

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 :

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 PAMPs (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 alogénico 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.

## ABSTRACT

The innate immune response is the first line of defence against the infection. The innate immune system is capable of recognizing from the micro-organisms surface cell a common constant molecular pattern, called Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), by receptors known as Pattern Recognition Receptors (PRRs).

The purpose of this study was to characterize the immune response in coelomocytes in Antarctic sea urchin (*Sterechinus neumayeri*) by a cellular and molecular approach. Twenty sea urchins were stimulated with a heat-treated bacterial and yeast cell suspension. Samples of caelomic fluid were taken after 24 and 48 hours post stimulation.

We confirmed the presence of four types of coelomocytes: phagocytes, colorless spherule cells, red spherule cells and vibrate cells. The immune system responded positively in the stimulated sea urchin with bacterium, showing an increase in the total coelomocytes and red spherule cells after 24 hours post stimulation, followed by a stabilization 48 h later. Contrarily, stimulated sea urchin with yeast, did not result in any changes in coelomocytes number. This phenomenon was corroborated at the molecular level in the stimulated sea urchin with bacterium by an increase and/or decrease of the expression of three targeted genes: actin, Allograft inflammatory type-1 (AIF-1) and metallothionein, after 24 and 48 hours respectively. The difference in cell responses between the bacterium and the yeast could be due to the presence of distinct PAMPs, which generate a different immune response against the exogenous agents.

Additionally, an allogenic inflammatory factor type-1 (AIF-1) gene was identified and cloned from coelomocytes of Antarctic sea urchin. The full length cDNA of Sn AIF-1 consisted of 648 bp and encoding a protein of 151 amino acids, with two biologically active EF-hand motifs. The cloned Sn AIF-1 showed between 38 and 64 % of identity in the deduced amino acids sequence with AIF sequences of invertebrates and vertebrates published. The mRNA transcripts in coelomocytes of Sn AIF-1 after bacterial challenge were examined by RT-PCR. The mRNA expression of Sn AIF-1



was increased at 24 h after bacteria challenge. This is the first report of this gene on the immune response in a marine invertebrate. Because of the conserved structural pattern, the close phylogenetic relationship with others AIF-1 family proteins and in the high evolutionary conservation of this gene it can be considered as an essential molecule in the immune response in the context of cell proliferation.

## 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 cumplo 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 alógeno 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



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Planteamiento.

La homeostasis es un conjunto de fenómenos de autorregulación que conducen al mantenimiento de la constancia en la composición y propiedades del medio interno de un organismo (**Real Academia Española, 2001**), ella está asegurada por un delicado sistema que puede ser perturbado cuando la integridad del organismo es puesta en peligro.

Los invertebrados son capaces de reconocer diferentes patrones moleculares de patógenos asociados con bacterias, hongos, levaduras y virus, así como también percibir cambios ambientales y disponer de estos mecanismos para poder protegerse (**Guerrero, 2007**). La protección de esta integridad necesita la puesta en marcha de un cierto número de reacciones de defensa, tanto a nivel fisiológico como comportamental.

Un sistema que ayuda a esta adaptación es el sistema inmunitario innato que poseen todos los invertebrados, el cual les permite controlar y protegerse de los diversos organismos patógenos y cambios ambientales que les producen un cierto nivel de estrés, ya sean cambios en su medio interno (lesiones tisulares, infecciones, etc) o cambios en el medio externo (frío, calor, etc).

El estrés es un concepto amplio que engloba muchas situaciones de diversa índole. Desde un punto de vista genérico se puede decir que respuesta al estrés es la respuesta del organismo, desarrollada durante la evolución, a cualquier perturbación de la homeostasis (**Carrasco, 2000**). La utilización de diversos estímulos o agentes estresantes en diversos organismos, tanto en invertebrados como en vertebrados, han permitido estudiar la respuesta inmunitaria con la finalidad de comprender como el organismo se defiende ante una situación distinta a lo cotidiana.

Las especies marinas antárticas se consideran más sensibles que otros grupos marinos, ya que éstas se han desarrollado en un ambiente que se caracteriza por una baja temperatura y una elevada estabilidad (**Peck, 2005**). En el erizo antártico *Sterechinus neumayeri*, sólo se tienen datos de los tipos de celomocitos y su capacidad fagocítica, estudiada por **Shimada y colaboradores (2002)**, pero no existe información a cerca de la respuesta inmunitaria generada por estos organismos frente a diversos estímulos a nivel molecular.

Por esta razón se considera importante poseer un grado de comprensión respecto de los mecanismos inmunitarios en invertebrados marinos antárticos, ya que al tomar en cuenta que estas especies han perdido la capacidad de adaptarse a cambios bruscos en el ambiente, un pequeño cambio en él podría dictar el éxito o el fracaso en las poblaciones.

## 1.2 Antecedentes sobre la especie biológica en estudio.

El erizo antártico, *Sterechinus neumayeri* (Fig.1), es el erizo de mar más abundante en las aguas antárticas (**Brey et al., 1995**) se puede encontrar en la Antártica, Península Antártica e islas subantárticas. Islas Shetland del Sur, Islas Orcadas del Sur, Islas Sandwich del Sur, Isla Georgia del Sur, Isla Patagonia del Sur, Isla Príncipe Edward, Isla Marion, Isla Crozet e Isla Kerguelen a profundidades desde 5 a 640 metros.

El color de la testa y espinas del *Sterechinus neumayeri* son variables, desde verde olivo o verde grisáceo a púrpura o violeta oscuro. Su crecimiento es tardío, alcanzando un diámetro máximo de siete centímetros a los cuarenta años de edad (**Brey et al., 1995**). Principalmente son herbívoros, parte de la dieta de *Sterechinus neumayeri* son las macroalgas y microalgas, pero además se alimenta de foraminíferos, esponjas, briozos, hidrozoos, poliquetos y anfipodos (**Amsler et al., 1999**).

Entre sus depredadores se encuentra la estrella de mar *Odontaster validus*, *Macrotychaster accrescens* y *Porania antarctica glabra* (**McClintock, 1994**), y la anémona *Urticinopsis antarcticus* (**Dayton et al., 1970**).



**Fig. 1.-** *Sterechinus neumayeri* (Erizo Antártico).  
Fuente (<http://peterbrueggeman.com/nsf/fguide/echinodermata1.html>)

### 1.3 Sistema Inmunitario.

La palabra inmunidad deriva del latín *immunitas*, que hace referencia a una serie de garantías civiles y legales que tenían los senadores en ejercicio en la antigua Roma. Desde un punto de vista histórico, inmunidad implica protección contra enfermedades, específicamente, patología infecciosa (**Guerrero, 2007**). Actualmente se define inmunidad como una reacción frente a sustancias exógenas ya sean vivas o inertes, entre las que se incluyen tanto microorganismos y macromoléculas como proteínas o lipopolisacáridos (**Abbas y Lichtman, 2000**).

#### Inmunidad Innata y Adquirida

Para protegerse los organismos han desarrollado varios mecanismos de defensa para reconocer y neutralizar patógenos. Estos mecanismos de defensa presentan diferencias significativas a lo largo de la escala filogenética, tendiendo hacia una mayor complejidad y potencia de las respuestas de defensa hasta lograr un reconocimiento específico de patógenos. Es así como el sistema inmunitario se divide en: Sistema inmunitario innato o natural y Sistema inmunitario adquirido o adaptativo (**Levinson, 2004**).

El sistema inmune innato es la primera línea de defensa contra los agentes patógenos y microorganismos infecciosos tratándose de un mecanismo ampliamente distribuido y conservado en todo el reino animal (**Hoffmann y Reichhart, 2002**).

El sistema inmune innato se caracteriza por ser de respuesta rápida que ocurre a las horas del contacto, no es específica lo que significa que este tipo de inmunidad no tiene la capacidad de discriminar entre distintos agentes extraños. Sin embargo, es capaz de reconocer estructuras patrón asociadas a patógenos conocidas como Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs) (**Medzhitov y Janeway, 1997**) que están presentes en la superficie de diferentes microorganismos, siendo caracterizado como un mecanismo de defensa a nivel

humoral. Es así como según **Hoffmann y Reichhart (2002)** indican que la mosca de fruta posee una respuesta inmunitaria multifacética que involucra la participación de reacciones humorales, que culminan con la destrucción de los organismos invasores, a través de péptidos líticos, indicando de acuerdo a los conocimientos actuales que el reconocimiento de los agentes no propios, resultan de la interacción entre los componentes de la pared microbiana y las proteínas extracelulares de reconocimiento de patrones, demostrando a través de ello cierto grado de especificidad en la respuesta inmunitaria innata, por medio de los componentes humorales.

La inmunidad innata está formada por las defensas que existen antes de la exposición al microorganismo (antígeno). Incluye defensas como barreras naturales ante agentes infecciosos (e.g piel, membranas mucosas, etc), determinados tipos celulares (e.g neutrófilos, macrófagos, células NK), determinadas proteínas (e.g cascada del complemento) y ciertos mecanismos como la fagocitosis y la inflamación (**Levinson, 2004**).

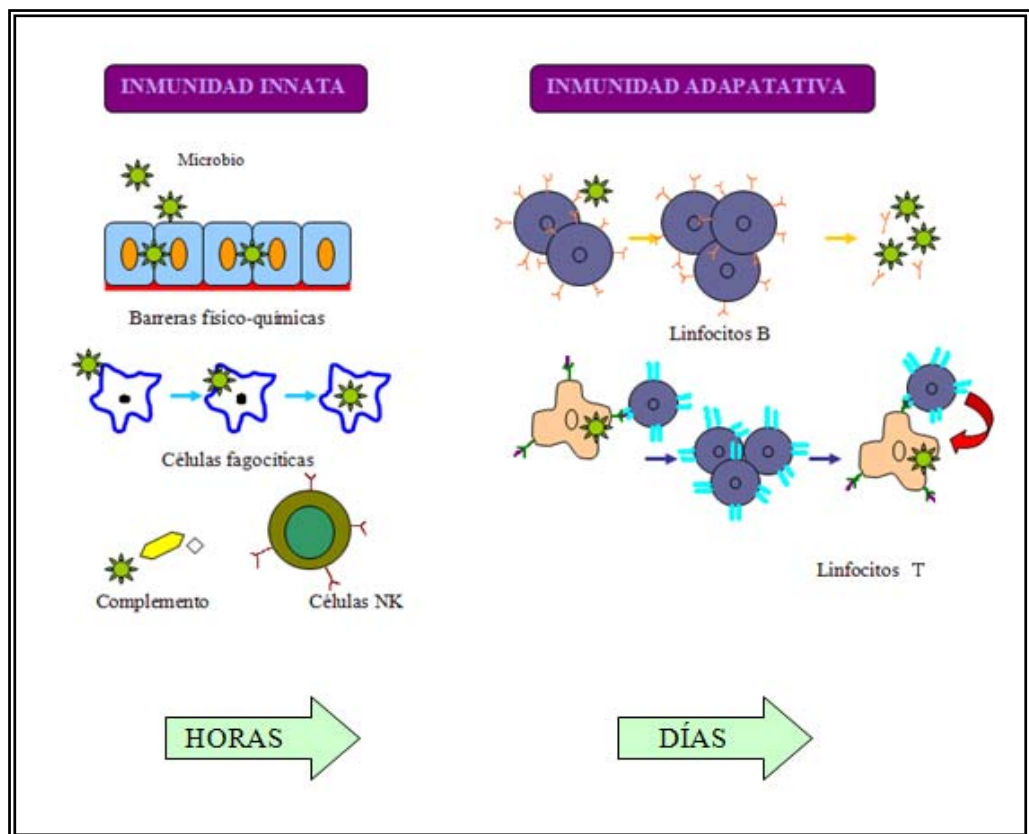
El sistema inmune adaptativo se caracteriza por ser más complejo. A diferencia del sistema inmune innato, se activa tras el contacto con un determinado agente extraño y su respuesta es tardía y se mide en término de días (Fig. 2).

El sistema inmune adaptativo puede reconocer patógenos específicos en forma más eficiente, gracias a que tiene la capacidad de discriminar entre distintos agentes extraños aunque prácticamente sean iguales. El poder de especificidad en el reconocimiento, se debe a que este tipo de inmunidad posee memoria, por lo tanto, el segundo contacto con el mismo antígeno produce una respuesta más fuerte y rápida, entregando una protección prolongada.

Este tipo de respuesta específica, es mediada por los linfocitos. Los linfocitos son de dos tipos: linfocitos B y linfocitos T.



Los linfocitos T, pueden ser linfocitos T colaboradores (Th), linfocitos T citotóxicos (Tc) y algunos autores también han propuesto los linfocitos T supresores/reguladores (Ts). La respuesta inmune específica, se considera que puede ser de dos tipos: humoral y celular. Se considera que cuando el elemento efector final son las inmunoglobulinas formadas por los linfocitos B se trata de una respuesta tipo humoral, mientras que cuando participan los linfocitos T, tanto los Th como los Tc, se trata de una respuesta tipo celular. Para que se inicie una u otra respuesta inmune se requiere el reconocimiento del antígeno y activación de los linfocitos. Los linfocitos B reconocen el antígeno mediante inmunoglobulinas de membrana (Igs) mientras que los linfocitos T lo reconocen mediante una estructura especializada, conocida como receptor de linfocitos T (TcR), (**Ortiz-Andrellucchi, 2007**).



**Fig. 2.-** Representación de los componentes del sistema inmune innato y adaptativo, y el tiempo de acción que tardan en responder ante una infección. Modificado de (<http://www.mednet.cl/medios/atencionprimaria/atencionprimariainfantil/CursoExtPedHSBAediciones2006/VacunasIDFig1.jpg>).

Como se mencionó anteriormente los mecanismos que intervienen en la inmunidad innata están muy conservados a nivel filogenético, por lo tanto están presentes en todos los organismos multicelulares, pero es importante destacar que las células y moléculas implicadas en la inmunidad adaptativa solamente están presente en los vertebrados (**Costa, 2008**).

#### **1.4 Sistema Inmunitario en Invertebrados.**

El conocimiento del sistema inmune es esencial para entender las estrategias de sobrevivencia y/o relaciones ecológicas entre ellos (**Cooper *et al.*, 2002**).

Los invertebrados comprenden la parte más importante del reino animal, representando aproximadamente el 95% de las especies conocidas, dentro de ellos los equinodermos representan el 0.5%, un porcentaje menor si se compara con los moluscos que representan un 10% respecto del total de organismos en el reino animal (**Lecointre y LeGuyader, 2001**).

#### Inmunidad celular y humoral

En general los invertebrados poseen un sistema inmunitario de defensa innato, el cual está constituido por componentes celulares y humorales.

- Mecanismos de defensa a nivel celular

El mecanismo de defensa a nivel celular está representado por células fagocíticas.

A finales del siglo XIX, Elie Metchnikoff, observó las células que se encuentran en el celoma perivisceral y en el tejido mesenquimal de los equinodermos. Metchnikoff, fue el primero en demostrar la encapsulación de un

cuerpo extraño insertado en un invertebrado, empleando la estrella de mar *Astropecten pentacanthus* (Smith *et al.*, 2006). Observó que al introducir una espina de rosal en la cavidad del cuerpo de la estrella, ésta era atacada por células móviles que se acercaban a la espina e intentaban defender a la larva mediante la ingestión del invasor en un proceso de fagocitosis (Beck y Habicht, 1996). De ahí en adelante Metchnikoff inició el estudio de la Teoría Fagocítica en inmunología celular, definiendo la **fagocitosis** como un mecanismo por el cual las células tienen la capacidad de absorber partículas alimenticias (Metchnikoff, 1891). Posteriormente se demostró que la fagocitosis constituye un mecanismo fundamental mediante el cual los organismos de todo el reino animal se defienden contra las infecciones.

Las células con capacidad fagocítica en los invertebrados se conocen como **celomocitos** o **hemocitos**, dependiendo de si el invertebrado posee o no cavidad celómica o hemocele.

El comportamiento de estas células se caracteriza por el cumplimiento de diversos procesos, comenzando por el reconocimiento de la partícula no propia y adherencia, a través del encuentro al azar entre la célula fagocítica y la partícula extraña o bien mediante quimiotaxis (respuesta a señales químicas). El reconocimiento de las partículas o agentes extraños se puede dar a través de los celomocitos, hemocitos o diversos PAMPs. Luego de la adherencia, se produce la ingestión de las partículas extrañas por medio de la formación de un fagosoma, finalmente se produce la digestión y destrucción de la partícula extraña mediante la activación de hidrolasas lisosomales.

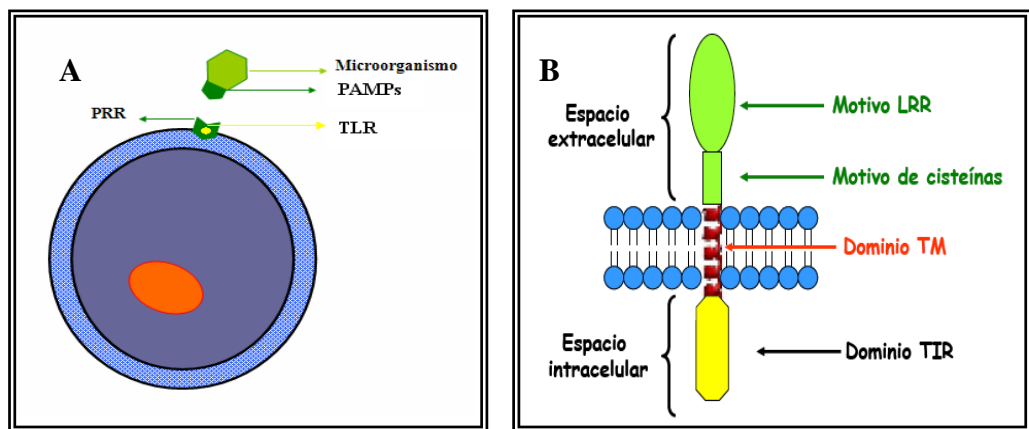
Junto a su capacidad fagocítica, los celomocitos y hemocitos tienen también una participación importante en la formación de nódulos y en la encapsulación de patógenos cuando la capacidad fagocítica se ve superada, ya sea por la excesiva cantidad de patógenos o por su gran tamaño como en el caso de protozoos. En este caso los fagocitos rodean a las partículas extrañas para impedir su diseminación constituyendo nódulos o encapsulándolas formando capas y produciendo

compuestos tóxicos. Finalmente, se sabe que los invertebrados tienen la capacidad de diferenciar los componentes propios de los no propios, poniéndose en manifiesto, por ejemplo, en el rechazo de los tejidos (**Kruse *et al.*, 1999**).

- Mecanismos de defensa a nivel humoral

Entre los componentes humorales, los invertebrados no poseen elementos específicos como los anticuerpos de los animales vertebrados, pero presentan sustancias producidas en su mayoría por los celomocitos o hemocitos como son: las opsoninas (proteínas con función opsonizante), aglutininas (sustancias con capacidad aglutinante, como las lectinas), sustancias con actividad lítica directa como proteínas formadoras de poros y factores similares a las citocinas (**Abbas y Litchman, 2000**).

Además de estos mecanismos, los invertebrados son capaces de reconocer estructuras conservadas asociadas a patógenos conocidas como Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs) (**Medzhitov y Janeway, 1997**). Los receptores celulares encargados del reconocimiento de los PAMPs se denominan Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRR), los cuales se han seleccionado en el transcurso de la evolución para reconocer estructuras o productos microbianos y de los que forman parte los receptores Toll (**Carrillo-Esper, 2003**) (Fig.3).



**Fig. 3.-** Representación de cómo la célula reconoce al microorganismo a través de los PAMP, mediante los PRR que se encuentran en la membrana de la célula (A). Representación esquemática de la estructura de un receptor tipo Toll (B), (**Obtenido de Costa, 2008**).

Los receptores tipo Toll (TLR por Toll-like receptor) son una familia de proteínas transmembranales que tienen una amplia representación en todo el reino animal, formando parte del sistema inmune. Sus funciones principales son el reconocimiento del patógeno y la estimulación de la respuesta inmune correspondiente (**Beutler, 2004**). Fueron descubiertos inicialmente en la mosca de la fruta, estableciéndose que eran parte fundamental de la inmunidad innata de la mosca para su defensa contra infecciones bacterianas y micóticas (**Anderson et al., 1985; Lemaitre et al., 1996**).

