



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

CARACTERIZACIÓN DE UNA PROTEASA PRESENTE EN EL
VENENO DE *Palythoa caribaeorum*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS
(QUÍMICA ACUÁTICA)

PRESENTA:

MARTHA MAYELA MANZANO MORA

TUTOR PRINCIPAL:

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

COMITÉ TUTOR:

DR. ESTUARDO LÓPEZ VERA
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM

DR. SAÚL GÓMEZ MANZO
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA, SS

DRA. ALEJANDRA HERNÁNDEZ SANTOYO
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

DR. JOSÉ FEDERICO DEL RÍO PORTILLA
INSTITUTO DE QUÍMICA UNAM

ASESOR EXTERNO:

DR. JOSÉ FERNANDO LAZCANO PÉREZ
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, PUERTO MORELOS, UNAM

CD. MX. SEPTIEMBRE, 2021



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.



**CARACTERIZACIÓN DE UNA SERÍN PROTEASA PRESENTE EN
EL VENENO DE *Palythoa caribaeorum***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS
(QUÍMICA ACUÁTICA)

PRESENTA:
MARTHA MAYELA MANZANO MORA

TUTOR(A) O TUTORES PRINCIPALES:
TUTOR PRINCIPAL:
DR. ROBERTO ALEJANDRO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

COMITÉ TUTOR:
DR. ESTUARDO LÓPEZ VERA
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM

DR. SAÚL GÓMEZ MANZO
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA, SS

DRA. ALEJANDRA HERNÁNDEZ SANTOYO
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

DR. JOSÉ FEDERICO DEL RÍO PORTILLA
INSTITUTO DE QUÍMICA UNAM

ASESOR EXTERNO:
DR. JOSÉ FERNANDO LAZCANO PÉREZ
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, PUERTO MORELOS, UNAM

MÉXICO, CD. MX., SEPTIEMBRE, 2021.



El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Química de Biomacromoléculas 2 del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, así como los recursos para actividades de formación recibidos del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgar la beca para la realización de este proyecto.

Al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología por darme la oportunidad de desarrollar mi trabajo de tesis.

Al Dr. Roberto Alejandro Arreguín Espinosa de los Monteros, quién me proporcionó los medios necesarios para realizar este proyecto, así como por su apoyo en todo momento.

A los miembros de mi comité tutorial: Dr. José Fernando Lazcano Pérez, Dr. Saúl Gómez Manzo, Dr. Estuardo López Vera, Dr. José Federico del Río Portilla y Dra. Alejandra Hernández Santoyo, por su dedicación, consejos y revisiones durante este proceso.

A la M.C. Teresa y al M.C. Antonio del Laboratorio de pruebas biológicas por su apoyo y atención.

A mis compañeros del laboratorio de Biomacromoléculas 2: Biol. Mar. Noel Fabián, M.C. María Vanegas, M.C. Noé Salgado, Adrián h y en especial al M.C. Adrián Marcelo Franco Vázquez por su apoyo dentro y fuera del laboratorio.

A los amigos que formé en el Instituto de Química y en el lab B-2: M.C. Jorge A. Osorio Kuan, M.C. Rogerio A. Sebastián Saavedra y M.C. Esteban López Sampedro; mi tiempo en CDMX fue mucho más alegre y liviano a su lado. Cada uno está en mi mente siempre.

Al M.C. Alan G. Hernández Melgar por su apoyo en todo momento, sobre todo en los momentos más difíciles tanto en mi vida como durante el desarrollo de esta tesis. Por su amistad, amor y por todas las bonitas experiencias que hemos formado.

A mis grandes amigos de preparatoria Óscar, Gio, Roberto y Miry por su amistad, cariño y apoyo en todo momento.

A mis morsas favoritas: Carlos y Torres; dieciséis años de amistad aún son pocos comparado con los que nos faltan por cumplir.

A mis amigas de la Universidad: Ángeles y Moni, gracias por su amistad, apoyo y cariño.

A mi mejor amiga Luz por siempre estar a mi lado, sobre todo en los momentos más difíciles. No cabe duda de que la distancia es lo de menos cuando alguien nos importa. Lo mejor que me dejó la universidad fue tu amistad.

A mi amiga del posgrado Barbi por el apoyo, por nuestros ensayos antes de los tutorales y las horas de chisme que pasamos.

A mis papás Martha y Alejandro, mis hermanas Mireya y Monserrat, mi tío Salomón Mora y mi prima Sandra Manzano por su amor incondicional y apoyo en todo momento. Por animarme y darme fuerza para continuar después de mi diagnóstico y en todas las etapas donde la enfermedad a veces no me dejaba trabajar. Sin su apoyo y su fe en mí no hubiera podido salir adelante.

A mis primos Ivón, Marco, Kary, mi tía Rosaura, mi tío Alfredo y mi tía Male por siempre estar al pendiente de mí, por su cariño y confianza.

A todas las personas que estuvieron presentes y al pendiente de mí las llevo en mi corazón.

DEDICATORIAS

Este trabajo está dedicado a mis padres Alejandro Manzano Díaz y Martha Mora Aguilar por ser siempre mi ejemplo para seguir y por su amor incondicional. Dios y la vida me dieron el mejor regalo y es tenerlos a ustedes. Este logro es solo un poco de todo lo que ustedes merecen ver porque no hay duda de que los padres por amor nunca abandonan a sus hijos. Asimismo, todo lo que han hecho por mí provoca que siga de pie luchando por seguir y sobresalir. Los amo.

A mis hermanas Mireya Alejandra Manzano Mora y Monserrat Manzano Mora por estar conmigo siempre, por su amor, apoyo y buenos momentos juntas. Son mi fuerza para seguir adelante, las amo infinitamente.

A mi abuela Socorro, estoy segura de que desde arriba me observas y cuidas, pero sobre todo sigues cada paso que doy. Mis logros también van para ti con mucho amor.

Índice General

Índice de figuras	8
Índice de tablas.....	10
Abreviaturas	11
Resumen	13
Abstract	14
1. Introducción	15
2. Marco teórico	15
1. Filo Cnidaria	15
2. Orden Zoantharia	17
3. <i>Palythoa caribaeorum</i>	17
4. Composición del veneno de cnidarios.....	18
5. Enzimas	19
5.1 Proteasas	20
5.2 Serín proteasas y metaloproteasas	22
6. Función de las proteasas en el veneno	30
3. Antecedentes.....	32
1. Estudio de proteasas en cnidarios.....	32
1.1 Estudios de proteasas en <i>Palythoa caribaeorum</i>	35
4. Justificación	35
5. Hipótesis	36
6. Objetivos.....	36
7. Metodología	36
1. Muestreo	36
2. Obtención de extracto crudo.	37
3. Cuantificación de proteínas.....	37
4. Prueba de amortiguadores.....	38
5. Purificación parcial	39
Cromatografía preparativa de intercambio catiónico	39
6. Concentrado, filtrado y desalado de fracciones.....	39
7. Separación mediante cromatografía de exclusión molecular.....	40

8.	Determinación de la masa molecular mediante la técnica de electroforesis SDS-PAGE	40
9.	Prueba de actividad de proteasas	40
	Determinación de la actividad proteolítica en zimograma.	40
10.	Ensayo de proteasas	41
11.	Efecto de inhibidores	41
12.	Efecto de iones metálicos	42
13.	Monitoreo del grado de pureza de la fracción de interés mediante Fase reversa	42
14.	Análisis de la pureza de la fracción por MALDI-TOF.....	42
15.	Identificación por espectrometría de masas (MS/MS).....	43
8.	Resultados y discusiones	43
1.	Cuantificación de proteína mediante el ensayo con ácido bicinconínico (BCA) y análisis electroforético	43
2.	Prueba de estabilidad de amortiguadores	45
3.	Efecto de inhibidores de proteasas sobre VT	48
4.	Efecto de iones metálicos en VT.....	50
5.	Separación mediante intercambio catiónico	52
6.	Prueba de actividad proteolítica de fracciones obtenidas por FPLC.....	53
7.	Concentrado, desalado y separación de fracciones.....	56
8.	Separación por cromatografía de exclusión molecular.....	57
9.	Rendimiento total del veneno de <i>Palythoa caribaeorum</i>	62
10.	Efecto de inhibidores en P2IC.2	62
	Efecto de iones metálicos en P2IC.2.....	63
11.	Monitoreo del grado de pureza de la fracción de interés mediante Fase reversa	65
12.	Análisis por MALDI-TOF	66
13.	Identificación por espectrometría de masas (MS/MS)	71
9.	Conclusiones	75
10.	Perspectivas	76
11.	Referencias	77
	Anexo 1	89

Índice de figuras

Figura 1. Alternancia de generaciones en cnidarios	16
Figura 2. Mecanismo de descarga del nematocisto.....	17
Figura 3. Colonia de <i>Palythoa caribaeorum</i>	18
Figura 4. Mecanismo de acción de las proteasas.....	21
Figura 5. Triada catalítica característica de las serín proteasas.....	22
Figura 6. Diagrama de algunas serín proteasas: quimotripsina (a), tripsina (b) y elastasa (c)	25
Figura 7. Representación del sitio catalítico con los tres residuos de Histidina de unión al catión divalente de zinc.....	30
Figura 8. Área de estudio	37
Figura 9. Curva estándar ocupada para el BCA	43
Figura 10. SDS-PAGE del veneno total soluble de <i>P. caribaeorum</i>	44
Figura 11. Actividad proteolítica del veneno soluble de <i>P. caribaeorum</i>	45
Figura 12. Efecto del pH y tipo de amortiguador en la actividad proteolítica del extracto crudo.....	47
Figura 13. Efecto del pH y tipo de amortiguador en la actividad proteolítica después de 4 horas de incubación.....	47
Figura 14. Efecto de los inhibidores sobre VT después de una hora de incubación.....	49
Figura 15. Efecto de los iones metálicos sobre VT después de una hora de incubación.....	50
Figura 16. Cromatograma de Intercambio catiónico de VT	52
Figura 17. Prueba de punto final para la evaluación de la actividad proteolítica de las fracciones obtenidas mediante intercambio catiónico en FPLC	54
Figura 18. SDS-PAGE de las fracciones cromatográficas de <i>P. caribaeorum</i>	55
Figura 19. Prueba de punto final para la evaluación de la actividad proteolítica de las fracciones obtenidas mediante el uso de centricones con corte de 10 kDa	56
Figura 20. Cromatograma de exclusión molecular de la fracción P2IC.2	58
Figura 21. Prueba de punto final para la evaluación de la actividad proteolítica de las fracciones obtenidas mediante centricones con corte de 10 kDa	59
Figura 22. Prueba de punto final para la evaluación de la actividad proteolítica de cada una de las fracciones obtenidas en los pasos de purificación y de VT.....	60
Figura 23. SDS-PAGE de las fracciones cromatográficas de <i>P. caribaeorum</i>	61
Figura 24. Efecto de los inhibidores sobre P2IC.2 después de una hora de incubación.....	63
Figura 25. Efecto de los iones metálicos sobre P2IC.2 después de una hora de incubación	64
Figura 26. Cromatograma en fase reversa de la fracción P2IC.2	65
Figura 27. Espectro de masas de la fracción P2IC.2	66
Figura 28. Espectro de masas de la fracción P2IC.2-1.....	67
Figura 29. Cálculo de componentes multi carga para la fracción P2IC.2-1.....	68
Figura 30. Espectro de masas de la fracción P2IC.2-1.....	69
Figura 31. SDS-PAGE de las fracciones de interés.....	70
Figura 32. Alineamiento múltiple de las metaloproteasas identificadas para <i>G. brevicaudus</i> , <i>C. horridus</i> , <i>Hypsiglena</i> sp. y <i>E. carinatus sochureki</i>	74

Figura 33. Alineamiento múltiple de las metaloproteasas identificadas para <i>G. brevicaudus</i> , <i>C. horridus</i> , <i>Hypsiglena</i> sp. y <i>E. carinatus sochureki</i>	75
Figura 34. Identificación de sitios conservados en una metaloproteasa (Tipo II) del veneno de <i>Crotalus horridus</i>	89
Figura 35. Identificación de sitios conservados en la metaloproteasa dependiente de Zinc/desintegrina del veneno de <i>Gloydius brevicaudus</i>	89
Figura 36. Identificación de sitios conservados en la metaloproteasa (Tipo III) del veneno de <i>Hypsiglena</i> sp.	90

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de las enzimas.....	19
Tabla 2. Residuos catalíticos de las serín proteasas, mecanismos de activación y predominancia.....	23
Tabla 3. Fuentes y actividad biológica de algunas serín proteasas	25
Tabla 4. Grupos de metaloproteasas reportadas con su respectiva función en humanos	27
Tabla 5. Proteasas presentes en algunas especies de cnidarios.....	33
Tabla 6. Estudios realizados en <i>P. caribaeorum</i>	35
Tabla 7. Preparación de estándares de albúmina diluida (BSA)	38
Tabla 8. Prueba de estabilidad de amortiguadores	46
Tabla 9. UAP y UAPe del veneno total de <i>Palythoa caribaeorum</i>	51
Tabla 10. UAP y UAPe de las fracciones P1IC, P2IC y P3IC provenientes del veneno de <i>Palythoa caribaeorum</i>	54
Tabla 11. UAP y UAPe de la fracción P1IC y P2IC provenientes del veneno de <i>Palythoa caribaeorum</i>	57
Tabla 12. Unidades de actividad proteolítica (UAP) y específica (UAPe) de P2IC.1, P2IC.2, P2IC.3 provenientes de <i>Palythoa caribaeorum</i>	62
Tabla 14. UAP y UAPe de la fracción P2IC.2 proveniente del veneno de <i>Palythoa caribaeorum</i>	64
Tabla 15. Alineamiento de la metaloproteasa (Tipo II) con el péptido tríptico identificado en la fracción P2IC.2-1.....	71
Tabla 16. Alineamiento de la metaloproteasa (Tipo III) con el péptido tríptico identificado en la fracción P2IC.2	71
Tabla 17. Alineamiento de la metaloproteasa con el péptido tríptico identificado en la fracción P2IC.2	72
Tabla 18. Alineamiento de la metaloproteasa dependiente de Zinc/desintegrina con el péptido tríptico identificado en la fracción P2IC.2-1	72

Abreviaturas

Asp	Ácido aspártico
APMA	acetato de p-aminofenilmercúrico
ATP	Adenosín Trifosfato
BCA	Ácido bicinconínico
Ca²⁺	Catión divalente de Calcio
CG	Catepsina G
CHCA	ácido α-ciano-4-hidroxicinámico
cm	Centímetros
DFP	Diisopropil flurofosfato
DipF	Diisopropil fosfofluoridato
ECM	Matriz extracelular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido etilenglicol tetraacético
Fen	1,10-fenantrolina
FTC	Ensayo de fluoresceína tiocarbamoil (FTC)-caseína proteasa (por sus siglas en inglés)
g	Gramos
Glu	Ácido glutámico
GRZ	Granzimas
HCl	Ácido clorhídrico
His	Histidina
IUBMB	Unión Internacional de Bioquímica Molecular
kDa	Kilodalton
L	Litros
Lys	Lisina
MALDI-TOF	desorción/ionización láser asistida por una matriz con detección de masas por tiempo de vuelo (por sus siglas en inglés)
Mg²⁺	Catión divalente de Magnesio
Min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MMP	Metaloproteasa de matriz
MNP	Fagocitos mononucleares
NE	Elastasa de neutrófilos
NK	“Asesino natural”
P	Monocitos, monocitos proinflamatorios
PA	Activadores del plasminógeno
PMN	Neutrófilos polimorfonucleares
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoruro
ProMMP	Precursor inactivo de metaloproteasa de matriz

PR3	Proteasa 3
RFC	Fuerza centrífuga relativa (por sus siglas en inglés)
RPM	Revoluciones por minuto
SA	Ácido sinapínico
SDS	Dodecil Sulfato Sódico
Ser	Serina
TGF	Factor de crecimiento transformador
TIMP	Inhibidores tisulares de metaloproteasas
TLCK	N - α - Tosil - L - Lisinil - Clorometilcetona
TPCK	N - Tosil - L - Fenilalaninil - Clorometilcetona
UAP	Unidades de actividad proteolítica
UAPe	Unidades de actividad proteolítica específica
uPA	Activador de plasminógeno tipo urocinasa
uPAR	Receptor del activador de plasminógeno tipo urocinasa
V	Voltios
VT	Veneno total
°C	Grados Celsius
μL	Microlitros

Resumen

El filo Cnidaria es un grupo que ha sido poco estudiado pero que presenta gran relevancia desde el punto de vista farmacológico y biotecnológico por la gran variedad de componentes que presenta su veneno.

Palythoa caribaeorum es una especie común en el Atlántico occidental. Su amplia distribución y alta densidad poblacional es el resultado de varios factores entre los que destaca el veneno contenido en sus nematocistos compuesto por una amplia variedad de moléculas de interés como neurotoxinas, fosfolipasas, proteasas, entre otros. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar una proteasa del veneno de este organismo. El análisis del veneno mostró una gran cantidad de proteínas con masas que van desde los 12-245 kDa. El monitoreo de la actividad proteolítica en cada paso de purificación permitió identificar proteasas con niveles altos de actividad. Los experimentos con iones demuestran que tanto el veneno total como la fracción P2IC.2 no requirieron de cofactores, por lo que no son dependientes de metales.

Con base en los resultados se sugiere la presencia de al menos una metaloproteasa en la fracción P2IC.2 y P2IC.2-1. Debido a que no hubo una identificación completa con la base de datos UniProt, existe la posibilidad que los cuatro péptidos obtenidos pertenezcan a una nueva proteasa no reportada previamente. Este hallazgo constituiría el primer registro en el que se aísla e identifica una proteasa proveniente del veneno de un cnidario.

Abstract

The phylum Cnidaria is a group that has been little studied but that presents great relevance from the pharmacological and biotechnological point of view due to the great variety of components that its venom.

Palythoa caribaeorum is a common species in the western Atlantic. Its wide distribution and high population density are the result of several factors among which the venom contained in its nematocysts composed of a wide variety of molecules of interest like neurotoxins, phospholipases, proteases, among others. Therefore, the objective of this work was to isolate and characterize a protease from the venom of this organism. Venom analysis showed a large number of proteins with masses ranging from 12-245 kDa. Monitoring the proteolytic activity in each purification step made it possible to identify proteases with high levels of activity. Ion experiments show that both the total venom and the P2IC.2 fraction did not require cofactors, so they are not metal dependent.

Based on the results, the presence of at least one metalloprotease in the P2IC.2 and P2IC.2-1 fraction is suggested. Since there was no complete identification with the UniProt database, there is a possibility that the four peptides obtained belong to a new protease not previously reported. This finding would constitute the first record in which a protease from the venom of a cnidarian is isolated and identified.

1. Introducción

La búsqueda de compuestos útiles para la industria farmacéutica y alimentaria se ha enfocado principalmente en organismos terrestres debido principalmente, a la facilidad que se tiene para acceder a ellos. En años recientes se ha comenzado a buscar compuestos bioactivos en organismos marinos, ya que se ha observado que, debido a la presión constante en la que se desenvuelven, han evolucionado creando estrategias diversas para su supervivencia en las que se incluye una gran diversidad de metabolitos que les ayudan a defenderse de la depredación, de sus competidores y de infecciones. Sin embargo, los estudios al respecto son escasos.

Entre los diversos compuestos que han sido estudiados se encuentran las proteasas, enzimas presentes en todos los organismos y con funciones implicadas en la coagulación sanguínea, apoptosis o función digestiva, entre otras (Müller-Esterl, 2008). Estas enzimas también cumplen papeles importantes al estar presentes en el veneno de cnidarios y otros organismos venenosos como serpientes, donde ayudan junto con otras moléculas a inducir el proceso de hemorragia en las presas, al interferir en el sistema homeostático, así como en la degradación de tejidos (Bergillos-Gasión & Rivas-Fernández, 2013; Moran *et al.* 2012).

Las enzimas marinas también ofrecen ciertas ventajas sobre aquellas de origen terrestre o microbiano debido a que poseen una alta actividad y estabilidad en condiciones de reacción extremas (Haard & Simpson, 2000), lo que facilita su manipulación en el laboratorio. Por tanto, este trabajo pretende describir la actividad proteolítica del veneno producido por *Palythoa caribaeorum* un zoántido perteneciente al filo Cnidaria, así como el tipo de proteasa que presenta.

2. Marco teórico

1. Filo Cnidaria

Los cnidarios son animales invertebrados con simetría radial. Tienen dos capas embrionarias conocidas como ectodermo y endodermo, además de una matriz no celular

presente entre las dos capas denominada mesoglea (Brusca & Brusca 2005). Presentan reproducción con alternancia de generaciones o metagénesis, donde la forma pólipo (Fig. 1a) se reproduce asexualmente y la forma medusa lo hace sexualmente (Fig. 1b).

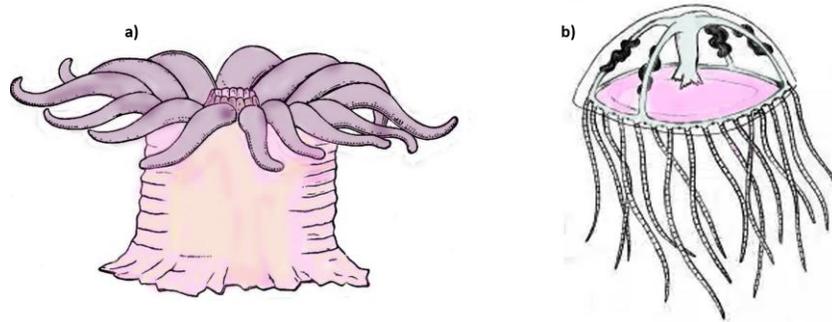


Figura 1. Alternancia de generaciones en cnidarios. Los cnidarios tienen dos formas posibles de reproducción, Fase pólipo (a) con reproducción asexual; Fase medusoide (b) con reproducción sexual.

Actualmente los cnidarios se clasifican en siete clases: Anthozoa, Hydrozoa, Scyphozoa, Cubozoa (Technau & Steele, 2011), Myxozoa, Staurozoa (Miranda *et al.* 2010) y Polypodiozoa (Horton *et al.* 2017). Estos organismos generalmente son depredadores; sin embargo, también pueden obtener alimento a partir de algas unicelulares fotosintéticas intracelulares con las que hacen simbiosis, llamadas zooxantelas (Frazão *et al.* 2012).

La capacidad de depredación y el consecuente éxito de su alimentación se basa en la presencia de células denominadas cnidocitos, cuyo principal fin es el de inyectar veneno. Estas células contienen organelos subcelulares especializados denominados cnidos o cnidocisto que constan de una cápsula invaginada de doble pared, un opérculo encargado de recibir los estímulos de alerta y un filamento con estructura cilíndrica continua o unida al ápice de la cápsula, el cual, se encuentra cubierto de espinas que le ayudará a sujetarse a su presa durante la descarga (Fig. 2).

