



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

“Aislamiento, purificación y caracterización de una fosfolipasa en
Palythoa caribaeorum.”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
MIGUEL CUEVAS CRUZ

TUTOR PRINCIPAL
DR. ROBERTO ALEJANDRO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM.

COMITÉ TUTOR
DRA. SILVIA ELENA CASTILLO BLUM
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

DR. EDGAR ZENTENO GALINDO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. JOSÉ ESTUARDO LOPÉZ VERA I
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM

DRA. NURIA VICTORIA SÁNCHEZ PUIG
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

MÉXICO, D. F. ENERO 2015



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.

**“Vive como si fueras
a morir mañana. Aprende
como si fueras a vivir
siempre”.**

Mahatma Gandhi

AGRADECIMIENTOS

INSTITUCIONALES

Al consejo nacional para la ciencia y tecnología (CONACYT) por la beca otorgada.

Al posgrado de Ciencias del Mar y Limnología por la oportunidad brindada para realizar mis estudios de maestría.

A la Universidad Nacional Autónoma de México formarme a lo largo de estos años.

PERSONALES

A mi mamá por su amistad, cariño y apoyo en todo lo que me he propuesto a lo largo de mi vida.

A mi papá por ser el ejemplo a seguir siempre, por su amor y sobre todo por estar siempre conmigo en todo momento pero sobre todo en los momentos más difíciles de mi vida.

A mis hermanas y cuñados por su amistad, su cariño y por permitiré formar parte de sus vidas, gracias por todo.

A mis sobrinos por ser la luz en mi vida y enseñarme que la vida puede brindarnos un mejor futuro.

A mis amigos de toda la vida: Felipe, Paco, Pepe Torres, Viri, Ale y Olivier por su amistad a lo largo de todos estos años.

A mis amigos de la universidad: Luis, Said, Héctor, Javi, Dulce, Ale, Hugo, Julieta Sandy y Joel por su amistad y estar siempre conmigo sobre todo en los peores momentos de mi vida, gracias por todo.

A mis amigos del Posgrado: Germán, Clau, Erick, Diana, Perla, Pavel, Hupna, Carlos, Barbará y Xóchitl.

A mis amigos del Instituto de Química: Pablo, Edson, Citlali, Sergio, Juan Pablo, Cin, Abi, Gris, Ari, Silvestre, Norma, Erick, Daniel, Dulce, Esteban, Fer, Magi y Lalo, gracias por su amistad, enseñanzas y críticas a lo largo de estos años.

COMITÉ TUTORAL

A mi comité tutorial, por todo su apoyo durante este trabajo de maestría, por haber estado siempre atentos en esta investigación y dar su buena crítica.

Al Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros, tutor principal de esta tesis. Le agradezco por la oportunidad de formar parte de su grupo, por todas las enseñanzas dadas y sobre por brindarme su apoyo y amistad en todo momento.

A la Dra. Silvia Elena Castillo Blum, por todas sus enriquecedoras charlas, críticas y su apoyo en todo.

Al Dr. José Estuardo López Vera, por su amistad, sus comentarios puntuales y acertados. Aprecio el tiempo que me ha brindado.

A la Dra. Nuria Victoria Sánchez Puig, por sus contribuciones al trabajo experimental, por haber estado siempre atenta en esta investigación.

Al Dr. Edgar Zenteno Galindo, por su severidad, su buen juicio y darme muchas lecciones.

Al Dr. Benjamín Velasco Bejarano, por su amistad a lo largo de estos años, sus críticas y por su apoyo en todo.

Sin ellos la culminación del presente trabajo no hubiera sido posible.

Índice de contenido

Índice de ilustraciones.....	1
Índice de tablas.....	2
Índice de abreviaturas.....	3
Resumen.....	5
1. ANTECEDENTES.....	6
1.1 Organismos marinos.....	6
1.2 Cnidarios.....	6
1.3 <i>Palythoa caribaeorum</i>	9
1.4 Venenos aislados de organismos marinos.....	11
1.5 Enzimas.....	12
1.6 Fosfolipasas.....	14
1.6.1 Fosfolipasa A ₁	15
1.6.2 Fosfolipasa B.....	16
1.6.3 Fosfolipasa C.....	16
1.6.4 Fosfolipasa D.....	16
1.6.5 Fosfolipasa A ₂	17
2. JUSTIFICACIÓN.....	24
3. OBJETIVOS.....	25
4. HIPÓTESIS.....	26
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
5.1 Colecta de material biológico.....	27
5.2 Desarrollo experimental.....	27
5.3 Metodología.....	28
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
7. CONCLUSIONES.....	45
8. PRESPECTIVAS.....	46
9. REFERENCIAS.....	47
10. ANEXOS.....	53

Índice de ilustraciones.

Figura 1 Etapas de vida de Cnidarios.....	7
Figura 2 Esquema de un nematocisto.....	7
Figura 3 Estructura de la palitoxina	8
Figura 4 <i>Palythoa caribaeorum</i>	10
Figura 5 Clasificación de fosfolipasas	15
Figura 6 Mecanismo catalítico de las sPLA ₂ s.....	22
Figura 7 Sistema Arrecifal Veracruzano	27
Figura 8 Diagrama de flujo del procedimiento experimental	28
Figura 10 Prueba cualitativa de actividad fosfolipasa A ₂	34
Figura 11 Cromatograma de intercambio catiónico fracción 30 kDa.	35
Figura 12 Cromatograma de exclusión molecular fracción 3	37
Figura 13 Espectro de Masas de muestra 3d.	38
Figura 14 Alineamiento enzima 3c	42
Figura 15 Alineamiento enzima 3d	44

Índice de tablas.

Tabla 1 Rendimiento en peso seco de extracto crudo	33
Tabla 2 Actividad específica en fracción mayor a 30 kDa	36
Tabla 3 Actividades específicas en fracción CIC3.....	37
Tabla 4 Resumen de Purificación de enzima 3c	39
Tabla 5 Resumen de Purificación de enzima 3d.	39
Tabla 6 Alineamiento de secuencia de proteína 3c	41
Tabla 7 Alineamiento de secuencia de proteína 3d.....	44

Índice de abreviaturas.

Ácido araquidónico	AA
Ácido desoxirribonucleico	ADN
Ácido ribonucleico	ARN
Ácido oleico	AO
Base de datos de proteínas	PDB
Factor de necrosis tumoral alfa	TNF α
Fosfolipasa A ₁	PLA ₁
Fosfolipasa A ₂	PLA ₂
Fosfolipasa A ₂ citosólica	cPLA ₂
Fosfolipasa A ₂ degradantes de los mediadores autocoides conocidos como factores activadores plaquetarios	PLA ₂ -PAF-AH
Fosfolipasa A ₂ independiente de calcio	iPLA ₂
Fosfolipasa A ₂ lisosomal calcio-independiente	L-PLA ₂
Fosfolipasa A ₂ secretora	sPLA ₂
Fosfolipasa B	PLB
Fosfolipasa C	PLC
Fosfolipasa D	PLD
Guanosina-5'-trifosfato	GTP
Interferón gamma	IFN- γ
Interleucina 1	IL-1
Interleucina 6	IL-6
Nicotinamida adenina dinucleótido	NADH
Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato	NADPH
No determinado	ND
Potencial de hidrógeno	pH

Resonancia magnética nuclear	RMN
Síndrome de inmunodeficiencia humana	SIDA
Trifosfato de Adenosina	ATP
Unión Internacional de Química Pura y Aplicada	IUPAC

Resumen.

El crecimiento de evidencias científicas en las últimas décadas han revelado que muchas moléculas de origen peptídico y proteico que forman parte de venenos tienen como objetivo perturbar los procesos fisiológicos mediante la unión a receptores, canales iónicos, o enzimas. Una de estas moléculas identificadas en los venenos son las fosfolipasas A₂, que además de su función catalítica primaria, pueden poseer otros tipos de actividades biológicas tales como hemorrágica, miotóxica, hemolítica, formación de edema, hipotensora, neurotóxica, cardiotoxica y agregación plaquetaria.

En este trabajo se planteó como objetivo el aislamiento, purificación y caracterización bioquímica de una fosfolipasa en el veneno de *Palythoa caribaeorum*, un zoántido que habita en el Golfo de México.

En el veneno se encontró la presencia de fosfolipasas y se pudieron extraer dos, las cuales fueron obtenidas a partir de un primer paso de ultrafiltración y posteriormente una serie de técnicas de cromatografía que incluyen una cromatografía de intercambio catiónico y una cromatografía de exclusión molecular.

Se determinó la actividad específica de las dos fosfolipasas obtenidas, el valor más alto de actividad específica fue de 10.92 que corresponde a la fosfolipasa denominada “3c” con respecto al valor de 5.58 obtenido para la fosfolipasa “3d”.

La masa molecular obtenida para la fosfolipasa 3c es de 14,653 Da, esta tiene 3 residuos de cisteína y pueden formar un puente de disulfuro. Al realizar el estudio bioinformático se puede observar que esta estructura posee una similitud con otra fosfolipasa A₂ reportada en *Acanthaster planci*. Para la muestra 3d la masa molecular es de 16,617 Da, esta muestra contiene 12 residuos de cisteína los cuales pueden llegar a formar hasta 6 puentes de disulfuro, al realizar el análisis bioinformático podemos observar que esta presenta similitud con dos fosfolipasas A₂ reportadas en *Conus magus*.

1. ANTECEDENTES

1.1 Organismos marinos

Las especies marinas representan, aproximadamente la mitad de la biodiversidad del planeta y se calcula que el mar contiene alrededor de 10 millones de especies de las que apenas se conoce una pequeña parte (Norse, 1995). Hasta ahora en los estudios en organismos marinos se han aislado una gran variedad de compuestos químicos incluidos fenoles, terpenoides, alcaloides, poliésteres y otros metabolitos secundarios los cuales están presentes en esponjas, bacterias, dinoflagelados, algas, etc. Además se han podido aislar péptidos biológicamente activos que cuentan con diversas actividades, incluyendo agonistas opiáceos, inmunomoduladores, antimicrobianos, antioxidantes, hipocolesterolémicos, antitrombóticos, antihipertensivos, anticancerígenos, antitumorales y antiproliferativos (Suárez *et al*, 2012).

1.2 Cnidarios

Los Cnidarios es un gran Phylum que está conformado por animales tóxicos que habitan sistemas acuáticos, la mayoría en ambientes marinos; estos animales tienen la capacidad de producir toxinas al igual que algunos organismos terrestres (*e.g.*, serpientes, escorpiones, arañas) u otros organismos marinos (*e.g.*, *Conus sp.*) (Turk and Kem, 2009). Hasta el día de hoy se han descrito poco más de 20,000 especies. Los Cnidarios presentan: a) simetría radial; b) contiene sólo dos capas de células, ectodermo (epidermis) que cubre el exterior de la superficie del cuerpo y el endodermo (gastrodermis) que cubre la cavidad del cuerpo; y c) una mesoglea que es una matriz no celular, elástica y homogénea que se localiza entre las dos capas antes mencionadas. Estos organismos son principalmente depredadores, después de digerir sus alimentos, los materiales indigeribles son eliminados por la boca al ambiente.

Las especies del Phylum generalmente muestran etapas de vida tanto de pólipo como medusoide, la etapa medusoide es responsable de la reproducción sexual (**figura 1**). Por el contrario, las anémonas de mar, los corales blandos y las plumas de mar (Anthozoa) muestran únicamente la etapa de pólipos sésiles que se reproducen sexualmente, como asexualmente.

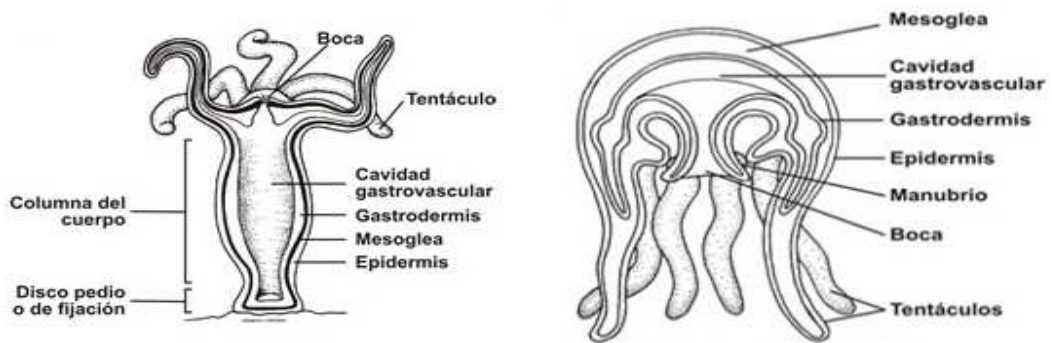


Figura 1 Etapas de vida de Cnidarios. Del lado izquierdo de la imagen se presenta la forma de pólipo mientras que del lado derecho la forma medusoide. Imagen obtenida de <http://www.asturnatura.com/articulos/cnidarios/general.php>

Una característica distintiva del Phylum es que contiene la presencia de nematocistos u orgánulos urticantes. Cada nematocisto está encerrado en una célula llamada cnidocito y es una especie de cápsula ovoide, que contiene un filamento enrollado que al ser tocado o estimulado químicamente se proyecta bruscamente atravesando o enredando a su posible presa o agresor e inoculando en éste sustancias tóxicas (*figura 2*). Las cápsulas individuales no alcanzan más allá de un milímetro de longitud, pero las sustancias que contienen resultan muy potentes lo cual juega un papel muy importante en la obtención del alimento, defensa contra los depredadores y adhesión al sustrato durante la locomoción en el estadio de pólipo. Existen 28 tipos de cnidocitos descubiertos hasta ahora, y se dividen en tres subcategorías: nematocistos (25 tipos), espirocistos (2) y pticocistos (1) (Mariscal *et al.* 1977).

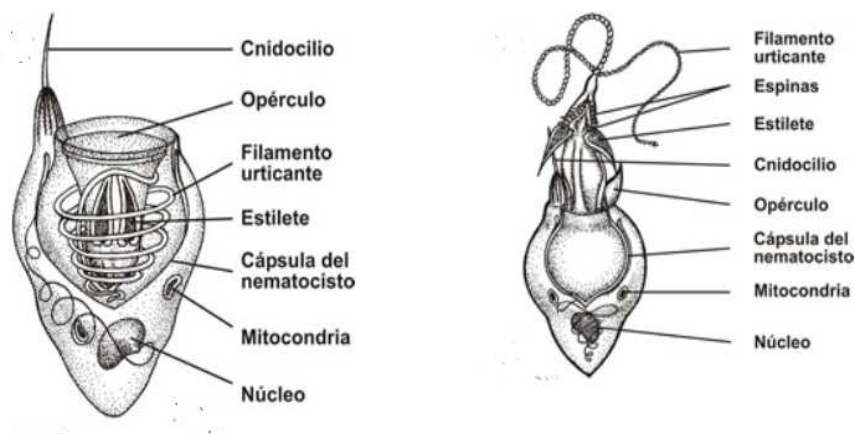


Figura 2 Esquema de un nematocisto, del lado izquierdo se observa el nematocisto antes de ser disparado, mientras del lado derecho se observa el nematocisto después de ser disparado. . Imagen obtenida de <http://www.asturnatura.com/articulos/cnidarios/general.php>

Debido a que las presas de las anémonas (pólipos), a diferencia de éstas, presentan mayor movilidad y pueden desplazarse en diferentes direcciones, las anémonas han desarrollado una gran variedad de sustancias tóxicas que sean capaces de causar una parálisis rápida en sus posibles víctimas. La única clase de cnidarios que probablemente carece de un veneno tóxico es el Myxozoa, un grupo de aproximadamente 2,000 animales pequeños parásitos que recientemente se ha demostrado que pertenecen a este Phylum.