Los receptores Toll se caracterizan por poseer un dominio extracelular caracterizado por repeticiones de leucina (LRR) y un motivo flanqueante de cisteína, un dominio transmembrana (TM) y un dominio intracelular conocido como receptor toll/IL-1 (TIR) (**Abbas y Lichtman, 2000**).

Hasta el momento se han identificado diez miembros de la familia de receptores similares a toll (TLR1-TLR10) (**Moreno y Sánchez-Ibarrola, 2003**) donde cada uno de ellos reconoce una determinada estructura patrón presente en los microorganismos.

Otro componente humoral de la respuesta inmune innata es el sistema del complemento. Este sistema está formado por un conjunto de proteínas plasmáticas que se activan tras una estimulación por parte de microorganismos y promueven la destrucción de los mismos, así como los procesos de fagocitosis e inflamación (**Abbas y Litchman, 2000**). La activación de este sistema se puede dar a través de tres vías: la vía clásica, la vía alternativa y la vía de las lectinas. La primera de ellas se activa por medio de los inmunocomplejos formados por la Inmunoglobulina G o M (IgG o IgM) unidos al antígeno, por lo que sólo se da en vertebrados. La vía alternativa, descubierta más tarde, pero más primitiva filogenéticamente (**Dodds y Matsushita, 2007**), no requiere la presencia de anticuerpos para activarse, sino que se inicia por medio del reconocimiento de PAMPs presentes en la superficie de microorganismos y finalmente la más reciente, la vía de las lectinas no requiere la presencia de anticuerpos para

activarse, pero si una molécula conocida como lectina de unión a manosa que reconoce los carbohidratos presentes en la membrana plasmática de los microorganismos (**Fujita et al., 2004; Endo et al., 2006**).

Las tres rutas tienen un punto común que se centra en la ruptura proteolítica del C3 en C3a y C3b. El C3a es capaz de activar los procesos inflamatorios y el C3b se une covalentemente a la superficie del agente extraño sirviendo como opsonina para activar la fagocitosis. Posteriormente se genera una cascada de acontecimientos que terminan con la formación de un complejo de ataque lítico sobre la membrana del patógeno (**Abbas y Litchman, 2000**).

Entre los invertebrados, el sistema inmune innato más ampliamente estudiado es el de la mosca *Drosophila melanogaster*, la cual ha sido ampliamente utilizada como modelo para investigaciones genéticas, seguida por el filum de los artrópodos y moluscos, con el objetivo de optar a nuevos conocimientos sobre los mecanismos de defensa que están presentes en especies relacionadas directamente con el cultivo, ya que éstas debido al constante manejo, estrés, las altas densidades, se han descrito como las posibles causas de enfermedades. Además de estas razones, virus, bacterias y parásitos se han descrito como los responsables de la generación de varias enfermedades (**Bower et al., 1994**).

### **1.5 Sistema Inmunitario en el Erizo.**

Los equinodermos, son organismos deuterostomados, son exclusivamente marinos y bentónicos. A pesar de su aspecto, desde el punto de vista evolutivo es el grupo de organismos que se encuentra más próximo a los vertebrados.

Los equinodermos se clasifican en: **Holoturoídeos** (Pepinos de mar), **Asteroídeos** y **Ofiuroídeos** (Estrellas de mar) y **equinoídeos** (Erizos de mar).

Los equinodermos forman parte del grupo de los invertebrados y por lo tanto sus mecanismos de defensa contra los agentes extraños son activados a través del sistema inmunitario innato.

#### Células involucradas en el sistema inmunitario

Los celomocitos son los mediadores centrales de la respuesta inmune en los erizos, a través de la fagocitosis y la encapsulación de partículas extrañas, en conjunto con la degranulación de moléculas antimicrobianas (**Smith et al., 2006**). Estas células forman parte del fluido celómico de un sistema circulatorio presente en equinodermos adultos y larvas, estando presentes en la mayoría de los tejidos.

#### Inmunidad larval en erizos

Las larvas de los equinoideos mantienen la simetría bilateral, pero sus adultos presentan una simetría radial (pentámera). Tienen un endoesqueleto calcáreo de origen mesodérmico y púas. Tiene el celoma muy desarrollado. El desarrollo embrionario es indirecto con una larva pelágica nadadora.

En erizos, la larva pluteus es bilateral, con un esqueleto interno de calcita que sirve de apoyo a la estructura global de la larva, incluyendo el intestino, los espacios del blastocele y los brazos se extienden desde el lado oral del organismo. Los cilios cubren al animal concentrándose en bandas en la intersección de la parte oral y aboral del ectodermo. Estas bandas de cilios le permiten a la larva nadar y permanecer en el plancton cerca de la superficie y atrapar las partículas de alimento a través de la boca. Las larvas planctónicas comen una variedad de organismos, incluso bacterias, células simples y eucariotas multicelulares (**Smith et al., 2006**). Ambos, los embriones y las larvas viven en ambientes que cuentan con un potencial de agentes microbianos incluyendo a aquellos que son introducidos al intestino, por consiguiente, estos animales deben tener los

mecanismos para protegerse contra la colonización microbiana e invasión en los dos sitios de mayor potencialidad de entrada de patógeno: la superficie del ectodermo y el largo de la superficie interior del intestino (**Smith, 2005**).

En estadios tempranos del desarrollo embrionario de erizos, se ha logrado determinar actividad fagocítica sobre levaduras en células embrionarias mesenquimales (**Silva, 2000**), también se ha determinado que durante la gastrulación precursoras de células pigmentarias y después de diferenciarse son capaces de sintetizar una molécula denominada Equinocromo A que presenta actividad antibacteriana (**Castellani et al., 2003**).

#### Metamorfosis y celomocitos en erizos adultos

Las larvas de erizo de mar tienen desarrollo indirecto. Se alimentan de plancton durante semanas a meses en un proceso de desarrollo que sirve para la dispersión de las larvas a una gran distancia de los parentales en el bentos. Cuando las larvas han completado su estadía en el plancton, descienden al fondo marino en busca de un sustrato adecuado para la metamorfosis, este proceso transforma al animal de una larva bilateral a un juvenil pentameral. La anatomía del erizo de mar totalmente metamorfoseado es esencialmente igual que el adulto con la linterna de Aristóteles (aparato bucal), intestino y gónadas que son los órganos mayores en la cavidad del celoma. En el interior de la cavidad celómica se encuentra el fluido celómico que rodea los órganos y que es el que contiene los celomocitos.

Los celomocitos cumplen un rol fundamental en los invertebrados y están presentes en una variedad de clases, formas y colores, dependiendo del organismo (**Edds, 1993**). En equinodermos la literatura describe cuatro tipos de celomocitos: **fagocitos** (60-70%), **células vibrátiles** (15-20%), **células esferoidales rojas** (5-10%) y **células esferoidales incoloras** (5-10%) (**Johnson, 1969a; Bertheussen y Seljelid, 1978; Isaeva y Korenbaum, 1990**).



El número de celomocitos varía substancialmente entre especies y también algunos individuos de acuerdo al tamaño y condiciones fisiológicas (Smith, 1981; Laughlin, 1989; Isaeva y Korembaum, 1990; Edds, 1993; Chia y Xing, 1996; Gross *et al.*, 1999). Los fagocitos constituyen la mayor proporción de celomocitos que están involucrados en el rechazo de injertos, quimiotaxis, fagocitosis, encapsulación, expresión de genes inmunitarios, aglutinación y reacciones de agregación (Gross *et al.*, 1999; Gross *et al.*, 2000; Clow *et al.*, 2004 y Hillier y Vacquier, 2003).

### 1.5.1 Sistema Inmunitario en el erizo modelo *Strongylocentrotus purpuratus*.

En los últimos años, los estudios en equinodermos han aumentado el conocimiento científico en invertebrados e inmunología comparativa. Dentro de la clasificación de los erizos, el género *Strongylocentrotus* es uno de los más comprensivamente estudiados con respecto a la capacidad de defensa inmunológica particularmente en los adultos (Gross *et al.*, 1999).

En el erizo *Strongylocentrotus purpuratus*, se han estudiado y diferenciado una variedad de celomocitos basándose en su estructura. Reconociéndose cuatro tipos celulares: fagocitos, células vibrátiles, células rojas esferoidales y células incoloras esferoidales. Los fagocitos, a su vez se clasifican en tres sub-categorías: células discoidales, células poligonales y pequeños fagotitos (Fig.4).

Las **células discoidales**, se caracterizan por presentar un núcleo denso, citoplasma formado desprovisto de organelos, con estriaciones de actina, radiando desde el centro. Su función en el sistema inmune es la opsonización (Clow *et al.*, 2004), quimiotaxis y fagocitosis (revisado por Gross *et al.*, 2000).

Las **células poligonales**, se caracterizan por poseer un núcleo claro (granulado), organelos en el citoplasma, la actina se encuentra en paralelo a los bordes rectos de la célula. Su función en el sistema inmune es quimiotaxis, opsonización (Clow *et al.*, 2004), actividad antibacteriana debido a lisozimas

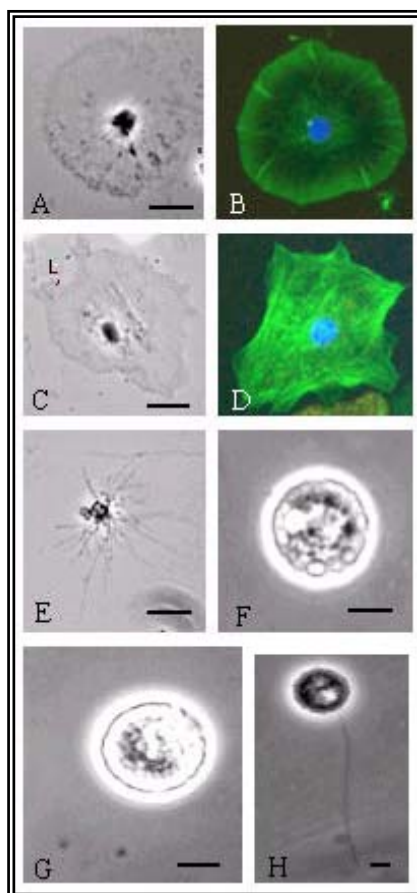
(Gerardi *et al.*, 1990), coagulación, encapsulación y rechazo de injertos (Revisado por Edds, 1993).

Los **fagocitos pequeños**, son más pequeños que las células discoidales y poligonales, citoplasma pequeño, pero su función es desconocida.

Las **células esferoidales rojas**, son ameboides, con inclusiones esféricas rojas, contienen el Equinocromo A, pigmento rojo que pertenece al grupo de las naftoquinonas y que le da el color característico a dichas células. El Equinocromo A es degranulado en presencia de bacterias (Johnson, 1969b) y tiene propiedades antimicrobianas contra las bacterias Gram positivas y Gram negativas (Service y Wardlaw, 1984; Gerardi *et al.*, 1990; Haug *et al.*, 2002). Las células esferoidales rojas aumentan alrededor de las lesiones y sitios de infección (Johnson, 1970; Coffaro e Hinegardner, 1977), sugiriendo que estas células y el Equinocromo A juegan un papel importante en la respuesta inmune en los erizos de mar adultos.

Las **células esferoidales incoloras**, son ameboides con inclusiones esféricas. Su función es desconocida a la fecha.

Las **células vibrátiles** son esféricas, poseen un solo flagelo que puede propulsarlos a través del fluido del celoma. Ellos han sido asociados con las reacciones de coagulación en respuesta a una lesión (Bertheussen y Seljelid, 1978).



**Fig. 4.-** Tipos de celomocitos en el erizo modelo *Strongylocentrotus purpuratus*. Imágenes de contraste de fases de células vivas, para un fagocito discoidal (A), fagocito poligonal (C), fagocito pequeño (E), célula esferoidal roja (F), célula esferoidal incolora (G) y célula vibrátil (H). Imágenes fluorescentes de un tipo de célula discoidal (B) y un tipo de célula poligonal (D). (Obtenido de Smith *et al.*, 2006)

A pesar de que los estudios con respecto a los mecanismos inmunitarios involucrados en invertebrados han aumentado últimamente, la información con respecto a ello en invertebrados marinos antárticos es limitada. Los escasos trabajos que existen han sido realizados principalmente en el contexto de la respuesta inflamatoria y la fagocitosis a bajas temperaturas (Silva *et al.*, 1998, 1999; Silva y Peck, 2000; Silva *et al.*, 2001).

Para la especie de erizo *Sterechinus neumayeri*, organismo central de este estudio, sólo se dispone de datos sobre los tipos de celomocitos y su capacidad fagocítica, estudiado por **Shimada y colaboradores (2002)**, quienes identificaron también cuatro tipos de celomocitos en esta especie de erizo estenotermo. Señalan además que la concentración de cada tipo de celomocitos varía entre los individuos y que la proporción de varios celomocitos de *Sterechinus neumayeri*, son similares a los descritos en *Strongylocentrotus droebachiensis* (**Bertheussen y Seljelid, 1978**), *Strongylocentrotus purpuratus* (**Johnson, 1969a**) y *Litechinus variegatus* (**Mangiaterra y Silva, 2001**).

### **1.6 Primer genoma secuenciado en equinodermos.**

La especie de erizo, *Strongylocentrotus purpuratus* ha sido uno de los organismos modelo más utilizados en biología, pero a pesar de su largo estudio, recientemente se cuenta con la secuencia de su genoma (**Sea Urchin Genome Sequencing Consortium, 2006**). El erizo marino representa el primer genoma secuenciado en equinodermos, que hasta donde se tiene conocimiento son los parientes más cercanos a los cordados, el grupo que incluye a los vertebrados.

El interés en secuenciar el genoma del erizo de mar, se debió a que este animal comparte un antepasado común con el ser humano. Comparando los genes del erizo de mar con la lista de los genes humanos, se puede apreciar cuáles de los genes humanos probablemente son innovaciones recientes en la evolución y cuáles son antiguos. La comparación también muestra que genes humanos han cambiado lentamente en nuestro linaje desde el más reciente ancestro común de humanos y deuterostomados, y cuáles están evolucionando con rapidez en respuesta a la selección natural.

Existe un gran interés en el sistema inmune del erizo y en ciertos genes que están involucrados en el reconocimiento de bacterias y patógenos, debido a que los erizos tienen un sistema inmune más sofisticado entre todos los animales

estudiados hasta ahora, el cual no se basa en anticuerpos, ya que la inmunidad innata en este caso, se refiere a un conjunto de proteínas que detectan aspectos únicos de una bacteria e informan a las células del organismo la presencia de agentes extraños. Ese grupo de proteínas en los erizos podría proporcionar nuevos instrumentos en la lucha contra muchas enfermedades infecciosas, además los erizos también tienen una enorme capacidad para enfrentar amenazas químicas en su ambiente mediante un conjunto de genes que pueden captar y eliminar esas amenazas (**Pearson, 2006**).

## 2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO

### **Objetivo general:**

El objetivo general de esta investigación es caracterizar a nivel celular y molecular la respuesta inmunitaria en el erizo antártico *Sterechinus neumayeri*.

### **Objetivos específicos:**

- Caracterizar la respuesta inmunitaria en el erizo antártico en el número y tipo de celomocitos.
- Analizar la expresión de algunos genes como la actina, factor inflamatorio allogénico tipo 1 (AIF-1) y la metalotioneína (MT) posiblemente implicados en la respuesta inmune en el erizo antártico, frente a la estimulación con bacterias muertas por calor (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhi*) y levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) a 24 y 48 horas.

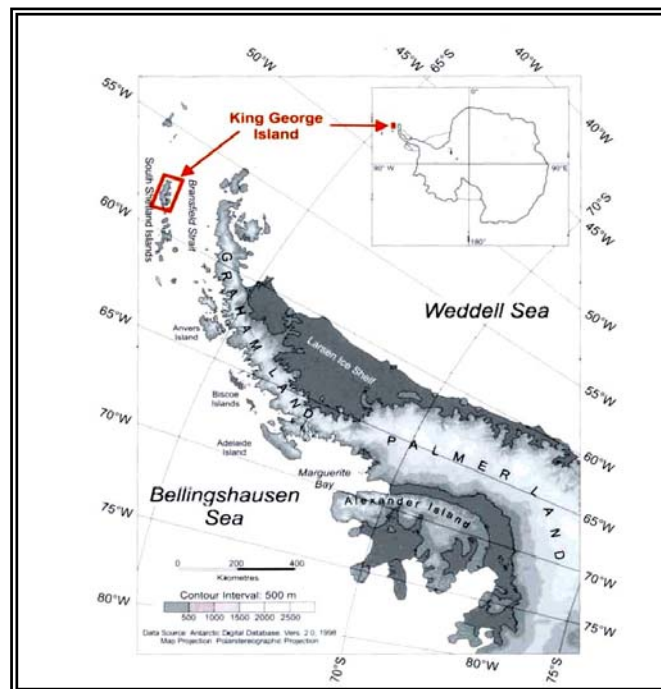
### **Hipótesis:**

Diversos patrones moleculares de patógenos pueden gatillar la respuesta inmunitaria del erizo *Sterechinus neumayeri*, generando una reacción de defensa a nivel celular y molecular demostrándolo con un aumento en la expresión de los genes relacionados con el sistema inmunitario innato, a pesar de las bajas temperaturas que existen en el medio marino antártico y que determinan que estos organismos posean un bajo metabolismo.

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1 Área de muestreo.

Como parte de la Expedición Científica Antártica de INACH en los veranos del 2008 y 2009 se realizaron experimentos de estimulación *in situ* de la respuesta inmunitaria en erizos. Estos se llevaron a cabo en la Bahía Maxwell (62° 15' S, 58° 55' W) que se encuentra localizada en la Isla Rey Jorge y pertenece a las Islas Shetland del Sur, en la Península Antártica (Fig. 5).

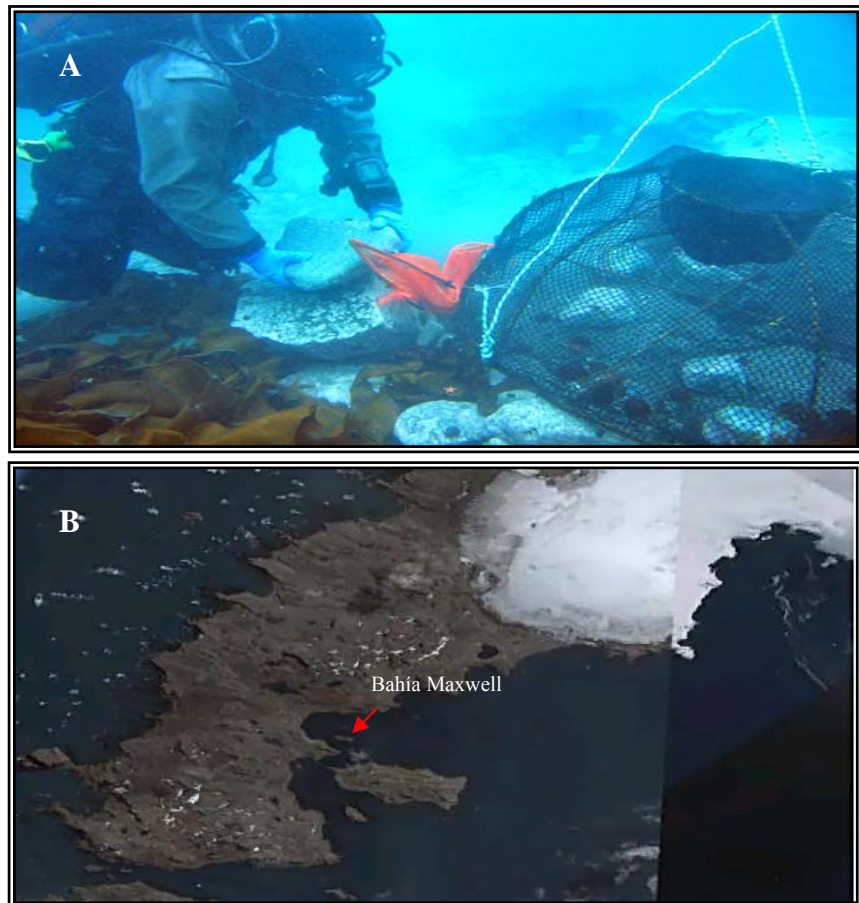


**Fig. 5.-** Península Antártica, a la izquierda costado superior se muestra en el rectángulo rojo la ubicación de la Isla Rey Jorge en las Islas Shetland del Sur.

### 3.2 Obtención de muestras y estimulación *in situ*.

Los erizos de mar *Sterechinus neumayeri* fueron colectados en el mes de febrero por medio de buceo autónomo ente los 6 y 8 metros de profundidad.

Para realizar la estimulación *in situ*, se procedió a disponer dos grupos de erizos uno experimental y otro control constituido por 20 individuos cada uno. Ambos grupos se dispusieron en dos “jaulas” (Fig.6A) a 6 metros de profundidad en la Bahía Maxwell (6B).



**Fig. 6.-** Jaula en la cual fueron colocados los erizos para la realización de la estimulación *in situ* (A). Mapa satelital de la Bahía Maxwell (62° 15' S, 58° 55' W), sitio en el que fue llevado a cabo el experimento (B).



Los erizos fueron estimulados con una mezcla de bacterias muertas por calor (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhi*) inyectando (200  $\mu$ l) en la cavidad celómica de los erizos a una concentración de  $1 \times 10^6$  cfu/ml.

Un segundo experimento se realizó con levaduras autoclavadas (*Saccharomyces cerevisiae*) con el mismo número de individuos y en las mismas condiciones del experimento anterior a una concentración de  $5 \times 10^7$  células/ml.

El experimento de estimulación con bacterias, se realizó tres veces cada uno de forma independiente entre los años 2008 y 2009, y el experimento de estimulación con levaduras, sólo se realizó en el verano del 2008.

### **3.3 Obtención y conteo de celomocitos.**

El fluido celómico fue colectado de 20 animales controles y estimulados a 24 y 48 horas post estimulación. Para ello se atravesó la membrana peristomal con una jeringa según el método utilizado por **Plytycz y Seljelid (1993)**. Posteriormente los celomocitos fueron cuantificados utilizando una cámara de Neubauer, contándose los celomocitos totales y las células esferoidales rojas.

### **3.4 Análisis de extracción de ARN y reacción de retrotranscripción.**

#### **3.4.1 Extracción de los ARNs totales.**

El fluido celómico obtenido de cada erizo fue centrifugado a 4000 rpm para separar el componente celular del plasmático. Los ARNs totales fueron extraídos desde los celomocitos utilizando el reactivo TRIZOL y siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen <sup>TM</sup>). Dicho protocolo consiste en la separación del ARN mediante extracción fenólica. El principio básico de la extracción fenólica es la desproteinización del homogeneizado celular (solución acuosa que contiene

los ácidos nucleicos) y la eliminación de los componentes no hidrosolubles mediante una separación de fases con distinta solubilidad (**Hernández *et al.*, 1995**).

La extracción de ARN, consistió en tres pasos:

### **1) Separación**

Se añadió 200 µl de cloroformo a cada tubo que contenía el ARN deseado y se agitó por 15 minutos en conjunto. Se dejaron a temperatura ambiente por 2 a 3 minutos, para posteriormente llevar los tubos a centrifugación por 15 minutos a una velocidad de 11441 rpm, a 8°C. Tras esta centrifugación se obtuvieron dos fases: una acuosa y superior y una orgánica e inferior.

### **2) Precipitado**

La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo para precipitar el ARN, para ello se añadió 500 µl de alcohol isopropílico. Cada tubo se agitó individualmente. Se dejaron a temperatura ambiente por 10 minutos y luego se centrifugó en las mismas condiciones que la centrifugación anterior, obteniendo como producto sobrenadante y un “pellet” en el fondo del tubo.

### **3) Lavado**

El sobrenadante se eliminó y el precipitado se lavó añadiendo 1 ml de etanol al 75%. Se agitó cada tubo y se centrifugaron esta vez por 5 minutos, a una velocidad de 7500 rpm, a 8°C. Finalmente se eliminó el etanol y se agregó 50 µl de agua ultrapura a cada tubo y se congeló a -20°C para su posterior cuantificación.

Para el éxito de la extracción y eliminar cualquier contaminación con ribonucleasas (ARNsas) que degradan el ARN durante y después de la extracción, se tomó precaución y se utilizaron guantes, tubos plásticos estériles y puntas con filtros.

### 3.4.2 Cuantificación de los ARNs totales.

Una vez extraído el ARN, se cuantificó utilizando un espectrofotómetro (UV-1603; UV-visible spectrophotometer Shimadzu), a través del cual se midió la cantidad de luz absorbida de la muestra a 260 nm y 280 nm longitud de onda. Se utilizaron cubetas UV desechables (BRAND, 500  $\mu$ l), una como control o blanco en la cual se agregó 100  $\mu$ l de agua ultra pura y otra(s) que contenían el ARN. En ella(s) se agregó 90  $\mu$ l de agua ultra pura y 10  $\mu$ l de la respectiva muestra de ARN. Una vez obtenido los valores de absorción de luz a 260 nm y 280 nm longitud de onda, se calculó el valor de R (Ec. 1), el cual nos indicó la calidad del ARN. Posteriormente se calculó la cantidad de ARN en  $\mu$ g por  $\mu$ l (Ec. 2) considerando el factor de dilución, el cual se obtuvo de acuerdo a la cantidad de agua y ARN que se le agregó a la cubeta (Ec.3).

$$R = A_{260} / A_{280} \quad (1)$$

$$\mu\text{g} / \mu\text{l} = A_{260} \times 40 \times \text{FD} \quad (2)$$

$$\text{FD} = \frac{\mu\text{l de agua} + \mu\text{l muestra ARN}}{\mu\text{l muestra ARN}} \quad (3)$$

Finalmente se observó la calidad del ARN a través de una cámara de electroforesis (Gel XL ultra V-2 Labnet) mediante un gel de agarosa al 1.5%, el cual fue posteriormente teñido con una solución de bromuro de etidio y visualizado finalmente a través de un transiluminador de UV.

### 3.4.3 Reacción de retrotranscripción (RT).

Tras la extracción de los ARNs fue necesario sintetizar el ADN complementario (ADNc) que sirve como sustrato para la PCR. El ADNc fue sintetizado a partir de 1 µg de ARN total.

La reacción de transcripción reversa (RT) se realizó utilizando 1 µl de los partidores de oligo-dT (Invitrogen™) que reconocen la cola de polyA de la cadena de ARN y que se une a ellas por complementariedad de bases, para lo cual se añadió además 1 µl de dNTP. Los componentes de dicha reacción fueron introducidos en tubos de PCR, que finalmente se ubicaron en el termociclador (Eppendorf Marter Cycle, capacidad 25 tubos). En él, la mezcla se calentó a 65°C por 5 minutos, posteriormente se enfrió en hielo y se añadió a las muestras 7 µl de la mezcla de reacción (Invitrogen™) que contenía 4 µl de tampón 5X, 2 µl de DTT y 1 µl de agua ultra pura, más 1 µl de la enzima transcriptasa reversa M-MLV. Los tubos se ubicaron nuevamente en el termociclador, continuando con el programa que consiste en 37°C por 59 minutos, 72°C por 15 minutos, seguida por una extensión final de 72° por 10 minutos. El programa para la reacción de transcripción reversa consistió en 30 ciclos.

### 3.5 Análisis de la expresión de genes.

Se diseñaron ocho juegos de partidores: Actina 1 (diseñados para amplificar la actina del ostión del norte), Actina 2 (diseñados para amplificar la actina del Halibut del atlántico), Metalotioneína, Trombospondina, Factor inflamatorio tipo1, Lectina (Sp056), TNF alfa y Galectina 9, a partir de regiones conservadas en genes ya descritos en el erizo *Strongylocentrotus purpuratus*. Para ello se ingresó el código del gen específico perteneciente a una lista de ESTs (Nair *et al*, 2005), y se utilizó el servidor PubMed de la página NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucore&itool=toolbar>) para recuperar la secuencia de nucleótidos. Posteriormente las secuencias obtenidas se

tradujeron virtualmente de ADN a proteína, a través de la herramienta de TRANSLATE del servidor ExPASy. Las secuencias de aminoácidos se alinearon con el programa ClustalW (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>). Finalmente se utilizó el programa Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), para el diseño de los respectivos partidores, según el gen de interés (Tabla 1).

**Tabla 1:** Secuencias de partidores diseñados a partir de regiones conservadas de genes descritos en el erizo *Strongylocentrotus purpuratus*.

Genes	Sentido	Secuencia de Partidores 5'-3'	Tamaño amplicón (bp)	T <sub>m</sub> (°C)
Actina 1 (Ostión)	Forward	CCTTTACGCCAACACTGTCC	200	56
	Reverse	CACCGATCCAGACGGAGTAT		56
Actina 2 (Halibut)	Forward	ATCGTGGGGCGCCCCAGGCACC	550	80
	Reverse	CTCCTTAATGTACGCACGATTTTC		64
Metalotioneína	Forward	GACGTGCTCTAAGCCCAGAC	300	60
	Reverse	TCACAATGAGACCCACCGTA		61
Trombospondina	Forward	CACCATGCCTGATGTCAAGT	200	60
	Reverse	TGTCTGCTTGGAGCATGTTG		60
Factor inflamatorio alogénico tipo 1 (ALLO)	Forward	ACGGAAGTGGAAACCATCAAC	200	60
	Reverse	CAGATGTGGAGCAGCGTAAA		60
Lectina (Sp056)	Forward	GCACAGCCAGCAACCAGCACTACAAT	640	71
	Reverse	ACGCCGATGGGTTCTACAGTGAAGGT		70
TNF alfa	Forward	CCCTACCCAGGGGAAAATAA	200	60
	Reverse	TGTTGGTAGCTTGCTGGTTG		60
Galectina 9	Forward	CAGCTTCCATTTGTGCTGAA	200	60
	Reverse	AGTGCAGGGCTACGTCTGAT		60

### **3.5.1 Análisis de expresión génica mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

La PCR conocida así por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction), es un método que se utiliza para amplificar de un modo eficiente y rápido fragmentos de ADN mediante la enzima Taq DNA polimerasa. Sin embargo, la Taq polimerasa sólo es capaz de sintetizar ADN a partir de un molde de ADN, por esta razón fue necesario generar primero una cadena de ADNc (**Hernández *et al.*, 1995**), proceso descrito anteriormente.

Las condiciones para la reacción de la cadena de polimerasa (PCR), fueron las siguientes; la mezcla de reacción (25 ul) contenía: 18,7 ul de agua ultra pura, 2,5 ul tampón 10X, 0,8 ul MgCl<sub>2</sub>, 0,5 ul dNTP'S, 0,5 ul de cada partidor, 0,5 ul Taq ADN polimerasa y 1ul de ADN.

El programa de amplificación consistió en 10 minutos a 94°C, seguidos por 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto y finalmente una etapa de elongación de 72°C por 7 minutos, para todos los juegos de partidores.

A partir de las fotos de geles de agarosa obtenidas, tanto de erizos estimulados con bacterias y/o levaduras a 24 y 48 horas respectivamente, se cuantificó la expresión de los tres genes en estudio: ACT, AIF-1 y MT, a través del programa de análisis de imagen denominado como ImageJ versión 1.41, a través del cual se calculó el promedio de acuerdo a los píxeles de la imagen utilizando una escala de valores de grises dentro de la selección, representados en unidades arbitrarias (UA). Para ello se realizó un triplicado de cada uno de los genes.

Los datos obtenidos fueron graficados a través del Programa SigmaPlot v 10.0, tanto para erizos estimulados con bacterias y levaduras a 24 y 48 horas.

### **3.6 Clonaje y secuenciación del ADNc del factor inflamatorio alógeno tipo 1 (AIF-1) del erizo antártico *Sterechinus neumayeri*.**

#### **3.6.1 Estrategia de amplificación por PCR del gen AIF-1.**

Los partidores fueron diseñados a partir de la secuencia ADNc de AIF-1 del erizo modelo *Strongylocentrotus purpuratus* disponible en GenBank. En esta base de datos existen dos secuencias nucleotídicas virtuales que codifican para el gen del AIF-1 en el erizo (CV652693 y XM\_001199136.1). A partir de la primera secuencia se diseñó un juego de partidores, para lograr la amplificación parcial del gen respecto de su marco de lectura abierto (Open Read Frame) y de la región 5' no traductora (UTR): ALLO FW: 5'-ACGGAAGTGGAACCATCAAC-3' y ALLO RV: 5'-CAGATGTGGAGCAGCGTAAA-3, respectivamente. La segunda secuencia es similar a la anterior, la diferencia es que esta proviene de un análisis computacional automático que deriva de una secuencia genómica (NW001338811), para lo cual se utilizó un método de predicción de genes GNOMON, apoyada por evidencias de etiquetas de secuencias expresadas (Expressed Sequence Tags (EST)). A través de esta segunda secuencia se diseñaron tres juegos de partidores para intentar la amplificación completa de todo el marco de lectura abierto (ORF) de AIF-1 del erizo antártico *Sterechinus neumayeri* (ALLO4 FW: 5'-TGTCACAAAGAGGGGGAAA-3'; ALLOCONS FW: 5'-GTGCAAGGTGGCAAGCAA-3'; ALLO3 FW: 5'-GGCAAACAAAA GCAAGTGG-3'; ALLO RV: 5'-CAGATGTGGAGCAGCGTAAA-3') (Tabla 2).

Para observar la respuesta inmunitaria en el erizo antártico *Sterechinus neumayeri*, como se mencionó anteriormente, se utilizó la secuencia original de ADNc de AIF-1 del erizo modelo *Strongylocentrotus purpuratus* (Fig.7).

GGNCGCGCNCCGGCGGATCGACACNAGTTGGTATCCNCCNCNNTTNNGTACGAGCAAG	60
GCCNNGGNAGTTCAAATGCCTTCGNTACAACNCCTTTATGGATTCAAACGTGCAAGGTG	120
GCAAGCAATGGGGACAGGCNAAACAAAAGCAAGTGAAGAGATAGATGACGAAATCGAGA	180
CCATTATCACACAAAACCTTTATATCCNGAGGTTGAAGAATTAGAAGAGAAAATTAGCAGCA	240
TATAAAGACCAATTTATAACATACGATCTCGATGGCAGTGGAGACCTCGATGACAATGAC	300
GTGAGGGTGATGATGGAGAAGTTGGGTCAACCAAAGAACCAGATAGAGATCAGAAAGATG	360
<b>FW ALLO →</b>	
ATCAAAGAAATTGACCTTAACGGAAGTGAACCATCAACTACAAAGAGTTTGTACATATG	420
ATGCTGGGCGGCAAGAGCAGCATTATGAGAATGATACTCATGTTCNAGGAGAAGATGAAA	480
GCAAAGAGATACCCACTGGCCTACCCCCAAAGAAAAGCTTCTCAGATCTTCCTTGAAAC	540
TGATCCACAATTAATCANTATGCAATTTTATTCTGCTATAATTATTTTATTTTATTTTC	600
<b>← RV ALLO</b>	
TACATTTTACGCTGCTCCACATCTGTATNAATCACGCANGGGTGTNTATANGGGGTATAT	660
GGAATGTACGGTGCCNCCGAAANTNACTATCNNTGCGTGCTTCTTTTATNNTGCNTGNCT	720
CNATAAATCTANGCCCCGNCGACCCACCCACATTTTCTGCNCTGNGNNTNCAATANCG	780
CTCNTNTGNCCNNNCAGGGNCTTTTCCNCT	810

**Fig. 7.-** Secuencia original de ADNc de AIF-1 del erizo modelo *Strongylocentrotus purpuratus* (número de acceso CV652693), esta secuencia no es de buena calidad ya que presenta varias N. La localización de los partidores se indica como ALLO (FW) Y ALLO (RV) respectivamente, estos amplifican un fragmento de 200 pb. Los números en la derecha indican la posición de los nucleótidos.

Para lograr amplificar la secuencia completa del ADNc de AIF-1 en el erizo antártico *Sterechinus neumayeri*, se utilizó la secuencia de ADNc de AIF-1 que deriva de la original del erizo modelo *Strongylocentrotus purpuratus* (Fig. 8).



GCTTTGGAGCATATCAGGGCCATCATCATATTCTGTTACACATCCAGGCGGGATAAGAAT	60
ATCGCAAAGTGGTGGTGGCGAGAAAAGAGAGACACACCAAAAAGAAGAAGGACGGATGTC	120
GCCGAAATAGCGCATTGTAATTACACATCGCGTATAAGTGGTGGAAAAGGGGAAGTGCCA	180
GAGTGTATATGCAAACCGAGCACAGTTGTATAGTAGACAGAAAACGCACGTGCTGGTGTAC	240
FW ALLO 4 →	
TGGAGTGTCAACAAAGAGGGGGAAAA	300
GAAAAATTCATTCTGAGTATTGCATTTGAGGAACAAGGAAGCAATTCAAAATGCCTCGTA	360
FW ALLO CONS →	
CAACTTTTGATCGTTTGAACGTGCAAGGTGGCAA	420
AAGTGG	480
TTGAAGAATTAGAAGAGAAATTAGCAGCATATAAAGACCAATTTATAACATACGATCTCG	540
ATGGCAGTGGAGACCTCGGTAAGATCCTCATGTTTCGAGGAGAAGATGAAAGCAAAAGAGA	600
TACCCACTGGCCTACCCCCAAAGAAAAGCTTCTCAGATCTTCCTTGA	660

**Fig. 8.-** Secuencia de ADNc de AIF-1 que deriva de la secuencia original del ADNc de AIF-1 del erizo modelo *Strongylocentrotus purpuratus* (número de acceso XM\_001199136.1). La localización de los partidores se indica como ALLO 4 (FW); ALLO CONS (FW) y ALLO 3(FW) respectivamente. Los números en la derecha indican la posición de los nucleótidos.

Esta vez, se utilizaron erizos individuales estimulados con bacterias muertas por calor. Las condiciones para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), fueron las siguientes; la mezcla de reacción (25 µl) contiene: 18,7 µl de agua ultra pura, 2,5 µl tampón 10X, 0,8 µl MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl dNTP'S, 0,5 µl de cada partidor, 0,5 µl Taq ADN polimerasa y 1µl de ADN.

La amplificación de la PCR fue realizada con 30 ciclos a 94° por 1 minuto, a 60° por 1 minuto y a 72° por un minuto, seguida por una extensión final de 72° por 7 minutos.

El producto de PCR se visualizó, a través de una cámara de electroforesis (Gel XL ultra V-2 Labnet) mediante un gel de agarosa al 1.5%, el cual fue posteriormente teñido con una solución de bromuro de etidio y visualizado finalmente a través de un transiluminador UV.

De los tres juegos de partidores, sólo se logró amplificar uno de ellos, denominado ALLO4, cuya codificación correspondería a la secuencia completa del ADNc de AIF-1 del erizo antártico *Sterechinus neumayeri*.

**Tabla 2:** Secuencias de partidores diseñados a partir del ADNc de AIF-1 del erizo *Strongylocentrotus purpuratus* (CV652693.1- XM\_001199136.1), para lograr la amplificación del ADNc de AIF-1 del erizo antártico *Sterechinus neumayeri*.

Genes	Sentido	Secuencia de Partidores 5'-3'	Tamaño amplicón (bp)	T <sub>m</sub> (°C)
Factor inflamatorio alogénico tipo 1 (ALLO)	Forward	ACGGAAGTGAACCATCAAC	200	60
	Reverse	CAGATGTGGAGCAGCGTAAA		60
ALLO4 ALLO	Forward	TGTCAACAAAGAGGGGAAA	648	60
	Reverse	CAGATGTGGAGCAGCGTAAA		60
ALLOCONS ALLO	Forward	GTGCAAGGTGGCAAGCAA	513	62
	Reverse	CAGATGTGGAGCAGCGTAAA		60
ALLO3 ALLO	Forward	GGCAAAACAAAAGCAAGTGG	487	61
	Reverse	CAGATGTGGAGCAGCGTAAA		60

### 3.6.2 Clonación del ADNc de AIF-1 del erizo antártico *Sterechinus neumayeri*.

Para obtener dicha secuencia, el producto de PCR (ALLO4) fue clonado dentro un vector PCR 2.1 TOPO (Invitrogen™). La mezcla de reacción (6µl) contuvo 2µl del producto de PCR, 1µl de solución salina, 2 µl de agua ultra pura y 1µl del vector topo. Se añadió 2 µl de la reacción de clonación a las células competentes (*Escherichia coli*) y se incubó en hielo por 15 minutos. Posteriormente a las células competentes se les indujo a un choque de calor a 42°C por 30 segundos.

Luego sobre el hielo se les añadió 250 µl de medio SOC. Finalmente se crecieron a 37°C por 24 horas, en agitación, para después sembrar 50 - 100 µl en placas de kanamicina (50 µg/µl). Después de 24 horas se observó crecimiento de cuatro colonias en las placas cultivadas con 100 µl, se procedió a realizar crecimiento de las mismas, pero esta vez en medio líquido. Para ello se añadió en cuatro tubos falcon de 15 ml, 10 ml de medio LB, 10 µl de kanamicina (50 µg/µl) y parte de la colonia respectiva (enumeradas del 1-4) y se dejaron crecer a 37°C por 24 horas, en agitación.

Para recuperar el plásmido que contenía la secuencia de ADNc de AIF-1, se realizó una MiniPrep siguiendo las instrucciones del fabricante (Fermentas) para posteriormente ser secuenciado. Para asegurarnos de haber obtenido el ADN desde la MiniPrep, se cargaron 10 µl de cada muestra (plásmido 1-4) más 2 µl de SYBR green y se visualizó posteriormente a través de un gel de agarosa al 1,5% en un transiluminador.

### **3.6.3 Secuenciación y análisis del ADNc de AIF-1 del erizo antártico *Sterechinus neumayeri*.**

El análisis de secuenciación de ADN, consistió en la aplicación de un kit (Applied Biosystem) denominado Big Dye terminador versión 3.1 (BDT v 3.1), en un secuenciador automático de ADN (Applied Biosystems), modelo 3130 XL, el cual es manejado a través de un software llamado, Sequencing analysis. La búsqueda de homologías de secuencias fue realizada con el algoritmo de BLAST de la página de NCBI (<http://www.ncbi.gov./Blast>). Las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron traducidas virtualmente por el programa translate del servidor ExPASy. Finalmente las secuencias aminoacídicas fueron alineadas con ClustalX (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>). Los árboles filogenéticos fueron construidos en base a los alineamientos de secuencias de aminoácidos (ClustalX v 2.0) por neighbour-joining desde el programa Mega v 4.1.

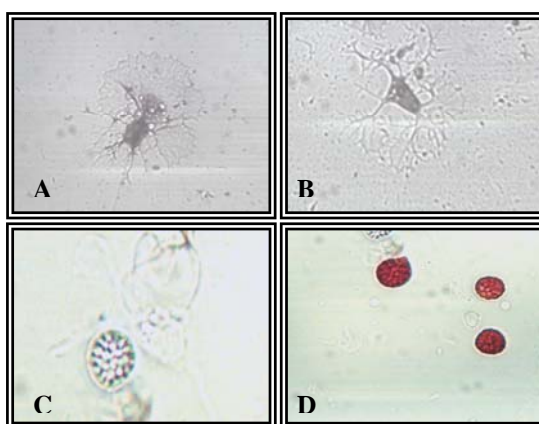
### **3.7 Análisis estadísticos**

Dentro de los análisis estadísticos se realizó un análisis de varianza ANOVA, considerándose significativo cuando  $P < 0,05$  y un ensayo de comparaciones múltiples (Duncan), en los análisis de conteo de celomocitos totales y células esferoidales rojas entre las condiciones de estimulación y control. Además se realizó un ensayo de Student's, en los análisis de expresión de genes, considerándose significativo cuando  $P < 0,05$  entre las condiciones de estimulación y control, para cada uno de los genes en estudio. Todo esto se realizó, a través del Programa Statistica v 7.0.

#### 4. RESULTADOS

##### 4.1 Conteo y función en el sistema inmunitario de los celomocitos en el erizo antártico *Sterechinus neumayeri*.

Tras la extracción y conteo de los celomocitos en el erizo antártico fue posible identificar todos los tipos celulares descritos por **Shimada *et al.*, 2002**: Fagocitos, células esferoidales incoloras, células esferoidales rojas y células vibrátiles (Fig.9).



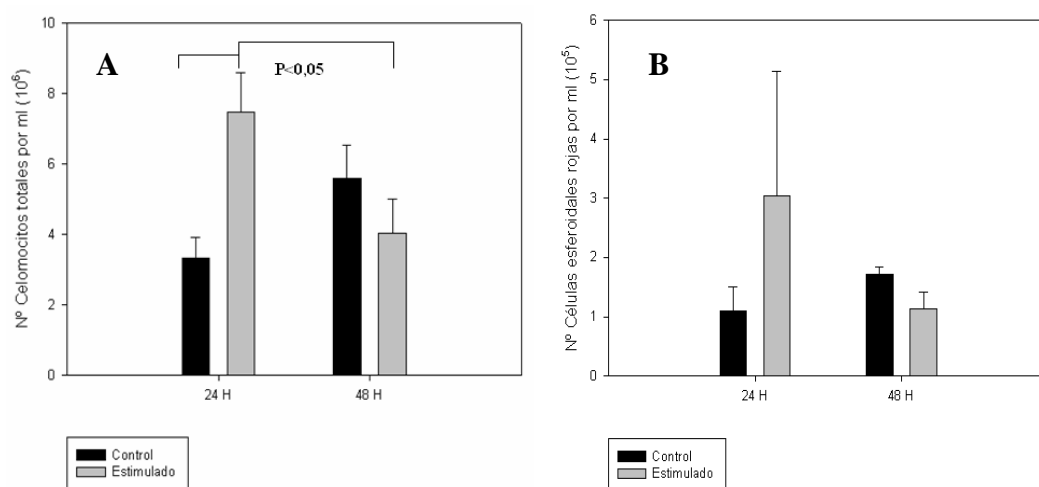
**Fig .9.-** Algunos tipos de celomocitos en el erizo antártico *Sterechinus neumayeri* obtenidos desde la cavidad celómica. Fagocito (A), Fagocito (B), Célula esferoidal incolora (C), Célula esferoidal roja (D).

Los resultados indican que el número de celomocitos totales aumentó en los erizos estimulados con bacterias con respecto a los erizos controles, luego de las 24 horas post estimulación. Igual fenómeno se observó en un tipo celular denominada células esferoidales rojas. Después de 48 horas los valores tenderían a una estabilización en el número de celomocitos (Fig.10).

La concentración de los celomocitos totales (Fig.10A), aumentó significativamente ( $P < 0.05$ ), entre los erizos controles y en los erizos estimulados luego de las 24 horas (promedio  $3,34 \pm 0,57 \times 10^6$  células/ml, promedio  $7,47 \pm 1,13 \times 10^6$  células/ml, respectivamente). Luego de las 48 horas, hubo una disminución no significativa ( $P > 0.05$ ) en la concentración de

celomocitos totales, entre los erizos controles y los erizos estimulados (promedio  $5,59 \pm 0,96 \times 10^6$  células/ml, promedio  $4,02 \pm 0,98 \times 10^6$  células/ml, respectivamente), sin embargo se observó una disminución significativa ( $P < 0.05$ ) entre los erizos estimulados luego de las 24 y 48 horas post estimulación (Tabla 5B).

En relación a la concentración de células esferoidales rojas (Fig.10B), no hubo un aumento significativo ( $P > 0.05$ ), entre los erizos controles y los erizos estimulados luego de las 24 horas (promedio  $1,09 \pm 0,41 \times 10^5$  células/ml, promedio  $3,04 \pm 2,09 \times 10^5$  células/ml, respectivamente). De igual forma, luego de las 48 horas no hubo una disminución significativa ( $P > 0.05$ ) en la concentración de células esferoidales rojas, entre los erizos controles y los erizos estimulados (promedio  $1,72 \pm 0,12 \times 10^5$  células/ml, promedio  $1,14 \pm 0,28 \times 10^5$  células/ml, respectivamente) (Tabla 6B).

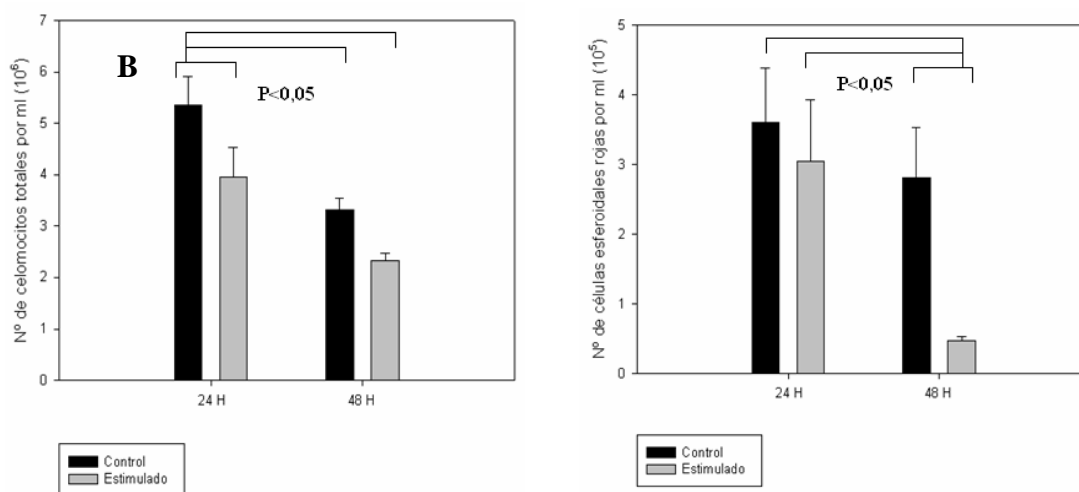


**Fig. 10.-** Celomocitos totales (A) y células esferoidales rojas (B), en erizos estimulados con bacterias muertas por calor (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhi*). Se realizó un análisis de varianza ANOVA, considerándose significativo cuando  $P < 0,05$  y un ensayo de comparaciones múltiples (Duncan) entre las condiciones de estimulación y control, a través del Programa Statistica v 7.0.

En levaduras no se observó un aumento celular en los erizos estimulados, respecto de los erizos controles, tanto para celomocitos totales, como para las células esferoidales rojas (Fig. 11).

La concentración de los celomocitos totales (Fig.11A), presentó una disminución significativa ( $P < 0.05$ ), entre los erizos controles y los erizos estimulados luego de las 24 horas post estimulación (promedio  $5,35 \pm 0,56 \times 10^6$  células/ml, promedio  $3,95 \pm 0,59 \times 10^6$  células/ml, respectivamente), por el contrario, luego de las 48 horas no hubo una disminución significativa ( $P > 0.05$ ), entre los erizos controles y los erizos estimulados (promedio  $3,31 \pm 0,23 \times 10^6$  células, promedio  $2,32 \pm 0,15 \times 10^6$  células/ml, respectivamente), sin embargo si se observó una disminución significativa ( $P < 0.05$ ) entre los erizos controles luego de las 24 horas y entre los erizos controles y estimulados luego de las 48 horas (Tabla 7B).

La concentración de células esferoidales rojas (Fig.11B), presentó una disminución no significativa ( $P > 0.05$ ), entre los erizos controles y los erizos estimulados luego de las 24 horas post estimulación (promedio  $3,602 \pm 0,790 \times 10^5$  células/ml, promedio  $3,052 \pm 0,872 \times 10^5$  células/ml, respectivamente), por el contrario, luego de las 48 horas si hubo una disminución significativa ( $P < 0.05$ ) entre los erizos controles y los erizos estimulados (promedio  $2,81 \pm 0,72 \times 10^5$  células/ml, promedio  $0,47 \pm 0,06 \times 10^5$  células/ml, respectivamente), además se observó una disminución significativa entre los erizos estimulados luego de las 48 horas y entre los erizos controles y estimulados luego de las 24 horas (Tabla 8B).



**Fig. 11.-** Celomocitos totales (A) y células esferoidales rojas (B) en erizos estimulados con levaduras autoclavadas (*Saccharomyces cerevisiae*). Se realizó un análisis de varianza, ANOVA, considerándose significativo cuando  $P < 0,05$  y un ensayo de comparaciones múltiples (Duncan) entre las condiciones de estimulación y control, a través del Programa Statistica v 7.0.

#### 4.2 Expresión de genes en celomocitos de *Sterechinus neumayeri*.

Se diseñaron seis juegos de secuencias de partidores a partir de regiones conservadas de genes descritos en el erizo *Strongylocentrotus purpuratus* (Tabla 3) que estarían implicados en la generación de una respuesta inmunitaria en el erizo. La actina se amplificó utilizando partidores sintetizados para la actina del ostión del norte (*Argopecten purpuratus*) y el halibut del atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*).

**Tabla 3:** Secuencias de partidores diseñados a partir de regiones conservadas de genes descritos en el erizo *Strongylocentrotus purpuratus*.

Genes	Sentido	Secuencia de Partidores 5'-3'	Tamaño amplicón (bp)	Tm (°C)	Reacción PCR
Actina 1 (Ostión)	Forward	CCTTTACGCCAACACTGTCC	200	56	+/- (Débil)
	Reverse	CACCGATCCAGACGGAGTAT		56	
Actina 2 (Halibut)	Forward	ATCGTGGGGCGCCCCAGGCACC	550	80	+ (Fuerte)
	Reverse	CTCCTTAATGTACGCACGATTC		64	
Metalotioneína	Forward	GACGTGCTCTAAGCCCAGAC	300	60	+
	Reverse	TCACAATGAGACCCACCGTA		61	
Trombospondina	Forward	CACCATGCCTGATGTCAAGT	200	60	-
	Reverse	TGTCTGCTTGGAGCATGTTG		60	
Factor inflamatorio alogénico tipo 1 (ALLO)	Forward	ACGGAAGTGGAAACCATCAAC	200	60	+
	Reverse	CAGATGTGGAGCAGCGTAAA		60	
Lectina (Sp056)	Forward	GCACAGCCAGCAACCAGCACTACAAT	640	71	+/-
	Reverse	ACGCCGATGGGTTCTACAGTGAAGGT		70	
TNF alfa	Forward	CCCTACCCAGGGGAAAATAA	200	60	-
	Reverse	TGTTGGTAGCTTGCTGGTTG		60	
Galectina 9	Forward	CAGCTTCCATTTGTGCTGAA	200	60	-
	Reverse	AGTGCAGGGCTACGTCTGAT		60	

Con estos partidores tras ser sometido el ADNc a la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) se logró obtener una fuerte amplificación en tres de estos ocho genes, ellos son: la Actina 2 (Halibut), Metalotioneína y el factor inflamatorio alogénico tipo 1. Por esta razón, se decidió trabajar con los tres genes anteriormente nombrados para analizar la respuesta inmunitaria a través de la

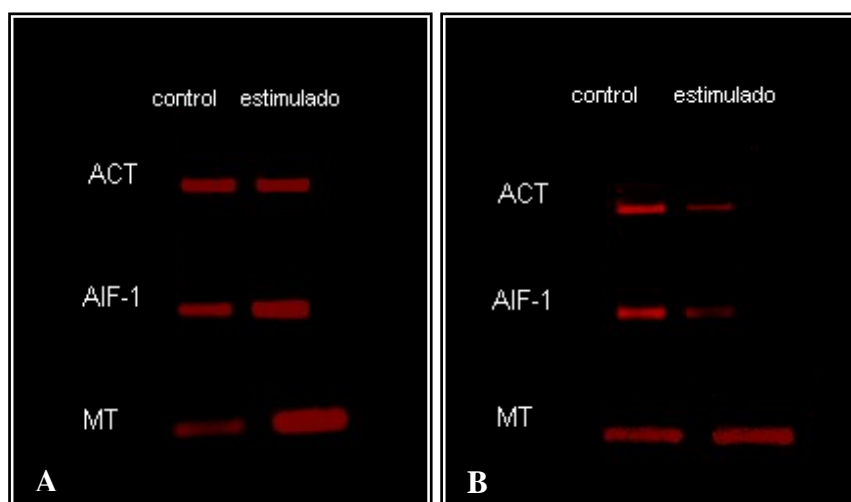


expresión génica mediante PCR en celomocitos de erizos estimulados con bacterias y levaduras.

#### 4.2.1 Análisis de expresión génica por PCR en celomocitos de erizos estimulados con bacterias y levaduras.

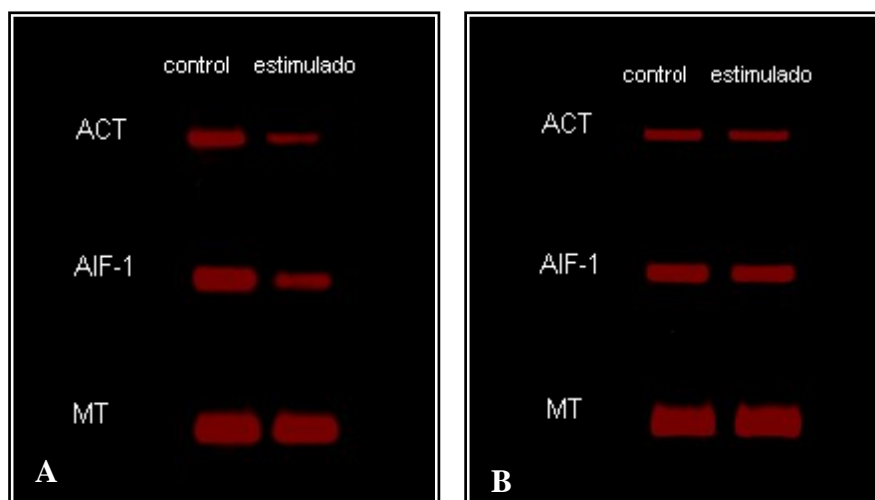
Se observó a través del análisis semicuantitativo de la PCR tradicional, la expresión de los tres genes en estudio: Actina, Factor inflamatorio alogénico tipo 1 y Metalotioneína en celomocitos en el erizo antártico *Sterechinus neumayeri* sometidos a la estimulación con bacterias y levaduras a 24 y 48 horas.

Con respecto a los erizos estimulados con bacterias (Fig.12), luego de las 24 horas post estimulación, el análisis muestra claramente una amplificación constante en el gen de la actina y una mayor amplificación en el gen del factor inflamatorio alogénico tipo 1 y la metalotioneína, entre los erizos que fueron estimulados con respecto a los erizos controles (Fig.12A). Luego de las 48 horas post estimulación, el análisis muestra una disminución en la amplificación del gen de la actina y el factor inflamatorio alogénico tipo 1 y una amplificación constante en el gen de la metalotioneína entre los erizos estimulados con respecto a los erizos controles (Fig.12B).



**Fig. 12.-** Expresión de la ACT, AIF-1 y MT en erizos estimulados con bacterias muertas por calor (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhi*) a 24 (A) y 48 (B) horas.

Con respecto a los erizos estimulados con levaduras (Fig.13), el análisis muestra una menor amplificación en los tres genes entre los organismos que fueron estimulados en comparación a la amplificación de los organismos controles, tanto luego de las 24 horas post estimulación (Fig.13A) como luego de las 48 horas post estimulación (Fig.13B).



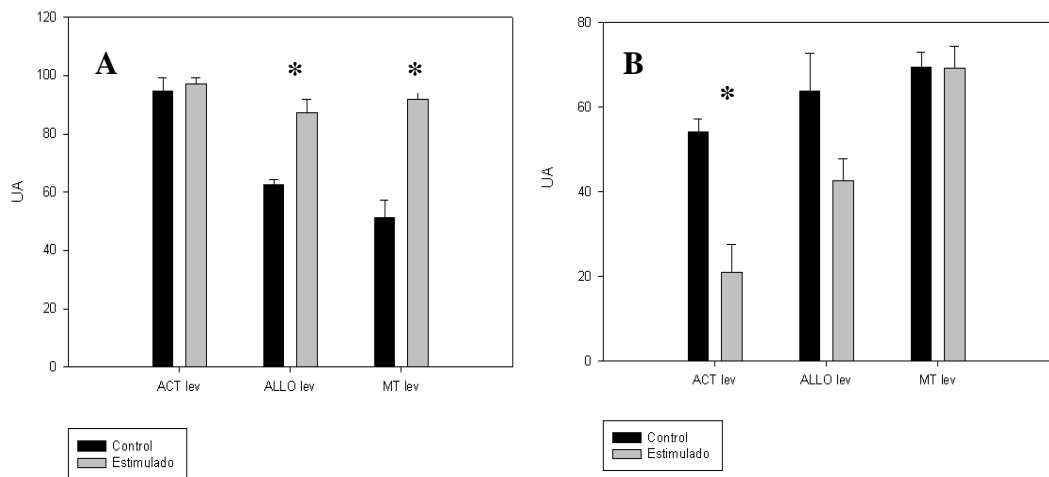
**Fig. 13.-**Expresión de la ACT, AIF-1 y MT en erizos estimulados con levaduras autoclavadas (*Saccharomyces cerevisiae*) a 24 (A) y a 48 (B) horas.

A partir de los datos obtenidos a través de la cuantificación por medio del programa de análisis de imagen Imagen, se obtuvo el siguiente resultado:

Con respecto al gen de la actina, no hay un aumento significativo ( $P>0.05$ ) en el valor promedio de la expresión del gen (Tabla 9), entre los erizos controles y los erizos estimulados (promedio  $94,73 \pm 4,42$  UA y promedio  $97,28 \pm 1,91$ UA, respectivamente) luego de las 24 horas post estimulación (Fig. 14A), sin embargo luego de las 48 horas post estimulación se observó una disminución significativa ( $P<0.05$ ) del valor promedio de la expresión (Tabla 9) entre los erizos controles y los erizos estimulados (promedio  $54,08 \pm 3,12$  UA y promedio  $20,98 \pm 6,62$  UA, respectivamente) (Fig.14B).

En cuanto al gen del factor inflamatorio alogénico tipo 1, hay un aumento significativo ( $P < 0.05$ ) en el valor promedio de la expresión del gen (Tabla 10), entre los erizos controles y los erizos estimulados (promedio  $65,21 \pm 2,83$  UA y promedio  $87,40 \pm 4,60$  UA, respectivamente) luego de las 24 horas post estimulación (Fig.14A), sin embargo, luego de las 48 horas post estimulación no se observó una disminución significativa ( $P > 0.05$ ) del valor promedio de la expresión (Tabla 10) entre los erizos controles y los erizos estimulados (promedio  $63,82 \pm 8,83$  UA y promedio  $42,60 \pm 5,13$  UA, respectivamente) (Fig.14B).

Finalmente en el gen de la metalotioneína, hay un aumento significativo ( $P < 0.05$ ) en el valor promedio de la expresión del gen (Tabla 11), entre los erizos controles y los erizos estimulados (promedio  $51,39 \pm 5,78$  UA y promedio  $94,21 \pm 6,63$  UA, respectivamente) luego de las 24 horas post estimulación (Fig.14A), sin embargo luego de las 48 horas post estimulación, no se observó una disminución significativa ( $P > 0.05$ ) del valor promedio de la expresión (Tabla 11), entre los erizos controles y los erizos estimulados (promedio  $69,56 \pm 3,46$  UA y promedio  $69,12 \pm 5,34$  UA, respectivamente) (Fig.14B).



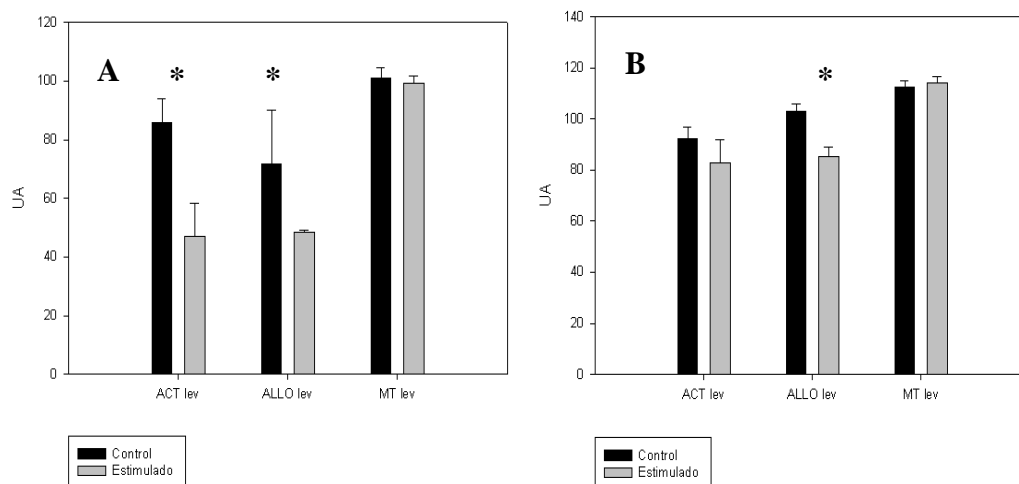
**Fig. 14.-** Promedio de escala de valores de grises de la ACT, AIF-1 y MT en erizos estimulados con bacterias por calor (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhi*) a 24 (A) y 48 (B) horas. Se realizó un ensayo de Student's, considerándose significativo cuando  $* P < 0,05$  entre las condiciones de estimulación y control, a través del Programa Statistica v 7.0, para cada uno de los genes.

Con respecto a los erizos estimulados con levaduras, el valor promedio es menor en los tres genes en estudio entre los erizos estimulados y los erizos controles luego de las 24 y 48 horas post estimulación (Fig. 15).

Con respecto al gen de la actina, hay una disminución significativa ( $P < 0.05$ ) en el valor promedio de la expresión del gen (Tabla 12), entre los erizos controles y los erizos estimulados (promedio  $86 \pm 7,84$  UA y promedio  $47,13 \pm 11,16$  UA, respectivamente) luego de las 24 horas post estimulación (Fig.15A), sin embargo luego de las 48 horas post estimulación, no se observó una disminución significativa ( $P > 0.05$ ) del valor promedio de la expresión (Tabla 12), entre los erizos controles y los erizos estimulados (promedio  $92,24 \pm 4,56$  UA y promedio  $83,03 \pm 8,83$  UA, respectivamente) (Fig.15B).

En cuanto al gen del factor inflamatorio alogénico tipo 1, hay una disminución significativa ( $P < 0.05$ ) en el valor promedio de la expresión del gen (Tabla 13), entre los erizos controles y los erizos estimulados (promedio  $90,02 \pm 3,78$  UA y promedio  $48,30 \pm 0,66$  UA, respectivamente) luego de las 24 horas post estimulación (Fig.15A) y luego de las 48 horas post estimulación, también se observó una disminución significativa ( $P < 0.05$ ) en el valor promedio de la expresión (Tabla 13), entre los erizos controles y los erizos estimulados (promedio  $103,14 \pm 2,85$  UA y promedio  $85,27 \pm 3,93$  UA, respectivamente) (Fig.15B).

Finalmente en el gen de la metalotioneína, no hay una disminución significativa ( $P > 0.05$ ) en el valor promedio de la expresión del gen (Tabla 14), entre los erizos controles y los erizos estimulados (promedio  $100,92 \pm 3,61$  UA y promedio  $99,29 \pm 2,49$  UA, respectivamente) luego de las 24 horas post estimulación (Fig.15A), así como tampoco luego de las 48 horas post estimulación (Tabla 14), variando entre (promedio  $112,49 \pm 2,50$ ) UA en los erizos controles y entre (promedio  $114,30 \pm 2,19$ ) UA los estimulados (Fig.15B).

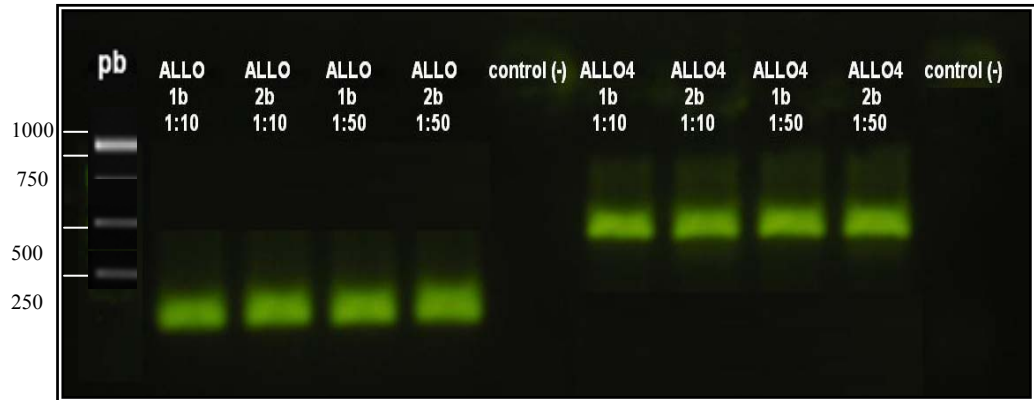


**Fig. 15.-** Expresión de la ACT, AIF-1 y MT en erizos estimulados con levaduras autoclavadas (*Saccharomyces cerevisiae*) a 24 (A) y 48 (B) horas, representado en unidades arbitrarias (UA). Se realizó un ensayo de Student's, considerándose significativo cuando \*  $P < 0,05$  a través del Programa Statistica v 7.0.

#### 4.3 Clonación y Secuenciación del ADNc de AIF-1 del erizo antártico *Sterechinus neumayeri*.

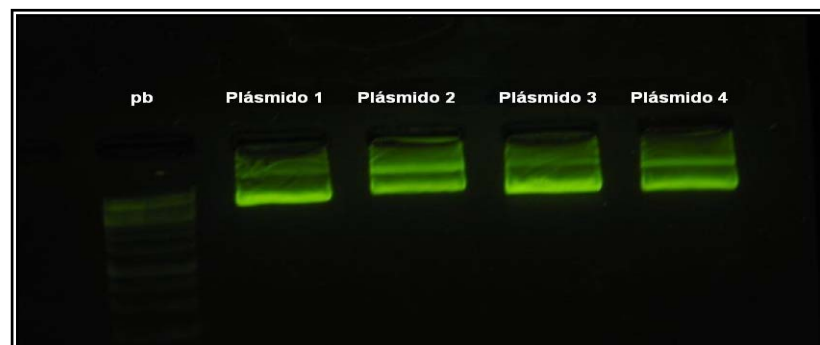
Tras realizar la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) con los tres juegos de partidores ALLO4 (FW)- ALLO (RV); ALLOCONST (FW)- ALLO (RV) y ALLO3 (FW)- ALLO (RV), se logró amplificar solamente la sección que codifica entre los partidores ALLO4 (FW)- ALLO (RV).

El juego de partidores ALLO (FW)- ALLO (RV) amplifica un fragmento de 200 pb y el juego de partidores ALLO4 (FW)- ALLO (RV) amplifica un fragmento de 648 pb. Para verificar que el tamaño del producto obtenido a través de la PCR corresponde al esperado para AIF-1 del erizo antártico se observó a través de un gel de agarosa 1,5% (Fig.16).



**Fig. 16.-** Expresión del gen AIF-1 para verificar que el producto de PCR corresponde al ADNc del AIF-1 que codifica la secuencia completa del erizo antártico *Sterechinus neumayeri*. En el lado izquierdo se muestra la expresión del AIF-1 utilizando los partidores ALLO (FW)- ALLO (RV) como control, que codifican 200 pb y en el lado derecho se muestra la expresión del AIF-1 utilizando los partidores ALLO4 (FW)- ALLO (RV) que codifica 648 pb. El gel fue teñido con SYBR green, para posteriormente visualizarlo a través del transiluminador.

Tras verificar que el juego de partidores ALLO4 (FW)- ALLO (RV) tiene el tamaño esperado, se procedió a realizar la clonación descrita anteriormente en los materiales y métodos, obteniendo como resultado cuatro plásmidos que serán utilizados para la secuenciación (Fig. 17).



**Fig. 17.-** Visualización de los cuatro plásmidos obtenidos a través de la clonación del gen AIF-1 que codifican la secuencia completa del ADNc del AIF-1 del erizo antártico *Sterechinus neumayeri*. El producto de PCR fue clonado dentro un vector PCR 2.1 TOPO (Invitrogen <sup>TM</sup>). El gel fue teñido con SYBR green, para posteriormente visualizarlo a través del transiluminador.

De los cuatro plásmidos sólo fueron secuenciados dos de ellos: Plásmido 1 y Plásmido 2. A partir de este procedimiento se obtuvo la secuencia del ADNc del AIF-1 del erizo antártico *Sterechinus neumayeri* (Fig.18).

```

TGTCAAACAAGAGGGGAAA CCGGGATTTGGGCGAAAAATTGAAAATAATCAAGAAAAGG 60
1 GAACAATCATTCTGAGCATCGCATTGAGGAAGAAGGAAGCAGTTCTAAAAATGCCTCGTA 120
   M P R
4 CAACTTTCGACCGTTCAAACGTACAGGGTGGCAAGCAATGGGGGCAAGCAAAGCAACGCC 180
   T T F D R S N V Q G G K Q W G Q A K Q R
24 AAACAGACCAGATAGATGATGAAATAGATAGCATTATCACACAAAACACGTATCCAGAGG 240
   Q T D Q I D D E I D S I I T Q N T Y P E
44 TCGAGGAATTAGACGAGAACTAGTGACCTACAAAGATCAATTCATAACGTACGATCTCG 300
   V E E L D E K L V T Y K D Q F I T Y D L
64 ATGGCAGTGGAGACCTCGACGACAATGACGTGAGGGTGATGATGGAAAAACTAGGTCAAC 360
   D G S G D L D D N D V R V M M E K L G Q
84 CCAAGAACCATATAGAAATCAGGAAGATGATTAAGAGATTGACCTCAACGGAAGTGGAA 420
   P K N H I E I R K M I K E I D L N G S G
104 CCATCAACTTCAGAGAGTTCGTACAGACGATGCTGGGGGCAAGACCAGCATTATGAGAA 480
   T I N F R E F V Q T M L G G K T S I M R
124 TGATACTGATGTTTCGAGGAGAAGAATAAAGAAAAGGAGAAACCTGTCCGGGCCGCCCAA 540
   M I L M F E E K N K E K E K P V G P P P
144 AGAAAAGCTTCTCTGATCTGCCGTGAAATAAATCCACAGCAAACAATAATGCAATCCAG 598
   K K S F S D L P -
TTGGCTATATCCTATTTTATTTCTACA TTTACGCTGCTCCACATCT 648

```

**Fig. 18.-** Secuencia de ADNc de AIF-1 del erizo antártico *Sterechinus neumayeri*, obtenida por clonación del producto de PCR (en verde se indican los partidores FW ALLO4 y RV ALLO, respectivamente), correspondiente a la secuencia de ADNc de AIF-1 que deriva de la secuencia original del ADNc de AIF-1 del erizo modelo *Strongylocentrotus purpuratus* (número de acceso XM\_001199136.1). Los números en la derecha indican la posición de los nucleótidos y los números a la izquierda indican la posición de los aminoácidos. En rojo se destacan los dos motivos que corresponden a las proteínas de unión a calcio, EF-HAND y en celeste los sitios de unión a calcio (loop). (<http://www.expasy.ch/prosite/>).

En el erizo *Sterechinus neumayeri*, los aminoácidos implicados en los dos motivos EF-hand van desde el 49-84 y desde el 85-120, y los sitios de unión a calcio (loop) van desde el aminoácido 62-73 y del 98-109, respectivamente.

Una vez obtenida la secuencia de ADN del AIF-1 (Sn-AIF-1) del *Sterechinus neumayeri*, se caracterizó por uso de herramientas de bioinformática el número de aminoácidos, punto isoeléctrico, el peso molecular y el porcentaje de identidad, tomando organismos representativos dentro de la escala evolutiva (Tabla 4). De esta manera la secuencia de *Sterechinus neumayeri* presentó 151 residuos

aminoacídicos, con un peso molecular 17,4 kDa y un punto isoeléctrico de 4.92. Estas características serían distintas a las que presenta *Strongylocentrotus purpuratus*. Sin embargo Sn-AIF-1 presentaría una mayor identidad con *S. purpuratus*. La primera secuencia con código GenBank CV652693 codifica para una proteína de 123 residuos y un peso molecular de 14,1 kDa, mientras que la segunda XM\_001199136.1 codifica para una proteína de 98 residuos y un peso molecular de 11,1 kDa.

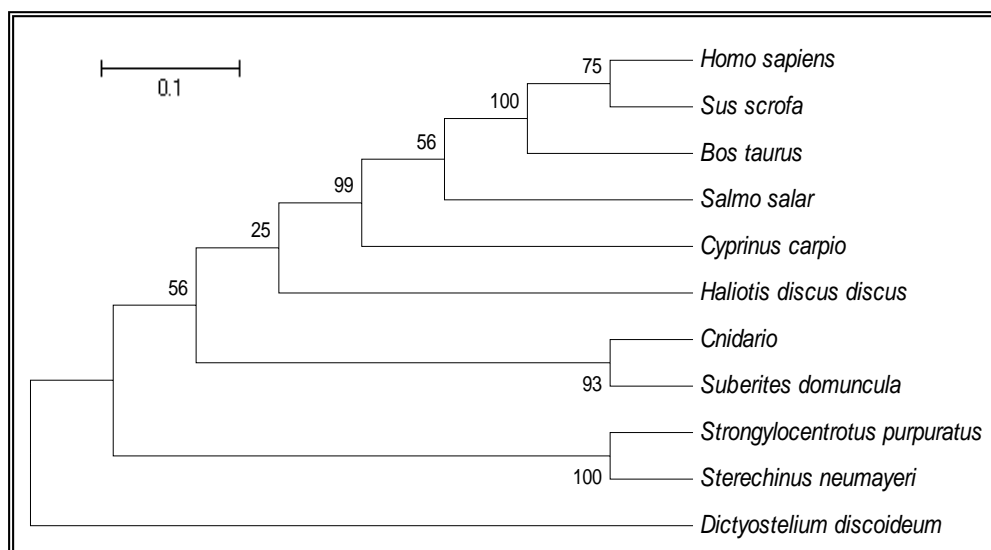
**Tabla 4.-** Parámetros del AIF-1 en organismos representativos dentro de la escala evolutiva.

AIF-1	Nº Aminoácidos	pI	PM (kDa)	Porcentaje de Identidad
<i>Sterechinus neumayeri</i>	151	4,92	17,4	-
<i>Suberites domuncula</i>	144	5,2	16,6	48
<i>Uncultured Cnidarian</i>	149	5,48	17,0	45
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	123	6,13	14,1	64
<i>Haliotis discus hannai</i>	151	4,96	17,1	48
<i>Salmo salar</i>	147	5,29	16,8	38
<i>Cyprinus carpio</i>	148	5,58	16,9	40
<i>Bos taurus</i>	147	5,98	16,8	38
<i>Sus scrofa</i>	147	5,98	16,8	39
<i>Homo sapiens</i>	147	5,97	16,7	40

Los mismos organismos fueron utilizados para crear un árbol filogenético (Fig.19). Este árbol filogenético nos muestra la relación de evolución que existe entre varias especies, por lo tanto se construye tomando en cuenta la teoría de la evolución que nos indica que todos los organismos son descendientes de un ancestro común. En este caso se creó un árbol en donde se utilizó una secuencia suficientemente cercana de un organismo, por ejemplo, la ameba *Dictyostelium discoideum* para permitir la inferencia de las otras secuencias y a la vez lo suficientemente lejano para ser un grupo externo evidente, de esta forma esta especie quedaría en la raíz de nuestro árbol. Las especies utilizadas se separaron en dos grupos bastante definidos: el grupo de los invertebrados (cnidario (*Uncultured Cnidarian*), la esponja (*Suberites domuncula*) y los erizos (*Strongylocentrotus purpuratus* y *Sterechinus neumayeri*)) y el grupo de los vertebrados (el molusco (*Haliotis discus discus*), los peces (*Salmo salar* y



*Cyprinus carpio*), el bovino (*Bos taurus*), el cerdo (*Sus scrofa*) y el humano (*Homo sapiens*)). En ambos grupos las especies se ordenaron según el orden de complejidad de las mismas, refiriéndonos en este caso a la distancia evolutiva entre cada una de ellas.



**Fig. 19.-** Árbol filogenético construido con la molécula relacionada al AIF-1 del erizo antártico *Sterechinus neumayeri*, *Suberites domuncula* (Q966YB), *Cnidario* (QOH8V2), *Strongylocentrotus purpuratus* (CV652693), *Haliotis discus hannai* (QOMUS3), *Salmo salar* (B5X824), *Cyprinus carpio* (O93246), *Bos taurus* (Q9BDK2), *Sus scrofa* (Q9GK83), *Homo sapiens* (P55008). El análisis fue realizado a través del método neighbour-joining, descrito en Materiales y Métodos. Los números en los nodos son un indicador del nivel de confianza (dado como un porcentaje) por las ramas, determinados por el análisis bootstrap (1000 réplicas de bootstrap). La escala indica una distancia de evolución de 0.1 aminoácidos. La distancia relacionada de la secuencia de aminoácidos de la ameba *Dictyostelium discoideum*, deducida desde el gen *cbpB* (CbpB\_DICDI; AF020281) fue usada como outgroup.

Se eligieron cinco de las diez especies representativas para observar los motivos correspondientes a las proteínas EF-hand a través de un alineamiento. Estructura representada por una hélice-loop- hélice (Fig.20).



## 5. DISCUSIÓN

### 5.1 Conteo y función en el sistema inmunitario de los celomocitos en el erizo antártico *Sterechinus neumayeri*.

Diversos estudios evalúan que la respuesta inmunitaria en el erizo de mar se genera a través de células fagocíticas que se encuentran en la cavidad celómica de este organismo. Estas células se denominan celomocitos y según **Shimada y colaboradores (2002)**, son los mediadores de la respuesta celular frente a los cambios inmunitarios a través de diferentes mecanismos como la fagocitosis, encapsulación, citotoxicidad y producción de agentes antimicrobiales.

Según **Smith y Davidson (1994)** y **Johnson (1969a)**, los celomocitos son activados fácilmente a través de lesiones o infecciones, respondiendo con un incremento en su movilidad, secreción y fagocitosis.

En nuestro estudio se evaluó la respuesta inmunitaria en el erizo de mar antártico *Sterechinus neumayeri*, por medio de la estimulación con bacterias y levaduras muertas por calor. Esta es la primera experiencia que se realiza *in situ* para evaluar la respuesta inmune a bajas temperaturas. Los organismos son altamente sensibles a cualquier cambio que se produzca en su medio ambiente, ya sea a nivel físico-químico o biológico, por lo cual los erizos no se trasladaron a un acuario para no provocarles un estrés adicional y además para no afectar los resultados que se querían obtener.

Varios estudios han reportado la ingestión de diferentes partículas por celomocitos en diversas especies de equinoideos, incluyendo partículas extrañas (**Ito et al., 1992**), bacterias (**Jonson, 1969a; Plytyez y Seljelid, 1993**) y también levaduras (**Silva, 2000; Mangiaterra y Silva, 2001**).

Morfológicamente existen diversas clases de celomocitos. Es así como, por ejemplo, **Shimada y colaboradores (2002)** encontraron cuatro tipos de celomocitos en el erizo antártico. Entre ellos: fagocitos ameboides, células

esferoidales incoloras, células esferoidales rojas y células esferoidales vibrátiles. En el presente estudio se observaron los cuatro tipos de celomocitos descritos por **Shimada y colaboradores (2002)** (Fig. 9). Cabe destacar que entre los celomocitos totales el tipo morfológico que se observó respecto de una variación significativa frente a una estimulación con bacterias fueron las denominadas células esferoidales rojas.

La inmunidad innata es la primera línea de defensa contra la infección. Los mecanismos efectores que participan en la respuesta inmune innata constituyen la respuesta inflamatoria que se desarrolla en el sitio de la infección, cuyo objetivo es destruir al agente causal (**Guerrero, 2007**). El aumento en el número de celomocitos en erizos estimulados con bacterias, tanto para celomocitos totales como para las células esferoidales rojas, luego de las 24 horas (Fig. 10A), indica que el sistema inmunitario del organismo responde positivamente activando los procesos de ploriferación celular que produce la presencia de algunos patógenos o patrones moleculares de éstos. Este proceso de proliferación tiene por finalidad proteger la homeostasis del organismo, a través de la eliminación del los agentes extraños que están causando un cierto nivel de estrés y provocando a la vez un desequilibrio en el sistema del organismo. Es así como **Holm y colaboradores (2008)**, mencionan que además del epitelio celómico que se ha propuesto como la fuente más probable de celomocitos en equinodermos, el órgano axial y el cuerpo de tiedmann han sido sugeridos como tejidos hematopoyéticos, los cuales frente a un estrés darían inicio a la ploriferación de células madres, que luego se diferenciarían en celomocitos, que actuarían como refuerzo frente a la lesión. Por lo tanto, el reconocimiento de las bacterias induciría la ploriferación de las células del epitelio celómico (celomocitos) y además de las células diferenciadas por parte de los tejidos hematopoyéticos, reflejadas en el aumento en el número de celomocitos.

En relación a la mayor cantidad de celomocitos de tipo células esferoidales rojas, se debería a que estas contienen el Equinocromo A que posee propiedades antimicrobianas contra las bacterias Gram positivas y Gram negativas (**Service y**

**Wardlaw, 1984; Gerardi et al., 1990; Haug et al., 2002**), así mismo las células esferoidales rojas aumentan alrededor de las lesiones y sitios de infección (**Johnson, 1970; Coffaro e Hinegardner, 1977**), sugiriendo que estas células y el Equinocromo A, juegan un papel importante en la respuesta inmunitaria en los erizos de mar adultos. El aumento en el número de células inmunitarias, sólo fue significativo para los celomocitos totales (Tabla 5B), ya que para las células esferoidales rojas, este aumento no fue significativo (Tabla 6B), lo cual se debe a la diferencia y similaridad entre los promedios en la concentración de celomocitos totales y células esferoidales rojas entre los tres experimentos realizados de forma independiente. La disminución posterior del número de celomocitos no fue significativa, tanto para celomocitos totales (Tabla 5B), como para las células esferoidales rojas (Tabla 6B) luego de las 48 horas (Fig.10B), debido a la regulación que genera el sistema inmunitario para retornar a su estado basal (homeostasis), ya que una vez que la respuesta inmunitaria ha sido activada, ésta debe volver a su estado normal (**Guerrero, 2007**). Un factor que participa en el retorno del estado basal es la apoptosis, uno de los procesos importantes que ocurre durante el desarrollo normal y que juega un papel crítico en la eliminación de células que son anormales o que están dañadas (**Jacobson et al., 1997; Hardy, 1999; Meier et al., 2000**).

La fagocitosis representa un sistema de defensa poderoso contra los microorganismos que amenazan la integridad funcional del hospedador (**Splettstoesser y Schuff-Werner, 2002**). Es así como en condiciones metabólicas normales, existe un balance entre los eventos oxidativos (producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)) y los sistemas de defensa (antioxidantes y/o atrapadores de radicales libres) manteniendo la homeostasis celular (**Calderón, 2005**).

Actualmente se considera que los radicales libres de oxígeno juegan un papel importante como moléculas regulativas en numerosos procesos fisiológicos y patológicos a nivel celular. Los ROS pueden estar presentes en diferentes momentos, por ejemplo: frente a infecciones, ciclo redox y transporte de

electrones en la mitocondria. Pero únicamente se ha demostrado que el mecanismo de la fagocitosis, actúa como una máquina compleja que puede producir y eliminar activamente, grandes cantidades de sustancias tóxicas (**Splettstoesser y Schuff-Werner, 2002**).

Según lo mencionado anteriormente se puede decir que al producir el estímulo con bacterias en el erizo antártico, se genera una respuesta inmunitaria demostrada con el aumento en el número de celomocitos. La función de los celomocitos es ir al sitio de la infección y eliminar a los agentes causales de esta misma. Por lo tanto al producirse la fagocitosis por los celomocitos hacia los patógenos, la fagocitosis produce una serie de sustancias tóxicas que llevarán a la muerte de los elementos que están produciendo un desequilibrio en el sistema del organismo y así a través de la apoptosis volver al estado basal (homeostasis).

En el medio marino antártico, la temperatura de las aguas usualmente se encuentra en un rango entre  $-1,9^{\circ}\text{C}$  y  $2^{\circ}\text{C}$  (**Clarke y Leakey, 1996**). Donde los procesos fisiológicos principalmente son marcadamente lentos bajo estas condiciones (**Peck, 1998**).

**Shimada y colaboradores (2002)**, realizaron el primer estudio *in vivo* e *in vitro* en equinoideos antárticos con respecto a la fagocitosis, incluyendo la capacidad germicida a temperaturas polares, en el erizo antártico *Sterechinus neumayeri*. En este estudio, se comparó el tipo y la concentración de celomocitos, además de la capacidad fagocítica entre erizos de mar antárticos, con erizos de mar temperado y tropical. A partir de ello, demostraron que los cuatro tipos de celomocitos son iguales que aquellos descritos en erizos temperados y tropicales, y que la concentración de ellos varía de acuerdo a cada individuo. En cuanto a la capacidad fagocítica, no existe diferencia significativa, sugiriendo una adaptación a la fagocitosis en equinoideos de temperaturas antárticas.

**Silva y Peck (2000)** también compararon la capacidad fagocítica entre el erizo antártico y la estrella de mar *Odontaster validus*, obteniendo resultados similares

tanto *in vivo* como *in vitro*, sugiriendo una eficiencia en la fagocitosis en temperaturas antárticas, al igual que **Shimada y colaboradores (2002)**. Indicando además que la fagocitosis es un mecanismo importante de resistencia natural.

En el caso de los erizos estimulados con levaduras, no se observó un aumento en el número de células inmunitarias, ya sea en los celomocitos totales, como para las células esferoidales rojas, luego de las 24 (Fig.11A) y 48 (Fig. 11B) horas post estimulación. Demostrando que el sistema inmunitario del erizo antártico no respondería frente a este tipo de partícula extraña, mediante la disminución significativa entre los celomocitos totales (Tabla 7B) y células esferoidales rojas (Tabla 8B) luego de las 24 y 48 horas post estimulación.

La diferencia de la respuesta celular, ante la presencia de bacterias y levaduras se puede deber a que tanto las bacterias como las levaduras poseen diferentes PAMPs. De acuerdo a esto se sabe, según **Aderem y Ulevitch (2000)** que patógenos como la mayoría de las bacterias Gram negativas son reconocidas por un patrón molecular denominado LPS y que muchas de las bacterias Gram positivas son reconocidas por ácidos lipoteicoicos, generando en el momento del reconocimiento entre el PAMPs y TLR específico una respuesta inflamatoria, lo que se ve reflejado en el aumento en el número de células inmunitarias, en este caso los celomocitos. Además menciona que patógenos como las levaduras son reconocidas por patrones denominados mananos, manoproteínas y zimosan (presente en la pared celular), que al igual que los otros PAMPs al ser reconocidos generan una respuesta inflamatoria. A esto se puede agregar que el  $\beta$ - Glucano es la mayor estructura polisacárida presente en la pared celular en la mayoría de las levaduras y hongos (**Secombes, 1994**).

De acuerdo a esto, el erizo antártico podría generar una respuesta inmunitaria distinta para estos dos agentes extraños. Sin embargo no se descarta que exista otra vía de reconocimiento molecular frente a las levaduras. Además cabe destacar que la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, es un hongo que ha sido ampliamente estudiado dada su importancia en la industria panadera y vitivinícola, así como

por su capacidad de producir etanol (**Folch-Mallol, et al., 2004**). Esta levadura se obtiene a través de la cerveza como su nombre lo indica: Saccharo (azúcar), myces (hongo) y cerevisiae (cerveza) (**Hernández, 1999**), por lo tanto no se encuentra en el ecosistema marino antártico, pero sin embargo si existen otros tipos de levaduras como: *Candida psychrophila* (**Deegenars y Watson, 1997**), *Cryptococcus sp* y *Rhodotorula sp* (**Amato et al., 2009**), entre otras. Esta puede ser la razón por la cual el organismo en estudio no genera una respuesta inmunitaria tan relevante como lo hace con las bacterias, ya que quizás no posee un mecanismo específico para el reconocimiento de esta levadura, pero quizás sí para aquellas que están circulando constantemente en su medio ambiente, sugiriendo que quizás los celomocitos carecen del TLR específico que identifica a las levaduras, denominado TLR2 (**Moreno y Sánchez-Ibarrola, 2003**). Sin embargo se cree necesario continuar con las investigaciones con respecto a la respuesta inmunitaria en relación a la estimulación con levaduras para obtener una conclusión más concreta.

## **5.2 Expresión de genes en celomocitos de *Sterechinus neumayeri*.**

La fuerte amplificación del gen de la actina, factor inflamatorio alogénico tipo 1 y la metalotioneína (Tabla 3), implica que estos tres genes de alguna manera participan cuando el sistema inmunitario del erizo inicia el ataque como la defensa contra las partículas extrañas que invaden su organismo. Cuando se dice de alguna manera, se refiere a que los tres genes cumplen funciones distintas en los organismos y que éstos se expresan de acuerdo al rol específico de cada uno con respecto a la situación de estimulación con partículas extrañas o cambios en el ambiente que desencadenan una respuesta del sistema inmunitario a nivel celular.

Como en todo estudio de expresión de genes, se debe utilizar un gen control o de referencia para poder comparar o normalizar la expresión de los genes a estudiar. En este caso se eligió la actina, ya que es una proteína altamente conservada y abundante en las células eucarióticas (**Percipalle, 2007**) y además



porque debido a su naturaleza y porque se expresa en el citoesqueleto de todas las células eucarióticas, se utiliza como gen control para determinar la expresión de genes (**Kreuzer et al., 1999**). La **Actina**, es una de las proteínas más abundantes entre los eucariotas y se encuentra presente en todo el citoplasma (**Maillet, 2002**). Como proteína, posee un peso molecular de 42 kDa (**Zamir y Geiger, 2001**). La actina es muy conservada a nivel filogenético, pero sin embargo, es codificada por una familia multigénica que ha evolucionado a partir de un gen precursor común (**Guirardo et al., 2002**). Sus principales funciones fisiológicas están relacionadas con la motilidad celular y los cambios de forma de la célula durante el ciclo celular. También, participa en la organización del citoplasma para generar fuerzas mecánicas dentro de la célula en respuesta a diversas señales extracelulares, es esencial para algunas actividades contráctiles y controla las interacciones celulares, la adhesión molecular y el transporte intracelular (**Schmit et al., 1998; Moustakas et al., 1998**).

El **Factor Inflamatorio Alogénico tipo 1**, es un polipéptido hidrofílico que actúa como barrera en las especies y fue identificado por primera vez por **Utans y colaboradores (1995)**, a través de un aloinjerto cardíaco con rechazo crónico en una rata, en donde la inflamación juega un rol importante (**Autieri et al., 2002**). Luego se demostró que la expresión del factor alogénico tipo 1, se correlaciona con el rechazo cardíaco en el trasplante clínico de corazón. La expresión del AIF-1 también aumenta la producción de IL-6, 10 y 12 en macrófagos de ratón, demostrando que el AIF-1 juega un rol importante sobre todo en respuesta frente a estímulos inflamatorios (**Watano et al., 2001**). Sin embargo, la relación directa entre la expresión del factor alogénico tipo 1 y las actividades de macrófagos frente a una lesión, aún no se entiende totalmente.

La **Metalotioneína**, es una proteína cuyo nombre deriva del hecho que esta tiene un gran contenido de metales y es rica en cisteínas (**Kägi y Schaffer, 1988**). Originalmente la metalotioneína fue identificada como un proteína de bandeo para el cadmio, responsable de la acumulación natural en la corteza renal equina (**Margoshes y Vallee, 1957**). Su posterior caracterización puso de manifiesto que se trataba de un polipéptido de bajo peso molecular, con un alto contenido en

cisteínas y sin aminoácidos aromáticos ni histidina. Estas proteínas contienen varios átomos metálicos en su molécula que se encuentran coordinados en dos estructuras en forma de cluster metal-tiolato (**Kägi y Vallee, 1960**). Las metalotioneínas son capaces de responder a determinados estímulos. A estos estímulos les denominamos inductores. Muchos de ellos son capaces de actuar tanto *in vivo* como en cultivo. No obstante, algunos genes fallan en su inducción en cultivo debido a la ausencia de receptores adecuados o por otras causas más complejas. Se podría hablar, por tanto, de inductores primarios o secundarios en función de si incrementan directamente la síntesis de de MTs (metalotioneínas) o no (**Carrasco, 2000**).

### **5.2.1 Modificación de la expresión de genes en celomocitos estimulados con bacterias y levaduras.**

De modo general, el aumento de la expresión de los genes en los erizos estimulados con bacterias, con respecto a los controles luego de las 24 horas post estimulación (Fig.12A), significó que los genes responden positivamente frente al estímulo o agente estresor desencadenando la activación del sistema inmunitario expresándolo a nivel molecular. En cuanto a la disminución en la expresión, luego de las 48 horas post estimulación (Fig.12B), se debe a la regulación que genera el sistema inmunitario para retornar a su estado basal (homeostasis) (**Guerrero, 2007**), demostrándolo también a nivel molecular.

El aumento y la disminución de la expresión de los genes, luego de las 24 y 48 horas mediante la reacción en cadena de la polimerasa, se corroboró con los datos obtenidos a través de la cuantificación por medio del programa de análisis de imagen ImageJ (Fig. 14A y 14B).

Con respecto al gen control, se esperaba que su expresión no variara frente a la estimulación del erizo antártico, ya sea con bacterias o con levaduras luego de las 24 y 48 horas, ya que este gen por sus características particulares ha sido utilizado

mayoritariamente como gen control en otros estudios (**Yang et al., 2005; Smith et al., 2006**) . Sin embargo se observaron cambios en su expresión, al igual que en los otros dos genes. Cabe destacar que además de la actina se han utilizado otros genes como control, por ejemplo:  $\beta$ - actina (**Yang et al., 2005; Watano et al., 2001**) y GAPDH (**Nagakawa et al., 2004; Autieri y Chen, 2005**).

Como se mencionó anteriormente los tres genes en estudio cumplen diferentes funciones en el organismo y al poner en peligro la integridad de éste, se genera una cascada de reacciones para su defensa y así poder mantener su equilibrio interno, por lo tanto la variación del gen control, se debe quizás a que la actina del citoesqueleto cumple una variedad de funciones biológicas; incluyendo la dinámica intracelular, división y movimiento celular, (**Henson, 1999; Jockusch, 2006**), adhesión y estabilidad estructural (**Jockusch, 2006**) y organización del citoplasma para generar fuerzas mecánicas dentro de la célula en respuesta a diversas señales extracelulares (**Schmit y Hall, 1998; Moustakas et al., 1998**). Por lo tanto las funciones que cumple la actina se relacionarían directamente con el movimiento y ploriferación celular, demostrándolo a través de un aumento no significativo (Tabla 9) en la expresión después de la estimulación con bacterias luego de las 24 horas (Fig.14A) y participando además en la mantención de la estabilidad del sistema interno, demostrándolo a través de una disminución significativa (Tabla 9) en su expresión (Fig.14B).

En relación a los otros dos genes, se ha demostrado que el factor inflamatorio alogénico tipo 1, se expresa en el rechazo de aloinjertos (**Utans et al., 1996**), tiempo después se encontró que el AIF-1 está involucrado en la respuesta inflamatoria asociada al rechazo en el transplante cardiaco en humano (**Utans et al., 1996**) y se demostró además que la expresión del AIF-1 también aumenta la producción de IL-6, 10 y 12 en macrófagos de ratón, demostrando que el AIF-1 juega un rol importante sobre todo en la respuesta inmune frente a estímulos inflamatorios (**Watano et al., 2001**), agregando el estudio de **Yang y colaboradores (2005)**, en el cual concluyen que la expresión del AIF-1 juega un rol importante como mediador en la sobrevivencia, migración y propiedades

proinflamatorias de macrófagos. Se dice también que la primera fase de la inflamación ocurre durante el reconocimiento del injerto (**Shiraishi et al., 1997**) o durante la curación de las heridas (**Kheradmand et al., 1998**) en mamíferos. **Watano y colaboradores (2001)**, afirman también que el AIF-1 juega un rol importante sobre todo en respuesta frente a estímulos inflamatorios, por lo tanto el AIF-1 puede servir como marcador que responde en el reconocimiento de patrones propios de los no propios (**Kruse et al., 1999**), demostrado a través del aumento significativo en su expresión (Tabla 10) frente al estímulo con bacterias, luego de las 24 horas post estimulación (Fig.14A). El AIF-1 demuestra también su capacidad de inhibición de la apoptosis, promoviendo la supervivencia de las células inmunitarias (**Yang et al., 2005**), reflejado en la disminución no significativa en su expresión luego de las 48 horas post estimulación (Tabla 10) (Fig.14B).

Finalmente la Metalotioneína es capaz de responder a determinados estímulos. Entre ellos encontramos los metales pesados (e.g. Cd, Zn, Cu, Hg), agentes inflamatorios y citoquinas (e.g. LPS), Hormonas y factores de crecimiento (e.g. insulina), agentes citotóxicos (e.g. Hidrocarburos, Etanol, Cloroformo), condiciones estresantes como inflamación, irradiación (**Carrasco, 2000**), la metalotioneína además cumple un importante rol en la homeostasis (**Takano et al., 2004**), sugiriendo que estas proteínas forman parte de la respuesta al estrés, demostrándolo a través de un aumento significativo en su expresión (Tabla 11) luego de las 24 horas post estimulación con bacterias (Fig.14A). Este aumento de la expresión estaría asociado a la producción de especies reactivas de oxígeno que se producen continuamente en los tejidos o en células inmunitarias que tiene una alta capacidad fagocítica. Este es el caso de leucocitos y macrófagos que presentan una gran actividad del sistema de transporte de electrones en la mitocondria y de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa. Por esto es necesaria que las células tengan sistemas de defensa antioxidantes que previenen el daño a los tejidos por los radicales de oxígeno. Recientemente se ha enfocado la atención a la metalotioneína como un radical depurador debido a la constante velocidad de reacción con radicales hidroxilos in vitro la cual es muy

alta (**Thornalley y Vasak, 1985**), frente a esto también se sabe que durante la fagocitosis se producen ROS y según **Kägi y Schäffer (1988)**, la metalotioneína está presente en una gran cantidad de eucariotas funcionando como antioxidante, jugando un papel protector frente a los radicales hidroxilos.

Contrariamente, no se observó un aumento en la expresión de los genes en los erizos estimulados con levaduras, luego de las 24 (Fig. 13A) y 48 horas (Fig. 13B) post estimulación con respecto a los erizos controles. Al igual que en el experimento anterior, este resultado se corroboró con los datos obtenidos a través de la cuantificación por medio del programa de análisis de imagen ImageJ (Fig. 15A y 15B). Sin embargo igual se obtuvieron diferencias en la expresión de los tres genes tanto luego de las 24, como luego de las 48 horas post estimulación, en el gen de la actina (Tabla 12), factor inflamatorio alométrico tipo 1 (Tabla 13) y metalotioneína (Tabla 14). Como se mencionó anteriormente esto se puede deber, a que tanto las bacterias como las levaduras poseen diferentes PAMPs y por lo tanto el erizo podría generar una respuesta inmunitaria distinta ante el reconocimiento de las levaduras.

### **5.3 Clonación y secuenciación del ADNc de AIF-1 del erizo antártico *Sterechinus neumayeri*.**

Este es el primer reporte de AIF-1 descrito para celomocitos de invertebrados en cuanto a su participación en la respuesta inmunitaria, ya que las investigaciones que existen en base los AIF-1 que se expresan en mamíferos y esponjas y que están relacionadas con el objetivo de obtener información a cerca de la función que cumple éste, principalmente en base al rechazo de aloinjertos (**Utans et al., 1996; Kruse et al., 1999**) y la respuesta inflamatoria asociada al rechazo en el trasplante cardiaco en humano (**Utans et al., 1996**), esta última también demostrada en la producción de IL-6, 10 y 12 en macrófagos de ratón (**Watano et al., 2001**), estas y otra investigaciones, con la finalidad de entender las funciones biológicas y además para el desarrollo de nuevos tratamientos que

mejoren los trasplantes alogénicos, todo esto para aportar nuevos conocimientos al campo de la medicina.

A través de la clonación y secuenciación del AIF-1 en el erizo antártico *Sterechinus neumayeri*, se pudo inferir que esta secuencia presenta en su estructura aminoacídica dos sitios biológicamente activos, denominados motivos EF-hand (Fig. 18). Las proteínas EF-hand se caracterizan por presentar una estructura, que consiste en una primera hélice  $\alpha$ , una vuelta donde se encuentra el ión calcio y una segunda hélice  $\alpha$  (Nakayama y Kretsinger, 1994). Kretsinger (1975) sugirió que todas las proteínas que se unen calcio son miembros de la familia EF-hand, es así como se conocen 31 subfamilias de las proteínas EF-hand (Nakayama y Kretsinger, 1994).

Las proteínas EF-hand están implicadas en un amplio rango de procesos celulares como: resistencia a drogas o medicamentos, transporte de iones y nutrientes, modificación de ácidos nucleicos y metabolismo, regulación transcripcional, respuesta al estrés, quimiotáxis, reacciones redox, modificación y degradación de la pared celular (Yubin *et al.*, 2006). El calcio es el catión más versátil en la biología de la célula, por lo tanto, la regulación del tráfico de calcio y el nivel de calcio intracelular representa uno de los sistemas más importantes en la transducción de señales en organismos eucariotas (Masullo *et al.*, 2006). De hecho la fina sincronización en la regulación del  $\text{Ca}^{2+}$  en los leucocitos es requerida para la iniciación de una respuesta inmunitaria, es así como además Masullo y colaboradores (2006), indican que la señalización del  $\text{Ca}^{2+}$  produce la activación de procesos muy importantes en los leucocitos, incluyendo: la proliferación, activación del receptor inducido, secreción, fagocitosis, quimiotáxis y muerte celular.

A lo anterior se puede agregar además que el nivel de calcio intracelular es bajo y que cuando el nivel de calcio aumenta, las proteínas que forman parte de la familia EF-hand se unen al calcio para ejercer una respuesta relacionada con algún proceso biológico en particular (Yubin *et al.*, 2006).

En otro contexto, el AIF-1 fue primeramente identificado por **Utans y colaboradores (1995)** y ha sido clonado en una amplia gama de organismos, por ejemplo, en invertebrados como las esponjas (**Kruse *et al.*, 1999**) y en vertebrados como en peces óseos como la carpa (**Fujiki *et al.*, 1999**), en mamíferos como la rata (**Utans *et al.*, 1995**), el cerdo (**Chen *et al.*, 1997**) y el humano (**Utans *et al.*, 1996**). A partir de ello, diversos informes indican que el AIF-1 es altamente conservado a nivel de evolución, demostrándolo a través de la confección de un árbol filogenético (Fig.19).

Finalmente, se eligieron cinco de las diez especies representativas para observar los motivos correspondientes a las proteínas EF-hand a través de un alineamiento, todos ellos invertebrados (Fig.20) donde es posible apreciar que los motivos de EF-hand al igual que la secuencia en la cual están implicados, en este caso el AIF-1, se conservan también a lo largo del tiempo.

## **6. CONCLUSIONES**

El aumento en el número de celomocitos totales y células esferoidales rojas luego de las 24 horas en los erizos estimulados con bacterias indica que el sistema inmunitario del organismo actuaría positivamente, activando los procesos de proliferación celular, desde las células del epitelio celómico y además de las células diferenciadas por parte de los tejidos hematopoyéticos que produce la presencia de algunos patógenos o patrones moleculares de éstos, adicionando que tras las mismas condiciones los tres genes en estudio: actina, AIF-1 y metalotioneína demostraron tener una mayor amplificación con respecto a los organismos controles. Situación similar ocurrió luego de las 48 horas cuando se observó una disminución en el número de celomocitos totales y células esferoidales rojas debido al retorno del estado basal (homeostasis) del organismo, demostrándolo también en la disminución de la expresión de los tres genes en relación a los controles.

La diferencia en la respuesta celular, ante la presencia de bacterias y levaduras se puede deber a que tanto las bacterias como las levaduras poseen diferentes PAMPs y de acuerdo a esto el erizo antártico podría generar una respuesta inmunitaria distinta para estos dos agentes extraños, pero no se descarta que exista otra vía de reconocimiento molecular frente a las levaduras. Este acontecimiento también se observó a nivel molecular, ya que la expresión de los tres genes en los organismos estimulados fue menor en relación a los organismos controles, tanto luego de 24 como luego de las 48 horas.

Por lo tanto se puede concluir que la respuesta molecular, representada por los tres genes en estudio: actina, AIF-1 y metalotioneína, se ve reflejada en la respuesta celular que genera el organismo frente a un estímulo, ya sea con bacterias o levaduras, independiente de la función que cumpla cada uno de ellos.

En relación al AIF-1, este gen podría estar implicado en procesos de proliferación de los celomocitos. Futuros estudios deberían apuntar a confirmar el



rol de este gen en los procesos de proliferación asociados al reconocimiento de lo no propio. Finalmente, a través de los parámetros físico-químicos de la proteína y análisis filogenéticos del gen AIF-1 de diversos organismos dentro de la escala evolutiva, es posible afirmar que el AIF-1 es una molécula altamente conservada entre diferentes especies y con un alto grado de similaridad, considerándose como una molécula esencial en la respuesta inmunitaria.

## 7. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Abbas, A.K., A.H. Lichtman. 2000. General properties of immune responses. In: "Cellular and molecular immunology". Interamericana McGraw Hill.
2. Aderem, A. and R.J. Ulevitch. 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, 406: 782-787.
3. Amsler, C.H., J.B. McClintock and B.J. Baker. 1999. An antarctic feeding triangle: defensive interactions between macroalgae, sea urchins, and sea anemones. *Marine Ecology Progress Series*, 183: 105-114.
4. Amato, P., S. Shawn and B.C. Christner. 2009. Macromolecular synthesis by yeasts under frozen conditions. *Environmental Microbiology*, 11(3): 589-596.
5. Anderson, K.V., G. Jurgens and C. Nusslein-Volhard. 1985. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product, 42: 791-798.
6. Autieri, M.V., S. Kelemen, B.A. Thomas, E.D. Feller, B.I. Goldman and H.J. Eisen. 2002. Allograft inflammatory factor-1 expression correlates with cardiac rejection and development of cardiac allograft vasculopathy. *Circulation*, 106: 2218.
7. Autieri, M.V. and X. Chen. 2005. The ability of AIF-1 to activate human vascular smooth muscle cells is lost by mutations in the EF-hand calcium-binding region. *Experimental Cell Research*, 307: 204-211.

8. Beck, G. and G.S. Habicht. 1996. Immunity and the Invertebrates. *Scientific American*. The evolution of The Immune System: 60-66.
9. Bertheussen, K. and R. Seljelid. 1978. Echinoid phagocytes in vitro. *Exp. Cell. Res.*, 111: 401–412.
10. Beutler, B. 2004. Innate Immunity: an overview. *Mol. Immunol.*, 40: 845-859.
11. Bower, S.M., S.E. McGladdery and I.M. Price. 1994. Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. *Annu. Rev. Fish Dis.*, 4: 1-199.
12. Brey, T., J. Pearse, L. Baseh, J. McClintock and M. Slattery. 1995. Growth and production of *Stereochinus neumayeri* (Echinoidea: Echinodermata) in McMurdo Sound, Antarctica. *Marine Biology*, 124: 279-292.
13. Calderón, R. 2005. La apoptosis en biología y patología. *Revista Peruana de Cardiología*, 31(2): 119-128.
14. Carrasco, J. 2000. Regulación de las metalotioneínas durante el estrés y la inflamación, y su influencia durante la respuesta inflamatoria. Tesis de Doctorado en Biología. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.
15. Carrillo-Esper, R. 2003. Inmunidad innata, receptores toll y sepsis. *Cirugía y Cirujanos*, 71: 252-258.
16. Castellani, C., J.P. Rast. and E.H. Davidson. 2003. Isolation of pigment cell specific genes in the sea urchin embryo by differential macroarray screening. *Development*, 130: 4587-4596.

17. Chen, Z.W., B. Ahren, C.G. Ostenson, *et al.* 1997. Identification, isolation, and characterization of daintain (allograft inflammatory factor 1), a macrophage polypeptide with effects on insulin secretion and abundantly present in the pancreas of prediabetic BB rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 13879-13884.
18. Chia, F. and J. Xing. 1996. Echinoderm coelomocytes, a review. *Zool. Stud.*, 35: 231-254.
19. Clarke, A. and R.J. Leakey. 1996. The seasonal cycle of phytoplankton, macronutrients and the microbial community in a near shore Antarctic marine ecosystem. *Limnol. Oceanogr.*, 41: 1281-1294.
20. Clow, L.A., D.A. Raftos, P.S. Gross and L.C. Smith. 2004. The sea urchin complement homologue, SpC3, functions as an opsonin. *J. Exp. Biol.*, 207: 2147-2155.
21. Coffaro, K.A. and R.T. Hinegardner. 1977. Immune response in the sea urchin *Lytechinus pictus*. *Science*, 197: 1389-1390.
22. Cooper, E., E. Kauschke and A. Cossarizza. 2002. Digging for innate immunity since Darwin and Metchnikoff. *BioEssays*, 24: 319-333.
23. Costa, M. 2008. Estudio de la respuesta inmune y expresión génica del mejillón mediterráneo, *Mytilus galloprovincialis*. Tesis de Doctorado en Biología, Universidad de Vigo, Vigo, Galicia, España.
24. Dayton, P.K., G.A. Robillard and R.T. Paine. 1970. Benthic faunal zonation as a result of anchor ice at McMurdo Sound, Antarctica. In: Holdgate MW (ed) *Antarctic ecology*. Vol.1. Academic Press, New York.

25. Deegenars, M.L. and K. Watson. 1997. Stress proteins and stress tolerance in an Antarctic, psychophilic yeast, *Candida Psychrophila*. FEMS Microbiology Letters, 151: 191-196.
26. Dodds, A. W., M. Matsushita. 2007. The phylogeny of the complement system and the origins of the classical pathway. Immunobiology, 212: 233-243.
27. Edds, Kenneth. T. 1993. Cell Biology of Echinoid Coelomocytes. I. Diversity and Characterization of Cell Types. Journal of Invertebrate Pathology, 61: 173-178.
28. Endo, Y., M. Takahashi, T. Fujita. 2006. Lectin complement system and pattern recognition. Immunobiology, 211: 283-293.
29. Folch-Mallol, J.L., A. Garay-Arroyo, F. Lledias, A.A.Covarrubias Robles. 2004. La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Rev. Latinoam. Microbiol., 46(1-2): 24-46.
30. Fujiki, K., D.H. Shin, M. Nakao, T. Yano. 1999. Molecular cloning of carp (*Cyprinus carpio*) CC chemokine, CXC chemokine receptors, allograft inflammatory factor-1, and natural killer cell enhancing factor by use of suppression subtractive hybridization. Immunogenetics, 49: 909-914.
31. Fujita, T., M. Matsushita, Y. Endo. 2004. The lectin-complement pathway- its role in innate immunity and evolution. Immunol. Rev., 198: 185-202.
32. Gerardi, P., M. Lassegues and C. Canicatti. 1990. Cellular-distribution of sea urchin antibacterial activity. Biol. Cell., 70: 153-157.

33. Gross, P.S., W.Z. Al-Sharif, L.A. Clow and L.C. Smith. 1999. Echinoderm immunity and evolution of the complement system. *Dev. Comp. Immunol.*, 23: 429-442.
34. Gross, P.S., L.A. Clow and L.C. Smith. 2000. SpC3, the complement homologue from the purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*, is expressed in two subpopulations of the phagocytic coelomocytes. *Immunogenetics*, 51: 1034-1044.
35. Guerrero, J. 2007. VII Curso de Ciencias Básicas: Introducción a la inmunología general. *Gastr. Latinoam.*, 18(2): 113-116.
36. Guirardo, O., M. Solanas. I. Costa y E. Escrich. 2002. El citoesqueleto de la actina: Una perspectiva desde la biología molecular del cáncer. *Rev. Cubana. Invest. Biomed.*, 21(2): 115-122.
37. Hardy, K. 1999. Apoptosis in the human embryo. *Rev. Reprod.*, 4: 125-134.
38. Haug T., A. K. Kjuul, O.B. Styrvold, E. Sandsdalen, O.M. Olsen and K. Stensvag. 2002. Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea), and *Asterias rubens* (Asteroidea). *J. Invert. Path.*, 81: 94-102.
39. Henson, J.H. 1999. Relationships Between the Actin Cytoskeleton and Cell Volume Regulation. *Microsc. Res. Tech.*, 47: 155-162.
40. Hernández, A., P.M. Vasallo, A. Torres y E. Salido. 1995. Análisis del ARN: Estudio de la expresión génica. *NEFROLOGÍA*, 15(2): 67-84.
41. Hernández, D.R. 1999. Efecto de un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* en consumo, digestibilidad y variables ruminales en borregos alimentados

con pasto ovillo (*Dactylis glomerata*) cosechado a dos intervalos de rebrote. Tesis de maestría en ciencias. Colegio de Posgraduados, Montecillo, México.

42. Hillier, B.J. and V.D. Vacquier. 2003. Amassin, an olfactomedin protein, mediates the massive intercellular adhesion of sea urchin coelomocytes. *J. Cell. Biol.*, 160: 597-604.
43. Hoffmann, J.A. and J.M. Reichhart. 2002. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat. Immunol.*, 3: 121-126.
44. Holm, K., S. Dupont, H. Sköld, A. Stenius, M. Thorndyke and B. Hernroth. 2008. Induced cell proliferation in putative haematopoietic tissues of the sea star, *Asterias rubens* (L.). *The Journal of experimental biology*, 211: 2551-2558.
45. Isaeva, V.V. and E.S. Korenbaun. 1990. Defense functions of coelomocytes and immunity of echinoderms. *Sov. J. Marine Biol.*, 15: 353-363.
46. Ito, T., T. Matsutani, K. Mori and T. Normurat. 1992. Phagocytosis and hydrogen peroxide production by phagocytes of the sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. *Dev. Comp. Immunol.*, 16: 287-294.
47. Jacobson, M.D., M. Weil and M.C. Raff. 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell*, 88: 347-354.
48. Jockusch, B.M., C.A. Schoenenberger, J. Stetefeld, U. Aebi. 2006. Tracking down the different forms of nuclear actin. *Trends Cell Biol.*, 16: 391-396.

49. Johnson, P.T. 1969a. The coelomic elements of sea urchins (*Strongylocentrotus*): I. The normal coelomocytes, their morphology and dynamics in hanging drop. *J. Invertebr. Pathol.*, 13: 25–41.
50. Johnson, P.T. 1969b. The coelomic elements of the sea urchins (*Strongylocentrotus*). III. In vitro reaction to bacteria. *J. Invert. Pathol.*, 13: 42-62.
51. Johnson, P. T. 1970. Infection with diatoms and other microorganisms in the sea urchin spines (*Strongylocentrotus fanciscanus*). *J. Invert. Pathol.*, 16: 268-276.
52. Kägi, J.H. and A. Schäffer. 1988. Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry*, 27: 8509-8514.
53. Kägi, J.H.R. and B.J. Vallee. 1960. Metallothionein: A cadmium-and zinc containing protein from equine renal cortex. *J. Biol. Chem.*, 235: 3460-3465.
54. Kheradmand, F., E. Werner, P. Tremble, M. Symons and Z. Werb. 1998. Role of *Rac1* and oxygen radicals in collagenase-1 expression induced by cell shape change. *Science*, 280: 898-902.
55. Kretsinger, R.H. 1975. Hypothesis: Calcium modulated proteins contain EF hands. In *Calcium Transport in Contraction and Secretion*. pp. 469-78. E Carafoli, F Clementi, W Drabikowski, A Margreth (ed), Amsterdam: North- Holland.
56. Kreuzer, K.A., U. Lass, O. Landt, A. Nitsche, J. Laser, H. Ellerbrok, G. Pauli, D. Huhn, C.A. Schmidt. 1999. Highly sensitive and specific fluorescence reverse transcription-PCR assay for the pseudogene-free



- detection of beta-actin transcripts as quantitative reference. Clin. Chem., 45: 297-300.
57. Kruse, M., R. Steffen, R. Batel, I.M. Müller and W.E.G. Müller. 1999. Differential expression of allograft inflammatory factor 1 and of glutathione peroxidase during auto- and allograft response in marine sponges. Journal of Cell Science, 112: 4305-4313.
58. Laughlin, J. D. 1989. Coelomocytes of the urchin *Lytechinus pictus* (Echinoidea). J. Invertebr. Pathol., 54: 404-405.
59. Lecointre, G. and H. LeGuyader. 2001. Classification phylogénétique du vivant. Ed. BELIN.
60. Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut., *et al.* 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults, 86: 973-983.
61. Levinson, W. 2004. Microbiología e inmunología médicas. McGRAW-Hill interamericana. Octava edición. España.
62. Maillet, M. 2002. Biología Celular (en español). Pág. 132. Publicado por Elsevier España.
63. Mangiaterra, M.B.B.C.D. and J.R.M.C. Silva. 2001. Induced inflammatory process in the sea urchin (*Lytechinus variegatus*). J. Invertebr. Biol., 120: 178-184.
64. Margoshes, M. and B.L. Vallee. 1957. Cadmium protein from equine kidney cortex. J. Am. Chem. Soc., 79: 4813-4814.

65. Masullo, P., A. Sumoza-Toledo, H. Bhagat, S. Partida-Sánchez. 2006. TRPM channels, calcium and redox sensors during innate immune responses. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 17: 654–666.
66. McClintock, J. 1994. Trophic biology of antarctic shallow-water echinoderms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 111: 191-202.
67. Medzhitov, R. and Jr.C.A. Janeway. 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.*, 9: 4-9.
68. Meier, P., A. Finch and G. Evan. 2000. Apoptosis in development. *Nature*, 407: 796-801.
69. Metchnikoff, E. 1891. *Lectures on the Comparative Pathology of Inflammation Delivered at Pasteur Institute in 1891*. Dover, New York 224 p (republished in 1968).
70. Moreno, C. and A. Sánchez-Ibarrola. 2003. Receptores tipo toll: bases moleculares de la relación entre respuestas innatas y adaptativas del sistema inmunitario. *Rev. Med.Uni. Navarra*, 4(3): 29-33.
71. Moustakas, A., P.A. Theodoropoulos, A. Gravanis, D. Haussinger and C. Stournaras. 1998. The cytoskeleton in cell volume regulation. *Contrib. Nephrol. Basel Karger*, 123: 121-134.
72. Nair, S.V., H. Del Valle, P.S. Gross, D.P. Terwilliger and L.C. Smith. 2005. Macroarray analysis of coelomocyte gene expression in response to LPS in the sea urchin. Identification of unexpected immune in a invertebrate. *Physiol. Genomics*, 22: 33-47.
73. Nagakawa, Y., S. Nomoto, Y. Kato, R.A. Montgomery, G.M. Williams, A.S. Klein and Z. Sun. 2004. Over-Expression of AIF-1 in liver allografts

and peripheral blood correlates with acute rejection after transplantation in rats. *American Journal of Transplantation*, 4: 1949-1957.

74. Nakayama, S. and R.H. Kretsinger. 1994. Evolution of the EF-hand family of proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 23: 473-507.
75. Ortiz-Andrellucchi, A. 2007. Nutrición e inmunidad. *Revista Sociedad Médica Quirúrgica, Hospital Pérez de León*, 38(1): 12-18.
76. Pearson, H. 2006. The sushi genome project. Sea urchin genes reveal surprising similarities with humans. *Nature News*, online. [www.nature.com/news/2006/061109/full/news061106-15.html](http://www.nature.com/news/2006/061109/full/news061106-15.html).
77. Peck, L.S. 1998. Feeding, metabolism and metabolic scope in Antarctic ectoderms. *Soc. Exp. Biol. Semin. Ser.*, 66: 365-390.
78. Peck, L.S. 2005. Prospects for survival in the Southern Ocean: vulnerability of benthic species to temperature change *Antarctic Science*. 17(4): 497-507.
79. Percipalle, P. 2007. Genetic connections of the actin cytoskeleton and beyond. *BioEssays*, 29: 407-411.
80. Plytycz, B. and R. Seljelid. 1993. Bacteria clearance by the sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Dev. Comp. Immunol.*, 17: 283-289.
81. Real Academia Española. 2001. *Diccionario de la Lengua Española*. Vigésima segunda edición. Vol.2, Pág. 1224. Madrid, España.
82. Schmit, A. and M. N. Hall. 1998. Signalin to the actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 14: 305-38.

83. Sea Urchin Sequencing Consortium. 2006. The Genome of the Sea Urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science*, 314: 941-952.
84. Secombes, C.J. 1994. Enhancement of fish phagocyte activity. *Fish Shellfish Immunol*, 4: 421-436.
85. Service, M. and A.C. Wardlaw. 1984. Echinochrome-a as a bactericidal substance in the coelomic fluid of *Echinus esculentus* (L). *Comp. Biochem. Physiol.*, 79B: 161-165.
86. Shimada, J.C., L.R. Porto-Neto, M.B. Dauriz, B.E. Jensch-Junior and J.R.M.C. Silva. 2002. Phagocytosis in Vitro and in vivo in the antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri* at 0°C. *Polar Biol.*, 25: 891-897.
87. Shiraishi, T., A. Kuroiwa, T. Shirakusa, K. Kawahara, S. Yoneda, K. Kitano, K. Okabayashi and A. Iwasaki. 1997. Free radical-mediated tissue injury in acute lung allograft rejection and the effect of superoxide dismutase. *Ann. Thorac. Surg.*, 64: 821-825.
88. Silva, J.R., 2000. The onset of phagocytosis and identity in the embryo of *Lytechinus variegatus*. *Dev. Comp. Immunol.*, 24: 733-739.
89. Silva, J.R.M.C., F.J. Hernandez-Blazquez and R.L. Barbieri. 1998. Induced inflammatory response in the antarctic fish *Nothothenia neglecta*. *Polar Biol.*, 20: 206-212.
90. Silva, J.R.M.C., N. Staines, O.M. Parra and F.J. Hernandez-Blazquez. 1999. Experimental studies on the relationship between fish (*Nothothenia coriiceps*, Richardson, 1844) and parasite (*Pseudoterranova decipiens*, Krabbe, 1878) at antarctic temperatures. *Polar Biol.*, 22: 417-424.

91. Silva, J.R.M.C. and L. Peck. 2000. Induced in vitro phagocytosis of the antarctic starfish *Odontaster validus* (Koehler, 1906) at 0°C. *Polar Biol.*, 23: 225-230.
92. Silva, J.R.M.C., F.J. Hernandez- Blázquez, L.R. Porto-Neto and J.C.S. Borges. 2001. Comparative study of in vivo and in vitro phagocytosis including germicida capacity in *Odontaster validus* (Koehler, 1906) at 0°C. *J. Invertebr. Patho.*, 77: 180-185.
93. Smith, V.J. 1981. The echinoderms. In: Ratcliffe NA, Rowley, AF (Eds). *Invertebrate blood cells*. Pág. 513-562. Academic Press, London.
94. Smith, L.C. 2005. *Host responses to bacteria: innate immunity in invertebrates*. Cambridge University Press.
95. Smith, L. C. and E. H. Davidson. 1994. The echinoderm immune system: characters shared with vertebrate immune systems, and characters arising later in deuterostome phylogeny. In *Primordial Immunity: Foundations for the Vertebrate Immune System*. G. Beck, E. L. Cooper, G. S. Habicht, and J. J. Marchalonis, eds. New York Academy of Sciences, New York, 712: 213-226.
96. Smith, L.C., J.P. Rast, V. Brockton, D.P. Terwilliger, S.V. Nair, K.M. Buckely and A.J. Majeske. 2006. The sea urchin immune system. *Invertebrate Survival Journal*, 3: 25-39.
97. Splettstoesser, W.D. and P. Schuff-Werner. 2002. Oxidative stress in phagocytes - "The enemy within". *Microsc. Rev. Tech.*, 57: 441-455.
98. Takano, H., K. Inoue, R. Yanagisawa, M. Sato, A. Shimada, T. Morita, M. Sawada, K. Nakamura, C. Sanbongi and T. Yoshikawa. 2004. Protective

role of metallothionein in acute lung injury induced by bacterial endotoxin. *Thorax*, 59: 1057-1062.

99. Thornalley, P.J. and M. Vasak. 1985. Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochim. Biophys. Acta.*, 827: 36-44.
100. Utans, U., R.J. Arceci, Y. Yamashita and M.E. Russell. 1995. Cloning and characterization of allograft inflammatory factor-1: a novel macrophage factor identified in rat cardiac allografts with chronic rejection. *J. Clin. Invest.*, 95: 2954.
101. Utans, U., W.C. Quist, B.M. McManus, J.E. Wilson, R.J. Arceci, A.F. Wallace, M.E. Russell. 1996. Allograft inflammatory factor-1. A cytokineresponsive macrophage molecule expressed in transplanted human hearts. *Transplantation*, 61:1387-1392.
102. Watano, K., K. Iwabuchi, S. Fujii., *et al.* 2001. Allograft inflammatory factor-1 augments production of interleukin-6, -10 and -12 by a mouse macrophage line. *Immunology*, 104: 307.
103. Yang, Z.F., D.W. Ho, C.K. Lau, C.T. Lam, C.T. Lum, R.T.P. Poon and S.T. Fan. 2005. Allograft inflammatory factor-1 (AIF-1) is crucial for the survival and pro-inflammatory activity of macrophages. *International Immunology*, 17(11): 1391-1397.
104. Yubin Z., W. Yang, M. Kirberger, H.W. Lee, G. Ayalasomayajula and J.J. Yang. 2006. Prediction of EF-hand calcium-binding proteins and analysis of bacterial Ef-hand proteins. *Structure, Function and Bioinformatics*, 65: 643-655.

105. Zamir, E. and B. Geiger. 2001. Components of cell-matrix adhesions. *Journal of Cell Science*, 114(20): 3577-3579.

## 8. ANEXOS

### 8.1 Abreviaturas y Siglas:

**ACT:** Actina

**ADN:** Ácido desoxirribunucleico

**ADNc:** ADN complementario

**ARN:** Ácido Ribonucleico

**ARNsas:** Riibonucleasas

**ARNm:** ARN mensajero

**AIF-1:** Factor inflamatorio alogénico tipo 1

**BLAST:** Siglas en inglés de *Basic Local Aligment and Search Tool* = Alineamiento local básico y búsqueda de herramientas

**°C:** Grado centígrado

**MgCl<sub>2</sub>:** Cloruro de magnesio

**D:** dalton

**DDT:** ditiotreitól

**dNTP's:** Siglas en inglés de *Deoxynucleotide thriphosphates* = Desoxinucleótidos trifosfatos

**Ec:** Ecuación

**e.g:** Ejemplo

**EST:** Siglas en inglés de *Expressed Sequence Tag* = Etiquetas de secuencia expresadas.

**ExPASy:** Siglas en inglés de *Expert Protein Analisis System* = Sistema de análisis experto en proteínas

**FD:** Factor de dilución

**Fig:** Figura



**GAPDH:** Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.

**Ig:** Inmunoglobulina

**LPS:** Lipopolisacárido

**LRR:** Siglas en inglés de *Leucine-Rich Repeat* = Repeticiones ricas en Leucina

**MT:** Metalotioneína

**MTs:** Metalotioneínas

**NCBI:** Siglas en inglés de *National Center for Biotechnology Information* = Centro nacional de información sobre biotecnología

**ORF:** Siglas en inglés de *Open Read Frame* = Marco abierto de lectura

**PAMP's:** Siglas en inglés de *Pathogens-Associated Molecular Pathern* = Patrones moleculares asociados a patógenos

**PCR:** Siglas en inglés de *Polymerase Chain Reaction* = Reacción en cadena de la Polimerasa

**PRR:** Siglas en inglés de *Pattern Recognition Receptor* = Receptores de reconocimiento de patrones

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno

**rpm:** Revoluciones por minuto

**RT:** Siglas en inglés de *Reverse Transcription* = Transcripción Reversa

**Tc:** Linfocitos T citotóxicos

**TcR:** Receptor de Linfocitos T

**Th:** Linfocitos T colaboradores

**TLR:** Siglas en inglés de *Toll Like Receptor* = Receptor con homología a Toll

**TNF:** Siglas en inglés de *Tumor Necrosis Factor* = Factor de necrosis tumor

**Ts:** Linfocitos T supresores/reguladores

**µg:** Microgramo

**µl:** Microlitro

**UTR:** Siglas en inglés de *unstranlated region* = Región no traducida

**UV:** Ultravioleta

## 8.2 Tablas

**Tabla 5** Promedio de celomocitos totales en el erizo antártico *Sterechinus neumayeri* estimulados con una mezcla de bacterias muertas por calor (A). Ensayo de comparaciones múltiples (Duncan) (B).

A	Horas	<i>controles</i>		<i>estimulados</i>	
		24 h	48 h	24 h	48 h
	<b>Promedio</b> ( $\times 10^6$ )	3,34	5,59	7,48	4,02
	<b>SD</b>	0,58	0,97	1,13	0,98

B	Tratamiento / hora	control 24	control 48	estimulado 24	estimulado 48
		control 24		0,142175	0,019112
	control 48	0,142175		0,192842	0,27121
	estimulado 24	0,019112	0,192842		0,037001
	estimulado 48	0,620505	0,27121	0,037001	

**Tabla 6** Promedio de células esferoidales rojas en el erizo antártico *Sterechinus neumayeri* estimulados con una mezcla de bacterias muertas por calor (A). Ensayo de comparaciones múltiples (Duncan) (B).

A	Horas	<i>controles</i>		<i>estimulados</i>	
		24 h	48 h	24 h	48 h
	<b>Promedio</b> ( $\times 10^5$ )	1,09	1,73	3,04	1,15
	<b>SD</b>	0,419	0,121	2,097	0,284

B	Tratamiento / hora	control 24	control 48	estimulado 24	estimulado 48
		control 24		0,702166	0,264791
	control 48	0,702166		0,414832	0,715868
	estimulado 24	0,264791	0,414832		0,269203
	estimulado 48	0,9725	0,715868	0,269203	

**Tabla 7** Promedio de celomocitos totales en el erizo antártico *Sterechinus neumayeri* estimulados con levaduras (A). Ensayo de comparaciones múltiples Duncan (B).

A	Horas	<i>controles</i>		<i>estimulados</i>	
		24 h	48 h	24 h	48 h
	<b>Promedio (x10<sup>6</sup>)</b>	5,35	3,31	3,95	2,32
	<b>SD</b>	0,56	0,23	0,59	0,15

B	Tratamiento / hora	control 24	control 48	estimulado 24	estimulado 48
		control 24		0,004939	0,031972
	control 48	0,004939		0,30344	0,116234
	estimulado 24	0,031972	0,30344		0,019525
	estimulado 48	0,000275	0,116234	0,019525	

**Tabla 8** Promedio de células esferoidales rojas en el erizo antártico *Sterechinus neumayeri* estimulados con levaduras (A). Ensayo de comparaciones múltiples Duncan (B).

A	Horas	<i>controles</i>		<i>estimulados</i>	
		24 h	48 h	24 h	48 h
	<b>Promedio (x10<sup>5</sup>)</b>	3,6	2,81	3,05	0,47
	<b>SD</b>	0,79	0,72	0,87	0,06

B	Tratamiento / hora	control 24	control 48	estimulado 24	estimulado 48
		control 24		0,489134	0,607704
	control 48	0,489134		0,82612	0,042351
	estimulado 24	0,607704	0,82612		0,034044
	estimulado 48	0,014686	0,042351	0,034044	

**Tabla 9** Expresión del gen de la actina en el erizo antártico *Sterechinus neumayeri* estimulados con bacterias. El valor de  $P$ , se obtuvo a partir de un ensayo de Student's, entre los erizos controles y los erizos estimulados, considerándose significativo cuando  $P < 0,05$ .

Horas	<i>control</i>	<i>estimulado</i>	<i>control</i>	<i>estimulado</i>
	24 h	24 h	48 h	48 h
Promedio	94,73	97,28	54,08	20,98
SD	4,42	1,91	3,12	6,62
	$P= 0,62$		$P= 0,01$	

**Tabla 10** Expresión del gen factor alogénico tipo 1 en el erizo antártico *Sterechinus neumayeri* estimulados con bacterias. El valor de  $P$ , se obtuvo a partir de un ensayo de Student's, entre los erizos controles y los erizos estimulados,

Horas	<i>control</i>	<i>estimulado</i>	<i>control</i>	<i>estimulado</i>
	24 h	24 h	48 h	48 h
Promedio	65,21	87,40	63,82	42,60
SD	2,83	4,60	8,83	5,13
	$P= 0,01$		$P= 0,11$	

considerándose significativo cuando  $P < 0,05$ .

**Tabla 11** Expresión del gen de la metalotioneína en el erizo antártico *Sterechinus neumayeri* estimulados con bacterias. El valor de  $P$ , se obtuvo a partir de un

ensayo de Student's, entre los erizos controles y los erizos estimulados, considerándose significativo cuando  $P < 0,05$ .

Horas	<i>control</i>	<i>estimulado</i>	<i>control</i>	<i>estimulado</i>
	24 h	24 h	48 h	48 h
<b>Tabla Promedio</b>	86,00	47,13	92,24	83,03
<b>SD</b>	7,84	11,16	4,56	8,83
	<b><math>P= 0,04</math></b>		<b><math>P= 0,41</math></b>	

Expresión del gen de la actina en el erizo antártico *Sterechinus neumayeri* estimulados con levaduras. El valor de  $P$ , se obtuvo a partir de un ensayo de Student's, entre los erizos controles y los erizos estimulados, considerándose significativo cuando  $P < 0,05$ .

**Tabla 13** Expresión del gen factor alogénico tipo 1 en el erizo antártico *Sterechinus neumayeri* estimulados con levaduras. El valor de  $P$ , se obtuvo a partir de un ensayo de Student's, entre los erizos controles y los erizos estimulados, considerándose significativo cuando  $P < 0,05$ .

Horas	<i>control</i>	<i>estimulado</i>	<i>control</i>	<i>estimulado</i>
	24 h	24 h	48 h	48 h
<b>Promedio</b>	51,39	94,21	69,56	69,12
<b>SD</b>	5,78	6,63	3,46	5,34
	<b><math>P= 0,01</math></b>		<b><math>P= 0,94</math></b>	

<b>Promedio</b>	90,02	48,30	103,14	85,27
<b>SD</b>	3,78	0,66	2,85	3,93
	<b>P= 0,001</b>		<b>P= 0,02</b>	

**Tabla 14** Expresión del gen de la metalotioneína en el erizo antártico *Sterechinus neumayeri* estimulados con levaduras. El valor de  $P$ , se obtuvo a partir de un ensayo de Student's, entre los erizos controles y los erizos estimulados, considerándose significativo cuando  $P < 0,05$ .

<b>Horas</b>	<i>control</i>	<i>estimulado</i>	<i>control</i>	<i>estimulado</i>
	<b>24 h</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	<b>48 h</b>
<b>Promedio</b>	100,92	99,29	112,49	114,30
<b>SD</b>	3,61	2,49	2,50	2,19
	<b>P= 0,73</b>		<b>P= 0,62</b>	