Existen tres tipos de cnidos: 1. los espirocistos presentes en las anémonas y en algunas especies de coral, tienen una función adhesiva y son utilizados para inmovilizar mecánicamente a la presa. 2. Los pticocistos exclusivos de ceriantarios (orden perteneciente a la clase Anthozoa) también poseen una función adhesiva. Además, son

utilizados para construir el tubo en el que viven. Finalmente, 3. los nematocistos presentes en todos los cnidarios; son los únicos involucrados en funciones de defensa y depredación (Fig. 2) (Frazão *et al.* 2012). Estos contienen veneno que es inyectado después de la descarga, a través de una alteración en la presión osmótica de la cápsula, combinada con la influencia de ciertos estímulos mecánicos y químicos, que conduce a una liberación súbita de calcio en el interior de la cápsula, un ingreso de agua, y un aumento en la presión interior de la misma (Fig. 2).

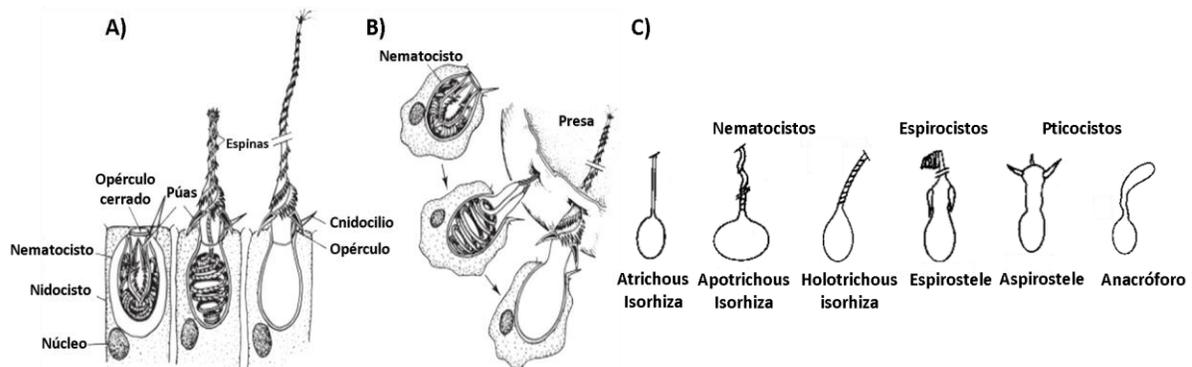


Figura 2. Mecanismo de descarga del nematocisto: Etapas en la descarga de un cnidocisto mediante estímulo químico o mecánico(a); penetración del filamento del cnidocisto en otro organismo (b) (Modificado de Pechenik, 2016); tipos de cnidocitos: nematocistos, espirocistos y pticocistos (c).

2. Orden Zoantharia

Los zoántidos pertenecen a la subclase Hexacorallia, clase Anthozoa. Son organismos marinos sésiles coloniales que carecen de esqueleto, aunque dentro de esta subclase también existen especies solitarias y con esqueleto calcáreo o cutícula quitinosa (Brusca *et al.* 2016). El taxón a menudo se considera un intermedio entre los corales duros (Scleractinia) y las anémonas de mar (Actiniaria) (Irei *et al.* 2015). Los zoántidos forman colonias de pólipos, poseen dos filas de tentáculos cubiertos por nematocistos (Uzbek *et al.* 2009) y por lo general, se encuentran en zonas someras en los arrecifes de coral (Sinniger *et al.* 2005).

3. *Palythoa caribaeorum*

Este organismo pertenece al orden Zoantharia. Es común encontrarlo en el Atlántico occidental, ya que se distribuye ampliamente en las costas de Argentina, Uruguay, Venezuela, Panamá, Costa Rica, Nicaragua, Honduras, México, Islas Vírgenes, St. Thomas

EE.UU., Jamaica, Venezuela y es la especie dominante en los arrecifes de Brasil (Varela *et al.* 2002; Silva *et al.* 2015). Probablemente, esta amplia distribución y alta densidad poblacional son el resultado de varios factores como la plasticidad de la colonia, la tolerancia fisiológica a cambios en la temperatura o condiciones propias del ambiente en el que se encuentran, estrategias reproductivas eficientes, un crecimiento rápido y contar con diversos mecanismos contra la depredación (Acosta *et al.* 2001; Rabelo *et al.* 2013).

P. caribaeorum se caracteriza por la formación de colonias de pólipos, los cuales están rodeados por dos anillos de tentáculos cargados de nematocistos, y la ausencia de un esqueleto de carbonato de calcio como los corales, mientras que su coloración suele ser blanquecina a marrón, a veces amarillenta (Fig. 3).



Figura 3. Colonia de *Palythoa caribaeorum*. Morfología común de la anémona colonial en la que se muestran los pólipos y formación de tentáculos alrededor de la boca (Tomada de Bize, 2015).

4. Composición del veneno de cnidarios

La composición química del veneno de los cnidarios consiste principalmente de péptidos, proteínas, enzimas como proteasas e inhibidores de proteasas (Frazão *et al.* 2012). El veneno de las medusas puede presentar, adicionalmente, catecolaminas, aminas vasoactivas (histamina, serotonina) bradicininas y proteínas o péptidos con función dermatoneurotóxica, cardiotoxica, miotóxica, nefrotóxica y antígenos proteicos (Vera *et al.* 2004). Asimismo, también puede incluir: sales y restos de ensamblaje de nematocistos

(Brusca & Brusca, 2005; Genzano *et al.* 2014).

5. Enzimas

Entre los componentes de muchos venenos como los de serpientes o cnidarios se encuentran las enzimas (Pérez-Nogués *et al.* 2008; Frazão *et al.* 2012). Generalmente son moléculas de naturaleza proteica a excepción de las ribozimas que, tienen como función principal catalizar reacciones químicas. Como todos los catalizadores, las enzimas funcionan disminuyendo la energía de activación de una reacción, de tal modo que se acelera sustancialmente la tasa de reacción, y a pesar de esto, no son consumidas por las reacciones que catalizan, ni alteran su equilibrio químico (Bairoch, 2000).

La Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) ha clasificado a las enzimas con base en la clase de reacción que catalizan. Por lo que a cada enzima se le asignan cuatro números denominados “nombre sistemático”. Los tres primeros indican la clase, subclase y sub-subclase, mientras que el último es un número de orden. Por otra parte, existe una versión corta del nombre sistemático, denominado *nombre recomendado* (McKee & McKee, 2014). En la siguiente tabla se enuncia la clasificación de las enzimas de acuerdo con el tipo de reacción que utilizan:

Tabla 1. Clasificación de las enzimas. La clasificación de las enzimas está dividida en seis clases de acuerdo con el tipo de reacción catalizada que realizan, así como la nomenclatura de ellas (modificada de Hernández-Melgar 2019).

Clasificación	Tipo de reacción catalizada	Ejemplos para la nomenclatura en enzimas: Clase, subclase, sub-subclase y orden
1. Oxidorreductasas	Óxido-reducción.	E.C.1.1.1.1 1 Óxido reductasa 1.1 Actúa sobre grupos donantes de CH-OH 1.1.1 Con NAD ⁺ o NADPH ⁺ como aceptor 1.1.1.1 Alcohol deshidrogenasa
2. Transferasas	Transferencia de grupos funcionales.	E.C.2.1.1.4 2 Transferasa 2.1 Transferencia de grupos de carbono

			2.1.1 Metiltransferasas 2.1.1.4 Acetilserotonina-O-metiltransferasa
3. Hidrolasas	Reacciones de hidrólisis.	E.C.3.4.15.1	3 Hidrolasa 3.4 Actúa sobre enlaces peptídicos (peptidasas) 3.4.15 Peptidil-dipeptidasas 3.4.15.1 Peptidil-dipeptidasa A
4. Liasas	Eliminación de grupo para formar enlaces dobles.	E.C.4.1.1.1	4 Liasa 4.1 Liasas carbono-carbono 4.1.1 Carboxilasa 4.1.1.1 Piruvato descarboxilasa
5. Isomerasas	Isomerización.	E.C.5.1.1.1	5 Isomerasa 5.1 Racemasas y epimerasas 5.1.1 Actúa sobre aminoácidos y derivados 5.1.1.1 Alanina racemasa
6. Ligasas	Formación de enlace acoplada a la hidrólisis de ATP.	E.C.6.3.5.2	6 Ligasa 6.3 Forma puentes de carbono-nitrógeno 6.3.4 Otras ligasas de carbono-nitrógeno 6.3.4.1 GMP Sintasa

5.1 Proteasas

Las proteasas son enzimas del tipo hidrolasas cuya función catalítica es el rompimiento de los enlaces peptídicos que conforman a las proteínas (Beynon & bond, 2001). El rompimiento que realizan estas enzimas da como resultado péptidos y aminoácidos (Fig. 4). Estas enzimas están involucradas en la degradación de proteínas y péptidos de la dieta y

De acuerdo con el IUBMB, las proteasas se clasifican en función de dos criterios: tipo de reacción catalizada y naturaleza química del sitio catalítico. Respecto al su sitio de acción se dividen en dos grupos: exopeptidasas y endopeptidasas. Las exopeptidasas rompen el péptido cerca de los grupos terminales del sustrato, es decir, en el extremo C-terminal (carboxipeptidasas), y en el extremo N-terminal (aminopeptidasas), o ambos lados terminales (dipeptidasas); mientras que las endopeptidasas lo hacen distantes del extremo del sustrato (Graterol *et al.* 2007; Nadeem *et al.* 2007). Por otra parte, con base en su mecanismo catalítico son clasificadas en cuatro grupos: serín proteasas, proteasas aspárticas, cisteín proteasas y metaloproteasas.

5.2 Serín proteasas y metaloproteasas

Las serín proteasas reciben su nombre debido a que el mecanismo catalítico se encuentra caracterizado por poseer un residuo de serina encargado del ataque nucleofílico sobre el carbonilo del enlace peptídico, para así formar un intermediario acil-enzima; no obstante, en esta reacción también participan de manera fundamental dos aminoácidos más, un residuo de aspartato encargado de recibir los electrones (electrófilo), así como un residuo de histina responsable de la desprotonación del grupo tiol, estos tres aminoácidos juntos (Ser, His & Asp) conforman la denominada triada catalítica característica de las serín proteasas. No obstante, existen también registros donde las serín proteasas pueden contener tríadas catalíticas diferentes como lo son: Ser-His-Glu, Ser-Lys/His y Ser N-terminal (Fig. 5).

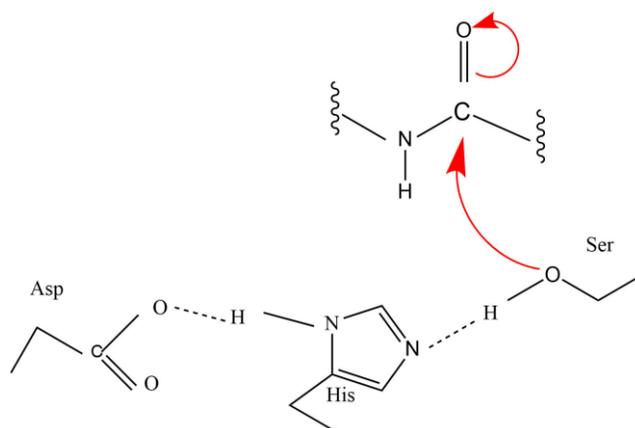


Figura 5. Triada catalítica característica de las serín proteasas. Representación del sitio activo catalítico de las serín proteasas formado por un residuo de aspartato, uno de histidina y uno de serina.

En la Tabla 2 se muestran los residuos catalíticos presentes en las familias de serín proteasas. Estas hidrolasas también presentan un cofactor característico de calcio necesario para la acción de la enzima (Hedstrom, 2002; Marroquín- de Jesús & Viguera-Morales, 2019). Generalmente son activas a pH neutro o alcalino, con un pH óptimo entre 7 y 11. Además, tienen amplias especificidades de sustrato, como la actividad estereolítica y amidasa. Las masas moleculares que presentan oscilan entre 18 y 35 kDa, con puntos isoeléctricos entre 4 y 6 (Barrett, 1994). En las serín proteasas alcalinas el pH óptimo es de 10; su punto isoeléctrico registrado es alrededor de 9 y masas moleculares de 15 a 30 kDa. Un dato interesante es que la mayor cantidad de registros de este grupo se encuentran en varias bacterias (*Arthrobacter*, *Streptomyces*), moho, levaduras y hongos (*Conidiobolus* spp y *Aspergillus*) (Rao et al. 1998).

Tabla 2. Residuos catalíticos de las serín proteasas, mecanismos de activación y predominancia. E, Eucariota; B, bacteria; Ar, Archaea; Pr, protozoos; H, hongos; Pl, plantas; An, animal; V, virus (tomada y modificada de Cera, 2009 y Chakraborti, 2017).

Clan	Familias	Ejemplo de Miembro representante	Residuo catalítico	Predominante	Mecanismo de activación
PA	12	Tripsina	His, Asp, Ser	E	Escisión de un propéptido N-terminal que permite el plegado a la configuración activa Regulación de la actividad de la peptidasa
SB	2	Subtilisina	Asp, His, Ser	B, Ar, Pr, H, Pl, An, V	Procesar las proteínas a lo largo de la vía de secreción. Cataliza la activación proteolítica de la proteína de unión al elemento regulador de esteroides Capacidad de funcionar a pH ácido.
SC	2	Prolil oligopeptidasa	Ser, Asp, His	B, Ar, Pr, H, Pl, An, V	Asociado con péptidos y proteínas de proceso proespecíficos N-terminales Degrada péptidos biológicamente activos
SE	6	Carboxipeptidasa	Ser, Lys	B, Ar, Pr, H, Pl, An, V	Participa en la síntesis y remodelación de las

					paredes celulares bacterianas
SF	3	Lex A peptidasa	Ser, Lys/His	B, Ar, Pr, H, Pl, An, V	Elimina los péptidos señal y facilita la secreción
SH	2	Ensamblaje de citomegalovirus	His, Ser, His	B, Ar, Pr, H, Pl, An, V	Región donde se producen los virus maduros e infectivos
SJ	1	Peptidasa LON	Ser, Lys	B, Ar, Pr, H, Pl, An, V	Proteólisis dependiente de ATP Capacidad de actuar como ATPasas activadas por proteínas
SK	2	Peptidasa Clp	Ser, His, Asp	B, Ar, Pr, H, Pl, An, V	Desempeñan un papel importante tanto en el control de la calidad de las proteínas como en la degradación reguladora de proteínas específicas
SP	3	Nucleoporina	His, Ser	B, Ar, Pr, H, Pl, An	Procesamiento autolítico para generar nucleoporinas
SQ	1	Aminopeptidasa DmpA	Ser	-	Especificidad para liberación de residuos de aminoácidos en la configuración L en su acción sobre péptidos.
SR	1	Lactorerrina	Lys, Ser	Ar, Pl, An	Actividad proteolítica hacia una serie de proteínas
SS	1	L,D-carboxipeptidasa	Ser, Glu, His	B, Ar, Pr, H, Pl, An	-
ST	5	Serín proteasa romboide	His, Ser	B, Ar, Pr, H, Pl, An, V	Hidroliza enlaces peptídicos dentro de una bicapa de fosfolípidos Escinde las proteínas transmembrana cerca del borde periplásmico de la membrana

Las serín proteasas más estudiadas son la quimotripsina, tripsina y elastasa. Todas catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos (amida), pero con especificidades diferentes por las cadenas laterales que flanquean al enlace peptídico a cortar. Es importante saber que la quimotripsina es específica para un residuo hidrófobo que precede al enlace peptídico escindible y requiere que el aminoácido a cortar sea aromático (Phe y Tryr); por su parte la tripsina o las proteasas tipo tripsina son específicas para un residuo con carga

positiva (Lys, Arg), ya que poseen un residuo de aspartato con carga negativa; rompen la unión peptídica en la cual el grupo carboxilo es aportado por lisina o arginina, mientras que la elastasa lo rompe para un residuo neutro pequeño (por ejemplo Ala) (Fig. 6) (Voet & Voet, 2006).

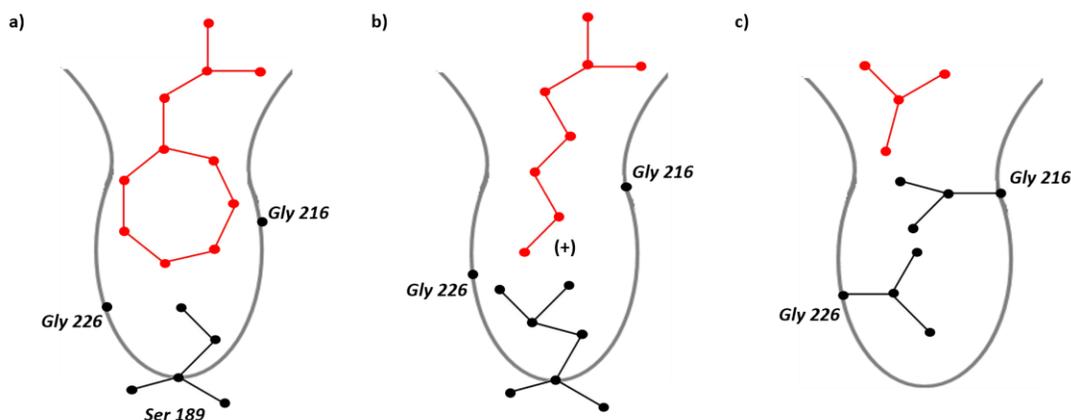


Figura 6. Diagrama de algunas serín proteasas: quimotripsina (a), tripsina (b) y elastasa (c). En color rojo, se ilustra la afinidad por una cadena lateral adyacente al enlace escindible en sustratos polipeptídicos. Quimotripsina es más afín la cadena lateral aromática y tripsina es afín cadenas laterales cargadas positivamente que pueden interactuar con Ser 189 en la parte inferior del sitio de especificidad. El sitio está bloqueado en la elastasa, por lo que interacciona con cadenas laterales pequeñas sin carga.

Igualmente, se ha observado que, estas tres enzimas junto con las metaloproteasas están involucradas en la generación de los principales desórdenes locales y sistémicos producidos por envenenamiento de origen animal, ya que estas enzimas actúan directamente sobre las proteínas sanguíneas, como el fibrinógeno y los factores coagulantes (Huari *et al.* 2016). En la Tabla 3 se muestra a detalle algunas de las actividades biológicas que presentan las serín proteasas.

Tabla 3. Fuentes y actividad biológica de algunas serín proteasas. La tabla presenta el tipo de proteasa clasificada, su fuente de origen, así como la actividad o función que realizan y el sustrato específico de acción (Tomado de Owen, 2006).

Proteasa	Fuente	Sustratos/Actividad
Elastasa de neutrófilos	PMNs	Proteínas ECM (elastina, proteínas de la membrana basal), proteoglicanos
Proteinasa-3		Proteínas plasmáticas (inmunoglobulinas, factores de coagulación, componentes del complemento)
		Citoquinas y sus receptores
		Activación del factor de crecimiento (pro-TGF- α , TGF- β latente para NE)

		Inactivación de TIMPs (NE)
		Conversión de angiotensina I a angiotensina II (CG)
		Receptores (CD2, CD4, CD8, receptores del complemento, receptor de fosfatidil serina de macrófagos, receptores activados por proteasa)
		Antibacterianos y antifúngicos
		Activación de linfocitos y plaquetas
		Secreción de citocinas / quimiocinas por células epiteliales y MNP
		Secreción de mucina MUC5A por las glándulas submucosas
		Degranulación de células caliciformes
		Crecimiento y diferenciación mielomonocítica (PR3)
		Autoantígeno en la granulomatosis de Wegener (PR3)
Activadores del plasminógeno (PA)	PMNs	Convertir plasminógeno en plasmina
PA tipo uroquinasa	MNPs	Adhesión y migración celular (uPA unido a uPAR)
PA tipo tejido	Células endoteliales	
Plasmina		Fibrina, fibronectina, laminina, proteoglicanos
		Activa proMMP latentes
Proteínas de coagulación (p. Ej., Trombina)	Plasma	Hemostasis
Componentes del complemento	Plasma	Activación del complemento
Quimasas	Mastocitos	Proteínas ECM, proteoglicanos, angiotensina I, sustancia P
		Degranulación de células caliciformes
Triptasa	Mastocitos	Proteínas ECM
		Activación de pro-MMP-3
Granzimas (GRZs)	Células CD8 ⁺ T	Apoptosis de células infectadas por virus y células tumorales
	Células NK	Proteoglicanos (GRZ B)
		Secreción de citocinas por MNP, fibroblastos y células epiteliales (GRZ A)
Tripsina y quimotripsina	Tracto gastrointestinal	Digestión de proteínas en el intestino delgado.

Por su parte, las metaloproteasas son una clase de enzimas que utilizan iones metálicos (la mayoría dependientes de zinc; sin embargo, hay pocos casos en donde se encuentran acoplados al manganeso, el cobalto y el hierro) unidos a proteínas y una molécula de agua coordinada para catalizar la adición de agua a un enlace peptídico. Asimismo, las metaloproteasas registradas para serpientes presentan papeles funciones a nivel de patogénesis del daño tisular local, actuando como componentes de factores de coagulación, plaquetas y componentes de la matriz extracelular (Gutiérrez & Rucavado,

2000). Las metaloproteasas son una familia de proteasas dependientes de zinc que se clasifican de acuerdo con sus diferencias estructurales en cinco grupos que se enlistan en la siguiente tabla:

Tabla 4. Grupos de metaloproteasas reportadas con su respectiva función en humanos. Hasta el momento se han registrado seis familias (colagenasas, gelatinasas, estromalisinas, matrilisinas, MT-MMP, no clasificadas y ADAM's) con diferentes funciones (Tomado de Coronato *et al.* 2012).

Grupo	Tipo	Función
Colagenasas	MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18	Escinden el colágeno intersticial I, II y III dando lugar al colágeno desnaturalizado o gelatina.
Gelatinasas	MMP-2 y MMP-9	Degradan el colágeno desnaturalizado o gelatina. MMP-2: también digiere colágenos I, II y III y es expresada en condiciones normales por las células del estroma y mayoría de tejidos. MMP-9: está casi ausente en tejidos normales y se encuentra limitada a monocitos y macrófagos.
Estromalisinas	MMP-3, MMP-10 y MMP-11	Digieren diversos componentes de la matriz extracelular. Producidas por fibroblastos del estroma al ser activados por la glicoproteína de membrana celular EMMPRIN (extracelular matrix metalloproteinase inducer) producida por las células tumorales. Las MMP-3 también pueden activar otros precursores inactivos de metalo-proteasas (MMP'S).
Matrilisinas	MM-P, MMP-26	Estructuralmente son las más simples debido a que carecen del dominio Hemopexina (glicoproteína). Actúan sobre moléculas de la superficie celular y son expresadas específicamente por células tumorales de origen epitelial.
Metaloproteasas asociadas a membrana MT-MMP (membrane-type matrix metalloproteases)	1. Proteínas transmembrana: unidas a la misma por un sitio hidrófobo: MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-24 2. Proteínas que poseen glicofatidilinositol (GPI): MMP-17 y MMP-25.	Forman parte de las membranas basales e intervienen en la actividad proteolítica de otras MMP'S.

