

UNIVERSIDAD DE MAGALLANES

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO CIENCIAS Y RECURSOS NATURALES



**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE RECONOCIMIENTO DE
PATÓGENOS EN EL ERIZO ANTÁRTICO (*Sterechinus neumayeri*)**

Carolina Andrea Pérez Toledo

Director Tesis: Dr. Marcelo González
Co-Director Tesis: Dra. Valeria Latorre

UNIVERSIDAD DE MAGALLANES

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO CIENCIAS Y RECURSOS NATURALES



**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE RECONOCIMIENTO DE
PATÓGENOS EN EL ERIZO ANTÁRTICO (*Sterechinus neumayeri*)**

Carolina Andrea Pérez Toledo

Director Tesis: Dr. Marcelo González
Co-Director Tesis: Dra. Valeria Latorre

2011

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE RECONOCIMIENTO DE
PATÓGENOS EN EL ERIZO ANTÁRTICO (*Sterechinus neumayeri*)**

Departamento de Ciencias y Recursos Naturales

Fecha: 2011

Decano Facultad Ciencias

Jefe de Carrera

Aprobado por Comisión de Calificación

Tesis entregada como requerimiento para obtener el Título de
Biólogo Marino en la Facultad de Ciencias.

2011

UNIVERSIDAD DE MAGALLANES

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO CIENCIAS Y RECURSOS NATURALES



**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE RECONOCIMIENTO DE
PATÓGENOS EN EL ERIZO ANTÁRTICO (*Sterechinus neumayeri*)**

Carolina Andrea Pérez Toledo

Director Tesis: Dr. Marcelo González
Co-Director Tesis: Dra. Valeria Latorre

2011

RESUMEN

Los equinodermos han sido objeto de variados estudios comparativos desde el punto de vista evolutivo. Esto se debe a que son invertebrados del grupo deuterostomados.

El erizo de mar ha desarrollado distintas estrategias en el marco de su sistema inmune innato. Una de ellas es la detección de moléculas extrañas que puedan ingresar al organismo mediante la utilización de receptores de reconocimiento de patrón (RRP). Estos detectan diferentes patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs).

El propósito de este estudio fue caracterizar la expresión de genes que codifican para proteínas que actúan como RRP, particularmente en la respuesta inmune del erizo antártico, *Sterechinus neumayeri*. Para lograrlo se diseñaron 7 juegos de partidores específicos, 5 correspondientes a receptores de tipo Toll y 2 a LBP/BPI. Posteriormente, se cuantificó la expresión del mejor juego de partidores para cada gen en una cinética comparativa entre organismos control, y estimulados con lipopolisacáridos.

Si bien se observó claramente la expresión de los genes en estudio ante la estimulación con LPS, los resultados no muestran una inducción efectiva.

La expresión del gen LBP/BPI mostró tendencia a una disminución significativa. Mientras que en el caso del gen correspondiente a Toll, esto sólo ocurrió al comienzo del periodo experimental.

Destaca el hecho de haber obtenido por primera vez una secuencia parcial de ADNc del gen LBP/BPI para el erizo antártico *S. neumayeri*. Su posterior análisis filogenético indicó homologías con secuencias descritas del gen en otros organismos, tanto vertebrados como invertebrados.

AGRADECIMIENTOS

Al encontrarme en esta etapa, de finalizar mi carrera universitaria, me siento muy orgullosa de mis logros y afortunada de las personas que estuvieron a mi lado en este proceso...

En primer lugar quisiera agradecer al Dr. Marcelo González A. por guiarme académicamente desde que empecé a asistir al laboratorio, enseñándome conocimientos que posteriormente me ayudaron a desarrollar mi práctica y tesis que en este momento estoy presentando. A los integrantes del Laboratorio de Biorrecursos Antárticos en especial a Geraldine Ascencio, Carla Gimpel, Rocío Urtubia y Paris Lavin, quienes a diario me entregan consejos y conocimientos para la realización de mis actividades, además del apoyo en todo momento y amistad compartiendo momentos gratos cada día.

Quisiera mencionar también a mis profesores de Universidad quienes en estos cinco años me han transmitido conocimientos para poder en un futuro desempeñarme como una buena profesional. A mis compañeritos Fernanda Silva y Rodrigo Mancilla con quienes pasamos los últimos años, noches y noches sin dormir para obtener buenos resultados... que creo que claramente nos funcionó... Minoría gana! :D

Finalmente quiero agradecer inmensamente a las personas más importantes en mi vida: a mi hermosa familia, a mis abuelos Marina, Raúl, Rosa y Chano quienes siempre se encuentran pendientes de mis estudios y se alegran con cada logro... los quiero mucho y a ti.. te extraño demasiado.

También debo agradecer infinitamente a quienes día a día me apoyan con todo, me contienen, celebran mis alegrías, lloran mis penas, soportan mis periodos de estrés pero lo más importante me dan amor y fuerza para lograr mis metas... Me siento muy afortunada y orgullosa de tener a mis padres **Raúl** y **Cecilia** y obvio de mi hermanito **Ariel**. Los amo mucho...

Carolina Pérez Toledo.

No tengo todo calculado, ni mi vida resuelta, sólo tengo una sonrisa y espero una de vuelta 🎵...

