



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
INSTITUTO DE QUÍMICA

**“Microidentificación taxonómica y caracterización bioquímica de dos
proteínas presentes en la matriz intramineral de las espinas del erizo de
mar *Astropyga pulvinata* (Lamarck, 1816) (Echinodermata,
Diadematidae)”**

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
PABLO ARTURO JUÁREZ ESPINOZA

TUTORES PRINCIPALES
DR. ROBERTO ALEJANDRO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM.
DR. FRANCISCO ALONSO SOLÍS MARÍN
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DR. ESTUARDO LÓPEZ VERA
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM.
DR. SERGIO RODRÍGUEZ MORALES
UNIDAD DE QUÍMICA EN SISAL, YUCATÁN.
DR. ALFREDO LAGUARDA FIGUERAS
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM.
DRA. NURIA SÁNCHEZ PUIG
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM.

MÉXICO, D. F.

JULIO, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**“No decaigas
que vivir es aprender
y no hay nada que temer
si crees en ti”.**

Il Divo “Héroe”

DEDICATORIA

“A mi madre; sin importar lo errado y criticado de mis acciones, tú siempre las has respetado y apoyado, no tengo palabras para agradecerte solo me permito dedicarte otro logro más en mi superación académica. A mi novia KARLA MGlez, ya que tu me has ayudado a salir adelante en la última fase de este proceso; siempre apoyándome y no permitiendo que desistiera pese a lo pesado y difícil de la burocracia en la universidad.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al **CONACYT** por brindarme la beca **392658/255627** para la realización de este proyecto; al **Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología** por aceptarme como alumno de maestría con la matrícula **511023590**.

A mis directores de tesis el Dr. Roberto Alejandro Arreguín Espinosa de los Monteros del Instituto de Química y el Dr. Francisco Alonso Solís Marín del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología por resguardarme bajo su guía y tutela.

A mis profesores de Oceanografía Física el Dr. David León y la Dra. Adela Monreal por corregir los conceptos errados de esta rama durante mi carrera de licenciatura.

A la **M. en C. Berenit** del Instituto de Biología por el procesamiento de las muestras para las sesiones de Microscopía Electrónica de Barrido y de esa manera realizar la parte taxonómica de este trabajo. A la **M. en C. Alicia Duran** por proporcionarme la bibliografía para la discusión de parte de los resultados en la presente investigación.

A mis compañeros de ambos laboratorios: Alexa, Andrea, Elba, Julio, Pedro, Armando, Mauricio, Carito, Magy, Caro, Tania, Viri y Nancy del Laboratorio de Sistemática y Ecología de Equinodermos del ICMYL por los platicas y viajes durante la realización de este posgrado; a mis otros compañeros Sergio, Ary, Miguel, Eduardo, Juan Pablo, Edson, Citlali, Cinthya, Fernando López y Lazcano del Laboratorio de Bioquímica 2. Reconociendo que gracias al Dr. Juan Pablo por ayudarme con la columna cromatográfica para la purificación de las proteínas y al candidato de doctorado Edson Robles por auxiliarme en los ensayos de actividad biomineralizante.

RESUMEN

Astropyga pulvinata es un diadematido que posee cinco pares series de puntos iridiscentes presentes en los interambulacros, a partir de observación 20 organismos *in vivo* a través de un estereoscopio y el análisis con un microscopio electrónico de barrido se identificaron los pedicelarios, las espículas y rosetas calcáreas de los pies ambulacrales. Los pedicelarios presentes en *A. pulvinata* son trivalvados y de tres tipos: claviformes (oficéfalos) presentes en ambulacro; tridentes distribuidos en el peristoma; y trifoliados presentes en toda la testa excepto en los interambulacros. Los pedicelarios claviformes son los únicos que no están unidos por un pedúnculo calcáreo de tipo diadematoide. Se obtuvieron diez espículas de diversos tejidos blandos: una en el intestino; tres de la membrana anal; y seis del peristoma, dos de las cuales no han sido descritas hasta el momento. Una de estas nuevas espículas posee forma de bastos y otra de media luna.

De las observaciones *in vivo* se encontraron puntos iridiscentes más pequeños presentes en el ambitus que se constituyen de alrededor de ocho células, también se encuentra una relación entre el diámetro del peristoma y la altura de la testa.

Los 20 organismos vivos se disectaron en tres estructuras calcáreas (testa, espinas y Linterna de Aristóteles), la matriz intramineral de las espinas se obtuvo descalcificando las estructuras con una solución de ácido acético al 50%, después se dializó, liofilizó y se obtuvieron 483 µg de peso seco a partir de 6280 mg de espina. Posteriormente el extracto crudo se separó en tres fracciones por medio de ultrafiltración: E30 que presenta un concentración de proteínas de 29.56 µg/mg y un glicosilación del 18.2%, E10 con 14.35 µg/mg de proteína y 24.7% de glicosilación y E01 con una concentración de 0.84 µg/mg de proteína y 53.2 % de glicosilación. La fracción E10 se separó en siete fracciones por una columna de G50, de las fracciones obtenidas la fracción cuatro (E10F4) se analizó a por masas y se obtuvieron dos proteínas: *Astropyga I* presenta un peso de 17.31 kDa, un pI de 6.0 y posee una similitud con las alfa Anhidrasas carbónicas; y *Astropyga II* es una glicoproteína con un peso de 23.47 kDa y un pI de 5.6. Ambas proteínas se asemejan mucho a la P16 reoportada en *S. purpuratus*.

Palabras claves: Pedicelarios; espículas; claviformes; trifoliados; tridentados; puntos iridiscentes; peristoma, espinas, proteínas.

ABSTRAC

Astropyga pulvinata is a sea urchin of the family Diadematidae that have five series of blue iridescent spots on interambulacra zones. The taxonomical microcharacterization of this animal is based on Mortensen's drawings of its pedicellaries and spicules. To have a detailed picture of the aforementioned structures rather than a hand draw, in the present study we acquired the corresponding electronic microscope images. Isolation of the different calcareous structures identified three types of pedicellaries: ophicephalous (claviform) present on the ambulacra, tridentates present on peristome and triphyllous present all over the test except on the interambulacral areas. Ophicephalus pedicellaries are not bounded on the calcareous stalk. Additionally, we obtained ossicles from different soft tissues such as the intestinal epithelium, the anal membrane and the peristoma area. Pictures identified two new diagnostic characters; one has a bat shape while the other has a waning crescent shape. Observations *in vivo* showed that blue iridescent spots on the interambulacra are a group of 35 cells bound together. In addition, we also observed smaller blue spots on the ambitus formed by groups of eight cells. There is a direct relationship between the height of the test and the peristoma diameter.

In the second part of this work, we obtained the intramineral matrix from the test, teeth and spine of 20 organisms. The intramineral matrix was extracted by desmineralization of the structures with a solution of acetic acid at 50% (w/v), the extract was dialyzed with water and lyophilized. The crude extract contained 483 µg of dry weight from 6280 mg of spine. This crude extract was separated into three fractions by ultrafiltration: molecules with a molecular weight larger than 30 kDa (E30) that had a concentration of 29.56 µg/mg of proteins and 18.2% of glycosylation, molecules with a molecular weight between 10-30 kDa (E10) with 14.35 µg/mg and 24.7% glycosylation and molecules with a molecular weight smaller than 10 kDa (E01) with a protein concentration of 0.84 µg/mg and 53.2% glycosylation. Fraction E10 was further separated into seven subfractions by size exclusion chromatography (Sephadex G50). We isolated two proteins from one of these subfractions: *Astropyga I* has a molecular weight of 17.31 kDa, pI of 6.0 and shows 38% identity with carbonic α -anhydrase of *Helocidaris erythrogramma*; and *Astropyga II* a glycoprotein with a molecular weight of 23.47 kDa and a pI of 5.6. A distal analysis of both proteins' primary sequence shows they are closely related to P16 of *Strongylocentrotus purpuratus*.

Key words: Pedicellaries, spicule, claviforms, triphyllioids, tridents; iridescent spots, peristoma, spine, proteins

RESUMO

Astropyga pulvinata é um ouriço do mar da família Diadematidae que apresenta cinco pares de pontos iridiscentes nas zonas interambulacrais. Através da observação de 20 animais *in vivo* com auxílio de um esteriomicroscópio e de análise de microscopia eletrônica de varredura foram indentificadas as pedicelárias, espículas e rosetas calcáreas de seus pés ambulacrais. As pedicelárias presentes em *A. pulvinata* são trivalvadas e classificadas em três tipos: claviformes (oficéfalous) presentes no ambulacro, tridentadas distribuídas no peristoma e trifoliadas presentes em toda a carapaça, exceto nos ambuláculos. As pedicelárias claviformes são as únicas que não estão unidas a um pedúnculo calcário do tipo diadematoide. Se obtiveram dez espículas provenientes de diferentes tecidos moles: sendo uma do intestino, três da membrana anal e seis do peristoma. Duas destas espículas presentes no peristoma são novos registro para a espécie e possuem forma de meia lua e de bastão. Das observações *in vivo* foram encontrados pequenos pontos iridiscentes no âmbito, os quais se constituem em um conjunto de aproximadamente oito células. Também foi encontrada uma relação entre o diâmetro do peristoma e a altura da carapaça. Os 20 espécimes estudados foram dissecados e separados em três estruturas calcárias (carapaça, espinhos e Lanterna de Arsitóteles). A matriz intramineral dos espinhos foi obtida através da descalcificação dos mesmo com uma solução de ácido acético a 50%. Posteriormente se dialisou, liofilizou e se obteve 483 µg de peso seco a partir de 6280 mg de espinhos. A seguir o extrato foi dividido por ultrafiltração em três frações: E30 com uma concentração de 29,56 µg/mg de proteína e 18,2% de glicosilação, E10 com 14,35 µg/mg de proteína e 24,7% de glicosilação e E01 com 0,84 µg/mg e 53,2%, respectivamente. A fração E10 se separou em sete subfrações por meio de uma coluna de cromatografia G50. A subfração quatro (E10F4) apresentou duas proteínas: *Astropyga I* que têm o peso de 17,31 kDa, um pI de 6,0 e possui uma porcentagem da similaridade com alpha-anidrase carbonica e *Astropyga II* que apresenta um peso de 23,47 kDa e pI de 5,6. As duas proteínas são muito parecidas a P16 de *Strongylocentrotus purpuratus*.

Palavras-chave: Pedicelárias; espículas; claviformes; trifoliadas; tridentadas; pontos iridiscentes; peristoma, espinhos, proteínas.

ÍNDICE

RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
RESUMO.....	vi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	4
1.- Biomoléculas identificadas en el endoesqueleto larvario de los erizos de mar.....	4
2.- Estudios de biomineralización en organismos adultos de equinodermos.....	6
3.- Composición mineral de las estructuras calcáreas en equinoideos adultos.....	8
4.- Ensayos de síntesis de carbonato de calcio.....	9
5.- Estudios taxonómicos realizados con <i>A. pulvinata</i>	9
III. JUSTIFICACIÓN.....	10
IV. OBJETIVOS.....	11
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	11
1.- Obtención y cuidado de organismos vivos.....	11
1.1.- Obtención de organismos.....	11
1.2.- Mantenimiento de los organismos.....	11
2.- Identificación taxonómica a partir de microestructuras.....	12
2.1.- Obtención de espículas y pedicelarios de erizo de <i>A. pulvinata</i>	12
2.2.- Tratamiento de espículas y pedicelarios para el microscopio electrónico de barrido.....	12
2.3.- Análisis de organismo en vivo.....	12
3.- Análisis de la matriz orgánica de las espinas.....	13
3.1. - Obtención de la matriz de la espina.....	13
3.2. – Fraccionamiento y purificación del extracto de la espina.....	13
3.3. - Cuantificación de proteínas por el método de análisis del ácido bicinconíco (BCA).....	14
3.4.- Determinación de porcentaje de glicosilación de las fracciones.....	14
3.5.- Determinación de pesos moleculares y secuencias de las proteínas.....	15
3.6.- Análisis de las secuencias obtenidas.....	15
3.7.- Ensayo de actividad de formación de cristales de carbonato de calcio.....	15
VI.- RESULTADOS.....	17
A.- Descripción taxonómica.....	17
B.- Ficha taxonómica.....	24

C.- Caracterización bioquímica de las proteínas de la matriz orgánica de <i>A. pulvinata</i>	27
VII. DISCUSIÓN	33
A. Descripción taxonómica	33
B. Caracterización bioquímica de las proteínas de la matriz orgánica	35
VIII. CONCLUSIONES	36
IX. PRESPECTIVAS	37
X. BIBLIOGRAFÍA	37
ANEXOS	A-I

ÍNDICE DE FIGURAS



Figura 1. Diagrama de las estructuras anexas de la testa de un erizo de mar (tomado de Brusca y Brusca, 2006).....	1
Figura 2. <i>Astropyga pulvinata</i> . Fotografía de Erika Porras en 2012.....	2
Figura 3. Porcentaje de publicaciones sobre biomineralización en base a las estructuras calcáreas reportadas en equinoideos (Scopus y SciFinder, 2013).....	3
Figura 4. a) Tipos de pedicelarios. b) Pedicelario completo y c) “Punto azul” de <i>Astropyga pulvinata</i> (Tomado de Mortensen, 1940).....	10
Figura 5. Espículas de <i>A. pulvinata</i> : a) esófago, b) gonoducto y c) misceláneas (Tomado de Mortensen, 1940).....	10
Figura 6. Diagrama de purificación del extracto de espinas.....	14
Figura 7. Sistema de formación de cristales de calcio, en donde (g)= gas y (l)= líquido.....	16
Figura 8. Corroboración taxonómica del ejemplar 4.8.08 de la Colección deICMyL-UNAM a partir del mamelón (superior) y una espícula (inferior) de <i>A. pulvinata</i>	17
Figura 9. <i>Astropyga pulvinata</i> . A= detalle de la zona interambulacral, B= peristoma, C= pedicelario con tejido y pedúnculo y D= detalle de los puntos iridiscentes del ambulacro; donde — = 0.5 mm.....	20
Figura 10. Pedicelarios trivalvados y pedúnculo calcáreo (<i>Pc</i>) presentes en <i>A. pulvinata</i>	21
Figura 11. Pedicelarios de <i>Astropyga pulvinata</i> ; <i>Td</i> = tridentes, <i>Cv</i> = claviformes y <i>Tf</i> = trifoliados.....	21
Figura 12. Espículas del peristoma; <i>Ml</i> = media luna y <i>B</i> = basto (escala — = 200µm).....	22
Figura 13. Espícula de la pared intestinal.....	22
Figura 14. Espículas de la membrana anal.....	23
Figura 15. A- Rosetas calcáreas presentes en los podios ambulacrales. B- Acercamiento del podio ambulacral; donde — = 0.25 mm.....	23
Figura 16. Fotografías de los tratamientos empleados para la obtención de microestructuras;  = daño en la estructura y  = suciedad en la estructura.....	24

Figura 17. Gel de Acrilamida al 4% teñido con Azul de Alciano, <i>PM</i> = marcador de pesos moleculares y <i>E30</i> = fracción E30.....	27
Figura 18. Fraccionamiento de E10 a partir de la columna G50.....	28
Figura 19. Árbol filogenético del programa Jalview de las proteínas biomineralizantes de los erizos de mar reportadas y las aisladas de <i>A. pulvinata</i>	29
Figura 20. Ensayos de cristalización a temperatura ambiente; donde <i>AC</i> = Anhidrasa carbónica y <i>-</i> = 0.25 mm.....	30
Figura 21. Ensayos de cristalización a T= 4 °C; donde <i>AC</i> = Anhidrasa carbónica y <i>-</i> = 0.25 mm.....	30
Figura 22. Determinación de los cristales formados por la <i>AC</i> a través del MEB; <i>TA</i> = Temperatura ambiente.....	31
Figura 23. Comparación del número de cristales de los ensayos A= sistema de CO ₂ ; se observa solo un cristal y B= sistema sin CO ₂ ; se observa un mayor número de cristales; donde <i>-</i> = 0.05 mm.....	32
Figura 24. A- Tipos de pedicelarios y B- Podio ambulacral (Tomado de D'yakonov, 1969).....	34
Figura 25. Reacción de sistema de CO ₂ ; aq = acuoso, g = gas, s = sólido, P = proteína y CCA = carbonato de calcio amorfo (Tomado de Gower, 2008).....	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla de abreviaturas	x
Tabla I. Proteínas aisladas a partir de embriones de equinoideos.....	6
Tabla II. Proteínas identificadas en las estructuras calcáreas de equinoideos adultos; donde X = presente y LA= Linterna de Aristóteles.....	8
Tabla III. Volúmenes de soluciones para las pruebas de formación de cristales de CaCO ₃	16
Tabla IV. Medidas de los especímenes de <i>A. pulvinata</i> depositados en la colección del ICML-UNAM.....	18
Tabla V. Información adicional de los ejemplares de <i>A. pulvinata</i> de la colección del ICML-UNAM, ND= no disponible.....	19
Tabla VI. Secuencias y características de las proteínas <i>Astropyga I</i> y <i>Astropyga II</i>	29
Tabla VII. Actividad de formación de cristales de CaCO ₃ de los extractos y fracciones de <i>A. pulvinata</i> ; donde: ✓ = positivo, ✗ = negativo y - = no probado.....	31
Tabla VIII. Tabla de rendimiento de purificación del extracto de las espinas.....	32

Tabla de abreviaturas

Abreviatura	Significado
ACC	Amorphous Calcium Carbonate
LA	Linterna de Aristóteles
MEB	Microscopio Electrónico de Barrido
MSP	Mesenchyme Spicule Protein
<i>Pl</i>	<i>Paracentrotus lividus</i>
PM	Protein Matrix
PMC	Primary Mesenchime Cell
SM	Spicule Matrix
Sp	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>
T	Temperatura
TA	Temperatura Ambiente

I. INTRODUCCIÓN

Los equinodermos son organismos exclusivamente marinos que poseen un sistema vascular acuífero y un endoesqueleto calcáreo; pertenecen al phylum Echinodermata, el cual se divide en cinco clases: a) Crinoidea, lirios de mar; b) Asteroidea, estrellas de mar; c) Ophiuroidea, estrellas quebradizas; d) Echinoidea, erizos de mar; y e) Holothuroidea, pepinos de mar.

El endoesqueleto de éstos organismos está formado por pequeños osículos calcáreos llamados espículas, las cuales pueden estar presentes en los tejidos blandos, como en los holoturoideos; pueden estar articulados entre sí, como en los asteroideos y ofiuroideos; o bien, fusionados para formar un caparazón denominado “testa” como el caso de los equinoideos (Ruppert y Barnes, 1996).

La testa está compuesta principalmente por 70% de carbonato de calcio (CaCO_3) en forma de calcita y 30% de carbonato de magnesio (MgCO_3) (Wang *et al.*, 2009). El endoesqueleto de los erizos de mar no solo se encarga de proteger los órganos vitales, sino también del desarrollo de otras estructuras calcáreas anexas como las espinas, las cuales pueden ser largas y punzantes para defenderse de algunos depredadores como peces (balistidos y lábridos), moluscos (cefalópodos) y crustáceos. Las espinas no solo poseen la función de protección, también son empleadas para la locomoción (Booolotian, 1966; Ruppert y Barnes, 1996). Los organismos adultos presentan otras estructuras calcáreas accesorias en la superficie del cuerpo llamadas pedicelarios, estos están presentes en las estrellas y erizos de mar y sus funciones son la protección y limpieza del organismo (Fig. 1) (Killian y Wilt, 2008).

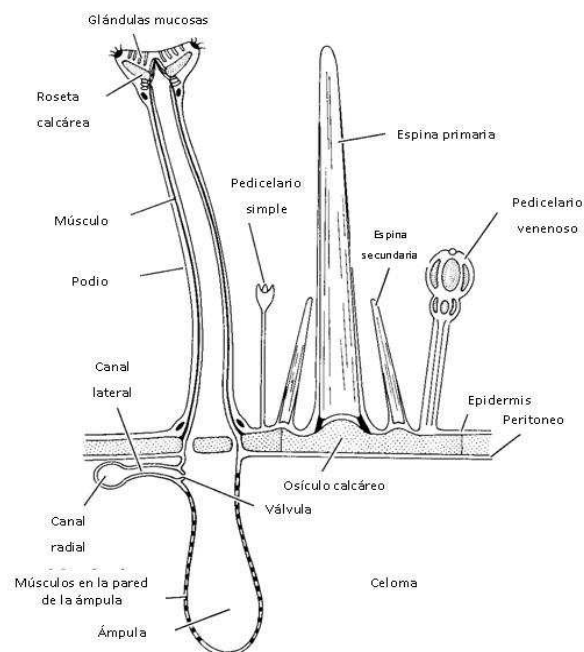


Figura 1. Diagrama de las estructuras anexas de la testa de un erizo de mar (tomado de Brusca y Brusca, 2006).

Astropyga pulvinata, es un equinoideo regular (forma globosa) que se caracteriza por presentar dos pares de series de puntos de color azul iridiscente a lo largo de cada una de las zonas interambulacrales. Es un miembro de la familia Diadematidae, por lo que presenta espinas largas, punzantes y armadas con espineletas. Las espinas pueden ser bandeadas con colores turquesa, amarillo y blanco o bien lisas de color blanco ó púrpura (Mortensen, 1940; Caso, 1979) (Fig. 2). Esta especie habita sobre fondos rocosos, arenosos y/o sedimentos finos, o en arrecifes coralinos. Se distribuye desde San Miguel del Cabo, Baja California, México hasta Isla Lobos, Perú a profundidades que van desde 0 a los 95 m (Caso, 1990; Red Iberoamérica de Equinodermos, 2011).

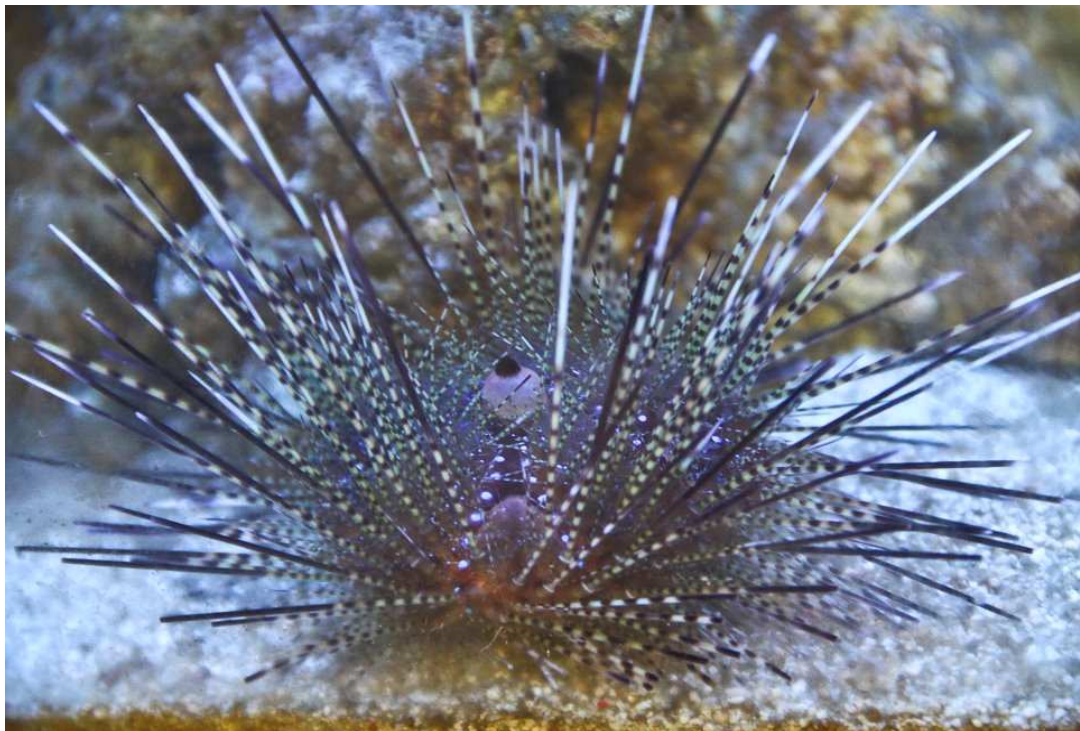


Figura 2. *Astropyga pulvinata*. Fotografía de Erika Porras en 2012.

Un proceso interesante en *A. pulvinata* y en todos los equinodermos, es la formación de sus estructuras calcáreas a través de la biomineralización, la cual es el proceso a través del cual los seres vivos sintetizan estructuras inorgánicas (huesos, dientes, caparzones, etc.) a partir de la interacción entre biomacromoléculas y fases minerales. Las principales fases minerales están constituidas de: 1) carbonatos, 2) fosfatos, 3) sulfatos, 4) silicatos, 5) óxidos y 6) sulfuros (Mann, 2001). La mayoría de las biomacromoléculas que interactúan con estas fases minerales son proteínas y son poco conocidas. Los organismos marinos como equinodermos, moluscos, esponjas, anélidos, entre otros, han desarrollado estructuras inorgánicas como caparzones, conchas, espículas y espinas que constituyen su endo y exoesqueleto a partir de carbonato de calcio y silicatos (Wilt *et al.*, 2003).

La mayoría de los trabajos de biomineralización realizados en erizos de mar han sido enfocados a la formación del endoesqueleto larvario (espícula larvaria) durante los estadios embrionario y larval de

algunas especies como *Arbacia punctulada*, *Paracentrotus lividus*, *Strongylocentrotus purpuratus*, *Lytechinus variegatus*, *Lytechinus pictus*, *Tripneustes gratilla*, *Anthocidaris crassispina* y *Hemicentrotus pulcherrimus* (McClay y Matranga, 1986; Cervello *et al.*, 1992; Yamasu y Wilt, 1999; Kitajima y Urakami, 2000; Ettensohn *et al.*, 2007; Noll *et al.*, 2007; Wilt *et al.*, 2008). En organismos adultos, los trabajos se han enfocado en tres principales estructuras que son: la testa, las espinas y los dientes (Linterna de Aristóteles, LA) en las especies *P. lividus* y *S. purpuratus* (Ameye *et al.*, 2001; Mann *et al.*, 2010) (Fig. 3).

En vista de que se desconocen cuales son las proteínas presentes en la matriz orgánica de las espinas de *A. pulvinata*, en éste proyecto se aislaron, purificaron y caracterizaron las proteínas que participan en la formación de cristales carbonato de calcio. Además, se llevó a cabo la identificación taxonómica del organismo a partir de microestructuras como pedicelarios y espículas presentes en esta especie, ya que la mayoría de los equinoideos son identificados con base a sus características más evidentes como forma y color de la testa, tamaño y forma de las espinas, entre otros.

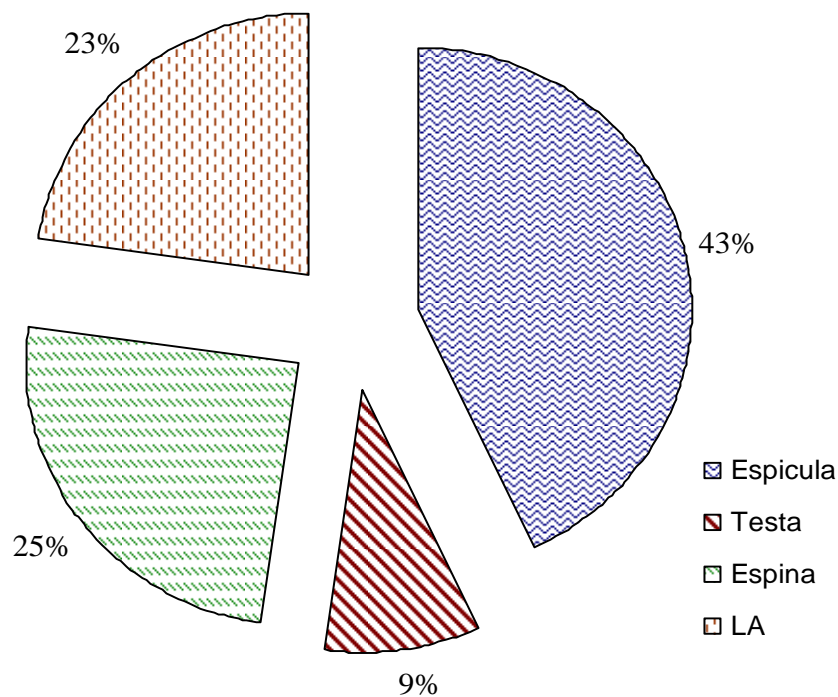


Figura 3. Porcentaje de publicaciones sobre biomineralización en base a las estructuras calcáreas reportadas en equinoideos (Scopus y SciFinder, 2013).

II. ANTECEDENTES

1.- Biomoléculas identificadas en el endoesqueleto larvario de los erizos de mar

Uno de los primeros trabajos referente a la interacción de los iones de calcio con proteínas de los embriones de equinoideos es el de McClay y Matranga (1986), quienes demostraron que la depositación de calcio en los embriones de *Arbacia punctulata* y *Lytechinus variegatus* se debe a la Hialina presente en los blastómeros. En años posteriores, este equipo de investigadores determinó que el Toposoma, una glicoproteína denominada 22S, es responsable del transporte del calcio en los embriones de *Paracentrotus lividus* (Cervello *et al.*, 1992). En 2007, Noll y colaboradores determinaron que el toposoma también se encarga de la transferencia de hierro en los embriones de las especies *Tripnesutes gratilla* y *Paracentrotus lividus* (Tabla I).

Otras proteínas esenciales en el crecimiento longitudinal del endoesqueleto de los embriones de *P. lividus* (*Pl*) son la *Pl*-nectina y la *Pl*-*univin*, la primera se localiza en la superficie de las células del mesodermo; y la segunda es una proteína que se expresa cuando hay errores con la *Pl*-SM30 [*P. lividus*-Spicule Matrix 30kDa (*Pl*-SM30)] o *Pl*-nectina; ya que al inhibir la actividad de la *Pl*-SM30 el endoesqueleto larvario presenta malformaciones y el embrión no se desarrolla; a partir de este estímulo la *Pl*-*univin* corrige estas malformaciones y permite continuar con el proceso de formación de la espícula larvaria (espiculogénesis) (Zito *et al.*, 2003). Wessel y colaboradores (1991) caracterizaron fibras de colágeno presentes durante la espiculogénesis en los embriones de *S. purpuratus*. Las proteínas presentes tienen un tamaño de 210 kDa y se localizan en el blastocele de las células del mesenquima primario [primary mesenchyme cells (PMC)]. Se cree que estas macromoléculas influyen en la diferenciación celular del embrión durante el proceso de biomineralización (Tabla I).

Otras proteínas identificadas mediante el uso de anticuerpos detectaron a SM50 (spicule matrix 50 kDa) y otra proteína de 29 kDa (SM29), las cuales son responsables del crecimiento radial y longitudinal de la espícula larvaria respectivamente. Además con ayuda de la inmunofluorescencia se determinó que la SM30 se localiza sobre la superficie del endoesqueleto y la SM50 y SM29 se expresan durante la gastrulación en los embriones de *H. pulcherrimus* (Kitjima y Urakami, 2000). En ese mismo año, Wilt (2002) elaboró un resumen sobre el proceso de biomineralización del endoesqueleto larvario de los erizos de mar, en el cual se menciona que las PMC son las responsables de la formación de carbonato de calcio amorfo [amorphous calcium carbonates (ACC)] y la calcita en la espícula larvaria; y de algunas proteínas como la SM50, SM30 y PM27 que están presentes en los tejidos de los adultos.

La Alx1 presente en embriones de *S. purpuratus* y *L. variegatus*, la cual influye en el fenotipo permite en el desarrollo del embrión; ya que al suprimir su expresión, los embriones no desarrollan el endoesqueleto. Alx1 se relaciona con la subfamilia Cart1/Alx3/Alx4 de los vertebrados, que es la encargada de la formación del esqueleto, cráneo y cuello derivados de la pleura neural (Ettensohn *et al.*, 2003). La P16 se encarga de la elongación de espícula larvaria; sin embargo, no es una proteína

crítica para la formación de ésta. Durante la inhibición de la elongación de la espícula larvaria esta proteína formó una espícula trirradiada (Cheers y Etensohn, 2005). Wilt y colaboradores (2008a) determinaron que las proteínas LSM34 y SpSM50 en los embriones de *L. variegatus* y *S. purpuratus* son esenciales en el depósito inicial de calcio en el endoesqueleto larvario, así como en su elongación. Ambas proteínas presentan la misma función, pero diferente secuencia, es decir, son ortólogas. Años posteriores, Wilt y colaboradores (2010b) con el uso de marcadores isotópicos (^{15}Ca y ^{35}S -metionina) determinaron que la SpSM30B se sintetiza en los PMC y se encarga de la secreción interna de calcio en las espículas de las larvas de *S. purpuratus*.

Killian y colaboradores (2010) determinaron la presencia de proteínas pertenecientes a las familias SpSM30 en diferentes tejidos de adultos y estadios embrionarios de *S. purpuratus*; ésta familia consta de seis proteínas designadas como SpSM30A-F, durante el desarrollo embrionario: SpSM30A se sobre expresa durante el desarrollo tardío, SpSM30B, C y E durante la gastrulación y SpSM30F antes de la gastrulación. El patrón de expresión de estas proteínas en los tejidos de adultos corresponden: SpSM30B-D en las espinas, SpSM30E en los pies ambulacrales, SpSM30D y E en la linterna de Aristóteles y SpSM30E en la testa. La clasificación de las proteínas identificadas en el endoesqueleto de las larvas de erizo de mar fue realizada por Mann y colaboradores (2010b), quienes identificaron por medio de espectrometría de masas en *S. purpuratus*, se detectaron 231 proteínas, siendo las más abundantes SM50, SM30 y MSP130 [mesenchyme-specific cell surface glycoprotein 130 kDa (MSP-130)]. Las proteínas se clasificaron en seis familias: a) *Proteínas con dominio C-lectina simple* donde se encuentra la PM27; b) *SM30*, son proteínas ricas en Prolina; c) *SM50*, es un grupo heterogéneo con un dominio C-lectina; d) *Proteína de la matriz con C-lectina*, es otro grupo no tan abundante que consta de tres cisternas conservadas; e) *Métalo proteínas y proteasas*, en este grupo encontramos a las Anhidrasas carbónicas (AC), MSP-130, Fosfodenteina y proteínas ricas en glicina; y f) *Misceláneas*.

Uno de los estudios más recientes sobre biomineralización en embriones es el de Pinsino y colaboradores (2011), en el cual determinaron que el manganeso interviene con la fijación del calcio y provoca que los embriones de *P. lividus* no generen esqueleto.

Tabla I. Proteínas aisladas a partir de embriones de equinoideos.

Proteína	Función	Autor	Especies
Hialina	Deposición de calcio	McClay y Matranga, 1986	<i>Arbacia punctulada</i> y <i>Lytechinus variegatus</i>
Fibras de Colágeno	Determinantes en la formación de la espícula y diferenciación celular	Wessel <i>et al.</i> , 1991	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>
Toposoma	Transporte del calcio y transferencia de hierro	Cervello <i>et al.</i> , 1992 Noll <i>et al.</i> , 2007	<i>Paracentrotus lividus</i>
SM30	Crecimiento longitudinal del endo esqueleto larvario	Kitajima y Urakami, 2000	<i>Hemicentrotus pulcherimus</i>
SM50	Crecimiento radial del endo esqueleto larvario	Kitajima y Urakami, 2000	<i>Hemicentrotus pulcherimus</i>
Ax11	Crecimiento radial del endo esqueleto larvario	Ettensohn <i>et al.</i> , 2003	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> y <i>Paracentrotus lividus</i>
P16	Crecimiento radial del endo esqueleto larvario	Ettensohn <i>et al.</i> , 2003	<i>Lytechinus variegatus</i>
Pl-nectina	Crecimiento longitudinal del endo esqueleto larvario	Zito <i>et al.</i> , 2003	<i>Paracentrotus lividus</i>
Pl-univina	Corrección de errores de Pl-netina	Zito <i>et al.</i> , 2003	<i>Paracentrotus lividus</i>
LSM34	Misma función que la SM50	Wilt <i>et al.</i> , 2008	<i>Lytechinus variegatus</i>

2.- Estudios de biomineralización en organismos adultos de equinodermos

Los equinoideos adultos presentan tres principales estructuras calcáreas (testa, linterna de Aristóteles y espinas). Sin embargo, se han identificado la presencia de proteínas involucradas en la biomineralización en estructuras no calcificadas. Uno de los primeros trabajos es el de Richardson y colaboradores (1989), quienes determinaron la presencia de la SM50 en diferentes tejidos como los pies ambulacrales de *S. purpuratus*. En años posteriores, Amaye y colaboradores (2001) localizaron glicoproteínas en las espinas de *P. lividus* a través de reacciones inmunes con lectinas. En este estudio se determinó que las N-glicoproteínas se localizan en la región interna de la espina y son ricas en manosa; las O-glicoproteínas se localizan en la región superficial de la espina y poseen un disacárido de 1-3 β Galactosa-1-3 α NacetilGalactosa y el ácido siálico se localiza en el septum de las espinas.

Posteriormente, Illies y colaboradores (2002) mencionan que las proteínas SM50, SM37 y PM27 son una subfamilia, en donde la SM50 posee un punto isoeléctrico alcalino, es rica en prolina y no está glicosilada. Otras proteínas que no habían sido mencionadas son la SM29 y la SM32 que también son miembros de la subfamilia SM, ambas están glicosiladas en el aminoácido N-terminal de la asparagina. Después, Robach y colaboradores (2006), por medio de espectrometría de masas, determinaron que las proteínas ricas en ácido aspártico son las responsables de la formación de calcita rica en magnesio en los dientes de *L. variegatus*. Posteriormente, Mann y colaboradores (2008a) determinaron 110 proteínas presentes en la testa y las espinas de *S. purpuratus*, en donde la SM50 fue el componente más abundante en ambas estructuras. También se identificaron algunas metaloproteasas y miembros de la familia MSP-130, además de Anhidrasa carbónica, colágeno, equinonectina, entre otras. En ese mismo año, Mann y colaboradores (2008b) determinaron que la linterna de Aristóteles de *S. purpuratus* presenta alrededor de 138 proteínas de las cuales: 56 están presentes en la testa y espina, la MSP-130 y una Anhidrasa carbónica fueron los componentes más abundantes. En años posteriores, este equipo de investigación determinó la presencia de fosfoproteínas, 21 en la testa y 15 en la linterna de Aristóteles en *S. purpuratus*. Estas proteínas son ortólogas a las que presenta el hombre en los huesos y dientes, ya que algunas de estas presentan una similitud del 63%. La proteína más abundante en este estudio fue la Fosfodentina (Mann *et al.*, 2010a) (Tabla II).

Otro tipo de estudio empleando las secuencias de proteínas reportadas fue el de Livingston y colaboradores (2006), quienes por medio de un alineamiento de las proteínas de *S. purpuratus* y otros deuterostomados determinaron que la mayoría de las proteínas de erizos de mar son específicas y al parecer no tienen una aparente homología con los invertebrados deuterostomados y vertebrados. Estudios muy similares fueron realizados por Killian y Wilt (2008) a través de una recopilación de los aspectos moleculares del endoesqueleto de equinoideos, basándose principalmente en las proteínas aisladas de las espículas larvares; mencionan que el proceso de biomineralización en los adultos y la evolución de estas proteínas en relación con cordados y vertebrados puede esclarecer su evolución.

Además de equinoideos también se han empleado equinodermos de otras clases, un ejemplo es el trabajo de Gayathri y colaboradores (2007); quienes extrajeron la matriz orgánica de las placas calcáreas de la estrella de mar *Pisaster giganteus*, esta matriz está constituida por polipéptidos ricos en glicina que favorecen la formación de ACC en las pruebas de cristalización de carbonatos.

Tabla II. Proteínas identificadas en las estructuras calcáreas de equinoideos adultos; donde X = presente y LA= Linterna de Aristóteles.

Proteína	LA	Tejidos			Autor	Especies
		Testa	Espina	Otros		
SM50		X	X	Pies ambulacrales	Richardson <i>et al.</i> , 1989 Mann <i>et al.</i> , 2008	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>
O-glicoproteínas			X		Amaye <i>et al.</i> , 2001	<i>Paracentrotus lividus</i>
N-glicoproteínas			X		Amaye <i>et al.</i> , 2001	<i>Paracentrotus lividus</i>
Anhidrasa carbónica		X	X		Mann <i>et al.</i> , 2008	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>
MSP-130		X	X		Mann <i>et al.</i> , 2008	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>
Fosfodentina	X		X		Mann <i>et al.</i> , 2010	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>
SM30		X	X		Mann <i>et al.</i> , 2010	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>

3.- Composición mineral de las estructuras calcáreas en equinoideos adultos

Además de los estudios de las biomacromoléculas antes mencionadas, también se han realizado investigaciones sobre la composición de las estructuras minerales de los equinoideos. Uno de los primeros trabajos fue el Donnay y Pawson (1969) quienes por medio de la difracción de rayos X determinaron que la mayoría de las placas de los equinodermos son de calcita rica en magnesio, siendo las únicas excepciones la linterna de Aristóteles y los anillos calcáreos de los holoturoideos.

Posteriormente, Märkel y colaboradores (1989) mediante técnicas histológicas determinaron que en las espinas y linterna de Aristóteles de *Eucidaris tribuloides*, la biomineralización se realiza en la cavidad vacuolar de las células presentes en las matrices orgánicas de ambas estructuras; en donde los iones de Ca^{2+} y el CO_2 son transportados por sustancias externas hacia la superficie de dicha cavidad para que los proteoglicanos y glicoproteínas realicen el proceso de calcificación. Otro estudio también realizado con técnicas histológicas fue el de Amaye y colaboradores (1999) en el cual se identificaron algunas proteínas SM30 y SM50 presentes en las placas de la testa, pedicelarios y el diente de *P. lividus*, por medio de cuatro ensayos: dos de ellos con fijación tradicional con ácido tánico y otro sin dicho ácido, CF1 y CF2 respectivamente; y los últimos tratamientos consistieron en el uso de la crió preservación con ácido gálico y sin él, los cuales se denominaron HPF1 y HPF2, respectivamente. Además, mencionan a diferentes glicoproteínas presentes en los esclerositos y preodontoblastos, las cuales son modificadas en el aparato de Golgi y después son exportadas hacia las células calcáreas por medio de vesículas y estas son eventualmente secretadas en los sitios de calcificación.

Otro tipo de estudios son los mapeos a través del Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) y la identificación de los cristales por difracción de rayos X, fueron realizados por Killian y colaboradores (2009) encontraron que el CaCO_3 presente en la linterna de Aristóteles contiene precursores ACC. Posteriormente, Goetz y colaboradores (2010) mapearon la orientación de los cristales calcáreos presentes en las espinas de erizo de mar *Amblyopneustes pachitus*, observando que las cuñas (región más externa) presentan una misma orientación entre ellas y la región central que es más porosa.

4.- Ensayos de síntesis de carbonato de calcio

La formación de cristales de calcio se debe a varios factores físico-químicos. En el estudio realizado por McGrath y colaboradores (2001) determinó que la forma de los cristales de CaCO_3 depende de los grupos funcionales algunos solventes orgánicos como alcoholes, ácidos carboxílicos y surfactantes; en este ensayo también se probó el extracto crudo de las espinas del erizo de mar *Evechinus chloroticus*.

Otro factor determinante es la temperatura, Faatz y colaboradores (2004) demostraron que las formas ACC y el carbonato de calcio hidratado forman partículas esféricas a una temperatura constante; el tamaño de las partículas es inversamente proporcional a la temperatura.

También el pH es un factor crítico Wang y colaboradores (2009) determinaron la relación de los iones magnesio y calcio de los precipitados de CaCO_3 , mediante el uso de moléculas sintéticas de carácter ácido (ácido cítrico, ácido D-tartárico, ácido aspártico, entre otras) controladas a un $\text{pH} > 9.0$. Al respecto, se determinó que los ácidos aspártico y glutámico son más afines al calcio que al magnesio, ya que forman ACC o calcita.

Además de los factores físico-químicos, las condiciones del experimento también influyen en la formación de los cristales. Chen y colaboradores (2009) mencionan que el CaCO_3 se presenta en forma de calcita, en un sistema de interacción aire-agua, en el que el ácido esteárico ayuda a estabilizar al ACC para la formación de los cristales.

La formación de calcita es un proceso muy complejo, la investigación de Radha y colaboradores (2010) describe el proceso energético de la formación de un complejo hidratado de ACC a calcita, el cual es un mecanismo exotérmico irreversible que va de ACC hidratado a un ACC anhidro y finalmente a calcita. En su estudio se determinó que el segundo intermediario (ACC anhidro) no es necesario en la deshidratación para la formación de calcita. Posteriormente Goodwin y colaboradores (2010) mencionan que el CaCO_3 y las moléculas de agua interactúan en una red combinada de puentes de hidrógeno, en donde los complejos hidratados de ACC son inestables con respecto a los cristales polimórficos de CaCO_3 , debido a que existe una separación nanométrica por la carga.

5.- Estudios taxonómicos realizados con *A. pulvinata*

Los trabajos taxonómicos existentes de *A. pulvinata* son únicamente los de Mortensen (1940) y Caso (1979 y 1991), ambos presentan fotografías de las testas en blanco y negro; y en el caso particular de Mortensen presenta bosquejos hechos a mano de las espículas y pedicelarios de dicha especie (Fig. 4 y 5). El trabajo más reciente es el de Alvarado (2008), el cual consiste en un monitoreo en Costa Rica donde se establece que esta especie es de preferencias diurnas y de aguas frías ($T= 24^{\circ}\text{C}$).

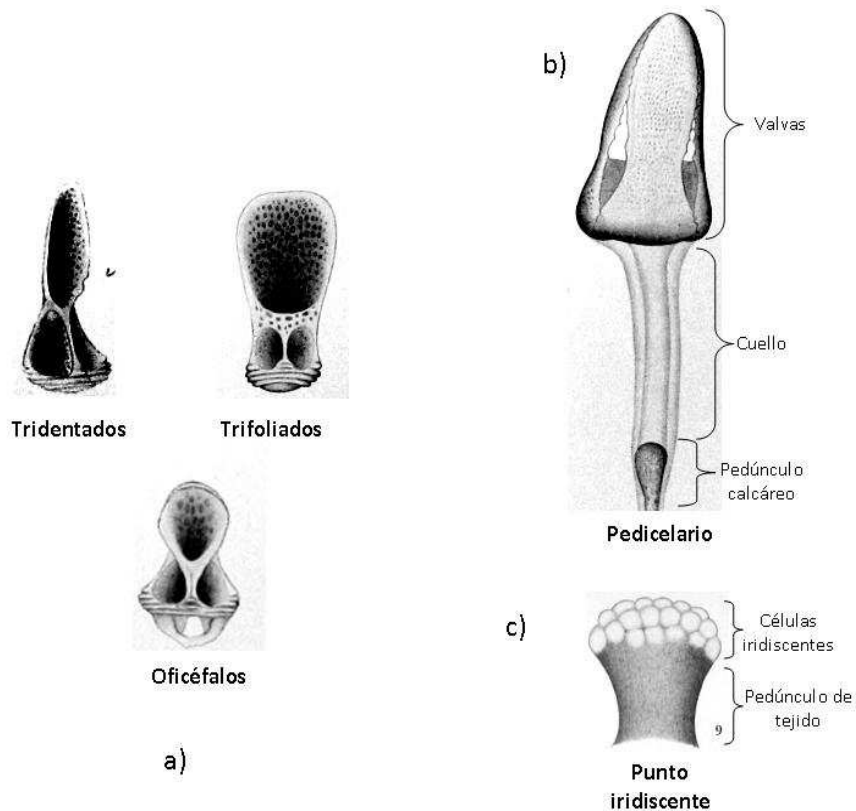


Figura 4. a) Tipos de pedicelarios. b) Pedicelario completo y c) “Punto azul” de *Astropyga pulvinata* (Tomado de Mortensen, 1940).

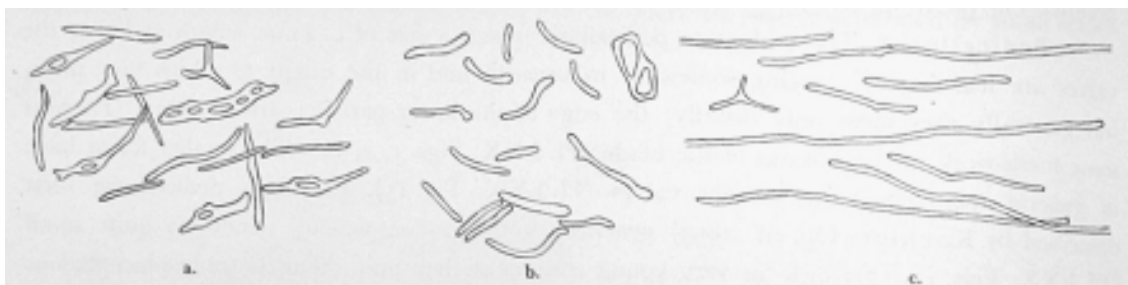


Figura 5. Espículas de *A. pulvinata*: a) esófago, b) gonoducto y c) misceláneas (Tomado de Mortensen, 1940).

III. JUSTIFICACIÓN

En vista de que los trabajos con *A. pulvinata* son escasos y no se tiene ningún registro sobre las macromoléculas que están relacionadas en los procesos de biomineralización de esta especie, es pertinente realizar un análisis bioquímico para conocer el tipo de proteínas presentes en las matrices intraminerales de las estructuras calcáreas de éstos erizos. Así como corroborar la formación de cristales de calcio a partir de las proteínas aisladas de estas matrices. Por lo tanto, es importante extraer y caracterizar las proteínas con actividad biomineralizante que este presente en la matriz orgánica de las espinas de *A. pulvinata*.

Además es necesario actualizar los bosquejos de las espículas y pedicelarios de Mortensen por medio de imágenes obtenidas a través del Microscopio electrónico de barrido para complementar la información taxonómica de ésta especie.

IV. OBJETIVOS

GENERAL

Caracterizar y determinar la actividad biomineralizante de la matriz orgánica de las espinas calcáreas de *A. pulvinata* y realizar una ficha taxonómica con nuevas estructuras que ayuden a clasificar a esta especie.

ESPECÍFICOS

- I. Purificar y caracterizar las biomoléculas presentes en la matriz orgánica de las espinas de *A. pulvinata*.
- II. Corroborar la actividad de síntesis de cristales de carbonato de calcio de los extractos y fracciones de las estructuras calcáreas de *A. pulvinata*.
- III. Obtener e identificar las espículas y pedicelarios presentes en *A. pulvinata* para corroborar su identificación taxonómica.
- IV. Determinar el método más adecuado para la obtención de las microestructuras.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

1.- Obtención y cuidado de organismos vivos

1.1.- Obtención de organismos

En vista que los organismos pertenecientes a una colección no pueden ser destruidos para realizar ningún trabajo químico y muchos de ellos ya fueron fijados con formol o alcohol, es posible que proteínas presentes en ellos se hayan desnaturalizado por estos solventes. Además que *A. pulvinata* es una especie muy difícil de recolectar. Por lo que se decidió por comprar 15 organismos en un acuario de la ciudad para que a partir de estos se obtuvieran las muestras para la obtención de las microestructuras y las matrices orgánicas de las estructuras calcáreas.

1.2.- Mantenimiento de los organismos

Una vez comprados los organismos vivos se acondicionó un acuario marino con las siguientes características: temperatura de 28 °C, salinidad de 25 ups y foto periodo de 8 hrs. Los organismos fueron alimentados con alga roja (Sea Veggies *Porphyra sp.*) y se les adicionó por semana un aditivo con calcio y magnesio con una concentración de 16.6 y 3.6 mg/l respectivamente (Azoo AZ17235).

2.- Identificación taxonómica a partir de microestructuras

2.1.- Obtención de espículas y pedicelarios de erizo de *A. pulvinata*

Los pedicelarios se obtuvieron de diferentes regiones de la testa y las espículas de los tejidos como la membrana bucal (peristoma), órganos internos como intestino, esófago y gónadas. Para la obtención de estas microestructuras se empleó la metodología propuesta Solís-Marín y colaboradores (2009), en la cual los tejidos se colocan en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, se les adiciona hipoclorito de sodio, se deja reposar 10 min. y se centrifuga a 91.67 g durante 10 min.

Para determinar cual era el mejor tratamiento para la remoción de la materia orgánica para obtener las microestructuras se hicieron diluciones de cloro comercial [hipoclorito de sodio (NaClO)] al 6% con agua en la siguiente proporción 1:0, 1:1 y 1:2; también se empleó una solución de peróxido de hidrógeno al 20% (Sigma) sugerida por Coppard y Campbell (2006). Una vez oxidada la materia orgánica, se realizaron una serie de lavados con agua destilada, filtrada y desionizada mediante centrifugación por 10 min a 91.67 g. En cada lavado el sobrenadante se removió con una pipeta Pasteur (este paso se realizó dos veces).

2.2.- Tratamiento de espículas y pedicelarios para el microscopio electrónico de barrido

Una vez obtenidas las espículas y pedicelarios, estos se sometieron a una serie de lavados con diluciones de etanol en el siguiente gradiente: 70, 80, 90 y 100%. En cada lavado el tubo se centrifugó a 91.67 g por 10 min., el sobrenadante se eliminó con ayuda de una pipeta Pasteur. Después del último lavado, las muestras se sometieron a secado por medio de punto crítico (T= 31°C y P= 72.9 bar) en el Laboratorio de Microscopía Electrónica del Instituto de Biología UNAM-CU.

Posteriormente, las muestras fueron colocadas sobre una etiqueta de carbón previamente adherida a un porta-muestras metálico, para posteriormente ser recubiertas con una capa de oro y de esa manera obtener las imágenes en el MEB (Solís-Marín *et al.*, 2009).

2.3.- Análisis de organismo *in vivo*

Además de trabajar con los organismos depositados en la colección, también se analizaron los organismos vivos utilizando un microscopio estereoscópico (ZEISS Stremi DV4) para observar las características morfológicas principales de la especie estudiada. Las características macroscópicas descritas por Mortensen (1940) y Caso (1978) se utilizaron para analizar a los especímenes de *A.*

pulvinata depositados en la Colección Nacional de Equinodermos "Dra. María Elena Caso Muñoz" del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología.

3.- Análisis de la matriz orgánica de las espinas

3.1. - Obtención de la matriz de la espina

Para la extracción de la matriz proteica de las estructuras calcáreas se sacrificaron los organismos vivos empleando la metodología de Gayathri y colaboradores (2007). Los organismos adultos se diseccionaron en las tres principales estructuras calcáreas reportadas en la literatura (espinas, testa y Linterna de Aristóteles). Cada una de las estructuras se depositó en un vaso de precipitado y se lavó con agua desionizada por 30 minutos en agitación constante.

Posteriormente, cada material se lavó con 200 ml de hipoclorito de sodio al 6% para remover la materia orgánica superficial de la estructura durante 1 hr a 4 °C. Después, el material se lavó tres veces con agua desionizada para eliminar el hipoclorito; una vez finalizados los lavados el material se secó y pesó.

En seguida, el material se pulverizó con ayuda de un mortero de porcelana sobre una cama de hielo seco. Después cada uno de los materiales se colocó en un vaso de precipitado, se desmineralizó con una solución de ácido acético al 50% (20ml por cada gramo de muestra) en agitación constante a 4 °C por 24 horas. Para finalizar, cada muestra se dializó con una membrana con un poro de 3.5 KDa (Spectra/Pro, No.133 116) y se secó con un SpeedVac (TA y a bajo vacío P 0.1356 psi) (Thermo Scientific, Mod. ISS110-115 Savant).

Con la finalidad de probar un método alternativo para desmineralizar las estructuras calcáreas se empleó una parte de la LA con una solución de HCl (Sigma 320331) al 0.6 M como lo sugieren Alvares y colaboradores (2009).

3.2. – Fraccionamiento y purificación del extracto de la espina

El extracto crudo de la espina se fraccionó y concentró por ultrafiltración con tres diferentes membranas (Amicón, Ultracel, Millipore): primero con una membrana con un poro de 30 kDa (CAT. PLTK04310 Lot. C2CA00331), luego el filtrado se transfirió a otra membrana de 10 kDa (CAT. 13612 Lot. C6SN09599) y por último el filtrado se pasó por una de 1 kDa (CAT. PLAC04310 Lot. C1AA27287). A partir de este método se obtuvieron tres fracciones: a) **E30**, con un peso mayor a 30kDa; b) **E10**, con un intervalo de 10 a 30 kDa y c) **E01**, con un intervalo de 1 a 10 kDa. Una vez obtenidas las fracciones, estas se secaron en el SpeedVac.

Posteriormente la fracción E10 se fraccionó en un Cromatografía líquida de alta eficiencia [Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)] por medio de una columna de exclusión molecular de 80 ml de Sephadex G50 con un regulador de Tris-HCl de 50mM con cloruro de sodio al 0.15M con un pH de 8. La muestra se separó a un flujo de 0.3 ml/min empleando un volumen de 450 ml del buffer. Una vez

obtenidas las fracciones de la columna se dializaron con agua desionizada con una membrana de 3.5 KDa (Spectra/Pro, No.133 116) y se secaron con el SpeedVac (Fig. 6).

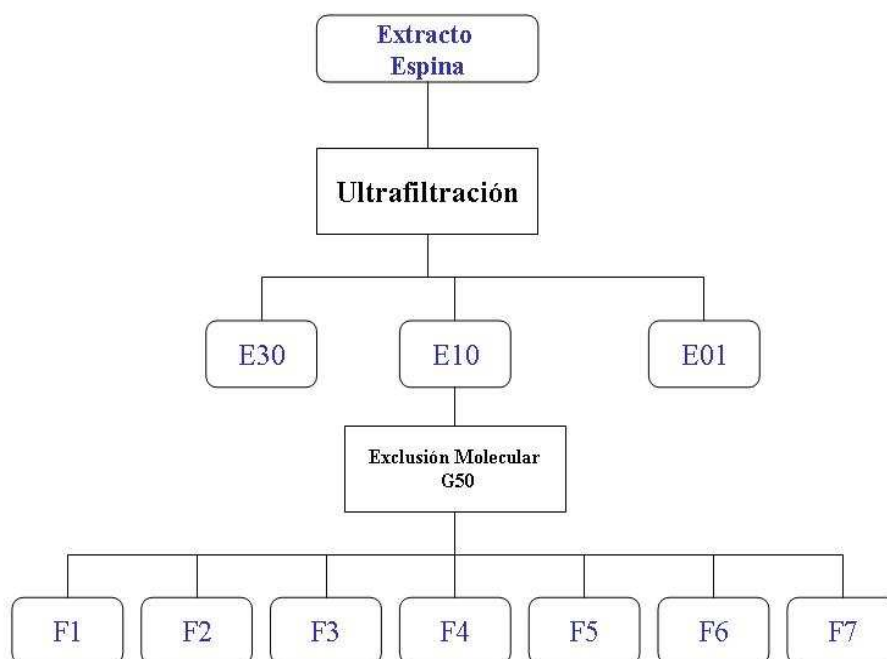


Figura 6.Diagrama de purificación del extracto de espinas.

3.3. - Cuantificación de proteínas por el método del ácido bicinónico (BCA)

La cuantificación de proteínas se determinó mediante un ensayo con ácido bicinónico (ThermoSCIENTIFIC #23225), mediante la determinación de la curva estándar de la albúmina bovina (BSA, 2mg/ml, ThermoSCIENTIFIC #23209).

El método consiste en la reducción del ión Cu^{2+} a Cu^{1+} por medio de la proteína en un medio alcalino donde el BCA se une al Cu^{1+} desarrollando una reacción colorimétrica, muy sensible y específica. El primer paso consiste en la quelación de la proteína con cobre en un medio alcalino que un complejo de color azul. El segundo paso consiste en el desarrollo de la reacción colorimétrica, el BCA reacciona con el cobre reduciéndolo y formando una coloración morada que presenta una absorbancia a 562 nm dependiendo de la concentración de proteína presente en la muestra.

Se colocaron 25µl de cada una de las muestras (extractos y fracciones) de una solución a una concentración de 1mg/ml, esto se realizó por duplicado en los pocillos de la microplaca de 96 pocillos. La microplaca se leyó a 562 nm en un espectro Elx-808 Ultra Microplate Reader (Bio-Tek Instruments) y con el programa KC4.

3.4.- Determinación de porcentaje de glicosilación de las fracciones

Para determinar el porcentaje de glicosilación de las fracciones del extracto se empleó un kit de estimación de Carbohidratos de Glicoproteínas (Pierce #23260) ya que permite la identificación de glicoproteínas y determinar el porcentaje de glicosilación al comparar con los estándares.

La detección se basa en la oxidación de los azúcares presentes en la glicoproteína con el meta-periodato de sodio, formando aldehidos que al reaccionar con el agente detector producen una reacción colorimétrica morada que puede ser media a 550 nm.

Se adicionaron 50 µl de cada una de las muestras de un estándar de 1 mg/ml en el pocillo de una microplaca por triplicado. La microplaca se leyó a 550 nm en un espectro (Versamax Tunable Microplate Reader) con el programa SoftMaxPro.

3.5.- Determinación de pesos moleculares y secuencias de las proteínas

La fracción *E10F4* se envió a Kratos Company, Estados Unidos, Boston, Massachusetts. Donde determinaron la presencia de dos proteínas en dicha fracción, las cuales fueron separadas por electroforesis capilar y posteriormente a través de espectrometría de masas con un triplecuadrupolo en modo de electrospray para la determinación de los pesos moleculares de cada fracción. La secuencia de las proteínas se realizó en un equipo MALDI-TOF-TOF en donde primero se determina el amino terminal por degradación de Edman, posteriormente se hace una degradación triptica y por ultimo una degradación con exoquinasa.

3.6.- Análisis de las secuencias obtenidas

Una vez obtenidas las secuencias de las dos proteínas aisladas se realizó un alineamiento de secuencias (BLAST) empleado la base de datos de proteínas no redundantes [non-redundant proteins sequences (nr)] para determinar la similitud de las secuencias de las proteínas aisladas en *A. pulvinata* con las de la base de datos. Posteriormente se realizó una base de datos con las proteínas aisladas y las reportadas en las Tablas I y II para realizar un alineamiento con el programa Jalview y de esa manera obtener un árbol filogenético para determinar su relación de estas.

3.7.- Ensayo de actividad de formación de cristales de carbonato de calcio

Para este ensayo se hicieron modificaciones a la técnica empleada por Chen y colaboradores (2009) sugeridas por Robles-Gómez (2012); el cual consistió en el uso de soluciones de CaCl₂ (Sigma C-1016) a una concentración de 20mM y otra (NH₄)₂CO₃ (Sigma A9516) a 40 mM.

En una microplaca de 96 pocillos, se adicionaron 100 µl de cada una de las soluciones por pocillo y después se adicionaron los siguientes controles: A) 10 µl de agua desionizada, B) 10 µg de Anhidrasa carbónica (AC) (Sigma c-2273), C) 5 µg de AC y D) 1 µg de AC, de acuerdo al esquema de la Tabla III. Al final, a cada micropocillo con los controles, se le adicionó una gota de aceite mineral (Sigma m-5904) para evitar que el CO₂ atmosférico influenciara en el ensayo. Cada prueba se hizo por

duplicado. Para determinar la actividad se adicionó 1 μg de proteína de cada fracción obtenida en la ultrafiltración.

Tabla III. Volúmenes de soluciones utilizados en las pruebas de formación de cristales de CaCO_3 .

Reactivos	Microplaca				
	A	B	C	D	E
CaCl_2 (μL)	100	100	100	100	100
NH_4CO_3 (μL)	100	100	100	100	100
Muestra ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	-	-	-	-	1
H_2O MQ(μL)	10	-	-	-	-
AC (μg)	-	10	5	1	-

No obstante, al detectar falsos positivos en el ensayo anterior, se elaboró un segundo sistema empleando una solución de CaCl_2 [20mM] con ZnCl_2 [25mM] disueltos en buffer de Tris-HCl [25 mM] a un pH de 7 y un flujo constante de CO_2 , en donde las muestras estaban en un micro sistema al ser separadas por una membrana con un poro de 500 Da (Spectra/Pro, No.133 116) de la solución (Fig. 7). La formación de cristales se observó en un microscopio estereoscópico (ZEISS Stemi DV4) y se tomaron fotografías con una cámara digital (Canon PowerShot G9) a las 24 horas.

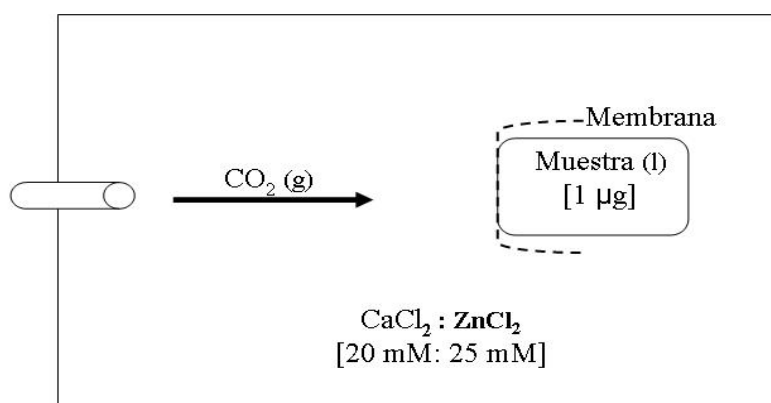


Figura 7. Sistema de formación de cristales de calcio, en donde (g)= gas y (l)= líquido.

VI.- RESULTADOS

A.- Descripción taxonómica

Se revisaron 29 organismos de la especie *A. pulvinata* depositados en la Colección Nacional de Equinodermos del ICML, 14 preservados en seco y 15 preservados en alcohol (Tablas IV y V). A partir de estos se determinaron las medidas como diámetro del ambitus y la altura de la testa, entre otras. La máxima altura de la testa en esta especie es de 3 cm y el diámetro máximo es de 11 cm. El ejemplar con el número de catálogo 4.8.08 de la colección fue recolectado en el límite batimétrico reportado para esta especie (95 m) (Tabla IV); además, debido a que el ejemplar es el más pequeño de todo registro, se corroboró su identificación a partir de las imágenes del MEB del mamelón (base de la espina) y una espícula con base a lo encontrado en los organismos vivos, esto para evitar el daño de este ejemplar (Fig. 8). En base a las medidas de la Tabla IV, se encuentra una relación casi similar con la altura de la testa y el diámetro del peristoma ($27.7 \pm 2.3\text{mm} \approx 28.5 \pm 2.1\text{mm}$, respectivamente).

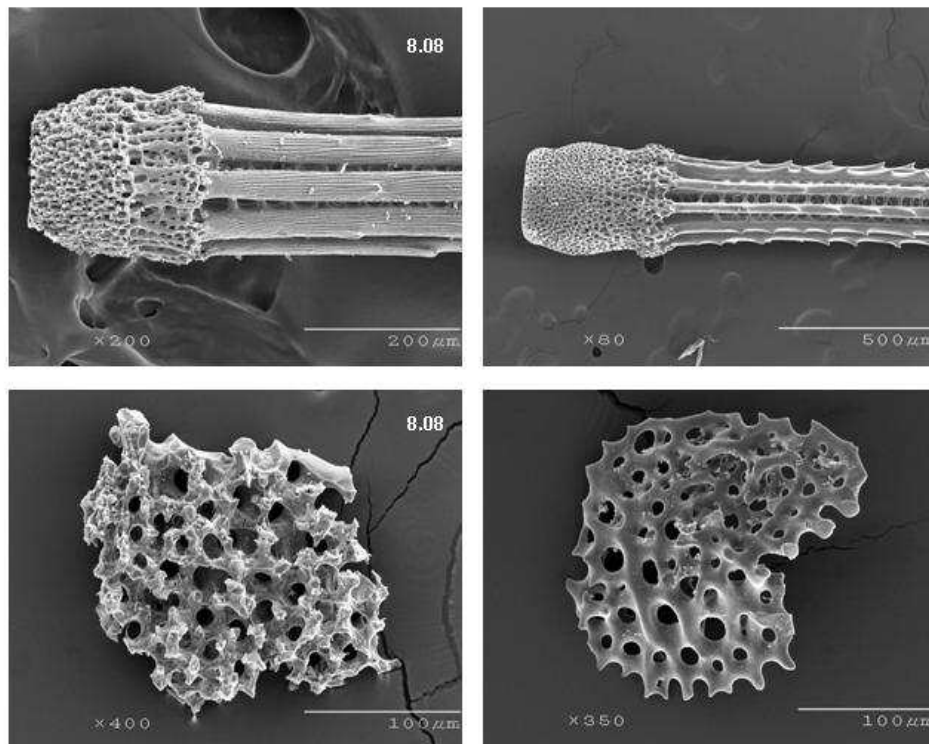


Figura 8. Corroboración taxonómica del ejemplar 4.8.08 de la Colección deICMyL-UNAM a partir del mamelón (superior) y una espícula (inferior) de *A. pulvinata*.

Tabla IV. Medidas de los especímenes de *A. pulvinata* depositados en la colección del ICML-UNAM; donde ND= no disponible.

Año	Núm. Catálogo	Ambitus	Alto	Disco apical	Peristoma	Linterna
2000	4.8.0	89	29	22	29	3
1945	4.8.01	94	28	26	30	3
1945	4.8.01	92	26	27	33	4
1960	4.8.02	48	13	11	14	2
1960	4.8.02	42	12	10	13	2
1960	4.8.02	34	12	9	12	2
1960	4.8.02	37	12	9	12	1
1961	4.8.03	61	18	13	19	1
1961	4.8.03	57	18	13	19	1
1961	4.8.03	58	18	14	18	1
1961	4.8.03	91	30	20.5	ND	ND
1961	4.8.03	72	26	17	24	3
-	4.8.04	105	33	26	ND	ND
-	4.8.04	103	35	21	31	5
-	4.8.05	83	22	19	25	4
1973	4.8.06	35	11	8	14	1
1993	4.8.07	33	13	11	11	2
1993	4.8.07	39	11	7	11	1
1990	4.8.08	8	1	1	4	0
1998	4.8.09	34	10	9	12	1
1998	4.8.09	22	8	6	8	0.5
1998	4.8.10	35	12	8	12	1
1998	4.8.10	29	11	9	13	1
1998	4.8.11	140	36	28	35	5
1999	4.8.12	50	16	11	11	1
2000	4.8.13	88	29	17	27	3
1993	4.8.14	110	28	25	31	6
1993	4.8.14	103	28	23	30	6
1993	4.8.14	79	25	17	24	6

Tabla V. Información adicional de los ejemplares de *A. pulvinata* de la colección del ICML-UNAM, ND= no disponible.

Año	Núm. de Catálogo	Preservación	País	Localidad	LAT	LONG	Z (m)
2000	4.8.0	Seco	México	Faro de Bucerías, Michoacán	12° 21' 13"	N 103° 31' 28"	12.0-21.0
1945	4.8.01	Seco	México	Macapule, Sinaloa	25° 21'	N 108° 40'	ND
1945	4.8.01	Seco	México	Macapule, Sinaloa	25° 21'	N 108° 40'	ND
1960	4.8.02	Alcohol	México	Bahía de la Paz, BCS	24° 20'	N 110° 45'	30.09-33.436
1960	4.8.02	Alcohol	México	Bahía de la Paz, BCS	24° 20'	N 110° 45'	30.09-33.436
1960	4.8.02	Alcohol	México	Bahía de la Paz, BCS	24° 20'	N 110° 45'	30.09-33.436
1960	4.8.02	Alcohol	México	Bahía de la Paz, BCS	24° 20'	N 110° 45'	30.09-33.436
1961	4.8.03	Alcohol	México	Acapulco, Guerrero	16° 46'	N 99° 55'	ND
1961	4.8.03	Alcohol	México	Acapulco, Guerrero	16° 46'	N 99° 55'	ND
1961	4.8.03	Alcohol	México	Acapulco, Guerrero	16° 46'	N 99° 55'	ND
1961	4.8.03	Seco	México	Acapulco, Guerrero	16° 46'	N 99° 55'	ND
1961	4.8.03	Seco	México	Acapulco, Guerrero	16° 46'	N 99° 55'	ND
-	4.8.04	Seco	México	Acapulco, Guerrero	16° 46'	N 99° 55'	ND
-	4.8.04	Seco	México	Acapulco, Guerrero	16° 46'	N 99° 55'	ND
-	4.8.05	Seco	México	Acapulco, Guerrero	16° 46'	N 99° 55'	ND
1973	4.8.06	Alcohol	México	Playa Tlacopamocho, Guerrero	16° 46'	N 99° 55'	10
1993	4.8.07	Alcohol	México	Salina Cruz, Oaxaca	16° 09'	N 95° 11'	3.5
1993	4.8.07	Alcohol	México	Salina Cruz, Oaxaca	16° 09'	N 95° 11'	3.5
1990	4.8.08	Alcohol	México	Cabo San Miguel, Baja California	28° 07' 06"	N 112° 42' 07"	95
1998	4.8.09	Alcohol	México	Punta Maldonado, Guerrero	16° 16' 419"	N 98° 46' 372"	ND
1998	4.8.09	Alcohol	México	Punta Maldonado, Guerrero	16° 16' 419"	N 98° 46' 372"	ND
1998	4.8.10	Alcohol	México	Lázaro Cárdenas, Michoacán	17° 57' 946"	N 102° 22' 104"	ND
1998	4.8.10	Alcohol	México	Lázaro Cárdenas, Michoacán	17° 57' 946"	N 102° 22' 104"	ND
1998	4.8.11	Seco	México	Petatlán, Guerrero	17° 52' 336"	N 101° 52' 345"	ND
1999	4.8.12	Seco	Perú	Isla Lobos, Perú	06° 58'	S 80° 45'	6
2000	4.8.13	Seco	México	Faro de Bucerías, Michoacán	18° 21' 4.9"	N 103° 31' 21.9"	12
1993	4.8.14	Seco	México	Puerto Madero, Chiapas	14° 42' 25"	N 92° 23' 82"	ND
1993	4.8.14	Seco	México	Puerto Madero, Chiapas	14° 42' 25"	N 92° 23' 82"	ND
1993	4.8.14	Seco	México	Puerto Madero, Chiapas	14° 42' 25"	N 92° 23' 82"	ND

Los acercamientos de los organismos *in vivo* revelaron que los puntos iridiscentes de la zona del interambulacro se componen de alrededor de 35 células (Fig. 9 A) y están articulados a la testa por un pedúnculo de tejido (Fig. 9 D). No obstante, se observaron puntos más pequeños sobre toda la superficie del ambitus formados por ocho células (Fig. 9 A). El peristoma se compones de cinco pares de podios bucales y el aparato mandibular se compone de cinco dientes (Fig. 9 B). También se observó que los pedicelarios están unidos al pedúnculo calcáreo por un tejido elástico (Fig. 9 C).

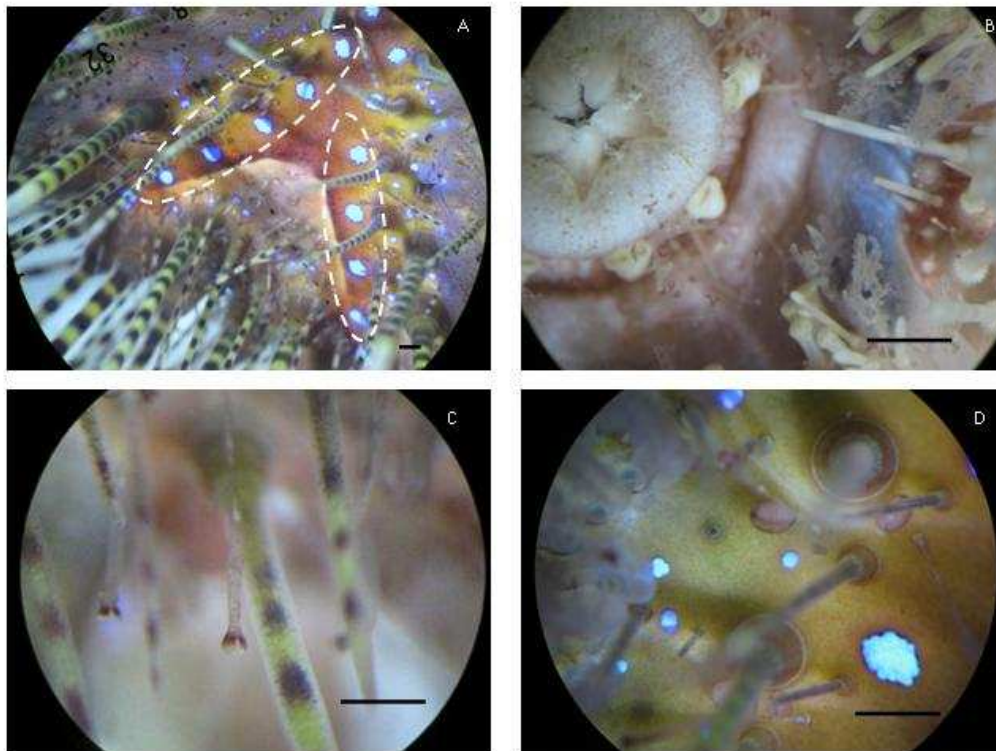


Figura 9. *Astropyga pulvinata*. A= detalle de la zona interambulacral, B= peristoma, C= pedicelario con tejido y pedúnculo y D= detalle de los puntos iridiscentes del ambulacro; donde — = 0.5 mm.

Mediante las imágenes del MEB, se observó que los pedicelarios presentes en *A. pulvinata* son trivalvados (Fig. 10) y de tres tipos: a) *Tridentes*, que se encuentran cerca del peristoma; b) *Trifoliados*, que son los más abundantes, pequeños y se ubican por toda la testa excepto en las zonas interambulacrales y c) *Claviformes* presentes en el ambulacro (Fig. 11). Los pedicelarios tridentados y trifoliados son los únicos que presentan pedúnculo calcáreo y se encuentran unidos directamente a la testa por un tejido (Fig. 9 C y 10 Pc).

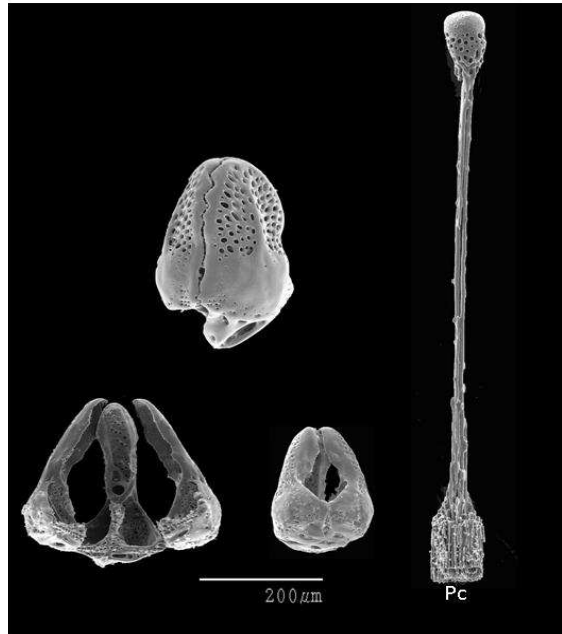


Figura 10. Pedicelarios trivalvados y pedúnculo calcáreo (*Pc*) presentes en *A. pulvinata*.

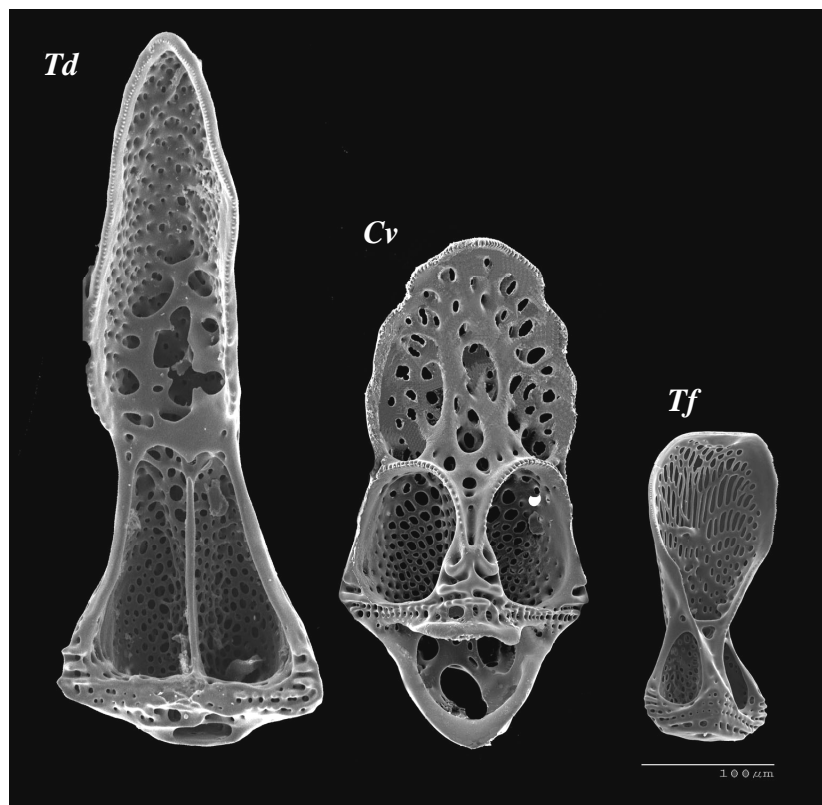


Figura 11. Pedicelarios de *A. pulvinata*; *Td* = tridentes, *Cv* = claviformes y *Tf* = trifoliados.

En lo que respecta a las espículas, se encontraron 10 tipos de espículas diferentes: seis en el peristoma, una en el intestino y tres en la membrana anal. De las espículas presentes en el peristoma cuatro se asemejan a los bosquejos realizados por Mortensen (1940). Mientras que las dos espículas restantes presentan las siguientes características: 1) *Medias lunas*, son estructuras porosas con forma de luna creciente con uno de los extremos truncado de manera angular (Fig. 12 MI); 2) *Bastos*, estructuras porosas que presenta un extremo más ancho que el otro (Fig. 12B).

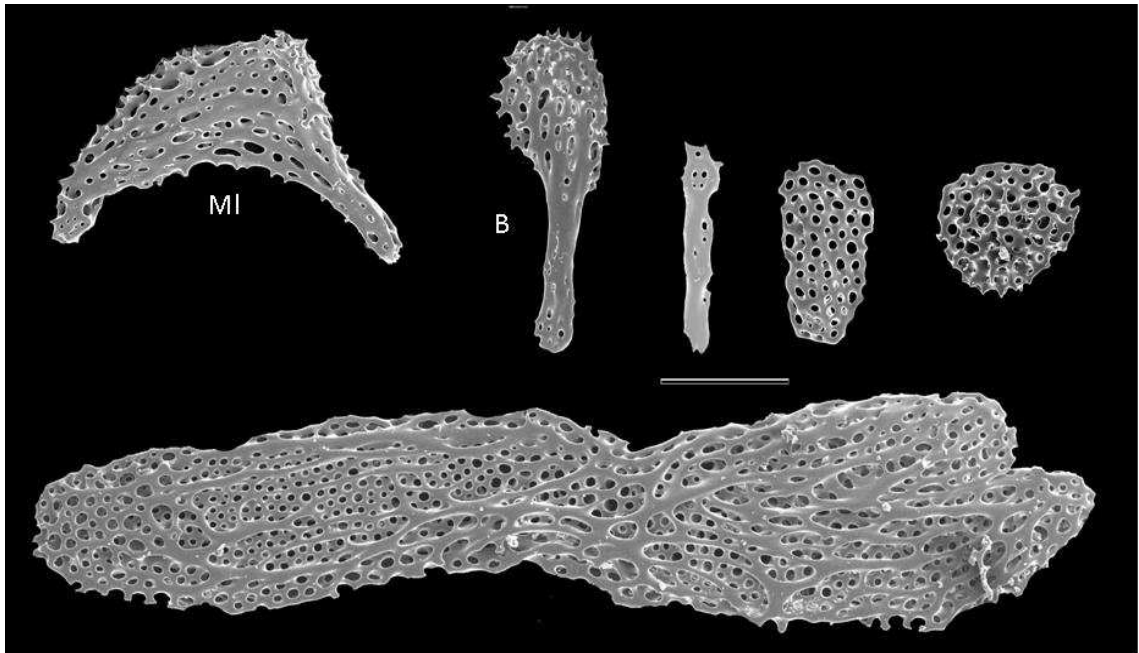


Figura 12. Espículas del peristoma; *MI* = media luna y *B* = basto (escala $\text{—} = 200\mu\text{m}$).

La espícula obtenida del intestino (Fig. 13) es similar a la descrita por Mortensen (1940) (Fig. 5C); mientras que las espículas encontradas en la membrana anal (en forma de redes) representan nuevos caracteres para la identificación de esta especie (Fig. 14).

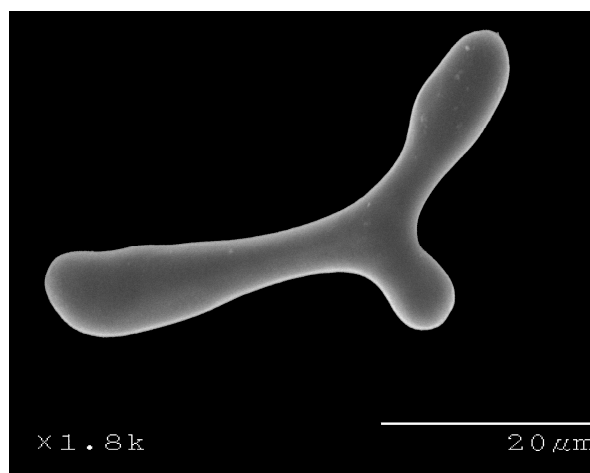


Figura 13. Espícula de la pared intestinal.

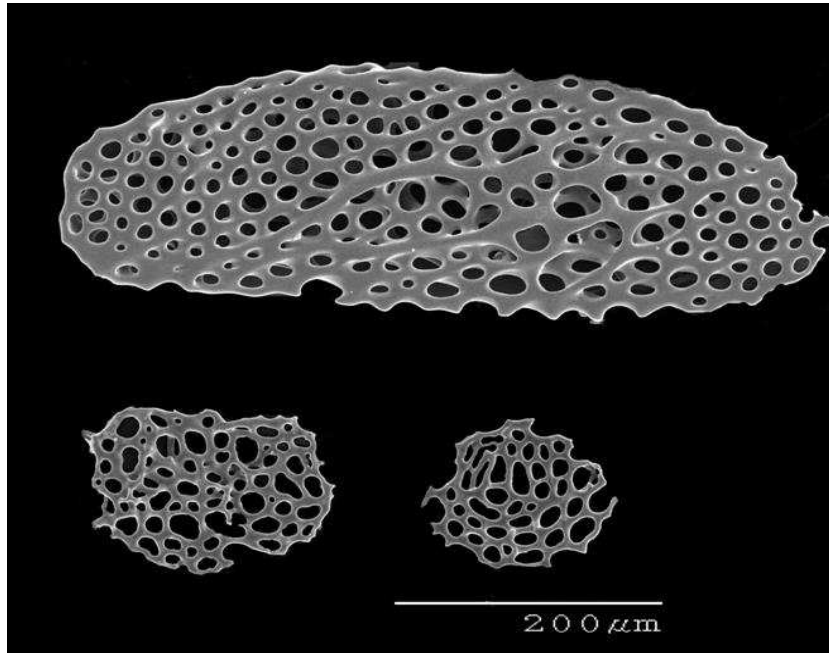


Figura 14. Espículas de la membrana anal.

También se identificaron las rosetas calcáreas que conforman el disco suctor de los podios ambulacrales (Fig. 15 B), las cuales presentan forma de coronas con distintas crestas (Fig. 15 A).

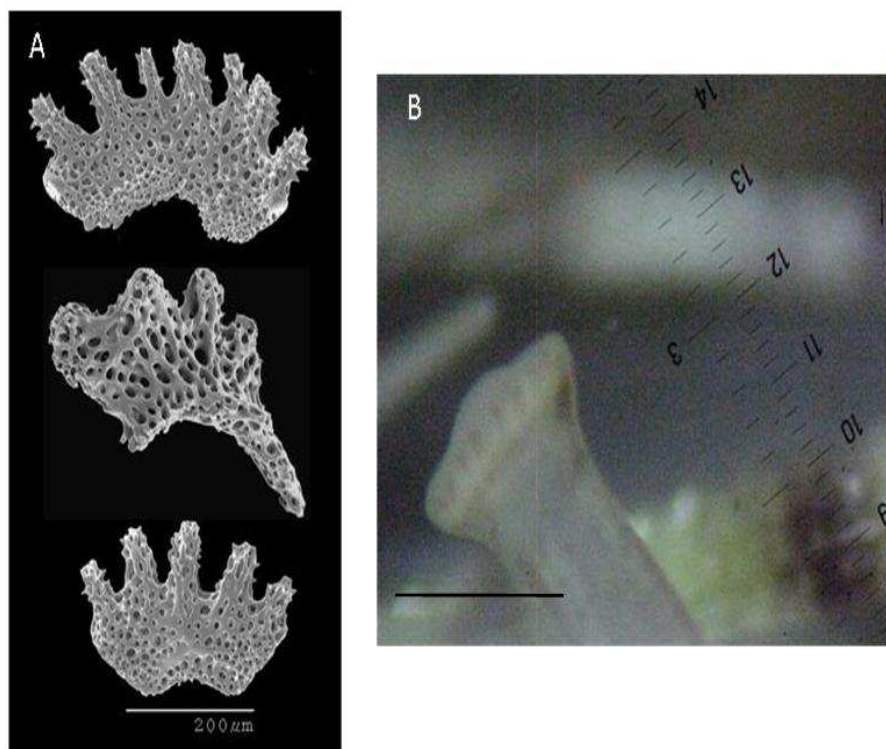


Figura 15. A- Rosetas calcáreas presentes en los podios ambulacrales. B- Acercamiento del podio ambulacral; donde — = 0.25 mm.

De los tratamientos empleados para la obtención de las microestructuras, el NaClO al 3% fue el mejor porque permitió la obtención de los pedicelarios claviformes. Mientras que la técnica con peróxido reacciona en forma violenta con la piel de los órganos internos, y en los tejidos externos de la testa no degrada la materia orgánica y además daña las espículas. Se puede observar que la región exterior de la espícula esta degradada (Fig. 16 H₂O₂). Mientras que el resto de los tratamientos con cloro solo dejan un poco de suciedad en las muestras (Fig. 16).

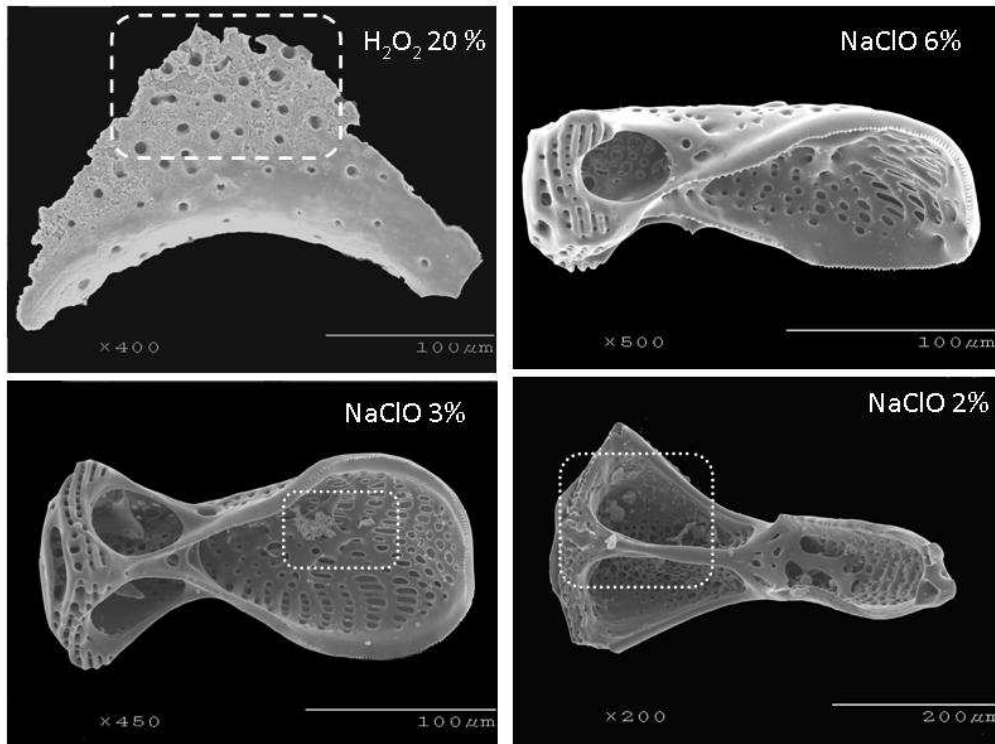
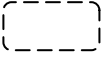




Figura 16. Fotografías de los tratamientos empleados para la obtención de microestructuras;  = daño en la estructura y  = suciedad en la estructura.

= daño en la estructura y  = suciedad en la estructura.

B.- Ficha taxonómica

Phylum Echinodermata

Clase Echinoidea Leske, 1778

Subclase Euechinoidea Bronn, 1860

Infraclase Acroechinoidea Smith, 1981

Orden Diadematoida Duncan, 1889

Familia Diadematidae Gray, 1855

Género *Astropyga* Gray, 1825

Astropyga pulvinata (Lamarck, 1816)

Cidarid pulvinata Lamarck, 1816: 59, 385.

Astropyga pulvinata.- L. Agassiz y Désor, 1846: 345; A. Agassiz, 1872: 94, 214, 418. H. L. Clark, 1923: 158-159. Boone, 1926: 9-10; Grant y Hertlein, 1938: 15; H. L. Clark, 1940: 348; Mortensen, 1940 197-203; Steinbeck y Ricketts, 1941: 399; H. L. Clark 1948: 236-237; Caso, 1948: 184-187; 1953: 222; 1961: 241-245; 1978: 22-24; 1979: 212; 1990: 89.

Astropyga venusta.- Verrill, 1867: 296-298, 331, 344; 1870: 99.

Astropyga depressa.- L. Agassiz, 1867: 579-580, 595.

Astropyga radiata.- Caso, 1961: 304.

Diagnosis: (Tomado de Mortensen, 1940 y Caso, 1979) la testa es grande un poco deprimida con porciones desnudas en la zona interambulacral. En el sistema apical las placas genitales son de forma triangular. Las espinas largas, punzantes y armadas con espineletas, pueden ser bandeadas con colores turquesa, amarillo y blanco o bien lisas son de color blanco o púrpura. Los pedicelarios son trivalvados y de tres tipos: a) *Tridentes*, se encuentran cerca del peristoma; b) *Trifoliados*, son los más abundantes y pequeños, se ubican por toda la testa excepto en las zonas interambulacrales; y c) *Claviformes* presentes en el ambulacro. Los pedicelarios tridentados y trifoliados son los únicos que presentan pedúnculo calcáreo, se encuentran unidos directamente a la testa por un tejido. Las rosetas calcáreas que conforman el disco suctor de los podios ambulacrales presentan un número diverso de crestas. Las espículas del intestino son trirradiadas y las del peristoma son irregulares.

Referencias de identificación: Mortensen, 1940: 169, fig. 98-a; 193, fig. 114; 194, fig. 115; I8, lám. 70, fig. 8-12, 18-19; I11, lám. 73, fig. 9; D'yakonov, 1969: 40, fig. 36-c; 50-52, fig. 50, 51-c, 52-e y f; Lawrence, 1977: 240, fig. 3.123-Ad.

Material tipo: Museo École de Mines de Paris (Boone, 1926).

Material examinado: ver Tabla IV.

Localidad tipo: Desconocida (Boone, 1926).

Distribución geográfica: desde San Miguel del Cabo, Baja California, México hasta Isla Lobos, Perú.

Distribución batimétrica: a diferentes profundidades 0 – 95 m (Caso, 1990; Red Iberoamérica de Equinodermos, 2011).

Sustrato que habita: habita en los arrecifes coralinos, fondos rocosos, arenosos y de sedimentos finos (Red Iberoamérica de Equinodermos, 2011).

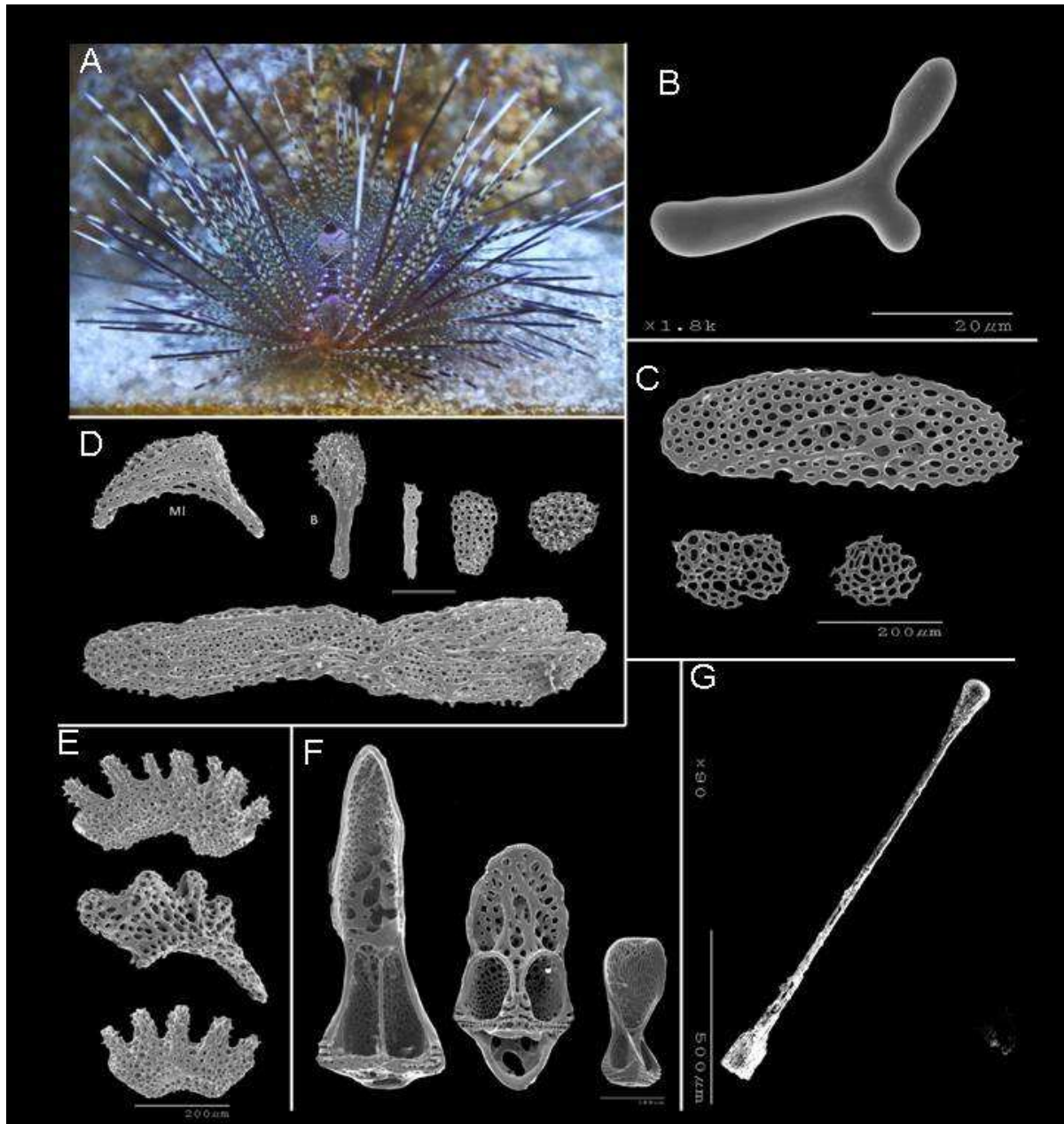


Lámina. *Astropyga pulvinata* (Lamarck, 1816). A. Vista lateral superior del organismo. B. Espícula del intestino; C. Espículas de la membrana anal; D. Espículas del peristoma; E. Rosetas calcáreas del podio suctor; F. Tipos de pedicelarios. G. Pedúnculo diadematode del pedicelario.

C.- Caracterización bioquímica de las proteínas de la matriz orgánica de *A. pulvinata*

Se procesaron 15 organismos, de los cuales se obtuvieron los siguientes pesos secos de las estructuras calcáreas: 36.25 g de espinas, 139.25 g de testa y 14.1 g de LA. LA se emplearon 4.48g para una extracción con HCl [0.6N]. La cantidad de proteínas presentes en cada uno de los extracto de diferentes estructuras calcáreas por el análisis de BCA fue: *Espina* = 601.43 $\mu\text{g/g}$ de extracto, *LA* = 1616.43 $\mu\text{g/g}$ de extracto, *LA_{HCl}*= 150 $\mu\text{g/g}$ y *Testa* = 1373.33 $\mu\text{g/g}$ de extracto. La extracción con HCl disminuye el rendimiento protéico aproximadamente a una décima parte con respecto a la extracción con ácido acético. La mayor cantidad de proteínas al parecer se encuentra en la LA, seguida por la testa y por último la espina.

Las fracciones obtenidas por ultrafiltración del extracto de espinas, son denominadas como *E30* (> 30kDa), *E10* (>10, <30 kDa) y *E01* (>1, <10 kDa). La cantidad de proteína determinada por el BCA de las fracciones fue: *E30*= 29.56 $\mu\text{g/mg}$, *E10*= 14.35 $\mu\text{g/mg}$ y *E01*=0.84 $\mu\text{g/mg}$. Para determinar la presencia de glicoproteínas se utilizó un gel de acrilamida al 15% en donde se colocaron las fracciones obtenidas por la membrana de Amicón y se tiñó con Azul de Alciano, la única fracción que se logro teñir fue la *E30* con una banda (Fig. 17). No obstante el kit de glicosilación determinó que las fracciones por ultrafiltración presentan el siguiente porcentaje de azúcares: *E30*= 18.2%, *E10*= 24.7% y *E01*= 53.2%.



Figura 17. Gel de Acrilamida al 15% teñido con Azul de Alciano, *PM* = marcador de pesos moleculares y *E30* = fracción E30.

Se opto por separar a la fracción *E10* por una cromatografía de exclusión molecular ya que muchas de las proteínas reportadas en las Tablas I y II presentan un peso que va de en los 16 hasta los 30 kDa, a partir de este proceso se obtuvieron siete subfracciones como se aprecia en el cromatograma de la Figura 18, las cuales presentan los siguientes pesos en seco: *E10F1*=10.03 μg (37.5%), *E10F2*= 5.5 μg (20.61%), *E10F3*= 0 μg , ***E10F4*= 0.2 μg (0.76%)**, *E10F5*= 4.56 μg (17.07%), *E10F6*= 0 μg y *E10F7*= 6.41 μg (24.02%) (Tabla VIII). Por medio del análisis de masas, la fracción *E10F4* presenta

dos proteínas con pesos moleculares promedios de 17 396.52 Da (16%) (*Astropyga I*) y 23 453.36 Da (84%) (*Astropyga II*) (Tabla VI), estas fueron separadas por medio de electroforesis capilar y posteriormente secuencias por degradación de Edman. Las secuencias de las proteínas se presentan en Anexos I y II. Al realizar un alineamiento de ambas secuencias, se obtuvieron los siguientes resultados: a) *Astropyga I* aparentemente pertenece a la superfamilia de proteínas **α -Anhidrasa Carbónica**, y presenta una similitud del 38% con una AC parcial *H. erythrogramma* (ABE27962.1) (Anexo III); y b) *Astropyga II* en el alineamiento general presenta una similitud del 41% con una Apolipoproteína A-I de *Bos taurus* (NP 776667.2) (Anexo IV). Al realizar el alineamiento con las secuencias de las proteínas reportadas en las Tablas II y III empleando el programa Jalview (Anexo V), se obtuvo un árbol filogenético en donde ambas proteínas son más similares a la P16 de *S. purpuratus* (Fig. 19).

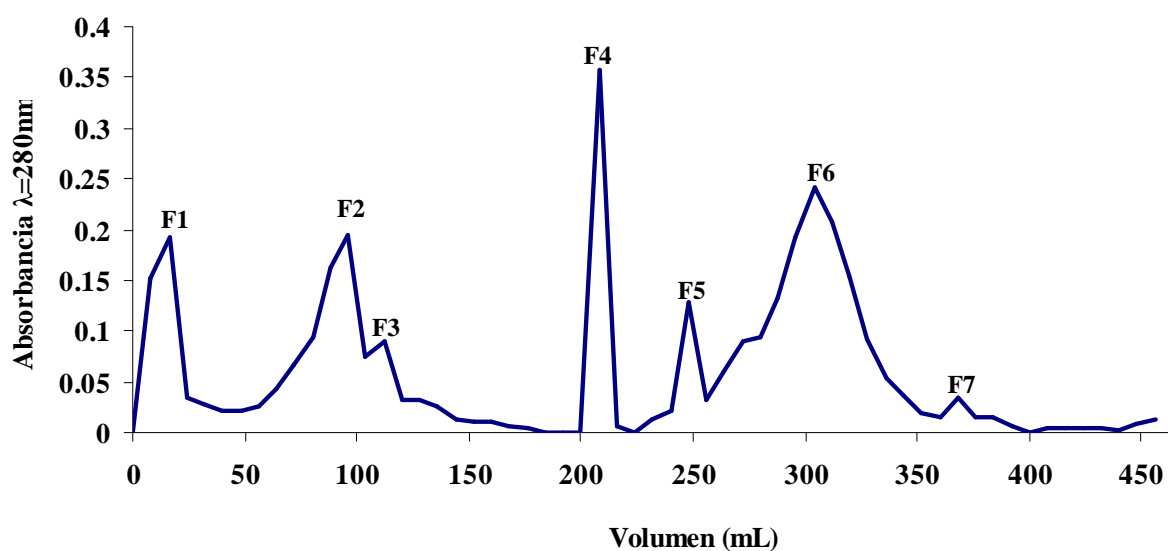


Figura 18. Fraccionamiento de E10 a partir de la columna G50.

Tabla VI. Secuencias completas, punto isoeléctrico, masa promedio y composición de aminoácidos de las proteínas *Astropyga I* y *Astropyga II*.

<i>Astropyga I</i>										
pI de la Proteína: 6.0										
Masa promedio: 17371										
Composición de amino ácidos: A10 C4 D9 E7 F8 G11 H4 I5 K4 L11 M3 N11 P8 Q3 R10 S10 T11 V11 W2 Y11										
1	TEGMYLKGGY	TVGVRRYNTL	SGVRAKTVCN	QESVTKVEYY	AHLPLRDDMT	VNSNNFMEPS	PNDNAAVDAL	IIDNCFYRYL		
81	HFWGTTPERG	SEHTVRDSRL	GYFIQASWSV	CGCNPIYGLL	PFDKAPALHI	EDNFSLTVAR	GVDQAYTSFN	FRP		
<i>Astropyga II</i>										
pI de la Proteína: 5.6										
Masa promedio: 23471										
Composición de amino ácidos: A17 C4 D12 E16 F8 G13 H5 I5 K10 L18 M4 N11 P9 Q10 R13 S10 T12 V12 W2 Y14										
1	TVETLRQQLP	YSDALIIDNC	FYRYLHFWGT	TPSVCGCNPI	YLGLPFDKAP	ALHIEDNRLG	EEFREGARQK	VQELGDLRTE		
81	GMYLKGGYTV	GVRRYNTLSG	VRAKTVCNQE	STASLRQEMH	KDLEEVKQVT	KVEYYAHLPL	RDDMTEYHAK	ASEQLKALGE		
161	KAVNSNNFME	PSPNDNAAVD	YFIQASWARG	VDQAYTSFNF	AYDRP					

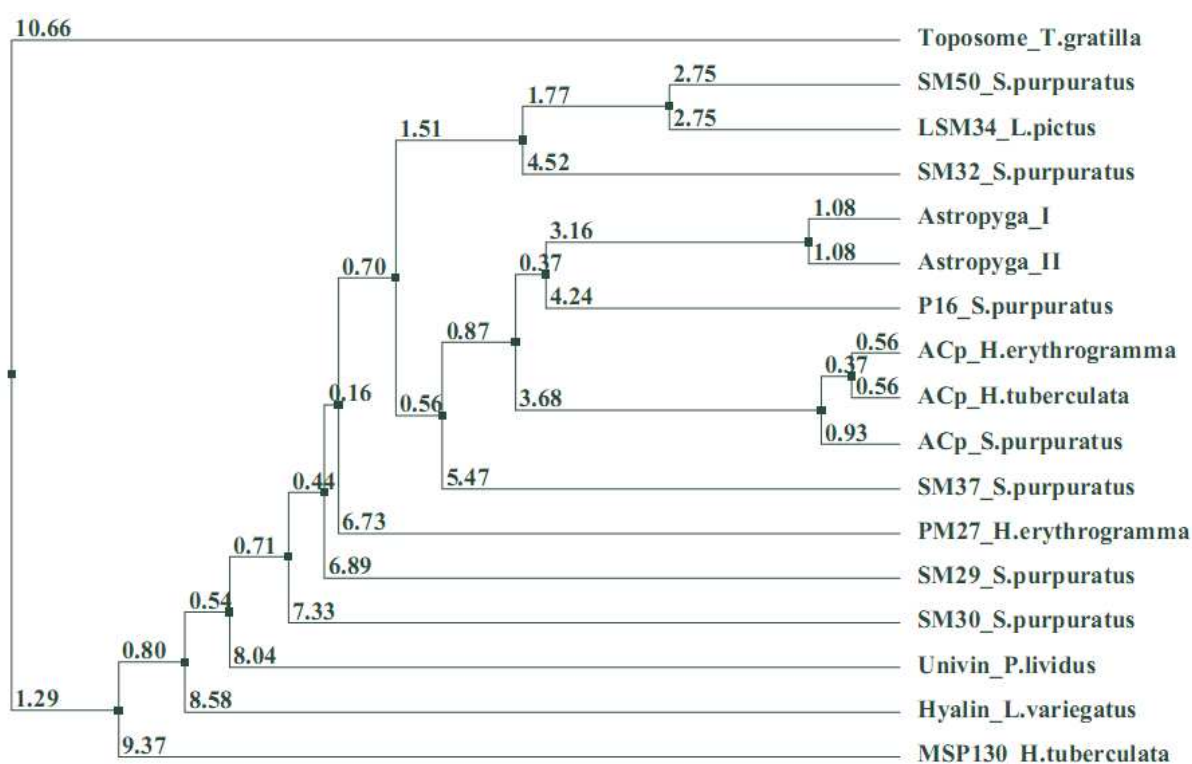


Figura 19. Árbol filogenético del programa Jalview de las proteínas biomineralizantes de los erizos de mar reportadas y las aisladas de *A. pulvinata*.

En el ensayo de formación de cristales en microplaca; todas las fracciones de la ultrafiltración, los estándares y el blanco (el agua) dieron positivo (Tabla VII). Los cristales formados a partir de la anhidrasa carbónica presentan simetría más uniforme con respecto a los del blanco (H_2O); además, conforme se aumenta la cantidad de proteína en el pocillo, los cristales son más amorfos. No obstante, los cristales que presentan más simetría y menor tamaño son los obtenidos a bajas temperaturas ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) pero el tamaño es menor con respecto a los obtenidos en temperatura ambiente (TA) (Figs. 20, 21 y 22).

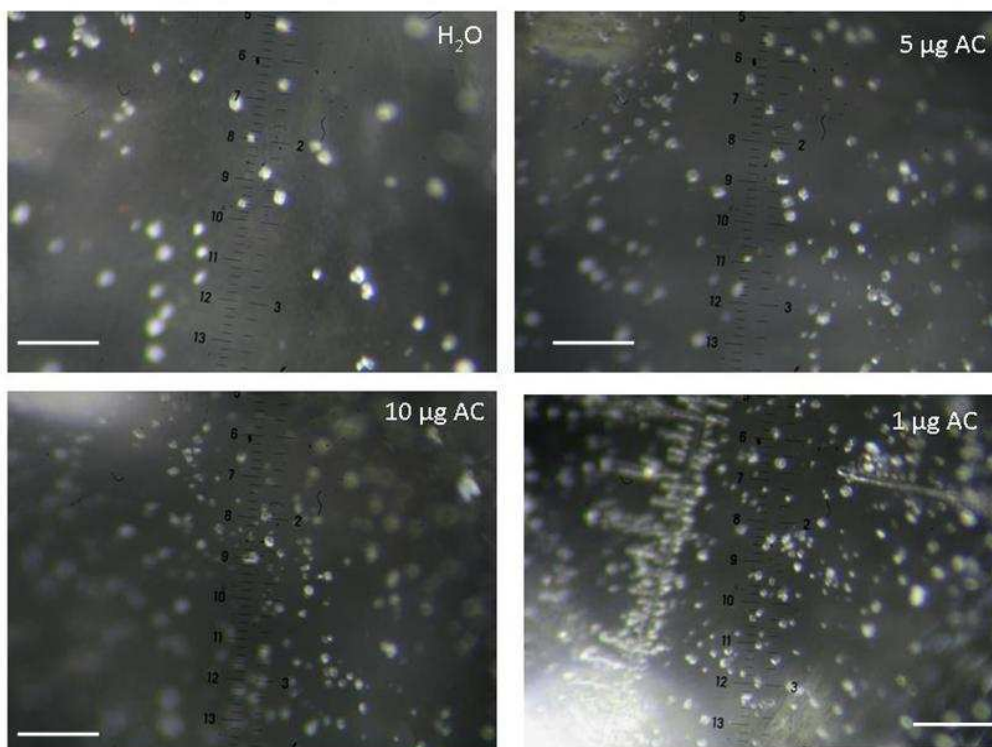


Figura 20. Ensayos de cristalización a temperatura ambiente; donde AC = Anhídrida carbónica y ≈ 0.25 mm.

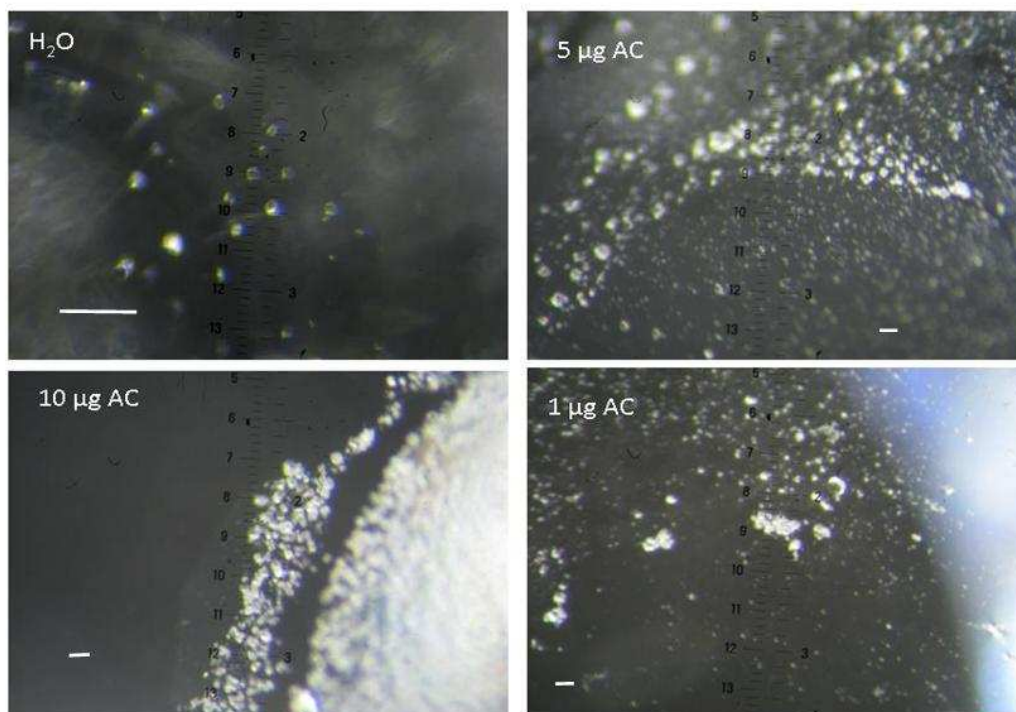


Figura 21. Ensayos de cristalización a $T = 4$ °C; donde AC = Anhídrida carbónica y ≈ 0.25 mm.

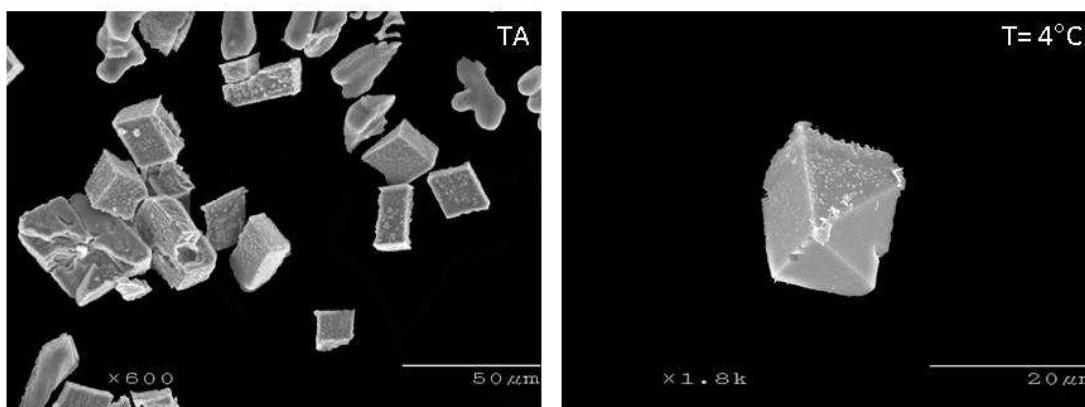


Figura 22. Determinación de los cristales formados por la AC a través del MEB; TA = Temperatura ambiente.

Debido a la presencia de falsos positivos del blanco, se optó por elaborar un segundo sistema en donde se eliminara estos errores. En el sistema de CO₂ se sometieron los extractos crudos, la anhidrasa carbónica y la ovoalbúmina, así como el efecto sinérgico de los extractos con alguna de las otras proteínas; la presencia de actividad se muestra en la Tabla VII. Al comparar ambos ensayos se observa que el número de cristales es menor pero la eliminación de los falsos positivos es una novedad en todos los ensayo de síntesis de cristales de calcio (Fig. 23). Las fracciones de la ultrafiltración y de la exclusión molecular, no se emplearon en estos ensayos porque el rendimiento fue muy bajo, y con lo que respecta a E10F4 toda se envió a Kratos Company (Tabla VIII).

Tabla VII. Actividad de formación de cristales de CaCO₃ de los extractos y fracciones de *A. pulvinata*; donde: ✓ = positivo, ✗ = negativo y - = no probado.

Muestra	Control	Microplaca		Sistema de
		TA	4 °C	CO ₂
Buffer	Negativo	-	-	✗
H ₂ O	Negativo	✓	✓	✗
AC	Positivo	✓	✓	✓
OvAlb	Positivo	-	-	✓
Espina	Extracto	-	-	✓
LA	Extracto	-	-	✓
Testa	Extracto	-	-	✓
E30	Fracción	✓	✓	-
E10	Fracción	✓	✓	-
E01	Fracción	✓	✓	-

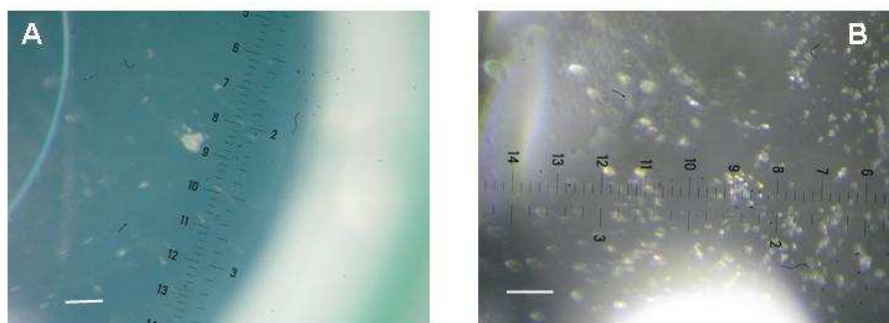


Figura 23. Comparación del número de cristales de los ensayos A= sistema de CO₂; se observa solo un cristal y B= sistema sin CO₂; se observa un mayor número de cristales; donde - = 0.05 mm.

Tabla VIII. Tabla de rendimiento y algunas características de la purificación del extracto de las espinas, fracciones de ultrafiltración y columna G50; donde - = no determinado.

Muestra	Material mg	Extracto µg	Material insoluble	Proteína [µg/mg]	Glicosilación (%)	Rendimiento	
						Total	Neto
Espinas	6280	483.00	1	0.600	-	7.69%	100.00%
E30	-	49.60	-	29.561	18.2	10.27%	10.27%
E10	-	26.70	-	14.358	24.7	5.53%	5.53%
E01	-	296.30	-	0.845	53.2	61.35%	61.35%
E10G50F1	-	10.03	-	-	-	37.55%	2.08%
E10G50F2	-	5.50	-	-	-	20.61%	1.14%
E10G50F3	-	0.00	-	-	-	0.00%	0.00%
E10G50F4	-	0.20	-	-	-	0.76%	0.04%
E10G50F5	-	4.56	-	-	-	17.07%	0.94%
E10G50F6	-	0.00	-	-	-	0.00%	0.00%
E10G50F7	-	6.41	-	-	-	24.02%	1.33%

VII. DISCUSIÓN

A. Descripción taxonómica

El género *Astropyga* se caracteriza por presentar series de pares de puntos en las zonas interambulacrales que van desde la boca hasta el ano (Fig. 9A), estos puntos están unidos directamente a la testa por un tejido como se observa en la Figura 4 (Mortensen, 1940). Los puntos más evidentes son conjuntos de aproximadamente de 35 células y otros mucho más pequeños en todo el ambitus (Fig. 9D).

La relación encontrada entre la altura de la testa y el peristoma ($27.7 \pm 2.3\text{mm}$ y $28.5 \pm 2.1\text{mm}$, respectivamente) no ha sido repostada.

Los pedicelarios al parecer son espinas modificadas en pequeñas articulaciones de la testa que se encargan de la limpieza y protección del organismo (D'yakonov, 1969; Mortensen, 1977). Estos están presentes en los equinodermos regulares, son trivalvados (Fig. 10) y la mayoría están conformados por tres partes: un pedúnculo calcáreo (pedicelo), un cuello compuesto por tejido conectivo y una cabeza (pedicelario) (Fig. 9C) (D'yakonov, 1969; Lawrence, 1987). *A. pulvinata* presenta tres de los cuatro tipos de pedicelarios reportados; como D'yakonov (1969) menciona los miembros de la familia Diadematidae carecen de pedicelarios de tipo globíferos. Los pedicelarios tridentados son comunes en la zona oral, están unidos al pedúnculo por un cuello de tejido conectivo y sus valvas son alargadas en forma de hojas que son característicos de la familia Diadematidae (Fig. 11Td) (D'yakonov, 1969); estos responden a estímulos mecánicos para remover partículas u organismos parásitos; los pedicelarios tridentados de diademátidos presentados por Coppard y colaboradores (2010) son muy diferentes a los encontrados en *A. pulvinata* debido a que empleo otro miembro de la familia diadematidae *Diadema* sp.; se puede apreciar que la región distal (superior del pedicelario) es más alargada y armada con ornamentaciones en el borde de la valva en *Diadema* y en *A. pulvinata* es más corta y solo presenta pequeños dientecillo en el borde de la región distal (Mortensen, 1940; Campbell, 1972; Lawrence, 1977; Coppard y Campbell, 2006).

Los pedicelarios trifoliados son los más pequeños de todos los pedicelarios (Fig. 10Tf), están unidos a un pedúnculo con un cuello de tejido y distribuidos por toda la testa (Campbell, 1972; Lawrence, 1977; Coppard y Campbell, 2006), las valvas son más redondeadas; los pedicelarios son más parecidos a los descritos por Mortensen (1940) que a los encontrados por Coppard y colaboradores (2010).

Con respecto a los pedicelarios claviformes son una variedad de pedicelarios oficefalos, los cuales carecen de pedúnculo (Fig. 11Cv) (D'yakonov, 1969; Coppard *et al.*, 2010) y son característicos de los diademátidos juveniles. Los pedicelarios claviformes identificados por Coppard y colaboradores (2010) no presentan ninguna similitud con los encontrados en este trabajo y las descripciones de Mortensen (1940). Mientras que el pedúnculo calcáreo encontrado en este trabajo (Fig. 10Pc) es de tipo diadematoide según D'yakonov (1969) (Fig. 24A-3), el cual fue obtenido de *S. purpuratus*.

Es posible que método con H_2O_2 empleado por Coppard y colaboradores (2010), no sea el más adecuado para la limpieza de los pedicelarios y espículas, debido a que no permite comparar este tipo

de estructuras con las descritas por Mortensen (1940) y las del presente trabajo. No obstante, esta metodología conserva el cuello del pedicelario (Fig. 4 y 9C), el cual esta unido al pedúnculo calcáreo (Fig. 10Pc).

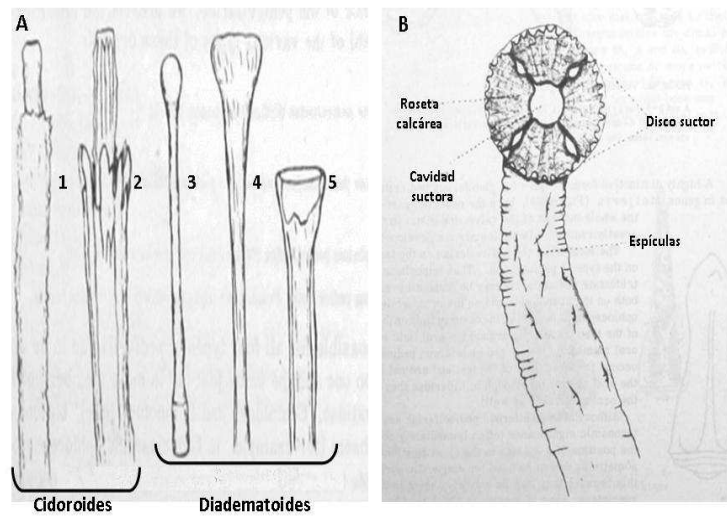


Figura 24. A- Tipos de pedicelarios. B- Podio ambulacral (Tomado de D'yakonov, 1969).

De las espículas obtenidas de *A. pulvinata*, solo la del intestino (Fig. 13) y las cuatro del peristoma (Fig. 12) se asemejan a los bosquejos de Mortensen (1940) (Fig. 5A y C), en donde las espículas del intestino son de tipo trirradiadas y las del peristoma son de forma irregular (Mortensen, 1940; D'yakonov, 1969). Lawrence (1977) también obtuvo espículas del peristoma de otras especies de equinoideos, pero éstas no se parecen a las obtenidas en el presente trabajo; ya que las de Lawrence son cuerpos en C (semi-lunar) y las de *A. pulvinata* son porosas y diversas (Fig.12). Las dos espículas restantes del peristoma (Fig. 12-MI y B) y las de la membrana anal (Fig. 14) no fueron reportadas por Mortensen (1940); sin embargo, las medias lunas presentan similitud con un bosquejo presentado por D'yakonov (1969) obtenido en ejemplares de *Parasalenia graciosa*, la cual es nombrada como espícula en forma de “C” característica en equinoideos.

En base a los tipos de pedicelarios y espículas encontradas en *A. pulvinata* se puede corroborar la taxonomía actual propuesta por Kroh y Smith (2010), ya que los pedicelarios tridentados y el pedúnculo son característicos de la familia Diademátidae y la espícula de forma de media luna son características de la clase Echinoidea.

La rosetas del podio ambulacral se identificaron con base al bosquejo de D'yakonov (1969) (Fig. 24B), y en caso el particular de *A. pulvinata* estas presentan una gran variedad de crestas (Fig. 14A). Lo cual sugiere que están descartadas como uno caracter taxonómico para la identificación de los equinoideos.

B. Caracterización bioquímica de las proteínas de la matriz orgánica

El uso de ácido HCl [0.6 M] para la obtención de la matriz intramineral de las estructuras calcáreas quedó descartado, después de observar que la cantidad de proteína obtenida es mucho menor ($LA = 1616.24 \mu\text{g/g} > LA_{HCl} = 150 \mu\text{g/g}$). Sin embargo, en algunos trabajos se ha empleado el HCl para descalcificar estructuras calcáreas de equinoideos. McGrath y colaboradores (2001) descalcificaron las espinas de *E. chloroticus* con HCl a [1M] y Alvares y colaboradores (2009) los dientes de *Echinus variegatus* con HCl a [0.6 M]. Por desgracia ninguno de los trabajos revisados reporta la cantidad de proteína obtenida, por lo cual es difícil determinar una solución adecuada para la descalcificación de las estructuras calcáreas de equinoideos.

En vista que existe el antecedente de glicoproteínas presentes en las espinas de *S. purpuratus* y *P. lividus* (ver Tabla II) (Amaye *et al.*, 2001; Mann *et al.*, 2010), se empleó la tinción de Azul de Alciano para la detección de glicoproteínas en el extracto de espinas (Wardí y Allen, 1972). La tinción de azul de alciano consiste en la unión con grupos con un alto contenido de cargas negativas debido a los grupos carboxilos presentes algunos azúcares presentes en las glicoproteínas; el azul de alciano se disuelve en ácido acético provocan la transformación los grupos hidroxilos (-OH) azúcares en derivados ácidos (Dong *et al.*, 2012). La banda presente en la fracción E30 podría ser equiparable a la glicoproteína SM37 (Fig. 17) ya que en esta fracción se encuentran las proteínas mayores de 30 kDa.

La proteína *Astropyga I* presenta un dominio conservado con las α -anhidrasas carbónicas. Las proteínas reportadas en esta superfamilia presentan las siguientes características: secuencias de 260 a 459 aminoácidos, tres histidinas (H_{94} , H_{96} y H_{114}) ligadas a un ión Zinc y un sitio catalítico en donde participan la Histidina (H_{64}) y una Tirosina (Y_{127}) (Hassan *et al.*, 2013). *Astropyga I* solo tiene 174 aminoácidos; el único aminoácido que se alinea es la T_{85} de *Astropyga I* con respecto a T_{150} de las secuencias de las AC parciales (ACp); no obstante se observan varios segmentos conservados de la posición 22-31, 116-120, 130-143, 170-174, 203-210 y 239-245 para la identificación de las anhidrasas carbónicas (Anexo V). Con lo que respecta a *Astropyga II*, ésta posee 205 aminoácidos y no se asemeja a ninguna de las proteínas biomineralizantes de erizo de mar (Anexo-VI). En base al árbol filogenético ambas proteínas se relacionan más con la P16 (Fig. 19), las regiones con las que se asemeja son 1-4 (Anexo VI).

La sensibilidad de los ensayos reportada para la formación de cristales de calcio se encuentra en el rango de 10 a 100 μg de extracto crudo (Gower, 2008); McGrath y colaboradores (2001) emplearon 100 μg del extracto del erizo de mar *E. chloroticus*; y Gayathri y colaboradores (2007) utilizaron 100 μg del extracto de la estrella *Pisaster giganteus*. Durante este trabajo se modificó el método para activar los extractos: esto se realizó a partir de la Anhidrasa Carbónica (AC) a diferentes concentraciones (Fig. 20), la cual es un control positivo empleado en estas pruebas (Hwang *et al.*, 2012). La concentración mínima para la actividad fue de 1 μg de muestra (extractos y controles) para

la actividad de formación de cristales en microplacas (Tabla VI). El método de microplacas se realizó a diferentes temperaturas con la finalidad de apreciar el efecto de la temperatura sobre este tipo de pruebas. Como se observa en la Figura 21, la forma de los cristales es más definida a bajas temperaturas ($T=4^{\circ}\text{C}$) que a la temperatura ambiente (TA).

El sistema utilizando CO_2 , eliminó los falsos positivos de los controles negativos. En vista de que la AC es una metaloenzima dependiente de Zinc se empleó la solución de ZnCl_2 para favorecer la reacción de AC (Hassand *et al.*, 2013). En éste sistema el CO_2 gaseosos se disuelve en el buffer, tomado como base la reacción descrita por Gower (2008). Al respecto, se observa que la primera reacción del sistema consiste en la formación del CCA, que posteriormente da lugar a un proceso de deshidratación para la formación de calcita (Fig. 25).

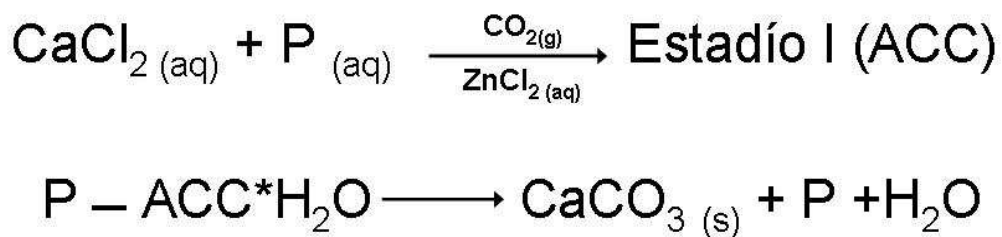


Figura 25. Reacción de sistema de CO_2 ; aq = acuoso, g = gas, s = sólido, P = proteína y ACC = carbonato de calcio amorfo (Tomado de Gower, 2008).

En base a las características bioquímicas de las fracciones obtenidas por la ultrafiltración, se puede constatar que la matriz orgánica de las espinas posee un gran porcentaje de azúcares, lo cuales pueden o no estar ligados a las proteínas (Tabla VIII). La actividad de los azúcares en la formación de CaCO_3 no ha sido estudiada a detalle; sin embargo, Natoli y colaboradores (2010) mencionan que las glicoproteínas y azúcares presentan selectividad polimórfica ya pueden interactuar con los iones Ca^{2+} o CO_3^{2-} . En el caso particular de la Ovoalbumina es una N-glicoproteína por un ácido sialilolisacaridos en la asparagina 292; esta glicoproteína se encarga de captar los iones Ca^{2+} a través de grupos carboxilo de sus aminoácidos para posteriormente depositarlos en los sitios de calcificación (Wolf *et al.*, 2011).

VIII. CONCLUSIONES

Para la obtención de microestructuras como espículas y pedicelarios es mejor trabajar con organismos vivos y emplear una solución de hipoclorito de sodio al 2%. Es importante analizar los distintos tipos de tejidos blandos presentes en los equinoideos como el peristoma, intestino, membrana anal, gónadas, entre otras para la obtención de espículas; ya que algunas de las espículas encontradas en este trabajo no habían sido reportadas hasta el momento.

A. pulvinata posee tres de los cuatro tipos de pedicelarios presentes en los equinoideos: claviformes, tridentados y trifoliados. Los pedicelarios claviformes son característicos del género *Astropyga* y son los únicos que no están unidos por un pedúnculo calcáreo de tipo diadematoide.

El uso de caracteres taxonómicos bien definidos es importante para la identificación de las especies de erizos regulares, sin embargo, las rosetas calcáreas presentan mucha variación morfológica por lo cual son descartadas para la identificación de *A. pulvinata*.

La matriz orgánica de las espinas de *A. pulvinata* es una mezcla compleja de biomacromoléculas, dentro de las cuales las glicoproteínas juegan un papel principal ya que son las encargadas de muchas funciones específicas (A-II). Las proteínas aisladas *Astropyga I* y *Astropyga II*, parecen ser un nuevo grupo de proteínas biomineralizantes no reportadas.

La elaboración de un sistema de síntesis de CaCO_3 el cual elimina los falsos positivos es algo novedoso para corroborar la actividad biomineralizante de los extractos y fracciones de la matriz orgánica de las espinas de *A. pulvinata*.

La anhidrasa empleada en este trabajo, es un buen control positivo para realizar ensayos bidirigidos con las proteínas biomineralizantes.

IX. PERSPECTIVAS

El principal ensayo a futuro de este proyecto, sería confirmar la actividad biomineralizante de las proteínas *Astropyga I* y *Astropyga II* en el sistema de CO_2 . Posteriormente confirmar si *Astropyga I* presenta una actividad de tipo Anhidrasa carbónica y en caso de que fuera positiva esta actividad, se sometería a pruebas de quelación para determinar si es una proteína metalodependiente o no.

Con respecto *Astropyga II* falta determinar la cadena de azúcares de esta glicoproteína, así como corroborar si la cadena de azúcares es un factor clave de la actividad en la biomineralización.

Además hacer análisis de biología molecular para ver si participan en la síntesis de las espículas y pedicelarios de *A. pulvinata*.

Con lo que respecta a las microestructuras, falta realizar un estudio con las otras dos especies del género *Astropyga* (*Astropyga radiata* y *Astropyga magnifica*) para corroborar si estas son características de esta especie o bien del género.

También es necesario realizar un análisis de toda la clase para corroborar la identificación de D'yakonov a partir de espículas y pedicelarios, ya que esto podría ser una nueva manera de identificación de la clase Equinoidea.

X. BIBLIOGRAFÍA

Alvarado, J.J. 2008. *Seasonal Occurrence and Aggregation Behavior of the Sea Urchin Astropyga pulvinata (Echinodermata: Echinoidea) in Bahía Culebra, Costa Rica*. **Pacific Science**. 62(4): 579-592.

- Alvares, K., Dixit, S.N., Lux, E. y A. Veis. 2009. *Echinoderm Phosphorylated Matrix Proteins UTMP16 and UTMP19 Have Different Functions in Sea Urchin Tooth Mineralization. Journal of Biological Chemistry*. 284(38): 26149-20160.
- Ameye, L.; Becker, G.D.; Killian, C.; Wilt, F.; Kemps, R.; Kuypers, S. y P. Dubois. 2001. *Proteins and Saccharides of the Sea Urchin Organic Matrix of Mineralization: Characterization and Localization in the Spine Skeleton. Journal of Structural Biology*. 134: 56-66.
- Ameye, L.; Hermann, R.; Killian, C.; Wilt, F. Y P. Dubois. 1999. *Ultrastructural Localization of Proteins Involved in Sea Urchin Biomineralization. The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 47(9): 1189-1200.
- Booolootian, R.A. 1966. *Physiology of Echinodermata. Intersciences Publisher*. United States of America. 882pp.
- Caso, M.E. 1978. *Los Equinoideos del Pacífico de México Parte Primera- Órdenes Cidaroida y Aulodonta Parte Segunda- Órdenes Stiridonta y Camarodonta. Centro de Ciencias del Mar y Limnología UNAM*. México.242pp.
- Caso, M.E. 1990. *I. Las especies del género Hesperocidaris Mortensen, Astropyga Gray, Arbacia Gray y Lytechinus Agassiz, colectadas en las campañas oceanográficas Cortes 1, 2, 3 *A bordo del B/O "El Puma"*. Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología*. 17(1): 83-94.
- Campbell, A.C. 1972. *The form and function of the skeleton in pedicellariae from Echinus esculentus L. TISSUE & CELL*. 4 (4): 641-661.
- Cervello, M.; Di Ferro, D.; D'Amelio, L.; Zito, F. y V. Matranga. 1992. *Calcium-dependent self-aggregation of toposome, a sea urchin embryo cell adhesión molecule. Biology of the Cell*. 74: 231-234.
- Cheers, M.S. y C.A. Etensohn. 2005. *P16 is an essential regulator of skeletogenesis in the sea urchin embryo. Developmental Biology*. 283: 384-396.
- Chen, Y.; Xiao, J.; Wang, Z. y S. Yang. 2009. *Observation of a Amorphous Calcium Carbonate Precursor on a Stearic Acid Monolayer Formed during the Biomimetic Mineralization of CaCO₃. Langmuir*. 25: 1054-1059.
- Cho, J. W.; Partin J. S. y W. J. Lennarz. 1996. *A technique for detecting matrix proteins in the crystalline spicule of sea urchin embryo. Proc. Nat. Acad. Sci*. 93: 1282-1286.
- Coppard, S.E. y A.C. Campbell. 2006. *Systematic significance of tridentate pedicellariae in the echinoid genera Diadema and Echinothrix. Invertebrate Biology*. 125(4): 363-378.
- Coppard, S.E.; Kroh, A. y A.B. Smith. 2010. *The evolution of pedicellariae in echinoids: an arms race against pests and parasites. Acta Zoologica*. 1-24.
- Dong, W.; Matsuno, Y. y A. Kameyama. 2012. *A Procedure for Alcian Blue Staining of Mucins on Polyvinylidene Difluoride Membrane. Analytical Chemistry*. 84: 8461-8466.

- Donnay, G. y D.L. Pawson. 1969. *X-ray Diffraction Studies of Echinoderms Plates*. **Science**. 166: 1147-1150.
- D'yakonov, M.A. 1969. *Fauna of Russia and adjacent countries. Echinodermata. Volume I. Echinodea. Israel Program for Scientific Translation*. Jerusalem. 265pp.
- Ettensohn, C.A.; Illies, M.R.; Oliveri, P. y D.L. De Jong. 2003. *Alx1, a member of the Cart1, Alx3/Alx4 subfamily of Paired-class homeodomain proteins is an essential component of the gene network controlling skeletogenesis fate specification in the sea urchin embryo*. **Development**. 130: 2917-2928.
- Ettensohn, C.A.; Kitazawa, C.; Cheers, M. S.; Leonard, J. D. y T. Sharma. 2007. *Gene regulatory networks and developmental plasticity in the early sea urchin embryo: alternative deployment of the skeletogenic gene regulatory network*. **Development**. 134: 3077-3087.
- Faatz, M.; Gröhn, F. Y G. Wegner. 2004. *Amorphous Calcium Carbonate: Synthesis and Potential Intermediate in Biomineralization*. **Advanced Materials**. 12(16): 996-1000.
- Gayathri, S.; Lakshminarayanan, R.; Weaver, J. C.; Morse, D.E.; Kini, R.M. y S. Valiyaveetil. 2007. *In Vitro Study of Magnesium-Calcite Biomineralization in the Skeletal Materials of the Seastar Pisaster giganteus*. **Chem. Eur. J.** 13: 3262-3268.
- Goetz, A.; Griesshaber, E. y W.W. Schmahl. 2010. *An Easy Approach to Increase the Precision of EBSD Analysis – Examples from a Sea Urchin Calcite Study*. **Solid State Phenomena**. 160: 229-234.
- Goodwin, A.L.; Michel, F.M.; Phillips, B.L.; Keen, D.A.; Dove, M.T. y R.J. Reeder. 2010. *Nanoporous Structures and Medium-Range Order in Synthetic Amorphous Calcium Carbonate*. **Chemistry of Materials**. 22: 3197-3205.
- Gower, L.B. 2008. *Biomimetic Model Systems for Investigating the Amorphous Precursor Pathway and Its Role in Biomineralization*. **Chem. Rev.** 108: 4551-4627.
- Hassan, Md.I.; Shajee, B.; Waheed, A.; Ahmad, F. y W.S. Sly. 2013. *Structure, function and applications of carbonic anhydrase isozymes*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 21: 1570-1582.
- Hwang, E.T.; Gang, H.; Chung, J. y M.B. Gu. 2012. *Carbonic anhydrase assisted calcium carbonate crystalline composites as a biocatalyst*. **Green Chem.** 14: 2216-2220.
- Illies, M.R.; Peeler, M.T.; Dechtiaruk, A.M. y C.A. Ettensohn. 2002. *Identification and developmental expression of new biomineralization proteins in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus**. **Dev Genes Evol** 212: 419-431.
- Killian, C. E. y F. H. Wilt. 2008. *Molecular Aspects of Biomineralization of the Echinoderm Endoskeleton*. **Chemical Reviews**. 108(11): 4463-4474.
- Killian, C.E.; Metzler, R.A.; Gong, Y.U.T.; Olson, I.C.; Aizenberg, J.; Politi, Y.; Wilt, F.H.; Scholl, A.; Young, A.; Doran, A.; Kunz, M. Tamura, N.; Coppersmith, S.N. y P.U.P.A. Gilbert. 2009.

- Mechanism of Calcite Co-orientation in the Sea Urchin Tooth.* **Journal of the American Chemistry Society.** 131(51): 18404-18409.
- Killian, C.E.; Croker, L. y F.H. Wilt. 2010. *SpSM30 gene family expression patterns in embryonic and adult biomineralized tissues of the sea urchin, Strongylocentrotus purpuratus.* **Gene Expression Patterns.** 10: 135-139.
- Kitajima, T. y H. Urakami. 2000. *Differential distributiosn of spicule matrix proteins in the sea urchin embryo skeleton.* **Develop. Growth Differ.** 42: 295-306.
- Kroh, A. y A.B. Smith. 2010. *The phylogeny and classification of post-Palaeozoic echinoids.* **Journal of Systematic Paleontology.** 8(2): 147-212.
- Lawrence, J. 1987. *A Functional Biology of Echinoids.* **The Johns Hpkins University Press.** United States of America. 340pp.
- Livingston, B.T.; Killian, C.E.; Wilt, F.; Cameron, A.; Landrum, M.J.; Ermolaeva, O.; Sapojnikov, V.; Maglott, D.R.; Buchanan, A.M. y C.A. Ettensohn. 2006. *A genome-wide analysis of biomineralization-related proteins in the sea urchin Strongylocentrotus purpuratus.* **Developmental Biology.** 300: 335-348.
- Mann, K.; Poustka, A.J. y M. Mann. 2008a. *The sea urchin (Strongylocentrotus purpuratus) test and spine proteomes.* **Proteome Science.** 6(22): 10pp.
- Mann, K.; Poustka, A.J. y M. Mann. 2008b. *In-depth, high-accuracy proteomics of the sea urchin tooth organic matrix.* **Proteome Sciences.** 6(33): 11pp.
- Mann, K.; Poustka, A. y M. Mann. 2010a. *Phosphoproteomes of Strongylocentrotus purpuratus shell and tooth matrix: identification of a major acid sea urchin tooth phosphoprotein, phosphodontin.* **Proteome Science.** 8(6): 14pp.
- Mann, K.; Wilt, F.W. y A.J. Poustka. 2010b. *Proteomic analysis of the sea urchin (Strongylocentotus purpuratus) spicule matrix.* **Proteome Science.** 8(33): 12pp.
- Märkel, K.; Röser, U. y M. Stauber. 1989. *On the ultrastructure and the supposed function of the mineralizing matrix coat of the sea urchins (Echinodermata, Echinoida).* **Zoomorphology.** 109: 79-87.
- McGrath, K. M.; Baker, M. F.; Dickinson, S. R.; Henderson, G.; MacKenzie, C. R. y S. M. Wilbanks. 2001. *Controlling calcium carbonate precipitation in the presenceof the biological and organis molecules.* **Proceeding of SPIE.** 4590: 14-25.
- McClay, D.R. y V. Matranga. 1986. *On the role of Calcium Adhesion of Embryonic Sea Urchin Cells.* **Experimental Cell Research.** 165: 152-164.
- McGrath, K.M.; Barker, M.F.; Dickinson, S.R.; Henderson, G.; Mackenzie, C.R. y S.M. Wilbanks. 2001. *Controlling calcium carbonate precipitation in the pesence of biological and organic molecules.* **Proceedings of SPIE.** 4590: 14-25.
- Mortensen, T.M. 1940. *A Monograph of the Echinoidea III₁ Aulodonta with additions to vol. II (Lepidoncentroidea and Stirodonta).* **CA. Reital Publisher.** Copenhagen. 370pp.

- Mortensen, Th. 1977. *Handbook of Echinoderms of British Isles*. Clarendon Press Oxford. Netherlands. 471pp.
- Natoli, A.; Wiens, M.; Schröder, H.M.; Stifanic, M.; Batel, R.; Soldati, A.L.; Jacob, D.E. y W.E.G. Müller. 2010. *Bio-varite formation by glycoproteins from freshwaters pearls*. **Micron**. 41: 359-366.
- Noll, H.; Alcedo, J.; Daube, M.; Frei, E.; Schiltz, E.; Hunt, J.; Humphries, T.; Matranga, V.; Hochstrasser, M.; Aebersold, R.; Lee, H. y M. Noll. 2007. *The teoposome, essential for sea urchin cell adhesion and development, is a modified iron-less calcium-binding transferrin*. **Developmental Biology**. 310: 54-70.
- Peled-Kamar, M.; Hamilton, P. y F.H. Wilt. 2002. *Spicule Matrix Protein LSM34 Is Essential for Biomineralization of the Sea Urchin Spicule*. **Experimental Cell Research**. 272: 56-61.
- Pinsino, A.; Roccheri, M.C.; Costa, C. y V. Matranga. 2011. *Manganese Interference with Calcium, Perturbs ERK Signaling, and Produce Embryones with No Skeleton*. **Toxicological Science**. 123(1): 217-230.
- Radha, A.V.; Forbez, T.Z.; Killian, C.E.; Gilbert, P.U. y A. Navrotsky. 2010. *Transformation and crystallization energetics of synthetic and biogenic amorphous calcium carbonate*. **Proceedings of the National Academy Science of the United States of America (PNAS)**. 107(38): 16438-16443.
- Red Iberoamericana de Equinodermos (RIE). 2011. *Base de datos de las especies de Equinodermos presentes en América Latina e Iberoamérica*.
- Richardson, W.; Kitajima, T.; Wilt, F. y S. Benson. 1989. *Expression of a Embryonic Spicule Matrix Gene in Calcified Tissues of Adult Sea Urchins*. **Developmental Biology**. 132: 266-269.
- Robach, J.S.; Stock, S.R. y A. Veis. 2006. *Mapping of magnesium and different protein fragments in sea urchin teeth ion mass spectroscopy*. **Journal of Structural Biology**. 155: 87-95.
- Robles-Gómez, E. 2012, *Comentarios personales*. Alumno de Doctorado. **Posgrado en Ciencias Químicas UNAM**.
- Ruppert, E.E. y R.D. Barnes. 1996. *Zoología de los Invertebrados*. McGraw-Hill Interamericana. México. 1114pp.
- Solís-Marín, F.A.; Arriaga-Ochoa, J.A.; Laguarda-Figueroa, A.; Frontana-Uribe, S.C. y A. Durán-González. 2009. *Holoturoideos (Echinodermata: Holothuroidea) del Golfo de California*. **CONABIO ICML-UNAM**. México. 177pp.
- Tapia-Ramírez, V. 2012. *Revisión Taxonómica de Equinoideos (Echinodermata: Echinoidea) del Golfo de California, México*. Tesis de licenciatura. **UNAM**. 185 pp.
- Wang, D.; Wallace, A.F.; De Yoreo, J.J. y P.M. Dove. 2009. *Carboxylated molecules regulated magnesium content of amorphous calcium carbonates during calcification*. **Proceedings of the**

- National Academy Sciences of the United States of America (PNAS)**. 106(51): 21511-21516.
- Wardi, A.H. y W.S. Allen. 1972. *Alcian Blue Staining of Glycoproteins*. **Analytical Biochemistry**. 48: 621-623.
- Wessel, G.M.; Etkin, M. y S. Benson. 1991. *Primary Mesenchyme Cells of the Sea Urchin Embryo Require an Autonomously Produced, Nonfibrillar Collagen for Spiculogenesis*. **Developmental Biology**. 148: 261-272.
- Wilt, F.H. 2002. *Biom mineralization of the Spicules of Sea Urchin Embryos*. **Zoological Science**. 19: 253-261.
- Wilt, F.H.; Killian, C.E. y B.T. Livingston. 2003. *Development of calcareous skeletal elements in invertebrates*. **Differentiation**. 71: 237-250.
- Wilt, F.; Croker, L.; Killian, C.E. y K. McDonald. 2008a. *Role of LSM34/SpSM50 proteins in the endoskeletal spicule formation in the sea urchin embryos*. **Invertebrate Biology**. 127(4): 452-459.
- Wilt, F. H.; Killian, C.E.; Hamilton, P. y L. Croker. 2008b. *The dynamics of secretion during sea urchin embryonic skeleton formation*. **Experimental Cell Research**. 314: 1744-1752.
- Wolf, S.E.; Leiterer, J.; Pipich, V.; Barrea, R.; Emmerling, F. y W. Tremel. 2011. *Strong Stabilization of Amorphous Calcium Carbonate Emulsion by Ovalbumin: Gaining Insight into the Mechanism of 'Polymer-Induced Liquid Precursor' Process*. **Journal of the American Chemical Society**. 133: 12642-12649.
- Yamasu, K. y F.H. Wilt. 1999. *Functional organization of DNA elements regulating SM30 α , a spicule matrix gene of the sea urchin embryos*. **Development, Growth and Differentiation**. 41:81-91.
- Zito, F.; Costa, C.; Sciarrino, S.; Poma, V.; Russo, R.; Angerer, L.M. y V. Matranga. 2003. *Expression of univin, a TGF- β growth factor, requires ectodermo-ECM interaction and promotes skeletal growth in the sea urchin embryo*. **Developmental Biology**. 264: 217-227.

ANEXOS

I- *Astropyga I* y sus respectivas modificaciones postraduccionales

Index Number: *Astropyga I*

pI of Protein: 6.0

Protein MW: 17371

Amino Acid Composition: A10 C4 D9 E7 F8 G11 H4 I5 K4 L11 M3 N11 P8 Q3 R10 S10 T11V11 W2 Y11

1 TEGMYLGGY TVGVRRYNTL SGVRAKTVCN QESVTKVEYY AHLPLDDMT VNSNFMPEPS PNDNAAYDAL IIDNCFYRYL
 81 HFWGTTPERG SEHTVRRDSRL GYFIQASWSV CGCNPYLG L PFDKAPALHI EDNFSLTVA R GVDQAYTSFN FRP

No	m/z (mi)	m/z (av)	Modificaciones	Comiento	Final	Missed Cleavages	Secuencia
1	808.4312	808.9179		8	15	0	 K GGYTVGVRGGYTVGVR
1	841.4124	842.0076		1	7	0	 -)TEGMYLKTEGMYLK G
1	857.4073	858.007	1 Oxidation	1	7	0	 -)TEGMYLK G
1	883.413	884.0451	1 Acetyl	1	7	0	 -)TEGMYLK G
1	899.4179	900.0445	1 Acetyl 1 Oxidation	1	7	0	 -)TEGMYLK G
1	909.4789	910.0236		17	24	0	 R YNTLSGVRYNTLSGVR A
1	964.5323	965.1065		8	16	1	 K GGYTVGVRGGYTVGVR Y
1	1065.58	1066.2122		16	24	1	 R RYNTLSGVRRYNTLSGVR A
1	1108.5303	1109.2508		27	36	0	 K TVCNQESVTKTVCNQESVTK V
1	1108.6109	1109.2781		17	26	1	 R YNTLSGVRAKYNTLSGVR K I
1	1143.5501	1144.1961		90	99	1	 R GSEHTVRDSRGSEHTVRDSR L
1	1260.6735	1261.4752		37	46	0	 K V EYAHLP LRV EYAHLP L R D
1	1307.6624	1308.5053		25	36	1	 R AKTVCNQESVTKAKTVCNQESVTK V
1	1406.6852	1407.5811		79	89	0	 R YLHFWGTTPERYLHPWGTTPER G
1	1501.707	1502.6363		141	153	0	 R GVDQAYTSFNFRPGVDQAYTSFNFRP -
1	1630.8258	1631.9027		1	15	1	 -)TEGMYLKGGYTVGVRTEGMYLKGGYTVGVR R
1	1646.8207	1647.9021	1 Oxidation	1	15	1	 -)TEGMYLKGGYTVGVR R
1	1672.8363	1673.9403	1 Acetyl	1	15	1	 -)TEGMYLKGGYTVGVR R
1	1688.8312	1689.9396	1 Acetyl 1 Oxidation	1	15	1	 -)TEGMYLKGGYTVGVR R
1	2173.0574	2174.398		79	96	1	 R YLHFWGTTPERGSEHTVRYLHFWGTTPERGSEHTV R D
1	2350.186	2351.7032		27	46	1	 K TVCNQESVTKVEYAHLP L R TVCNQESVTKVEYAHLP L R D
1	3669.5567	3672.0003		47	78	0	 R DDMTVNSNFMPEPSPNDNAAYDALIIDNCFYRDDMTVNSNFMPEPSPNDNAAYDALIIDNCFYR Y
1	3685.5516	3687.9997	1 Oxidation	47	78	0	 R DDMTVNSNFMPEPSPNDNAAYDALIIDNCFYR Y
1	3701.5465	3703.9991	2 Oxidation	47	78	0	 R DDMTVNSNFMPEPSPNDNAAYDALIIDNCFYR Y

Index Number: *Astrayga II*

pI of Protein: 5.6

Protein MW: 23471

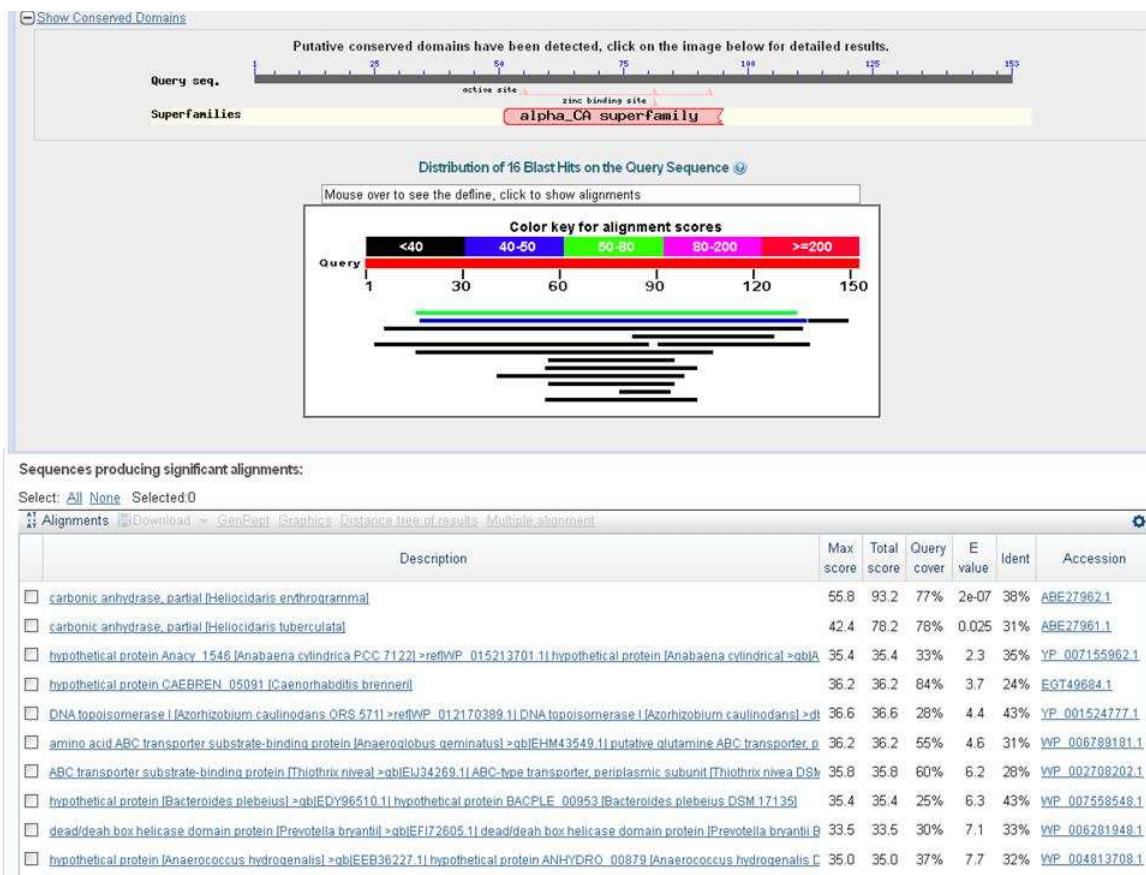
Amino Acid Composition: A17 C4 D12 E16 F8 G13 H5 I5 K10 L18 M4 N11 P9 Q10 R13 S10 T12 V12 W2 Y14

1	TVETLRQQLP	YSDALIIDNC	FYRYLHPWGT	TPSVCGCNPI	YGLPFDKAP	ALHIEDNRLG	EEFREGARQK	VQELGDLRTE
81	GMVYKGGYTV	GVRRYNTLSG	VBAKTVCNQE	STASLRQEMH	KDLEEVKQVT	KVEYYAHLPL	RDDMTEYHAK	ASEQLKALGE
161	KAVNSNNFME	PSPNDAAAYD	YFIQASWAR	VDQAYTSFNF	AYDRP			

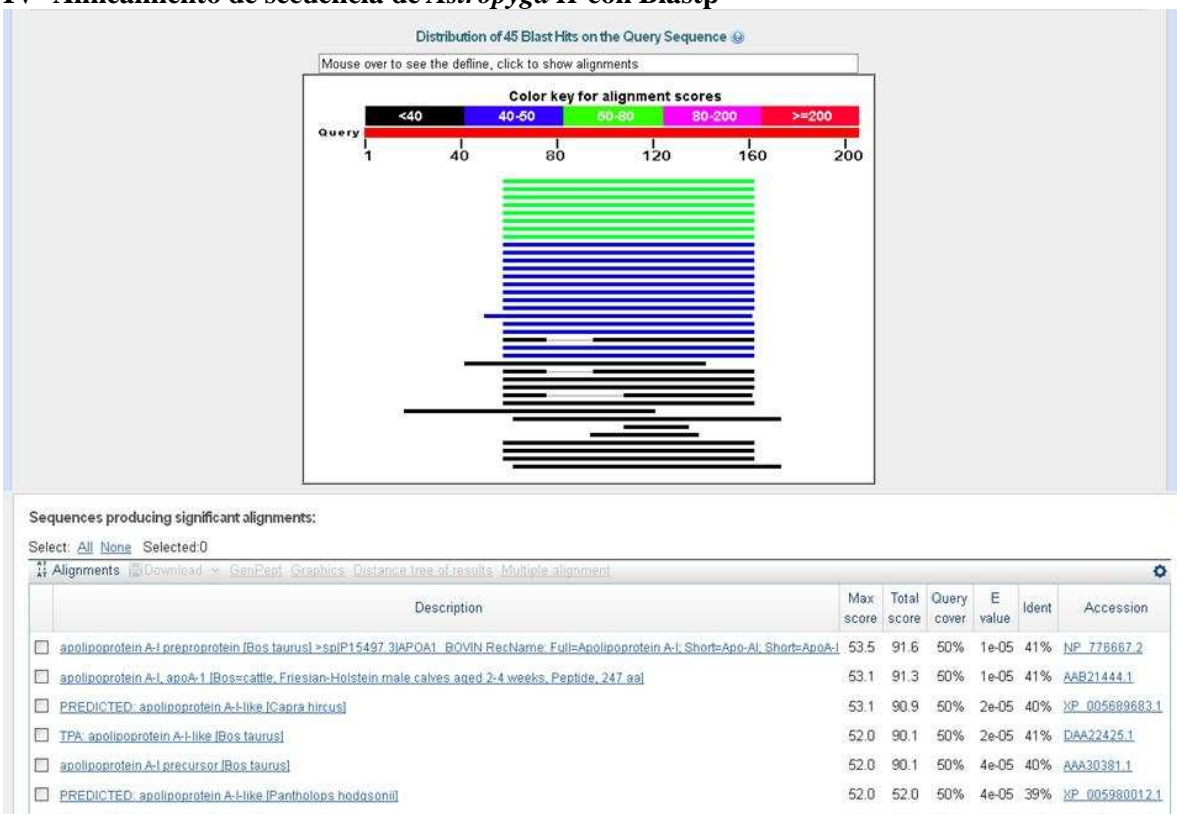
No	m/z (m)	m/z (av)	Modifications	Start	End	Missed Cleavages	Sequence
1	808.4312	808.9179		86	93	0	KIGGYTVGVRGGYTVGVR(R)
1	841.4124	842.0076		79	85	0	RITEGMYLKTEGMYLK(G)
1	857.4073	858.007	1Oxidation	79	85	0	RITEGMYLK(G)
1	909.4789	910.0236		95	102	0	RIVNTLSGVRVNTLSGVR(A)
1	929.5051	930.0549		71	78	0	KIVQELGDLRVOELGDLRIT
1	964.5323	965.1065		86	94	1	KIGGYTVGVRGGYTVGVRRI(Y)
1	1065.58	1066.2122		94	102	1	RIRVNTLSGVRVNTLSGVR(A)
1	1108.6109	1109.2781		95	104	1	RIVNTLSGVRVNTLSGVR(A)
1	1109.4568	1110.1945		142	150	0	RIDDMTYHAKDDMTYHAK(A)
1	1125.4517	1126.1939	1Oxidation	142	150	0	RIDDMTYHAK(A)
1	1163.5804	1164.2707		59	68	1	RILGEEFREGARLGEFREGAR(Q)
1	1168.6321	1169.3309	1Gln->pyro-Glu	69	78	1	RQKVOELGDLR(T)
1	1173.6474	1174.3475		151	161	1	KIVASEQLKALGEKASEQLKALGEK(A)
1	1185.6586	1186.3616		69	78	1	RQKVOELGDLRQKVOELGDLRIT
1	1188.647	1189.3592		122	131	1	KIDLEEVKQVTKDLEEVKQVTK(V)
1	1260.6735	1261.4752		132	141	0	KIVVEYAHPLRVEYAHPLR(D)
1	1308.6212	1309.4493		105	116	0	KIVTCNQESTASLRVTCNQESTASLR(Q)
1	1368.6464	1369.5455	1Gln->pyro-Glu	117	127	1	RQEMHKDLEEVK(Q)
1	1384.6413	1385.5448	1Gln->pyro-Glu	117	127	1	RQEMHKDLEEVK(Q)
1	1385.6729	1386.5761	1Oxidation	117	127	1	RQEMHKDLEEVKQEMHKDLEEVK(Q)
1	1401.6679	1402.5755	1Oxidation	117	127	1	RQEMHKDLEEVK(Q)
1	1507.7533	1508.7037		103	116	1	RIAKIVTCNQESTASLRVTCNQESTASLR(Q)
1	1630.8258	1631.9027		79	93	1	RITEGMYLKGGYTVGVRTEGMYLKGGYTVGVR(R)
1	1646.8207	1647.9021	1Oxidation	79	93	1	RITEGMYLKGGYTVGVR(R)
1	1699.9166	1700.9904	1Gln->pyro-Glu	128	141	1	KIQVTKVEYYAHLRQVTKVEYYAHLR(D)
1	1716.9432	1718.021		128	141	1	KIQVTKVEYYAHLRQVTKVEYYAHLR(D)
1	1751.8996	1753.0397		71	85	1	KIVQELGDLRTEGMYLKVOELGDLRTEGMYLK(G)
1	1765.8061	1766.9359		142	156	1	RIDDMTYHAKASEQLKDDMTYHAKASEQLK(A)
1	1767.8946	1769.0391	1Oxidation	71	85	1	KIVQELGDLRTEGMYLK(G)
1	1781.8011	1782.9352	1Oxidation	142	156	1	RIDDMTYHAKASEQLK(A)
1	1850.8344	1851.9819		190	205	0	RIGVDQAYTSFNFAYDRPGVDQAYTSFNFAYDRP(L)
1	1961.9168	1963.212		105	121	1	KIVTCNQESTASLRQEMHKVTCNQESTASLRQEMHK(D)
1	1977.9117	1979.2114	1Oxidation	105	121	1	KIVTCNQESTASLRQEMHK(D)
1	2041.9688	2043.3199	1Gln->pyro-Glu	7	23	0	RQQQLPYSDALIIDNCFYR(Y)
1	2058.9953	2060.3505		7	23	0	RQQQLPYSDALIIDNCFYRQQQLPYSDALIIDNCFYR(Y)
1	2351.1125	2352.6469		132	150	1	KIVVEYAHPLRDDMTYHAKVEYYAHLRDDMTYHAK(A)
1	2367.1074	2368.6463	1Oxidation	132	150	1	KIVVEYAHPLRDDMTYHAK(A)
1	2758.3869	2760.1607		1	23	1	(-)TVETLRQQLPYSDALIIDNCFYRVTETLRQQLPYSDALIIDNCFYR(Y)
1	2800.3974	2802.1982	1Acetyl	1	23	1	(-)TVETLRQQLPYSDALIIDNCFYR(Y)
1	3192.4116	3194.4438		162	189	0	KIAVNSNNFMESPNDNAAAYDYFIQASWARAVNSNNFMESPNDNAAAYDYFIQASWAR(G)
1	3208.4065	3210.4432	1Oxidation	162	189	0	KIAVNSNNFMESPNDNAAAYDYFIQASWAR(G)
1	3690.6918	3693.0272		157	189	1	KIALGEKAVNSNNFMESPNDNAAAYDYFIQASWARALGEKAVNSNNFMESPNDNAAAYDYFIQASWAR(G)
1	3706.6867	3709.0266	1Oxidation	157	189	1	KIALGEKAVNSNNFMESPNDNAAAYDYFIQASWAR(G)
1	3944.9251	3947.5579		24	58	0	RIVLHPWGTTSPVCGCNPIYGLPFDKAPALHIEDNRYLHPWGTTSPVCGCNPIYGLPFDKAPALHIEDNFI(L)

III- *Astrayga II* y sus modificaciones postraduccionales

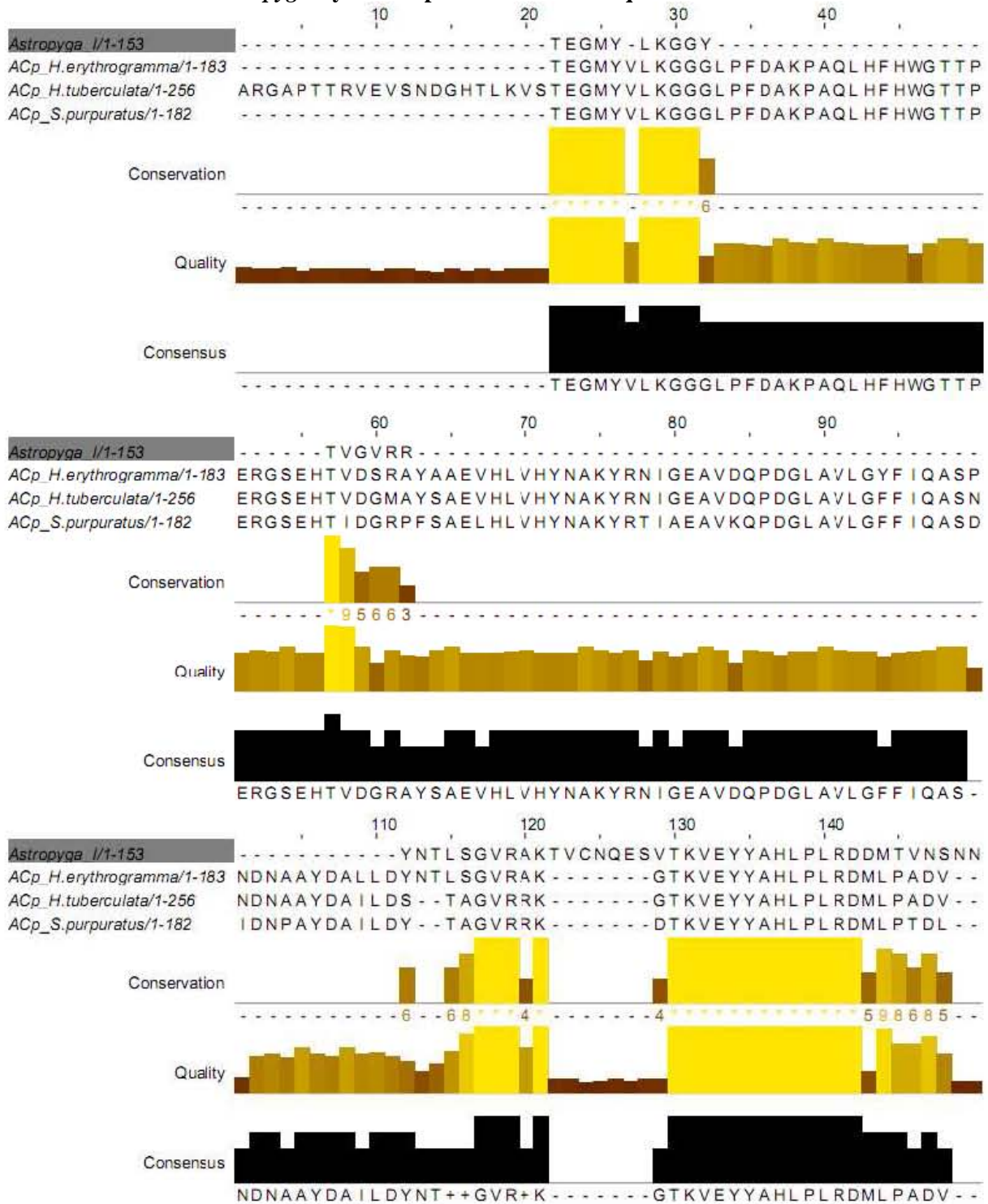
III- Alineamiento de secuencia de *Astropyga I* con Blastp



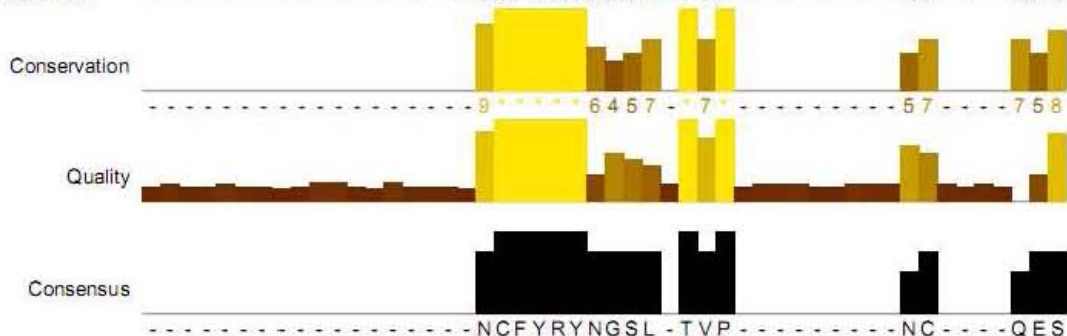
IV- Alineamiento de secuencia de *Astropyga II* con Blastp



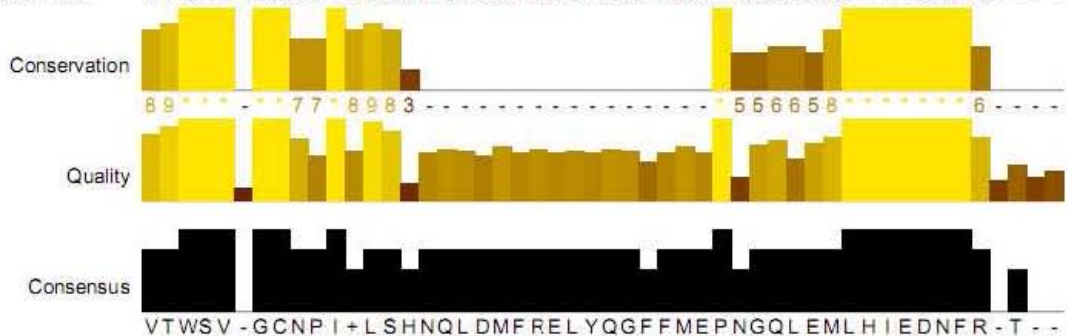
V- Alineamiento de *Astropyga I* y las AC parciales de otros equinodermos



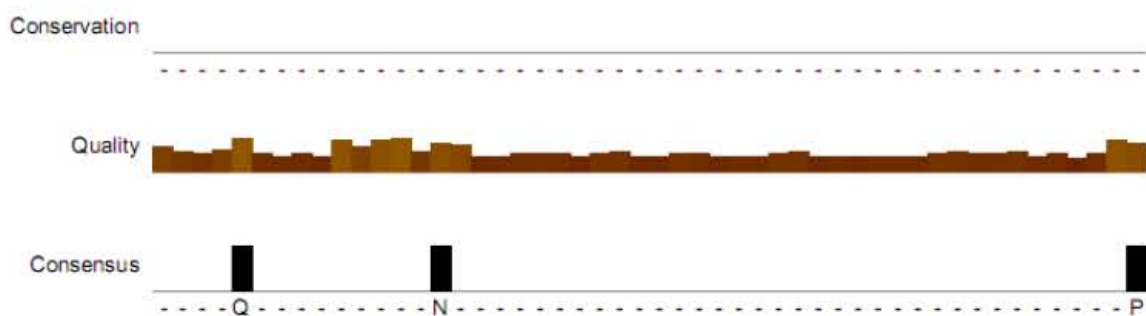
160 170 180 190
Astropyga l/1-153 FMESPNDNAAYDAL I IDNCFYRYLHFWGTTPERGSEHTVRDSRLGYF IQ
 ACp_H.erythrogramma/1-183 -----NCFYRYNGSL -TVP -----NC ----QES
 ACp_H.tuberculata/1-256 -----NCFYRYNGSL -TVP -----NC ----QES
 ACp_S.purpuratus/1-182 -----SCFYRYNGSL -TVP -----KC ----WES



210 220 230 240
Astropyga l/1-153 ASWSVCGCNP IYLGL -----PFDKPA L H IEDNFSLTVA
 ACp_H.erythrogramma/1-183 VTWSV -GCNP IYLSNQLDMFRELYQGFLMEPSGQLEMLHIEDNFR ----
 ACp_H.tuberculata/1-256 VTWSV -GCNP IHMSHNQLDMFRELYQGFFMEPNGQLEMLHIEDNFRPTQP
 ACp_S.purpuratus/1-182 VTWSV -GCGV IHL SHNQLDMFRELYQGFFMEPNGQLEMLHIEDNFR ----

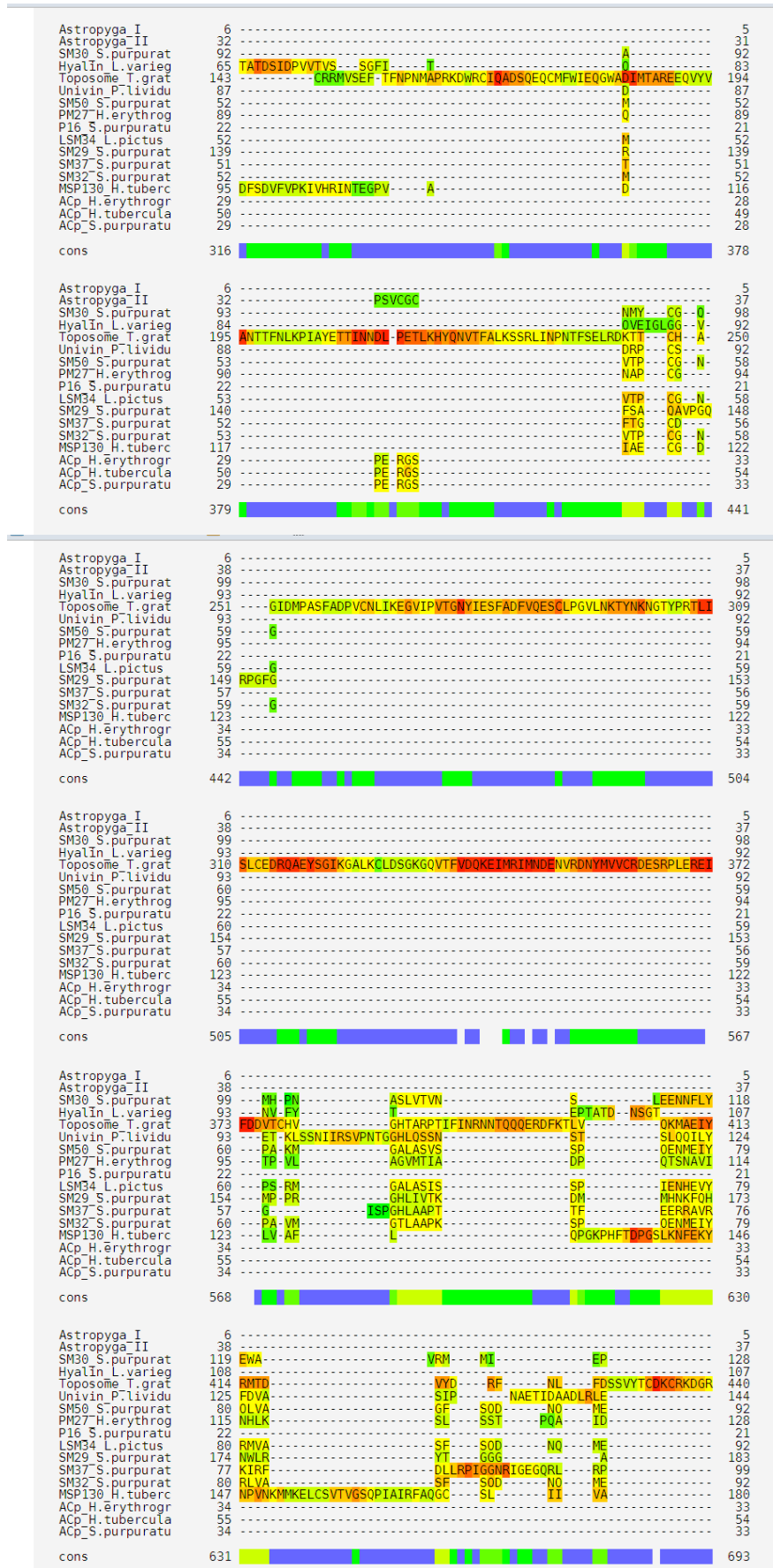


260 270 280 290
Astropyga l/1-153 RGV DQ -----AYTSFN F -----RP
 ACp_H.erythrogramma/1-183
 ACp_H.tuberculata/1-256 LYDRQVL RNVGPGRNVNPGMGF SANN SGNLL SANL FLL L SAVMAL VCRSL
 ACp_S.purpuratus/1-182 -----P

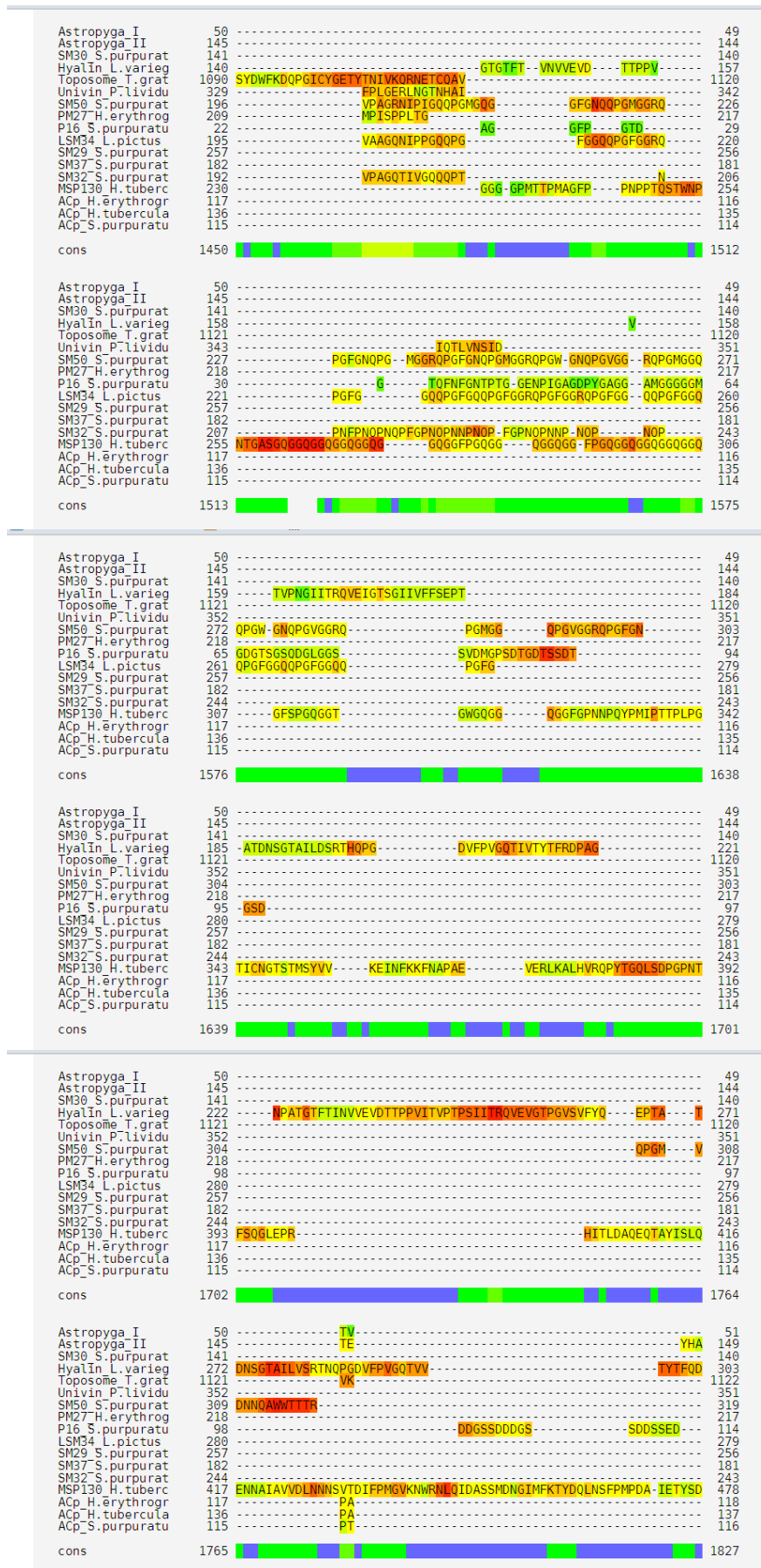


VI- Alineamiento de *Astropyga I* y *Astropyga II* con las proteínas biomineralizantes reportadas en erizo de mar





Astropyga I	6	-----	5
Astropyga II	38	-----	60
SM30_S.purpurat	129	---EPV-----	131
Hyalin_L.varieg	108	-----	107
Toposome_T.grat	441	LONKNLIFLDESNTLEILDDAKVFAGEVYAAAYNTCSQVLPKPRAKICVNTNVEYEAACRRFKGI	503
Univin_P.lividu	145	---IPA-----	147
SM50_S.purpurat	93	---NEV-----	95
PM27_H.erythrogr	129	---LPE-----	131
P16_S.purpuratu	22	-----	21
LSM34_L.pictus	93	---NEA-----	95
SM29_S.purpurat	184	---NKT-----	186
SM37_S.purpurat	100	---SNV-----	102
SM32_S.purpurat	93	---REV-----	95
MSP130_H.tuberc	181	-----	183
ACP_H.erythrogr	55	---EHTVDSRAYAAEVH-----	58
ACP_H.tubercula	55	---EHTVDGMAYSAEVH-----	58
ACP_S.purpuratu	34	---EHTIDGRPFSAELH-----	79
cons	694		756
Astropyga I	6	-----	11
Astropyga II	61	EEFREGARQKVOELGDLRTEGMYLKG-----	89
SM30_S.purpurat	132	-----	131
Hyalin_L.varieg	108	-----	107
Toposome_T.grat	504	AE-----NIPQVKNAVW-GCVLANSSMECKMAVHDNTADLFKANPDETFIAGKEFLDPLM	558
Univin_P.lividu	148	-----	147
SM50_S.purpurat	96	-----	95
PM27_H.erythrogr	132	-----	131
P16_S.purpuratu	22	-----	21
LSM34_L.pictus	96	-----	95
SM29_S.purpurat	187	-----	186
SM37_S.purpurat	103	-----	102
SM32_S.purpurat	96	-----	95
MSP130_H.tuberc	184	-----	183
ACP_H.erythrogr	59	---GE-----AVDIPDGLAVLGYFFIOA-----	77
ACP_H.tubercula	80	---AE-----AVDIPDGLAVLGFFFIOA-----	98
ACP_S.purpuratu	59	---AE-----AVKQPDGLAVLGFFFIOA-----	77
cons	757		819
Astropyga I	12	-----	11
Astropyga II	90	-----	89
SM30_S.purpurat	132	-----	131
Hyalin_L.varieg	108	-----	107
Toposome_T.grat	559	SVHRNDSVTLNHTYTRTLAVIKRSSLNQFPDILNVPEGQPKYIKDLYKLRICSAGLKNFSAFA	621
Univin_P.lividu	148	-----	147
SM50_S.purpurat	96	-----	95
PM27_H.erythrogr	132	-----	131
P16_S.purpuratu	22	-----	21
LSM34_L.pictus	96	-----	95
SM29_S.purpurat	187	-----	186
SM37_S.purpurat	103	-----	102
SM32_S.purpurat	96	-----	95
MSP130_H.tuberc	184	-----	183
ACP_H.erythrogr	78	-----	77
ACP_H.tubercula	99	-----	98
ACP_S.purpuratu	78	-----	77
cons	820		882
Astropyga I	12	-----	11
Astropyga II	90	-----	89
SM30_S.purpurat	132	-----	131
Hyalin_L.varieg	108	-----	107
Toposome_T.grat	622	NPIGYLLANGTIPRIGSVFESVNRYPSTCIPEIEPERFRFDSDLLGRELNWGFSTLMMYNF	684
Univin_P.lividu	148	-----	147
SM50_S.purpurat	96	-----	95
PM27_H.erythrogr	132	-----	131
P16_S.purpuratu	22	-----	21
LSM34_L.pictus	96	-----	95
SM29_S.purpurat	187	-----	186
SM37_S.purpurat	103	-----	102
SM32_S.purpurat	96	-----	95
MSP130_H.tuberc	184	-----	183
ACP_H.erythrogr	78	-----	77
ACP_H.tubercula	99	-----	98
ACP_S.purpuratu	78	-----	77
cons	883		945
Astropyga I	12	-----	11
Astropyga II	90	-----	89
SM30_S.purpurat	132	---WIGLHAGPI-----	140
Hyalin_L.varieg	108	-----	107
Toposome_T.grat	685	TGOEWLLWNTPTA-----TWNFLTYNRKVSNGLDIKKLIETLKRONLTSHIF	729
Univin_P.lividu	148	---LPSANSQTPSLAVRIYQLQS-----RTR-----	170
SM50_S.purpurat	96	---WLGWNSQS-----PFF-----	106
PM27_H.erythrogr	132	---WTGLHNNII-----I-----ALL-----	144
P16_S.purpuratu	22	-----	21
LSM34_L.pictus	96	---WLGWNTOS-----PRF-----	106
SM29_S.purpurat	187	---WMGLAELPS-----APESNRYF-----	203
SM37_S.purpurat	103	---WMGFRLGG-----	111
SM32_S.purpurat	96	---WLGWNSMN-----PFM-----	106
MSP130_H.tuberc	184	---VWGNNYTK-----TF-----	194
ACP_H.erythrogr	78	-----	77
ACP_H.tubercula	99	-----	98
ACP_S.purpuratu	78	-----	77
cons	946		1008
Astropyga I	12	-----	11
Astropyga II	90	-----	89
SM30_S.purpurat	141	-----	140
Hyalin_L.varieg	108	-----	107
Toposome_T.grat	730	NQNLTSAVVELLDDLVGVDGLSDLIKGLQDSISPQKORLNLRDLNSNSFPNFEVGRVTLSDK	792
Univin_P.lividu	171	-----	172
SM50_S.purpurat	107	-----	106
PM27_H.erythrogr	145	-----	144
P16_S.purpuratu	22	-----	21
LSM34_L.pictus	107	-----	106
SM29_S.purpurat	204	-----	203
SM37_S.purpurat	112	-----	111
SM32_S.purpurat	107	-----	106
MSP130_H.tuberc	195	-----	194
ACP_H.erythrogr	78	-----	77
ACP_H.tubercula	99	-----	98
ACP_S.purpuratu	78	-----	77
cons	1009		1071



Astropyga_I 52 NSN - NFM - EPS 60
 Astropyga_II 150 -KASEQLKA 172
 SM30_S.purpurat 141 LGEKA - VNSN - NFM - EPS 168
 Hyalin_L.varieg 304 WYSGEPTVY - TNWERMTPPIAEPGL 358
 Toposome_T.grat 1123 DV - VFYPEPTASONS 1124
 Univin_P.lividu 353 355
 SM50_S.purpurat 326 LGNORG 325
 PM27_H.erythrogr 218 217
 P16_S.purpuratu 115 114
 LSM34_L.pictus 280 279
 SM29_S.purpurat 257 256
 SM37_S.purpurat 182 181
 SM32_S.purpurat 244 243
 MSP130_H.tuberc 479 535
 ACP_H.erythrogr 119 119
 ACP_H.tubercula 138 138
 ACP_S.purpuratu 117 117

cons 1828 1890

Astropyga_I 61 PNDNAAYDALII - - - D - - - - - NC - - - - - 75
 Astropyga_II 173 PNDNAAYD 180
 SM30_S.purpurat 169 GA - - - - - MIFDADIIAQMFINOV - - - - - EIT - - - - - 189
 Hyalin_L.varieg 359 GTAILVT - - - - - RTNPGDFFS - - - - - VGQTVVITYTFDPTGNPA - - - - - 393
 Toposome_T.grat 1125 TCVGTPRM 1132
 Univin_P.lividu 356 355
 SM50_S.purpurat 326 325
 PM27_H.erythrogr 218 217
 P16_S.purpuratu 115 114
 LSM34_L.pictus 280 279
 SM29_S.purpurat 257 256
 SM37_S.purpurat 182 181
 SM32_S.purpurat 244 243
 MSP130_H.tuberc 536 GQAMGVEEELGRFRFSMVDGNPNPDI FDSV - - - - - YMFGGRGISAYKIDPVTRNM - - - - - 588
 ACP_H.erythrogr 120 V - - - - - NC - - - - - 122
 ACP_H.tubercula 139 L - - - - - SC - - - - - 141
 ACP_S.purpuratu 118 120

cons 1891 1953

Astropyga_I 76 75
 Astropyga_II 181 180
 SM30_S.purpurat 190 POWVPEQAINDRHALICEYHPSGMT - - - - - AAAAAAPTNAPTFPMTTAPPMAAT - - - - - 239
 Hyalin_L.varieg 394 TATVTINIVE - - - - - EDITPPTVNCINDVIRTVELGTTSAQ - - - - - VFYSE - - - - - 434
 Toposome_T.grat 1133 KKIS - - - - - VG - - - - - RFGAKQYKMKVCMCS - RPSKFRVK - - - - - 1160
 Univin_P.lividu 356 PKVCC - APTKLSG - - - - - 367
 SM50_S.purpurat 326 325
 PM27_H.erythrogr 218 217
 P16_S.purpuratu 115 HSGG - - - - - 118
 LSM34_L.pictus 280 279
 SM29_S.purpurat 257 256
 SM37_S.purpurat 182 181
 SM32_S.purpurat 244 243
 MSP130_H.tuberc 589 LAWDSGDIIE - - - - - KEIAKFYPKIFN - - - - - AA - AIYGNPRRVGPKTIN - DMRSS - - - - - 633
 ACP_H.erythrogr 123 122
 ACP_H.tubercula 142 141
 ACP_S.purpuratu 121 120

cons 1954 2016

Astropyga_I 76 75
 Astropyga_II 181 180
 SM30_S.purpurat 240 RGPV - - - - - PTASDVGOAT - - - - - LISRTAQPDSFEP - - - - - 243
 Hyalin_L.varieg 435 MAEFQ - - - - - CDNGYGY - - - - - 457
 Toposome_T.grat 1161 TSMI - - - - - VGGROPGMG - - - - - GQGVGGROPVGGGR - - - - - 1173
 Univin_P.lividu 368 371
 SM50_S.purpurat 326 349
 PM27_H.erythrogr 218 217
 P16_S.purpuratu 145 144
 LSM34_L.pictus 280 279
 SM29_S.purpurat 257 256
 SM37_S.purpurat 182 181
 SM32_S.purpurat 244 246
 MSP130_H.tuberc 634 RGPECE - - - - - SLAVGDVQGRKLI FVGIDGVSALAI FSVAPGNSTP - - - - - FAP - - - - - 674
 ACP_H.erythrogr 123 122
 ACP_H.tubercula 142 141
 ACP_S.purpuratu 121 120

cons 2017 2079


Astropyga_I 76 FYRYLHFNGTTPERGESETVRDSRLGYFIOASWSVCGCNPIYLGU - - - - - 120
 Astropyga_II 181 YFIOASW - - - - - 187
 SM30_S.purpurat 244 243
 Hyalin_L.varieg 458 457
 Toposome_T.grat 1174 KPVTITACECPCEELIEYNAS - FTQDOM - - - - - WKNVSN - - - - - QYHLTG - E - - - - - 1215
 Univin_P.lividu 372 371
 SM50_S.purpurat 350 Q - - - - - 350
 PM27_H.erythrogr 218 217
 P16_S.purpuratu 145 144
 LSM34_L.pictus 280 279
 SM29_S.purpurat 257 256
 SM37_S.purpurat 182 181
 SM32_S.purpurat 247 246
 MSP130_H.tuberc 675 674
 ACP_H.erythrogr 123 FYRYNGS - LTVPNC - - - - - OESVTWSV - GCNPIYLSNNO - - - - - 154
 ACP_H.tubercula 142 FYRYNGS - LTVPNC - - - - - OESVTWSV - GCNPIHSHNO - - - - - 173
 ACP_S.purpuratu 121 FYRYNGS - LTVPKG - - - - - WESVTWSV - GCGVIHLSHQ - - - - - 152

cons 2080 2142

Astropyga_I 121 120
 Astropyga_II 188 187
 SM30_S.purpurat 244 243
 Hyalin_L.varieg 458 458
 Toposome_T.grat 1216 QDVYRQIP - - - - - IWG - NNSFFYNHS - - - - - N - - - - - 1235
 Univin_P.lividu 372 371
 SM50_S.purpurat 351 PGFGNQPGVGGROPGMGGQPVMGGQPVGGRQPMGGROPFGFNOPGV - - - - - A - - - - - 399
 PM27_H.erythrogr 218 218
 P16_S.purpuratu 145 145
 LSM34_L.pictus 280 GQOPG - - - - - FGGQPFGGGQPGFGGG - - - - - N - - - - - 392
 SM29_S.purpurat 257 256
 SM37_S.purpurat 182 181
 SM32_S.purpurat 247 NOPT - - - - - I - - - - - PNR - NQFETPNQ - - - - - YESIFRO - - - - - 263
 MSP130_H.tuberc 675 682
 ACP_H.erythrogr 155 LDMFREL - - - - - 161
 ACP_H.tubercula 174 LDMFREL - - - - - 180
 ACP_S.purpuratu 153 LDMFREL - - - - - 159

cons 2143 2205

Astropyga_I	121	-----	-----	120
Astropyga_II	188	-----	-----	187
SM30_S.purpurat	244	-----	-----	250
Hyalin_L.varieg	459	GATVW - TYIFGDNAGNIADP	-----	C 478
Toposome_T.grat	1236	LKNKFEI -	-----	1242
Univin_P.lividu	372	-----	YFI -----	374
SM50_S.purpurat	400	CG - RC - PGMG QQPNNPN	-----	NP 417
PM27_H.erythrogr	219	T - TN - PGMG	-----	226
P16_S.purpuratu	146	GAV -	-----	148
LSM34_L.pictus	303	P - QR - PGMG	-----	310
SM29_S.purpurat	257	-----	-----	256
SM37_S.purpurat	182	-----	-----	181
SM32_S.purpurat	264	P - NN - PNOPN	-----	271
MSP130_H.tuberc	683	GKIGANYK - FLYEGRK TGDLSPESLTFIPPEK SQANKP LLLV TGRVSGTVSMYEIVDPVY W	-----	743
ACP_H.erythrogr	162	-----	-----	161
ACP_H.tubercula	181	-----	-----	180
ACP_S.purpuratu	160	-----	-----	159

cons 2206  2268

Astropyga_I	121	-----	-----	131
Astropyga_II	188	-----	PFDAKPALHIE -----	187
SM30_S.purpurat	251	-----	NLV - NS -----	264
Hyalin_L.varieg	479	VETITVNTVD TIPTIVNCVS - DVV - RV -----	LTGGRF GG S -----	512
Toposome_T.grat	1243	GNH - SVLV - EHVQT VVVENPVGVISQLNTEVD PEDRV	-----	1277
Univin_P.lividu	375	NNE - NVVL - RO -----	YEDI -----	387
SM50_S.purpurat	418	NPNPNPN - PNNP - NPRFNRP PN -----	LI -----	439
PM27_H.erythrogr	227	L - VETPAR VVDGV - IQ -----	FENGL -----	245
P16_S.purpuratu	140	VAA GVGYEV - RK -----	RNG -----	165
LSM34_L.pictus	311	Q - PNSP - NPRFNRP PN -----	LQA -----	328
SM29_S.purpurat	257	-----	L -----	259
SM37_S.purpurat	182	-----	MG -----	183
SM32_S.purpurat	272	T - PNTP - NRP NO -----	PI -----	283
MSP130_H.tuberc	744	LLK LGTDIEGSX - TSVTSSA - VSIF - FA -----	FLSGX -----	774
ACP_H.erythrogr	162	-----	YOG LFME - P SGOLEM -----	175
ACP_H.tubercula	181	-----	YOG FFME - P NGOLENLHIE -----	198
ACP_S.purpuratu	160	-----	YOG FFME - P NGQLEN -----	173

cons 2269  2331

Astropyga_I	132	-----	-----	136
Astropyga_II	188	-----	DNFSL -----	187
SM30_S.purpurat	265	LLHEIPRR RRMRPSNYRKNPYE -----	-----	286
Hyalin_L.varieg	513	VVYTEPT - ATDISGT -----	-----	526
Toposome_T.grat	1278	LMD - TANITK TCE SVWTGQSWLP -----	ERFONYKTTG SCVVPEY -----	1316
Univin_P.lividu	388	VVEA -----	-----	391
SM50_S.purpurat	440	-----	FA -----	441
PM27_H.erythrogr	246	MRDG -----	-----	250
P16_S.purpuratu	166	ATH -----	-----	168
LSM34_L.pictus	329	ETD -----	-----	331
SM29_S.purpurat	260	QY -----	-----	261
SM37_S.purpurat	184	AAVH -----	-----	187
SM32_S.purpurat	284	OP -----	-----	285
MSP130_H.tuberc	775	FAV -----	-----	777
ACP_H.erythrogr	176	-----	-----	175
ACP_H.tubercula	199	-----	DNFRP TQPLYDROVLRNG -----	226
ACP_S.purpuratu	174	-----	VPGRNVNPGM -----	173

cons 2332  2394

Astropyga_I	137	-----	TV - ARGVDD AYTS - FNFR -----	153
Astropyga_II	188	-----	ARGVDD AYTSFN - FA YDRP -----	205
SM30_S.purpurat	287	-----	-----	GIOP 290
Hyalin_L.varieg	527	-----	-----	ASLV 530
Toposome_T.grat	1317	GRNLR SRVSRFRE - INQRF - GE - RENYW -----	-----	1344
Univin_P.lividu	392	-----	-----	CCCR 395
SM50_S.purpurat	442	-----	-----	DALA 445
PM27_H.erythrogr	251	-----	-----	VGG 254
P16_S.purpuratu	169	-----	-----	LONA 172
LSM34_L.pictus	332	-----	-----	VTGS 335
SM29_S.purpurat	262	-----	-----	CYKY 265
SM37_S.purpurat	188	-----	-----	CEIR 191
SM32_S.purpurat	286	-----	-----	RLFO 289
MSP130_H.tuberc	778	-----	-----	YMRX 781
ACP_H.erythrogr	176	-----	LV - IEDNFR -----	183
ACP_H.tubercula	227	GFSANN SGNLLSANLFLLLSAV - LV - LVGRSL -----	-----	256
ACP_S.purpuratu	174	-----	LIEDNFR -----	182

cons 2395  2427