MMPs que no están clasificadas en las categorías anteriores	MMP-12	Expresada principalmente en macrófagos e influye en su capacidad migratoria. Su principal sustrato es la elastina. Detectada solo en el hígado humano
	MMP-9	Digiere a los miembros de la familia de las amelogeninas, proteínas de la matriz extracelular.
	MMP-20 o enamelisina	Función aún desconocida Se expresa principalmente en tejido reproductor y carece del dominio hemopexina, pero tiene un dominio rico en cisteína seguido de uno de tipo
	MMP-22	inmunoglobulina.
	MMP-23	Se expresa en queratinocitos e interviene en la hemostasis y la cicatrización de herida. Se expresa en queratinocitos e interviene en la hemostasis y la cicatrización de heridas.
	MMP-28	Se expresa en queratinocitos e interviene en la homeostasis y cicatrización de heridas.
ADAM (desintegrin and metalloproteinase)	Unidas a una molécula de desintegrina, ligando potencial para integrinas y otros receptores.	Proteínas de membrana multifuncionales con organización compleja de dominos que comprende: secuencia señalizadora, dominio metaloproteasa, dominio tipo desintegrina, región rica en cisteína, dominio tipo receptor del factor de crecimiento epidérmico, región transmembrana, dominio citoplasmático.

Así mismo, las metaloproteasas en venenos de serpientes presentan diversos tipos y dominios que se han clasificado en tres clases:

Metaloproteasas tipo I

Estas enzimas poseen solamente un dominio metaloproteasa que es una secuencia de unión a zinc HEXXHXXGXXH seguida por un giro de metionina (Escalante *et al.* 2011) más un predominio con masas moleculares entre 20 y 30 kDa (Fox & Serrano, 2005; Markland & Swenson, 2013). Un aspecto interesante de este grupo es la actividad proteolítica que presentan sobre receptores, moléculas de matriz o adhesión celular que pueden conducir

hemorragia, inhibición de la agregación plaquetaria e inhibición de la adhesión de los neutrófilos (Hsu & Huang, 2010).

Metaloproteasas tipo II

Son enzimas con masas entre 30 y 60 kDa (Markland & Swenson, 2013), pero también se han identificado otras proteínas de baja masa molecular provenientes de algunos venenos de serpiente como *Echis carinatus* y *Trimeresurus gramineus* (Gould *et al.* 1990). Contienen un dominio de metaloproteasa y el predominio, además de un dominio de desintegrina (generalmente se encuentra proteolizado y liberado para generar una desintegrina activa (Fox & Serrano, 2005; Jia *et al.* 1996) y se tiene conocimiento de que es una proteína dimérica que mantiene en su estructura ambos dominios para su actividad (Camacho *et al.* 2014). Además, las proteasas del tipo II son codificadas por la familia de genes ADAM's (A Desintegrin And Metalloprotease) (Wolfsberg *et al.* 1995). Su característica principal es la presencia de la secuencia tripeptídica conservada RGD (arginina-glicina- aspártico), que forma el sitio común de reconocimiento de las integrinas (Gould *et al.* 1990). Sin embargo, está secuencia puede estar sustituida por TDE (Thr-Asp-Glu), EDE (Glu-Asp-Glu) o por otras secuencias (López & Rodríguez-Acosta, 2003).

Metaloproteasas tipo III

Estas metaloproteasas presentan masas entre 60-100 kDa y se caracterizan por tener los mismos dominios que las P-II más un dominio rico en cisteínas (Fox & Serrano, 2005). Al poseer un dominio de metaloproteasa, uno de desintegrina y uno rico en cisteína su actividad proteolítica es mucho mayor (Baldo *et al.* 2010).

Las metaloproteasas provenientes de venenos de serpientes poseen en su sitio activo la secuencia **HEXGHNLGXXHD**, en donde los tres residuos de Histidina (histidinas presentes en el sitio activo de todas las metaloproteasas) forman el sitio de unión para el Zn^{2+} (Fig. 7), el residuo de glicina permite la formación de un giro y el residuo de ácido glutámico (E) conforma el sitio catalítico. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que las secuencias pueden ser diferentes respecto a su sitio activo, a pesar de que su dominio es de metaloproteasa (López & Rodríguez-Acosta 2003).

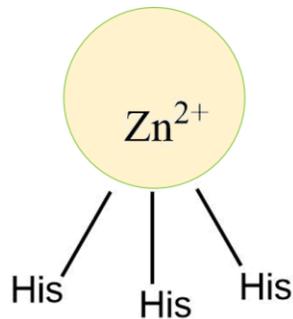


Figura 7. Representación del sitio catalítico con los tres residuos de Histidina de unión al catión divalente de zinc. Los tres residuos de histidina forman el sitio de unión para el Zn^{2+} , permitiendo que la enzima sea activa.

Por otro lado, aproximadamente cinco docenas de metaloproteasas muestran que el zinc forma complejos con cualquier donante de nitrógeno (His) y oxígeno (Glu o Asp), siendo His el aminoácido predominante debido a su capacidad para dispersar la carga a través del enlace de H de su nitrógeno ligado, mientras que el anión carboxilato de los ligandos Glu y Asp reduce la carga del metal haciendo más difícil que el agua unida al metal ionice y que el metal actúe como catalizador ácido (Auld, 2013).

Actualmente se conocen sustancias capaces de inhibir la función de las proteasas mediante diferentes mecanismos. Por ejemplo, el uso de diisopropil fluorofosfato (DFP), diisopropil fosfofluorida (DipF) para serín proteasas. Es más común que se utilicen las clorometil cetonas como N - α - Tosil - L - Lisinil - Clorometilcetona (TLCK) o N-Tosil-L-Fenilalanil-Clorometilcetona (TPCK) o Fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), ya que inhiben la mayoría de las enzimas que forman parte de esta familia. Estos reactivos no son tan específicos, ya que también son capaces de inhibir algunas cisteín proteasas (Laskowski, 1997). En el caso de las metaloproteasas, los agentes más utilizados son 1,10-fenantrolina, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y ácido etilenglicol tetraacético (EGTA) estos últimos considerados como agentes quelantes, estos último remueven el metal del sitio activo para bloquear la actividad, aunque para esta clase también se pueden inhibir removiendo el agua o mediante la unión de un complejo de hidródo-metal (Auld, 2013).

6. Función de las proteasas en el veneno

Existen muchos organismos capaces de producir veneno considerado como una defensa biológica o como un mecanismo para la depredación ligada a una “ventaja

evolutiva” donde el organismo que lo genera es apto para subsistir. Esto aumenta la probabilidad de sobrevivencia y proliferación.

Gracias al estudio de los componentes de los venenos y su modo de acción de los venenos, se tienen conocimientos de que las toxinas que los componen pueden tener diferentes funciones o mecanismos de acción ante la presa y/o el depredador, desde causar una parálisis neuromuscular, como las conotoxinas de caracoles marinos, hasta provocar una hemorragia o necrosis como las fosfolipasas y proteasas de las serpientes (Pereira *et al.* 2005). En muchos venenos, las proteasas son catalogadas como proteínas auxiliares que facilitan la difusión de neurotoxinas al romper la matriz extracelular de la presa; además de que pueden tener funciones citolíticas, gelatinolítica, caseinolítica y fibrinolítica (Klompen *et al.* 2020). Estas enzimas, particularmente las metaloproteasas y serín proteasas, se encuentran presentes en todos los organismos incluyendo el veneno de especies terrestres y cnidarios.

Las metaloproteasas son las hidrolasas predominantes en el veneno de serpientes, escorpiones y arañas y su función está asociada a los cuadros hemorrágicos inducidos por la degradación de fibrinógeno/fibrina, así como de proteínas de matriz extracelular, relacionadas con el proceso hemostático, cicatrización y modelaje de los vasos sanguíneos como laminina, fibronectina, entre otras (Girón *et al.* 2008). Así mismo, son las responsables de efectos tóxicos como hemorragia, edema, dermonecrosis, inhibición de la agregación plaquetaria y mionecrosis (Pereañez *et al.* 2008).

En serpientes de la familia Viperidae se ha reportado que el porcentaje de las serín proteasas corresponde solo a un 1% del contenido total del veneno (Calvete *et al.* 2009), donde este tipo de enzimas tiene actividad similar a trombina que consumen el fibrinógeno induciendo desfibrinación y alteraciones en la coagulación (Gutiérrez, 2002), calicreína y t-PA. Lo anterior puede asociarse a proteínas muy activas, ya que son responsables del dolor local, incrementos en la permeabilidad capilar, hipotensión sistémica y la contracción del músculo liso. Sin embargo, también existen registros de serín proteasas hasta un 26% del contenido total del veneno como es el caso de la especie *Bitis gabonica*. En contraste con la familia Elapidae, las serín proteasas tienen una menor presencia en el veneno pues pueden

formar parte del 5% del veneno como ocurre con *Notechis scutatus* o menos del 0.1% en *Micropechis ikaheka*, mientras que las metaloproteasas ocupan el 7.6% del total del veneno (Tasoulis & Isbister, 2017), y esta clase es la que tiene más presencia de todas las hidrolasas presentes en el veneno. Por último, en crotálicos como *Ovophis okinavensis* se ha registrado la presencia de hasta el 93.1% de serín proteasas (Tasoulis & Isbister, 2017).

En venenos de serpientes también se ha registrado la presencia de serín proteasas que son activadoras de los factores V y X (factores importantes en la cascada de coagulación), activadores de protrombina y activadores de plaquetas, respectivamente (de Lima *et al.* 2005). “Específicamente, el factor V forma parte de las proteínas que intervienen en el sistema de coagulación y también es llamado **Proacelerina o Factor Lábil**. En contraste con los demás factores de coagulación, el factor V **no es enzimáticamente activo**, sino que **funciona como cofactor**; cuando el factor se activa, cumple el rol de cofactor del factor X que se convierte en la enzima activa en el complejo protrombinasa (Guerrero & López, 2015) para así formar protrombina en trombina. Por último, La mayor parte de los factores de coagulación por activación enzimática se transforman en serín proteasas (tienen un grupo serina en su sitio activo) de doble cadena, que se mantienen unidas por puentes disulfuro y tienen cierto grado de homología estructural entre ellos (Martinuzzo, 2017)”.

3. Antecedentes

1. Estudio de proteasas en cnidarios

Los estudios más actuales de venenos y extractos de cnidarios han hallado la presencia de diversos tipos de proteasas e inhibidores de proteasas (Liu, 2015; Becerra *et al.* 2016). A continuación, se muestran algunas proteasas encontradas en el veneno de este filo, así como las técnicas utilizadas para su identificación que van desde la detección de actividad proteolítica por el uso de zimogramas, hasta la sugerencia de la presencia de serín, cisteín o metaloproteasas mediante transcriptómica y/o proteómica.

Tabla 5. Proteasas presentes en algunas especies de cnidarios. La tabla señala las especies de cnidarios y el tipo de muestra ocupado para la detección de enzimas proteolíticas, así como la técnica utilizada para el estudio.

Espece	Muestra	Enzima	Estudio	Cita
<i>Aurelia aurita</i> (medusa)	ARN y ADN	Serín proteasa	Identificación de dos genes de serín proteasa mediante PCR	(Rojas & Doolittle, 2002)
<i>Myxobolus cerebrealis</i> (Mixozoo)	ADN	Serín proteasa	Identificación de un gen de serín proteasa mediante PCR	(Kelley <i>et al.</i> 2004)
<i>Anthothoe chilensis</i> (anémona)	Tentáculos	Actividad proteolítica	Método de estimación de proteinasa con hemoglobina	(Retuerto <i>et al.</i> 2007)
<i>Nematostella vectensis</i>	Tejido endodérmico	Serín proteasa	Secuencias codificantes, gen aclarado pro RT-PCR	(Kimura <i>et al.</i> 2009)
<i>Nemopilema nomurai</i> , <i>Rhopilema esculenta</i> , <i>Cyanea nozakii</i> , <i>Aurelia aurita</i> (escifozoo)	Veneno	Actividad proteolítica	Electroforesis: zimograma	(Lee <i>et al.</i> 2011)
<i>Nematostella vectensis</i> (anémona)	Nematocistos	Metaloproteasa	Espectrometría de masas en TANDEM	(Moran <i>et al.</i> 2013)
<i>Stomolophus meleagris</i> (medusa)	Veneno	Metaloproteasa	Transcriptómica	(Li <i>et al.</i> 2014)
<i>Chironex fleckeri</i> (medusa)	Veneno	Metaloproteasa	Proteómica y transcriptómica	(Brinkman <i>et al.</i> 2015)
<i>Cyanea capillata</i> (medusa)	Tentáculos	-Metaloproteasa -Serín proteasa	Transcriptómica	(Liu <i>et al.</i> 2015)
<i>Nemopilema nomurai</i> (medusa)	Nematocistos	Quimiotripsina similar a proteasa humana 1	Análisis Blast y clonación de secuencia genómica y cDNA de la proteasa	(Heo <i>et al.</i> 2016)
<i>Olindias sambaquiensis</i> (medusa)	Tentáculos	-Metaloproteasa -Serín proteasa	Electroforesis: zimograma	(Knittel <i>et al.</i> 2016)
<i>Alatina alata</i> (medusa)	Tejido	-Metaloproteasa -Proteasa similar a quimiotripsina	Transcriptómica	(Lewis Ames <i>et al.</i> 2016)

-Serín proteasa				
<i>Cyanea nozakii</i> (medusa)	Veneno	Metaloproteasa	Transcriptómica y proteómica	(Li <i>et al.</i> 2016)
<i>Anemonia sulcata</i>, <i>Heteractis crispa</i> y <i>Megalactis griffithsi</i> (anémonas)	Veneno	Metaloproteasa	Análisis GO a través de transcriptómica	(Macrander <i>et al.</i> 2016)
<i>Chrysaora fuscescens</i> (medusa)	Veneno	-Metaloproteasa -Aspartil proteasa -Serín proteasa	Proteómica	(Ponce <i>et al.</i> 2016)
<i>Phymactis papillosa</i> (hexacorral)	Veneno	Actividad proteolítica	Electroforesis: zimograma	(Cuya & Escobar, 2017)
<i>Crysaora láctea</i> (scifozoo); <i>Tamoya haploneama</i> y <i>Chiropsalmus quadrumanus</i> (cubozoa)	Veneno	Metaloproteasa	Proteómica	(Jaimes-Becerra <i>et al.</i> 2017)
<i>Palythoa caribaeorum</i> (zoántido)	<i>Mucus</i>	-Metaloproteasa -Serín proteasa -Cisteín proteasa	Zimograma y evaluación de actividad mediante sustratos cromogénicos específicos	(Guarnieri <i>et al.</i> 2018)
<i>Palythoa caribaeorum</i> (zoántido)	Veneno	Actividad proteolítica	Zimograma	(Manzano-Mora, 2018)
<i>Condylactis gigantea</i> (anémona)	Extracto total del Cuerpo	Actividad proteolítica	Electroforesis: zimograma	(Diez-García <i>et al.</i> 2018)
<i>Cyanea capillata</i> y <i>Nemopilema nomurai</i> (medusas)	Nematocisto	-Metaloproteasa -Serín proteasa	Proteómica y transcriptómica	(Wang <i>et al.</i> 2018)
<i>Nemopilema nomurai</i> (medusa)	Veneno	-Metaloproteasa -Serín proteasa	Proteómica	(Choudhary <i>et al.</i> 2019)
<i>Cyanea sp.</i> (medusa)	ADN	-Metaloproteasa -Serín proteasa	Proteómica y transcriptómica	(Liang <i>et al.</i> 2019)
<i>Anthopleura dowii</i> (anémona)	Tentáculos y <i>mucus</i>	Metaloproteasa	Proteómica y transcriptómica	(Ramírez-Carreto <i>et al.</i> 2019)
<i>Pachycerianthus cf. mahua</i>, <i>Cheriantheomorpha brasiliensis</i>, <i>Isarachnanthus nocturnus</i> y <i>Pachycerianthus borealis</i> (ceriantarios)	Veneno	-Metaloproteasa -Serín proteasa	Transcriptómica	(Klompfen <i>et al.</i> 2020).

1.1 Estudios de proteasas en *Palythoa caribaeorum*

Los estudios en *Palythoa caribaeorum* han mostrado la presencia de diversas moléculas de interés, como neurotoxinas, inhibidores de proteasas, proteasas, entre otros. En la Tabla 6 se presentan algunos de los estudios realizados en esta especie. Si bien, la cantidad de estudios es menor en comparación con los realizados con otras especies del filo Cnidaria, son grandes aportaciones que remarcan la importancia de estudiar a *P. caribaeorum*, ya que podrían asociarse con las ventajas que tiene en el medio y su posible utilidad en la biotecnología.

Tabla 6. Estudios realizados en *P. caribaeorum*. La tabla señala los estudios que se han realizado sobre *P. caribaeorum* y el tipo de muestra que ocuparon para el análisis desde 1983 hasta el 2019.

Muestra	Estudio	Cita
Extracto total del organismo	Aislamiento y purificación de Palytoxina	(Béress <i>et al.</i> 1983)
Extracto total del organismo	Actividad anti analgésica y antiinflamatoria	(Soares <i>et al.</i> 2006)
Veneno	Retrasa la inactivación del canal de sodio sensible a tetrodotoxina (TTX)	(Lazcano-Pérez <i>et al.</i> 2014)
Veneno	Retrasa la inactivación de canales de sodio activados por voltaje e inhibe los canales de calcio y potasio	(Lazcano-Pérez <i>et al.</i> 2016)
Veneno	Actividad hemolítica, presencia de fosfolipasa PLA2 y actividad contra <i>Giardia intestinalis</i>	(Lazcano-Pérez <i>et al.</i> 2018)
ARN	Neurotoxinas, inhibidores de proteasa tipo Kunitz, toxinas hemostáticas, hemorrágicas, péptidos de membrana activa, toxinas relacionadas con alérgenos e inmunidad innata	(Liao <i>et al.</i> 2018)
Veneno	Presencia de fosfolipasa PLA2 con actividad neurotóxica	(Cuevas-Cruz <i>et al.</i> 2019)

4. Justificación

El descubrimiento de la existencia de proteasas ha permitido nuevas líneas de investigación sobre el papel de dichas enzimas en la fisiología de los organismos. Sin embargo, existen escasos registros de su aislamiento a partir de organismos marinos, específicamente de los cnidarios donde la mayoría han sido identificadas mediante estudios de proteómica y transcriptómica. Por lo tanto, esta propuesta de investigación pretende mostrar la importancia de realizar estudios de caracterización de proteasas en *Palythoa caribaeorum*, así como determinar los tipos presentes y el nivel de actividad que presentan.

5. Hipótesis

Estudios en el proteoma del veneno de cnidarios sugieren la expresión de proteasas, así mismo este tipo de enzimas forman parte activa del veneno de otros organismos tanto marinos como terrestres, por lo que será posible aislar y caracterizar una proteasa presente en el veneno de *Palythoa caribaeorum*.

6. Objetivos

Objetivo general

Aislar e identificar una proteasa presente en el veneno de *Palythoa caribaeorum*.

Objetivos específicos

1. Purificar una proteasa mediante técnicas cromatográficas.
2. Identificar la masa molecular de la proteasa de interés.
3. Determinar la subclase de proteasa presente.
1. Identificar la proteasa purificada mediante espectrometría de masas.

7. Metodología

1. Muestreo

Los ejemplares de *P. caribaeorum* se recolectaron en el mes de agosto del 2015 en la laguna arrecifal de Puerto Morelos, Q. Roo, México, a una profundidad máxima de un metro mediante buceo libre y se procesaron en el laboratorio de Toxinología de Cnidarios, de la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales, Puerto Morelos (Fig. 8).

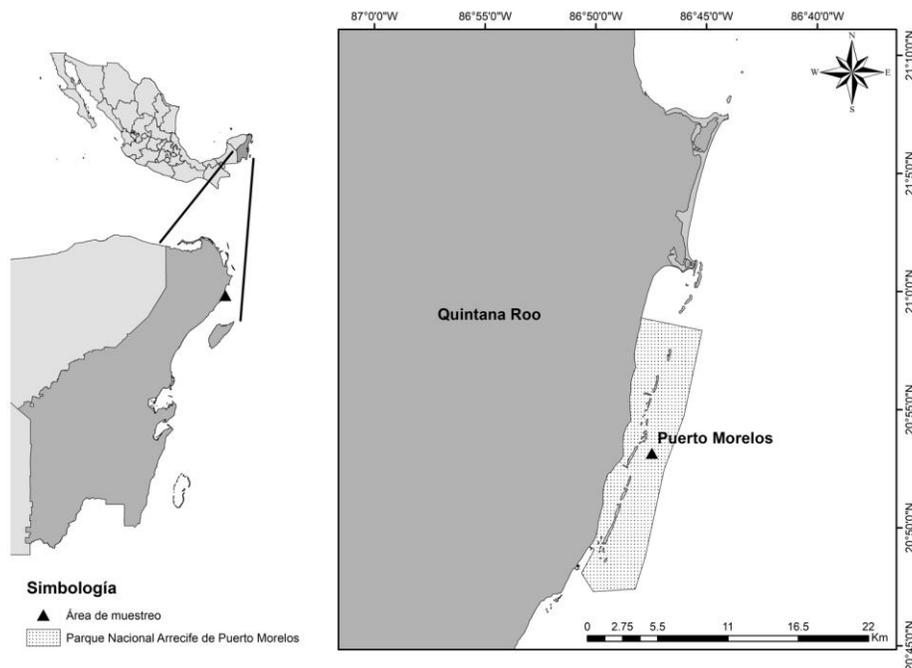


Figura 8. Área de estudio. Laguna Arrecifal del Parque Nacional de Arrecifes en Puerto Morelos (Ilustración realizada por Amauri Castillejos-Hernández).

2. Obtención de extracto crudo.

Los organismos recolectados se fragmentaron con un martillo y un cincel, mientras se eliminaba la base rocosa y el tejido esponjoso. Posteriormente se pesaron 545.1 g del tejido esponjoso y se colocaron en un vaso de precipitado de 2 L, y se agregó 1 L de agua desionizada. Los organismos se exprimieron cuidadosamente para exponer los tentáculos de los pólipos al medio; con un cepillo se manipularon para mejorar la descarga de nematocistos. El extracto obtenido se centrifugó a 2,463 RFC a 4 °C, durante 15 minutos en una centrífuga 5810 R (Eppendorf). Se tomó el sobrenadante, se liofilizó y se almacenó a -70 °C.

3. Cuantificación de proteínas

Se determinó la concentración de proteína en el extracto crudo, utilizando Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoScientific). Se agregaron 25 µL del extracto y patrones de la curva de calibración en una placa de 96 pozos y posteriormente se adicionaron 200 µL del reactivo de trabajo compuesto por la mezcla de la solución de ácido bicinonínico y la solución de

sulfato cúprico. Se incubó durante 30 minutos a una temperatura de 37 °C; al finalizar el tiempo de incubación se determinó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 562 nm en un equipo lector de microplacas Synergy HT® (BioTek®). Cada muestra se analizó por triplicado. Para determinar la concentración de proteína de cada una de las muestras del extracto crudo, se hizo una curva de calibración a partir de 2 mg/mL de albúmina sérica bovina (BSA) (Tabla 7), las soluciones se prepararon con concentración de 0-2000 µg/mL, donde la ecuación de la recta obtenida fue $y=0.0007x$; $R^2= 0.9984$ (Fig. 8).

