la ACT, AIF-1 y MT en erizos estimulados con bacterias muertas por calor a 24 (A) y 48 (B) horas	38
<b>Figura 13</b> Expresión de la ACT, AIF-1 y MT en erizos estimulados con levaduras autoclavadas a 24 (A) y a 48 (B) horas	39
<b>Figura 14</b> Expresión de la ACT, AIF-1 y MT en erizos estimulados con bacterias muertas por calor a 24 (A) y 48 (B) horas, representado en unidades arbitrarias (UA)	40
<b>Figura 15</b> Expresión de la ACT, AIF-1 y MT en erizos estimulados con levaduras autoclavadas a 24 (A) y 48 (B) horas, representado en unidades arbitrarias (UA)	42
<b>Figura 16</b> Expresión del gen AIF-1 para verificar que el producto de PCR	43

corresponde al ADNc del AIF-1 que codifica la secuencia completa del erizo antártico *Sterechinus neumayeri*

**Figura 17** Visualización de los cuatro plásmidos obtenidos a través de la clonación del gen AIF-1 43

**Figura 18** Secuencia de ADNc de AIF-1 del erizo antártico *Sterechinus neumayeri* 44

**Figura 19** Árbol filogenético construido con la molécula relacionada al AIF-1 del erizo antártico *Sterechinus neumayeri* 46

**Figura 20** Alineamiento de secuencias de aminoácidos relacionados con el gen AIF-1 en cinco invertebrados 47

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Secuencias de partidores diseñados a partir de regiones conservadas de genes descritos en el erizo <i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	26
<b>Tabla 2</b> Secuencias de partidores diseñados a partir del ADNc de AIF-1 del erizo <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> , para lograr la amplificación del ADNc de AIF-1 del erizo antártico <i>Sterechinus neumayeri</i>	31
<b>Tabla 3</b> Secuencias de partidores diseñados a partir de regiones conservadas de genes descritos en el erizo <i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	37
<b>Tabla 4</b> Parámetros del AIF-1 en organismos representativos dentro de la escala evolutiva	45
<b>Tabla 5</b> Promedio de celomocitos totales en el erizo antártico <i>Sterechinus neumayeri</i> estimulados con una mezcla de bacterias muertas por calor	80
<b>Tabla 6</b> Promedio de células esferoidales rojas en el erizo antártico <i>Sterechinus neumayeri</i> estimulados con una mezcla de bacterias muertas por calor	80
<b>Tabla 7</b> Promedio de celomocitos totales en el erizo antártico <i>Sterechinus neumayeri</i> estimulados con levaduras	81
<b>Tabla 8</b> Promedio de células esferoidales rojas en el erizo antártico <i>Sterechinus neumayeri</i> estimulados con levaduras	81
<b>Tabla 9</b> Expresión del gen de la actina en el erizo antártico <i>Sterechinus neumayeri</i> estimulados con bacterias	82
<b>Tabla 10</b> Expresión del gen factor alogénico tipo 1 en el erizo antártico <i>Sterechinus neumayeri</i> estimulados con bacterias	82
<b>Tabla 11</b> Expresión del gen de la metalotioneína en el erizo antártico <i>Sterechinus neumayeri</i> estimulados con bacterias	82
<b>Tabla 12</b> Expresión del gen de la actina en el erizo antártico <i>Sterechinus neumayeri</i> estimulados con levaduras	83
<b>Tabla 13</b> Expresión del gen factor alogénico tipo 1 en el erizo antártico <i>Sterechinus neumayeri</i> estimulados con levaduras	83
<b>Tabla 14</b> Expresión del gen de la metalotioneína en el erizo antártico <i>Sterechinus neumayeri</i> estimulados con levaduras	83