

**Universidad
de La Laguna**

Facultad de Farmacia

Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Molecular y Genética
Área de conocimiento: Bioquímica y Biología Molecular

Trabajo de Fin de Grado

**Identificación y revisión bibliográfica del
antecesor de Eumetazoa: “*Trichoplax
adhaerens*”.**

Daniel Matías Camacho Espino

Grado en Farmacia

Tutores

Dr. Francisco Javier Quevedo Ruíz
Dr. Juan Ignacio Frías Viera

Septiembre, 2020

ABSTRACT

The phylum placozoa is a group of primitive animals with great evolutionary and pharmacological interest. It is represented by a few genus, when Trichoplax and its representative species *T. adhaerens* are most studied. In this work, the knowledge of this species has been bibliographically reviewed, both from an evolutionary point of view and relative to its pharmacological interest.

Experimentally, protocols have been developed for the isolation of the species in the most predictable coastal habitat for this species in the Canary Islands and for the physical identification of the specimens obtained.

The results obtained indicate, on the one hand, the lack of study on this recently discovered species, as well as the potential importance of Trichoplax sp. in studies involving an ancestral animal model for the study of drugs. Including the search for biochemical targets and response mechanisms different from those described in more evolutionarily recent models.

Candidate specimens have been isolated in shallow waters of Tenerife and optimal isolation conditions for this species have been established.

RESUMEN

El Filo placozoa es un grupo de animales primitivos y con gran interés evolutivo y farmacológico. Está representado por pocos géneros, de los que *Trichoplax* y su especie representativa *T. adhaerens* es el más estudiado. En este trabajo se ha hecho una revisión bibliográfica del conocimiento actual de esta especie, tanto desde el punto de vista evolutivo como desde el punto de vista de su interés farmacológico.

Experimentalmente, se han realizado los protocolos para el aislamiento de la especie en uno de los hábitats costeros más previsible de Canarias así como la identificación física de los especímenes candidatos recolectados.

Los resultados obtenidos indican, por un lado, la falta de estudio sobre esta recientemente descubierta especie, y por otro lado, la importancia potencial de *Trichoplax* en investigaciones que impliquen un modelo ancestral animal para el estudio de fármacos. Incluyendo la búsqueda de dianas bioquímicas y mecanismos de respuesta diferentes a los descritos en modelos más evolucionados.

Finalmente, se han aislado por primera vez especímenes candidatos de *Trichoplax* en aguas someras de Tenerife y se han propuesto las condiciones óptimas de crecimiento de esta especie.

ÍNDICE

ABSTRACT.....	2
RESUMEN.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. <i>Trichoplax adhaerens</i> , una especie singular.....	5
1.2 Origen evolutivo de los Metazoa.....	7
1.3. Significado evolutivo del género <i>Trichoplax</i>	7
2. OBJETIVOS.....	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
3.1. Metodología de generación de resultados bibliográficos.....	10
3.2. Metodología de búsqueda y aislamiento de <i>Trichoplax</i>	10
3.3. Microscopía y cultivo de <i>Trichoplax</i>	12
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14
4.1.Revisión del género <i>Trichoplax</i>	14
4.2.Aislamiento de <i>Trichoplax</i> en Canarias.....	16
4.3. Microscopía de especímenes aislados.....	17
5. CONCLUSIONES.....	19
6. BIBLIOGRAFÍA.....	20

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Trichoplax adhaerens*, una especie singular.

Los placozoos (Placozoa) son un filo de animales con una estructura corporal muy básica. Sin embargo al estudiarlos se considera que puede tener un origen más complejo. Fueron descritos por el zoólogo alemán Franz Eilhard Schulze (1840-1921), tras identificarlos en un acuario marino del Instituto de Zoología de Graz (Austria) [1]. *Trichoplax adhaerens* incluye una sola especie, si bien se ha sugerido que pueden existir hasta 100 especies aún desconocidas [1, 2].

T.adhaerens destaca por tener una organización celular más simple que cualquier otro metazoo vivo, su tamaño (no superior a algunos milímetros), su aspecto (una placa peluda irregular, de ahí el término que describe al filo) y su genoma, lo hacen candidato a ser un organismo modelo para diferentes estudios, hasta ahora limitados por la necesidad de aislar, caracterizar y cultivar esta especie [3].

En 1971, el protozoólogo Grell, halló el *T. adhaerens* libre en la naturaleza, en los mares Mediterráneo y Rojo. Posteriormente se identificaron a lo largo de las aguas marinas cálidas cercanas a trópicos y subtropicos (Figura 1.1). Son considerados como bentónicos. Sin embargo se recolectan frecuentemente adheridos a diferentes sustratos. Una de las técnicas más utilizadas consiste en el uso de la columna de agua con portaobjetos situada por encima del fondo marino . (Figura 1.2) [4].