Tabla 7. Preparación de estándares de albúmina diluida (BSA). Los patrones preparados se utilizaron para obtener la curva de calibración necesaria para cuantificar la proteína presente en el veneno de *P. caribaeorum*.

Stock	Volumen del diluyente (µL)	Volumen y fuente de BSA (µL)	Concentración final de BSA (µg/mL)
A	0	300 del stock	2000
B	125	275 del stock	1500
C	325	325 del stock	1000
D	175	175 de la dilución B	750
E	325	325 de la dilución C	500
F	325	325 de la dilución E	250
G	325	325 de la dilución F	125
H	400	100 de la dilución G	25
I	400	0	0 = blanco

Así mismo, durante cada paso de purificación se realizó la cuantificación de proteínas mediante el equipo NanoDrop One (Thermo Scientific) en el modo medición de proteínas a 280 nm.

4. Prueba de amortiguadores

Con la finalidad de determinar la mejor forma de conservar la muestra y mantener su actividad, se realizó una prueba de amortiguadores a diferentes condiciones de pH. 1 mg de veneno total (VT) se re-suspendió en 100 µL de cada uno de los siguientes amortiguadores: citratos pH 5.5, Tris-HCl pH 7.5 y Tris HCl pH 8.5. Inmediatamente, se midió la absorbancia a 280 nm para saber la concentración de proteína presente en la muestra utilizando el equipo NanoDrop One (Thermo Scientific).

Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 1,190 RFC por 15 minutos y se le leyeron a 280 nm para evaluar si hubo pérdida de proteína por formación de agregados que precipitaron y se realizó una prueba de actividad proteolítica a cada una de las muestras

con su respectivo amortiguador, utilizando el EnzChek® Protease Assay (Invitrogen®); el ensayo se describe más adelante.

Finalmente, las muestras se incubaron por cuatro horas con los diferentes amortiguadores, para poder identificar si hubo pérdida de proteína posterior a la incubación mediante la lectura a 280 nm y una prueba de actividad proteolítica para determinar si las posibles proteasas presentes se mantuvieron activas para degradar el sustrato.

5. Purificación parcial

Cromatografía preparativa de intercambio catiónico

Para comenzar a separar el VT en sus diferentes componentes, se empacó una columna de intercambio catiónico débil de 12.9 cm con una matriz de CM Sepharose (Sigma-Aldrich) y se utilizó un FPLC Äkta™ Start. Previo a correr la muestra, se evaluó la eficiencia de la columna utilizando NaCl al 0.4 M como eluyente y NaCl al 0.8 M como muestra, como se indica en las instrucciones de uso.

Una vez que se evaluó la columna, se utilizó como eluyente la solución amortiguadora Tris-HCl 50 mM con NaCl 0.1 M (pH 7.0) a un flujo fue de 1 mL/min y se recolectaron fracciones con un colector de fracciones Water (Millipore). El gradiente comenzó con 100% de fase A (Tris-HCl 50 mM, pH 7.0) por 30 minutos. Posteriormente, se realizó un gradiente lineal con solución amortiguadora B (Tris HCl 50 mM pH 7.0 y NaCl 0.1 M) con el 100% por 25 minutos, por último, se cambió a 100% de A (solución amortiguadora inicial) por 5 minutos.

6. Concentrado, filtrado y desalado de fracciones

Las fracciones que mostraron absorbancia a 280 nm se concentraron y se desalaron utilizando centricones para tubos cónicos de 50 mL con corte de 10 kDa (Millipore), por medio de centrifugación a 2791.2 RFC por 10 minutos a 4 °C utilizando una centrífuga RT6000 (Sorvall).

Durante este proceso, las fracciones se reconstituyeron en amortiguador Tris-HCl 50 mM con pH 7.8 para conservar su actividad y se evaluó la presencia de actividad proteolítica

en cada una de las fracciones obtenidas utilizando el kit específico para proteasas Enz Check Protease Assay (Invitrogen®).

7. Separación mediante cromatografía de exclusión molecular

Para el siguiente paso de purificación, se utilizó una columna de exclusión molecular Protein kw-802.5 de (Shodex) en un sistema de HPLC Shimadzu SPD-10A, con detector UV/Vis SPD 10A. La muestra se eluyó utilizando una elución isocrática en solución amortiguadora de Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 conteniendo NaCl 0.1 M a un flujo de 0.5 mL/min. La duración de corrida fue de 35 minutos y durante este tiempo se recolectaron las fracciones de acuerdo con las señales de absorbancia a 210 y 280 nm.

8. Determinación de la masa molecular mediante la técnica de electroforesis SDS-PAGE

Para determinar la masa molecular de las fracciones purificadas, se utilizaron geles unidimensionales SDS-PAGE empleando el equipo Mini-Protean II (Biorad). Se cargaron 10 µg de proteína total de cada muestra y 3 µL de marcador de masa molecular AccuRuler RGB PLUS Prestandard Protein Lader (Maestrogen). El SDS-PAGE se corrió a una intensidad constante de 90 V durante el apilado y de 120 V hasta la finalización de la corrida (llegada del colorante al borde inferior del gel). Posteriormente, el gel SDS-PAGE se tiñó con la solución teñidora (azul de coomassie) en agitación lenta durante 30 minutos y se destiñó con la solución desteñidora (ácido acético 10%). El análisis se realizó en cada paso de purificación para monitorear las muestras de interés.

9. Prueba de actividad de proteasas

Determinación de la actividad proteolítica en zimograma.

Para determinar si las fracciones purificadas contenían actividad proteolítica, se realizó un zimograma, que es un gel en condiciones no desnaturizantes donde se ocupó un gel copolimerizado de acrilamida-caseína al 10%, empleando el equipo Mini-Protean III, Bio-Rad eluyéndose con un amortiguador de Tris-glycine, siguiendo la metodología de Troberg y Nagase (2003). Se cargaron 10 µg de proteína total para cada una de las muestras y 3 µL de marcador de masa molecular. La electroforesis se llevó a cabo empleando una

intensidad constante de 150 V.

Para poder detectar la actividad de proteasas, una vez terminado el tiempo de corrida, se agregaron 20 mL de amortiguador de renaturalización enzimática por 15 minutos con agitación moderada, repitiendo este proceso cuatro veces dando un total de tiempo de lavado de una hora. Este paso es primordial pues intercambia SDS dentro del gel con el detergente no iónico Tritón X-100, lo que facilita la renaturalización de las enzimas.

Consecutivamente, el gel fue transferido a 30 mL de amortiguador de desarrollo por 2 horas a 37 °C. Por último, el gel se transfirió a una solución de tinción (azul de coomassie R250) por 30 minutos.

10. Ensayo de proteasas

La actividad proteolítica de las fracciones se determinó mediante el kit para determinar actividad de proteasas EnzChek® Protease Assay (Invitrogen®). Se agregaron por triplicado 10 µg de la muestra en una placa de 96 pozos y se dejó reaccionar por una hora con 100 µL de la solución de caseína fluorescente a una temperatura de 37 °C protegidos de la luz. Las muestras fueron excitadas a una longitud de onda de 485 nm y la emisión se midió a 525 nm utilizando el equipo de microplacas Synergy HT® (BioTek®).

Las Unidades de actividad proteolítica (UAP) se definieron como $UAP = \Delta \frac{F_f - F_i}{tiempo}$ y las unidades de actividad proteolítica específica (UAPe) como: $\frac{UAP}{\mu g \text{ de proteína}}$.

Es importante mencionar que las muestras obtenidas en cada paso de purificación, fue evaluado con este kit para monitorear el estado de actividad de las proteínas de interés.

11. Efecto de inhibidores

Existen ciertos agentes específicos capaces de inhibir o bloquear la actividad proteolítica de proteasas, por ello se evaluó el efecto que causaban los inhibidores específicos de metaloproteasas (EDTA, EGTA y Fen (1,10-fenantrolina)) y serín proteasas (TPCK) en las fracciones pertenecientes a *P. caribaeorum*. Los inhibidores se ocuparon a una concentración de 10 mM sobre VT y la fracción de interés. Para ello, se incubó 0.5 µg de las

muestras con cada inhibidor por 1 h a 25 °C, protegidos de la luz. Posteriormente, se siguió el protocolo para ensayo de proteasas con el kit EnzChek® Protease Assay Invitrogen®).

12. Efecto de iones metálicos

Debido a que los iones metálicos pueden actuar como centro catalítico primario (grupo puente para unir el sustrato con la enzima) o ser estabilizantes de la conformación de la proteína enzimática en su forma catalíticamente activa, se utilizaron los iones Zn^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} y Mg^{2+} , así como el activador APMA (10 mM) sobre la actividad proteolítica de VT y las fracciones de interés. Para ello, se incubó 0.5 µg de las muestras con cada inhibidor por 1 h a 25 °C, protegidos de la luz. Posteriormente, se siguió el protocolo para ensayo de proteasas con el kit EnzChek® Protease Assay (Invitrogen®). Cada experimento se realizó por triplicado.

13. Monitoreo del grado de pureza de la fracción de interés mediante Fase reversa

El grado de pureza de las fracciones se determinó por la cromatografía en fase reversa siguiendo la metodología de Lomonte y Calvete (2017) con una columna C18 (4.6 mm x 250 mm, diámetro de partícula de 5 µm) (Zorbax), eluida a un flujo de 1 mL/min mediante un gradiente lineal de agua con 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA) (Sol. A) y 70% de acetonitrilo (CNCH₃) con TFA al 0.1% (Sol. B) monitoreado a 215 nm. Para este método se ocupó el sistema de HPLC Shimadzu SPD-10A, con detector UV/Vis SPD 10A.

14. Análisis de la pureza de la fracción por MALDI-TOF.

Esta técnica se utilizó para detectar el estado de pureza de la fracción de interés. Para el primer tratamiento, 2 µg de la proteína se le agregaron 5 µL de una solución saturada de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico, matriz específica para la detección de péptidos; mientras que al segundo tratamiento se adicionaron 5 µL de ácido sinapínico (SA), específico para proteínas, con 2 µg de proteína. 1 µL de estas mezclas se depositaron en una placa para MALDI y se dejó secar a temperatura ambiente. El espectro se registró en modo lineal positivo en un espectrómetro Bruker Microflex con un láser de nitrógeno a =337 nm y un intervalo de masas de 10 a 70 kDa.

15. Identificación por espectrometría de masas (MS/MS)

Las muestras de proteína se sometieron a una digestión trípica y los péptidos obtenidos se analizaron por espectrometría de masas nano-LC-MS/MS utilizando un muestreador automático Finnigan MicroAS y un sistema de bombeo Surveyor Ms acoplado a un LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific). Los resultados de MS/MS se analizaron con el software Mascot (Matrix Science, London, UK; versión Mascot in Proteome Discoverer 2.4.0.305). La búsqueda se hizo tomando en cuenta el registro de proteasas en organismos venenosos incluyendo cnidarios y excluyendo organismos no venenosos, así como los virus. Se utilizó Scaffold (Versión Scaffold_5.0.0, Proteome Software Inc., Portland, OR) para poder validar la identificación de los péptidos y proteínas basadas en su MS/MS. Se tomaron en cuenta las identificaciones de péptidos que presentaron una probabilidad superior al 95.0% mediante el algoritmo Peptide Prophet (Keller *et al.* 2002) con corrección de masa delta de Scaffold.

8. Resultados y discusiones

1. Cuantificación de proteína mediante el ensayo con ácido bicinonínico (BCA) y análisis electroforético

Para determinar la concentración de proteína de cada una de las muestras del extracto crudo, se empleó como referencia una curva estándar de albúmina sérica bovina previamente hecha donde la ecuación de la recta fue $y=0.0007x$; $R^2= 0.9984$ (Fig. 9).

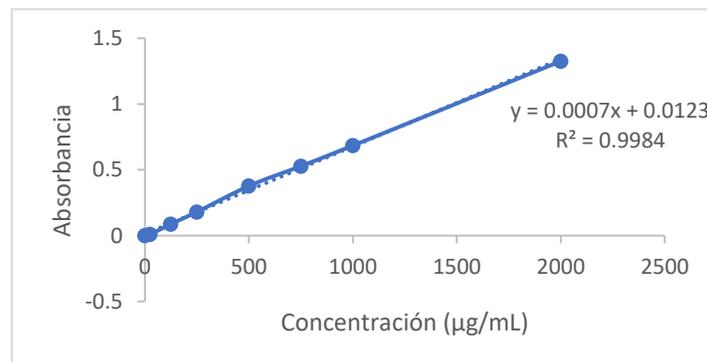


Figura 9. Curva estándar ocupada para el BCA. Curva obtenida utilizando los estándares de BSA: 0.0007 es la pendiente y 0.0123 la ordenada al origen y R^2 el factor de correlación.

Antes de realizar el primer paso de purificación, al extracto crudo del veneno total (VT), se determinó la concentración de proteína (12.43 mg/mL) mediante BCA y se observó la complejidad del veneno mediante el SDS-PAGE (Fig. 10), así como la comprobación de actividad proteolítica mediante un zimograma (Fig. 11).

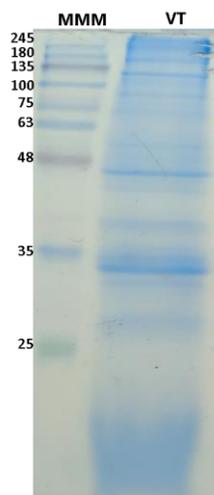


Figura 10. SDS-PAGE del veneno total soluble de *P. caribaeorum*. En el primer carril se muestran las bandas correspondientes a las masas moleculares de proteínas estándar (MMM), utilizando el marcador AccuRuler RGB PLUS Preistaned Protein Lader (Maestrogen); en el segundo carril se tiene el perfil electroforético de 10 μ g de veneno total. El veneno total muestra una amplia variedad de masas moleculares menores a 25 kDa hasta los 245 kDa.

Como se observa en la Fig. 10, el veneno total (VT) presenta una gran variedad de proteínas, dentro de las cuales se puede encontrar como bandas de interés una por debajo de los 25 kDa y una más por arriba de esta masa, estas masas aproximadas se encuentran en las masas que han sido reportadas para serin proteasas del tipo tripsina (Walsh, 1970). Se debe resaltar que dentro de esta complejidad no todas las proteínas presentes en VT tienen posible actividad proteolítica. En otros cnidarios como la anémona *Phymactis papillosa*, el veneno soluble presentó masas de 5 a 26 kDa (Cuya & Escobar, 2017), muy por debajo de las descritas para *P. caribaeorum* en este trabajo, ya que la menor masa identificada en el SDS-PAGE fue de 25 kDa, mientras que para la anémona de mar *Anthotoe chilensis*, el SDS-PAGE indicó que el veneno presentaba masas de 14 a 94 kDa y dentro de esta complejidad alguna o algunas proteínas tenían actividad proteolítica.

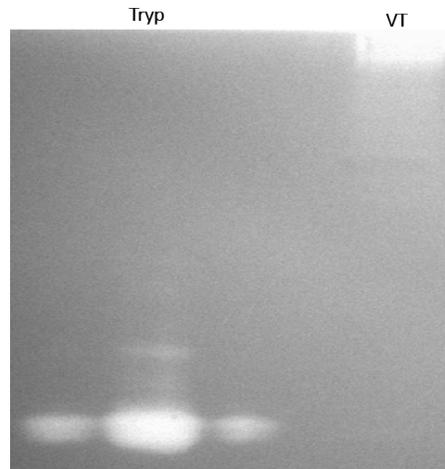


Figura 11. Actividad proteolítica del veneno soluble de *P. caribaeorum*. Zimograma al 10% copolimerizado con caseína, en donde el primer, segundo y tercer carril muestran la actividad de hidrólisis del estándar tripsina (Tryp) y en el cuarto carril la degradación del sustrato por parte del veneno total (VT).

El extracto crudo del veneno total (VT) presenta una hidrólisis total del sustrato (Fig. 11), sin embargo, la muestra no entró al gel, por lo que la banda de degradación se observa al inicio. Esto se puede deber a que la proteína al estar estructurada puede ser de mayor tamaño que el poro del gel o que la muestra se haya agregado, razón por la que se quedó al inicio. En el caso de tripsina, se han registrado isoformas en crustáceos como *Litopenaeus vannamei* y *Panulirus argus* (Rodríguez-Casariago *et al.* 2012), así mismo, la mayoría de los vertebrados poseen al menos un gen de tripsinógeno o isoforma de cada grupo de tripsinas (grupo 1 y 2) (Roach, 2002), lo que podría explicar la presencia de tres bandas de hidrólisis para tripsina, ya que a pesar de que solo se cargó en el segundo carril, la enzima es muy activa por lo que posiblemente comenzó a degradar otras zonas del gel con sustrato.

2. Prueba de estabilidad de amortiguadores

Con la finalidad de utilizar un amortiguador que conservara mejor la actividad proteolítica de la muestra, se probaron los amortiguadores Tris-HCl 50 mM pH7.8, Tris-HCl 50 mM pH8.5 y Citratos pH 5.5 y se registró la concentración de proteína según lo indicado en materiales y métodos. Los datos obtenidos se indican en la siguiente tabla.

Tabla 8. Prueba de estabilidad de amortiguadores. Concentración de proteína presente en el extracto una vez que fue disuelta en los amortiguadores evaluados y en cada uno de los tratamientos durante la prueba.

Amortiguadores	Concentración de proteína (µg/mL)			% de Proteína perdida
	Después de disolver la muestra	Posterior a la centrifugación	Una vez finalizada la incubación de 4 horas	
Tris-HCl pH 7.8	346.285	342.190	334.049	3.533
Tris-HCl pH 8.5	410.571	408.245	395.401	3.694
Citratos pH 5.5	297.238	286.430	234.162	21.220

Las concentraciones iniciales del veneno total en los diferentes amortiguadores son diferentes a las concentraciones finales. Además, las concentraciones iniciales fueron diferentes a pesar de que se pesó la misma cantidad de veneno para cada tratamiento (10 mg), por lo que se puede decir que no todo lo que conforma el extracto es proteína, pues es una combinación de restos de nematocistos, ensamblaje, entre otros. Sin embargo, aún con las diferencias en concentración de proteína para cada tratamiento, los resultados finales sobre el porcentaje de proteína perdida tomando en cuenta desde que se disolvió hasta después de la incubación, muestran que el amortiguador Tris-HCl con pH 7.8 fue el que mejor conservó la muestra con una pérdida total de 3.5%. En contraste con el mismo amortiguador, pero a pH 8.5 la diferencia es tan solo de 0.1, por lo que a este pH también se podrían conservar las proteínas del veneno. No obstante, la muestra disuelta en citratos mostró una pérdida del 21.2, siendo el que menor conservo las proteínas en la muestra, aunque no necesariamente la proteína que se pierde es una proteasa, puede ser cualquier proteína que es componente de este veneno.

Dentro de esta prueba también se evaluó si la muestra además de preservar la muestra conservaba actividad en caso de que hubiera proteasas presentes en el veneno, por lo que se utilizó proteasas EnzChek® Protease Assay (Invitrogen®) (Fig. 12).

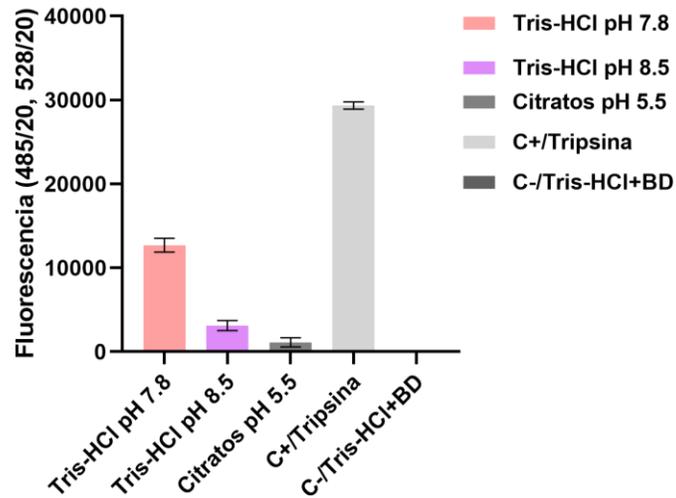


Figura 12. Efecto del pH y tipo de amortiguador en la actividad proteolítica del extracto crudo. Se muestra la actividad proteolítica del extracto crudo del veneno total una vez diluida en los amortiguadores Tris-HCl 50 mM (pH 7.8 y 8.5) y citratos (pH 5.5). Se utilizó como control positivo tripsina y como control negativo los diferentes amortiguadores con el amortiguador de digestión.

El extracto disuelto en el amortiguador Tris-HCl a pH de 7.8 fue el que presentó más actividad, mientras que a un pH de 8.5 la hidrólisis del sustrato disminuye considerablemente. Por su parte, la muestra con amortiguador citratos presentó muy baja actividad, por lo que se puede inferir que hay pocas proteínas del tipo proteasa o que algunas enzimas pudieran no estar activas (Fig. 12 y 13), posiblemente porque las proteasas de interés tienen un punto isoeléctrico muy cercano a 5.5 lo que ocasiona que precipiten a ese pH.

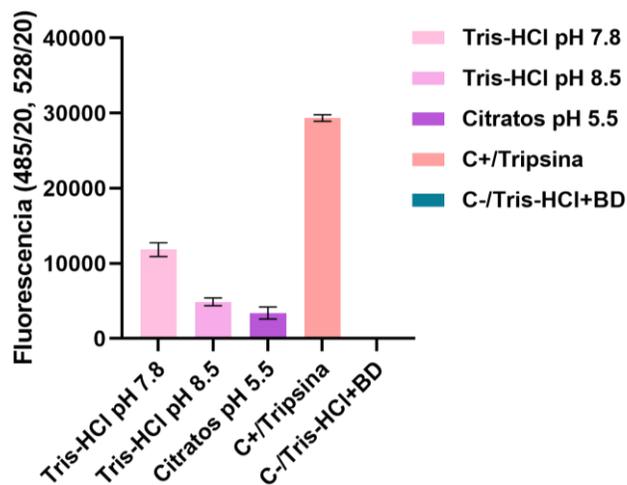


Figura 13. Efecto del pH y tipo de amortiguador en la actividad proteolítica después de 4 horas de incubación. Se muestra la actividad proteolítica del extracto una vez diluida en los amortiguadores Tris-HCl 50 mM (pH 7.8

y 8.5) y citratos (pH 5.5), utilizando como control positivo tripsina y como control negativo los diferentes amortiguadores con el amortiguador de digestión.

Para comprobar si después de un tiempo la muestra diluida en los diferentes amortiguadores conservaba actividad, se incubaron por cuatro horas tomando en cuenta que para realizar la prueba se utiliza una hora de incubación, con lo anterior, se decidió triplicar el tiempo para asegurar el efecto que las proteasas podrían tener en estas condiciones. Sin embargo, los resultados fueron similares a los mostrados en la Figura 12, reafirmando así que el amortiguador Tris-HCl pH 7.8 sería la solución base para conservar el extracto y sus respectivas fracciones.