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 PLANTEAMIENTO	1
1.2 SISTEMA IMMUNE	3
1.2.1 SISTEMA INMUNE INNATO	4
1.2.1.1 PATRONES MOLECULARES ASOCIADOS A PATÓGENOS (PAMPS)	5
1.2.1.2 RECEPTORES DE RECONOCIMIENTO DE PATRONES (RRP)	8
1.2.2 SISTEMA INMUNE INNATO EN INVERTEBRADOS	15
1.2.2.1 SISTEMA INMUNE INNATO EN EL ERIZO	16
1.3 CELOMOCITOS EN <i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	18
1.4 PRIMER GENOMA SECUENCIADO EN UN EQUINODERMO	20
1.5 ESPECIE BIOLÓGICA EN ESTUDIO: <i>Sterechinus neumayeri</i>	22
2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS DEL TRABAJO	23
3. METODOLOGÍA	24
3.1 ÁREA DE MUESTREO	24
3.2 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS Y ESTIMULACIÓN <i>IN SITU</i> DE LA RESPUESTA INMUNITARIA EN ERIZO	25
3.3 OBTENCIÓN DE CELOMOCITOS	25
3.4 EXTRACCIÓN DE ARN	26
3.5 REACCIÓN DE RETROTRANSCRIPCIÓN (RT)	28
3.6 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES	29

3.6.1	OBTENCIÓN DE LAS SECUENCIAS Y DISEÑO DE <i>PRIMERS</i>	29
3.6.2	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA A PARTIR DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	32
3.7	ESTRATEGIA DE AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS JUEGOS DE PARTIDORES TOLL	33
3.8	CLONAJE Y SECUENCIACIÓN PARCIAL DE ADNc DE LA PROTEÍNA BACTERICIDA DE ALTA PERMEABILIDAD / PROTEÍNA DE UNIÓN A LPS. (BPI-LBP)	34
3.8.1	ESTRATEGIA DE AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS JUEGOS DE PARTIDORES BPI-LBP	34
3.8.2	CLONACIÓN DEL PRODUCTO PCR	38
3.8.3	SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS	39
3.9	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LBP/BPI Y TOLL EN TEJIDOS DE ERIZO ANTÁRTICO <i>Sterechinus neumayeri</i> .	40
3.10	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	41
4.	RESULTADOS	42
4.1	CLONAJE Y SECUENCIACIÓN PARCIAL DE ADNc DE LA PROTEÍNA BACTERICIDA DE ALTA PERMEABILIDAD/ PROTEÍNA DE UNIÓN A LPS. (LBP/BPI)	42
4.2	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR RT-PCR, EN ERIZO ANTÁRTICO <i>Sterechinus neumayeri</i> .	47
4.3	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN LBP/BPI Y TOLL EN TEJIDOS DE ERIZO ANTÁRTICO <i>Sterechinus neumayeri</i> .	51
5.	DISCUSIÓN	52

6.	CONCLUSIONES	59
7.	FINANCIAMIENTO	60
8.	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	61
9.	ANEXO	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Patrones moleculares asociados a patógenos y receptores de reconocimiento de patrones.	7
Tabla 2: Partidores diseñados a partir de secuencias descritas del erizo púrpura <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> .	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ubicación filogenética del phylum Echinodermata.	1
Figura 2: Estructura del lipopolisacárido.	2
Figura 3: Inmunidad innata mediada por receptores Toll en <i>Drosophila melanogaster</i> .	10
Figura 4: Ligando de algunos miembros de la familia de <i>Toll like receptor</i> .	12
Figura 5: Diagrama de la estructura de la proteína bactericida con alta permeabilidad (BPI).	14
Figura 6: Tipos de celomocitos del erizo <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> .	18
Figura 7: Península Antártica, en el recuadro de color rojo, en la izquierda superior de la imagen se puede observar la ubicación de la Isla Rey Jorge en las Islas Shetland del Sur.	24
Figura 8: Alineamiento de secuencias hipotéticas descritas de LBP/BPI en el erizo púrpura <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> .	35
Figura 9: Secuencia hipotética de LBP/BPI descrita en el erizo púrpura <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> (nomenclatura de acceso es LOC589952).	36
Figura 10: Verificación del inserto clonado presente en las colonias de bacterias <i>E. coli</i> crecidas con antibiótico.	42
Figura 11: Plásmidos recuperados de la clonación del gen LBP/BPI.	43
Figura 12: Posición de la secuencia parcial de ADNc de LBP/BPI del erizo antártico <i>Sterechinus neumayeri</i> , obtenida a partir de la clonación del producto PCR	44

- Figura 13:** Árbol filogenético construido con la secuencia parcial del erizo antártico *S. neumayeri* obtenida en esta investigación y las secuencias recuperadas de la proteína LBP-BPI. 46
- Figura 14:** Expresión de gen control 28S / gen en estudio LBP/BPI, en las muestras de grupos control y estimulados con LPS. 49
- Figura 15:** Expresión de gen control 28S / gen en estudio Toll, en las muestras de grupos control y estimulados con LPS. 50
- Figura 16:** Expresión del gen control 28S y genes en estudio LBP/BPI y Toll en diferentes tejidos del erizo antártico *Sterechinus neumayeri*. 51