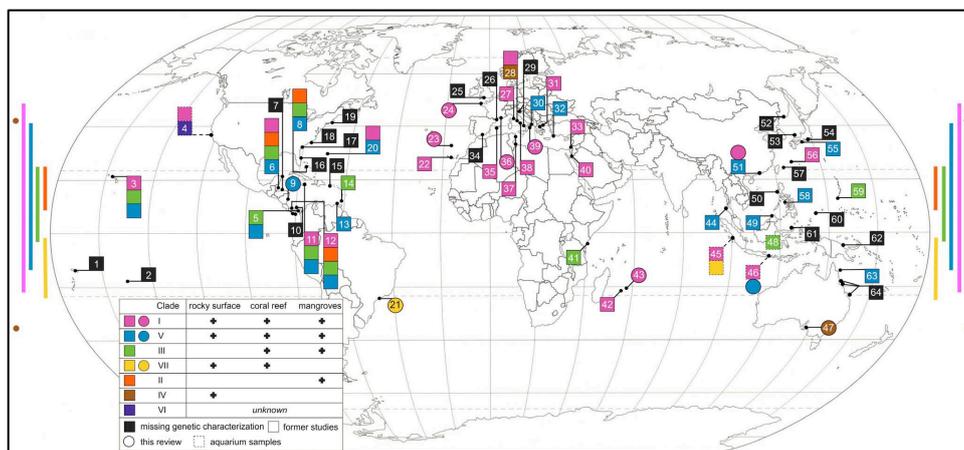


Figura 1.1. Distribución de los Placozoa descritas hasta la fecha. Figura tomada de [2].

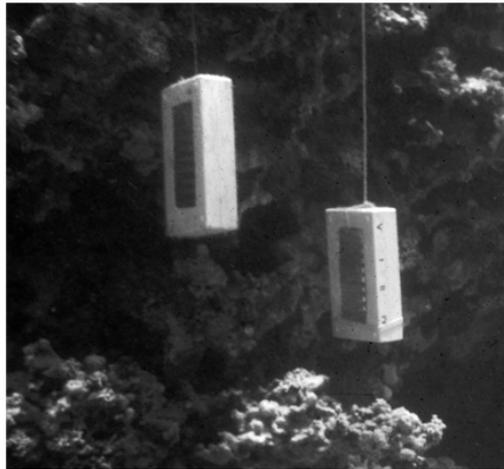


Figura 1.2. Columna de agua con portaobjetos sumergida por encima del fondo del mar. Figura tomada de [4]

Trichoplax carece de tejido muscular, y de los sistemas nervioso y digestivo. Además, establece relaciones sociales en su alimentación, lo cual mejora la extracción de los alimentos. La participación social aumenta cuando hay una mayor concentración de algas y cianobacterias. *T.adhaerens* podría usarse como modelo para estudiar algunos aspectos relacionados con la sociología y ecología [5].

Esta especie tiene en torno a unas cuarenta mil células. De las cuales únicamente encontramos seis tipos de células y dos cilios con funciones diferenciadas [6].(Figura1.3)

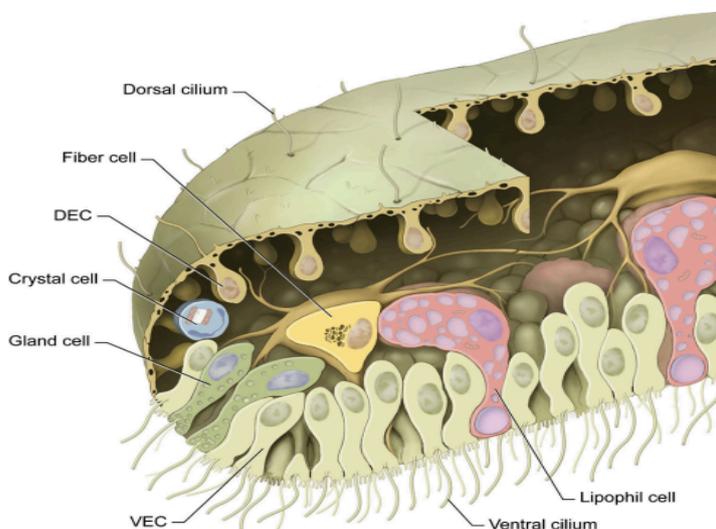


Figura 1.3. Tipos de células que conforman la estructura de *T. Adhaerens*. Figura tomada de [6]

1. Las células lipofílicas, cuya función es básicamente digestiva.
2. Las células glandulares, que secretan neuropéptidos.
3. Las células epiteliales dorsales, que forman una estructura como una membrana que protege y preserva el esqueleto del animal.
4. Las células ventrales que son ciliadas (cada una con un pelo).
5. Las células fibrosas, que se parecen anatómicamente a las neuronas y se conectan con otras células a través del cuerpo del animal.
6. Las células con cristal, monocristal de calcita rodeado de mitocondrias. Hay quien sugiere que estos cristales son un lastre a modo de sensor de gravedad y por lo tanto indica la altura a la que se encuentran.
7. El Cilio ventral.
8. El Cilio dorsal.

1.2 Origen evolutivo de los Metazoos

La secuenciación del genoma del *Trichoplax* y su posterior estudio está proporcionando mucha información sobre el origen de los metazoos basales. Debido a esto, *Trichoplax* ha adquirido un gran interés y ha sido redescubierta como una especie clave para desentrañar la evolución de los metazoos^[7]. A partir de la ontogenia de los Placozoos, se pueden encontrar aspectos que permitan reevaluar las teorías sincitial flagelada y colonial flagelada que se han propuesto para la evolución de los animales multicelulares. De forma resumida, la primera de las teorías propuestas, parte de un protozoo ancestral unicelular ciliado pero multinucleado y con diferenciación bilateral. La segunda de las teorías propone la unión de muchos protozoos unicelulares flagelados para configurar las primeras formas coloniales antecesoras.

El estudio del genoma y de la morfología de *Trichoplax*, permite situar este ancestro en ambas teorías y, en este contexto, tratar de dilucidar cuál de ellas interpreta mejor la evolución real de los animales. El interés de *Trichoplax* es el de situarse en un punto del proceso evolutivo para el que se tienen pocas especies representativas [8].