Los resultados obtenidos son congruentes con la literatura, en donde mencionan que el amortiguador Tris es la solución tampón más utilizada en experimentos biológicos por ser soluble al agua, es económico y lo más importante sobre todo para este proyecto es que es inerte a sistemas enzimáticos, es decir, no interacciona con los componentes presentes en la muestra lo que a diferencia de otras soluciones (AppliChem, 2008), pueden interaccionar con los componentes presentes y afectar el estudio de las muestras. Por ejemplo, el calcio se precipita como fosfato de calcio en soluciones amortiguadoras de fosfato, por lo que alguna reacción que requiera Ca^{2+} se vería afectada, así como la capacidad amortiguadora del tampón fosfato. Así mismo, la solución amortiguadora de citratos es un quelante del ion Ca^{2+} (Doyle & Promega Corporation, 1996), por lo que existe una probabilidad de que si hubiera serían proteasas dependientes de este ión podrían disminuir su capacidad de hidrólisis.

3. Efecto de inhibidores de proteasas sobre VT

Además de evaluar la actividad proteolítica de extracto crudo del VT, con el uso de iones e inhibidores se pudo sugerir la presencia de cierto tipo de proteasas. En el caso de los inhibidores de proteasas conocidos, El EDTA y EGTA son agentes quelantes de iones positivos que, junto con el compuesto Fen actualmente son ocupados como inhibidores de metaloproteasas (Ledezma *et al.* 2013). Como se observa en la Figura 14, en presencia de estos tres compuestos, la actividad proteolítica se inhibió considerablemente. Lo anterior sugiere la presencia de metaloproteasas en VT.

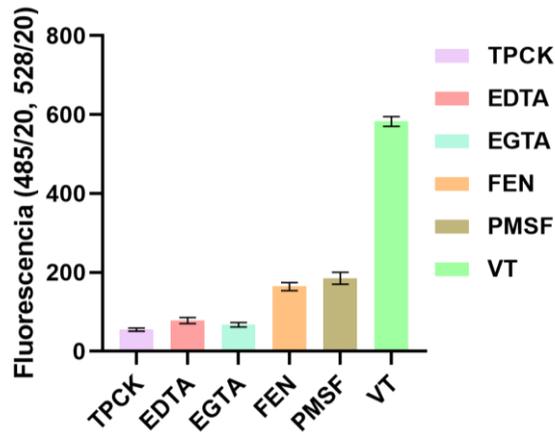


Figura 14. Efecto de los inhibidores sobre VT después de una hora de incubación. Para la detección de posibles serín proteasas, se ocuparon los inhibidores TPCK y PMSF, mientras que, para la detección de metaloproteasas, se utilizaron los agentes quelantes EDTA, EGTA y el inhibidor PMSF. Su actividad fue contrastada con el extracto total (VT) sin inhibidor. Los resultados son expresados como la media +/- su desviación estándar.

Se utilizaron los inhibidores PMSF que es un inhibidor de serín proteasas (quimotripsina, tripsina y trombina), así como de cisteín proteasas tipo papaína (Sigma-Aldrich, 2021), y TPCK, inhibidor específico de quimotripsina, también con capacidad para inhibir otras serín proteasas (Trivedi, 2020). Después del tiempo de incubación, la actividad del VT disminuyó con ambos inhibidores, sin embargo, fue más notable en presencia del TPCK, lo que puede sugerir la presencia de estas dos clases en VT.

Por otra parte, para cnidarios aún no hay estudios enfocados en el efecto de inhibidores sobre las proteasas encontradas, pues muchos de ellos están basados en proteómica y transcriptómica como se muestra en la Tabla 5. Sin embargo, para animales venenosos como serpientes o arañas la presencia de ciertos agentes como EDTA y PMSF, disminuyen la actividad proteolítica de las proteasas y son los agentes más utilizados para detectar presencia de metaloproteasas y serín proteasas, respectivamente. Tal es el caso de la araña *Loxocles laeta* donde el EDTA y PMSF disminuyeron la actividad proteolítica de las fracciones, asociando que el veneno de esta araña presente ambos tipos de proteasas (Huari *et al.* 2016).

4. Efecto de iones metálicos en VT

Zn^{2+} y Mg^{2+} son cofactores específicos de las metaloproteasas, y el Ca^{2+} y Mg^{2+} junto con el Mn^{2+} , son clasificados como cofactores de serín proteasas, por lo que se utilizaron estas sales para observar su efecto. Sin embargo, la presencia de iones afines a cierto tipo de proteasas no resultó en un incremento de la actividad (Fig. 15), más bien hubo una reducción de la misma; sin embargo, en el caso de $CaCl_2$ y $MgCl_2$ son los compuestos que menor reducción presentaron. Por otro lado, APMA no es un ión metálico, pero es utilizado como activador de precursores inactivos de metaloproteasas (proMMP) inactivas a metaloproteasas (MMP) activas con función catalítica. Este agente actúa sobre cisteínas del dominio catalítico de la metaloproteasa que son necesarias para su actividad, aunque a concentraciones elevadas de APMA, la metaloproteasa podría inhibirse (Milla *et al.* 1999). Conforme lo anterior, VT mostró muy baja hidrolisis del sustrato en presencia de APMA. Cabe resaltar que para esta prueba APMA se ocupó a una concentración 20 mM y posiblemente era mucho mayor a la concentración de posibles metaloproteasas o enzimas de otra clase, lo que ocasionó que la actividad en vez de verse acentuada disminuyera.

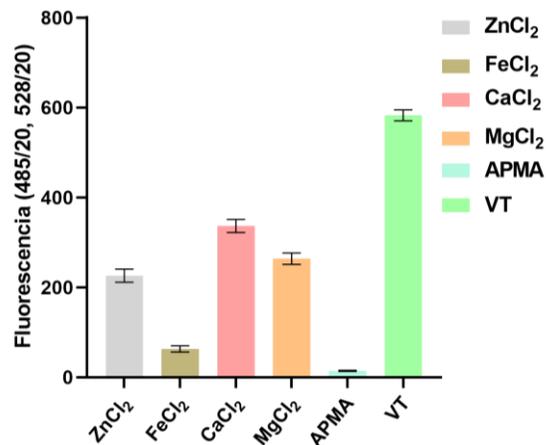


Figura 15. Efecto de los iones metálicos sobre VT después de una hora de incubación. Efecto de los iones metálicos sobre VT después de una hora de incubación. Se evaluó el efecto de los iones metálicos y el activador APMA sobre la actividad específica de VT para detectar posible presencia de metaloproteasas o serín proteasas, mediante el kit específico para detección de proteasas Enz Chek. Los resultados se expresan como media +/- desviación estándar.

Además, se evaluó el efecto de inhibidores de proteasas, iones metálicos como posibles cofactores y un activador de metaloproteasas sobre la actividad del veneno total

(VT); los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 9, en la que se presentan las Unidades de Actividad Proteolítica (UAP) y Unidades de Actividad Proteolítica Específica (UAPe) para cada tratamiento.

Tabla 9. UAP y UAPe del veneno total de *Palythoa caribaeorum*. El VT fue tratado con inhibidores de proteasas, iones metálicos como posibles cofactores y un activador de metaloproteasas.

		UAP	UAPe
IONES	ZnCl ₂	3.76	0.75
	FeCl ₂	1.05	0.21
	CaCl ₂	5.6	1.12
	MgCl ₂	4.39	0.87
INHIBIDORES	Fen	2.73	0.54
	TPCK	0.91	0.18
	EDTA	1.3	0.26
	EGTA	1.12	0.24
	PMSF	3.08	0.61
ACTIVADOR	APMA	0.23	0.04
MUESTRA	VT	9.71	1.94

Con los valores de UAPe se puede comparar de forma más acertada el efecto que tuvieron los inhibidores y los iones en la actividad del VT. Como se puede observar en la Tabla 9, CaCl₂ es el compuesto que menos redujo la actividad proteolítica del veneno (UAPe 1.12), seguido de MgCl₂ (UAPe 0.87). Esto refuerza la idea de la presencia de serín proteasas en el extracto total. Por su parte, TPCK fue el compuesto con mayor capacidad inhibitoria de la acción proteolítica de VT con valores de 0.18, mientras que PMSF inhibió de tal forma que VT tuvo una actividad de 0.61. En el caso de la muestra de veneno total sin iones e inhibidores, los valores de actividad específica (1.94) son mucho más bajos en comparación con el veneno de la serpiente *Bothrops atrox* con una actividad específica de 56.6 en promedio, registrada por Ortíz y colaboradores en el 2012. Con estos datos, aparentemente

el veneno total de *P. caribaeorum* tiene menos actividad proteolítica que el veneno de esta serpiente.

5. Separación mediante intercambio catiónico
El primer paso de purificación utilizado fue una separación por intercambio catiónico. Se obtuvieron tres fracciones, las cuales se muestran en el siguiente cromatograma:

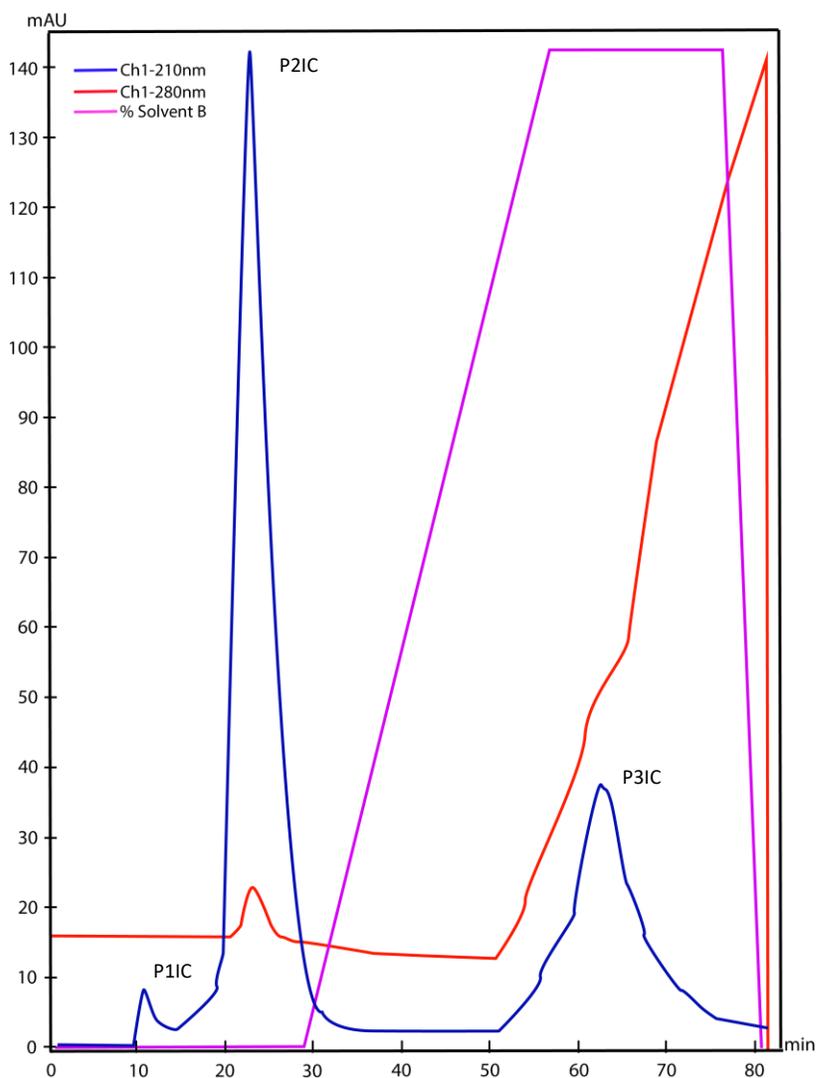


Figura 16. Cromatograma de Intercambio catiónico de VT. Se empacó una matriz CM Sepharose, utilizando como solución eluyente Tris-HCl 50 mM y NaCl 0.1 M con un flujo de 1mL/min. Línea roja: conductividad; línea azul: UV y línea rosa: gradiente de concentración del eluyente donde 100% de fase A (Tris-HCl 50 mM, pH 7.0) por 30 minutos. Posteriormente, la composición de los solventes se cambió a 100% de la fase móvil B por 25 minutos y se mantuvo por 25 minutos para volver a la fase A por 5 minutos.

Generalmente, la técnica cromatográfica de filtración en gel ha sido ocupada como primer paso de purificación como se reporta en los trabajos de Carrejo *et al.* (2005), Lazcano-Pérez *et al.* (2014), Cuya & Escobar (2017), entre otros; pero para este estudio se comenzó con la técnica de intercambio catiónico como el artículo de Vivas-Ruiz *et al.* (2015) donde utilizaron un intercambio iónico con una matriz CM-Sephadex- C50 y eluyendo con un gradiente lineal de NaCl de 0.1 a 1 M, mientras que en este estudio se utilizó una matriz CM-Sepharose eluyendo con un gradiente de 0.1 M de NaCl. Esta técnica decidió ocuparse con la intención de reducir el volumen de las fracciones; sin embargo, el cromatograma de la Figura 16 muestra poca retención del veneno total con la columna, ya que las dos primeras fracciones salen antes de iniciar el gradiente, por lo que para mejorar la interacción con la proteína posiblemente hubiera sido necesario modificar el pH de los amortiguadores ya que posiblemente se estuvo trabajando cercano al punto isoeléctrico de las proteínas presentes. Sin embargo, el que algunas proteínas presentes en el veneno no se unieran a la columna, no afectó la interacción con las proteínas de interés, por lo que puede decirse que la separación de VT mediante intercambio catiónico fue eficiente. Sin embargo, pudo ser útil realizar un gel de dos dimensiones para conocer el punto isoeléctrico de las proteínas y así mejorar la separación en caso de que hubiera más proteínas proteolíticas presentes en VT.

6. Prueba de actividad proteolítica de fracciones obtenidas por FPLC

Las fracciones P1IC, P2IC y P3IC obtenidas en el paso de purificación en intercambio catiónico fueron cargadas con una misma concentración total de proteína (3 µg) para monitorear la actividad proteolítica conservada en cada una de las fracciones, obteniendo así la siguiente gráfica:

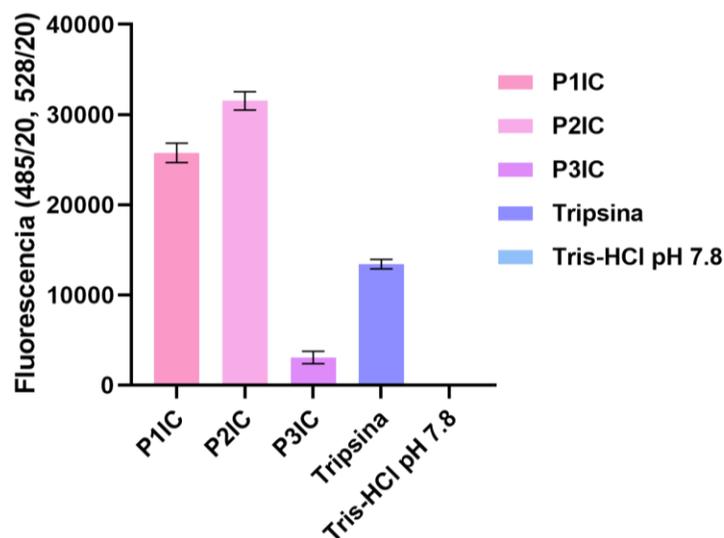


Figura 17. Prueba de punto final para la evaluación de la actividad proteolítica de las fracciones obtenidas mediante intercambio catiónico en FPLC. Se cargaron 3 μg de proteína, ocupando como control positivo Tripsina [1 μg] y como control negativo el amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7.8 junto con el buffer de digestión. Los resultados se expresan como media +/- desviación estándar.

La Figura 17 muestra la actividad proteolítica de las tres fracciones obtenidas mediante la técnica de intercambio catiónico. Las fracciones P1IC y P2IC fueron las más activas en la hidrólisis del sustrato, en contraste con P3IC donde se puede observar que la actividad proteolítica fue mínima, posiblemente esta baja actividad se deba a una baja concentración de proteasas en la muestra, por tanto, se descartó continuar trabajando con esta fracción.

Tabla 10. UAP y UAPe de las fracciones P1IC, P2IC y P3IC provenientes del veneno de *Palythoa caribaeorum*. Las fracciones se incubaron con el sustrato durante una hora; posteriormente se midió la actividad para determinar qué fracción presentaba mayor actividad proteolítica.

	UAP	UAPe
P1IC	429.2	143.066
P2IC	525.378	175.126
P3IC	50.894	16.964
Tripsina	223.738	223.738

La Tabla 10 confirma que la actividad específica de la fracción P2IC es mucho mayor en comparación con las otras fracciones. Asimismo, la actividad específica P3IC es muy baja,

donde no alcanza un valor mayor a 20, por esta razón se excluyó de los siguientes análisis a mostrar.

Por lo anterior, se realizó un SDS-PAGE para ver la complejidad de las fracciones de interés (P1IC y P2IC). En la Figura 18 se puede observar la presencia de tres bandas en P1IC donde las masas aproximadas rondan los 47 kDa a 100 kDa, mientras que para P2IC que es la fracción más activa, muestra una banda con una masa aproximada de 63 kDa. Si bien, las masas solo son un peso aproximado, son similares a las que se han registrado para metaloproteasas en donde se han registrado masas desde los 45 hasta los 92 kDa (Senties-Gómez *et al.* 2005; Kessenbrock *et al.* 2010). Por otro lado, se observa ligera similitud con las masas que se han registrado para serín proteasas (16.3 a 63 kDa) (Devaraja *et al.* 2008; Betancourt-Cervantes, 2009; Jesús-Ramírez *et al.* 2017); sin embargo, esto no es un indicador para concluir que la muestra parcialmente pura forma parte de una u otra clase.

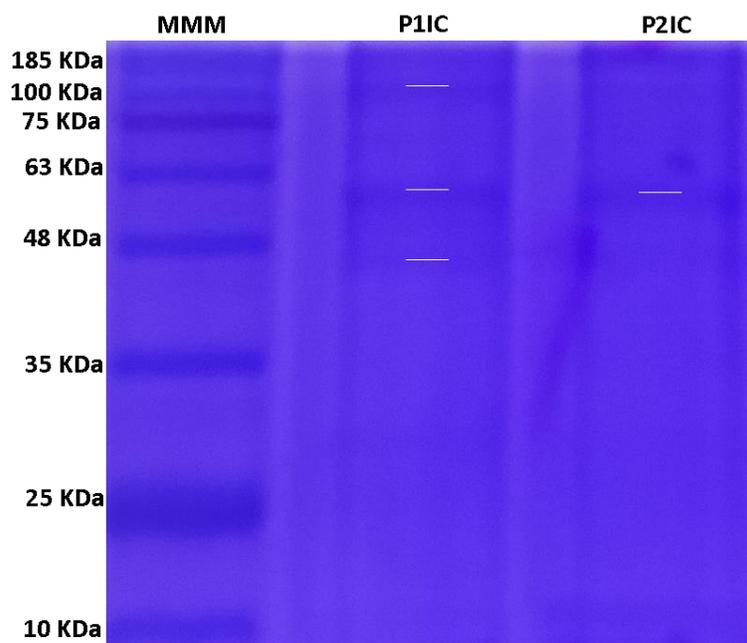


Figura 18. SDS-PAGE de las fracciones cromatográficas de *P. caribaeorum*. En el primer carril se muestran las bandas correspondientes a las masas moleculares de proteínas estándar (MMM) utilizando el marcador AccuRuler RGB PLUS Preistained Protein Lader (Maestrogen); en el segundo y tercer carril se tiene el perfil electroforético del veneno soluble 10 µg de veneno total de las fracciones obtenidas mediante intercambio catiónico en FPLC (P1IC y P2IC).

7. Concentrado, desalado y separación de fracciones

Debido a que las fracciones obtenidas con el intercambio catiónico quedaban muy diluidas, se ocuparon Centricones[®] de 50 mL con corte de 10 kDa. Esta técnica permite disminuir la concentración de sal en la muestra, además de considerarse como un paso de purificación tomando en cuenta que las serín proteasas e incluso las metaloproteasas presentan masas mayores a 10kDa, por lo que se descartarían todas aquellas menores a esta masa.

Para comprobar la efectividad del método, se evaluó la actividad proteolítica en las fracciones de interés, teniendo como resultado la presencia de actividad proteolítica en ambas fracciones (Fig. 19), lo que permitió el avance al siguiente paso de purificación donde la fracción más activa en la hidrólisis del sustrato fue P2IC.

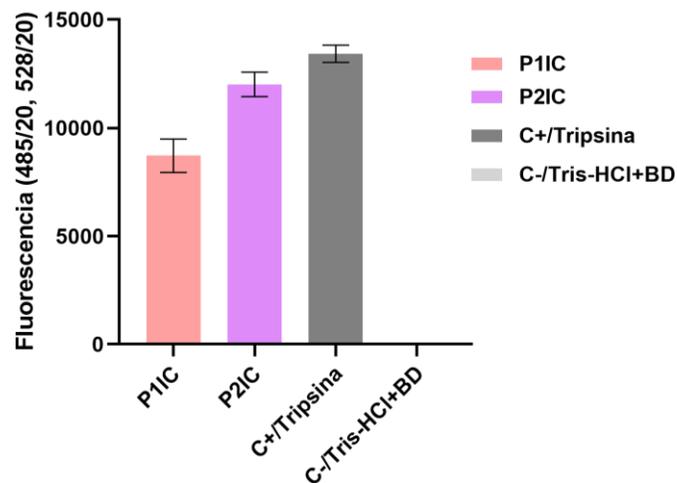


Figura 19. Prueba de punto final para la evaluación de la actividad proteolítica de las fracciones obtenidas mediante el uso de centricones con corte de 10 kDa. Se cargaron 3 µg de proteína, ocupando como control positivo Tripsina [1g] y como control negativo el amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7.8 junto con el buffer de digestión. Los resultados se expresan como media +/- desviación estándar.

Sin embargo, a pesar de que las fracciones se mantienen activas, la actividad proteolítica específica disminuyó. Por ejemplo, para P2IC antes del uso de centricones tenía valores de 175.2, mientras que para P1IC fue de 143, pero después del paso con centricones disminuyó a 66.6 y 235.3, respectivamente como lo muestra la Tabla 10. Sin embargo, hay varios factores que pudieron influir en la disminución de actividad como lo puede ser el

proceso de congelación y descongelación que presentaron las fracciones, ya que durante estos eventos se pudo haber promovido que algunas de las proteasas presentes sufrieran algún proceso de desnaturalización que afectó o disminuyó su capacidad de degradar sustrato. Esto se puede explicar con lo registrado por Franks en 1985, donde indica que, la desnaturalización de las proteínas durante la congelación está relacionada con los cambios físicos y químicos alrededor de las proteínas durante el proceso y que el cambio de estos parámetros, así como la formación de cristales de hielo dependen de la velocidad de congelación.

Generalmente, una congelación lenta hace que se formen cristales de hielo grandes y no uniformes, en donde los solutos y posiblemente las proteínas, son empujados hacia regiones no congeladas, produciendo un elevado aumento en la concentración de soluto y un cambio de pH debido a la cristalización de la sal del amortiguador, lo que provoca que puedan conducir a la deshidratación, disociación o distorsión de las proteínas y, por tanto, la inactivación (Cao *et al.* 2002). En contraste con lo anterior, la Tabla 11 muestra a tripsina más activa; posiblemente ocurrió lo mismo que con las fracciones, sin embargo, no se monitoreó si la tripsina perdía o conservaba su actividad. Así mismo, este estándar es una enzima pura, mientras que en las fracciones aún hay una mezcla de proteasas y otras proteínas lo que hace que tengan menor actividad y tripsina sea más activa.

Tabla 11. UAP y UAPe de la fracción P1IC y P2IC provenientes del veneno de *Palythoa caribaeorum*. Se midió la actividad proteolítica de las fracciones con el kit específico para detección de proteasas EnzChek® Protease Assay (Invitrogen®) y como estándar Tripsina.

	UAP	UAPe
P1IC	145.144	48.381
P2IC	200.088	66.696
Tripsina	235.350	235.350

8. Separación por cromatografía de exclusión molecular

Posterior al concentrado, desalado y purificación utilizando los centricones, se realizó un proceso de separación de la fracción P2IC. Se eligió esta fracción porque además de ser

la más activa, presentaba mayor concentración de proteína (0.43 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). A continuación, se muestra el cromatograma obtenido empleando la columna de exclusión molecular utilizando la columna SHODEX PROTEIN KW-802:

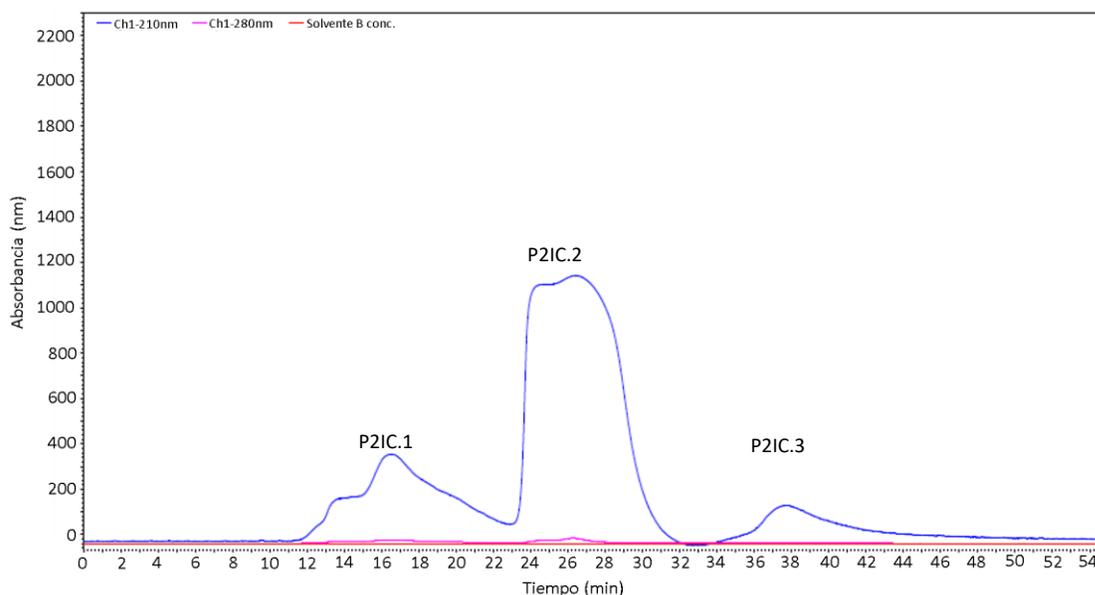


Figura 20. Cromatograma de exclusión molecular de la fracción P2IC.2. Se utilizó una columna SHODEX PROTEIN KW-802, con el amortiguador Tris-HCl 50 mM como solución eluyente a un flujo de 1mL/min. Donde línea roja: línea base; línea azul: Abs 210 nm y línea rosa: Abs 280 nm.

Conforme al cromatograma de la Figura 20, se recolectaron tres fracciones a las que se les determinó la concentración de proteína (P2IC.1, 0.52 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; P2IC.2, 0.22 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y P2IC.3 0.13 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) para poder evaluar la actividad proteolítica utilizando el EnzChek® Protease Assay (Invitrogen®) y determinar cuál fracción era la más activa.

La fracción más activa fue P2IC.2, por su parte, P2IC.3 presentó una hidrólisis que las otras fracciones tomando en consideración que en todas se cargaron 3 μg (Fig. 20). Lo anterior pudo corroborarse tomando en cuenta los valores de actividades específica para cada uno de los tratamientos.

Tabla 12. Unidades de actividad proteolítica (UAP) y específica (UAPe) de P2IC.1, P2IC.2, P2IC.3 provenientes de *Palythoa caribaeorum*. Se midió la actividad proteolítica de las fracciones con el EnzChek® Protease Assay (Invitrogen®) y como estándar Tripsina.

	UAP	UAPe
P2IC.1	303.166	101.055
P2IC.2	331.455	110.485
P2IC.3	217.977	72.659
Tripsina	223.738	223.738

De las tres fracciones obtenidas, la que presenta menor actividad fue P2IC.3 con una actividad específica de 72.659 posiblemente por la presencia de una proteasa menos activa en estas condiciones.

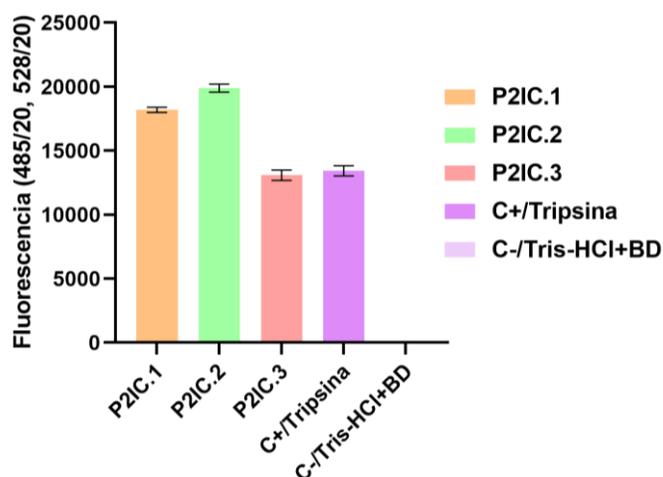


Figura 21. Prueba de punto final para la evaluación de la actividad proteolítica de las fracciones obtenidas mediante centrífugas con corte de 10 kDa. Se cargaron 3µg de proteína de cada una de las muestras. Se utilizó como control positivo Tripsina [1g] y como control negativo el amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7.8 junto con el buffer de digestión. Los resultados se expresan como media +/- desviación estándar.

Posteriormente, se comparó la actividad proteolítica presente en las fracciones obtenidas en HPLC y FPLC respecto al veneno total:

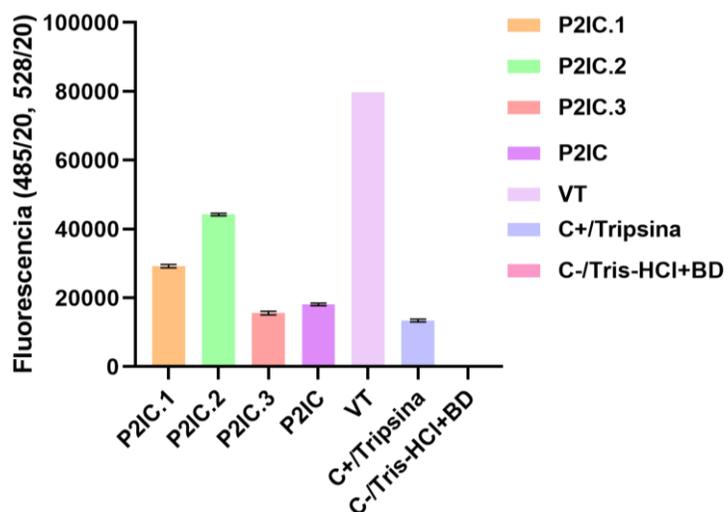


Figura 22. Prueba de punto final para la evaluación de la actividad proteolítica de cada una de las fracciones obtenidas en los pasos de purificación y de VT. Se cargó una masa de 3µg de proteína, ocupando como control positivo Tripsina [1g] y como control negativo el amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7.8 junto con el buffer de digestión. Los resultados se expresan como media +/- desviación estándar.

Indiscutiblemente, VT presentó mayor actividad respecto a las fracciones y esto se debe posiblemente a un efecto sinérgico originado por la mezcla de diversas proteasas también presentes en el veneno y que son capaces de hidrolizar el sustrato. Es importante señalar que en esa mezcla se encuentran proteasas, pero también otras proteínas y toxinas con diversas funciones en el veneno. En contraparte, P2C.2 fue la más activa dentro de las fracciones, incluso más que la fracción P2IC que es del primer paso de purificación (Fig. 22); lo anterior se debe a que en cada paso de purificación se fue enriqueciendo la fracción, por lo que se fueron separando y eliminando aquellas proteínas que no proveían de actividad y la concentración de proteínas con actividad proteolítica aumentó, es decir, se redujo la complejidad de la muestra volviéndola más pura.

Así mismo, se corrió un SDS-PAGE para monitorear el estado de pureza de las fracciones obtenidas (Fig. 23).

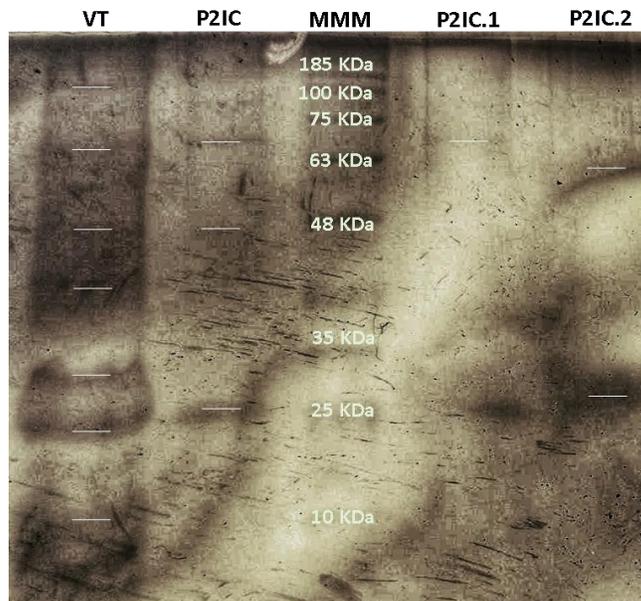


Figura 23. SDS-PAGE de las fracciones cromatográficas de *P. caribaeorum*. En el primer carril se muestra el perfil electroforético del veneno total de *P. caribaeorum*, en el segundo carril se presentan las proteínas presentes en la fracción obtenida por intercambio catiónico (P2IC), en el tercer carril se encuentran las bandas correspondientes a las masas moleculares de proteínas estándar (MMM) utilizando el marcador AccuRuler RGB PLUS Preistained Protein Lader (Maestrogen) y en el carril cuatro y cinco las fracciones de interés obtenidas en exclusión molecular (P2IC.1 y P2IC.2).

En el SDS-PAGE deja en evidencia la presencia de siete bandas en el veneno total con masas en un rango aproximado de entre 10 y 100 kDa. Para el caso de la fracción P2IC solo se conservan tres bandas de aproximadamente 25, 48 y 73 kDa, respectivamente, cabe recordar que dicha fracción es resultado de dos pasos de purificación previos (Intercambio catiónico y centrífuga), razón por la cual se observa una disminución en el número de proteínas que la componen. Finalmente, las sub-fracciones P2IC.1 y P2IC.2 provenientes de la fracción P2IC, presentan una banda de aproximadamente 70 kDa y dos bandas aproximadas de 62 kDa y 25 kDa, respectivamente. Con base en las masas obtenidas a partir del SDS-PAGE y debido a que P2IC.2 fue la fracción más activa, se puede sugerir la presencia de al menos una serín proteasas del tipo tripsina, ya que éstas registran masas de 24-25 kDa (Walsh, 1970; Cohen & Gertler, 1981), que corresponde con la masa de 25 kDa proveniente de P2IC y que se conservó P2IC.2 y explicaría su alta actividad hidrolítica. Mientras que las bandas de aproximadamente 60 kDa para ambas fracciones (P2IC y P2IC.2)

coinciden con las registradas para metaloproteasas, donde las del tipo II van de 60-100 kDa (Baldo *et al.* 2010).

9. Rendimiento total del veneno de *Palythoa caribaeorum*

Además, se evaluó el rendimiento de VT y sus respectivas fracciones obteniéndose los siguientes rendimientos y cantidades totales de proteína como se muestra en la Tabla 13. Conforme avanzaron los pasos de purificación, las muestras se enriquecieron de tal forma que la fracción P2IC.2 obtuvo el mayor rendimiento a pesar de que es la muestra con menor concentración de proteína y presenta mayor actividad específica respecto a las otras fracciones y un rendimiento superior al 50%.

Tabla 13. Rendimiento del VT, con sus respectivos pasos de purificación. Se describe el rendimiento de P1IC, fracción obtenida mediante intercambio catiónico y P1IC.1, P1IC.2, P1IC.3 mediante exclusión molecular.

Paso de purificación	Actividad total U/min	Proteína total en la fracción(µg)	Actividad específica (U/(µg*min))	Factor de purificación	Rendimiento (%)
VT	664.222222	779000	0.0009	1	100
P2IC	150.888889	1455.6000	0.1037	121.5736	22.7166
P2IC.1	243.466667	270.7500	0.8992	1054.6178	36.6544
P2IC.2	368.491667	52.5000	7.0189	8231.7548	55.4772
P2IC.3	130.141667	90.7500	1.4341	1681.8753	19.5931

10. Efecto de inhibidores en P2IC.2

La evaluación de actividad proteolítica, así como el efecto de inhibidores en la fracción de interés, siguió la misma metodología que para VT. P2IC.2 en presencia de EGTA, obtuvo un aumento en la actividad, lo anterior puede deberse a que el calcio y/o magnesio interactúan al estar presentes en el medio, impidiendo una hidrólisis eficiente de las serín proteasas, razón por la que se adicionan agentes quelantes como EDTA o EGTA, los cuáles “secuestran” estos iones mejorando la actividad de este tipo de enzimas tales como la tripsina (Schomburg & Scomburg, 2002). Por otra parte, la literatura indica que EDTA tiene una mayor afinidad para quelar iones Mg^{2+} , mientras que EGTA tiene mayor afinidad con Ca^{2+} (AAT Bioquest, 2019), esto también puede explicar un aumento en la actividad en presencia de los agentes quelantes. Por su parte, P2IC.2 en

presencia de TPCK presentó mínima actividad inhibitoria, a diferencia de PMSF que tiene mayor especificidad para inhibir la acción proteolítica de enzimas del tipo serina (Fig. 24).

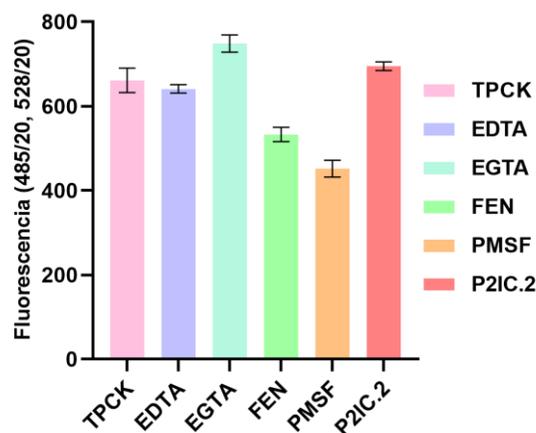


Figura 24. Efecto de los inhibidores sobre P2IC.2 después de una hora de incubación. Para la detección de posibles proteasas conservadas en los pasos de purificación se probó el efecto de inhibidores específicos para serín y metaloproteasas en la fracción. Los resultados se expresan como media +/- desviación estándar.

Por su parte, Fen también inhibió la actividad proteolítica de enzimas presentes PC2.2, lo que sugiere que esta fracción podría tener metaloproteasas.

Efecto de iones metálicos en P2IC.2

La actividad de VT no se vio acentuada en presencia de iones metálicos. La fracción P2IC.2 en presencia de iones no aumentó la actividad proteolítica, esto podría indicar que la enzima no requiere de iones divalentes para su actividad, razón por que P2IC.2 es más activa sin un cofactor. En contraste con lo anterior, Diez-García *et al.* (2018) purificaron el veneno de la anémona *Condylactis gigantea* y obtuvieron diferentes resultados a los de este estudio, ya que proteínas con mayor masa molecular en presencia de Ca^{2+} , Na^{2+} y Zn^{2+} aumentaron su actividad proteolítica asociando el resultado con presencia de metaloproteasas, mientras que la actividad de las proteínas con masas menores (23 kDa) es independiente de la presencia o ausencia de iones.

Por otro lado, APMA que es un activador de metaloproteasas, continuó generando una reducción en la actividad proteolítica, a pesar de que la concentración para esta prueba fue de 10 mM, el resultado podría indicar dos cosas: que esta fracción no requiere de

activadores para mejorar su actividad o que la concentración aún sigue siendo lo suficientemente alta, para inhibir la proteólisis de la fracción.

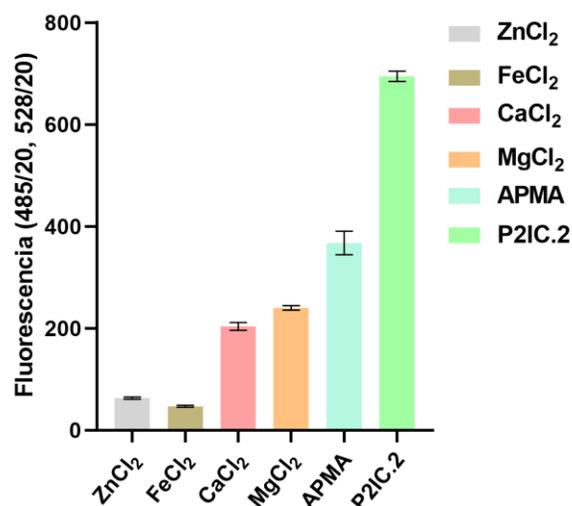


Figura 25. Efecto de los iones metálicos sobre P2IC.2 después de una hora de incubación. Se evaluó si las posibles proteasas en la fracción requerían cofactores como lo son los iones metálicos, ZnCl₂ y FeCl₂, así como el activador APMA para metaloproteasas y CaCl₂ y MgCl₂ para serín proteasas. Los resultados se expresan como media +/- desviación estándar.

En la siguiente tabla se muestran las UAP y UAPe de la fracción P2IC.2 en donde se puede comparar de mejor forma el efecto que tuvieron los iones e inhibidores sobre la fracción.

Tabla 14. UAP y UAPe de la fracción P2IC.2 proveniente del veneno de *Palythoa caribaeorum*. Las fracciones fueron tratadas con inhibidores de proteasas, iones metálicos como posibles cofactores y un activador de metaloproteasas.

		UAP	UAPe
IONES	ZnCl ₂	1.11	0.37
	FeCl ₂	0.76	0.25
	CaCl ₂	3.40	1.13
	MgCl ₂	4	1.3
INHIBIDORES	Fen	11.02	3.67
	TPCK	10.68	3.56
	EDTA	12.47	4.15

	EGTA	8.88	2.96
	PMSF	7.53	2.51
ACTIVADOR	APMA	6.12	2.04
MUESTRA	P2IC.2	11.57	3.85

Según lo indicado por Stocker *et al.* (1982) el ion Zn^{2+} en crotálicos y vipéridos podría actuar como inhibidor endógeno de serín proteasas y lo mismo ocurre para *Bothrops pictus* (Vivas-Ruiz *et al.* 2015). A pesar de ser organismos terrestres, tienen similitud con todos los animales venenosos al presentar entre sus componentes del veneno metaloproteasas y serín proteasas, lo anterior podría sugerir que el hecho de que P2IC.2 mostrara baja actividad proteolítica en presencia del zinc pudo ser el resultado de una inhibición, mientras que en presencia de $CaCl_2$ y $MgCl_2$, los valores de UAPe, fueron los más altos con 1.13 y 1.3 respectivamente. Para inhibidores, PMSF fue el que más inhibió la actividad proteolítica de la fracción quedando un total de 2.61.

11. Monitoreo del grado de pureza de la fracción de interés mediante Fase reversa

La fracción P2IC.2 en fase reversa mostró dos picos, el primero salió inmediatamente después del pico de inyección, mientras que la segunda (P2IC2.2-1) apareció en el minuto 19 (Fig. 26) lo que sugiere una mayor interacción con la columna y donde posiblemente se encuentren las proteínas de interés.

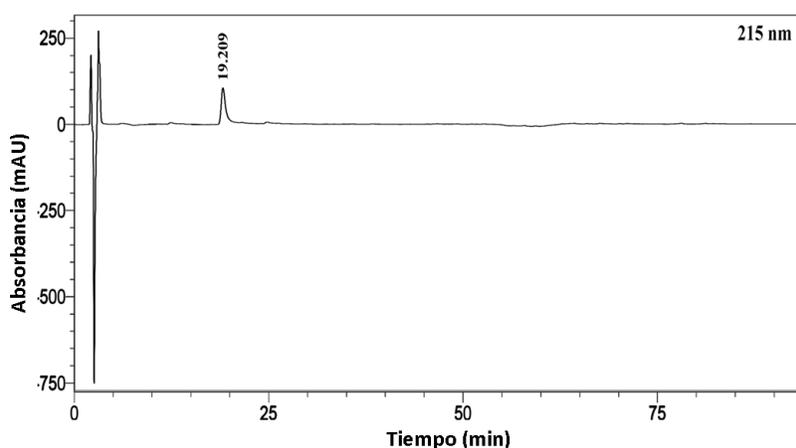


Figura 26. Cromatograma en fase reversa de la fracción P2IC.2. Se utilizó una columna C18 (Zorbax), eluida a un flujo de 1 mL/min mediante un gradiente lineal de agua con 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA) (Sol. A) y 70% de acetonitrilo (CNCH3) con TFA al 0.1% monitoreado a 215 nm.

12. Análisis por MALDI-TOF

Finalmente, 1.5 µg de la fracción P2IC.2 proveniente del P2IC se mandó a analizar por espectrometría de masas tipo MALDI-TOF para conocer la complejidad de la muestra y tener una idea más certera de las masas moleculares de las moléculas químicas que se encuentran presentes. De las dos matrices utilizadas, solo con ácido sinapínico (SA) la fracción “voló” dando como resultado el siguiente espectro de masas (Fig. 27).

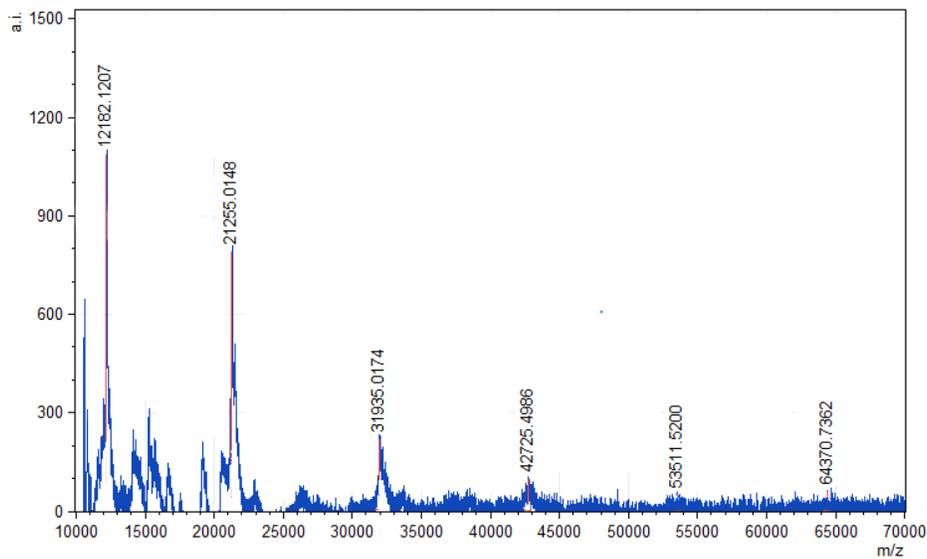


Figura 27. Espectro de masas de la fracción P2IC.2. Se utilizó la matriz SA específica para detección de proteínas, presentando seis componentes entre los 12,000 a 64,000 m/z.

El espectro de la Figura 27 muestra que las masas que componen esta fracción van de los 12 kDa hasta los 64 kDa. Knittel *et al.* (2016) reportan para la medusa *Olindias sambaquiensis* masas moleculares aproximadas de 25 y 50 kDa que corresponden a las masas de metaloproteasas presentes en venenos de serpientes y una de aproximadamente 30 kDa, consistentes con la masa molecular de serín proteasas. Se puede sugerir la presencia de una o ambos tipos de proteasas en la fracción P2IC.2. Así mismo, la presencia de una masa molecular de 31 kDa se puede asociar a las del tipo trombina registradas en vipéridos con masas moleculares de 26 a 33 kDa (Manjunatha 2006). Por otra parte, existen registros donde han detectado inhibición de enzimas proteolíticas en presencia de EDTA, además de ser dependientes de Na^+ , Ca^{2+} y Zn^{2+} sugiriendo la presencia de metaloproteasas,

sin embargo, también hay proteínas de masas moleculares aproximadas a 23 KDa con actividad proteolítica donde se descarta la posibilidad de ser metalo, serín y aspartil proteasa (Diez-García *et al.* 2018).

La fracción P2IC.2-1 obtenida en fase reversa, de igual forma se mandó a analizar por MALDI TOF en cuyo caso se estandarizó el equipo con dos proteínas: la primera con una masa de 12 kDa y la segunda con masa de 66 kDa, por lo que a continuación se presentan los espectros obtenidos (Fig. 28 y 29).

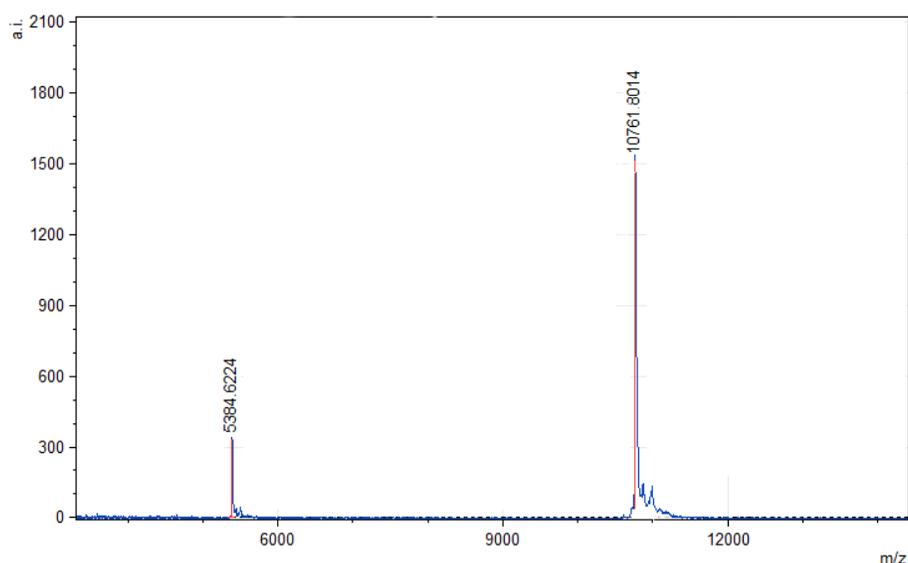


Figura 28. Espectro de masas de la fracción P2IC.2-1. Se utilizó la matriz SA específica para detección de proteínas y como estándar de calibración una proteína de 12 kDa. En el espectro se muestran componentes menores a 12,000 m/z.

En el espectro de la Figura 28 se utilizó una proteína de 12 kDa como estándar de calibración e indica la presencia de dos componentes con masas cercanas a 5 y 10 KDa. Este resultado puede indicar que es el mismo pico con multicarga ($[5384.62 \text{ m/z}] \times 2 = 10769.24$) que, aunque es raro encontrar estos resultados en MALDI se ha observado en péptidos de organismos marinos. Utilizando ESIprot Online, se corroboró que los dos componentes presentados en la Figura 28 correspondieran a la misma masa como se muestra a continuación:

ESIprot Online calculation

INPUT

Charge min.: 1+

Charge max.: 100+

ESI positive mode, H⁺ ions

m/z	charge	MW [Da]	Error [Da]
5384.224	2+	10766.43321716	2.8196042899508
10761.8014	1+	10760.79400858	-2.819604289949

Deconvoluted MW [Da]: 10763.61361287

Standard deviation [Da]: 3.9875226273725

Figura 29. Cálculo de componentes multi carga para la fracción P2IC.2-1. Se calculó la masa molecular de dos componentes: 5384.22m/z y 10761.8014 m/z.

Para esta misma fracción también se obtuvo el espectro de la Figura 30, que evidencia la presencia de tres componentes con masas que van desde los 21 hasta los 43 kDa, siendo masas similares a las registradas para proteasas en la literatura. Dentro de estos resultados también se destaca la ausencia del componente de 64 kDa mostrado en la figura 26, esto probablemente se debe a que es el mismo pico, pero con multicargas dando como resultado la presencia del componente de masa aproximada a 32 kDa ($[(64370.7362 \text{ m/z}) / 2 = 32185.3681]$).

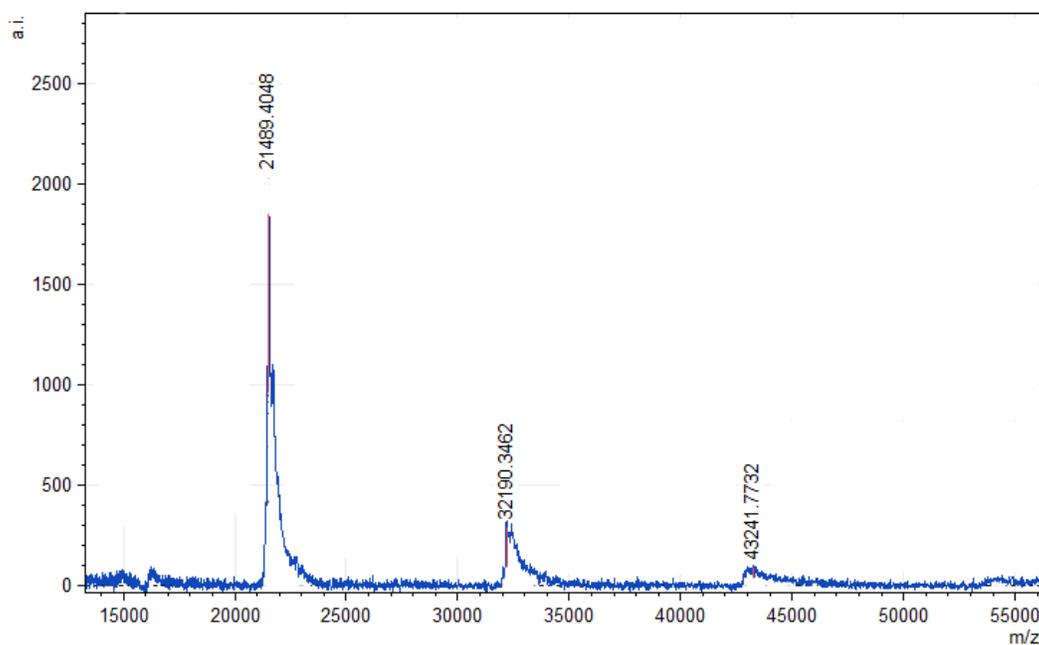


Figura 30. Espectro de masas de la fracción P2IC.2-1. Se utilizó la matriz SA específica para detección de proteínas y como estándar de calibración una proteína de 66 kDa. En el espectro se muestran componentes de 21,000 a 43,000 m/z.

Respecto a la detección de actividad de proteasas, existen algunos métodos para detección de actividad proteolítica como el análisis electroforético mediante zimogramas, el método de Kunitz (1943), detección mediante películas fotográficas (Pareja *et al.* 2006), el método FTC y el kit Enz Chek. Este último siendo de mayor interés para este proyecto, ya que es un ensayo basado en fluorescencia que detecta metalo-, serín y ácido sulfhidril proteasas, lo anterior permite delimitar el tipo de proteasas presentes en la muestra de interés y monitorearla en cada paso de purificación.

Por otro lado, este kit es un método simple porque no necesita de la preparación de tantos reactivos para su realización y es un método rápido ya que posterior a la incubación solo se realiza una lectura de punto final. Otras técnicas como zimogramas o FITC no solamente requieren de la preparación de muchos reactivos, sino que también es más lento el proceso pues requieren de más etapas para la realización de la prueba, como detener la reacción de la proteína con ácido tricloroacético, centrifugar y una vez hecho esto, ajustar el pH para mejorar la señal de fluoresceína para hacer la medición como en el FTC o la preparación del gel, la corrida y el proceso de tinción y desteñido del zimograma.

Por último, el aspecto más importante del EnzChek® Protease Assay (Invitrogen®) es que una limitante para este trabajo fue la limitada cantidad de veneno que se disponía, y dado que es kit presenta una gran sensibilidad de hasta nanogramos, buen rango de respuesta a bajas concentraciones permitió monitorear la presencia de estas enzimas en cada paso de purificación.

Para tener otro criterio de pureza de la fracción de interés, se realizó el análisis electroforético mediante SDS-PAGE, así mismo, se cargó la fracción P2IC posterior al uso del centrífugo. El gel se muestra a continuación:

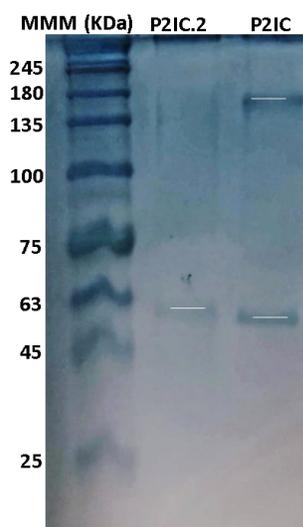


Figura 31. SDS-PAGE de las fracciones de interés. De izquierda a derecha: en el primer carril se encuentran las bandas correspondientes a las masas moleculares de proteínas estándar (MMM) utilizando el marcador AccuRuler RGB PLUS Preistaned Protein Lader (Maestrogen), en el segundo carril se presentan las proteínas presentes en la fracción obtenida por exclusión molecular (P2IC.2) y en el tercer carril el perfil electroforético de la fracción obtenida por intercambio catiónico (P2IC).

Se realizó un análisis electroforético de la fracción P2IC proveniente del intercambio catiónico en la que presenta dos bandas, una de aproximadamente 180 kDa y la segunda por debajo de 63 kDa; mientras que P2IC.2 solo conserva la banda menor a 63 kDa después del paso de purificación por exclusión molecular y el uso de centrífugas. Esta banda es consistente con la que aparece en el espectro de MALDI-TOF (Fig. 27), sin embargo, es un componente con multi carga.

13. Identificación por espectrometría de masas (MS/MS)

Los péptidos trípticos obtenidos de las fracciones P2IC.2 y P2IC.2-1 fueron analizados por espectrometría de masas-masas y con base en los patrones de fragmentación de los mismos se compararon contra la base de datos UniProt para proteasas registradas en venenos de organismos tanto terrestres como marinos mediante el programa Scaffold 5.0 en donde los cuatro péptidos identificados alinearon con diferentes metaloproteasas presentes en el veneno de *Gloydus brevicaudus*, *Hypsiglena* sp., *Echis carinatus sochureki* y *Crotalus horridus* (Tabla 15,16, 17 y 18).

Tabla 15. Alineamiento de la metaloproteasa (Tipo II) con el péptido tríptico identificado en la fracción P2IC.2-1. Se muestran las secuencias de la proteína identificada y el péptido trípticos con su respectivo porcentaje de cobertura.

Metaloproteasa (Tipo II)	
ID acceso de UniProt	A0A0K8RT96_CROHD
Especie	<i>Crotalus horridus</i>
Masa molecular	54 kDa
% de cobertura	17/478 aminoácidos (4%)
Origen del péptido	P2IC.2-1
Secuencia y cobertura:	
MIQVLLVTIC LAAPFYQGSS IILESGNVND YEVVYPRKVT AVPRGAVQPK YEDAMQYEFK VNGEPVVLHL EKNKGLFSED YSETHYSPDG REITTYPLVE DHCYYHGRIE NDADSTASIS ACNGLKGHFK LQGEMYLIEP LKLPDNEAHA VYKYENVEKE DEAPKMGCVT QNWESDKLIK KASYLDVTAE QQRFPQRYIE LVVVADHRMF TKYNNLNTV RIWVHEIVNI INVFYRSLNI RVSLTDLEIW SNQDQINVQS AAPDTLEAFG DWRETVLLNR ISHDNAQLLT AINFQENIIG RAYTGRMCDP RKS VGI VTDH SAINLWVAVT MAHELAHNLG ISHDGNQCHC DANSCIMSEE LSEELSFES DCSLNQYQTY LTDHNPQCML NEPLRTDTVS GNELLEAGEE CDCGSPANPC CDAATCK LRP GAQCAEGLCC DQCR FIKK GK ICRRARGDNP DDRCTGQSAD CPRNRFHA	

Tabla 16. Alineamiento de la metaloproteasa (Tipo III) con el péptido tríptico identificado en la fracción P2IC.2. Se muestran las secuencias de la proteína identificada y el péptido trípticos con su respectivo porcentaje de cobertura.

Metaloproteasa (Tipo III)	
ID acceso de UniProt	A0A098M156
Especie	<i>Hypsiglena</i> sp.
Masa molecular	68 kDa
% de cobertura	8/608 aminoácidos (1%)
Origen del péptido	P2IC.2

Secuencia y cobertura:					
M I Q A L L V T I G	L A V F P Y Q G S S	V I L E S G N I N D	Y E V V Y P Q K V P	A L P K G G L Q N A	E P E T K Y E D T M
Q Y E L K V N G E P	V V L H L E R N K G	L F S E D Y S E T H	Y S P D G R E I T T	S P P V Q D H C Y Y	H G S I Q N D A D S
T A V I S A C D G L	K G H F K H Q G E T	Y F I E P L K L S D	S E A H A V Y K Y E	N V E K E D E I P K	T C G V T Q T T W E
L D D P I K K I S Q	L A V T L E Q Q N T	Y L D T K K Y I E F	F I V V D N G M F N	K Y S R S L T D I R	T R V Y E L V N I L
N K I Y R T L N I H	V A L I G L E I W S	D Q D K I D V K S D	S T V T L K L F E A	W R E T D L L P R R	R N D N A Q L L T S
I T F D R G I V G L	S S V G K I C W P N	H S A E I I R D H T	S K G I M A S T M A	H E L G H N L G M Q	H D T Y S C N C N S
N K C V M S P S S G	P N Y Q F S S C S I	Q Q H R R Y L S R A	L P Q C L L D K P V	I T D I V A P A V C	G N Y F V E V G E E
C D C G F P E D C Q	S T C C N A T T C K	L Q P G A L C D S E	E C C E Q C R F K G	A E A E C R G A K D	D C D V A E R C T G
Q S A E C P K D Q F	Q R D G E P C Q N N	T G Y C Y N G K C P	T L E S Q C I A L Y	G P G N T V S P D I	C F R N N L L G N E
F A Y C R R E N G L	K S P C E P Q D V K	C G R L Y C T E R N	T M S C I V R Y F R	R D P D N G M V E P	G T K C G D G R V C

Tabla 17. Alineamiento de la metaloproteasa con el péptido tríptico identificado en la fracción P2IC.2. Se muestran las secuencias de la proteína identificada y el péptido trípticos con su respectivo porcentaje de cobertura.

Metaloproteasa					
ID acceso de UniProt	E9JG35_ECGCS				
Especie	<i>Echis carinatus sochureki</i>				
Masa molecular	69 kDa				
% de cobertura	9/605 aminoácidos (1%)				
Secuencia y cobertura:					
M M Q V L F I T I S	L A V L P Y L G S S	I I L E S G I V N D	Y E V V N P Q K V T	A M L K G E V K Q P	E Q K Y E D T M Q Y
E F K V K G E A V V	L H L E K N K G L F	S E D Y S E T H Y A	P D G R E I T T K P	A V E D H C Y Y H G	R I Q N D A D S Y A
S I S A C N G L K G	H F K L R G E M Y F	I E P L K I P D S E	A H A V Y K Y E N I	E K E D E A P K I C	G V K K T N W E S D
K S I Q E A S Q L N	L T P E Q Q R Y L N	S E K H I K V A I I	A D Y L I Y R K Y G	R N L F T I R T R I	Y E I I N I L N A I
Y R A F H M H V A L	V F L E I W S N G D	K I N V L P A A N V	T L D L F G K W R L	S D L L N R R E H D	N A Q L L T G I N F
D G P T A G L G Y V	G S M C E P Q Y S A	A I V Q D H N K I N	I L V A M A M A H E	L G H N L G M N H D	E K F C T C G A K S
C I M S G T L S C E	G S F R F S N C S Q	E E N R K Y L I R K	M P Q C I L K K P L	K T D I V S P P V C	G N Y L V E L G E D
C D C G T P T F C Q	N P C C N A A T C K	L T P G S Q C A D G	E C C D Q C R F R R	A G X E C R P A K D	E C D M A D L C N G
Q S D E C P K D Q F	Q R N G H P C Q N N	N G Y C Y N G K C P	V M G N Q C I S L F	G S R A T V A E D A	C F Q F N R L G S D
Y G Y C R K E N G I	K I P C A P E D V K	C G R L Y C F D N L	P E H K N P C Q I Y	Y T L R D E N K G M	V E P G T K C E N G

Tabla 18. Alineamiento de la metaloproteasa dependiente de Zinc/desintegrina con el péptido tríptico identificado en la fracción P2IC.2-1. Se muestran las secuencias de la proteína identificada y el péptido trípticos con su respectivo porcentaje de cobertura.

Metaloproteasa dependiente de Zinc/Desintegrina					
ID acceso de UniProt	VM2MC_GLOBR				
Especie	<i>Gloydus brevicaudus</i>				
Masa molecular	53 kDa				
% de cobertura	17/476 aminoácidos (4%)				
Secuencia y cobertura:					
M I Q V L L V I I C	L A D F P Y Q G T S	I I L E S G N V N D	Y E V V Y P R K V T	A L P K G A V Q P K	Y E D A M Q Y E F K
V N G E P V V L H L	E K N K G L F S K G	Y S E T H Y S P D G	R K I T T N P P V E	D H C Y Y H G R I Q	N D A D S T A S I S
A C N G L K G H F K	H Q G E M Y L I E P	L K L S D S E A H A	V Y K Y E N V E K E	D E A P K M C G V T	Q T N W K S D E P I
K A S Q Q R F P Q	R Y I E L V V V A D	H G M F T K Y D S N	L D T I R T W V H E	L V N S I N E F Y R	S L N I D V S L T E
L E I W S N Q D L I	N V Q S A A G D T L	E A F G D W R E T D	L L N R I S H D N A	Q L L T A T E L D G	N T I G L A H V A S
M C D P K R S T G V	V Q D H S A I N L L	V A V T M A H E T G	H N L G M N H D G N	Q C H C G A N S C V	M G D V L S E G V S
Y E F S D C S E N E	Y Q T Y L T D R N P	Q C I L N E P L R T	D T V S T P V S G N	E L L E A G K E C D	C G A P A N P C C D
A E T C K L R P G Q	Q C A E G L C C D Q	C R F M K E G T I C	Q E A K G D W N D D	T C N G I S A G C P	R N G F Y G

Como se mencionó anteriormente y se observa en las Tablas 15-18 cuatro péptidos trípticos fueron identificados en las fracciones obtenidas de la purificación del veneno de *P. caribaeorum*, donde dos pertenecen a la fracción P2IC.2 (exclusión molecular) y dos en P2IC.2-1 (fase reversa) con una cobertura menor al 50%, esto puede estar dado por dos razones: la primera es que las proteínas presentes en las fracciones no se encuentran en las bases de datos utilizadas, lo que podría explicar el que haya alineado con un organismo venenoso terrestre y no con las proteasas registradas en cnidarios en UniProt, debido a que para este filo solo existen nueve registros de los cuales todos son para serín proteasas (Base de datos UniProt¹); la segunda razón es que es probable que las proteasas presentes en la fracción y en general las enzimas de organismos marinos posean mayor presencia de enlaces covalentes como lo son los puentes disulfuro (Armstrong *et al.* 2013 en Marine Enzymes for Biocatalysis) lo que las hace resistentes al protocolo estándar de reducción/alquilación utilizado y dificultaría poder identificar los péptidos y proteínas presentes en las muestras. Así mismo, no se deben obviar las modificaciones post traduccionales dado que pueden alterar la digestión o parte del agente proteolítico, dificultando la fragmentación posterior; algunas de estas modificaciones son las acetilaciones, la producción de sulfoderivados y carbamilación del grupo ϵ -amino de la lisina, este último puede disminuir la actividad de la tripsina (Vega-Castro & Reyes Montaña, 2020).

Para poder tener una mayor comprensión acerca de los resultados obtenidos, se utilizó la plataforma PredictProtein para identificar los sitios conservados en las secuencias de las metaloproteasas con las que se alinearon los péptidos trípticos. Posteriormente, se hizo un alineamiento múltiple de las secuencias utilizando el programa Clustal O a través de la plataforma UniProt usando las secuencias de las metaloproteasas y los péptidos trípticos identificados dentro de estas secuencias, con el fin de reconocer el número de posiciones idénticas y similares como se muestra a continuación.

¹ : <https://www.uniprot.org/uniprot/?query=proteases+cnidaria&columns=id%2centry+name%2creviewed%2cprotein+names%2cgenes%2corganism%2clength&offset=0&sort=score>

<i>G. brevicaudus</i>	406	GKE	CDCGAPA	---	NPCCDAE	TCKLR	PGQQC	AEGL	CCDQCR	FMKEGTI	CQ E	AKGDW	-NDDT	461	
<i>C. horridus</i>	388	EE	CDCGS PA	---	NPCCDAA	TCKLR	PGAQC	AEGL	CCDQCR	F I	KKGKI	CR R	ARGDN	-PDDR	443
<i>Hypsiglena sp.</i>	418	EE	CDCGF PE	DCQST	CCNAT	TCKL	OPGA LC	DS	EECCEQ CR	FK GA	EAECRG	AKDD	CDVAER	477	
<i>E. carinatus suchureki</i>	418	G	EDCDCGTPT	FCQNP	CCNAA	TCKLT	PGSDC	ADGE	CCDQCR	FR RA	GXECP	AK	DECDMADL	477	
Pep 1 P2IC.2-1	1	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXX	XXXXXXXXXX	LR	PGQQC	AEGL	CCDQCR	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	17	
Pep 2 P2IC.2	9	XXXXXXXXXX	8												
Pep 3 P2IC.2	1	XXXXXXXXXX	XXXX	GXECP	AK	XXXXXXXXXX	9								
Pep 4 P2IC.2-1	1	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXX	XXXXXXXXXX	LR	PGAQC	AEGL	CCDQCR	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	17	

Figura 32. Alineamiento múltiple de las metaloproteasas identificadas para *G. brevicaudus*, *C. horridus*, *Hypsiglena sp.* y *E. carinatus sochureki*. Los aminoácidos iluminados en gris indican los residuos conservados en todas las secuencias, en azul aquellos que se repiten en al menos tres secuencias contando los péptidos de *P. caribaeorum*, en verde las cisteínas, el recuadro rojo el péptido que alineó con un fragmento de la secuencia de *C. horridus*, el recuadro verde el péptido que alineó con un fragmento de la secuencia de *G. brevicaudus*. y el recuadro amarillo el péptido que alineó con un fragmento de la secuencia de *E. carinatus suchureki*.

La figura 31 está representada por los sitios conservados en las cuatro secuencias de metaloproteasas de serpientes, así como también para las secuencias de los péptidos trípticos de P2IC.2 y P2IC.2-1 compuesta por los aminoácidos Gly, Cys, Asp, Pro, Ala, Thr, Lys, Arg y Phe, en donde las cisteínas son uno de los aminoácidos necesarios para mantener la proteína estable al ser formadoras de puentes disulfuro, además, juegan un papel importante en el plegamiento, en la unión de metales, en la catálisis enzimática y en la regulación de la actividad proteica (González-Segura, 2003). En el caso del péptido 1 y 4, solo hay una modificación de un aminoácido Gin por Ala, respectivamente. Esto hace que el péptido 1 alinee con la metaloproteasa dependiente de zinc con un dominio desintegrina y el péptido 4 con una metaloproteasa del tipo II. Sin embargo, las propiedades de estos aminoácidos son diferentes pues Q es un aminoácido polar sin carga, mientras que A es un aminoácido no polar, esto podría modificar las propiedades fisicoquímicas de la proteína, pero es imposible afirmar el efecto en general ya que no se tiene la cobertura completa.

<i>G. brevicaudus</i>	226	NEFYR	SLN	I	D	V	SLTE	LEIWS	NQDLI	NVQSA	AGDTLEAFGD	WRETDLLNRI	SHDNAQLLTA	285			
<i>C. horridus</i>	212	NVFYR	SLN	I	R	V	SLTDLEIWS	NQDQINVQSA	A	PDTLEAFGD	WRETVLLNRI	SHDNAQLLTA	271				
<i>Hypsiglena sp.</i>	241	NKI	YR	TLN	I	H	VALI	GLEIWS	DQDKID	VKSD	S	TV	TLK	FEA	WRETDLLPRR	RNDNAQLLTS	300
<i>E. carinatus suchureki</i>	238	NAI	YRAFHMH	VALVFLEIWS	NGDKIN	V	LPA	ANVTLDLFGK	WRLSDLLNRR	E	HDNA	QLLTG	297				
Pep 1 P2IC.2-1	1	XXXXXXXXXX	0														
Pep 2 P2IC.2	1	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	SD	S	TV	TLK	XXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	8			
Pep 3 P2IC.2	1	XXXXXXXXXX	0														
Pep 4 P2IC.2-1	1	XXXXXXXXXX	0														

Figura 33. Alineamiento múltiple de las metaloproteasas identificadas para *G. brevicaudus*, *C. horridus*, *Hypsiglena sp.* y *E. carinatus suchureki*. Los aminoácidos iluminados en gris indican los residuos conservados en todas las secuencias, en azul aquellos que se repiten en al menos tres secuencias contando los péptidos de *P. caribaeorum*, el recuadro rojo el péptido que alineó con un fragmento de la secuencia de *Hypsiglena sp.*

El tercer péptido identificado está compuesto por los aminoácidos S (serina), D (ácido aspártico), T (treonina), V (valina), L (leucina) y K (lisina) en donde TLK son sitios conservados presentes en todas las secuencias, mientras que SV aparecen en al menos tres secuencias.

Además, los resultados mostrados mediante Predict protein (Anexo 1) indican que los péptidos trípticos alineados se encuentran en los sitios más conservados dentro de las secuencias, sin embargo, para poder asegurar al 100% que es una metaloproteasa, es necesario obtener la secuenciación que permita identificar las características esenciales de una metaloproteasa dentro de los péptidos trípticos.

9. Conclusiones

- El veneno de *P. caribaeorum* está compuesto por proteínas con un amplio intervalo de masas de 12-245 kDa.
- El monitoreo de actividad proteolítica en cada paso de purificación permitió identificar la presencia de proteasas con niveles altos de actividad.
- La alta actividad proteolítica observada, puede ser en parte responsable de las lesiones ocasionadas por el veneno al entrar en contacto con su presa o depredador, resultados que podrían ser ocupados más adelante para confirmar el papel que tienen las proteasas en el veneno de los cnidarios.

- Los experimentos con iones demuestran que tanto el veneno total como la fracción P2IC.2 no requieren de cofactores, por lo que son no dependientes de metales.
- Con base en los resultados de actividad proteolítica, el intervalo de masas observado y las identificaciones parciales de MS/MS, se tiene evidencia suficiente para sugerir la presencia de al menos una metaloproteasa en la fracción P2IC.2
- Debido a que no hubo una identificación completa con la base de datos UniProt, existe la posibilidad que los cuatro péptidos pertenezcan a una nueva proteasa no reportada previamente, para corroborar esto será necesaria la secuenciación de manera imperativa.

10. Perspectivas

El presente estudio permitió identificar la presencia de proteasas en el veneno de *P. caribaeorum*. Sin embargo, es necesario obtener la secuenciación completa de la proteasa aislada, ya que permitiría realizar estudios de filogenia, determinación de la estructura mediante estudios bioinformáticos y posiblemente en un futuro la posibilidad de hacer una proteína recombinante.

Asimismo, para estudios posteriores es necesario modificar las condiciones de congelamiento de las muestras para evitar la pérdida de actividad, lo que permitirá el monitoreo adecuado de las fracciones.

11. Referencias

- AAT Bioquest. 2019. What is the difference between EDTA and EGTA? Recuperado de: <https://www.aatbio.com/resources/faq-frequently-asked-questions/What-is-the-difference-between-EDTA-and-EGTA>
- Acosta A, SamMarco PW & Duarte LF. 2001. Asexual reproduction in zoanthid by fragmentation: the role of exogenous factors. *Bulletin of Marine Science* 68: 363-381.
- AppliChem. Biological buffers. 2008. AppliChem, 11 pp.
- Auld DS. 2013. Metalloproteases in *Encyclopedia of Biological Chemistry, Second Edition*, Academic Press: 86-89.
- Bairoch A. 2000. The enzyme database in 2000. *Nucleic Acids Res* 28: 304-305.
- Bakar-Salleh A., Raja-Abdul-Rahman NZ & Basri M. 2006. *New lipases and proteases*. Nova Publishers, New York, 159 pp.
- Baldo C, Jamora C, Yamanouye N, Zorn TM & Moura-da-Silva AM. 2010. Mechanisms of vascular damage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: tissue distribution and *in situ* hydrolisis. *PLoS negl. Trop. Dis.* 4. E727.
- Barrett, AJ. 1994. *Methods Enzymology. Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases* Vol. 244. Academic Press Inc. San Diego California USA. pp. 1–15.
- Becerra-Amezcuca, M.P., González-Márquez, H., Guzmán-García, X. & Guerrero-Legarreta, I. 2016. Medusas como fuente de productos naturales y sustancias bioactivas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 47(2).
- Béress L, Zwick J, Kolkenbrock HJ, Kaul PN & Wassermann O. 1983. A method for the isolation of the caribbean Palytoxin /C-PTX) from the coelenterate (Zooantid) *Palythoa caribaeorum*. *Toxicon*, 21(2): 285-290.
- Bergillos-Gasi6n F & Rivas-Fernández MA. 2013. *Picaduras y mordeduras de animales: tratado de toxicología clínica*. Bubok, España 600 pp.
- Betancourt - Cervantes, Y. 2009. Estudio bioquímico y molecular de las proteasas vacuolares de *Candida glabrata*. Tesis de maestría, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México.

- Beynon RJ, and Bond JS. (2001) *Proteolytic Enzymes: A Practical Approach*, Oxford University Press, London.
- Brinkman DL, Jia X, Potriquet J, Kumar D, Dash D, Kvaskoff D, & Mulvenna J. 2015. Transcriptome and venom proteome of the box jellyfish *Chironex fleckeri*. *BMC Genomics*, 16(1), 1–15.
- Brusca RC & Brusca GJ. 2005. *Invertebrados*. McGraw-Hill Interamericana, España. 1005 pp.
- Camacho E, Villalobos E, Sanz L, Pérez A, Escalante T, Lomonte B & Rucavado A. 2014. Understanding structural and functional aspects of PII Snake venom metalloproteinases. Characterization of BlatH1, hemorrhagic dimeric enzyme from the venom of *Bothriechis lateralis*. *Biochimie*, 101:145-155.
- Cao E, Chen Y, Cui Z & Foster PR. 2003. Effect of freezing and Thawing Rates on Denaturation of Proteins in Aqueous Solutions. *Biotechnology and Bioengineering*, 82(6): 684-690.
- Calvete JJ, Borges A, Segura A, Flores-Díaz M, Alape-Girón A, Gutiérrez JM, Díez N, De Sousa L, Kiriakos D, Sánchez E, Faks JG, Escolano J & Sanz L. 2009. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops colombiensis* a medically important pitviper of the *Bothrops atrox-asper* complex endemic to Venezuela: Contributing to its taxonomy and snakebite management. *J Proteomics* 2009;72: 227-40.
- Cera E Di. 2009. Serine Proteases Enrico. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 61(5), 510–515.
- Chakraborti S, Chakraborti T & Dhalla NS. 2017. Proteases in human diseases. In *Proteases in Human Diseases*. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-3162-5>
- Choudhary I, Hwang DH, Lee H, Yoon WD, Chae J, Han CH, Yum S, Kang C, & Kim E. 2019. Proteomic analysis of novel components of *Nemopilema nomurai* jellyfish venom: Deciphering the mode of action. *Toxins*, 11(3).
- Cohen T., Gertler A. (1981). Pancreatic proteolytic enzymes from *Cyprinus carpio* L. Purification and physical properties of trypsin. Chymosin, elastase and carboxypeptidase B. *Comparative Biochemistry and Physiology* 69 B, 647-653.
- Coronato S, Laguens G & Di Girolamo V. 2012. Rol de las metaloproteinasas y sus inhibidores en patología tumoral. *MEDICINA (Buenos Aires)*, 72: 495-502.

- Cuevas-Cruz M, Lazcano-Pérez F, Hernández-Guzmán U, Díaz de la Vega-Castañeda KH, Colín-González AL, Santamaría A, Gómez-Manzo S, Marcial-Quino J & Arreguín-Espinosa A. 2019. A Novel Phospholipase A2 Isolated from *Palythoa caribaeorum* Possesses Neurotoxic Activity. *Toxins*, 11(2): 89.
- Cuya A & Escobar E. 2017. Estudio bioquímico del veneno de la anémona de mar *Phymactis papilosa* (Actiniidae). *Revista Peruana de Biología* 24(3): 303-310.
- de Lima DC, Álvarez Abreu P, de Freitas CC, Santos DO, Borges RO, Dos Santos TC, Mendes Cabral L, Rodrigues, CR, Castro HC. 2005. Snake Venom: Any Clue for Antibiotics and CAM? *Evid Based Complement Alternat Med* 2, 39-47.
- Devaraja S, Nagaraju S, Mahadeswaraswamy YH, Girish KS, Kemparaju K. 2008. A low molecular weight serin-protease: purification and characterization from *Hippasa agelenoides* (funnel web) spider venom gland extract. *Toxicon*, 52:130-138.
- Derin Owen. 2006. Serine proteinases *in* Encyclopedia of Respiratory Medicine.
- Diez-García N, Faks J, Nieves J & Sosa D. 2018. Caracterización de moléculas bioactivas presente en los extractos de la anémona *Condylactis gigantea*. *Investigatio* (10):18-31.
- Doyle, K., & Promega Corporation. 1996. Promega protocols and applications guide. Madison, WI: Promega Corp.
- Escalante T, Rucavado A, Fox JW & Gutiérrez JM. 2011. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. *Journal of Proteomics*, 74: 1781-1794.
- Fox JW & Serrano SM. 2005. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. *Toxicon*, 45:960-985.
- Franks F. 1985. Biophysics and biochemistry at low temperature. London: Cambridge University Press.
- Frazão, B., V. Vasconcelos & A. Antunes. 2012. Sea Anemone (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria) Toxins: An Overview. *Marine Drugs*, 10(8): 1812-1851.

- García-Pérez M. 2000. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia.
- Genzano, G, Schiarti A & Mianzan HW. 2014. Cnidaria. 67-85 pp. *in* Calcagno, J.A. 2014. Los invertebrados marinos. Vázquez Mazzini, Buenos Aires, Argentina, 354 pp.
- González-Segura L & Muñoz-Clares RA. 2002. El papel de los residuos de cisteína en la estructura y función de las proteínas. *Revista de Educación Bioquímica* 22(1):2-10.
- Graterol ME, Salazar AM, Aguilar I, Pérez JC, Sánchez EE, Arocha-Piñango CL, Rodríguez-Acosta A & Guerrero B. 2008. Hemorrhagic, coagulant and fibrinolytic activities of crude venom and fractions from mapanare (*Bothrops colombiensis*) snakes. *Comparative Biochemistry and Physiology – C Toxicology and Pharmacology*, 147 (1): 113 -21.
- Graterol H, Amaíz L, Torquati E & Contreras L. 2007. Determinación y caracterización parcial de proteasas obtenidas del fruto *Thevetia ahouai* (L.) A.DC. *Faraute de Ciencias. y Tecnología* 2(2): 16-25.
- Guarnieri MC, de Albuquerque Modesto JC, Pérez CD, Ottaiano TF, Ferreira RDS, Batista FP, de Brito MV, Campos IHMP, Oliva MLV. 2018. Zoanthid mucus as new source of useful biologically active proteins. *Toxicon*. 1(143): 96-107.
- Guerrero B, & López M. 2015. Generalidades del sistema de la coagulación y pruebas para su estudio. *Investigación Clínica*, 56(4): 432-454.
- Gutiérrez JM. 2002. Understanding snake venoms: 50 years of research in Latin America. *Revista Biología Tropical* 50, 377-394.
- Haard N & Simpson B. 2000. Seafood enzymes: utilization and influence on Postharvest seafood quality. Editorial Marcel Dekker Inc, New York, USA.
- Hedstrom L. 2002. Serine Protease Mechanism and Specificity. *Chemical Reviews*, 102: 4501-4523.
- Heo Y, Kwon YC, Bae SK, Huwang D, Yang HR, Choudhery I, Lee J, Yum S, Shin K, Yoon WD, Kang C & Kim E. 2016. Cloning a Chymotrypsin-Like 1 /CTRL-1) protease cDNA from the jellyfish *Nemopilema nomurai*. *Toxins*, 8(7): 1-10.

- Hernández-melgar, AG. 2019. Aislamiento e identificación de una nueva metaloproteasa en la pared corporal del pepino de mar *Holothuria inornata* SEMPER, 1868. Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.
- Hirsch HH, Suárez-Rendeules P, Aschtetter T & Wolf DH. 1989. Aminopeptidase yscII of yeast. Isolation of mutants and their biochemical and genetic analysis. *Journal of Biochemistry* 1973: 589-598.
- Horton T, Kroh A, Boury.Esnault N, Brandão SN, Costello MJ & Zeidler W. 2017. World Register of Marine Species (WORMS). WORMS Editorial Board.
- Hsu CC & Huang TF. 2011. Biological activities of snake venom metalloproteinases on platelets, neutrophils, endothelial cells, and extracellular matrices *in* *Toxins and Hemostasis*. Springer Netherlands, 723-732.
- Huari F, Lazo F, Vivas D, Rodríguez E & Yarlequé A. 2016. Caracterización parcial de dos proteasas de la araña casera del Perú *Loxosceles laeta*. *Revista de la Sociedad Química del Perú* 82(3): 296-305.
- Hyunkyung L, Eun-Sun J, Changkeun K, Won DY, Hong-Shu K & Euikyung K. 2011. Scyphozoan jellyfish venom metalloproteinases and their role in the cytotoxicity. *Toxicon* 58: 277-284.
- Irei, Y, Sinniger F, & Reimer JD. 2015. Descriptions of two azooxanthellate *Palythoa* species (subclass Hexacorallia, order Zoantharia) from the Ryukyu archipiélago, southern Japan, *Zookeys* 1-26.
- Jaimes-Becerra A, Chung R, Morandini AC, Weston AJ, Padilla G, Gacesa R, Ward M, Long PF & Marques AC. 2017. Comparative proteomics reveals recruitment patterns of some protein families in the venoms of Cnidaria. *Toxicon*, 137: 19-26.
- Keller A, Nesvizhskii AI, Kolker E, & Aebersold R. 2002. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Analytical Chemistry*, 74(20), 5383–5392. <https://doi.org/10.1021/ac025747h>
- Kelley G.O, Zagmutt-Vergara F.J, Leutenegger C.M., Adkison M.A., Baxa D.V., Hedrick R.P. 2004. Identification of a serin protease gene expressed by *Myxobolus cerebralis*

- during development in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of Aquatic Organisms* 59: 235-248.
- Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. *Cell*. 2010; 141(1): 52-67.
- Kimura A, Sakaguchi E & Nonaka M. 2009. Multi-component complement system of Cnidaria: C3, Bf, and MASP genes expressed in the endodermal tissues of a sea anemone *Nematostella vectensis*. *Immunobiology* 214: 165-178.
- Klomp AM, Macrander J, Reitzel AM & Stampar SN. 2020. Transcriptomic analysis of four cerianthid (Cnidaria, Ceriantharian) venoms. *Marine Drugs*, 18(8): 413.
- Knittel PS, Long PF, Brammall L, Marques AC, Almeida MT, Padilla G & Moura-da-Silva. 2016. Characterizing the enzymatic profile of crude tentacle extract from the South Atlantic jellyfish *Olindias sambaquiensis* (Cnidaria: Hydrozoa). *Toxicon* 119:1-7.
- Kunitz M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General Properties. *Journal of General Physiology*, 30: 291-310.
- Laskowski, M., Jr. (1997) Serine protease inhibitors, in *The Encyclopedia of Molecular*.
- Lazcano-Pérez F, Castro H, Arenas I, García DE, González-Muñoz R & Arreguín-Espinosa R. 2016. Activity of *Palythoa caribaeorum* Venom on Voltage-Gated Ion Channels in Mammalian Superior Cervical Ganglion Neurons. *Toxins*, 8(5):135.
- Lazcano-Pérez F, Vivas O, Román-González SA, Rodríguez-Bustamante E, Castro H, Arenas I, García DE, Sánchez-Puig N & Arreguín-Espinosa R. 2014. A purified *Palythoa* venom fraction delays sodium current inactivation in sympathetic neurons. *Toxicon*: 112-116.
- Lazcano-Pérez F, Zavala-Moreno A, Rufino-González Y, Ponce-Macotela M, García-Arredondo A, Cuevas-Cruz M, Gómez-Manzo S, Marcial-Quino J, Arreguín-Lozano B & Arreguín-Espinosa. 2018. Hemolytic, anticancer and antiangiogenic activity of *Palythoa caribaeorum* venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 24:12.
- Ledezma Y, Ledezma M, León M, Pineda W, Arteaga R, Navarro MC, Contreras V & De Lima AR. 2013. Relación entre cambios en la expresión de proteasas y metaciclologénesis

- espontánea asociadas a las condiciones de mantenimiento de *Trypanosoma cruzi* en laboratorio. *Salus*, 17 suppl. 1: 56-67.
- Lee H, Jung ES, Kang C, Yoon WD, Kim JS, Kim E. 2011. Scyphozoan jellyfish venom metalloproteinases and their role in the cytotoxicity. *Toxicon*. 1;58(3):277-84.
- Lewis-Ames C, Ryan JF, Bely AE, Cartwright P & Collins AG. 2016. A new transcriptome and transcriptome profiling of adult and larval tissue in the box jellyfish *Alatina alata*: an emerging model for studying venom, vision, and sex. *BMC Genomics* 17:650.
- Liang H, Jiang G, Wang T, Zhang J, Liu W, Xu Z, Zhang J & Xiao L. 2019. An integrated transcriptomic and proteomic analysis reveals toxin arsenal of a novel Antarctic jellyfish *Cyanea sp.* *Journal of Proteomics* 208.
- Liao Q, Li S, Siu SWI, Yang B, Huang C, Chan JY, Morlighem JRL, Wong CTT, Rádis-Baptista G, Lee SM. 2018. Novel Kunitz-like Peptides Discovered in the Zoanthid *Palythoa caribaeorum* through Transcriptome Sequencing. *Journal of Proteome Research*, 2;17(2):891-902.
- Li R, Yu H, Xue W, Yue Y, Liu S, Xing R & Li P. 2014. Jellyfish venomomics and venom gland transcriptomics analysis of *Stomolophus Meleagris* to reveal the toxins associated with sting. *Journal of Proteomics* 106: 17-29.
- Li R, Yu H, Yue Y, Liu S, Xing R, Chen X & Li P. 2016. Combined proteomics and transcriptomics identify sting-related toxins of jellyfish *Cyanea nozakii*. *Journal of Proteomics* 148: 57-64.
- Lomonte B & Calvete J 2017. Strategies in 'snake venomomics' aiming at an integrative view of compositional, functional, and immunological characteristics of venoms. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 23:26.
- López-Otín, C & Bond JS. 2008. Proteases: multifunctional enzymes in life and seas. *The Journal of Biological Chemistry* 283(45): 30433-30437.
- Liu G, Zhou Y, Liu D, Wang Q, Ruan Z, He Q, et al. (2015) Global Transcriptome Analysis of the Tentacle of the Jellyfish *Cyanea capillata* Using Deep Sequencing and Expressed

- Sequence Tags: Insight into the Toxin- and Degenerative Disease-Related Transcripts. *PLoS ONE* 10(11): e0142680.
- Macrander, J., Broe, M., & Daly, M. (2016). Tissue-specific venom composition and differential gene expression in sea anemones. *Genome Biology and Evolution*, 8(8), 2358–2375.
- López JC & Rodríguez-Acosta A. 2003. Metaloproteasas-Desintegrinas en el campo de la ofidiología. *Academia Biomédica Digital*, 17.
- Manjunatha Kini R. 2006. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function, and mechanism. *Biochemistry Journal*, 397 (3): 377–387.
- Manzano-Mora MM. 2018. Fraccionamiento e identificación de la actividad proteolítica del veneno de *Palythoa caribaeorum* (cnidaria: Anthozoa: Zoantharia). