



**Universidad  
Andrés Bello®**

**Universidad Andrés Bello**

Facultad de Ciencias de la Vida

Escuela de Ingeniería en Biotecnología

**Análisis de la expresión de los receptores tipo toll  
(TLRs) bajo estímulos de LPS y Poly I:C en  
celomocitos de erizo chileno (*Loxechinus albus*)**

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar  
al **Título Ingeniero en Biotecnología.**

**Director de Tesis: Dr. Juan Antonio Valdés**

Facultad de Ciencias de la Vida

Universidad Andrés Bello

**Maximiliano José Ignacio Villagra Figueroa**

**Santiago, Chile**

**Noviembre, 2018.**

# Índice

<b>1.-RESUMEN</b>	<b>3</b>
<b>2.- INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
2.1.- EL ERIZO CHILENO Y SU IMPORTANCIA PARA LA ECONOMÍA NACIONAL.	4
2.2.- SISTEMA INMUNE DE EQUINODERMOS	5
2.3.- ROL DE LOS RECEPTORES TIPO TOLL (TLRS) EN LA RESPUESTA INMUNE INNATA	9
2.4.- ARGUMENTOS DE LA HIPÓTESIS	13
<b>3.- HIPÓTESIS</b>	<b>14</b>
<b>4.- OBJETIVO GENERAL</b>	<b>14</b>
<b>5.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>14</b>
<b>6.- MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>15</b>
6.1.- CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE TLRS.	15
6.2.- ANIMALES Y TOMA DE MUESTRAS	16
6.3.- RECOLECCIÓN DE LÍQUIDO CELOMICO Y ESTIMULO CON PAMPs	16
6.4.- EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ARN DE CELOMOCITOS	17
6.5.- SÍNTESIS DE CDNA	18
6.6.- DISEÑO DE PARTIDORES Y PCR EN TIEMPO REAL	18
6.7.- MEDICIÓN VIABILIDAD CELULAR	19
6.8.- ANÁLISIS DE RESULTADOS	19
<b>7.- RESULTADOS</b>	<b>20</b>
7.1.- ELECCIÓN DE GENES CANDIDATOS	20
7.2.- ALINEAMIENTO MÚLTIPLE	23
7.3.- ÁRBOL FILOGENÉTICO	25
7.4.- DISEÑO Y VALIDACIÓN DE PARTIDORES	30
7.5.- CURVA DISOCIACIÓN PARTIDORES	32
7.6.- MEDICIÓN DENSIDAD Y VIABILIDAD CELULAR DE CELOMOCITOS	34
7.7.- PERFILES DE EXPRESIÓN <i>TLR3</i> , <i>TLR4</i> , <i>TLR6</i> Y <i>TLR8</i> EN RESPUESTA A POLY I:C Y LPS EN CELOMOCITOS	38
7.7.1.- TRATAMIENTO LPS	39
7.7.2.- TRATAMIENTO POLY I:C	44
<b>8.- DISCUSIÓN</b>	<b>50</b>
<b>9.- CONCLUSIONES</b>	<b>53</b>
<b>10.- BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>54</b>
<b>11.- ANEXO FIGURAS</b>	<b>62</b>

## 1.-Resumen

El erizo chileno es considerado una de las especies con mayor potencial para diversificar la industria acuícola en Chile, representando un 21% de la exportación de invertebrados marinos, debido a su alto valor comercial y gran demanda desde el mercado europeo y asiático. Actualmente las investigaciones se han basado principalmente en mejorar el crecimiento y desove de este invertebrado. En el año 2017 se logró secuenciar su transcriptoma, a partir del cual se ha logrado identificar una importante cantidad de genes relacionados al sistema inmune, principalmente receptores tipo Toll (TLR). En las distintas especies de erizos de mar, los TLRs están codificados por una gran familia multigénica compuesta por 60-250 genes en diferentes especies. En este estudio se describen 4 TLRs, los cuales fueron evaluados filogenética y transcripcionalmente, a través del estímulo con dos PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos): LPS y Poly I:C. El análisis filogenético se realizó comparando estas secuencias con los de TLRs de diferentes clases de vertebrados e invertebrados. Este análisis confirmó la conservación de las secuencias utilizadas en todas las especies. El análisis transcriptómico con Poly I:C, un análogo sintético al dsARN viral, generó un incremento en la expresión tiempo dependiente de *tlr3*, *tlr4*, *tlr6* y *tlr8* detectada mediante qPCR. En cambio, el estímulo con LPS, un componente de las bacterias Gram negativas, presentó una inducción en la expresión a las 4 horas únicamente en *tlr4*, sin afectar significativamente el nivel de transcrito de *tlr3*, *tlr6* y *tlr8*. El estudio de los TLRs en erizo de mar puede proporcionar nuevas perspectivas de la función de estos en el sistema inmune de invertebrados.

## 2.- Introducción

### 2.1.- El erizo chileno y su importancia para la economía nacional.

El erizo chileno (*Loxechinus albus*. Molina, 1782) es el equinodermo de mayor valor comercial en Chile, aportando el 21% de la producción nacional de invertebrados marinos (Aduana, 2016). Esta especie se distribuye a lo largo de toda la costa chilena, desde Arica (18°S) hasta tierra del Fuego (55°S) en la región de Magallanes (XII Región) habitando hasta los 106 metros de profundidad (Oyarzún *et al.*, 1999; Moreno y Molinet 2013). Su alimentación se basa en diferentes especies de algas, por lo cual se considera una especie generalista (Castilla & Moreno 1982).

En la actualidad, la cosecha de *L. albus* (que data de hace 10.000 años) se realiza desde bancos naturales ubicados en las costas de Chile principalmente desde la zona sur del país (Regiones de los Lagos, Aysén y Magallanes) y está permitida sólo entre los meses de marzo y septiembre. La mayoría de *L. albus* es exportado a Japón, y una mínima parte (aproximadamente 5%) es comercializado localmente. La alta demanda de *L. albus* lo ha convertido en la especie de erizo más extraída a nivel mundial y principal constituyente de la pesquería bentónica en Chile (Bustos & Olave., 2001). Desde 1976 ha aumentado su captura, llegando a un máximo de 60.166 toneladas en 2002 (IFOP 2017).

A partir de la necesidad de diversificar la acuicultura chilena, debido a la dependencia de la salmonicultura y considerando los grandes problemas que afectan a esta industria en la actualidad, es que se ha impulsado la investigación en el erizo chileno, la cual se ha basado mayoritariamente en mejorar la actividad económica relacionada a su distribución, reproducción, desarrollo de estados larvales y la extracción de este (Olave *et al.*, 2001). Sin embargo, a la fecha no existen estudios relacionados a su resistencia a patógenos y caracterización de su respuesta inmunológica frente a infecciones. Además, tomando como antecedente la devastación del erizo negro (*Diadema antillarum*) en el pacífico norte durante el año 1983 por parte de un patógeno, desconocido hasta la fecha (Edmunds *et al.*, 2001), es de vital importancia el estudio del sistema inmune del erizo chileno.

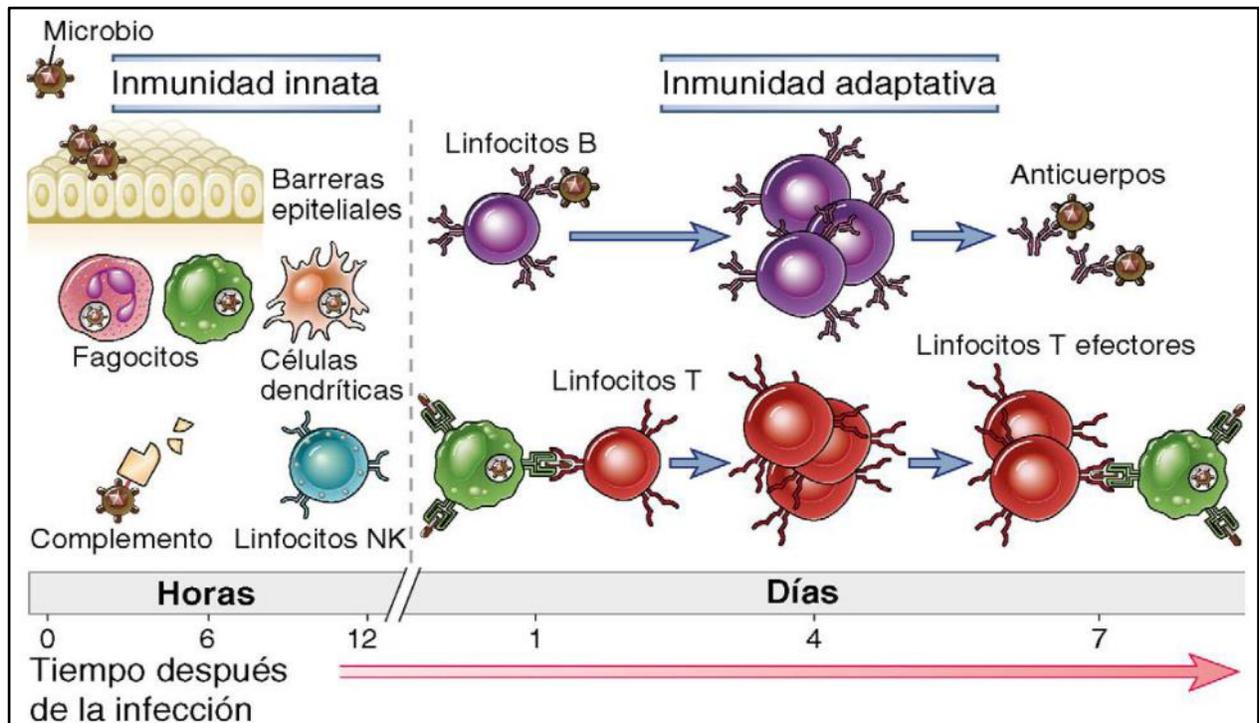
## 2.2.- Sistema inmune de equinodermos

El sistema inmune es el conjunto de estructuras y procesos biológicos en un organismo que le permiten mantener la homeostasis o equilibrio interno ante sustancias extrañas, identificadas como “no propio”, ya sea microbiológicas (virus, bacterias, hongos, protozoos y parásitos multicelulares) o contra macromoléculas (proteínas y polisacáridos), sin implicar una consecuencia patológica de tal reacción (Abbas *et al.*, 2001). La respuesta inmunitaria comienza con el reconocimiento del patógeno o material extraño y termina con el desarrollo de un mecanismo capaz de eliminarlo (Male *et al.*, 2007). Existe una gran diversidad de agentes infecciosos, requiriendo una gran diversidad de respuestas para poder combatir cada tipo de infección (Male *et al.*, 2007).

La respuesta inmunitaria puede ser dividida en dos categorías: Respuesta inmune innata (natural o inespecífica) y Respuesta inmune adaptativa (adquirida o específica), ambas se diferencian en la especificidad y el tiempo que tardan en provocar su efecto.

La respuesta innata no se modifica tras la exposición reiterada a un determinado patógeno, sin embargo, constituye la primera línea de defensa que controla los primeros pasos de la respuesta inmune, está conformada por barreras físicas, células fagocíticas, eosinófilos, células citotóxicas naturales (NK) y diversas moléculas que circulan en la sangre (complemento y proteínas de la fase aguda) (Male y Roitt., 1996; Abbas *et al.*, 2001). Es capaz de discriminar entre una variedad de patógenos y lo propio, deduciéndose que no es completamente inespecífica como se pensaba (Randon-Barragan, 2009).

Por su parte, la respuesta adaptativa, responde de manera específica a cada patógeno siendo más lenta en su desarrollo, además posee la capacidad de crear memoria inmunológica (Rubio-Godoy, 2010). En resumen, las dos características claves de la respuesta adaptativa son especificidad y memoria (Male *et al.*, 1996).



**Figura 1. Inmunidad innata y adaptativa.** Los mecanismos de la inmunidad innata son los primeros en efectuar una respuesta contra infecciones. Las respuestas adaptativas se inician después y consisten en la activación de linfocitos. **Abas. K.A., 2012.**

Respecto al sistema inmune de invertebrados marinos, este se ha descrito como exclusivamente innato (Smith *et al.*, 2006). Los principales componentes del Sistema inmune innato corresponden a los receptores de reconocimiento de patrones (*Pattern Recognition Receptors* o PRRs) que están encargados del reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*, PAMPs) (Duez *et al.*, 2006). De particular interés son los PRRs encargados de activar vías de transducción intracelulares o señalizadores, que conducen a la expresión de una variedad de genes de la respuesta inmune, incluyendo citoquinas pro-inflamatorias (Medzhitov *et al.*, 2000).

A pesar de no existir estudios en el sistema inmune de erizo chileno, si existe una gran cantidad de estudios en *S.purpuratus*, *L.variegatus*, *P.lividus*, entre otros. Los cuales han aportado gran cantidad de datos para el entendimiento del sistema inmune innato en general.

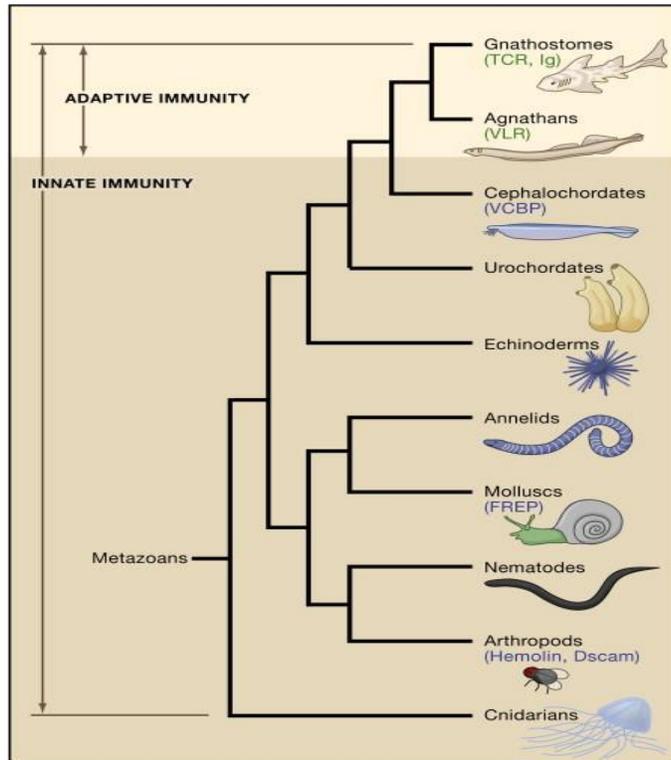
Durante muchos años se pensó que los invertebrados no poseían un sistema inmune reconocible, pensamiento que no compartía Elie Metchnikoff, quien en el año 1893 fue el primero en demostrar la encapsulación celular de un cuerpo extraño insertado en un invertebrado ( Metchnikoff 1893), en donde observó que al introducir una espina de rosal en la cavidad celómica de la estrella, esta era atacada por células móviles que se acercaban a la espina e intentaban defender a la larva mediante la fagocitosis del invasor (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”. Sin embargo, no fue hasta setenta años después que Hildemann y sus colegas demostraron la capacidad de varias especies de equinodermos para diferenciar lo propio de tejido no propio, a través de estudios de rechazo de aloinjerto (Hildemann y Dix, 1972, Karp y Hildemann, 1976). Estas observaciones iniciales se ampliaron en estudios de erizos de mar como en *Lytechinus pictus* y *Strongylocentrotus purpuratus*, en los que se definió la naturaleza no específica de la respuesta inmune innata de los erizos de mar (Coffaro y Hinegardner, 1977; Coffaro, 1979, 1980; Smith y Davidson 1992).

Estos y otros estudios identificaron las células del sistema circulatorio abierto en los equinodermos adultos, los celomocitos, como los principales efectores de las respuestas de defensa y como los principales mediadores del rechazo de aloinjertos (Hildemann y Dix, 1972; Coffaro y Hinegardner, 1977), respuesta a lesión o infección y eliminación de sustancias extrañas (Reinisch y Bang, 1971; Bertheussen, 1981; Yui y Bayne, 1983; Plytycz y Seljelid, 1993).

Actualmente los celomocitos se consideran el principal componente del sistema inmune de los invertebrados marinos (Liao *et al.*, 2017). Los celomocitos comprenden todos los tipos celulares que circulan libremente en el fluido de la cavidad celómica de 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 Korembaum, 1990).

El número de celomocitos varía entre especies y también entre individuos de la misma especie de acuerdo a su tamaño y condiciones fisiológicas (tabla 1) (Smith, 1981; Laughlin, 1989; Gross *et al.*, 1999; Arriza *et al.*, 2013). Los fagocitos constituyen la mayor proporción de celomocitos que están involucrados en el rechazo de agentes externos, quimiotaxis, fagocitosis, encapsulación, expresión de genes inmunitarios, aglutinación y reacciones de agregación (Gross *et al.*, 2000; Clow *et al.*, 2004 y Hillier y Vacquier, 2003).

Dentro de la batería de genes relacionados al desarrollo de la respuesta inmune que expresan los celomocitos se encuentra una gran diversidad de PRRs en particular los receptores tipo Toll (TLRs).



**Figura 2. Árbol filogenético teórico sobre la evolución de la inmunidad.**

Se muestran las relaciones evolutivas teóricas de los metazoos y el surgimiento de la inmunidad adaptativa en conjunción con la inmunidad innata. Familias de moléculas inmunes distintas a Receptores de tipo Toll están marcadas en azul: Dominios de Inmunoglobulinas de tipo V y proteínas con dominios de unión a quitina (VCBP), Proteínas relacionadas con fibrinógeno (FREP). Receptores inmunes basados en recombinación indicados en verde: Receptor de

células T (TCR), inmunoglobulinas (Ig) y receptor de linfocitos variables (VLR). **Cooper et al., 2006.**

Tabla 1: Subpoblaciones de celomocitos de distintos tipos de erizos de mar. El rango de diferencia entre subpoblaciones está representado en paréntesis. (modificado de Gross et al., 2000)

<b>Tipo celular</b>	<b>Subpoblación de celomocitos (%)</b>
<b>Fagocitos</b>	76.6 (60.0-82.6)
<b>Células Vibrátiles</b>	16.9 (15.0-20.0)
<b>Células esferoidales rojas</b>	7.8 (1.8-16.0)
<b>Células esferoidales incoloras</b>	3.7 (0.7-9.3)

### **2.3.- Rol de los Receptores tipo Toll (TLRs) en la respuesta inmune innata**

Dentro de los PRRs destaca la familia de los Receptores de tipo Toll (*Toll like Receptors*, TLRs), homólogos a los Toll de *Drosophila* (Hashimoto et al., 1988), identificados a inicios de la década de los 90 por su papel determinante en la respuesta inmune contra infecciones fúngicas (West et al., 2006).

Los TLR son los principales receptores de reconocimiento de patrones (PRR) de la superficie celular en el reconocimiento de los componentes microbianos y la inducción de respuestas inmunes (Akira y Takeda, 2004). Estos receptores son expresados en células como: neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, células epiteliales mucosas, células B, células T, células trofoblásticas, plaquetas y células megacariocíticas (Randon-Barragan, 2009; Takano et al., 2010). También se encuentran en algunas células no inmunitarias como fibroblastos y células epiteliales (Takano et al., 2010).

Los TLR se encuentran en vertebrados e invertebrados (Imler et al., 2004), y son glicoproteínas transmembrana de tipo 1, con tamaños moleculares entre 90-115 kDa. Se distinguen por poseer un dominio extracelular de unión al ligando compuesta de repeticiones ricas en leucina (LRR), así como uno intracelular, dominio del receptor Toll/IL-1, llamado dominio TIR, por su homología con el dominio citoplasmático del receptor de IL-1 (Akira y Takeda, 2004; Takano et al., 2010).

Las LRRs se encuentran en tándem y consisten entre 20-40 aminoácidos de largo, los que contienen una secuencia consenso de 10 aminoácido, XLXXLXLXXN, característica de las LRR en todos los TLR (Bell *et al.*, 2003; Matsushima *et al.*, 2007). Además de otra secuencia consenso, X $\theta$ XX $\theta$ XXXXFXXLX, que poseen algunas LRR en los TLR (Bell *et al.*, 2003; Matsushima *et al.*, 2007). Las LRRs en su conjunto forman una estructura tipo “herradura” para el dominio extracelular del receptor (Bell *et al.*, 2003). La estructura tipo herradura es característica de estos dominios, las variaciones en la secuencia y el largo de la inserción de las LRR generan diferentes conformaciones que están relacionadas con el reconocimiento específico de los PAMPs (Bell *et al.*, 2003).

Los ligandos para TLRs son motivos estructurales conservados de los microbios, denominados PAMPs, éstos incluyen lipopolisacárido (LPS), flagelina, lipoproteínas, glicolípidos, y los ácidos nucleicos de origen bacteriano, viral, parasitario o fúngica. En la Tabla 2 se muestra un resumen de los TLR que se han encontrado en mamíferos junto con los PAMPs que reconocen cada uno de ellos.

Tabla 2: TLR de mamíferos, expresión y ligados.

Receptor	Expresión (mRNA)	Ligando	Origen del ligando
TLR1 (con TLR2)	M, N, LB, NK, CDi, CDpl	Lipopéptidos triacilados (Pam <sub>3</sub> Cys) Factores solubles	Bacterias y micobacterias <i>Neisseria meningitidis</i>
TLR2	PMN, M, CD, CDi	Lipoproteínas y lipopéptidos Peptidoglicano (PG) Ácido lipoteicoico (LTA) Lipoarabidomanano Modulina soluble en fenol Glicoinositolfosfolípidos Glicolípidos Porinas Lipopolisacárido atípico Lipopolisacárido atípico Zymosan	Varios patógenos Bacterias Gram + Bacterias Gram + Mycobacteria <i>S. epidermidis</i> <i>T. cruzi</i> <i>T. maltophilum</i> <i>Neisseria</i> <i>Leptospira interrogans</i> <i>Porphyromonoa gingivalis</i> Hongos
TLR3	CD, CDi	RNA viral de doble cadena Poli(I:C)	Virus Sintético
TLR4	C.End, M, N, CD	Lipopolisacárido (LPS) Poteína de fusión Proteína de la envoltura HSP60	Bacterias Gram - Virus Sincitial respiratorio Virus de tumor mamario <i>Chlamydia pneumoniae</i>
TLR5	M, CD, CDi	Flagelina	Bacterias
TLR6 (con TLR2)	M, CDi, CDpl	Lipopéptidos diacilados (Pam <sub>2</sub> Cys) LTA Zymosan	Mycoplasma Bacterias Gram + Hongos
TLR7	CDpl	Imidazoquinolina ss RNA	Compuesto sintético Virus
TLR8	M, CDi	Imidazoquinolina ss RNA	Compuesto sintético Virus
TLR9	M, CDpl	DNA con motivos CpG	Bacterias y virus
TLR10	CDi	ND	ND
TLR11	Epitelio renal*	ND	Bacterias uropatógenicas

*M: monocito; N: neutrófilo; CD: célula dendrítica, CDi: CD inmadura; CDpl: CD plasmocitoide; C.End: célula endotelial; NK: Natural killer. \* Murino. En humanos se expresa una forma truncada de la proteína. (Adaptado de Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol 2004;4:499-511.*

Los TLR se “activan” uniéndose a su ligando, formando dímeros entre TLRs, ya sean homodímero o heterodímeros. Se ha sugerido que una vez que los TLR se activan, desencadenan la señalización induciendo dimerización de los dominios TIR, lo que provee una plataforma para el reclutamiento de las proteínas adaptadoras de la cascada de señalización (O’neill *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2007). Este grupo de moléculas adaptadoras, se caracteriza por poseer un dominio TIR. Las interacciones TIR-TIR entre la molécula adaptadora y el dominio intracelular del TLR desencadenan la cascada de señalización. Los adaptadores que se han descrito, hasta el momento, en mamíferos son Factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88), proteína adaptadora con un dominio TIR (TIRAP), adaptador con dominio TIR que induce IFN- $\beta$  (TRIF), y molécula adaptadora relacionada a TRIF (TRAM) (Kumar *et al.*, 2009). El descubrimiento de varios adaptadores que contienen TIR, llevaron a la comprensión que tipos individuales de TLR reclutan distintos adaptadores citosólicos que pueden desencadenar respuestas específicas a microbios determinados (Akira *et al.*, 2006; Kawai *et al.*, 2010). Además, el tipo de señalización celular específicas definidas por sus propiedades inmunológicas pueden alterar la respuesta desencadenada por la señal de un mismo TLR en diferentes tipos de células (Barbalat *et al.*, 2009). Hasta el momento, 11 TLRs han sido identificados en humanos y 13 en ratón los que, de acuerdo al patógeno que reconocen, se pueden agrupar en dos categorías: TLRs de PAMPs bacterianos (TLR2, 4 y 5) o virales (TLR3, 7/8 y 9), los que se localizan principalmente en la superficie celular o requieren su internalización a compartimientos endosomales, respectivamente (Miggin *et al.*, 2006).

## 2.4.- Argumentos de la hipótesis

A diferencia de los insectos y vertebrados, los TLRs en erizos de mar son codificados por una gran familia de multigenes. A la fecha, 68 y 253 genes de TLR han sido identificados en *L. variegatus* y *S. purpuratus*, respectivamente, representando un número 5 veces mayor a lo conocido en vertebrados (Buckley and Rast, 2012; Smith et al., 2006). La diversidad de secuencias entre estos genes es mayor en el ectodominio LRR, consistente con una diversificación asociada de especificidad de reconocimiento inmune (Gross, et al 1999).

La gran cantidad de secuencias de TLRs descritas para erizos de mar (e invertebrados marinos en general) revelan la importancia que tienen estos receptores en el desarrollo de la respuesta inmune innata de estos organismos. Sin embargo, hasta la fecha no existen estudios que evalúen el comportamiento de los TLRs frente a diferentes PAMPs en el erizo chileno. Esta información resulta clave para comprender las bases moleculares que regulan la respuesta inmune innata de esta especie de invaluable valor para la economía nacional.

Recientemente, se obtuvo el transcriptoma correspondiente a los tejidos de gónada, intestino y celomocitos de erizo chileno (Antiqueo et al., 2018, en preparación). Análisis preliminares de este estudio revelan una gran variedad de genes putativos de receptores tipo Toll en esta especie. Por lo tanto, considerando el gran repertorio de TLRs presentes en el erizo chileno es interesante evaluar si existen diferencias transcripcionales de estos receptores bajo estímulos con PAMPs bacterianos (LPS) y virales (Poly I:C), lo que indicaría su rol diferencial durante el desarrollo de la respuesta inmune.

### **3.- Hipótesis**

LPS y Poly I:C promueven la expresión diferencial de los receptores tipo Toll 3, 4, 6 y 8 en celomocitos del erizo chileno (*Loxechinus albus*).

### **4.- Objetivo general**

Evaluar los patrones de expresión de receptores tipo Toll y viabilidad celular en celomocitos de *Loxechinus albus* estimulados con LPS y Poly I:C.

### **5.- Objetivos específicos**

- 1) Identificar y caracterizar secuencias de TLRs en el transcriptoma de erizo rojo.
- 2) Identificar filogenéticamente las diferencias evolutivas de los TLRs en erizo rojo y compararlos con distintas especies.
- 3) Evaluar la respuesta transcripcional de TLRs mediante qPCR en celomocitos de erizo rojo estimulados con LPS y Poly I:C

## 6.- Materiales y métodos

### 6.1.- Caracterización y análisis filogenético de TLRs.

A partir del transcriptoma de *Loxechinus albus* (Antiqueo *et al.*, 2018, *en revisión*) se identificaron las secuencias putativas de TLRs mediante BLASTx, utilizando un e-value  $< 1 \times 10^{-6}$ . A partir de la secuencia nucleotídica de cada TLR se tradujo la secuencia aminoacídica correspondiente a los seis marcos de lectura utilizando la herramienta ExPASy – Translate Tool (<https://web.expasy.org/translate/>). Posteriormente, se realizó un BLASTp contra siete especies (tabla 3) con el fin de identificar cuál de los marcos de lectura podría dar origen a un TLR y descartar los falsos positivos.

Tabla 3: Especies utilizadas para BLASTp contra contigs del transcriptoma de *Loxechinus albus*

Nombre científico	Taxonomy ID
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	7668
<i>Danio rerio</i>	7955
<i>Sus scrofa</i>	9823
<i>Salmo salar</i>	8030
<i>Bos Taurus</i>	9913
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	9986
<i>Cyprinus carpio</i>	7962
<i>Apostichopus japonicus</i>	307972

<i>Ciona intestinalis</i>	7719
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	8022
<i>Mus musculus</i>	10090
<i>Drosophila</i>	7215
<i>Homo sapiens</i>	9606

A continuación, se caracterizaron los dominios del total de TLRs identificados utilizando la herramienta CD-search tool (<https://ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb.cgi>) y analizados de manera gráfica con el programa IBS (GPS, <http://ibs.biocuckoo.org/>). Luego se escogieron las cuatro secuencias candidatas que presentaron mayor cobertura e identidad de cada especie y estas fueron utilizadas para realizar alineamientos múltiples de secuencia y arboles filogenéticos (tipo neighbor-joining) utilizando los programas CLUSTAL W (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) y MEGA 5.05, respectivamente.

## 6.2.- Animales y toma de muestras

Los erizos rojos, *Loxechinus albus*, fueron obtenidos desde el Centro de Investigación Marina de Quintay (CIMARQ) de la universidad Andrés Bello, ubicado al sur de la región de Valparaíso, Chile (33° 13'S, 71° 38'O). Los ejemplares fueron alimentados con algas extraídas directamente de la costa de Quintay.

Los experimentos se realizaron con 30 ejemplares juveniles de diámetro promedio de  $4,5 \pm 0,5$  cm y 35 gramos de peso promedio. Estos fueron transportados a Santiago en un acuario con flujo de aire constante y agua de mar filtrada y se mantuvieron en una incubadora a 10°C hasta su utilización. Los celomocitos fueron obtenidos mediante el corte de la membrana peristomal del erizo y la posterior recolección del contenido acuífero liberado desde la cavidad celómica.

## 6.3.- Recolección de líquido celómico y estímulo con PAMPs

Una vez obtenido el fluido celómico de todos los ejemplares, este fue dispuesto en un vaso precipitado haciendo un “pool” de fluido celómico de todos los ejemplares junto a un volumen igual de solución anticoagulante para celomocitos (20mM Tris, 0.5M NaCl, 70mM EDTA, pH 7.5). A continuación, se colocaron 5 ml de líquido celómico en placas de cultivo de 6 pocillos para ser estimulados con los PAMPs: LPS y Poly I:C, en concentraciones de 1µg/mL y 2 µg/mL respectivamente durante 2, 4, 8 y 12 horas. Los controles fueron tratados con la misma solución anticoagulante para celomocitos y dispuestos en placas de cultivo de 6 pocillos idénticas a las placas de desafío inmune, en los mismos tiempos antes indicados, incluido el tiempo 0 horas.

#### **6.4.- Extracción y cuantificación de ARN de celomocitos**

El fluido celómico fue centrifugado 10 min a 2000 RPM, con el fin de concentrar las células ( $3 \times 10^6$  células/mL), luego se retiró todo el sobrenadante para realizar la extracción con reactivo Trizol (Ambion™), según protocolo del fabricante (Hernández et al., 1995).

Luego se separaron las fases mediante la adición de 200 µL de cloroformo, el cual es agitado vigorosamente por algunos segundos. Posteriormente se incubó a temperatura ambiente por 2-3 minutos y luego se centrifugó por 15 minutos a 12000 RPM a 4°C. El cloroformo tiene la capacidad de eliminar ARNasas, así como de disolver lípidos y proteínas, y luego de este procedimiento el ARN es selectivamente retenido en la fase acuosa (Chomczynski y Sacchi., 1987).

Esta fase acuosa fue pasada a un nuevo tubo para precipitar el ARN, con 500 µl de alcohol isopropílico. Se incubaron a temperatura ambiente por 10 min y luego se centrifugó en las mismas condiciones que la centrifugación anterior, obteniendo como producto un sobrenadante y un “pellet” en el fondo del tubo.

Para finalizar, el precipitado de ARN fue lavado con etanol 75%, centrifugado (7500 rpm por 5min a 4°C), posteriormente se descartó el etanol, por último, se dejó secar a temperatura ambiente, se le añadió 80 µL de agua libre de nucleasas y se almacenó a -80°C hasta su cuantificación.

Luego de la extracción de ARN, las muestras fueron cuantificadas en el equipo Epoch multivolumen (BioTek, Winooski, VT, EE.UU), y se analizó la integridad incubando el ARN con buffer de carga 5x (Azul de bromofenol, 500 mM EDTA a pH 8, Formaldehído al 37%, formamida, 100% Glicerol y MOPS 10x) para ser visualizado por electroforesis en gel de agarosa 1.2 % en buffer MOPS 1x por 50 min a 70 V.

### **6.5.- Síntesis de cDNA**

El ARN total fue sometido a la reacción de transcripción reversa para la producción de ADN complementario (ADNc) tanto las muestras control, como los tratamientos con POLY I:C Y LPS. Se utilizaron 800 ng de ARN total con razón  $A_{260/280}$  mayor a 1,8 y menor a 2,0. Se utilizó el kit “QuantiTect® Reverse Transcription” (Qiagen, Austin, TX, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **6.6.- Diseño de partidores y PCR en tiempo real**

Se diseñaron partidores específicos para TLR 3, 4, 6, 8, 13.1 y 13.2 utilizando los programas Primer3 y AmplifX a partir de 4 secuencias caracterizadas anteriormente, además estos fueron corroborados con el programa OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies).

El PCR en tiempo real fue realizado en un termociclador Mx3000P (Stratagene, USA) utilizando un volumen final de 15,2  $\mu$ l, los cuales contenían 7,5  $\mu$ l de Brilliant II SYBR Green qPCR Master Mix 2x (Agilent Technologies), 1,5  $\mu$ l de un mix de partidores sentido y antisentido para cada gen (10  $\mu$ M), 0.2  $\mu$ l de ROX 1 mM y 6  $\mu$ l de cDNA en la dilución valorada (1:20), la que fue estimada realizando una curva estándar con diluciones seriadas de un pool de cDNA. Anterior a esta etapa se realizó una curva de disociación con el fin de corroborar la especificidad de los partidores y de descartar la formación de dímeros de estos. Por último, se realizó la cuantificación de los niveles de expresión relativa de los 4 TLRs utilizando como gen normalizador a 18s. Las condiciones de los PCR fueron: inicial de 10 min a 95°C, intermedia de 40 ciclos de 30

s. a 95°C, 30 s a T<sub>m</sub> (temperatura de fusión de la pareja de partidores), 32 s a 95°C y una etapa final de 30 s a 72°C.

### **6.7.- Medición viabilidad celular**

Todas las muestras de celomocitos fueron sometidas a un protocolo de tinción para discriminar viabilidad celular mediante el kit LIVE/DEAD® *Viability/Cytotoxicity* Kit, en donde se utilizaron 150 µL de *Ethidium monodimer-1* 10µM (Componente B) y 150 µM de Calcein AM 10 µM (Componente A), y fueron incubadas por 20 min a temperatura ambiente. La visualización se realizó en un Microscopio Trinocular Olympus aumento 40x, filtro 590nm para células vivas y 480nm para células muertas las imágenes fueron editadas en el programa ImageJ (NIH, USA).

### **6.8.- Análisis de resultados**

Los experimentos se realizaron con tres réplicas biológicas para cada tiempo de tratamiento y control, y los qPCR se realizaron cuantificando cada muestra en triplicado. Todos los resultados obtenidos fueron normalizados respecto a la condición control, representado en veces de inducción, y se expresaron como un promedio ± error estándar de la media (SEM). Para evaluar las diferencias entre los grupos clasificados se realizó un análisis de varianza de una vía (one way-ANOVA), seguido de una prueba post hoc de Tukey. Para los gráficos agrupados se realizó un análisis de varianza de dos vías (two way-ANOVA), seguido de una prueba de Sidak. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el programa computacional GraphPad Prism 6.

## **7.- Resultados**

### **7.1.- Elección de genes candidatos**

Hasta la fecha, el efecto de los PAMPS sobre la expresión diferencial de TLR en Erizo chileno no ha sido determinada. Gracias a la reciente secuenciación del transcriptoma de esta especie fue posible identificar una gran variedad de genes relacionados con la respuesta inmune, principalmente receptores tipo Toll.

Luego de encontrar 40 TLRs putativos desde el transcriptoma de *L.albus* por BLASTx, se seleccionaron los 6 con mayor porcentaje de identidad y cobertura respecto a los genes TLR utilizados en la literatura para *S. purpuratus* y *P. lividus* (tabla 4).

Tabla 4: Resultado de Blast utilizando los contigs provenientes del transcriptoma de *L.albus* contra la base de datos de proteínas proveniente de siete especies diferentes.

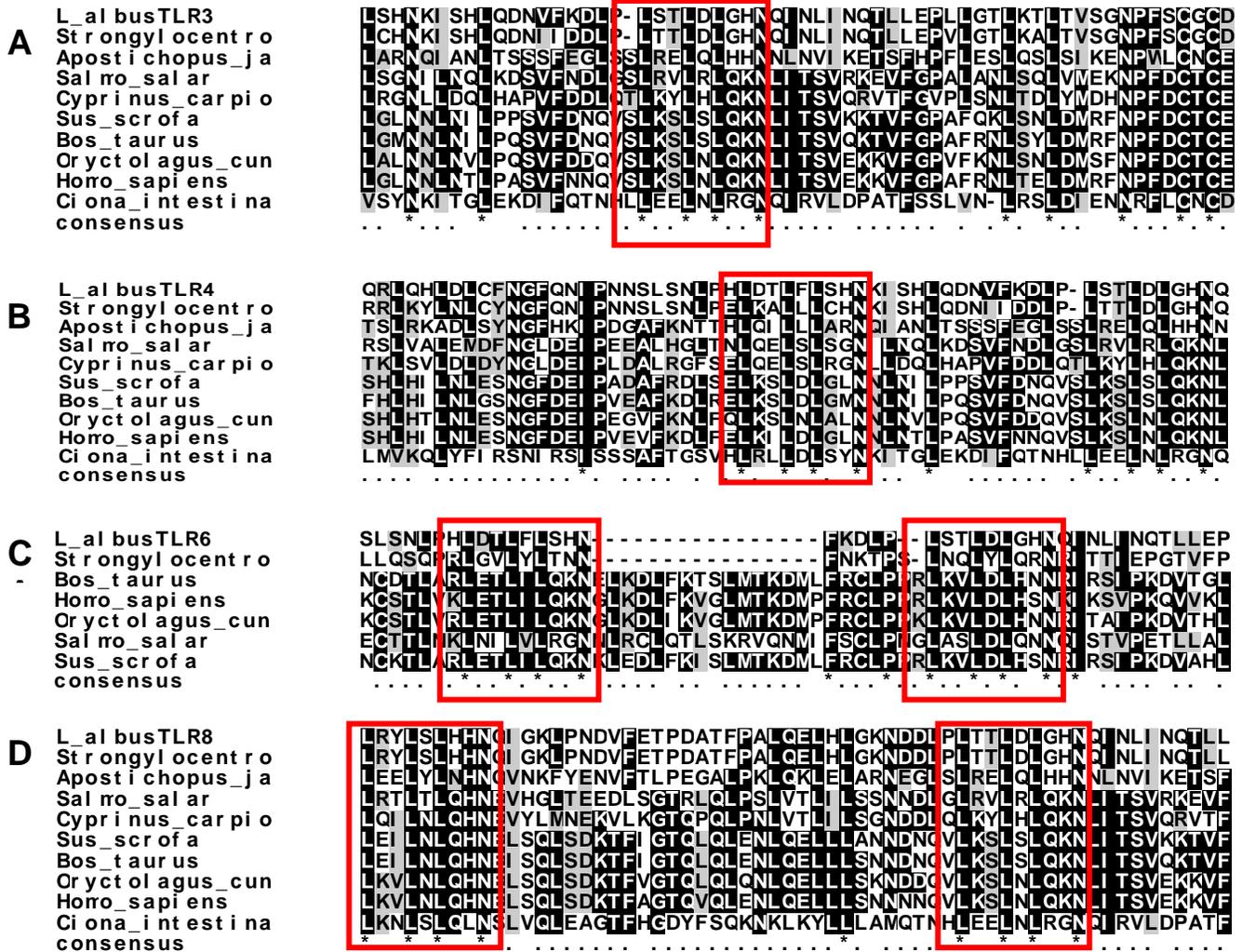
	<b>ESPECIE</b>	<b>GEN</b>	<b>COBERTURA</b>	<b>IDENT</b>
>contig_13797	<i>S. purpuratus</i>	TLR 3	100	82
>contig_47440	<i>S. purpuratus</i>	TLR 8	99	70
>contig_89250	<i>S. purpuratus</i>	TLR 4	100	85
>contig_69174	<i>S. purpuratus</i>	TLR 6	100	88

	<b>ESPECIE</b>	<b>GEN</b>	<b>COBERTURA</b>	<b>IDENT</b>
>contig_37051	<i>S. purpuratus</i>	TLR 3	99	74
>contig_38150				
>contig_38947	<i>S. purpuratus</i>	TLR 4	100	72
>contig_38948	<i>S. purpuratus</i>	TLR 4	98	79
>contig_50231	<i>S. purpuratus</i>	TLR 3	100	78
>contig_50799	<i>S. purpuratus</i>	TLR 3	99	60
>contig_53010	<i>S. purpuratus</i>	TLR 4	94	71
>contig_60596i	<i>S. purpuratus</i>	SLIT 2	96	67
>contig_61942	<i>S. purpuratus</i>	TLR 3	100	78
>contig_72813	<i>S. purpuratus</i>	TLR 3	93	32
>contig_79828	<i>S. purpuratus</i>	LRR P1	99	54
>contig_82856	<i>S. purpuratus</i>	TLR 4	96	59

>contig_83146	<i>S. purpuratus</i>	CENTRIOLIN	99	82
>contig_88250	<i>S. purpuratus</i>	TLR 4	100	80
>contig_94594	<i>S. purpuratus</i>	TLR 3	100	56
>contig_95101	<i>S. purpuratus</i>	TLR 4	100	69
>contig_96463	<i>S. purpuratus</i>	TLR 4	100	74
>contig_32069				
>contig_35294				
>contig_38949	<i>S. purpuratus</i>	TLR 6	100	75
>contig_50194				
>contig_50426	<i>S. purpuratus</i>	CARBOXYPEP	100	85
>contig_53248	<i>S. purpuratus</i>	TLR 3	92	88
>contig_69173	<i>S. purpuratus</i>	TLR 6	100	86
>contig_75061				
>contig_77678	<i>S. purpuratus</i>	TLR 6	100	70
>contig_79558				
>contig_246	<i>S. purpuratus</i>	TLR 2 tipo2	69	70
>contig_7675	<i>S. purpuratus</i>	LRR 1	100	48
>contig_82333	<i>S. purpuratus</i>	LRR 1	96	50
>contig_87027	<i>S. purpuratus</i>	TLR 13	98	37
>contig_94392				
>contig_94676	<i>S. purpuratus</i>	SLIT 3	100	65
>contig_98535	<i>S. purpuratus</i>	Gastrine R	100	81

## **7.2.- Alineamiento Múltiple**

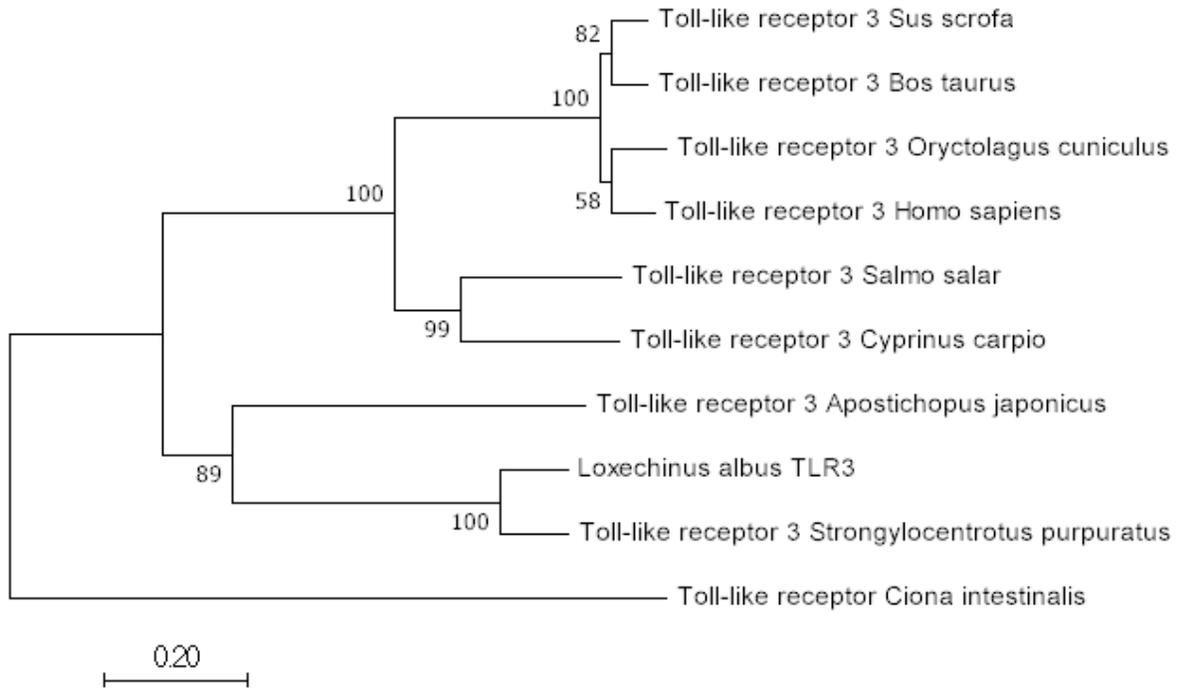
Para identificar si las secuencias elegidas tienen motivos conservados característicos de un receptor tipo Toll, se hicieron alineamientos múltiples de secuencias, en los cuales se pudo identificar una secuencia consenso propia de un dominio LRR (Figura 3) y un porcentaje de leucinas similar al 15% característico de los dominios LRR.



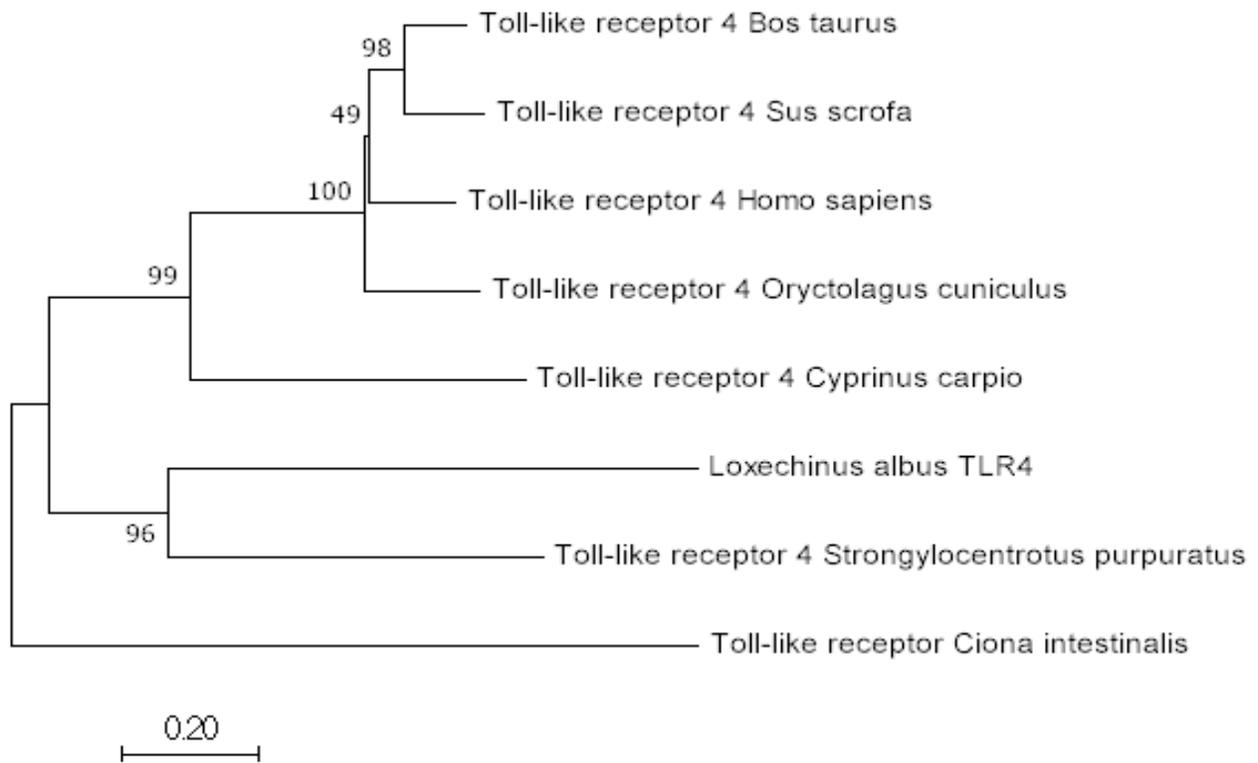
**Figura 3:** Alineamiento múltiple de secuencias de fragmentos de TLR3, 4, 6 y 8 en *Loxechinus albus* y otras 7 especies representativas. Con la letra A se indica el alineamiento de un fragmento de TLR3, con la letra B de un fragmento del TLR4, con la letra C de un fragmento del TLR6 y con la D un fragmento del TLR8. La secuencia encerrada en rojo corresponde a la secuencia consenso XLXXLXN propia del dominio LRR de los TLRs. El alineamiento fue creado con ClustalW en Mega7.

### 7.3.- Árbol filogenético

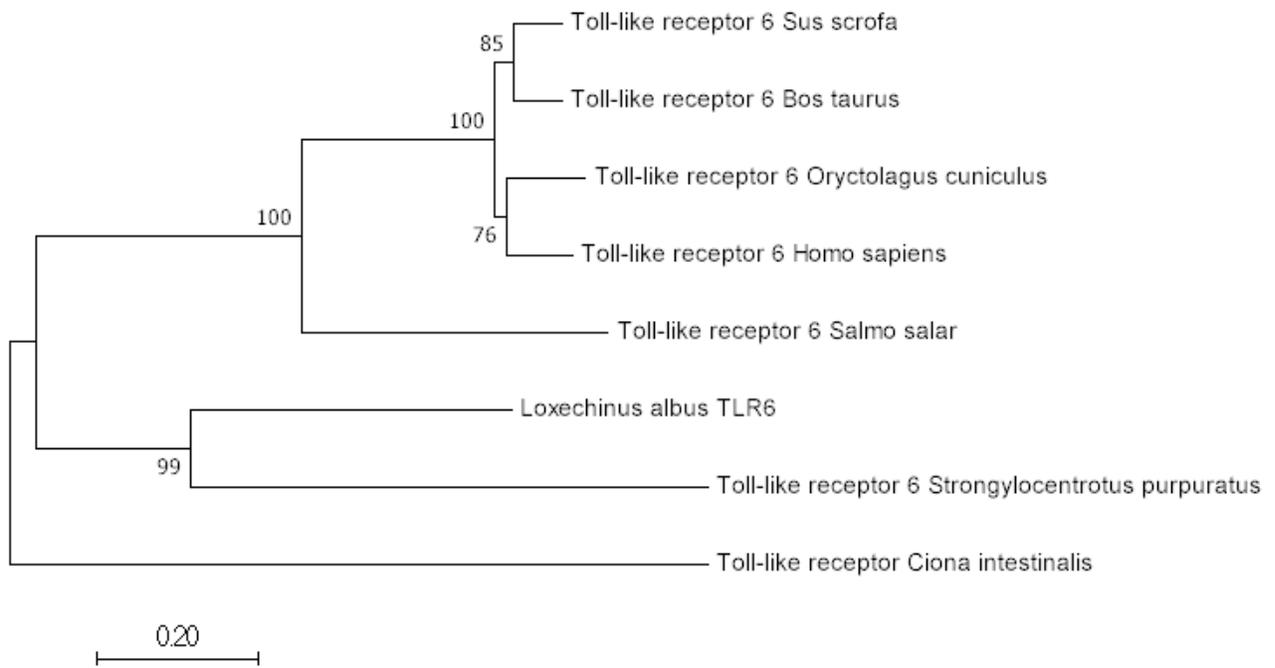
Con el fin de establecer una relación evolutiva de los TLRs de *L.albus* con otros organismos, se construyeron árboles filogenético con los organismos mencionados anteriormente en el alineamiento múltiple, agregando a *C.intestinalis* como grupo externo, para formar raíz. Se puede observar en la figura 4 una estrecha relación evolutiva entre equinodermos e invertebrados (*S.purpuratus* y *A.japonicus*), seguido de vertebrados acuáticos (*C.carpio* y *S.salar*) y, por último, con los mamíferos (*S.scrofa*, *B.taurus*, *H.sapiens* y *O.cuniculus*).



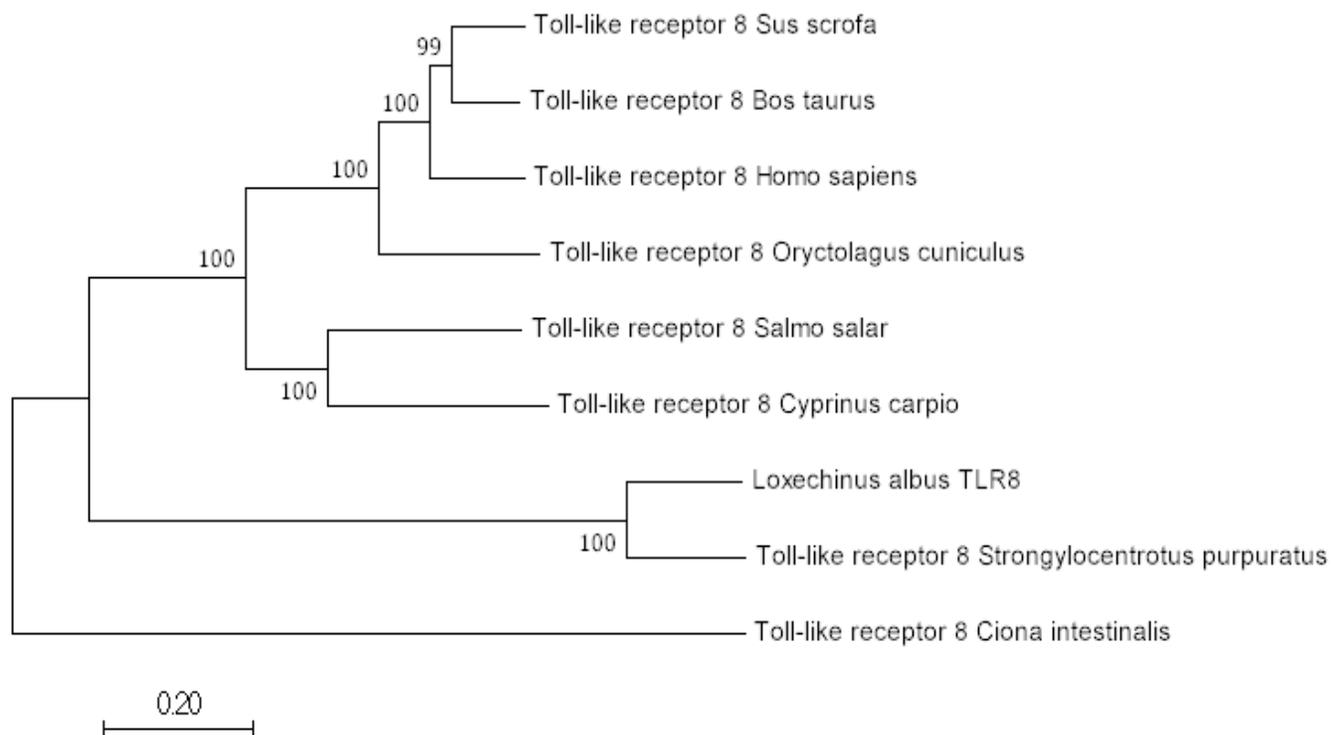
**Figura 4: Árbol filogenético con secuencias aminoacídicas (aa) para el gen TLR3.** La distancia relacionada a la secuencia de aa del urocordado *Ciona intestinalis* fue utilizado como grupo externo "outgroup". Los números en cada intersección indican el porcentaje de similitud del gen en cada especie utilizada.



**Figura 5: Árbol filogenético con secuencias aminoacídicas (aa) para el gen TLR4.** La distancia relacionada a la secuencia de aa del urocordado *Ciona intestinalis* fue utilizado como grupo externo "outgroup". Los números en cada intersección indican el porcentaje de similitud del gen en cada especie utilizada.



**Figura 6: Árbol filogenético con secuencias aminoacídicas (aa) para el gen TLR6.** La distancia relacionada a la secuencia de aa del urocordado *Ciona intestinalis* fue utilizado como grupo externo “outgroup”. Los números en cada intersección indican el porcentaje de similitud del gen en cada especie utilizada.



**Figura 7: Árbol filogenético con secuencias aminoacídicas (aa) para el gen TLR8.** La distancia relacionada a la secuencia de aa del urocordado *Ciona intestinalis* fue utilizado como grupo externo “outgroup”. Los números en cada intersección indican el porcentaje de similitud del gen en cada especie utilizada.

#### **7.4.- Diseño y validación de partidores**

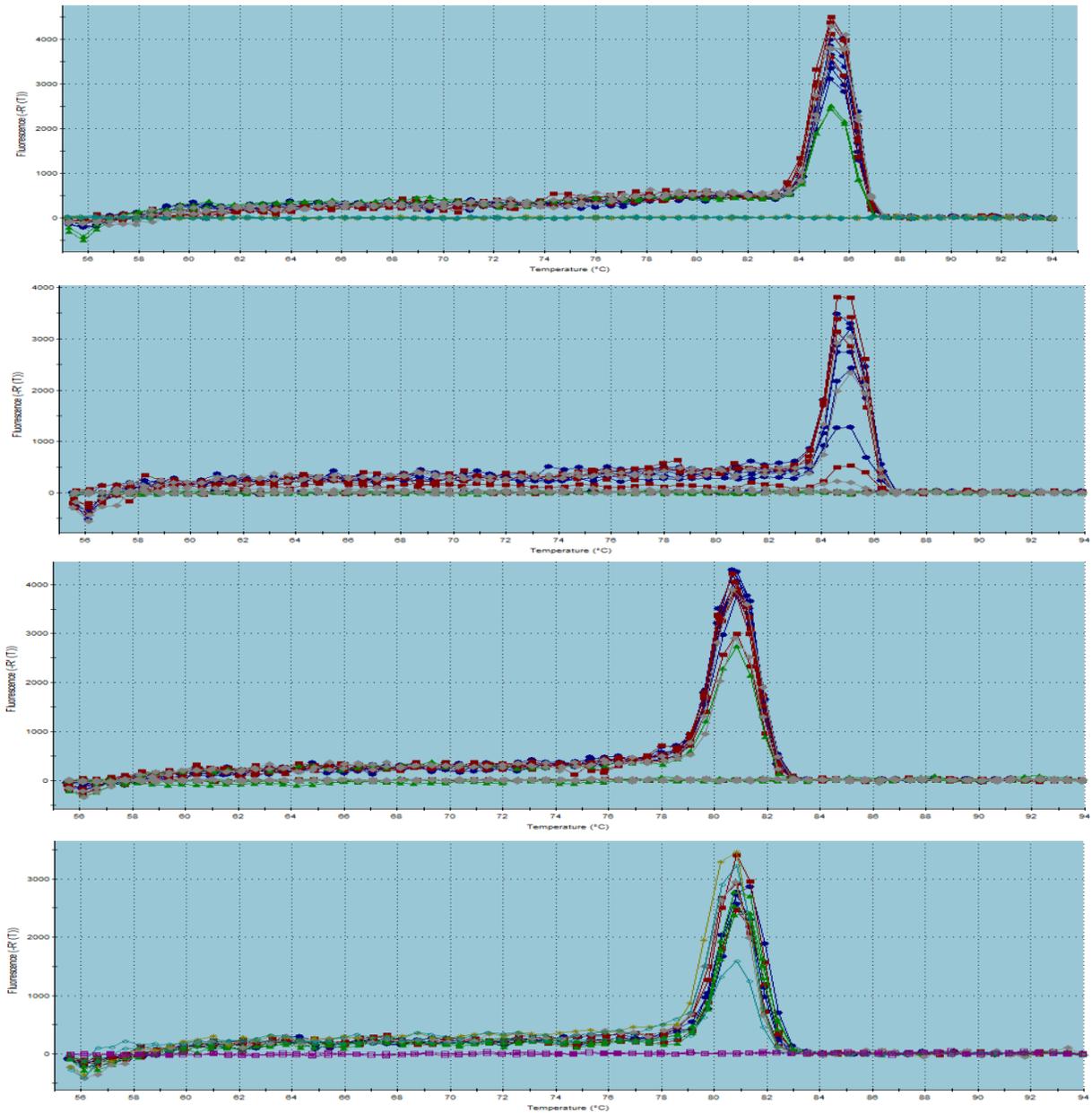
Una vez seleccionados los genes candidatos a partir de los análisis *in silico*, se diseñaron seis juegos de partidores (sentido y antisentido) a partir de las secuencias seleccionadas, que se ubican en el dominio TIR para el TLR 6 y en el dominio LRR para el TLR 3, 4 y 8 con el fin de validar su expresión experimentalmente (Figuras en anexo). Cada par tiene una TM similar, y un amplicón dentro de los parámetros adecuados para su utilización en qPCR. La tabla 5 entrega la información de los partidores utilizados.

Tabla 5: Partidores diseñados y utilizados en esta tesis

<i>Gen</i>	<i>Sentido</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Posición</i>	<i>Eficiencia (%)</i>	<i>Tm °C</i>
<i>TLR3</i>	Forward	cactggagcatctcaacgaa	LRR	101,7	60,5
	Reverse	ggacgatgatgatgaggaca			59
<i>TLR4</i>	Forward	gacgaggaatgggtaggtga	LRR	101,4	60,7
	Reverse	gcggaacttgagcatgaa			57,9
<i>TLR6</i>	Forward	atcaacgctctccattac	TIR	103,2	54,2
	Reverse	gaaccaggcatcatcaac			55,7
<i>TLR8</i>	Forward	aacaacgcctcatcctcatc	LRR	99,6	60
	Reverse	ggtcccattccaagtaagca			59,8
<i>18S</i>	Forward	cctggccttctctcggagtc	NA	100,8	63,1
	Reverse	ggatgccccgtaagattc			63
<i>TLR2</i>	Forward	atctggaatgggatgatga	NA	100,1	58,4
	Reverse	ttctgggggcactaaatgat			59,2
<i>TLR13</i>	Forward	tactggagcatctcaacgaa	NA	99,4	58,6
	Reverse	tcacgaacaacctgacaagg			60

## **7.5.- Curva disociación partidores**

Para corroborar que los partidores generan un solo producto de PCR amplificado, se realizó una curva de disociación (curva de melting). Una única curva es indicativa de un solo producto de PCR (figura 8). Para los siguientes genes se obtuvieron amplificaciones que cumplían con todos los requisitos para ser utilizado en estudios de expresión génica relativas: TLR3, TLR4, TLR6 y TLR8. Otros 2 TLRs fueron probados, TLR2 y TLR13, los cuales no amplificaron correctamente independiente de las variaciones en las condiciones de PCR testeadas y por consiguiente fueron excluidos de esta tesis.

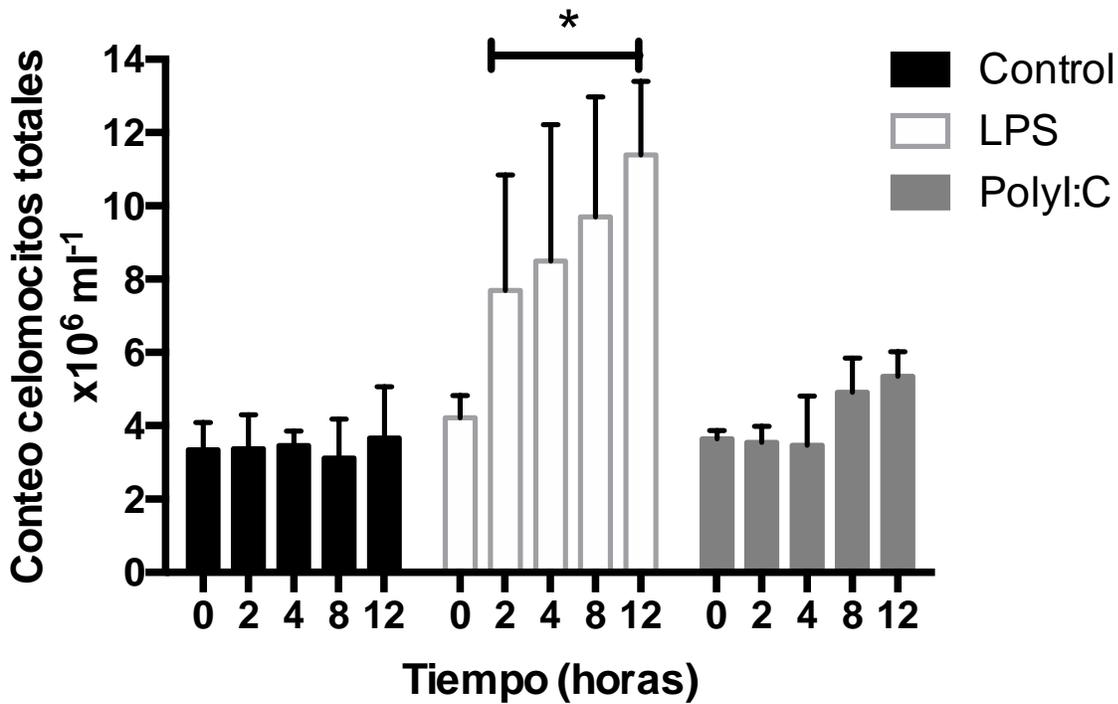


**Figura 8: Curva de melting o disociación, correspondiente a los genes TLR3, TLR4, TLR6 y TLR8.** En el eje X se observa la temperatura, mientras que en el eje Y, la fluorescencia obtenida. Se observa un solo producto amplificado para todos los genes con 3 réplicas. Las líneas que no presentan amplificación corresponden al control NTC y No-RT.

## **7.6.- Medición densidad y viabilidad celular de celomocitos**

Con el fin de determinar el impacto que causan los PAMPs utilizados en los celomocitos a nivel celular, se realizó un conteo celular en cámara de Neubauer para determinar cambios en la concentración de celomocitos con los tratamientos, donde se pudo comprobar un aumento significativo de la población celular en el tratamiento con LPS respecto al control (Figura 9).

Por otra parte, para determinar la viabilidad de estas células, se tiñeron con un kit comercial que discrimina rápidamente las células vivas de las muertas mediante la tinción simultánea con calceína AM verde fluorescente para indicar actividad de esterasa intracelular y homodímero-1 de etidio rojo fluorescente para indicar la pérdida de integridad de la membrana plasmática mediante microscopía de fluorescencia (Figura 10b) donde se observa que la viabilidad de los tratamientos Control y Poly I:C no tuvo cambios significativos, sin embargo, el tratamiento LPS disminuyó un 30% la relación células vivas/células muertas (Figura 10a).



**Figura 9: Conteo de celomocitos totales ( $10^6 \text{ ml}^{-1}$ ) de *L.albus* determinados a las 0, 2, 4, 8 y 12 horas post tratamiento. LPS (barras blancas), Poly I:C (barras grises) y Control (barras negras). Para indicar diferencias significativas se realizó un análisis de dos vías ANOVA seguido de una prueba de Sidak.**

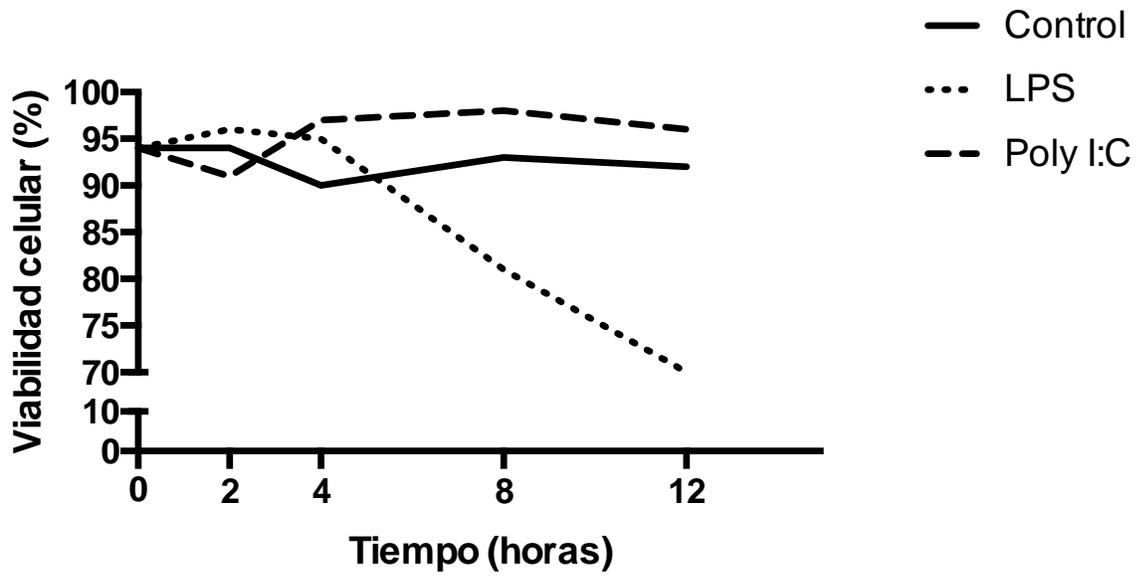
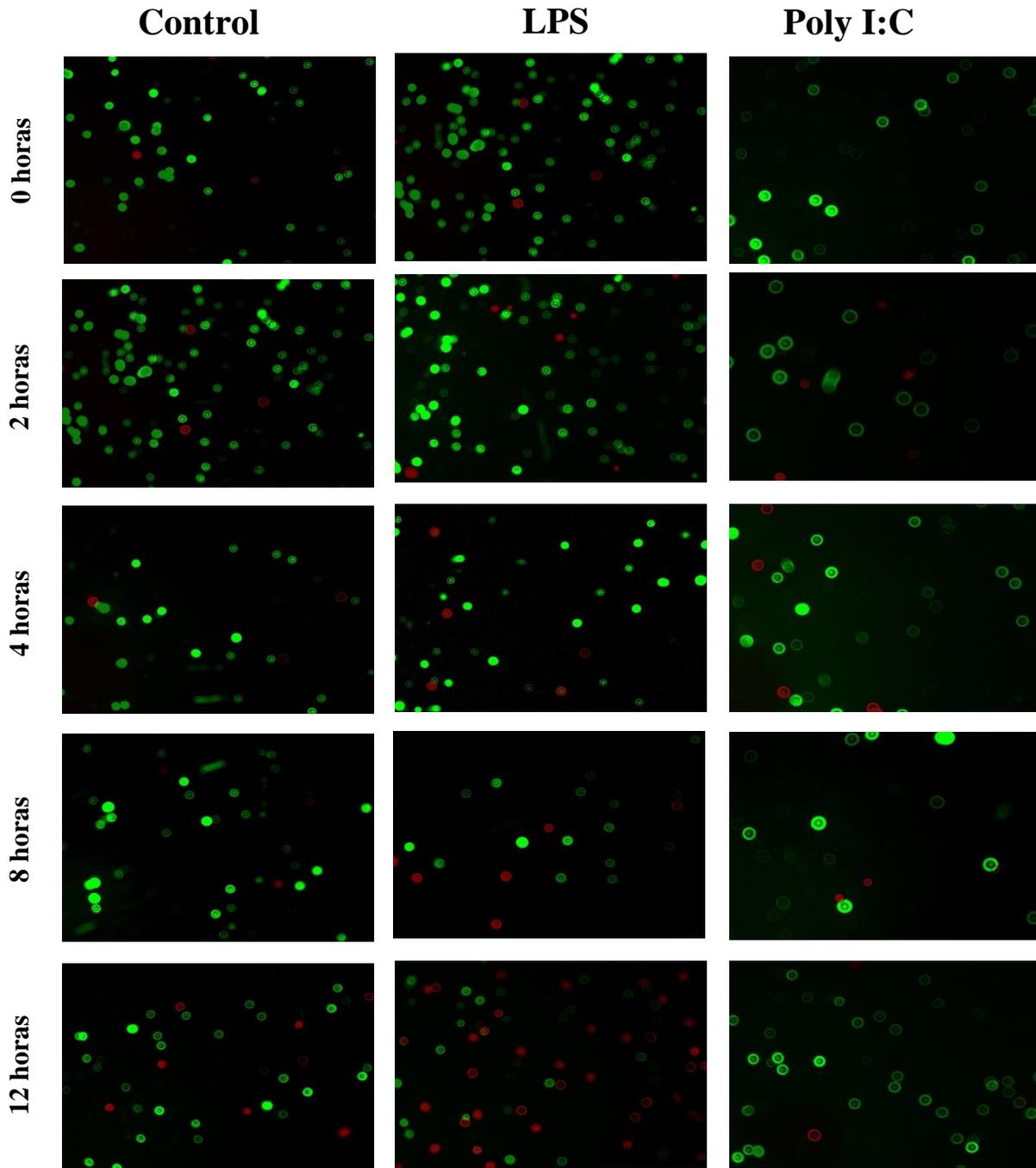


Figura 10a: Porcentaje de viabilidad celular de celomocitos de *L.albus* en condición control, tratamiento LPS y tratamiento Poly I:C.



**Figura 10b: Viabilidad de celomocitos en condición control, tratamiento LPS y tratamiento Poly I:C,** en verde se observan células vivas y en rojo las células muertas, todas las imágenes corresponden a fotografías sobrepuestas de celomocitos observados en un microscopio de fluorescencia a 480nm (rojo) y 590nm (verde), con aumento de 40x.

### **7.7.- Perfiles de expresión *tlr3*, *tlr4*, *tlr6* y *tlr8* en respuesta al estímulo con Poly I:C y LPS en celomocitos**

Se ha descrito que los receptores tipo Toll son activados tanto por virus como por infecciones bacterianas. Por lo tanto, se evaluaron los niveles de expresión de los candidatos en celomocitos estimulados con Poly I:C, que emula un estímulo de dsRNA viral y con LPS, un componente de la membrana externa de bacterias Gram-negativas.

Los efectos de Poly I:C y LPS en los niveles de transcritos de los TLRs de celomocitos de erizo *L.albus* fueron cuantificados a las 0, 2, 4, 8 y 12 horas después de cada tratamiento mediante qPCR.

Los valores expresados como veces de cambio respecto al control, se refieren al cociente entre la expresión relativa del tratamiento sobre la expresión relativa del control del mismo tiempo, estableciendo con valor de 1, las veces de cambio en el control a las 0 horas. Además, todos estos valores fueron el promedio de cada muestra analizada en triplicado.

### **7.7.1.- Tratamiento LPS**

#### **Receptor tipo Toll 3**

Los niveles de transcrito del TLR3 en el tratamiento LPS no mostraron diferencias significativas respecto al control (Figura 11). Sin embargo, es posible observar una tendencia a incrementar esta respuesta entre las 2 y 8 horas con hasta 2 veces de cambio, la cual no es significativa con el número de réplicas utilizado en el ensayo.

#### **Receptor tipo Toll 4:**

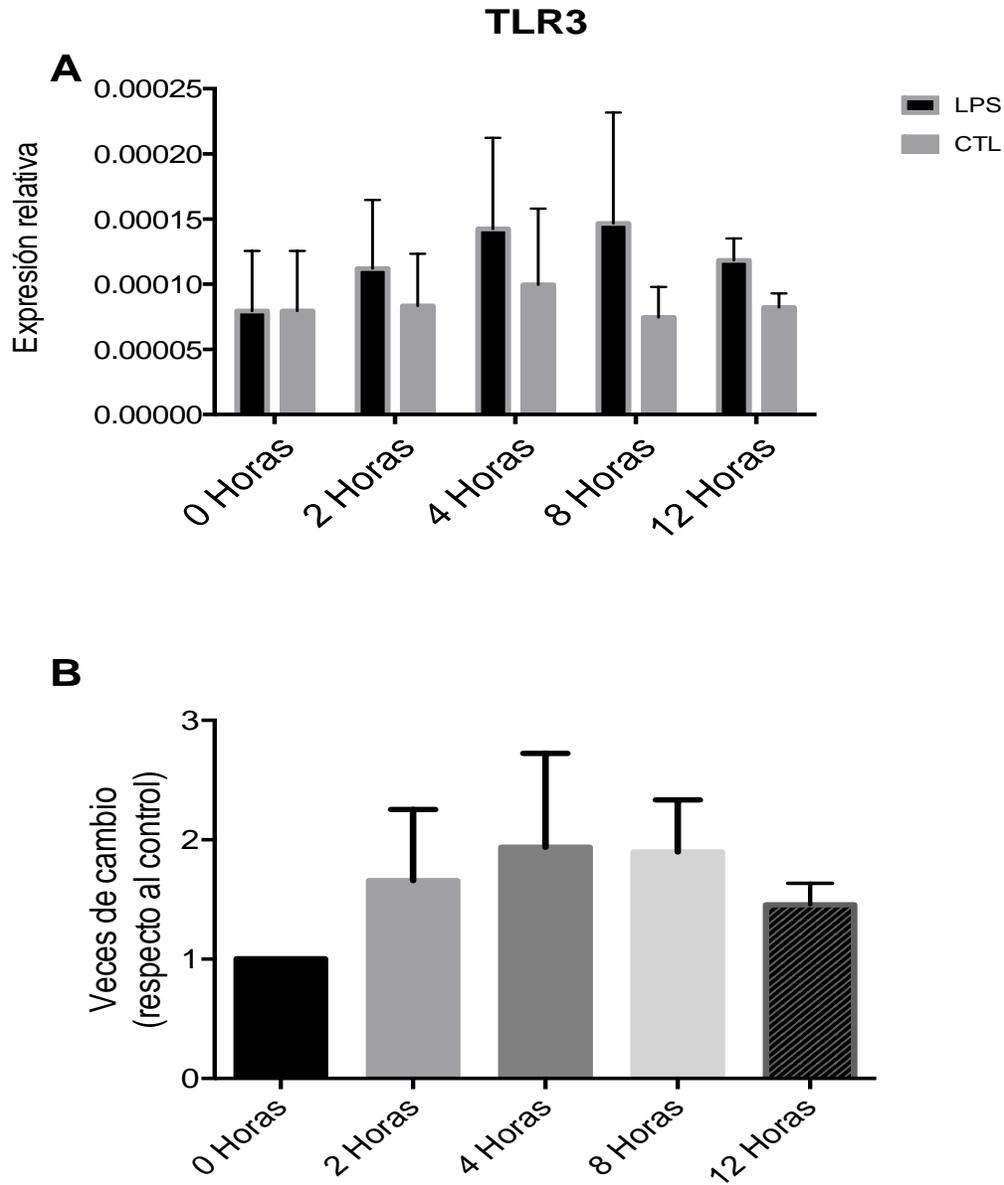
Los niveles de transcrito del receptor tipo Toll 4 aumentan de manera tiempo-dependiente a las 2 horas con más de 2 veces de cambio respecto al control, para luego volver a niveles de expresión normales (Figura 12).

#### **Receptor tipo Toll 6**

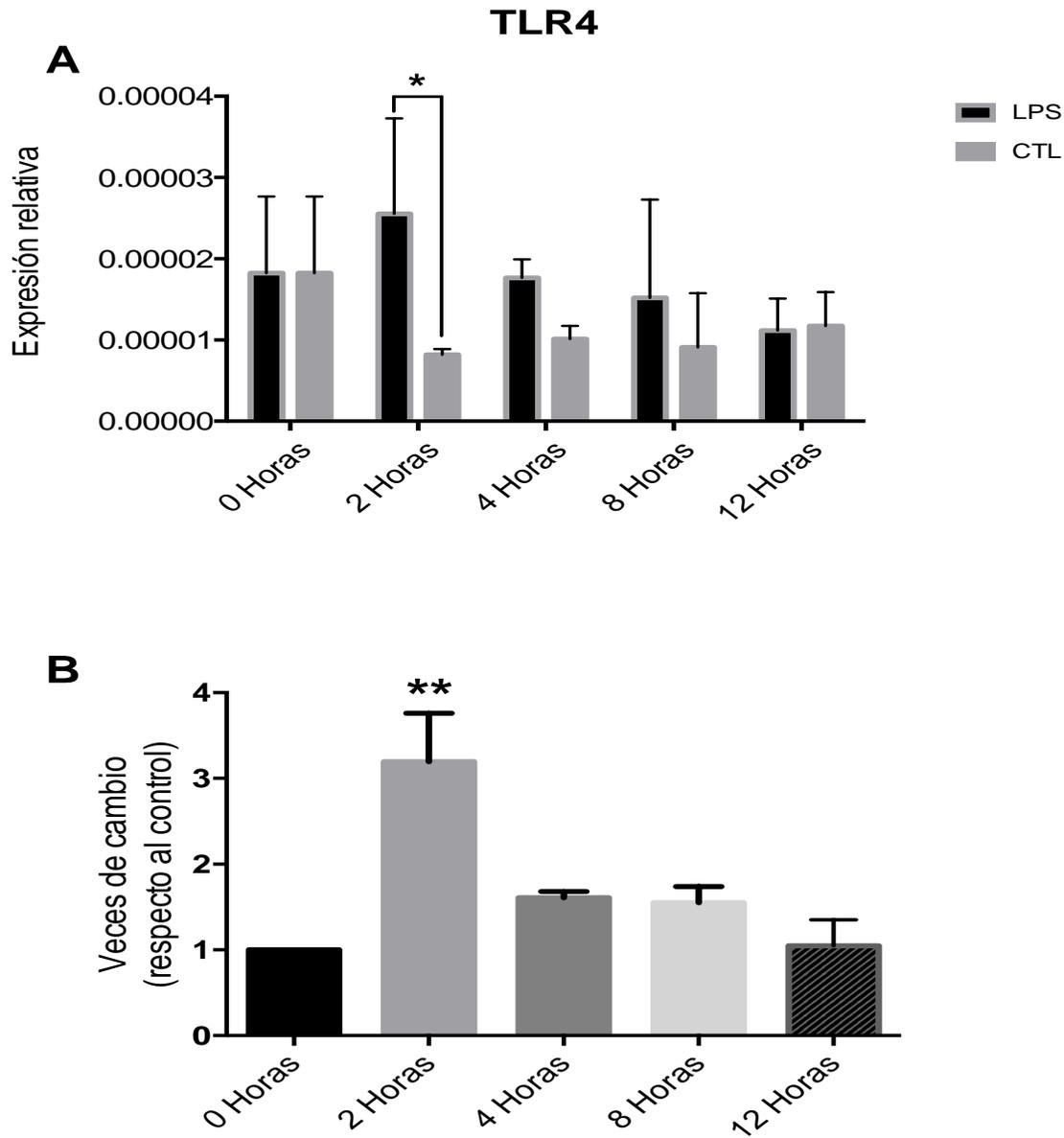
Los niveles de transcrito del receptor tipo Toll 6 en el tratamiento con LPS no presenta cambios significativos con respecto al control (Figura 13). Sin embargo, existe una tendencia a aumentar entre las 2 y 4 horas.

#### **Receptor tipo Toll 8**

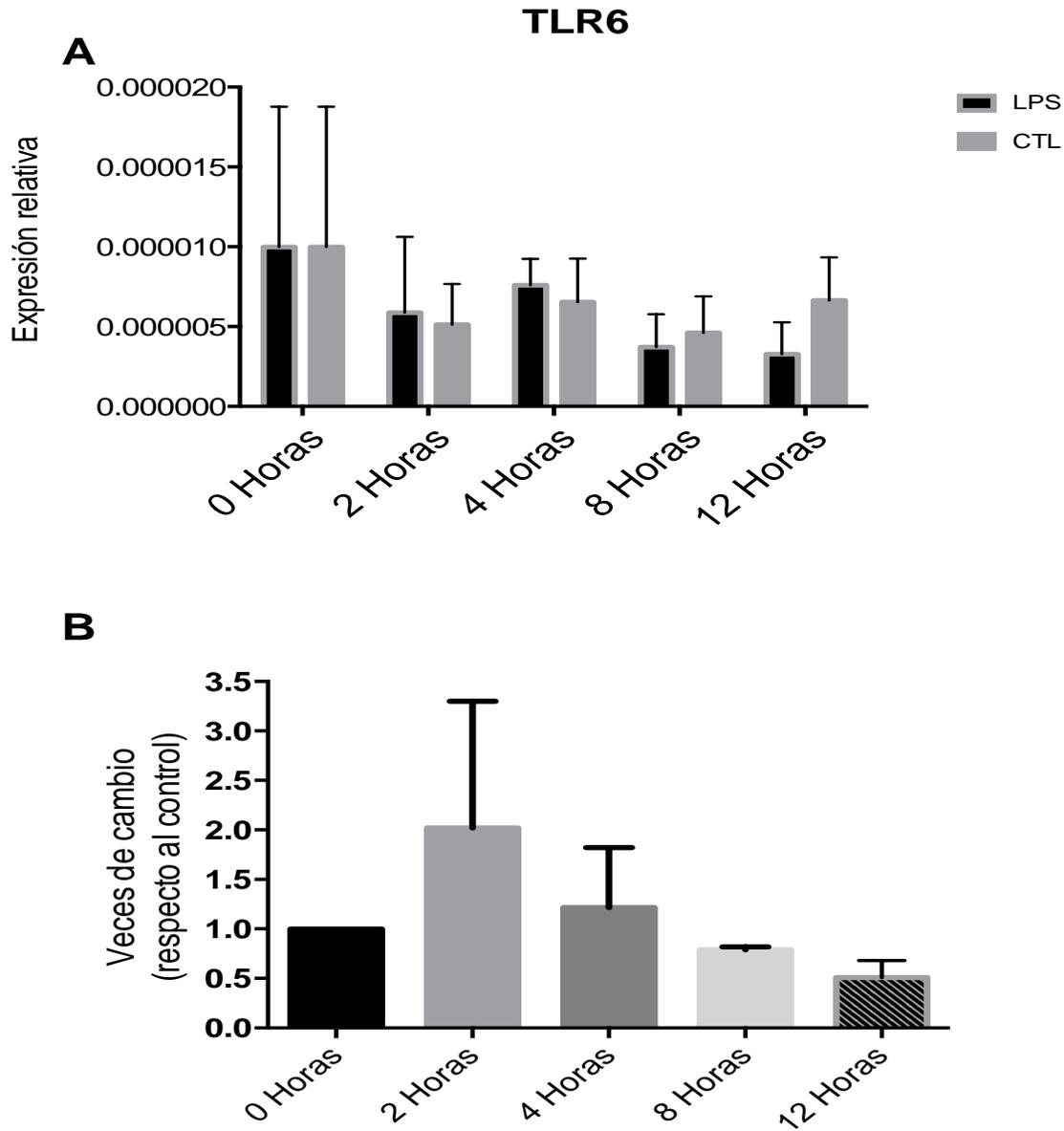
Los niveles de transcrito del receptor tipo Toll 8 a nivel transcriptómico en el tratamiento con LPS no presenta diferencias significativas con respecto al control. Sin embargo, es posible discriminar una tendencia a aumentar durante todo el ensayo, la cual no es significativa con el número de réplicas utilizadas (Figura 14).



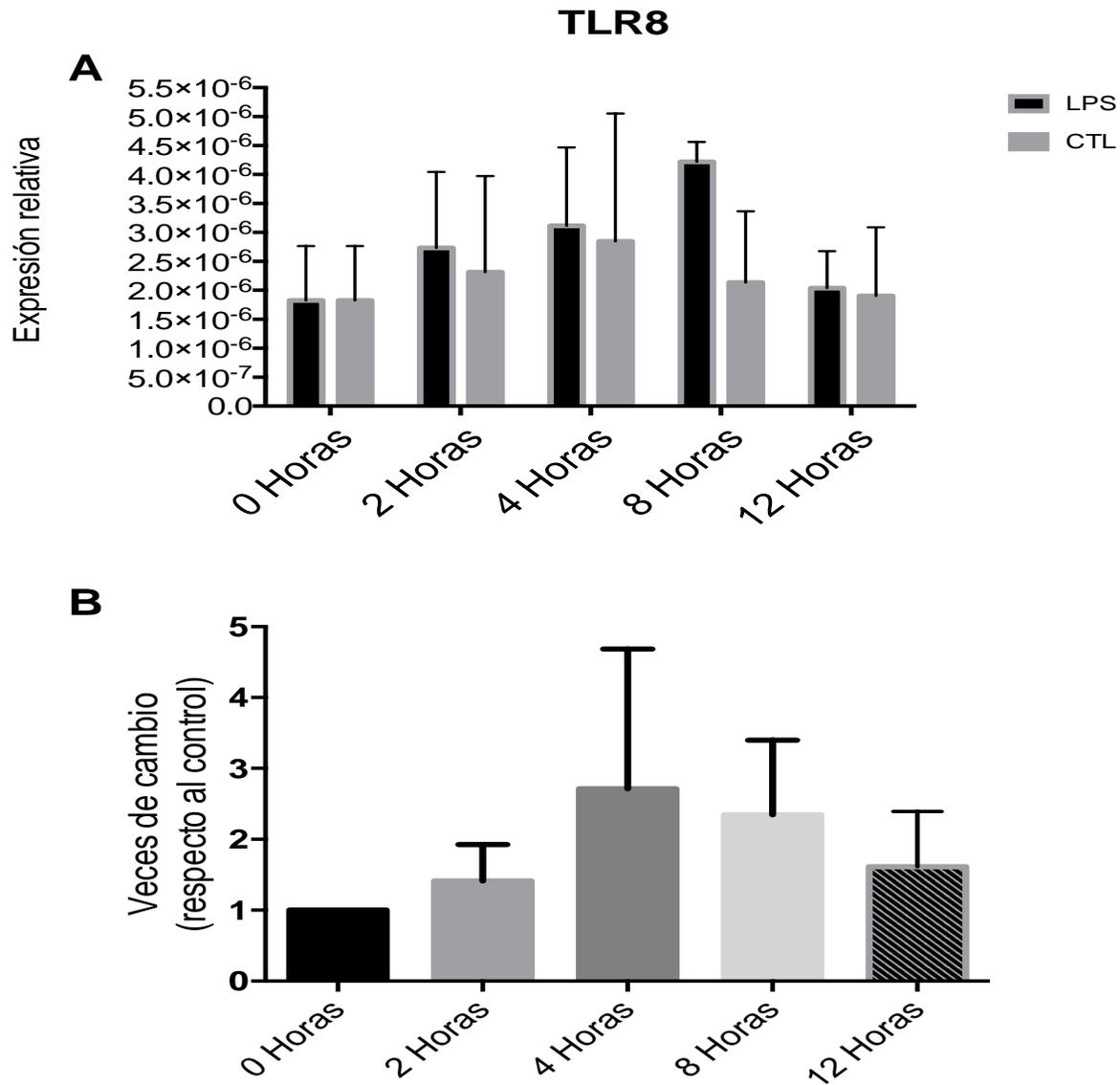
**Figura 11: Efecto de LPS sobre la expresión de receptor tipo Toll 3 en células inmunes del erizo rojo.** En el grafico A, se muestra la expresión relativa de TLR3 normalizado con el gen 18s. Las barras negras corresponden al tratamiento LPS, mientras que las barras grises corresponden al control. En el grafico B, se muestran las veces de cambio de cada tratamiento en relación al control. Para indicar diferencias significativas se realizó un análisis de dos vías ANOVA seguido de una prueba de Sidak para el grafico A, y un análisis de una vía ANOVA, seguido de una prueba post hoc de Tukey para el grafico B.



**Figura 12: Efecto de LPS sobre la expresión de receptor tipo Toll 4 en células inmunes del erizo rojo.** En el gráfico A, se muestra la expresión relativa de TLR4 normalizado con el gen 18s. Las barras negras corresponden al tratamiento LPS, mientras que las barras grises corresponden al control. En el gráfico B, se muestran las veces de cambio de cada tratamiento en relación al control. Para indicar diferencias significativas se realizó un análisis de dos vías ANOVA seguido de una prueba de Sidak para el gráfico A, y un análisis de una vía ANOVA, seguido de una prueba post hoc de Tukey para el gráfico B.



**Figura 13: Efecto de LPS sobre la expresión del receptor tipo Toll 6 en células inmunes del erizo rojo.** En el gráfico A, se muestra la expresión relativa de TLR6 normalizado con el gen 18s. Las barras negras corresponden al tratamiento LPS, mientras que las barras grises corresponden al control. En el gráfico B, se muestran las veces de cambio de cada tratamiento en relación al control. Para indicar diferencias significativas se realizó un análisis de dos vías ANOVA seguido de una prueba de Sidak para el gráfico A, y un análisis de una vía ANOVA, seguido de una prueba post hoc de Tukey para el gráfico B.



**Figura 14: Efecto de LPS sobre la expresión del receptor tipo Toll 8 en células inmunes del erizo rojo.** En el grafico A, se muestra la expresión relativa de TLR8 normalizado con el gen 18s. Las barras negras corresponden al tratamiento LPS, mientras que las barras grises corresponden al control. En el grafico B, se muestran las veces de cambio de cada tratamiento en relación al control. Para indicar diferencias significativas se realizó un análisis de dos vías ANOVA seguido de una prueba de Sidak para el grafico A, y un análisis de una vía ANOVA, seguido de una prueba post hoc de Tukey para el grafico B.

## **7.7.2.- Tratamiento Poly I:C**

### **Receptor tipo Toll 3**

La expresión del receptor tipo Toll 3 se ve aumentada 8 veces respecto al control a las 8 horas post-tratamiento con Poly I:C

### **Receptor tipo Toll 4**

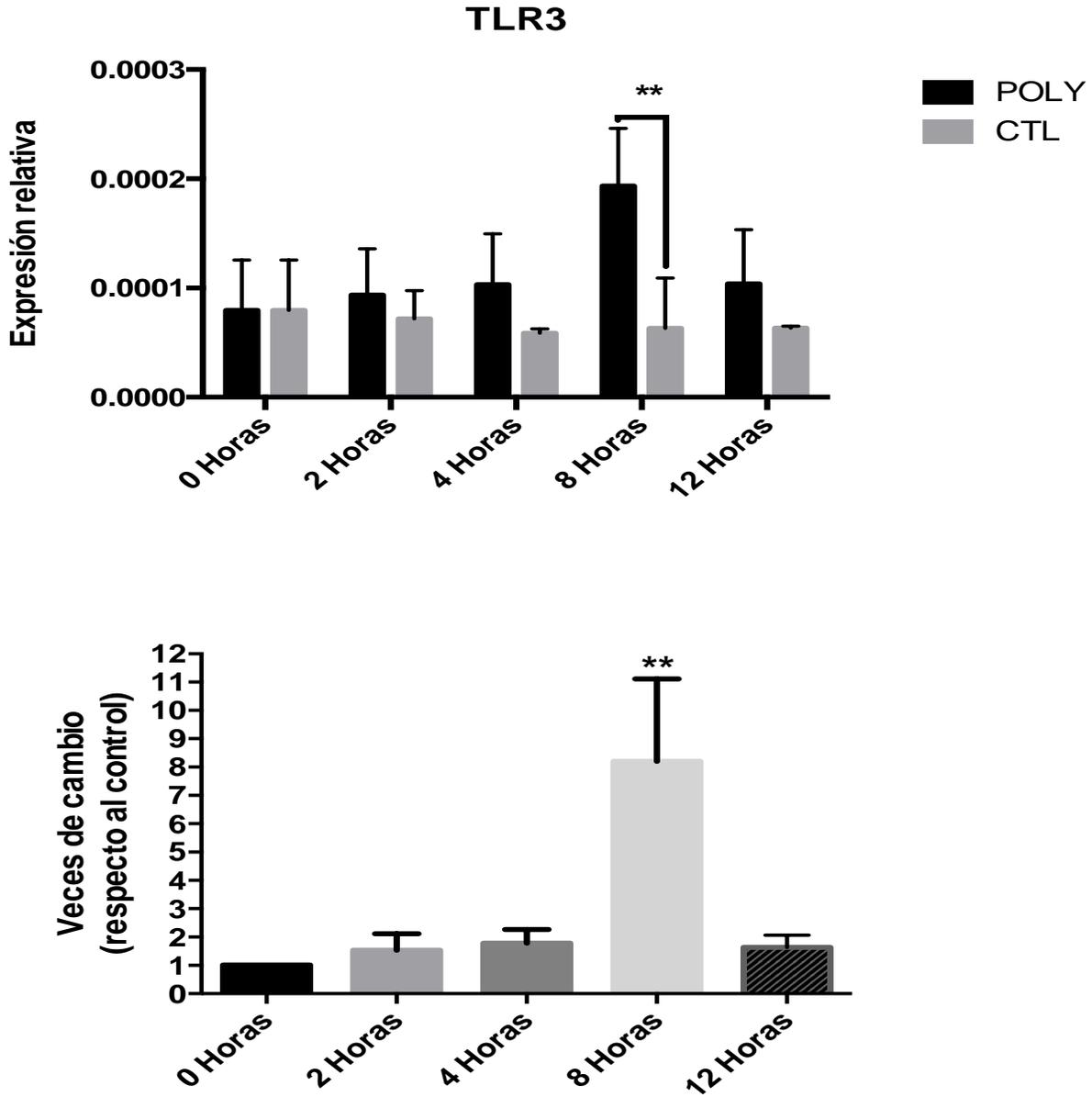
Los niveles de transcrito del receptor tipo Toll 4 en celomocitos de erizo rojo se ven sobre regulados de manera tiempo dependiente exclusivamente a las 8 horas post-tratamiento con Poly I:C.

### **Receptor tipo Toll 6**

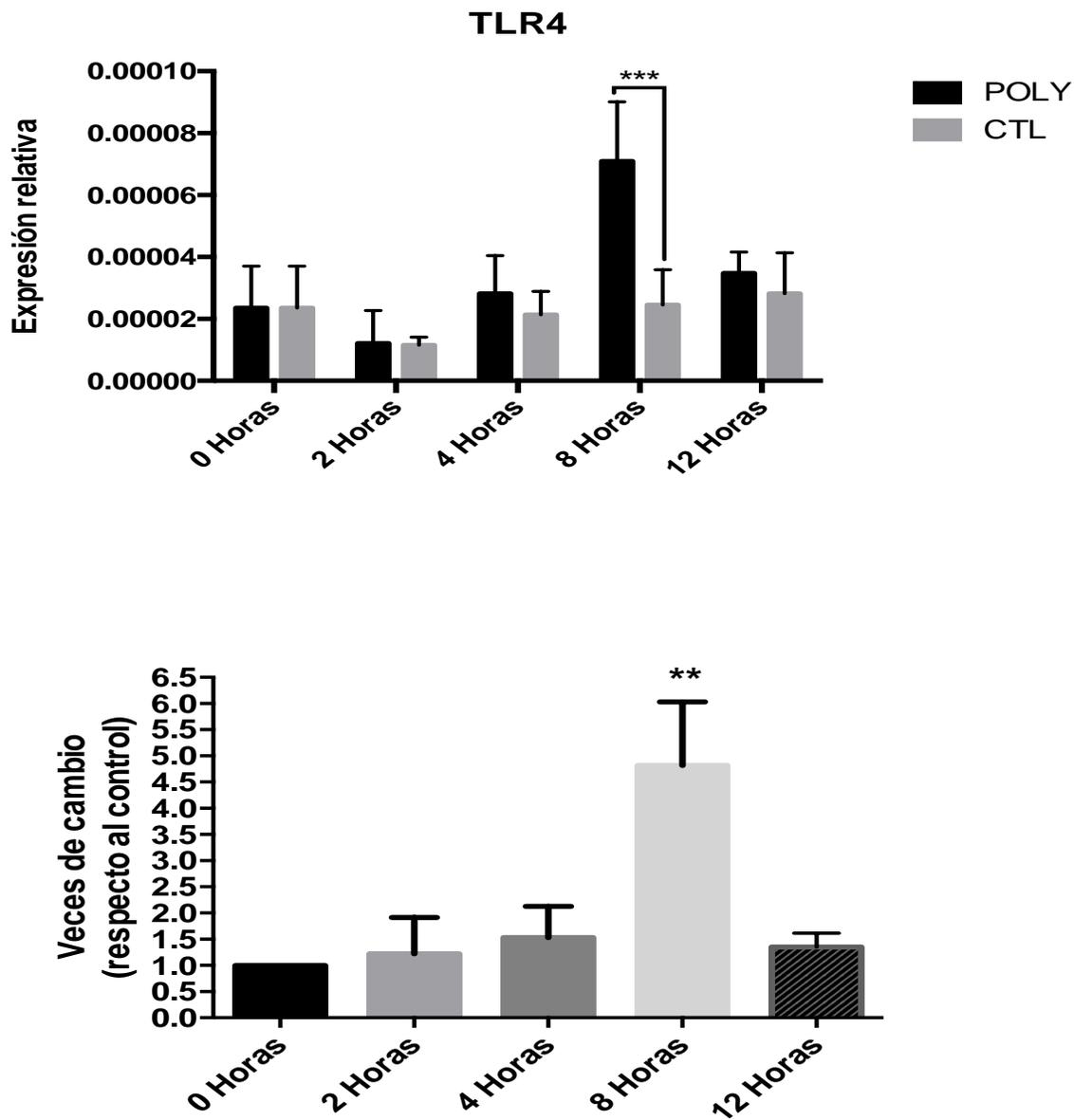
Con el fin de determinar el efecto de Poly I:C sobre el receptor de tipo Toll 6, se evaluó el nivel de expresión mediante qPCR. Donde observó una expresión tiempo-dependiente a las 8 horas exclusivamente.

### **Receptor tipo Toll 8**

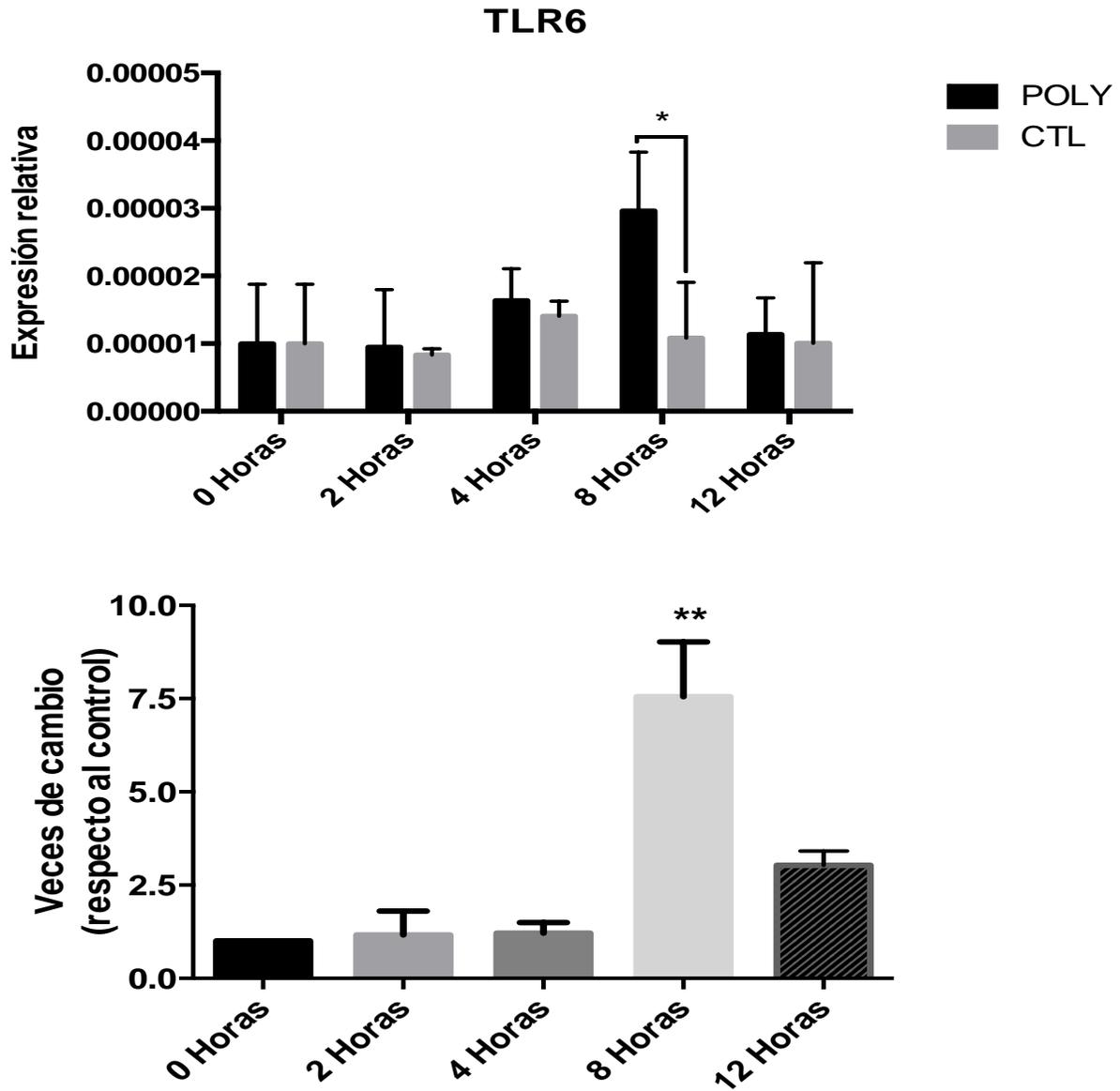
Los niveles de transcrito del receptor tipo Toll 8 solo se ve un aumento en sus niveles de mARN a las 8 horas de tratamiento con Poly I:C, manteniéndose en los niveles control en los demás tiempos analizados.



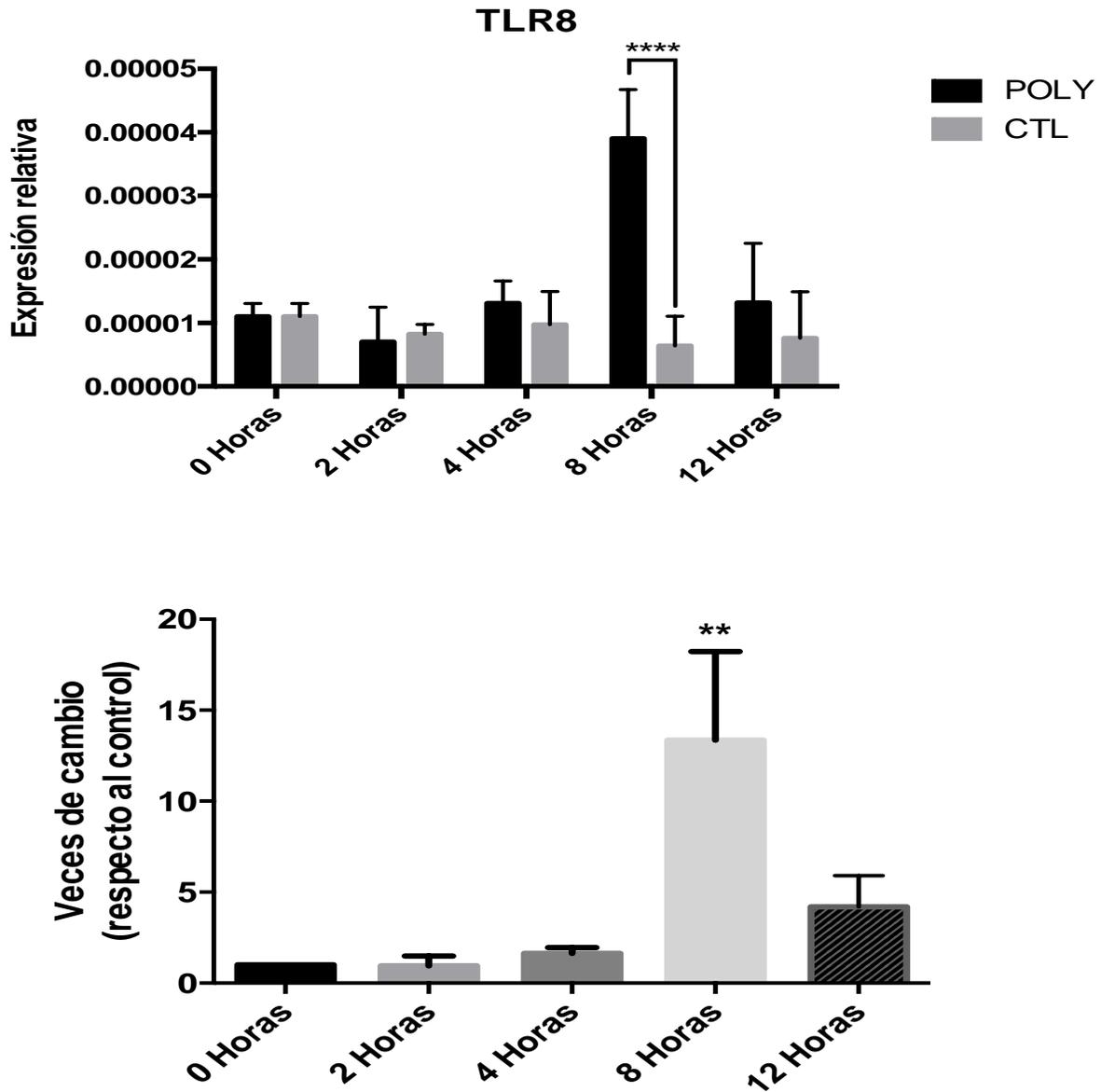
**Figura 15: Efecto de Poly I:C en la expresión del receptor tipo Toll 3 en células inmunes del erizo rojo.** En el gráfico A, se muestra la expresión relativa de TLR3 normalizado con el gen 18s. Las barras negras corresponden al tratamiento LPS, mientras que las barras grises corresponden al control. En el gráfico B, se muestran las veces de cambio de cada tratamiento en relación al control. Para indicar diferencias significativas se realizó un análisis de dos vías ANOVA seguido de una prueba de Sidak para el gráfico A, y un análisis de una vía ANOVA, seguido de una prueba post hoc de Tukey para el gráfico B.



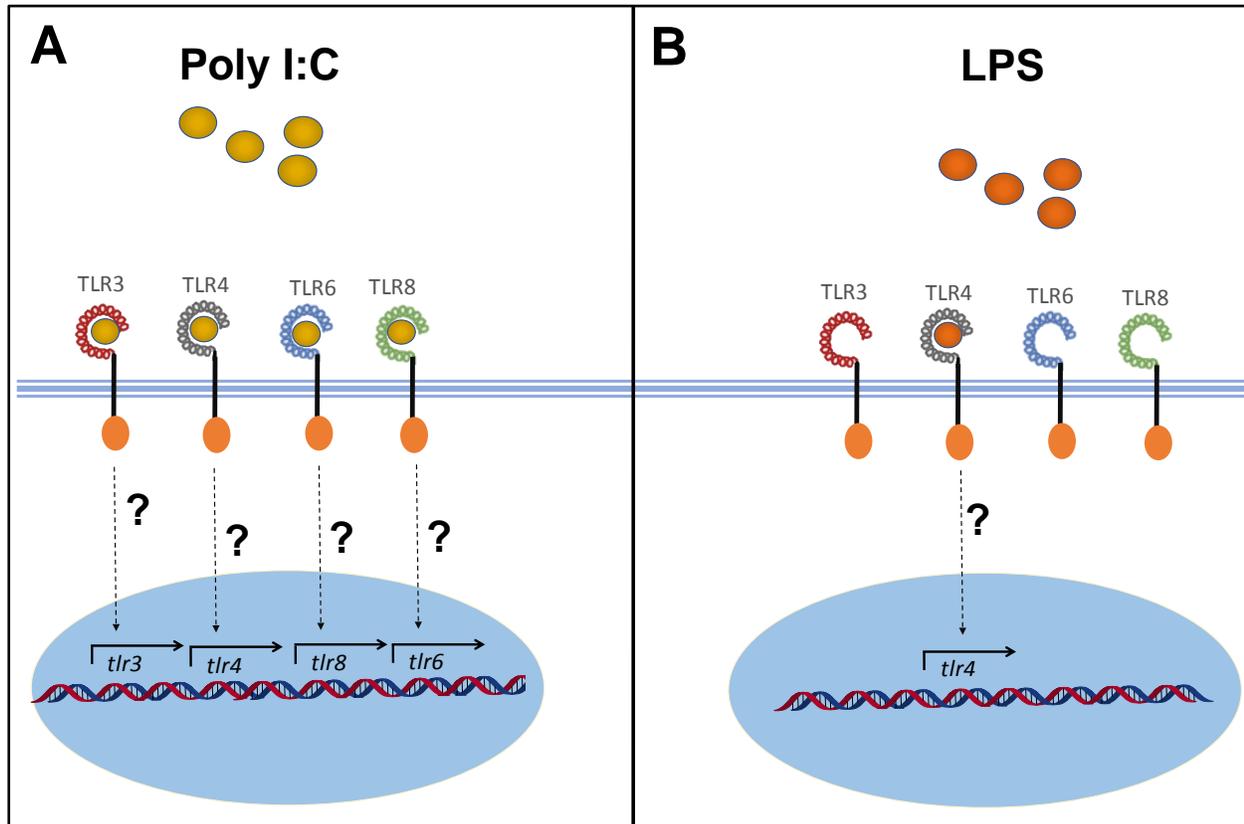
**Figura 16: Efecto de Poly I:C en la expresión del receptor tipo Toll 3 en células inmunes del erizo rojo.** En el grafico A, se muestra la expresión relativa de TLR3 normalizado con el gen 18s. Las barras negras corresponden al tratamiento LPS, mientras que las barras grises corresponden al control. En el grafico B, se muestran las veces de cambio de cada tratamiento en relación al control. Para indicar diferencias significativas se realizó un análisis de dos vías ANOVA seguido de una prueba de Sidak para el grafico A, y un análisis de una vía ANOVA, seguido de una prueba post hoc de Tukey para el grafico B.



**Figura 17: Efecto de Poly I:C en la expresión del receptor tipo Toll 6 en células inmunes del erizo rojo.** En el grafico A, se muestra la expresión relativa de TLR6 normalizado con el gen 18s. Las barras negras corresponden al tratamiento LPS, mientras que las barras grises corresponden al control. En el grafico B, se muestran las veces de cambio de cada tratamiento en relación al control. Para indicar diferencias significativas se realizó un análisis de dos vías ANOVA seguido de una prueba de Sidak para el grafico A, y un análisis de una vía ANOVA, seguido de una prueba post hoc de Tukey para el grafico B.



**Figura 18: Efecto de Poly I:C en la expresión del receptor tipo Toll 8 en células inmunes del erizo rojo.** En el grafico A, se muestra la expresión relativa de TLR8 normalizado con el gen 18s. Las barras negras corresponden al tratamiento LPS, mientras que las barras grises corresponden al control. En el grafico B, se muestran las veces de cambio de cada tratamiento en relación al control. Para indicar diferencias significativas se realizó un análisis de dos vías ANOVA seguido de una prueba de Sidak para el grafico A, y un análisis de una vía ANOVA, seguido de una prueba post hoc de Tukey para el grafico B.



**Figura 19: Respuesta transcriptómica de TLR3, TLR4, TLR6 y TLR8 ante estímulos con LPS y Poly I:C en *Loxechinus albus*.** A) Los TLR3, TLR4, TLR6 y TLR8 reconocen a Poly I:C como ligando, iniciando por una vía aún desconocida en equinodermos, la transcripción de los genes *tlr3*, *tlr4*, *tlr6* y *tlr8* de manera tiempo dependiente. B) El TLR4 reconoce a LPS como ligando, iniciando por una vía aún desconocida en equinodermos, la transcripción del gen *tlr4* de manera tiempo dependiente. La línea celeste representa una membrana celular/endosomal en donde se sitúan los receptores tipo Toll. Los óvalos celestes representan el núcleo de un celomocito donde se transcriben ARN mensajeros de los genes indicados.

## 8.- Discusión

Los receptores del sistema inmune innato desempeñan un papel vital dentro del organismo, al detectar de forma oportuna una gran variedad de componentes estructurales altamente conservados en los microorganismos, desencadenando una cascada de señalización intracelular que permite al organismo hospedador generar una respuesta antimicrobiana (Hancock *et al.*, 2016).

Los receptores tipo Toll cumplen funciones como: detectar la presencia de algún patógeno en el organismo hospedero y desencadenar una respuesta inmune innata, además de activar y guiar la respuesta inmune adaptativa contra ellos (Medzhitov *et al.*, 2000; Moreno *et al.*, 2003). Los TLR forman parte de los RRP, receptores que reconocen PAMPs (Randon-Barragan, 2009). Cada TLR tiene uno o varios PAMPs como ligando, estos PAMPs son característicos de microorganismos y así, mediante cascadas de señalización, se desencadena una respuesta contra el patógeno en particular (Kumar *et al.*, 2009).

Los dos PAMPs utilizados en esta tesis representan dos tipos de respuestas a patógenos: LPS, una infección por bacteria Gram negativa y Poly I:C, una molécula considerada el análogo sintético (en base a su estructura) a una doble hebra de RNA viral. En estudios anteriores realizados en *P.lividus*, se evaluaron los niveles de transcrito de un único receptor tipo Toll ante una inyección con Poly I:C y con LPS, donde se observó una respuesta de sobre regulación tiempo dependiente solamente en Poly I:C a las 9 horas post-inyección, en cambio, en el tratamiento LPS no se observó ningún cambio con respecto al control (Russo *et al.*, 2015), efecto similar al visto en *A.japonicus*, donde, luego del estímulo con peptidoglican, Zymosan, LPS y Poly I:C los niveles transcriptómicos de TLR3 y AjTLR mostraron una sobrerregulación con los 4 estímulos aplicados entre las 4 y 24 horas (Sun *et al.*, 2013).

Los TLRs evaluados en celomocitos de *L.albus* son activados diferencialmente respecto al estímulo efectuado. Específicamente, solo los niveles de mRNA de TLR4 fueron sobre regulados sostenidamente en el tiempo del ensayo con el tratamiento LPS, en cambio los niveles de transcrito para el TLR3, TLR6 y TLR8 no presentaron cambios significativos, aunque es posible diferenciar una tendencia a aumentar entre las 4 y 8 horas, la cual no es significativa por la dispersión de datos. Por su parte, el tratamiento

Poly I:C se activa de manera tiempo-dependiente a las 8 horas de estímulo en los 4 TLRs evaluados, llegando a ser hasta 12 veces mayor al control.

El TLR4 inicia una respuesta inmune frente a dos PAMPs de diferente naturaleza; bacteriana por parte del LPS y viral por parte del Poly I:C. El reconocimiento de un PAMPs de naturaleza viral y, a su vez, otro (no-viral) por parte de un mismo receptor tipo Toll es una situación sin precedentes en mamíferos, pero si propuesta para equinodermos por *Satake* 2012, quien postula un escenario evolutivo donde un invertebrado deuterostomado ancestral poseía genes TLR con reconocimiento de múltiples ligandos y localización tanto en la superficie celular como en los endosomas, características que fue perdiendo durante su evolución.

Respecto a los TLR3, TLR6 y TLR8, solo son sobre expresados en presencia de Poly I:C con valores sobre las 20 veces de cambio. El reconocimiento de este PAMPs como ligando para diferentes receptores tipo Toll podría estar dado por que, si bien la mayoría de estos receptores en erizos de mar son estructuralmente similares a los de los vertebrados, los patrones de diversificación y multiplicidad que caracterizan a estos sistemas no se ajustan al paradigma bajo el cual se entiende que funcionan los TLR en vertebrados (Smith, 2006). La gran mayoría de los genes TLR de erizo de mar son más similares entre sí que a los de otros animales, lo que sugiere una expansión genética específica del linaje de erizo de mar (Roach, 2005; Hibino, 2006; Satake, 2012). Es decir, estos genes no parecen especializados para reconocer elementos microbianos inmutables. Por el contrario, estas familias de genes tienen el carácter de un sistema en rápida evolución que se dirige contra un conjunto de objetivos igualmente en rápida evolución (Messier-Solek, 2010). De esta forma, los TLR en erizo de mar funcionan a un nivel diferente de inmunidad que los receptores para PAMPs clásicos, ya que son especies marinas que ocupan hábitats desde la zona intermareal hasta aguas profundas, los cuales son ambientes ricos en bacterias, hongos, virus, y parásitos, y muchos de estos son potencialmente patógenos de equinodermos. Por consiguiente, los equinodermos han evolucionado en diversas formas para superar los desafíos inmunes que supone la vida en un medio con estas características (Chun Li, 2015).

La sobreexpresión de los 4 TLRs evaluados en celomocitos con Poly I:C podría estar relacionada con la homología que tienen todos los receptores tipo Toll de equinodermos con TLR3, el cual se propone como el ancestro común del cual, a través de presión selectiva, surge el amplio repertorio de TLRs del erizo de mar (Roach, 2005).

En cuanto al ensayo de viabilidad, el tratamiento Poly I:C no presentó diferencias con el control, sin embargo, se observa una importante mortalidad de celomocitos en el tratamiento LPS a partir de las 4 horas, los cuales tienen un comportamiento similar a celomocitos de *S. purpuratus*, comportamiento del cual se desconoce la causa, pero que podría estar atribuida al proceso de encapsulación de la masa bacteriana dentro de un coagulo que tendría la finalidad de obstruir y bloquear la propagación bacteriana (Majeske *et al.*, 2013).

Cabe destacar también que se detectó un aumento en la población de celomocitos estimulados con LPS, el cual estaría indicando que el sistema inmunitario del organismo responde positivamente activando los procesos de proliferación celular que produce la presencia de algunos patógenos bacterianos o patrones moleculares de éstos (Patiño *et al.*, 2006; Holm *et al.*, 2008). Este proceso de proliferación tiene por finalidad proteger la homeostasis del organismo, a través de la eliminación de los agentes extraños que están causando un cierto nivel de estrés y provocando a la vez un desequilibrio en el sistema del organismo. (Yui, 1983; Ramirez, 2010).

Es importante recordar que esta tesis se realizó con celomocitos extraídos desde erizos vivos, y que el tratamiento se hizo *ex vivo*, por lo que sería de gran interés la realización del tratamiento *in vivo* para comprobar que el comportamiento observado concuerda en ambos casos. Como experimentos futuros proponemos un análisis a nivel proteico y la evaluación de moléculas río abajo como péptidos antimicrobianos, citoquinas, etc. Para entender el actuar del sistema inmune de una manera más integrada.

## 9.- Conclusiones

- El tratamiento con LPS, aumenta significativamente el número de células involucradas en la respuesta inmune.
- La respuesta generada por celomocitos contra LPS, produce una disminución en su relación células vivas/células muertas.
- LPS induce la expresión de ARN mensajero del receptor tipo Toll 4 en celomocitos de *Loxechinus albus* a las 2 horas de tratamiento.
- Poly I:C induce la expresión de ARN mensajero de los 4 receptores tipo Toll evaluados en esta tesis de manera tiempo dependiente.
- Los tratamientos LPS y Poly I:C, estimulan diferencialmente la expresión de receptores tipo Toll en celomocitos de *Loxechinus albus*.

## 10.- Bibliografía

- Abbas, K., Lleichtman, A., Jordan, S. (2005) Citocinas. En Abbas, K., Lleichtman, A., Jordan, S. Citocinas. (ed) Inmunología celular y molecular: pág. 243-274. Elsevier, Londres.
- Barbalat R, Lau L, Locksley RM, Barton GM. (2009). Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands. *Nature Immunology*.10(11),1200-1207.
- Beck, G. and G.S. Habicht. 1996. Immunity and the Invertebrates. *Scientific American*. The evolution of The Immune System: 60-66.
- Bell, J., Mullen, G., Leifer, C., Mazzoni, A., Davies, D. y Segal D. (2003). Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *TRENDS in immunology*. 24, 528-533.
- Bertheussen K. Endocytosis by echinoid phagocytes in vitro. II. Mechanisms of endocytosis (1981). *Dev. Comp. Immunol*. 5: 557-564.
- Bertheussen, K. and R. Seljelid. 1978. Echinoid phagocytes in vitro. *Exp. Cell. Res.*, 111: 401–412.
- Buckley, K.M., Rast, J.P., 2012. Dynamic evolution of toll-like receptor multigene families in echinoderms. *Front. Immunol*. doi:10.3389/fimmu.2012.00136.
- Bustos, E. & Olave, S. (2001). Manual: El cultivo del erizo (*Loxechinus albus*). . IFOP. División de acuicultura. , 22pp.

- Castilla, J. & Moreno, C. (1982). Sea urchins and *Macrocystis pyrifera*: experimental test of their ecological relations in southern Chile. In: Proceedings of the International Echinoderm Conference, Tampa Bay, Florida, USA, ed. JM Lawrence, pp. 257-263.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. 1987 Single Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159
- Coffaro KA (1979). Memory and specificity in the sea urchin *Lytechinus pictus*. Doctoral Dissertation, University of California.
- Coffaro KA, Hinegardner RT (1977). Immune response in the sea urchin *Lytechinus pictus*. *Science* 197: 1389-1390.
- Cooper, M. D., & Alder, M. N. (2006). The evolution of adaptive immune systems. *Cell*, 124(4), 815-822.
- 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.
- Dirección Nacional de Aduanas Chile (2016). Informe mensual de comercio exterior. Valparaiso.
- Duez, C., Gosset P., and Tonnel A. B. 2006. Dendritic cells and toll-like receptors in allergy and asthma. *Eur Journal Dermatology* 16:12-16.

- Edmunds, P. J., & Carpenter, R. C. (2001). Recovery of *Diadema antillarum* reduces macroalgal cover and increases abundance of juvenile corals on a Caribbean reef. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 5067-5071.
- 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.
- Hancock, R. E., Haney, E. F., & Gill, E. E. (2016). The immunology of host defence peptides: beyond antimicrobial activity. *Nature Reviews Immunology*, 16(5), 321.
- Hashimoto, C., Hudson K. L., and Anderson K. V.. 1988. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52:269-279.
- Hibino, T., Loza-Coll, M., Messier, C., Majeske, A.J., Cohen, A.H., Terwilliger, D.P., et al., 2006. The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome. *Dev. Biol.* 300 (1), 349–365.
- Hildemann WH, Dix TG (1972). Transplantation reactions of tropical australian echinoderms. *Transplantation* 14: 624-633.
- 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.

- Holm, K., Hernroth, B. & Thorndyke, M. *Cell Tissue Res* (2008) 334: 319. <https://doi.org/10.1007/s00441-008-0674-9>
  - Imler, J. y Zheng, L. (2004). Biology of Toll receptors: lessons from insects and mammals. *Journal of Leukocyte Biology*. 75, 18-26.
  - Isaeva, V.V. and E.S. Korenbaun. 1990. Defense functions of coelomocytes and immunity of echinoderms. *Sov. J. Marine Biol.*, 15: 353-363.
  - Janeway, C. y Medzhitov, R. (2002). Innate Immune Recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 197- 216.
  - Jin, M., Kim, S., Heo, J., Lee, M., Kim, H., Paik, S., Lee, H. a Lee, J. (2007). Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated-lipopeptide. *Cell*. 130, 1071- 1082.
- 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.
- Kawai, T. y Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update of toll like receptors. *Nature Immunology*. 11, 375-384.
  - Karp RD, Hildemann WH (1976). Specific allograft reactivity in the sea star *Dermasterias imbricata*. *Transplantation* 22: 434- 439.
  - Kumar, H., Kawai, T. y Akira S. (2009). Toll-like receptors and innate immunity. *BBRC*. 388, 621-625.

- Laughlin, J. D. 1989. Coelomocytes of the urchin *Lytechinus pictus* (Echinoidea). *J. Invertebr. Pathol.*, 54: 404-405.
- Li, C., Blencke, H. M., Haug, T., Jørgensen, Ø., & Stensvåg, K. (2014). Expression of antimicrobial peptides in coelomocytes and embryos of the green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Developmental & comparative immunology*, 43(1), 106-113.
- Liao, W. Y., & Fugmann, S. D. (2017). Lectins identify distinct populations of coelomocytes in *Strongylocentrotus purpuratus*. *PLoS one*, 12(11), e0187987.
- Majeske, A. J., Bayne, C. J., & Smith, L. C. (2013). Aggregation of sea urchin phagocytes is augmented in vitro by lipopolysaccharide. *PLoS one*, 8(4), e61419.
- Male, D., Brostoff, J., Roth, D., Roitt, I. (2007). *Inmunología*. 7<sup>o</sup> Ed. Elsevier. España. pp 535.
- Male D and Roitt I (1996) Introduction to the immune system. *Immunology*. Londres. 1-12.
- Matsushima, N., Tanaka, T., Enkhbayar, P., Mikami, T., Taga, M., Yamada, K. y Koruki, Y. (2007). Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll like receptors. *BMC Genomics*. 8, 124-144.
- Metchnikoff, E. 1891. *Lectures on the Comparative Pathology of Inflammation* Delivered at Pasteur Institute in 1891. Dover, New York 224 p
- Mesa-Villanueva, M., & Patiño, P. J. (2006). Receptores tipo Toll: entre el reconocimiento de lo no propio infeccioso y las señales endógenas de peligro. *Inmunología* (1987), 25(2), 115-130.

- Messier-Solek, C., Buckley, K. M., & Rast, J. P. (2010, February). Highly diversified innate receptor systems and new forms of animal immunity. In *Seminars in immunology* (Vol. 22, No. 1, pp. 39-47). Academic Press.
- Miggin, S. M., and O'Neill L. A.. 2006. New insights into the regulation of TLR signaling. *Journal of Leukocyte Biology* 80:220-226.
- Molinet, C., Moreno, C.A., Niklitschek, E.J., Matamala, M., Neculman, M., Arévalo, A. et al. (2012). Reproduction of the sea urchin *Loxechinus albus* across a bathymetric gradient in the Chilean Inland Sea. *Revista de biología marina y oceanografía*, 47, 257-272.
- O'Neill, L. y Bowie, A. (2007). The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll like receptor signalling. *Nature Reviews*. 7, 353-364.
- Oyarzún S, Marín S, Valladares C, Iriarte J. (1999). Reproductive cycle of *Loxechinus albus* (echinodermata : echinoidea ) in two areas of the magellan region ( 53 ° s , 70- 72 ° w ), chile \* 63: 439–49. Parra
- Plytycz B, Seljelid R (1993). Bacterial clearance by the sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Dev. Comp. Immunol.* 17: 283-289.
- Ramírez-Gómez, F., Aponte-Rivera, F., Méndez-Castaner, L., & García-Arrarás, J. E. (2010). Changes in holothurian coelomocyte populations following immune stimulation with different molecular patterns. *Fish & shellfish immunology*, 29(2), 175-185.

- Rast, J.P., Smith, L.C., Loza-Coll, M., Hibino, T., Litman, G.W., 2006. Genomic insights into the immune system of the sea urchin. *Science* 314 (5801), 952–956.
- Reinisch CL, Bang FB (1971). Cell recognition: Reactions of the sea star (*Asterias vulgaris*) to the injection of amebocytes of sea urchin (*Arbacia punctulata*). *Cell. Immunol.* 2: 496-503.
- Roach, J., Glusman, G., Rowen, L., Kaur, A., Purcell, M., Smith, K., Hood, L., y Aderem, A. (2005). The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proceedings National Academy of Science.* 102, 9577–9582.
- Rondon-Barragan (2009). Receptores similares a toll en peces: el inicio de la divergencia. *InVet.* 11, 15-30.
- Rubio-Godoy, M. (2010). Inmunología de los peces óseos. Revisión. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 1, 47-57.
- Chiaramonte, M., & Russo, R. (2015). The echinoderm innate humoral immune response. *Italian Journal of Zoology*, 82(3), 300-308.
- Satake, H., Sekiguchi, T., 2012. Toll-like receptors of deuterostome invertebrates. *Front. Immunol.* doi:10.3389/fimmu.2012.00034
- Smith LC, Britten RJ, Davidson EH (1992). SpCoel1: A sea urchin profilin gene expressed specifically in coelomocytes in response to injury. *Mol. Biol. Cell* 3: 403-414.

- Smith, L.C., Rast, J.P., Brockton, V., Terwilliger, D.P., Nair, S.V., Buckley, K., et al., 2006. The sea urchin immune system. *Inv. Surv. J.* 3, 25–39.
- Takano, T., Hwang, S., Kondo, H., Hirono, I., Aoki, T. y Sano, M. (2010). Evidence of Molecular Toll-like receptors mechanism in teleosts. *Fish Pathology.* 45, 1-16.
- Takeda, K., and Akira S.. 2004. TLR signaling pathways. *Seminars in Immunology* 16:3-9.
- West, A. P., Koblansky A. A., and Ghosh S.. 2006. Recognition and signaling by toll-like receptors. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 22:409-437.
- Yui M, Bayne C (1983). Echinoderm immunity: Bacterial clearance by the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Biol. Bull.* 165: 473-485.
- Zhang, J., Rajendram, K.V., Sun, L., Zhang., Y. (2013), Pathogen recognition receptors in channel catfish: Phylogeny and expression analysis of Toll-likereceptors. *Developmental and Comparative Immunology.* En prensa.

## 11.- Anexo figuras

### CONTIG13797 (TLR3)

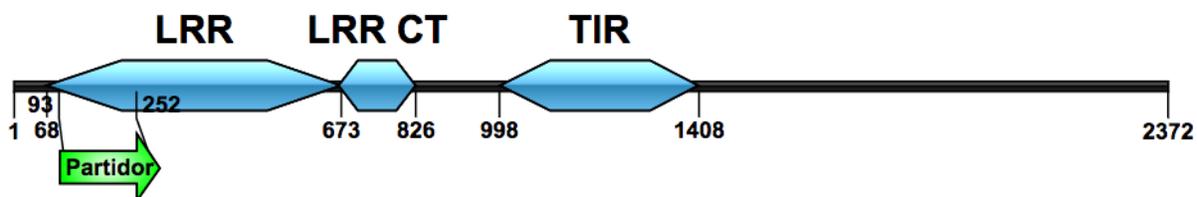


Figura anexa 1: Esquema del contig13797, fragmento de la secuencia del tlr3 en *L.albus*, indicando la ubicación del partidor en la región LRR.

### CONTIG 89250 (TLR4)

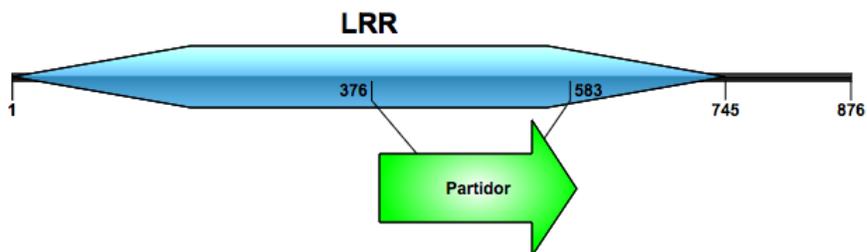


Figura anexa 2: Esquema del contig89250, fragmento de la secuencia del tlr4 en *L.albus*, indicando la ubicación del partidor en la región LRR.

## CONTIG69174 (TLR6)

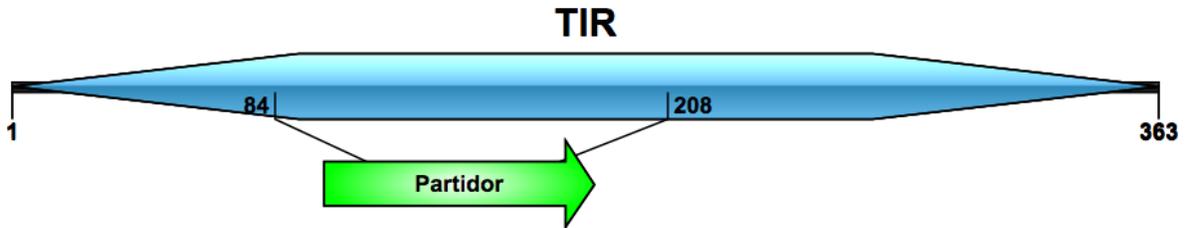


Figura anexa 3: Esquema del contig69174, fragmento de la secuencia del *tlr6* en *L.albus*, indicando la ubicación del partidor en la región TIR.

## CONTIG 47440 (TLR8)



Figura anexa 4: Esquema del contig 47440, fragmento de la secuencia del *tlr8* en *L.albus*, indicando la ubicación del partidor en la región LRR.