1.3. Significado evolutivo del género *Trichoplax*

La posición de *Trichoplax* en el árbol evolutivo también representa un importante punto de interés de la especie. El análisis clásico, basado en estudios filogenómicos sitúan a los poríferos (esponjas) en la base de la

evolución de los animales y a los placozoos en una posición intermedia, los cuales son los parientes más cercanos de los cnidarios..

Por otro lado, los análisis filogenéticos de proteínas mitocondriales poseen una fuerte tendencia a ubicar el filo Placozoa en la base de la evolución de los metazoos. Ambas hipótesis están relacionadas con las teorías colonial y sincitial descritas anteriormente [9].

Basándose en los resultados obtenidos en [10,11], se ha llegado a la conclusión de que a partir de un ancestro común, se han generado de forma muy temprana los filos placozoa, cnidaria y bilateria, estando situado por tanto Trichoplax evolutivamente en paralelo a los ancestros animales (*Figura 1.4*). *Esta es la hipótesis* que está prevaleciendo actualmente en la comunidad científica.

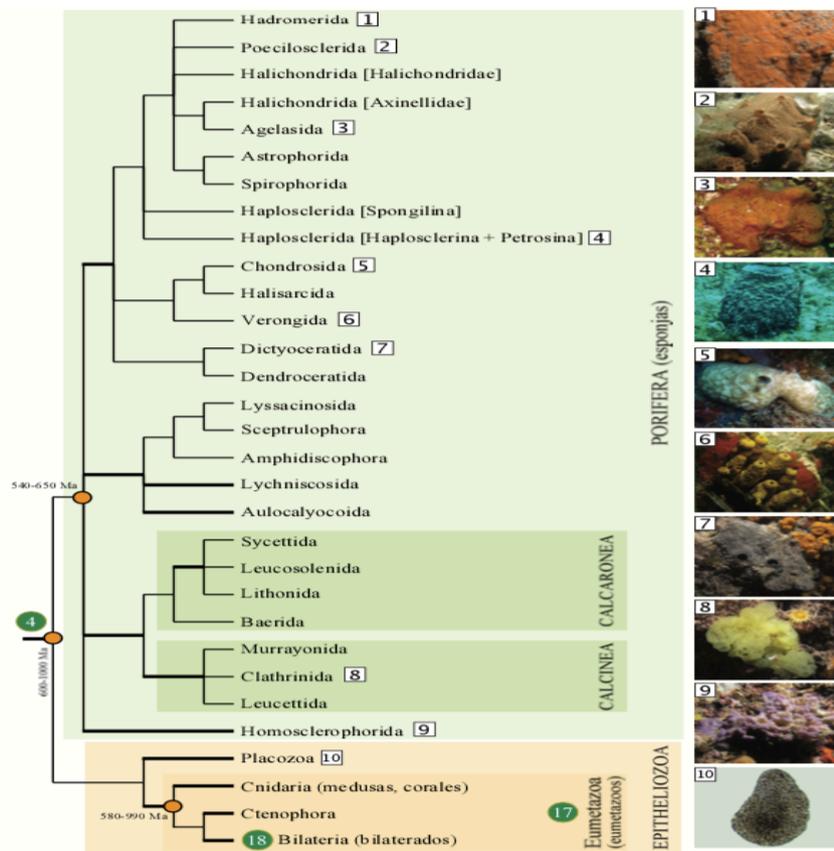


Figura 1.4 Árbol filogenético, en el que se observa el linaje evolutivo de Placozoa (figura tomada de [10])

2. OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo son los siguientes:

1. Presentar un resumen del conocimiento científico del género *Trichoplax*, destacando aquellos aspectos que lo hacen adecuado como modelo experimental.
2. Clasificar los trabajos realizados hasta la fecha sobre este filo, especialmente aquellos que contienen aspectos de interés farmacológico.
3. Llevar a cabo, por primera vez en Canarias, protocolos de aislamiento e identificación de *Trichoplax* empleando varias formas de extracción y microscopía.
4. Diseñar un medio de cultivo adecuado para el aislamiento y posterior estudio de la especie.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Metodología de generación de resultados bibliográficos.

La revisión bibliográfica realizada está fundamentada en las bases de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica o *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* empleando las sub-bases *Pub-Med* y *PubMedHealth*. Los términos iniciales de búsqueda utilizados han sido Placozoa y Trichoplax. Los limitantes de la búsqueda fueron las fechas de publicación y se eligió el periodo comprendido entre el 2002 y el 2020 debido a la escasez de referencias anteriores. Los trabajos se clasificaron en función del índice de impacto y de la relevancia relativa, siendo este un término referido al valor promediado por el NCBI para el impacto de los trabajos. También se utilizó el buscador web Google Scholar para identificar referencias genéricas, y en parte, alternativas a los artículos científicos estrictos.

3.2 Metodología de búsqueda y aislamiento de *Trichoplax* sp

Para la recolección del material a analizar se han utilizado principalmente dos métodos:

- Primer método: extracción directa de rocas o restos de conchas del fondo, por debajo de la zona de marea, para su posterior extracción en el laboratorio. En este caso se aislaron seis muestras con diferentes perfiles de profundidad en las zonas de Bajamar y Punta del Hidalgo (noroeste Tenerife) (*Figura 3.1*).



Figura 3.1. Muestras obtenidas en la zona noroeste de Tenerife.

- Segundo método: colocación de entre ocho y diez portaobjetos en una gradilla plástica inerte para su posterior extracción al cabo de 10 días. En este caso se aislaron dos grupos de muestras (*Figura 3.2*).

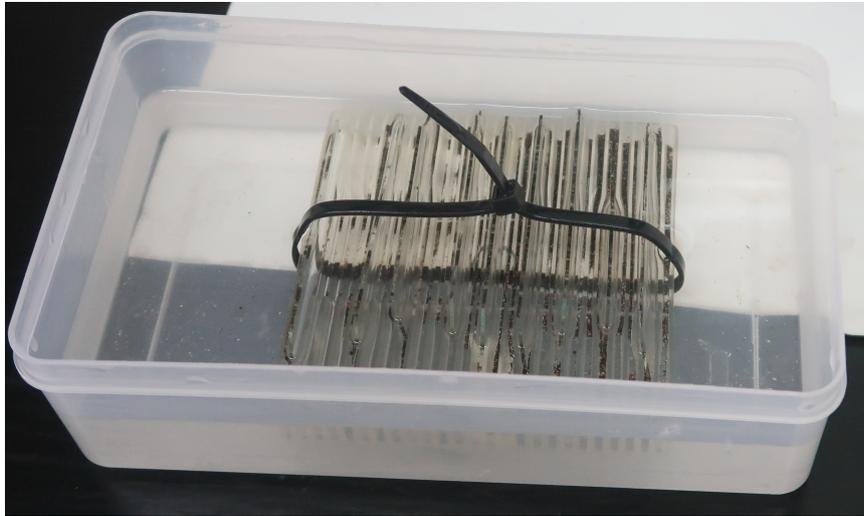


Figura 3.2. Carro de portaobjetos utilizado en la obtención de muestras empleado en el segundo método.

El procedimiento empleado para el aislamiento de especímenes, descrito en [12] con modificaciones, es el siguiente:

1. Se añade a la muestra 100 ml de una disolución 5% etanol en agua destilada, o alternativamente, 100 ml de agua de mar recién cogida en el lugar del aislamiento al 5% etanol.
2. Se espera 5 minutos. Antes de pasarlo al tubo de ensayo.
3. Se decanta la disolución en tubos de centrifugado de vidrio y se trasladan al laboratorio en frío.
4. Se centrifugan los tubos a 2000 rpm durante 5 minutos en un rotor basculante a temperatura ambiente, obteniendo así un sedimento.
5. De forma inmediata, se recoge la fracción sedimentada contenida en los 1000 μ l finales, empleando una pipeta Pasteur y transfiriendo a tubos eppendorf para su conservación.

6. Se depositan 100 μ l de la muestra resuspendida en portaobjetos para su exploración en busca de candidatos de *Trichoplax* empleando aumentos de 5x y 40x del objetivo (magnificaciones entre 50 y 400x)

Un esquema del procedimiento empleado se muestra en la *Figura 3.3*.

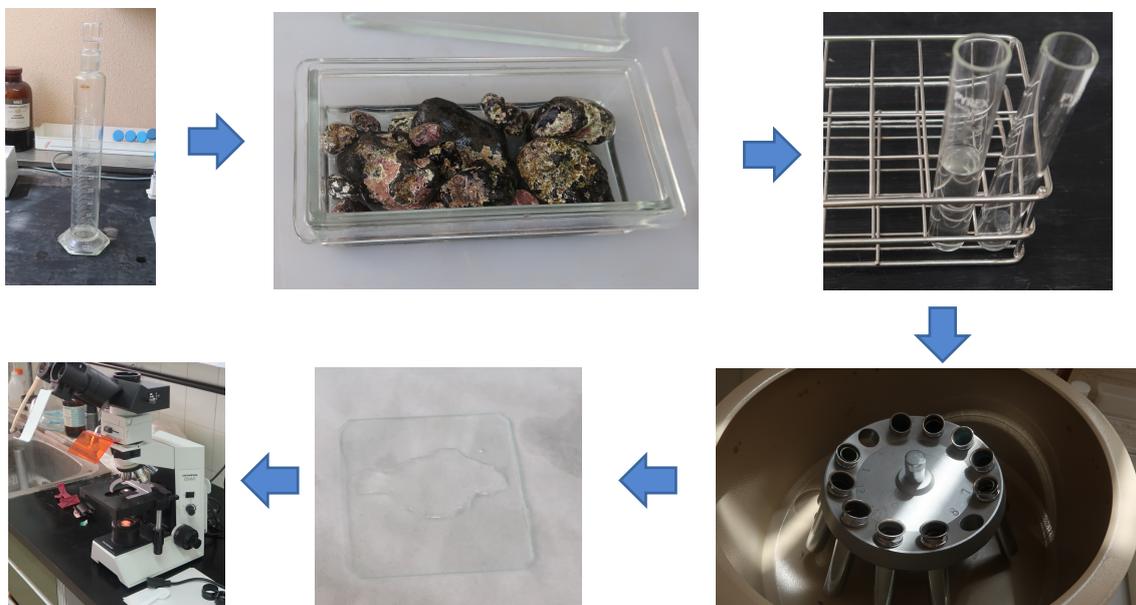


Figura 3.3. Descripción gráfica del proceso realizado.

3.3 Medios de cultivo de *Trichoplax* sp.

La bibliografía acerca del cultivo y multiplicación “in vitro” de especies del género *Trichoplax* y, en general, del filo Placozoa es muy limitada, los protocolos publicados hacen hincapié en el cultivo sobre céspedes de algas en medio salino. En estos sistemas se han observado los procesos de alimentación y sociales descritos para la especie de *T. adhaerens* [5,13]. El interés se centró en el diseño de un medio simple, es decir con nutrientes puros y en condiciones salinas similares al medio marino. De esta forma se identificó y se propuso un medio de cultivo en placas Petri de agar modificado del medio de crecimiento de levadura YPD (Yeast extract Peptona Dextrosa), donde la concentración de nutrientes es 1/10 respecto al YPC comercial y la de Glucosa es de 1/20. El medio propuesto contiene, por tanto:

- Extracto de levadura 0,1%.
- Peptona 0,2%.
- Glucosa 0,05%.

- Agar agar Merck 2%.
- En agua destilada conteniendo un porcentaje de sales al 3,5 % de los cuales ClNa al 2,4% y un coctel de minerales comerciales (suministrado para acuarios marinos) conteniendo 0,5% Cl Mg²⁺ y 0,7% ClK⁺.

Hemos previsto que este medio de cultivo no permita el crecimiento y desarrollo de las especies de Trichoplax y por tanto proponemos un medio complementario, más complejo en nutrientes debido a la adición de 1% de un triturado tamizado de espirulina comercial y donde en el que se sustituye el agua preparada por agua marina natural esterilizada y posteriormente filtrada a través de filtros desechables de 0,45 µm.

4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Revisión del género Trichoplax

Los términos Placozoa, Trichoplax y *T. adhaerens*, comienzan a aparecer en la literatura a partir del año 1974 aunque no es hasta el 2010 cuando aparece información relevante en las bases de datos. En el NCBI, en los últimos 10 años el término de búsqueda “Trichoplax” aparece citado en 1299 artículos, siendo en los últimos 5 años cuando el interés de esta especie empieza a destacar y a aumentar la relevancia de los trabajos con un total de 609 artículos, especialmente en conceptos como la evolución de los animales y más recientemente como modelo de estudio para diferentes aspectos de interés clínico. En la *Figura 4.1* se muestra la distribución de trabajos referidos al filo Placozoa y al género Trichoplax bajo diferentes criterios y años.

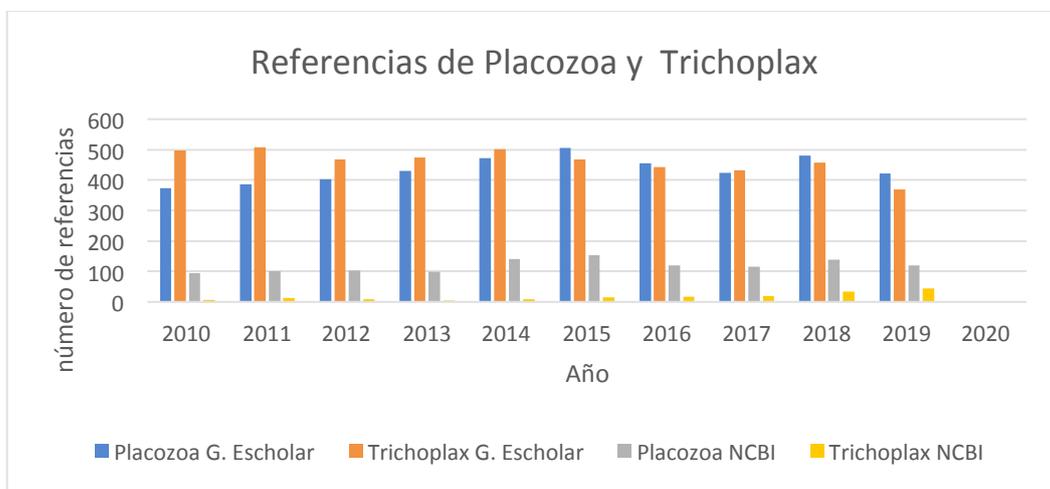


Figura 4.1. Artículos científicos referidos al filo y género de Trichoplax adhaerens en el buscador generalista Google scholar y en el NCBI.

El interés del género Trichoplax ha ido cambiando desde el descubrimiento de la especie. Desde su significado como organismo simple en su posición en el árbol filogenético hasta el análisis de su genoma y, como consecuencia, la búsqueda de aplicaciones como organismo modelo para el estudio de diferentes funciones y procesos metabólicos, algunos de ellos con

implicaciones clínicas, incluyendo sistema nervioso [14], hipoxia [15], cáncer [16] y comunicación intercelular [17,18].

La distribución de los diferentes aspectos científicos estudiados en *Trichoplax* y más específicamente en *T. adhaerens* se muestra en la *Figura 4.2* en la que se incluye el resultado del análisis de los artículos con mayor relevancia en los campos que se indican. Además de aquellos artículos, señalados con el término “indirecto” en referencia a que aparece tanto en el resumen y en el texto pero no como principal sujeto de estudio.

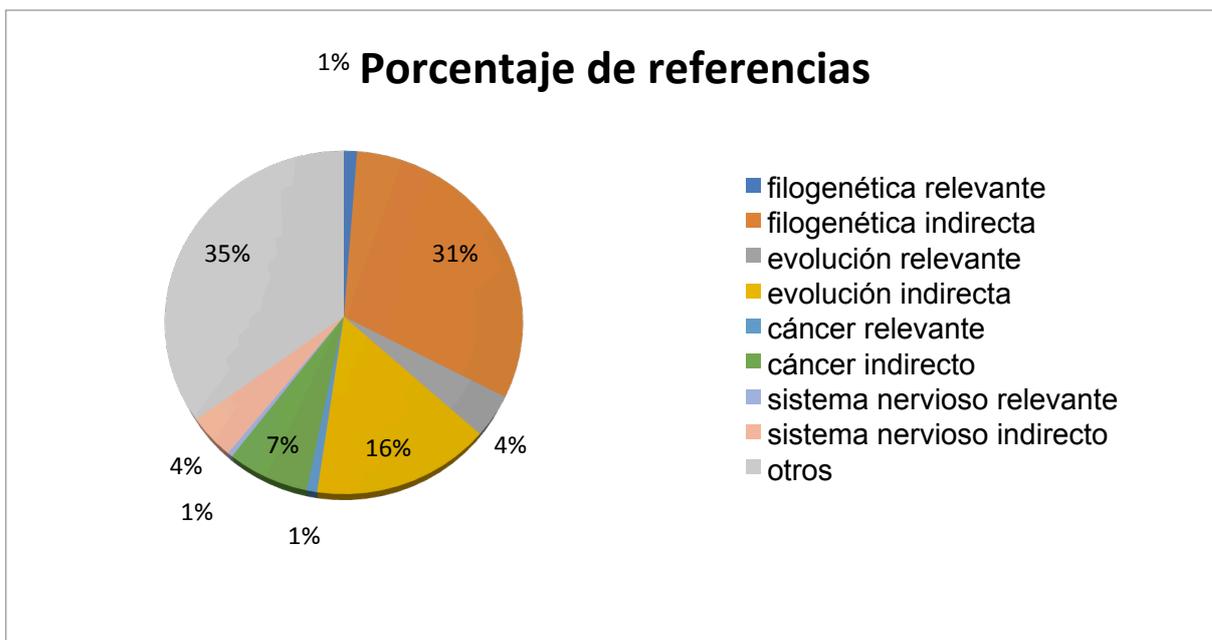


Figura 4.2. Distribución de referencias agrupadas por campos y que utilizan a T. adhaerens de forma directa o indirecta en el estudio.

En este trabajo se puso especial interés en clasificar las referencias que emplean a *T. adhaerens* en aspectos farmacológicos o bioquímicos que pudieran tener interés clínico y por tanto apoyaran la idea de emplear este organismo como modelo experimental a desarrollar en los próximos años, en este sentido, la *Figura 4.3* muestra los resultados de este análisis, donde se

refiere como resultados “indirectos” aquellos que aparecen no como objetivo principal del estudio:

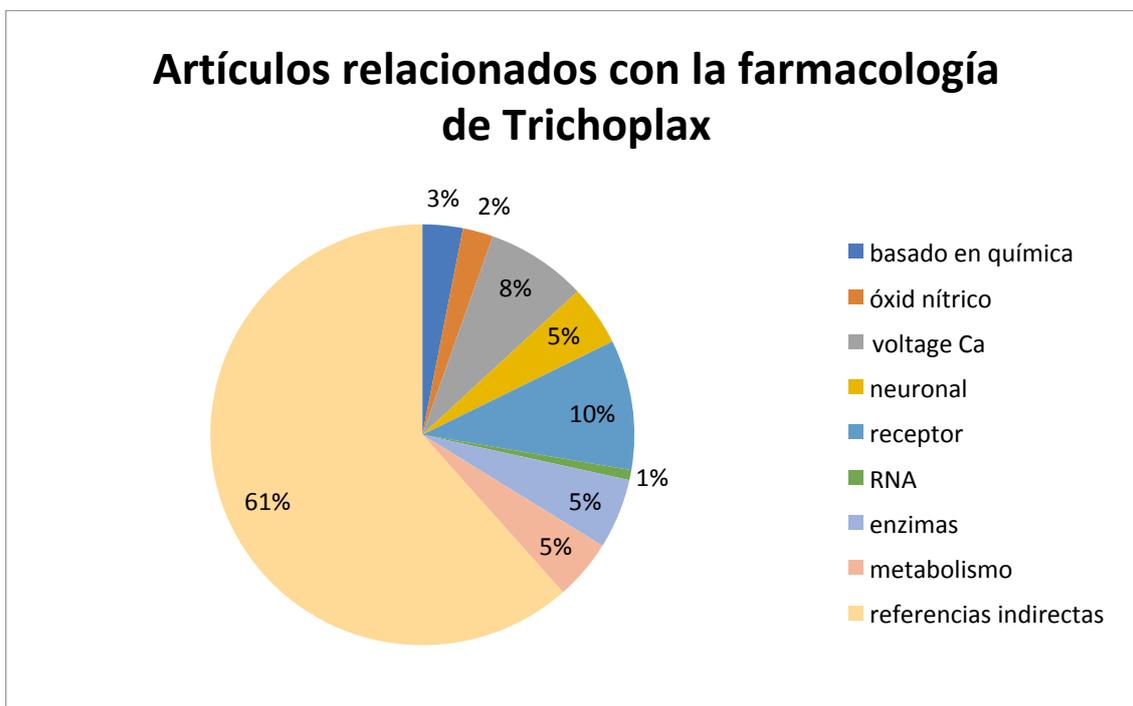


Figura 4.3. Distribución de referencias que estudian *T. adhaerens* en estudios con interés clínico.

4.2 Aislamiento de *Trichoplax* sp en Canarias

Para el desarrollo experimental del presente trabajo, se tomaron 8 muestras diferentes que pudieron ser analizadas en busca de candidatos de *Trichoplax*. Se identificaron visualmente (tamaño y forma) y en base a su movilidad, a más de 20 candidatos (se seleccionaron 17 para este trabajo), los cuales pudieron ser aislados empleando capilares, con el fin de ser analizados posteriormente utilizando técnicas específicas (morfológicas y moleculares). La concentración de estos ejemplares en la muestra final de sedimento fue de 0,21 especímenes por cm^3 .

Las muestras obtenidas empleando gradilla con portaobjetos, tienen una mayor eficacia para el aislamiento del *Trichoplax* cuando el tiempo de

exposición en la columna de agua es suficientemente grande para crear un biofilm de algas y otros organismos adheridos a los portaobjetos (más de 1 semana de exposición). Se necesita más trabajo experimental para ajustar los tiempos óptimos de exposición, la profundidad y la temperatura.

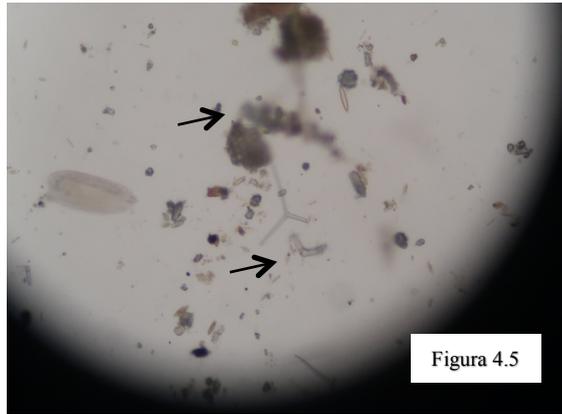
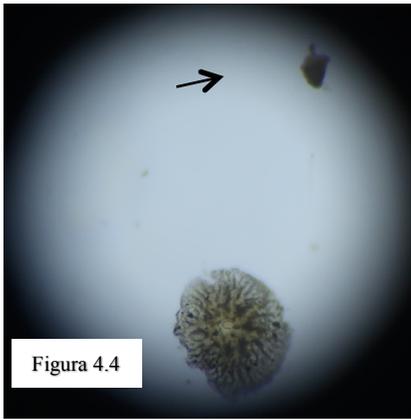
La siguiente tabla recoge algunas características de la recogida en campo de las muestras.

Nº muestra	Fecha recogida	Lugar	Nº especímenes	Profundidad (m)
1	25/06/20	Bajamar	0	0,5
2	29/06/20	Bajamar	0	0,5
3	03/07/20	La Punta	0	1
4	09/07/20	Bajamar	+(1)	1
5	16/07/20	La Punta	+	1,5
6	22/07/20	La Punta	++(4)	2
7	27/07/20	La Punta	+	1,5
8	2/08/20	Bajamar	+++ (10)	1,5

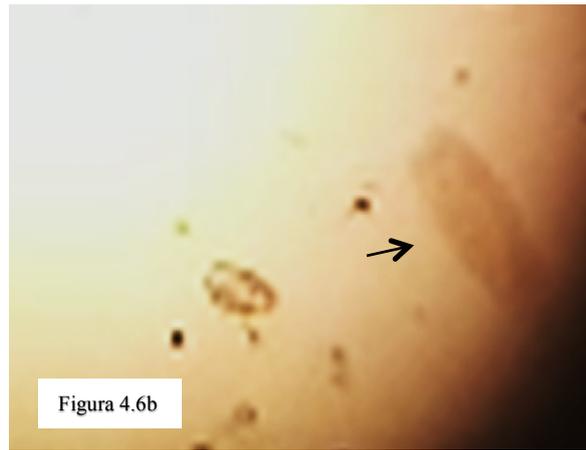
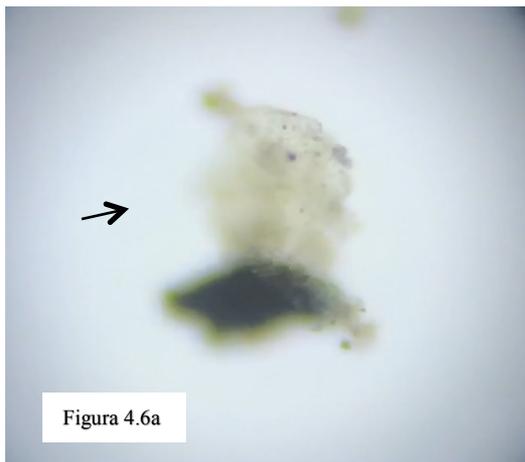
Tabla 1. Tabla con el número especímenes encontrados por muestra.

4.3 Microscopía de especímenes aislados

A modo de ejemplo, se presenta a continuación el proceso de análisis de diferentes muestras. Las muestras conteniendo candidatos se aíslan mediante capilares y se depositan en tubos eppendorf para su conservación y uso en estudios posteriores. En las *Figura 4.4*, *Figura 4.5* y *Figura 4.6*, se muestran ejemplos de candidatos detectados bajo microscopía, los cuales han sido aislados según el método y los aumentos que se indican.



Figuras 4.4. y figura 4.5. Aislado según método 1 y con un aumento de 10x.



Figuras 4.6a, 4.6b. Aislado según método 2 y con un aumento de 50x.

La identificación de los candidatos requiere detectar el movimiento ameboide, distinguible de otros componentes y restos biológicos presentes en las muestras.

5. CONCLUSIONES

Trichoplax es un género poco estudiado en la bibliografía, cuenta con unas 3000 referencias totales, pero de un gran interés dada su posición evolutiva y la poca representación de especies que posee este filo. La mayor parte de las referencias son relativas a sus características genómicas y a su posición taxonómica-evolutiva, sin embargo, recientemente se están elaborando estudios referentes a su metabolismo y a su fisiología cada vez más.

Últimamente se ha presentado esta especie como modelo ancestral del filo de los animales con vías metabólicas y sistema de respuesta bien definidos y características primitivas y por tanto emerge el interés que farmacológicamente puede tener esta especie como diana para el estudio de diferentes moléculas.

Los protocolos que hemos desarrollado para el aislamiento de especímenes en las costas de las islas, muestran su eficacia y probablemente serán la manera más adecuada para identificar y citar esta especie de forma inequívoca en este ambiente geográfico. La profundidad de muestreo y la exposición a la luz parecen, así como el tiempo de exposición en el caso del método donde usamos los portaobjetos, podrían ser factores relevantes para incrementar las opciones de detección de especímenes de Trichoplax. Los candidatos utilizados se han aislado en condiciones de profundidad alrededor de dos metros y en entornos ricos en organismos bentónicos adheridos al sustrato y relativamente alejados de la luz directa, lo que concuerda con lo descrito en la bibliografía consultada.

Los cultivos in vitro para esta especie pueden representar la forma adecuada de obtener material suficiente para resolver las cuestiones científicas que este organismo promete y evaluar su utilidad como organismo modelo.

6. BIBLIOGRAFÍA

1.Schierwater B, Eitel M, Osigus HJ, von der Chevallerie K, Bergma T, Hadrys H, et al. Trichoplax and Placozoa: one of the crucial keys to understanding metazoan evolution. En: DeSalle R and Schierwater B, eds. *Key transitions in animal evolution*. New Hampshire, Science Publishers, 2010:289-326

2.Schierwater B, DeSalle R. Placozoa. *Curr Biol*. 2018;28(3):R97-R98.
doi: 10.1016/j.cub.2017.11.042

3.Schierwater B. My favorite animal, Trichoplax adhaerens. *Bioessays*. 2005;27(12):1294-1302.
doi: 10.1002/bies.20320)

4.Pearse VB., Voigt O. Field biology of placozoans (Trichoplax): distribution, diversity, biotic interactions. *Integr Comp Biol*. 2007;47(5):677-692.
doi: 10.1093/icb/icm015

5.Fortunato A, Aktipis A. Social feeding behavior of *Trichoplax adhaerens*. *Front Ecol Evol*. 2019;7-19.
doi: 10.3389/fevo.2019.00019

6.Smith C.L, Mayorova T.D. Insights into the evolution of digestive systems from studies of Trichoplax adhaerens. *Cell Tissue Res*. 2019;377(3):353-367.
doi: 10.1007/s00441-019-03057-z

7.Srivastava M, Begovic E, Chapman J, et al. The Trichoplax genome and the nature of placozoans. *Nature*. 2008; 454(7207):955-960.
doi: 10.1038/nature07191

8.Miller D.J., Ball E.E. Animal evolution: the enigmatic phylum placozoa revisited. *Curr Biol*. 2005;15(1):R26-R28.
doi: 10.1016/j.cub.2004.12.016

9.Dellaporta SL, Xu A, Sagasser S, et al. Mitochondrial genome of Trichoplax adhaerens supports placozoa as the basal lower metazoan phylum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(23):8751-8756.
doi: 10.1073/pnas.0602076103

10.Lavrov DV. Key transitions in animal evolution: a mitochondrial DNA perspective. *Integr Comp Biol*. 2007; 47(5):734-743.
doi: 10.1093/icb/icm045

11.King N, Westbrook MJ, Young SL, et al. The genome of the choanoflagellate *Monosiga brevicollis* and the origin of metazoans. *Nature*. 2008; 451(7180):783-788.
doi: 10.1038/nature06617

12.H, Nakano H. Multiple surveys employing a new sample-processing protocol reveal the genetic diversity of placozoans in Japan. *Ecol Evol.* 2018;8(5):2407-2417.

doi: 10.1002/ece3.3861

13.Vicki Buchsbaum. Growth and Behavior of *Trichoplax adhaerens*: First Record of the Phylum Placozoa in Hawaii. *Pacific Science.* 1989;43:2.

doi: 10.1093/icb/icm015

14.Jorgensen EM. Animal evolution: looking for the first nervous system. *Curr Biol.* 2014; 24(14):R655-R658.

doi: 10.1016/j.cub.2014.06.036

15.Myllyharju J. Prolyl 4-hydroxylases, master regulators of the hypoxia response. *Acta Physiol (Oxf).* 2013;208(2):148-165.

doi: 10.1111/apha.12096

16.Pei J, Grishin NV. C2H2 zinc finger proteins of the SP/KLF, Wilms tumor, EGR, Hucklebein, and Klumpfuss families in metazoans and beyond. *Gene.* 2015;573(1):91-99.

doi: 10.1016/j.gene.2015.07.031

17.Jakob W, Sagasser S, Dellaporta S, Holland P, Kuhn K, Schierwater B. The Trox-2 Hox/ParaHox gene of *Trichoplax* (Placozoa) marks an epithelial boundary. *Dev Genes Evol.* 2004;214(4):170-175.

doi: 10.1007/s00427-004-0390-8

18.Zuccolotto-Arellano J, Cuervo-González R. Binary fission in *Trichoplax* is orthogonal to the subsequent division plane. *Mech Dev.* 2020;162:103608.

doi: 10.1016/j.mod.2020.103608