El Phylum Cnidaria comprende animales acuáticos bentónicos y pelágicos, incluyendo las clases Hydrozoa (hidroides, corales de fuego), Scyphozoa (medusas), Cubozoa (medusas caja), Anthozoa (corales duros, corales blandos, plumas de mar, anémonas de mar) , Staurozoa (stauromedusas) y Polypodiozoa (cnidarios parásitos) (World Register of Marine Species, 2014) .

Una de las clases más estudiadas dentro del Phylum son los de la clase Anthozoa en particular organismos del orden Zoanthidea (Zoántidos) debido a que presentan algunas moléculas tóxicas como la palitoxina (*figura 3*) que es una neurotoxina de origen no peptídico, la cual es una de las toxinas más potentes que se conocen, superada únicamente por la maitotoxina, que produce un dinoflagelado.

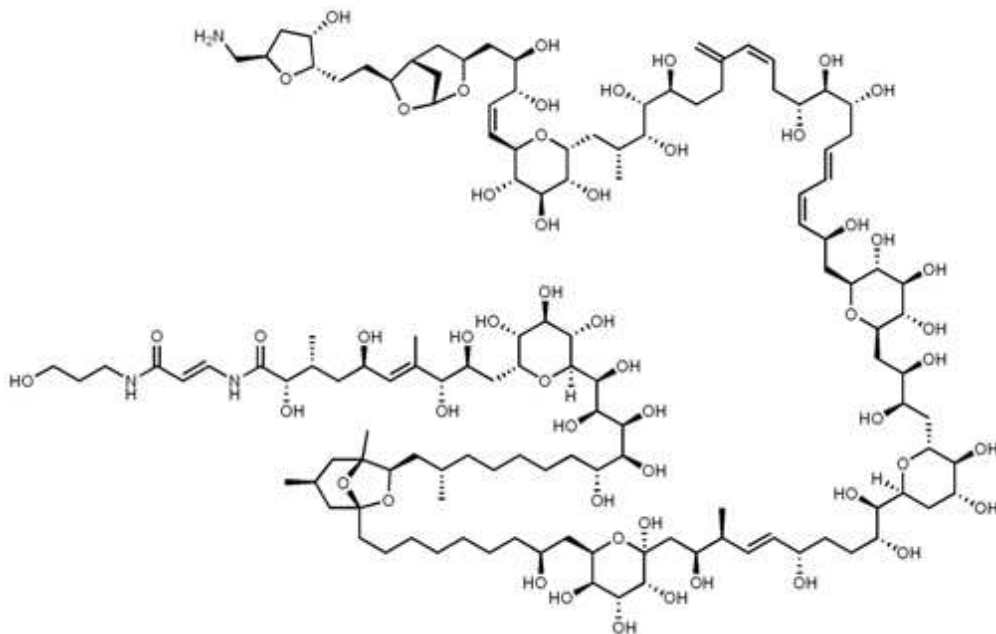


Figura 3 Estructura de la palitoxina, en la cual se puede observar la gran complejidad estructural de esta molécula por su gran número de centros asimétricos. Imagen obtenida de: http://biomedicinaemacao-unip.blogspot.mx/2011_06_01_archive.html

Los Zoántidos tienen apariencia muy similar a las anémonas, pero son considerablemente más pequeños son depredadores muy antiguos y sésiles que dependen para su supervivencia en gran medida a su veneno, se han encontrado fósiles que datan del Precámbrico hace aproximadamente 550 millones de años (Chen *et al.*, 2002). Por lo general no son mayores al centímetro y se presentan formando colonias de individuos, no obstante existen algunas especies que viven en solitario.

El disco oral se presenta libre de tentáculos a excepción de dos anillos alrededor del borde exterior, que visualmente los distingue de otros animales como las anémonas. Poseen un amplio rango de colores. Al igual que en otros casos, los colores llamativos suelen advertir potencial tóxico hacia sus depredadores.

En la naturaleza se localizan en zonas de alta iluminación y corriente, ligados a sedimentos que utilizan para alimentarse y para su crecimiento estructural. Entre las colonias de Zoántidos se encuentran en asociación otro tipo de organismos como esponjas, cangrejos, gambas y estrellas, etc.

Los estudios químicos de Zoántidos se han basado principalmente al estudio de palitoxinas (Moore & Bartolini, 1981) como se mencionó anteriormente, además del estudio de zoanthoxantinas (Prota, 1980; Chevolut, 1981), micosporinas (Hirata *et al.*, 1979) y actinoporinas. En comparación con la poca atención que se le ha dado al estudio de otros compuestos como esteroides (Kelecom and Solé-Cava, 1982), ácidos grasos, hemolisinas, etc.

1.3 Palythoa caribaeorum

Es una de las especies dentro del orden *Zoanthidea* y se encuentra ampliamente distribuida en las costas de Bermuda, México, Brasil, Cuba, Venezuela, Jamaica, Puerto Rico, Antillas Holandesas, Islas Vírgenes, Panamá, Montserrat y el sur de Florida. (Duerden. J. E., 1902; Varela *et al.*, 2002; World Register of Marine Species, 2014). Es una especie colonial que forma gruesos mantos incrustantes. El cuerpo está compuesto por grandes cálices circulares rodeados por labios redondeados cortos. Los pólipos carnosos tienen tentáculos sólidos y redondeados dispuestos en dos anillos. Los discos orales (mayores de 1,3 cm.) se presionan unos a otros cuando están totalmente expandidos., con una consistencia parecida al corcho. Presentan una coloración de blanca a marrón y a veces amarillenta, por lo cual es comúnmente llamado "Coral Blando Amarillo".

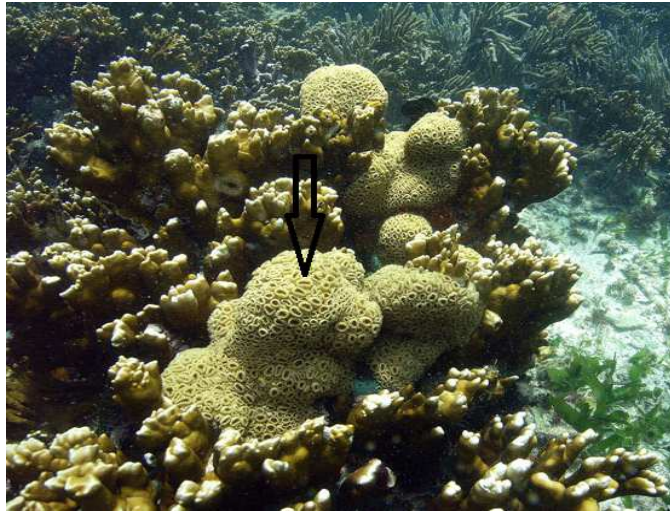


Figura 4 *Palythoa caribaeorum* Foto tomada por Juan Pedro Ruiz Allais

TAXONOMÍA

Reino Animalia

Phylum Cnidaria Verrill, 1865

Clase Anthozoa Ehrenberg, 1834

Subclase Hexacorallia Haeckel, 1896

Orden Zoantharia Gray, 1832

Familia Sphenopidae Hertwig, 1882

Género *Palythoa* Lamouroux, 1816

Especie *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860) (WORMS, 2013).

El primer registro que se llevó a cabo de esta especie fue en 1860, donde Eduard Placide Duchassaing de Fonbressin y Giovanni Michelotti publicaron dos monografías que enumeran 409 especies de Cnidaria recogidos en la región del Caribe, 208 de las cuales eran nuevas para la ciencia.

P. caribaeorum es un competidor muy agresivo por el espacio, ya que mata o inhibe el crecimiento de casi todos los demás invertebrados sésiles del arrecife, como los corales de fuego, esponjas y gorgonias (Suchánek and Green, 1981; Acosta, 2001). Además este organismo cuando se trata de

defenderse produce palitoxina, que mantiene a la mayoría de los depredadores a su debida distancia, aunque es presa de unos pocos invertebrados como son gusanos poliquetos y estrellas de mar (Mebs, 1998) y de pocas especies de peces arrecifales que se han registrado en el Caribe (Suchánek and Green, 1981; Francini-Filho and Moura, 2010). Esta especie es un gran depredador que posee una amplia gama de toxinas presentes en su veneno debido a que es un organismo sésil y el efecto del veneno debe ser instantáneo.

1.4 Venenos aislados de organismos marinos

Los venenos animales han sido identificados en distintos phyla incluyendo Cnidaria, Plathelmintha, Annelida, Arthropoda, Mollusca, Echinodermata y Chordata.

Los venenos (toxinas) se producen en abundancia para facilitar no solo la captura y digestión de presas, sino también para evitar la depredación en el caso de los organismos sésiles, los cnidarios son un ejemplo de éxito en la subsistencia en hábitats altamente competitivos por más de cientos de millones de años, además no es sorprendente encontrar numerosas invenciones celulares sofisticadas como los cnidocitos (Gershwin, *et al.*, 2013). Las toxinas de animales por lo general tienen como objetivo alterar procesos fisiológicos mediante la unión a receptores, canales iónicos, o enzimas. Además animales de distintos phyla producen toxinas que ejercen funciones estrechamente relacionadas. Por ejemplo, las serpientes (Chordata), escorpiones (Arthropoda), caracoles *Conus* (Mollusca) y anémonas marinas (Cnidarios) sintetizan toxinas que bloquean canales de potasio. Además algunas toxinas con plegamientos diferentes y con funciones similares también se pueden encontrar en venenos de animales filogenéticamente distintos. (Ménez, 1998).

En las primeras décadas del siglo XX era prácticamente imposible aislar y caracterizar químicamente las toxinas de los venenos, ya que las técnicas para aislar estos productos naturales apenas existían, además nadie tenía ideado un método eficiente para la obtención de veneno. Sin embargo, el fisiólogo francés Richet, purificó y estudió parcialmente 2 componentes activos del extracto tentacular de las anémonas de mar de origen Europeo *Actinia equina* y *Anemonia sulcata* a los cuales nombro "congestine" y "thalassine". (Richet, 1903^{a,b}) respectivamente. Posteriormente se encontró que la thalassine libera histamina de los mastocitos. En 1906 el químico ruso Tswett demostró la utilidad de realizar cromatografía en columna para la separación de algunas moléculas pequeñas (carotenoides), posteriormente este método se utilizó también para el aislamiento y purificación de péptidos y

proteínas de venenos. Sin embargo en el primer simposio sobre toxinas marinas se reveló que incluso en la década de 1960 la mayoría de los investigadores de toxinas marinas seguían -sin estudiar los efectos de los venenos completos o extractos crudos.

La primera secuencia de aminoácidos de una toxina de origen proteico que se reportó en un cnidario fue la secuencia de la toxina II de *A. sulcata* (Wunderer et al., 1976). Esta fue aislada y purificada con un alto grado de homogeneidad. En el otro lado del Atlántico, estudios electrofisiológicos se llevaron a cabo con la fracción parcialmente purificada de una toxina de la anémona de mar Caribe *Condylactis gigantea* (Shapiro, 1968;. Narahashi et al, 1969). Al igual que las toxinas de escorpión estas toxinas de anémona de mar, mostraron una unión a un canal de sodio que se encuentra en la superficie externa de las membranas neuronales y cardiacas (Catterall y Beress, 1978).

Los venenos de animales están constituidos de manera general por compuestos inorgánicos, compuestos orgánicos de bajo y alto peso molecular, - péptidos, proteínas no enzimáticas y enzimas con una gran variedad de funciones farmacológicas. Muchas de estas proteínas tóxicas de tamaño pequeño y algunas proteínas poseen una alta densidad de puentes de disulfuro. Para entender cómo funciona un veneno es necesario tener un poco de conocimiento acerca de las enzimas que lo componen, ya que estas juegan un papel importante en el mecanismo de acción del veneno.

1.5 Enzimas

Las enzimas son proteínas desarrolladas por las células de organismos vivos con la función específica de catalizar reacciones químicas *in vivo* y también son capaces de catalizar *in vitro* reacciones en las que intervienen tanto sustratos naturales como no naturales. Por lo que desde hace décadas la investigación ha sido dedicada para elucidar sus estructuras, funciones y mecanismos. (Fischer et al., 2010). Cabe resaltar que existe un pequeño grupo de enzimas que no tienen origen proteico que están compuestas de ARN catalítico (los ribozimas).

En la actualidad se han reportado en la base de datos más de 46,000 enzimas diferentes, las cuales se han purificado por medio de distintas técnicas de purificación y secuenciación; otras técnicas como la difracción de rayos X, RMN, etc., para conocer sus niveles estructurales; y técnicas de mutagénesis dirigida para conocer más sobre su funcionalidad y sus mecanismos de acción. Es importante señalar que muchas reacciones bioquímicas esenciales en la célula no requieren sólo de enzimas para la

catálisis, sino también de cofactores. El cofactor puede ser un *ion metálico* o bien una molécula orgánica, llamada *coenzima*, aunque algunos enzimas necesitan de ambos. Cuando se separa el cofactor, la proteína restante, que por sí misma es inactiva catalíticamente, se designa con el nombre de *apoenzima*. (IUPAC). Los cofactores orgánicos pueden ser a su vez grupos prostéticos, que se unen fuertemente a la enzima, o coenzimas, que son liberados del sitio activo de la enzima durante la reacción. Las coenzimas incluyen compuestos como el NADH, el NADPH y el ATP. Estas moléculas transfieren grupos funcionales entre enzimas. En las enzimas el cofactor puede actuar como centro catalítico primario, grupo puente para reunir el sustrato y la enzima ó agente estabilizante de la actividad enzimática (conformación).

Como todas las proteínas, las enzimas poseen una estructura primaria, secundaria y terciaria. La estructura 1^a está constituida por la secuencia de residuos de aminoácidos unidos por enlace peptídico, mientras que la 2^a y la 3^a otorgan a la enzima su forma tridimensional según se ha podido deducir por cristalografía de Rayos X. La conformación que adopta la cadena polipeptídica debido a los enlaces de hidrógeno o estructura 2^a, puede ser de tipo α -helicoidal o de lámina β . La estructura 3^a se refiere a la forma globular de la proteína, la cual se mantiene gracias a enlaces tipo disulfuro entre grupos tiol adyacentes y a enlaces iónicos entre grupos carboxílicos libres y grupos amino.

Los enlaces de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas son fundamentales en la estructura tridimensional total de la enzima. La estructura 4^a sólo aparece en aquellas enzimas constituidas por varias subunidades, las cuales establecen entre sí asociaciones de tipo no covalente.

Debido a su estructura proteica, la gran mayoría de las enzimas son muy sensibles a los cambios que se producen en su entorno. La presencia de disolventes orgánicos, una concentración alta de sales, un pH o una temperatura extrema, pueden provocar la desnaturalización de la enzima, es decir, la pérdida de sus estructuras 2^a, 3^a y 4^a. Con pequeñas variaciones del pH o de la temperatura no se llega a la desnaturalización, pero la enzima pierde actividad al haber cambios en su conformación. En general, la mayoría de las enzimas desarrollan su actividad óptima a pH 7 y a una temperatura de 37°C.

En los últimos 20 años el número de enzimas disponibles en el Banco de Datos de Proteínas (PDB) (Berman, et al., 2010) se ha incrementado considerablemente; por lo que se ha hecho necesario utilizar un sistema de clasificación específico. Entre las numerosas clasificaciones, algunas se basan en las reacciones que catalizan las enzimas, otras en el sustrato sobre el que actúan e incluso muchas

enzimas se designan con nombres triviales de origen histórico.

La comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica introdujo en 1964, para uniformar la nomenclatura, la siguiente clasificación sistemática, en la cual se consideran 6 clases principales de enzimas de acuerdo al tipo reacción implicada: oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas. A cada enzima se le asigna un número con cuatro dígitos. Los tres primeros indican la clase, subclase y sub-subclase, respectivamente, y el último es un número de orden. Por ejemplo en la fosfolipasa A₂ (EC 3.1.1.4) el primer número indica que nuestra enzima pertenece a la clase hidrolasa, el segundo dígito señala que actúan sobre enlaces éster, mientras que el tercer dígito indica que el enlace éster es de ácido carboxílico y finalmente el cuarto dígito nos indica el número de orden para la fosfolipasa A₂.

Como se mencionó anteriormente las enzimas juegan un papel importante en los venenos, de las cuales se han reportado: proteasas que producen hipotensión arterial; fosfodiesterasas responsables de la citólisis y hemólisis característica; hialuronidasas, colagenasas y elatasas que provocan la disgregación del tejido conectivo, una de las principales causas de la necrosis del sitio afectado; Así como exopeptidasas, L-aminoacioxidasas, nucleotidasas, ribonucleasas, desoxirribonucleasas, adenosin-trifosfatasa y acetilcolinesterasas. Además de fosfolipasas A₂ de las cuales nos enfocaremos en este trabajo, entre otras.

1.6 Fosfolipasas

Las fosfolipasas son un grupo de enzimas que están ampliamente distribuidas en la naturaleza y catalizan la hidrólisis de fosfolípidos de membrana. Están clasificados de acuerdo al enlace que rompen: PLA₁, (EC 3.1.1.3), PLA₂ (EC 3.1.1.4), PLB (EC 3.1.1.5), PLC (EC 3.1.4.3), y PLD (EC 3.1.4.4) (*figura 5*).

Estas enzimas han sido ampliamente estudiadas durante mucho tiempo, de hecho el primer reporte que dio el primer indicio de la existencia de estas enzimas fue en el jugo pancreático que hidroliza lecitina en el ácido glicerofosfórico, ácidos grasos y colina (Bokay A, 1877). La secuencia de aminoácidos completa de PLA₂ pancreática de caballo, perro, rata, bovino y humana son conocidas en la actualidad.

Estas enzimas contienen un alto grado de puentes disulfuro que las hace extremadamente estable al tratamiento con calor y cambios de pH.

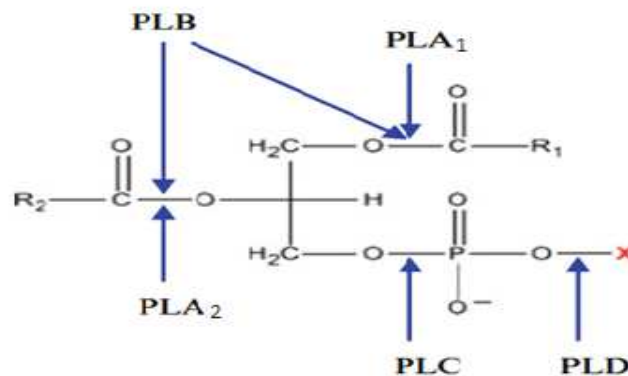


Figura 5 Clasificación de fosfolipasas. Representación general de un fosfolípido, donde X= base común en un fosfolípido (colina, etanolamina, inositol, etc.). Los varios sitios de rompimiento por ataque hidrolítico de varios tipos de fosfolipasa A₁, A₂, B, C y D se muestran con flechas. Modificado de A. Aloulou et al.

1.6.1 Fosfolipasa A₁

Estas enzimas catalizan la liberación de ácidos grasos en la posición *sn*-1, son encontradas en varias células y tejidos de diferentes organismos sin embargo solo se han aislado y clonado un número limitado hasta la fecha. Estas incluyen fosfatidilserinas específicas (PS-PLA₁s) de plaquetas de ratas, veneno de las avispas (Vespidae) y un ácido fosfatídico PLA₁- preferencial de testículo bovino y humano (Hiramatsu, et al., 2010).

Estas enzimas también pertenecen a la familia de enzimas triacilglicerol lipasa y muestran una secuencia muy similar a lipasas hepáticas y pancreáticas humanas. Todas estas enzimas tienen una típica triada catalítica Ser-His-Asp.

También están presentes enzimas de este tipo tanto en membranas externas como en el compartimiento citoplasmático de bacterias. Recientemente se ha informado de que la PLA₁ juega un importante papel biológico en la fosfolipidosis, una condición patológica en la que los fosfolípidos se acumulan en los lisosomas, y factores de virulencia en patogénesis bacterianas y fúngicas (Schmiel et al., 1998).

1.6.2 Fosfolipasa B

Estas enzimas catalizan tres actividades distintas: actividad *sn*-1 y *sn*-2 éster hidrolasa de ácido graso, actividad lisofosfolipasa y actividad de transacilasa . Por lo tanto hay cierta confusión en la nomenclatura para estas enzimas. La actividad de hidrolasa permite a estas enzimas romper ácidos grasos para formar tanto fosfolípidos (actividad PLB) como lisofosfolípidos (actividad lisofosfolipasa). Estas actividades también han sido descritas en bacterias, *Dictyostelium discoideum* (protozoo) y en células de mamíferos. Las PLB fúngicas tienen un rango de entre 600 y 700 aminoácidos de longitud y tiene un probable papel en la virulencia de patógenos fúngicos

1.6.3 Fosfolipasa C

La fosfolipasa C es una enzima que hidroliza el enlace fosfodiéster de un grupo glicerofosfolípido entre el esqueleto de glicerol y el grupo fosfato. Todas las PLC eucariotas conocidas solo utilizan fosfoinosítidos (fosfatidilinositol y sus derivados fosforilados) como sustratos, por lo que se les llama fosfoinosítidos específicos de PLCs y con frecuentemente referidos únicamente con el nombre de PLC.

Las PLCs juegan un papel crucial en la movilización de calcio en hormonas y neurotransmisores. En la actualidad se han aislado y caracterizado este tipo de enzimas en bacterias, plantas y diversos tejidos de animales (Aloulou, et al., 2012).

1.6.4 Fosfolipasa D

La PLD es una enzima que está ampliamente distribuida en la naturaleza, estando presente en varias isoformas en bacterias, protozoos, hongos, plantas y animales. Su principal sustrato al menos en mamíferos es la fosfatidilcolina la cual es hidrolizada en colina y ácido fosfatídico el cual está involucrado en el proceso de traducción de señal. La familia PLD incluye enzimas que están implicadas en el metabolismo de los fosfolípidos, nucleasas, toxinas, y envoltura proteica de virus con función desconocida.

Muchos factores (por ejemplo, ácidos grasos, fosfoinositol, pequeñas proteínas de unión a GTP, la proteína quinasa C, Ca^{2+} , fosforilación) regulan la activación de la PLD ya sea de una manera sinérgica o antagónica. La PLD genera ácido fosfatídico que posteriormente puede ser metabolizado por PLA_2 generando ácido lisofosfatídico un potente mitógeno celular, o por fosfatidato fosfohidrolasa produciendo diacilglicerol. La PLD es una enzima asociada a membranas y sus actividades se han reportado en diversos orgánulos, incluyendo la membrana plasmática, retículo endoplasmático, vesículas y membranas nucleares. (Aloulou, et al., 2012)

1.6.5 Fosfolipasa A_2

Las fosfolipasas A_2 constituyen un diverso grupo de enzimas con respecto a secuencia, función, localización y requerimiento por cationes divalentes. Están ampliamente distribuidas en casi todos los tipos de células animales examinadas, bacterias y protozoos.

Las fosfolipasas A_2 son enzimas del tipo hidrolasa-lipasas, las cuales inducen cambios en la composición membranal, activan la cascada inflamatoria y generan vías de señalamiento celular (transducción de señales). Las cuales están definidas por su habilidad para catalizar la hidrólisis en la posición *sn2* de enlaces esteres de fosfolípidos para liberar algunos ácidos grasos libres (como ácido araquidónico (AA) y ácido oleico (AO)) y lisofosfolípidos. Los ácidos grasos libres pueden tener la función de mensajero secundario y como precursor de ácidos eicosanoides los cuales son potentes mediadores de la inflamación y que están involucrados en la traducción de señales. Los lisofosfolípidos tienen gran importancia en la señalización celular, remodelación celular y perturbación membranal.

Además de su función catalítica primaria, se han encontrado fosfolipasas A_2 en venenos de insectos, moluscos, serpientes y algunos invertebrados marinos, tales como cnidarios y esponjas (Nevalainen et al., 2004). Las PLA_2 s han sido poco estudiadas con algunas excepciones notables tales como estrella de mar *Acanthaster planci* (Shiomi et al., 1998) y el caracol marino *Conus magus* (conodipine M) (McIntosh et al., 1995). En contraste con las PLA_2 s de invertebrados marinos, en venenos de serpientes las PLA_2 s han sido caracterizadas estructuralmente y algunas de sus actividades farmacológicas como: hemorrágica, miotóxica, hemolítica, formación de edema, hipotensora, presináptica, neurotóxica post-sináptica, cardiotóxica, agregación plaquetaria y convulsionante. (Arni and Ward, 1996).

El interés en el campo de las PLA₂ se ha incrementado en las últimas dos décadas debido al descubrimiento de la importancia que juegan los lípidos mensajeros en enfermedades como el cáncer (Laye and Gill, 2003) y la aterosclerosis.

La fosfolipasa A₂ se caracterizó por primera vez en el veneno de cobra en 1945 (Fairbairn, 1945), inicialmente fueron definidas como enzimas Ca²⁺ dependientes, con puentes de disulfuro, que contienen histidina y aspartato en el centro catalítico. La definición general de las PLA₂ como enzimas pequeñas, secretadas que contenían histidina en el centro catalítico, cambio en 1991 con el descubrimiento de la fosfolipasa citosólica (cPLA₂); el aislamiento inicial se realizó en el citosol de neutrófilos y de plaquetas (Sharp et al., 1991); el peso molecular elevado (40-80 kDa) no mantenía relación alguna con las sPLA₂, además en el centro catalítico se encontró serina. Actualmente las fosfolipasas A₂ se dividen por su funcionalidad, localización celular y tisular en dos grandes tipos: citosólicas de alto peso molecular y secretorias de bajo peso molecular. Por su dependencia de calcio en variedades: calcio-dependientes y calcio-independiente.

Se utilizan números romanos para identificar los dieciséis grupos, y los diversos subgrupos son nominados con letras mayúsculas, comprometiéndolo la totalidad de enzimas conocidas en virus, procariontes (bacterias) y eucariotes (hongos, reptiles y mamíferos).

La asignación a los distintos grupos depende de los mecanismos catalíticos de las enzimas, lo que ha determinado que la actividad hidrolasa puede ser por la presencia de cualquiera de los tres siguientes mecanismos consistentes en diadas de aminoácidos presentes en los centros catalíticos: *histidina/aspartato*, *serina/aspartato* y *serina/histidina/aspartato*. Los dieciséis grupos a su vez se pueden clasificar *grosso modo* en cinco tipos principales enzimáticos : 1) enzimas secretorias (sPLA₂), 2) enzimas citosólicas (cPLA₂), 3) enzimas calcio-independientes (iPLA₂) que pueden ser citosólicas, secretorias o mixtas, 4) enzimas degradantes de los mediadores autocoides conocidos como factores activadores plaquetarios (PLA₂-PAF-AH), y 5) enzima lisosomal calcio-independiente (L-PLA₂), que también posee actividad 1-*O*-acil-ceramida-sintasa y transacilasa. (Alfonso y García, 2009)

La función de las PLA₂ son diversas como sus clases e incluyen: Inflamación, muerte celular, crecimiento celular, señalización celular y mantenimiento de fosfolípidos de membrana.

1.6.5.1 Fosfolipasa A₂ secretora

Las sPLA₂ son proteínas que tienen alto grado de homología y contienen entre 119 y 143 residuos de aminoácidos aunque existen algunas excepciones. Los residuos de cisteínas en este tipo de enzimas son particularmente abundantes, con una estructura terciaria estabilizada por 5 a 8 puentes de disulfuro (Fourcade et al., 1996). Estas características le confieren estabilidad contra la proteólisis, resistencia a la desnaturalización y actividad en los líquidos extracelulares donde se encuentran.

Las sPLA₂ se encuentran tanto en tejidos de mamíferos como en algunos venenos de animales, donde catalizan la hidrólisis de glicerofosfolípidos de las membranas celulares y dan lugar a la liberación de ácidos grasos y de lisofosfolípidos. Cabe mencionar que la característica cinética más llamativa de las sPLA₂s es su preferencia por sustratos organizados en micelas, monocapas, vesículas, o membranas (Wacklin et al., 2006).

Se han clasificado en diferentes familias y grupos de acuerdo con el número y la posición de los residuos de cisteína presentes en sus secuencias. Todas las sPLA₂ tienen una configuración similar y el mismo mecanismo catalítico de acción, aunque poseen diferentes efectos farmacológicos (Lambeau and Lazdunski, 1999). En la actualidad han sido clonadas un gran número de fosfolipasas A₂ secretoras, algunas de estas proteínas expresadas heterológicamente han sido estudiadas bioquímicamente y cristalográficamente (Scott, et al. 1990).

En mamíferos se conocen 2 tipos de sPLA₂: la producida por el páncreas, llamada, por tanto, pancreática (sPLA₂-IB) y su función biológica es la de digerir lípidos en sales biliares (con carga negativa), y la segregada por el tejido sinovial o inflamatoria (sPLA₂-IIA) también activadas por carga negativa. Estas enzimas se han visto que se producen en el hígado tras algunos procesos de sepsis y algunas situaciones quirúrgicas, y esta producción está controlada por diversas citocinas proinflamatorias entre las cuales destacan la interleucina 1 (IL-1), la interleucina 6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interferón gamma (IFN- γ), lipopolisacáridos (LPS), etc. En esta regulación de la producción de las sPLA₂-II hay que destacar que existe sinergismo entre IL-1 e IL-6 y entre IL-6 y TNF- α , pero no entre IL-1 y TNF- α ; lo cual, lo cual nos indica que la IL-6 cumple un papel crucial en la inducción de la producción de sPLA₂-IIA (Villarubia et al., 2004).

Las obtenidas de venenos de serpientes se han clasificado como sPLA₂-IA las cuales son altamente activas frente a fosfolípidos de membrana de carácter neutro (células de mamíferos) algunas de ellas poseen mecanismos de acción similares a las sPLA₂-IIA (Wacklin, et al., 2006).

En las células que no expresan sPLA₂ probablemente la cPLA₂ moviliza el ácido araquidónico (AA) que se produce durante la activación celular. Sin embargo en las células que contienen sPLA₂, la liberación de AA parece estar mediada por estas enzimas y no por las cPLA₂ (Balsinde et al., 1997). Coincidentemente algunos tipos de células como neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastocitos, macrófagos y linfocitos T sintetizan y secretan sPLA₂ (Triggiani et al., 2005). Las sPLA₂ liberadas se unen a la superficie externa de las células y producen AA, el cual puede ser capturado por las células circundantes para producir eicosanoides. Estudios recientes demuestran que las sPLA₂ a pesar de no tener especificidad por el AA, producen este ácido graso en mayor proporción que otras, las razones de esta producción es aún desconocida (Murakami et al., 1998).

Las sPLA₂s humanas están implicadas en numerosas funciones biológicas. Ellas provocan las contracciones de los músculos lisos en el sistema cardiovascular y en el parénquima pulmonar, inducen la proliferación de células, están asociadas con una variedad de afecciones inflamatorias como la artritis reumatoide, el *shock* endotóxico, el síndrome de distrés respiratorio y varios tipos de cáncer gastrointestinal.

La determinación de los niveles de sPLA₂, tanto en los fluidos inflamatorios como en el plasma, tiene valor diagnóstico y pronóstico en pacientes con *shock* séptico, pancreatitis, artritis reumatoide, SIDA en estado terminal, por la posible relación entre la variación analítica y la evolución de la enfermedad (Valdés et al., 2002). Además de su reconocida función enzimática, se sabe que algunas sPLA₂ interaccionan con receptores específicos de membrana, que participan en sus actividades biológicas. Hasta el momento se han descrito receptores, la primera evidencia fue obtenida utilizando enzimas presentes en el veneno de serpiente. El modelo propuesto por Kini y Evans permite explicar los diferentes efectos farmacológicos de las sPLA₂ del veneno. Este modelo se basa en la presencia de receptores específicos localizados en la superficie de las células blanco que tienen alta afinidad por enzimas tóxicas, pero no por las sPLA₂ atóxicas. En base a este modelo se identificaron receptores específicos para varias sPLA₂. La neurotoxina sPLA₂ OS2 al ser utilizada como ligando permitió determinar 2 tipos de receptores: N y M.

Los receptores tipo N, que son profusamente expresados en el cerebro, pero que también están presentes en otros tejidos, se unen con gran afinidad a diferentes sPLA₂ de venenos lo que permitiría explicar sus acciones neurotóxicas (Lambeau and Lazdunski, 1999; Lambeau et al., 1989; Lambeau et al. 1991; Lambeau et al. 1997).

Los receptores de tipo M (180 kDa) se expresan en el pulmón, riñón e hígado, entre otros tejidos, pertenecen a la superfamilia de lectinas tipo C12, y tienen un alto grado de homología con el receptor de manosa expresado por los macrófagos. Teniendo en cuenta que la unión a este receptor de manosa provoca la activación fagocítica y la producción de citocinas inflamatorias en los macrófagos, se plantea que la activación de los macrófagos provocada tanto por sPLA₂-IA de veneno de cobra (*Naja mossambica mossambica*) como por sPLA₂-IIA humana se debe a su unión con estos receptores o receptores específicos tipo M, dejando abierta la posibilidad de que ambos fueran el mismo receptor, como así parece (Villarubia et al.2004) El receptor M se ha implicado en gran parte de los efectos biológicos de las sPLA₂, incluidos la emigración celular, la liberación de eicosanoides y el shock séptico (Ohara et al.1995), habiéndose demostrado que este receptor es la diana fisiológica para los grupos IB y IIA de las sPLA₂ en los mamíferos. Esto indica que las acciones de las sPLA₂-II no se deben a su mera acción catalítica sobre fosfolípidos de membrana y que, por tanto, existe una cierta especificidad en su comportamiento, especificidad que se define por la presencia de receptores adecuados en determinadas células.

En cuanto al papel fisiológico de las sPLA₂-II, se ha observado la importancia biológica de estas enzimas en el mantenimiento de la homeostasis en diversos órganos, así como en la protección del huésped frente a las agresiones, fundamentalmente bacterianas, lo que hace plantear que las sPLA₂-II son parte esencial en los mecanismos de inmunidad innata frente a determinados gérmenes patógenos (Villarubia et al.2004).

Mecanismo catalítico sPLA₂.

Algunos investigadores han demostrado que los mecanismos de catálisis para las sPLA₂ no ocurren vía la formación clásica de la acil enzima por intermedio de serinestearasas. En su lugar, las sPLA₂ utilizan un residuo de histidina estabilizado por aspartato para polarizar un enlace de H₂O, el cual ataca al carbonilo. El ión Ca²⁺ conserva el enlace que se requiere para estabilizar el estado de transición tetraédrico intermedio con ayuda de una glicina y un residuo de ácido aspártico (**figura 6**). Para esta clase de PLA₂ el calcio desempeña un papel activo en su catálisis. (Scott et, al, 1990).

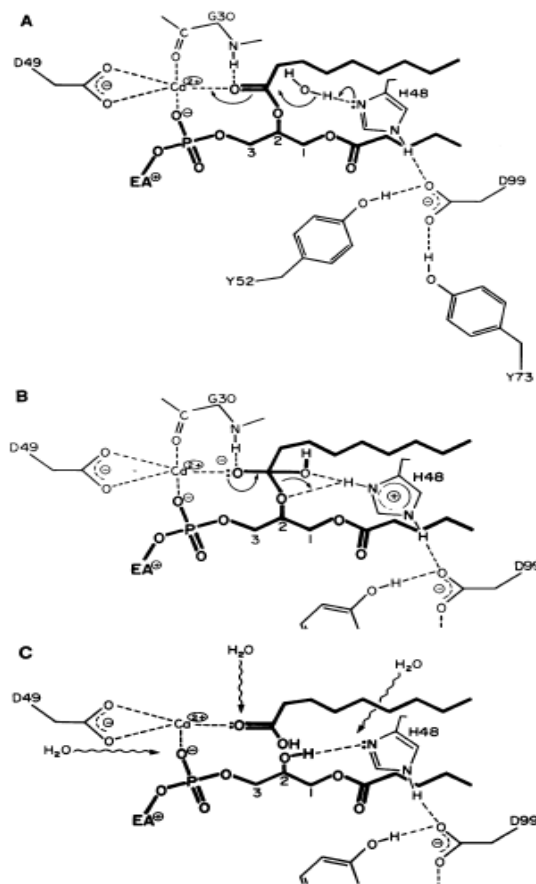


Figura 6 Mecanismo catalítico de las sPLA₂s Modificado de Scott et al., 1990

- A. Ataque catalítico de catalizador al sustrato, con formación de intermediario tetraédrico
- B. Colapso de intermediario tetraédrico.
- C. Formación de productos, tres moléculas de agua se mueven en el sitio activo (como se indica por las flechas) para reemplazar a los productos.

1.6.5.2 Fosfolipasa A₂ citosólica

Las cPLA₂ son enzimas con peso molecular entre 80 y 120 KDa. Además se sabe que las cPLA₂ muestran selectividad significativa hacia fosfolípidos que producen la liberación de AA de la posición *sn*-2. El grado de insaturación, la posición del doble enlace, la longitud de la cadena del ácido graso del sustrato influyen en la especificidad de la cPLA₂. El ácido oleico (C18:1) y el ácido linoleico (C18:2) están presentes abundantemente en membranas celulares y son pobremente liberadas por las cPLA₂, las cuales tienen alta preferencia por el ácido linolénico (C18:3) y el ácido eicosapentaenoico.

La liberación de AA por parte de las cPLA₂ es acelerada por la presencia de fosfolípidos oxigenados los cuales incrementan la susceptibilidad de la enzima. Niveles micromolares de Ca²⁺ son necesarios para la hidrólisis de los sustratos.

La cPLA₂ es expresada en la mayoría de las células y tejidos, una notable excepción es en linfocitos B y T maduros, los cuales no contienen niveles detectables de cPLA₂. El incremento de la expresión de cPLA₂ es acompañada por una prolongada producción de eicosanoides, sin embargo esta expresión es revertida por glucocorticoides (Kudo and Murakami, 2002).

2. JUSTIFICACIÓN

Debido al gran número de especies dentro del Phylum Cnidaria y a la poca información que aún existe en el conocimiento de las toxinas que estos producen, se ha hecho necesario tanto el estudio de los componentes proteicos como no proteicos presentes en el veneno de estos organismos. Dentro del Phylum Cnidaria las toxinas de la familia Zoanthidae han sido las menos estudiadas en comparación con las toxinas de anémonas marinas y solamente algunos péptidos y compuestos de bajo peso molecular han sido aislados a partir de este grupo de animales, por lo cual es necesario estudiar otro tipo de moléculas presentes en el veneno de *P. caribaeorum* como las fosfolipasas A₂ las cuales juegan un papel muy importante tanto en la digestión como en la toxicidad del veneno. Aunado a esto es importante conocer no solo el blanco de las fosfolipasas A₂ sino también la estructura y las actividades múltiples que poseen estas enzimas.

3. OBJETIVOS

Objetivo general.

Aislar, purificar y caracterizar bioquímicamente una fosfolipasa en el extracto de *Palythoa caribaeorum*.

Objetivos específicos.

- Determinar la presencia de fosfolipasa A₂ en el extracto de *Palythoa caribaeorum*.
- Purificar mediante el uso de técnicas cromatográficas.
- Determinar la secuencia de aminoácidos de las fosfolipasas A₂ obtenidas.
- Determinar el peso molecular de las fosfolipasas A₂ aisladas por espectrometría de masas.
- Determinar la actividad específica de las enzimas obtenidas.

4. HIPÓTESIS

En la mayoría de los venenos de animales incluidas serpientes, abejas, escorpiones y anémonas están presentes una variedad de fosfolipasas A_2 , las cuales participan tanto en la digestión como en la toxicidad del veneno, por lo tanto dentro de *Palythoa caribaeorum* se aislará al menos una fosfolipasa de tipo A_2 con características estructurales similares a las fosfolipasas reportadas en anémonas, debido a que pertenecen a la misma clase filogenética y la diversificación de los componentes del veneno con la misma funcionalidad biológica no altera algunos patrones estructurales.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Colecta de material biológico

La colecta de nuestro material se llevo a cabo en la Zona Arrecifal Veracruzana la cual está constituida por la Gallega, Galleguilla, Isla Verde, La Blanquilla, Anegada de Adentro, Arrecife Pájaros, Arrecife Hornos, Arrecife Punta Mocambo e Isla Sacrificios.

En específico en la Gallega que es un arrecife sobre el cual están estas construidos los astilleros del Puerto y el Fuerte de San Juan Úlua, la toma de muestra se realizo aproximadamente a 1 km de la línea de costa y a una profundidad aproximada de 1m.



Figura 7 Sistema Arrecifal Veracruzano Tomado de Lazcano-Pérez 2013

5.2 Desarrollo experimental

El desarrollo del trabajo de investigación se llevo a cabo en el laboratorio 2 de Química de Biomacromoléculas del Instituto de Química de la UNAM.

5.3 Metodología

En la figura 8, se presenta el diagrama de flujo para la determinación estructural de la fosfolipasa A₂ presente en *Palythoa caribaeorum*, desde la extracción del veneno, se muestra también cada uno de los análisis determinados en cada uno de las etapas y técnicas espectroscópicas.

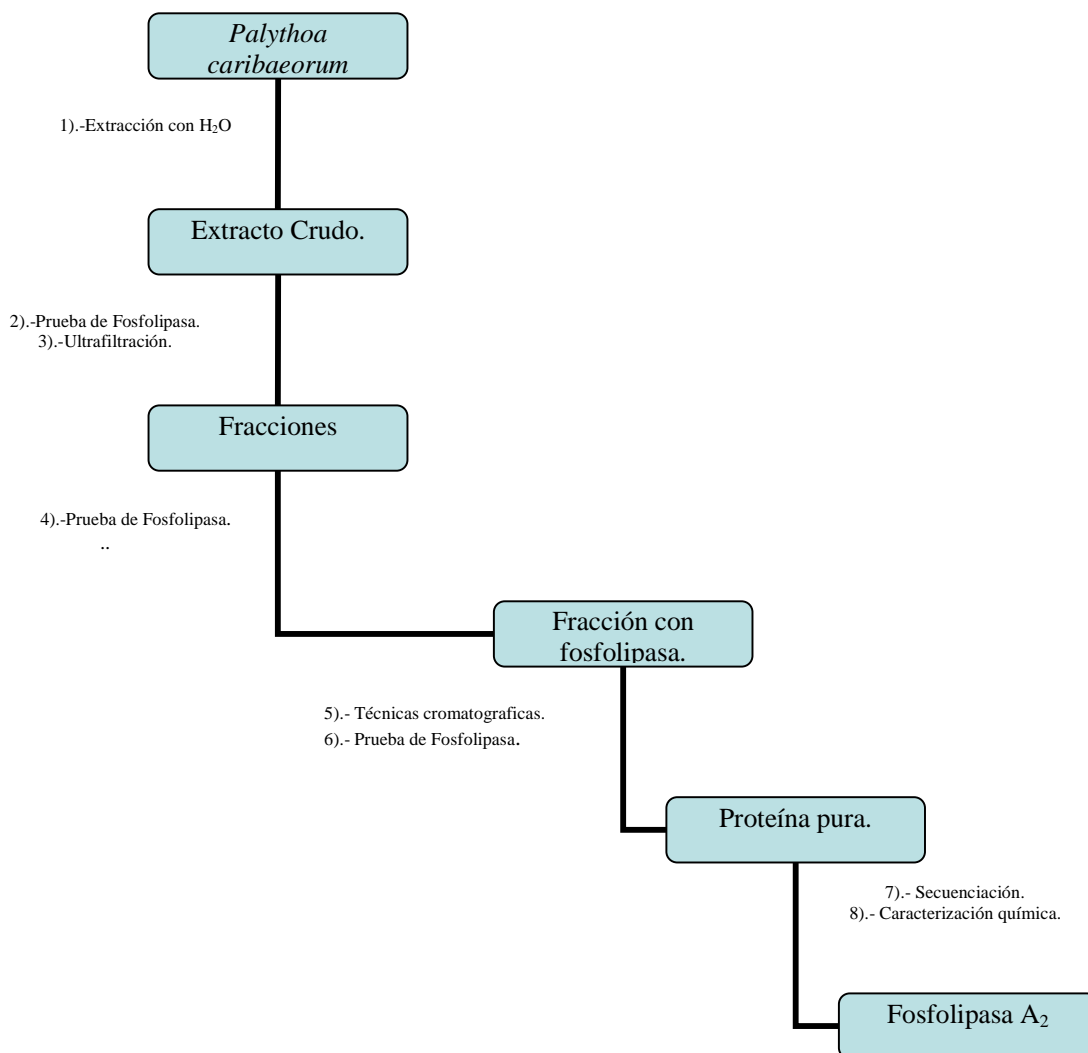


Figura 8 Diagrama de flujo del procedimiento experimental, desde la extracción hasta la caracterización química

Obtención de extracto crudo.

Se procesaron 0.5 kg del material colectado, a los que se les separó el moco del cuerpo con la ayuda de un cepillo, posteriormente se utilizó 1000ml de H₂O destilada para extraer la toxina de los pólipos con la ayuda del cepillo. En seguida la solución obtenida se centrifugó a 95.58 g durante 15 min. Se tomó el sobrenadante para llevar a cabo la liofilización del extracto, al finalizar el proceso de liofilización se llevó a cabo la cuantificación del peso del extracto crudo.

Determinación cualitativa de actividad de fosfolipasa A₂.

Para la determinación cualitativa de actividad fosfolipasa A₂ se prepararon las siguientes soluciones:

Solución A (3 ml de yema de huevo fresco en 9 ml NaCl 0.86%); Solución B (Se disolvió 0.3 g de agarosa en 50 ml de Tris-HCl 50 mM a pH 7.95 en un baño de agua hirviendo; Solución C (Se disolvió 100 ml de una solución 10 mM de CaCl₂)

Preparación de la placa:

Se mezcló 0.5 ml de A, 50 ml de B y 0.5 ml de C, se repartió la mezcla en cajas de petri (15 ml de agarosa en cada caja). Una vez que solidificó la placa se hicieron pequeños orificios de aproximadamente 3 mm de diámetro. Se colocó 10 µl de muestra en cada orificio; en donde existe actividad fosfolipasa se formaron unos halos transparentes más o menos de 24 h después.

Determinación cuantitativa de actividad de fosfolipasa A₂.

Para la determinación cuantitativa de actividad fosfolipasa A₂ se prepararon las siguientes soluciones:

Solución 0.1 M de CaCl₂, solución 1 M de NaCl, emulsión de L-a-fosfatidilcolina (2g de L-a-fosfatidilcolina, se adicionó 2.5 ml de 0.1 M CaCl₂ y 7.5 ml de NaCl 1 M, se agitó durante 30 minutos a 4 °C, se sonicó la mezcla durante 10 minutos y posteriormente y se aforó a un volumen de 100 ml), solución 0.002M de NaOH, solución de enzima (0.1mg de enzima se disolvió en 1ml en agua destilada, esta solución se mantuvo en hielo mientras el ensayo se realizaba).

Procedimiento:

La reacción se llevó a cabo a una temperatura de 25 °C.

Determinación de la velocidad del blanco: Se pipeteó 4 ml de emulsión de L-a-Fosfatidilcolina. Se ajustó el pH a 8.9 y se registró el volumen de titulante requerido para mantener el pH a 8.9 por 3 a 5 minutos, después la constante de velocidad fue obtenida. Se determinó la velocidad del blanco como volumen de titulante añadido por minuto de la porción final linear de la curva.

Determinación de Muestra: Se añadió apropiadamente enzima diluida sobre la emulsión, se registró la cantidad de base requerida para mantener el pH a 8.9 por 4 a 5 minutos.

Se determinó la “velocidad de la muestra” como el volumen de NaOH añadido por minuto de la porción final linear de la curva.

Cálculos.

$[(\text{Velocidad de muestra} - \text{Velocidad de blanco}) \times N \text{ NaOH} \times 1000] / \text{mg enzima en mezcla.}$

Una unidad fue 1meq de L-a – fosfatidilcolina hidrolizada a L-a- lisofosfatidilcolina y un ácido graso liberado por minuto a un pH de 8.9 a 25 °C

Definición de Unidad

Una unidad fue 1μmol de L-a – fosfatidilcolina hidrolizada a L-a- lisofosfatidilcolina y un ácido graso liberado por minuto a un pH de 8.5 a 37 °C

Purificación mediante ultrafiltración.

1g de extracto crudo el cual se disolvió en 25 ml de H₂O destilada.

Se llevó a cabo la filtración de esta solución en un amicon utilizando una serie de filtros de 1, 3, 10 y 30 kDa. A las 5 fracciones obtenidas se les realizó la prueba de fosfolipasa A₂ de manera cualitativa.

Purificación de fracciones mediante cromatografía de intercambio catiónico utilizando el HPLC.

Para llevar a cabo este tipo de cromatografía se utilizó una columna TSK SP-S-PW (Sulfopropil), un buffer A de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0.1 M a un pH= 7.65 y un buffer B de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0.1 M a un pH= 7.65de con NaCl 1M

Se inyectaron 500 μl de la muestra etiquetada con el nombre de "PM \uparrow 30 kDa". La muestra inyectada se eluyó con un flujo de 0.5ml/min, durante los primeros 30 minutos la elución fue con buffer A, posteriormente se inició un gradiente de los 30 a los 80 minutos donde alcanzó el 100% de buffer B y finalmente se dejó hasta los 120 minutos con buffer B. Las fracciones que fueron colectadas durante la corrida fueron dializadas.

Purificación de fracciones mediante cromatografía de Exclusión Molecular utilizando el HPLC

Para llevar a cabo este tipo de cromatografía se utilizó una columna TSKgel 62000-SW y agua destilada como eluyente a un flujo de 0.15 ml/min. Se inyectó 100 μl de la muestra etiquetada con el nombre F3 30 kDa.

Diálisis de muestras.

Se utilizaron membranas para diálisis de 12,000 -14,000 kDa de un tamaño ideal para introducir dentro de ellas cada una de las fracciones que se requería dializar al finalizar cada paso de purificación.

Cuantificación por BCA.

Se preparó una solución Stock con una concentración de 1 mg/ml de la muestra o fracción que se quiere cuantificar. Posteriormente se realizaron los cálculos para preparar la solución del BCA. Se mezclaron los ml necesarios de A y B. Y se tomaron 200 μl de esta mezcla que se colocan en los pozos de una microplaca. En estos pozos se colocaron también 25 μl de muestra y H_2O en el caso del

blanco y se dejó reaccionar durante un periodo de 2 horas a 37 °C.

Se leyeron las muestras en un espectrofotómetro y posteriormente se realizaron los cálculos necesarios para conocer la concentración de nuestras muestras.

Determinación de estructura primaria de las fosfolipasas A₂ de *Palythoa caribaeorum*.

Cada una de las fosfolipasas A₂ pura fue disuelta en 20% de acetonitrilo/0.1%TFA en H₂O. La solución de proteína (100pmol/μL) fue diluida 200 veces en una solución saturada de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico, en 50% de etanol (Cabra, et al., 2008). La solución enzimática de fosfolipasa se realizó con tripsina (grado secuenciación). La enzima se disolvió en 20μL de una solución 1 mM HCl hasta alcanzar una concentración de 1.25μg/μL; 50μL de la fosfolipasa disuelta (1000pmol) se hizo reaccionar con 48μL de 25mM NH₄HCO₃ a pH 8.4 y 2μL de la solución de tripsina. La mezcla se agitó e incubó a temperatura ambiental por 3 h y ésta se diluyó 200 veces en la solución de la matriz. La solución de proteína total fue depositada en la placa de Kratos (Manchester, England) Kompact.

El espectrofotómetro MALDI IV-TOF utilizó el sistema Autodrop (Microdrop, Norderstedt, Germany). El espectrofotómetro de masas está equipado con un rayo laser de N₂ a 337 nm para la ionización MALDI. El N-terminal y fragmentos de la secuencia fueron determinados por la degradación de Edman (Edman and Begg, 1967) en un secuenciador de proteínas en fase gaseosa (LF 3000, Beckman Instruments, Irvine, CA) equipada con HPLC (Beckman System Gold, Beckman Instruments, Irvine, CA). El equipo de HPLC tiene arreglo de diodos a 268 y 293 nm para señal y referencia, respectivamente. La columna de HPLC usada es Beckman Spherogel Micro PTH (2mm-150mm) y estándares Beckman grado secuenciación.

Estudio bioinformático.

Para el estudio bioinformático de nuestro trabajo se utilizó la herramienta BLAST de PUBMED, se usó la base de datos “secuencias de proteínas no redundantes (nr)” y el algoritmo “blastp, además del programa Jalview 2.8 que tienen herramientas para realizar el alineamiento y filogenia.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De 637.15g de *Palythoa caribaeorum* se obtuvo 4.11 g de extracto crudo. Por lo que se puede decir que se obtuvo el 0.645 % en peso de extracto crudo.

Para llevar a cabo la metodología propuesta se utilizó 1g de extracto crudo, que tiene un porcentaje de 17 % de proteína.

Para la ultrafiltración de extracto crudo se utilizaron membranas de 1 kDa, 3 kDa, 10 kDa y 30 kDa obteniéndose las siguientes 5 fracciones:

Tabla 1 Rendimiento en peso seco de extracto crudo

Fracción.	1kDa	1kDa - 3kDa	3kDa - 10kDa	10kDa - 30kDa	30kDa
Peso Seco.	424.6mg	178.5mg	153mg	18mg	187.2mg
%	42.46	17.85	15.3	1.8	18.72

Al llevar a cabo esta ultrafiltración se perdió solo el 3.87% de extracto crudo debido a la adsorción inespecífica de las membranas.

Se llevo a cabo la prueba cualitativa para determinar la actividad de fosfolipasa a cada una de las fracciones obtenidas a partir de la ultracentrifugación (figura 10) en donde se obtuvo el siguiente resultado:

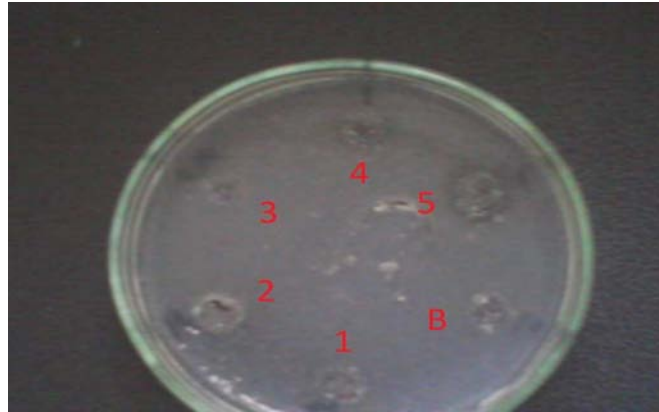


Figura 9 Prueba cualitativa de actividad fosfolipasa A₂, en donde: 1 = Fracción P.M < 1kDa, 2 = Fracción 1kDa < P.M < 3kDa 3 = Fracción 3kDa < P.M < 10kDa 4 = Fracción 10kDa < P.M < 30kDa y 5 = Fracción P.M. >30kDa.

Al llevar a cabo la prueba para la detección de actividad de fosfolipasa A₂ se pudo observar que en los pozos del 1 al 4 no se presentó actividad, pero en el pozo 5 fue evidente, esta fracción es la que corresponde a las proteínas que tienen un peso molecular mayor a 30 kDa.

La presencia de actividad en esta fracción se debe a la conformación que tienen estas enzimas por lo cual no pueden pasar fácilmente a través de la membrana, esto lo deducimos ya que la mayoría de las fosfolipasas A₂ pesan entre 14 y 18 kDa.

Se cuantificó la proteína de esta fracción resultado de **1.066 %** de proteína en muestra seca. Posteriormente al realizar la Cromatografía de Intercambio Catiónico descrita anteriormente se obtuvo el siguiente cromatograma.

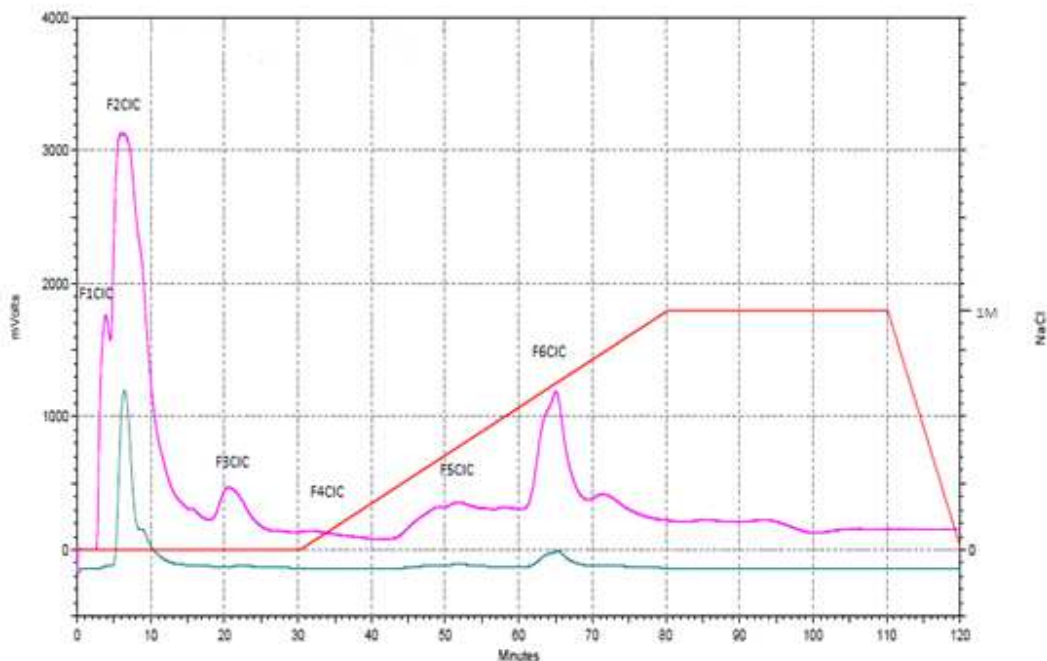


Figura 10 Cromatograma de intercambio catiónico fracción 30 kDa, en donde la línea roja (-) representa el método cromatográfico utilizado, la línea rosa (-) señala la absorbancia a 210 nm y la línea verde (-) la absorbancia a 280 nm.

Al llevar a cabo esta cromatografía se colectaron 6 fracciones en base a las fracciones que se presentaron, las cuales fueron etiquetadas con los nombres de:

F1CIC, F2CIC, F3CIC, F4CIC, F5CIC y F6CIC.

A las fracciones se les cuantificó la cantidad de proteína y se les determinó actividad específica donde se calculó:

Actividad específica= $[(\text{Velocidad de muestra} - \text{Velocidad de blanco}) \times N \text{ NaOH} \times 1000] / \text{mg enzima en mezcla}$.

Se determinó: Velocidad promedio del blanco que fue de 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ y la actividad específica promedio de nuestra enzima comercial mencionada anteriormente que fue de 6.33 meq/mg*min.

Tabla 2 Actividad específica en fracción mayor a 30 kDa, en donde N.D= Valor no determinado

Nombre de Fracción	Concentración de enzima (mg)	Actividad Especifica (mmol/mg*min)
CIC1	0.0011	1.140
CIC2	N.D	N.D
<u>CIC3</u>	<u>0.0034</u>	<u>13.790</u>
CIC4	0.0032	1.0365
CIC5	0.0405	0
CIC6	0.0893	0

Posteriormente se decidió trabajar con la fracción CIC3 por tener el valor más alto de actividad. Por lo que el siguiente paso de purificación realizado fue una cromatografía de exclusión molecular con una columna TSK gel 62000-SW. Seguida de la cuantificación de su actividad específica de cada fracción obtenida.

Fracción CIC3

Se realizó cromatografía de exclusión molecular con agua como eluyente a un flujo de 0.15ml/min.

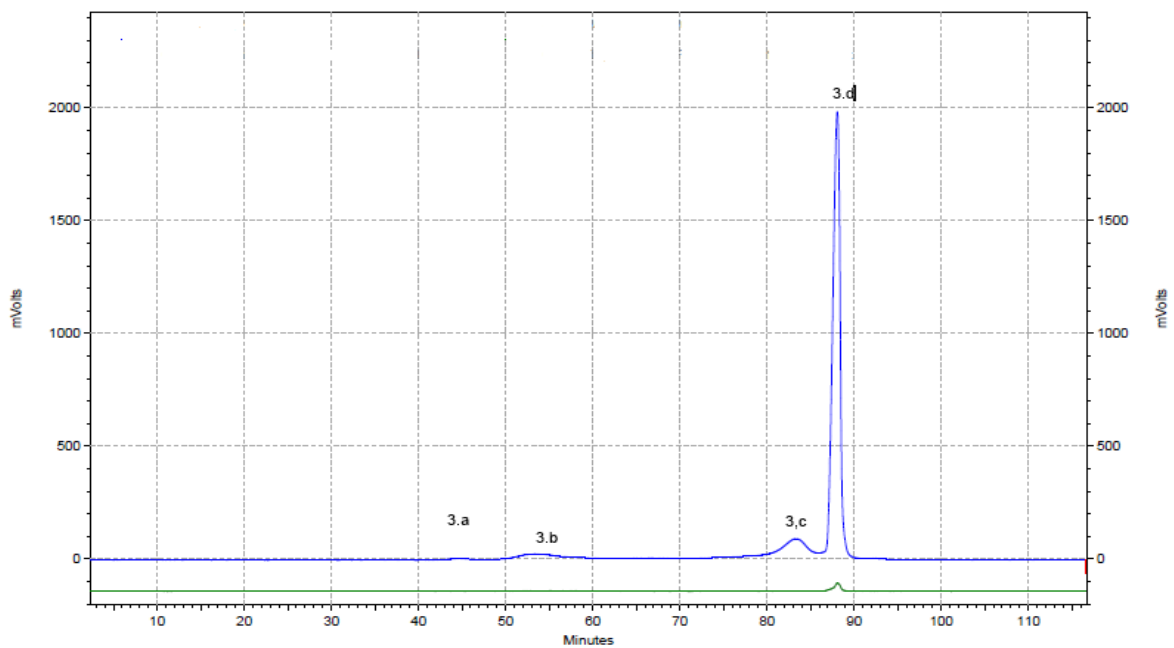


Figura 12 Cromatograma de exclusión molecular fracción 3, la línea azul (-) señala la absorbancia a 210 nm y la línea verde (-) la absorbancia a 280 nm

Tabla 3 Actividades específicas en fracción CIC3, en donde N.D= Valor no determinado

Nombre de Fracción	Concentración de enzima (mg)	Actividad Especifica (meq/mg*min)
3.a	0.0002	0
3.b	N.D	N.D
3.c	0.0067	10.92
3.d	0.0043	5.58

La tabla 3 nos presenta las actividades específicas de las fracciones obtenidas en la fracción 3; a las 2 fracciones que presentaron actividad se les determino su grado de pureza mediante la técnica de

espectrometría de masas MALDI-TOF y posteriormente se llevo a cabo la secuenciación de aminoácidos como se describió anteriormente.

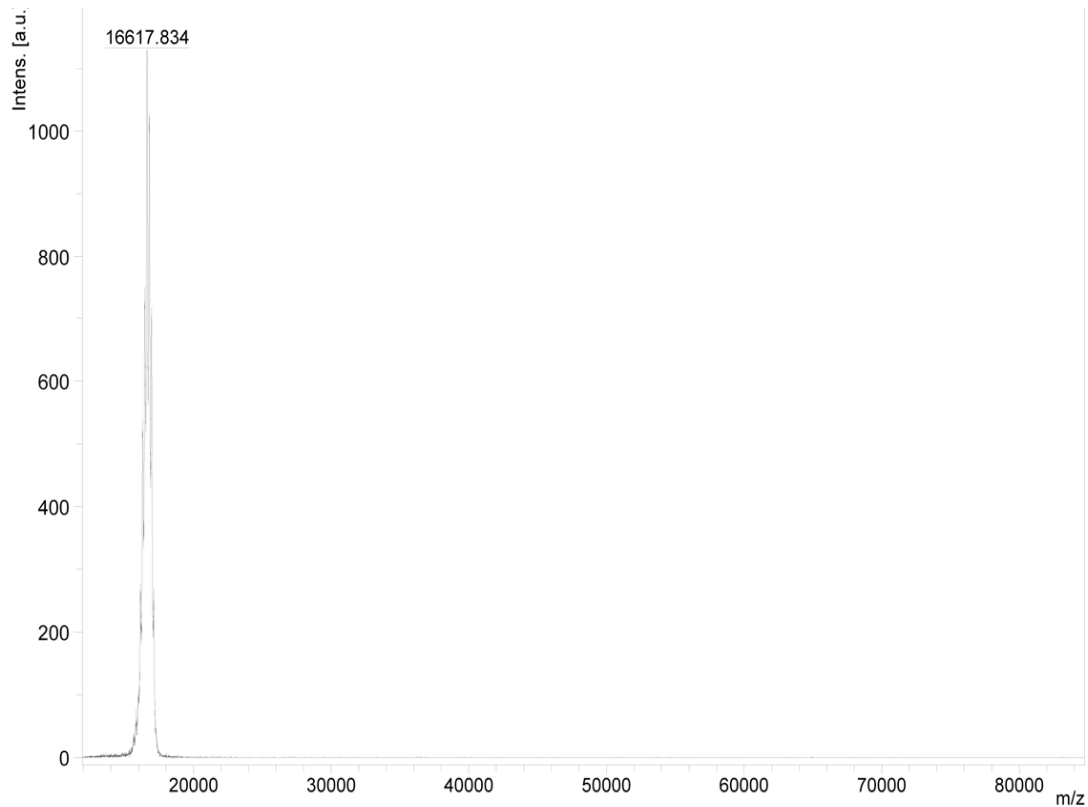


Figura 13 Espectro de Masas de muestra 3d.

En las tablas 4 y 5 se resume la purificación de las fosfolipasa A2 en *Palythoa caribaeorum*, en donde se utilizo 1 g de extracto crudo y se lograron obtener 0.527mg de la enzima 3c y 2.422mg de la enzima 3d respectivamente.

Para purificar las fosfolipasas A2 se utilizaron 4 etapas de purificación: Se observa que en el paso de purificación de cromatografía de intercambio catiónico nos presenta un valor más grande de actividad específica en comparación con las enzimas puras, esto se debe a que esta fracción contiene 2 fosfolipasas del tipo A₂ (determinadas por cromatografía y su actividad específica independiente de cada una de ellas).

Tabla 4 Resumen de Purificación de enzima 3c, en donde * = está determinado que hay dos fosfolipasas en este paso de purificación

<i>ETAPA</i>	<i>Proteína Total (mg)</i>	<i>Unidades de Actividad (meqXmin)</i>	<i>Actividad Especifica ((meq/mg*min)</i>	<i>Grado de Pureza</i>	<i>Rendimiento(%)</i>
Extracción	176	230.56	1.31	1	100
Ultrafiltración	42.47	116.367	2.74	2.09	24.13
*Cromatografía de Intercambio Catiónico	3.03	41.82	13.79	10.52	1.72
Cromatografía de Exclusión Molecular	0.52	5.67	10.92	8.33	0.29

Tabla 5 Resumen de Purificación de enzima 3d, en donde * = esta determinado que hay dos fosfolipasas en este tipo de purificación.

<i>ETAPA</i>	<i>Proteína Total (mg)</i>	<i>Unidades de Actividad (meqXmin)</i>	<i>Actividad Especifica ((meq/mg*min)</i>	<i>Grado de Pureza</i>	<i>Rendimiento(%)</i>
Extracción	176	230.56	1.31	1	100
Ultrafiltración	42.47	116.367	2.74	2.09	24.13
*Cromatografía de Intercambio Catiónico	3.03	41.82	13.79	10.52	1.72
Cromatografía de Exclusión Molecular	2.42	13.83	5.58	4.25	1.37

El peso molecular obtenido de la enzima 3c fue de 14,653 Da y la secuencia de aminoácidos obtenida fue la siguiente:

SKVREQLGPV TQEFWDNLEK EKVQPYLDEF QKKWHEEVEI YRQKVAPLQD
LAPYSDDLRLQ RLTARLEALK EGGGSLAEYH AKASEQLKAL GEKAKPVLED
LRQGLECDRI GAQCFADKRS TFKTDKC

A la cual se le realizó una búsqueda de proteínas homologas que se alinearon entre ellas mediante el empleo de la herramienta BLAST de PUBMED, se uso la base de datos “secuencias de proteínas no redundantes (nr)” y el algoritmo “blastp”. En la secuencia de aminoácidos presentada arriba se resaltan en color morado los posibles aminoácidos que forman parte de la diada catalítica (H₈₀ y D₁₀₈) y de color verde los aminoácidos que ayudan a la unión del Ca²⁺ (G₇₂ y G₇₄), esto se estableció con ayuda del análisis bioinformático que se presenta en la figura 14 en el cual solo se tomaron 3 secuencias de fosfolipasas A₂ donde se resaltan de color morado los aminoácidos que forman parte del sitio catalítico y de color verde los aminoácidos que se unen a calcio.

Las 3 secuencias analizadas se presentan a continuación:

Acanthaster planci

MNFLVVIVTT VSLAGAASAG EIQNLYQFGK MVMCLGNLNV LEGLEYNGYG
CYCGRGGKGT PLDDTDRCK QHDECYERAT DEMGCWSIET YATTYDYTKS
KVSGKCTIKC KLESDYSRFT IRKKCKAFIC ECDRIGAQCF ADKRSTFNRS LISYTKDKC

Acanthaster planci

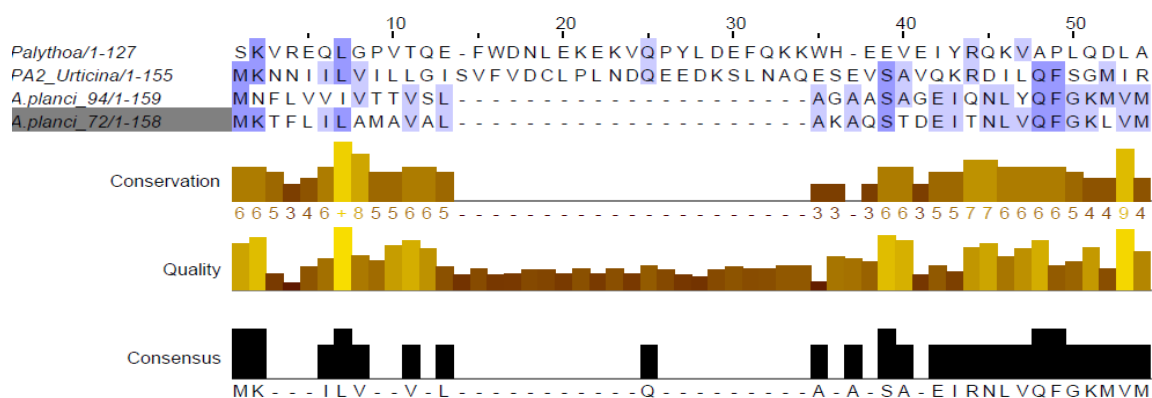
MKTFLILAMA VALAKAQSTD EITNLVQFGK LVMCLGNIGY TEGLEYDGYG
CFCGKGGKGT PVDATDRCC E VHDNCYQAV EEGKCWSVET YGTTYWYDQS
TSGSCSIRCW EEGDYNSLVP RKACKAAICE CDRKAAQCFA DNRPTFNRY LNYAKDTC

Urticina crassicornis

MKNNILVIL LGISVFDCL PLNDQEEDKS LNAQESEVSA VQKRDILQFS GMIRCATGRS
AWKYFNNGNW CGWGGSGTAV DGVDSCCRSH DWCYKRHDSC YPKIIPYIAS
TSGSHPSCSI TCHSANNRCQ RDVCNCDKVA AECFARNTYH PNNKH

Tabla 6 Alineamiento de secuencia de proteína 3c

ORGANISMO	IDENTIDAD	MAX SCORE	NÚMERO AA.	QUERY COVER
<i>Acanthaster planci</i>	94	41.2	159	14
<i>Acanthaster planci</i>	68	32	158	14
<i>Urticina crassicornis</i>	36	23.1	155	19



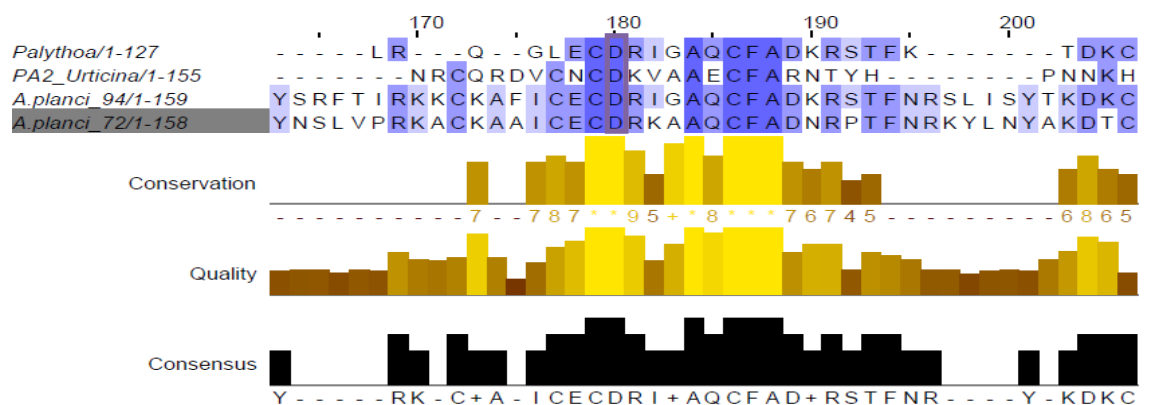
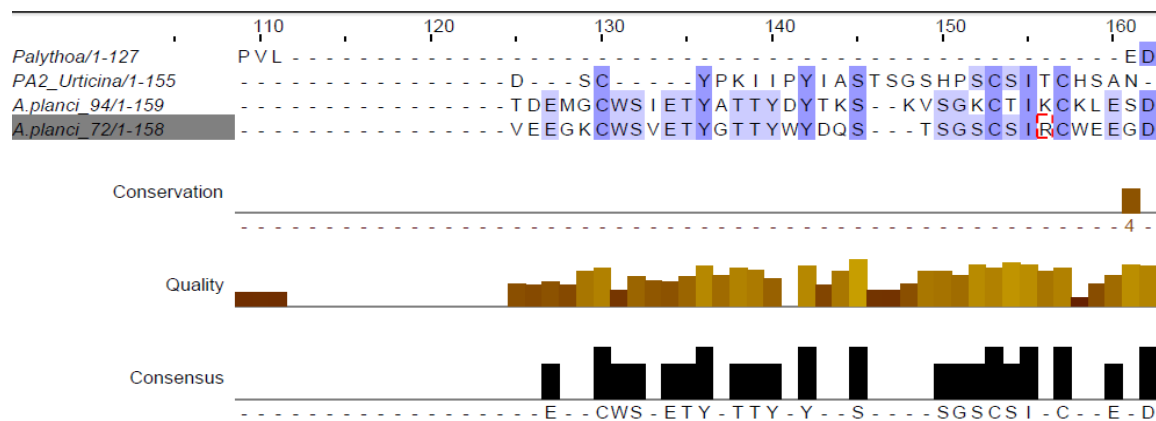
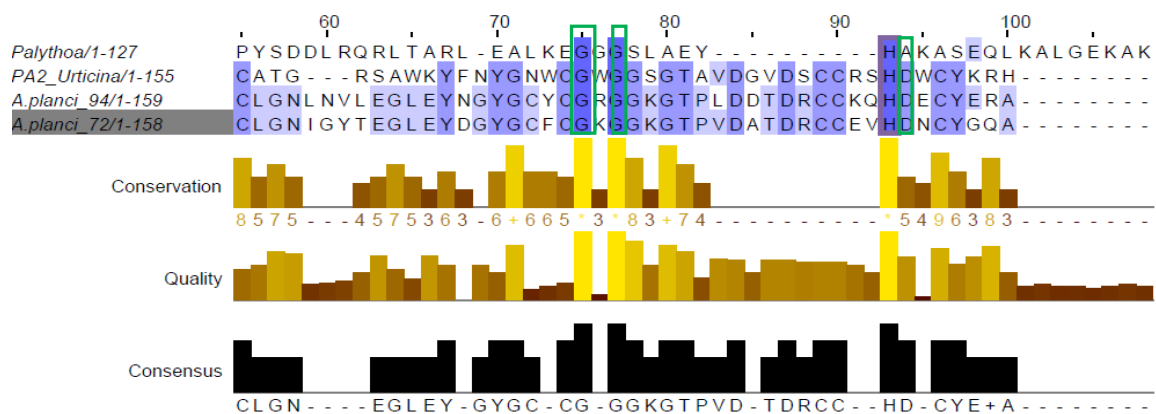


Figura 14 Alineamiento enzima 3c (*) Señalados de color morado (-) se pueden observar los aminoácidos del sitio activo de las proteínas reportadas en la literatura. * Señalados de color verde (-) se observan los aminoácidos que participan en la unión al metal.

En la tabla 6 se presentan las fosfolipasas A₂ de otros organismos que se encontraron en la base de datos, aunque la similitud no es muy grande ya que solo entre el 14 y 19% de nuestra proteína fue alineada, en la figura 14 se puede observar que los sitios catalítico (marcados en morado) y los aminoácidos que participan a la unión con el Ca²⁺ (marcados en verde) de las enzimas reportadas coinciden con los sitios propuestos en nuestra enzima, en donde H⁸⁰ y D¹⁰⁸ posiblemente conforman la diada catalítica de nuestra enzima, además de la posibilidad de que la G⁷² y G⁷⁴ formen parte de los aminoácidos que participen en la unión con el metal.

Debemos recalcar que uno de los organismos que posee una de estas fosfolipasas A₂ con un poco de similitud es la anémona marina *Urticina crassicornis*, este organismo pertenece a la misma clase taxonómica

Fracción 3d:

En la figura 13 se presenta el espectro de masas de esta fracción mediante el empleo de la técnica MALDI-TOF el cual nos muestra que nuestra proteína tiene un peso de 16617 Da.

Además se obtuvo la siguiente secuencia, la cual corresponde con el peso molecular obtenido en el espectro de masas de 16617 Da

MLKRLVQFSYVITCFSLSCFRHATLLTSGIPCQKXFLAALALLDFGERNANHNRSDLKRVC
ATYNDACCRKSVVRPACSVPM SXIPTSLSLVSDDCDVAASCSLKRLLCYAGMDPAACKCYHN
TYNQVTYHMRVLPVGF GFKQCDRAMD

A esta se le realizó el mismo análisis bioinformático que a la proteína 3c y se encontró una fosfolipasa A₂ en *Conus magus* que es un poco parecida a nuestra enzima 3d

Conus magus

QXPSTAELCKINSNACSVPF SXIPCQKXFLAACDRHDTCYHCGKHFGFKQDDCDDAFFRDMT
ALCAHGTDDDEGXCPXAATCTHWALIYFKTVQLFGWXHFNYQVDATYCPQFQPCMPXX

Tabla 7 Alineamiento de secuencia de proteína 3d

ORGANISMO	IDENTIDAD	MAX SCORE	NÚMERO AA.	QUERY COVER
<i>Conus magus</i>	92	23.1	119	14

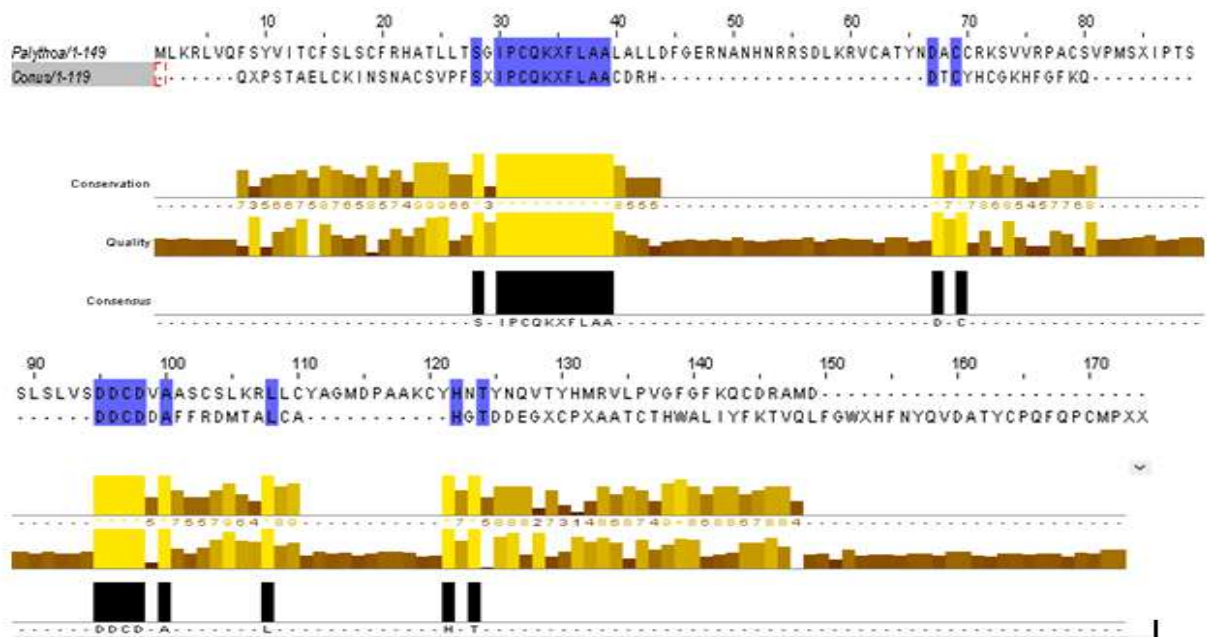


Figura 15 Alineamiento enzima 3d

En la tabla 7 solo se presenta la secuencia de una fosfolipasa A₂ de *Conus magus* ya que es la única fosfolipasa A₂ que alinea con un poco de similitud con nuestra enzima, además es importante señalar que se realizó un alineamiento que se presenta en la figura 16 solo con el objetivo de mostrar que hay regiones conservadas entre ambas enzimas que contienen aminoácidos como la H y D que posiblemente formen parte de la diada catalítica. Al observar ambos alineamientos para ambas fosfolipasas A₂ observamos que no hay gran similitud con las enzimas reportadas en la literatura pero si existe una región conservada en donde posiblemente se encuentre el centro catalítico por lo cual pensamos que posiblemente encontramos un nuevo grupo de fosfolipasas A₂, aunque para corroborar esto se requieren más estudios en otros organismos para poder realizar un estudio más profundo.

7. CONCLUSIONES

Se logro purificar 2 fosfolipasas A₂ de *P. caribaeorum* utilizando una ultrafiltración, cromatografía de intercambio iónico y de exclusión molecular.

Las fosfolipasas obtenidas pertenecen a la familia de fosfolipasas A₂ secretoras, una de las cuales tiene 12 residuos de cisteína formando posiblemente 6 puentes de disulfuro, lo cual concuerda con el número de residuos de cisteína reportado en la bibliografía; la otra fosfolipasa contiene 3 residuos de cisteína formando posiblemente 1 puente de disulfuro, a diferencia de los mínimo cuatro puentes de disulfuro que presentan todas las fosfolipasas A₂ secretoras hasta ahora conocidas.

La fosfolipasa 3c mostro un poco de similitud con la fosfolipasa A₂ reportada en la anémona marina *Urticina crassicornis*. Esta similitud solo se encuentra en la parte catalítica propuesta, por lo que se atribuye que esto se debe a la cercanía filogenética entre las anémonas marinas (orden Actinaria) y zoántidos (orden Zoanthidea).

8. PRESPECTIVAS

Estudios estructurales de dinámica molecular.

Obtener cristales de las fosfolipasas aisladas para determinar la estructura tridimensional por difracción de rayos X.

Evaluar la actividad neurotóxica.

Hacer experimentos mutagénicos para corroborar donde se encuentra el sitio catalítico.

Realizar experimentos con cationes divalentes para observar el comportamiento de la actividad.

Llevar a cabo la cinética enzimática de ambas fosfolipasas A₂ obtenidas.

9. REFERENCIAS

- Acosta, A. (2001) Disease in Zoanthids: Dynamics in space and time. *Hydrobiologia*. **460**: 113-130.
- Alfonso, G.G., García, C.A. (2009) Fosfolipasas A2: Grandes familias y mecanismos de acción. *Repert. Med. Cir.* **18(4)**: 199-209.
- Aloulou, A., Ben Ali, Y., Bezzine, S., Gelb, M. (2012). Phospholipases: An Overview. *Methods in Molecular Biology*. **861**: 63-85.
- Appeltans, W., Bouchet, P., Boxshall, G.A., De Broyer, C., de Voogd, N.J., Gordon, D.P., Hoeksema, B.W., Horton, T., Kennedy, M., Mees, J., Poore, G.C.B, Read G, Stöhr, S., Walter, T.C, Costello, M.J. (eds) (2012). World Register of Marine Species. Accessed at <http://www.marinespecies.org> on 2012-09-05.
- Arni, R.K. and Ward, R.J. (1996) Phospholipase A2- a structural review. *Toxicon*. **34(8)**:827-841.
- Balsinde, J., Balboa, M. and Dennis, E. (1998). Functional coupling between secretory phospholipase A2 and cyclooxygenase-2 and its regulation by cytosolic group IV phospholipase A2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**: 7951–7956.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G. L., Bhat, T. N., Weissig, H. (2000). *The Protein Data Bank. Nucleic Acids Res.* **28**: 235–242.
- Bokay A ,Z *Physiol Chem.*(1877), **1**, 157.
- Cabra, V., Vázquez Contreras, E., Moreno-Carcamo, A, Arreguín-Espinosa, R. (2008) The Effect of Sulfhydryl Groups and Disulphide Linkage in the Thermal Aggregation of Z19 Alpha-Zein. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1784**: 1028-1036.
- Carricart-Ganivet J.P. and G. Horta-Puga. (1993). Arrecifes de coral en México. 80-92. En: S.I. Salazar-Vallejo & N.E. González (eds.). Biodiversidad marina y costera de México. Com. Nal. Biodiversidad y CIQRO, México, 865.

- Catterall, W.A., Beress, L. (1978). Sea anemone toxin and scorpion toxin share a common receptor site associated with the action potential sodium ionophore. *J. Biol. Chem.* **253**: 7393–7396.
- Ciereszco, L. S. y K. B. Karns, (1973) Additional medicine – A potential resource Exploitation of Natural products. *The H.C Ørsted Institute. Copenhagen.* 8-12.
- Chen, J.Y., Oliveri, P., Gao, F., Dornbos, S.Q., Li, C.W., Bottjer, D.J., Davidson, E.H. (2002) Precambrian animal life: probable developmental and adult cnidarian forms from Southwest China. *Dev. Biol.* **248**: 182–196.
- De Bolster, M.W.G. (1997). «Glossary of Terms Used in Bioinorganic Chemistry: Coenzyme». International Union of Pure and Applied Chemistry. Consultado el 4-09-2012.
- Dennis, E.A. (1994) Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. *J Biol Chem.* **269(18)**:13057-60.
- Duerden, J. E. (1902). Reports on the actinians of Puerto Rico. *Bull. U. S. Fish.* **20** (1900, pt. 2): 321-374.
- Edman, P. and Begg, G. (1967) A Protein Sequenator. *European Journal of Biochemistry.* **1**: 80-91. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1967.tb00047.x>
- Fairbairn, D. (1945). The phospholipase of the venom of the Cottonmouth Moccasin *Agkistrodon piscivorus*. *J Biol Chem.* **157**: 633-644
- Faure, G.(2000). Natural inhibitors of toxic phospholipases A2 *Biochimie* 82 (2000) 833–840
- Fischer, J.D., Holliday, G.L., Rahman, S.A., Thornton, J.M. (2010) The Structures and Physicochemical Properties of Organic Cofactors in Biocatalysis. *J. Mol. Biol.* **403**: 803–824.
- Fourcade, O., Simon, M.F., Leballe, F. , Gigé, B., Gaits, F. , Delagebeaudeuf, C. , Gassama, A., Salles, J.P., J, Fauvel., Chap, H. (1996) Phospholipases A2 et pathologie inflammatoire : consensus et nouveaux concepts, *Med Sci (Paris)* **12**: 323-332
- Francini-Filho. R.B. and Moura R.L. de (2010) Predation on the toxic zoanthid *Palythoa caribaeorum* by reef fishes in the Abrolhos Bank, eastern Brazil. *Brazilian Journal of*

Oceanography **58**: 77–79.

- Garcia-Cubas, A., Reguero, M. and Jácome, L. (1994). Moluscos Arrecifales de Veracruz, México (Guía de campo), *Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, México*, 25-27.
- Gershwin, L. A., Richardson, A.J., Winkel, K.D., Fenner, P.J., Lippmann, J., Hore, R., Avila-Soria, G., Brewer, D., Kloser, R.J., Steven, A., Condie, S. (2013) Biology and ecology of irukandji jellyfish (cnidaria: cubozoa. *Adv Mar Biol.* **66**:1-85
- Hiramatsu T., Sonoda H., Takanezawa Y. et al (2003) Biochemical and molecular characterization of two phosphatidic acid-selective phospholipaseA1s, mPA-PLA1alpha and mPA-PLA1beta. *J Biol Chem* **278**:49438–49447.
- Hirata, Y., Uemura, D., Ueda, K. and Takano, S. (1979) Several compounds from *Palythoa tuberculosa* (Coelenterata). *Pure appl. Chem.* **51** (9): 1875-1883.
- IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). XML online corrected version: <http://goldbook.iupac.org> (consultado el 4-09-2012) created by M. Nic, J. Jirat, B. Kosata; updates compiled by A. Jenkins. ISBN 0-9678550-9-8. [doi:10.1351/goldbook](https://doi.org/10.1351/goldbook).
- Kelecom. A. and Solé-Cava, A. M. (1982) Comparative study of Zoanthid sterols, The genus *Palythoa* (Hexacorallia, Zoanthidea) *Comp. Biochem. Physiol.* **72B(4)**: 677-682.
- Kimura, S. and Y. Hashimoto (1973) Purification of the toxin in a Zoanthid *Palythoa tuberculosa*. *2nd Inter. Symp. Cnidaria Memorial of the 50th. Aniv. Of the Seto Marine Lab.* 713-718.
- Kimura, S, Y. Hashimoto and K. Yamazato. (1973) Toxicity of the zoanthid *Palythoa tuberculosa*. *Toxicon* **10**: 611-617.
- Kini, R.M., Evans, H.J. (1989) A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A2. *Toxicon.* **27(6)**:613-35.

- Kudo, I. and Murakami, M. (2002) Phospholipase A2 enzymes *Prostaglandins & other Lipid Mediators* **68-69**: 3–58.
- Lambeau G, Cupillard L, Lazdunski M. (1997) Membrane receptors for venom phospholipases A2. En: Kini RM, editor. *Venom phospholipase A2 enzymes: structure, function and mechanism*. Chichester: John Wiley & Son. 389-412.
- Lambeau G, Lazdunski M. (1999) Receptors for a growing family of secreted phospholipases A2. *Trends Pharmacol Sci* **20**:162-70.
- Lambeau G, Barhanin J, Schweitz H, Qar J, Lazdunski M. (1989) Identification and properties of very high affinity brain membrane-binding sites for a neurotoxic phospholipase from the taipan venom. *J Biol Chem* **264**:11503-10.
- Lambeau G, Lazdunski M, Barhanin J.(1991) Properties of receptors for neurotoxic phospholipases A2 in different tissues. *Neurochem Res* **16**:651-8.
- Laye, J.P. and Gill J, H. (2003) Phospholipase A2 expression in tumours: a target for therapeutic intervention? *Drug Discov Today* **8**:710.
- Mariscal, R. (1974). Nematocysts. In: Muscatine L, Lenhoff HM (eds.), *Coelenterate Biology: Reviews and New Perspectives*. Academic Press, New York. 132–153.
- Mebs, D. (1998) Occurrence and sequestration of toxins in food chains. *Toxicon* **36**:1519–1522.
- Ménez, A., (1998) Functional architectures of animal toxins: a clue to drug design? *Toxicon* **36** :1557-1572.
- McIntosh, J.M., Ghomashchi, F., Gelb, M.H., Dooley, D.J., Stoehr, S.J., Giordani, A.B., Naisbitt, S.R., Olivera, B.M., 1995. Conodipine-M, a novel phospholipase A2 isolated from the venom of the marine snail *Conus magus*. *J. Biol. Chem.* **270**: 3518–3526.
- Moore, R. E. and Bartoloni, G. (1981) Structure of palytoxin. *J. Am. chemL Soc.* **103**(9): 2491-2494.
- Murakami, M., Shimbara, S., Kambe, T., Kuwata, H., Winstead, M.V., Tishfields, J.A and

- Kudo, I.(1998) The Functions of Five Distinct Mammalian Phospholipase A₂s in Regulating Arachidonic Acid Release. *J. Biol Chem.* **273**: 14411-14423.
- Narahashi, T., Moore, J.W., Shapiro, B.I., 1969. Condylactis toxin: interaction with nerve membrane ionic conductances. *Science* **163**: 680–681.
 - Nevalainen, T.J., Peuravuori H.J., Quinn R.J., Llewellyn L.E., Benzie J.A.H., Fenner P.J., Winkel K.D. (2004) Phospholipase A2 in Cnidaria. *Comp. Biochem. Physiol. B* **139**: 731–735.
 - Norse, E.A.(1995) Maintaining the world's marine biological diversity. *Bull. Mar. Sci.* **57(1)**:10-13.
 - Ohara O, Ishizaki J, Arita H. (1995) Structure and function of phospholipase A2 receptor. *Prog Lipid Res* **34**:117-38.
 - Richet, C., 1903a. Des poisons contenus dans les tentacules des Actinies (congestine et thalassine). *C.R. Soc. Biol. Paris* **55**, 246–248.
 - Richet, C., 1903b. De la thalassine toxine cristallisée et pruritogène. *C.R. Soc. Biol. Paris* **55**, 707–710.
 - Sato T, Aoki J, Nagai Y. (1997) Serine phospholipid-specific phospholipase A that is secreted from activated platelets. A new member of the lipase family. *Biol Chem.* **272**: 2192–2198.
 - Scott, D. L., White, S. P., Otwinowski, Z., Yuan, W., Gelb, M. H., and Sigler, P. B. (1990). Interfacial catalysis: The mechanism of phospholipase AP. *Science* **250**, 1541-1546.
 - Sharp, J.D., White, D.L., Chiou, X.G., Goodson, T., Gamboa, G.C., McClure, D., Burgett, S., Hoskins, J., Skatrud, P.L., Sportsman, J.R. (1991) Molecular cloning and expression of human Ca(2+)-sensitive cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem.* **266 (23)**:14850-14853.
 - Shapiro, B.I., (1968). Purification of a toxin from tentacles of sea anemone *Condylactis gigantea*. *Toxicon.* **5**: 253–259.
 - Shiomi, K.A., Kazama, A., Shimakura, K., Nagashima, Y., 1998. Purification and properties

- of phospholipases A2 from the crown-of-thorns starfish (*Acanthaster planci*) venom. *Toxicon* **36**: 589–599.
- Schmiel D., Wagar E, Karamanou L., Weeks D., and Miller V. (1998) Phospholipase A of *Yersinia enterocolitica* contributes to pathogenesis in a mouse model. *Infect Immun* **66**:3941–3951.
 - SMEBD (2014). World Register of Marine Species. Accessed at <http://www.marinespecies.org>.
 - Suarez J. G., Burgos H. A., Ezquerra J.M. Bioactive peptides and depsipeptides with anticancer potential: Sources from marine animals. (2012) *Mar. Drugs*, **10**: 963–986.
 - Suchanek, T. H. and Green, D. J. (1981) Interspecific competition between *Palythoa caribaeorum* and other sessile invertebrates on St. Croix reefs, U.S. Virgin Islands. In: Int. Coral Reef Symp., 4. Proc. **2**: 679-684.
 - Triggiani, M., Granata, F., Giannattasio, G. and Marone, G.(2004) Secretory phospholipases A2 in inflammatory and allergic diseases: Not just enzymes *J Allergy Clin Immunol.* **116**: 1000-1006.
 - Turk T. and Kem W.R. (2009) The phylum Cnidaria and investigations of its toxins and venoms until 1990. *Toxicon* **54**: 1031–1037.
 - Valdés, R. Y, Bilbao D. M., León A. J. y Merchán G. F. (2002) *Rev Cubana Farm* ,**36**(2):121-8
 - Varela, C., Guitart, B., Ortiz, M., Lalana, R. (2002) Los zoantídeos (Cnidaria, Anthozoa, Zoanthiniaria), De la región occidental de Cuba. *Rev. Invest. Mar.* **23**(3):179-184.
 - Villarrubia, V. G., Costa A. L. and Díez A. R.(2004) Secreted phospholipases A2 (sPLA2): friends or foes? actors of the antibacterial and anti-HIV resistance. *Medicina Clinica* **123**(19): 749-757.
 - Wacklin, H.P., Tiberg, F., Fragneto, G., Thomas, R.K., (2006). Distribution of reaction products in phospholipase A2 hydrolysis. *Biochim. Biophys. Acta* **1768**: 349–356

- Wunderer, G., Fritz, H., Wachter, E., Machleidt, W., 1976. Amino acid sequence of a coelenterate toxin: toxin II from *Anemonia sulcata*. *Eur. J. Biochem.* **68**: 193–198.

10. ANEXOS

Index Number: CUEVAS3C

pI of Protein: 5.8

Protein MW: 14653

Amino Acid Composition: A11 C3 D9 E15 F4 G7 H2 I2 K14 L15 N1 P5 Q10 R8 S5 T4 V6 W2 Y4

1 SKVREQLGPV TQEFWDNLEK EKVQPYLDEF QKKWHEEVEI YRQKVAPLQD LAPYSDDLRQ RLTLARLEALK EGGGSLAEYH
 8 AKASEQLKAL GEKAKPVLED LRQGLECDRI GAQCFADKRS TFKTDKCC
 1

Number	m/z (mi)	m/z (ay)	Modifications	Start	End	Missed Cleavages	Sequence
1	803.3352	803.8740	1Gln->pyro-Glu	103	109	0	(R)QGLECDR(I)
1	820.3618	820.9047		103	109	0	(R)QGLECDRQGLECDR(I)
1	826.4305	826.9302		120	126	1	(R)STFKTDKSTFKTDK(C)
1	952.4557	953.1115		110	118	0	(R)IGAQCFFADKIGAQCFADK(R)
1	1014.6306	1015.2485		62	70	1	(R)LTARLEALKTLARLEALK(E)
1	1040.6099	1041.2430		94	102	0	(K)AKPVLEDLRAKPVLEDL(R)
1	1108.5568	1109.3001		110	119	1	(R)IGAQCFFADKIGAQCFADK(R)
1	1173.6474	1174.3475		83	93	1	(K)ASEQLKALGEKASEQLKALGEK(A)
1	1218.5749	1219.3040		71	82	0	(K)EGGGS LAEYHAKKEGGGS LAEYHAK(A)
1	1260.6008	1261.3879		34	42	0	(K)WHEEVEIYRWHEEVEIYR(Q)
1	1266.6365	1267.4328		23	32	0	(K)VQPYLDEFQKVPYLDEFQK(K)
1	1388.6957	1389.5631		33	42	1	(K)KWHEEVEIYRWHEEVEIYR(Q)
1	1394.7314	1395.6080		23	33	1	(K)VQPYLDEFQKVPYLDEFQK(W)
1	1516.7543	1517.6946		34	44	1	(K)WHEEVEIYRWHEEVEIYR(Q)
1	1523.7740	1524.7242		21	32	1	(K)EKVQPYLDEFQKVPYLDEFQK(K)
1	1538.8901	1539.8264		89	102	1	(K)ALGEKAKPVLEDLRAKPVLEDL(R)
1	1672.8541	1673.8746		45	59	0	(K)VAPLQDLAPYSDDLRVAAPLQDLAPYSDDLR(Q)
1	1736.7731	1737.9627	1Gln->pyro-Glu	103	118	1	(R)QGLECDRIGAQCFADK(R)
1	1753.7996	1754.9934		103	118	1	(R)QGLECDRIGAQCFADKQGLECDRIGAQCFADK(R)
1	1772.9177	1773.9957		66	82	1	(R)LEALKEGGGS LAEYHAKLEALKEGGGS LAEYHAK(A)
1	1841.9538	1843.1250		94	109	1	(K)AKPVLEDLRAKPVLEDLRAKPVLEDL(R)
1	1874.9243	1876.0454		71	88	1	(K)EGGGS LAEYHAKASEQLKEGGGS LAEYHAKASEQLK(A)
1	1911.9811	1913.1507	1Gln->pyro-Glu	43	59	1	(R)QKVAPLQDLAPYSDDLR(Q)
1	1929.0076	1930.1813		43	59	1	(R)QKVAPLQDLAPYSDDLRQKVAPLQDLAPYSDDLR(Q)
1	1932.9338	1934.1257		5	20	0	(R)EQLGPVTQEFWDNLEKEQLGPVTQEFWDNLEK(E)
1	1957.0138	1958.1948		45	61	1	(K)VAPLQDLAPYSDDLRVAAPLQDLAPYSDDLR(Q)
1	2188.1033	2189.4477		3	20	1	(K)VREQLGPVTQEFWDNLEKQVREQLGPVTQEFWDNLEK(E)
1	2190.0713	2191.4170		5	22	1	(R)EQLGPVTQEFWDNLEKEQLGPVTQEFWDNLEK(E)

Index Number: CUEVAS3D

pI of Protein: 9.0

Protein MW: 16617

Amino Acid Composition: A14 C12 D9 E1 F7 G5 H4 I3 K7 L16 M5 N6 P6 Q4 R11 S13 T7 V11 X2 Y6

1 MLKRLVQFSY VITCFSLSCF RHATLLTSGI PCQKXFLAAL ALLDFGERNA NHNRRSDLRK VCATYNDACC RKSVMRPACS
 8 VPMXSIPSTL SLVSDDCDVA ASCSLKRLCC YAGMDPAAKC YHNTYQVITY HMRVLPVGFQ FKQCDRAMEQ
 1

Number	m/z (mi)	m/z (ay)	Modifications	Start	End	Missed Cleavages	Sequence
1	821.2916	821.9113	1Gln->pyro-Glu	143	149	1	(K)QCDRAMD(-)
1	837.2866	837.9107	1Gln->pyro-Glu	143	149	1	(K)QCDRAMD(-)
1	838.3182	838.9420	1Oxidation	143	149	1	(K)QCDRAMD(-)
1	854.3131	854.9414	1Oxidation	143	149	1	(K)QCDRAMD(-)
1	881.4449	881.9348		49	55	1	(R)NANHNRR(S)
1	963.5662	964.2029		134	142	0	(R)VLPVGFQK(Q)
1	1218.4700	1219.4110		61	71	0	(R)VCATYNDACC(R)
1	1252.6064	1253.5343		108	119	0	(R)LLCYAGMDPAAK(C)
1	1268.6014	1269.5337	1Oxidation	108	119	0	(R)LLCYAGMDPAAK(C)
1	1346.5650	1347.5862		61	72	1	(R)VCATYNDACC(R)
1	1368.7304	1369.6357		22	34	0	(R)HATLLTSGIPCQK(X)
1	1374.5711	1375.5997		60	71	1	(K)RVCATYNDACC(R)
1	1408.7076	1409.7230		107	119	1	(K)RLLCYAGMDPAAK(C)
1	1424.7025	1425.7223	1Oxidation	107	119	1	(K)RLLCYAGMDPAAK(C)
1	1465.7620	1466.7659		134	146	1	(R)VLPVGFQKQCDR(A)
1	1548.8784	1549.8649		35	48	0	(K)XFLAALALLDFGER(N)
1	1829.7846	1831.0539		120	133	0	(K)CYHNTYNOVTYHMR(V)
1	1845.7795	1847.0533	1Oxidation	120	133	0	(K)CYHNTYNOVTYHMR(V)
1	2012.9973	2014.4310		5	21	0	(R)LVQFSYVITCFSLSCFR(H)
1	2169.0984	2170.6197		4	21	1	(K)RLVQFSYVITCFSLSCFR(H)
1	2255.2044	2256.5883		35	54	1	(K)XFLAALALLDFGERNANHNRR(R)
1	2774.3330	2776.2341		120	142	1	(K)CYHNTYNOVTYHMRVLPVGFQK(Q)
1	2790.3279	2792.2334	1Oxidation	120	142	1	(K)CYHNTYNOVTYHMRVLPVGFQK(Q)
1	2898.5910	2900.4779		22	48	1	(R)HATLLTSGIPCQKXFLAALALLDFGER(N)
1	3063.3732	3065.5655		108	133	1	(R)LLCYAGMDPAAKCYHNTYNOVTYHMR(V)
1	3079.3681	3081.5649	1Oxidation	108	133	1	(R)LLCYAGMDPAAKCYHNTYNOVTYHMR(V)
1	3095.3631	3097.5643	2Oxidation	108	133	1	(R)LLCYAGMDPAAKCYHNTYNOVTYHMR(V)
1	3362.7098	3365.0440		5	34	1	(R)LVQFSYVITCFSLSCFRHATLLTSGIPCQK(X)
1	3450.6987	3453.0777		73	106	0	(K)SVWRPACSVPMXSIPSTLSLVSDDCDVAASC SLK(R)
1	3466.6936	3469.0771	1Oxidation	73	106	0	(K)SVWRPACSVPMXSIPSTLSLVSDDCDVAASC SLK(R)
1	3578.7937	3581.2529		72	106	1	(R)KSVWRPACSVPMXSIPSTLSLVSDDCDVAASC SLK(R)
1	3594.7886	3597.2522	1Oxidation	72	106	1	(R)KSVWRPACSVPMXSIPSTLSLVSDDCDVAASC SLK(R)
1	3606.7998	3609.2663		73	107	1	(K)SVWRPACSVPMXSIPSTLSLVSDDCDVAASC SLK(L)
1	3622.7947	3625.2657	1Oxidation	73	107	1	(K)SVWRPACSVPMXSIPSTLSLVSDDCDVAASC SLK(R)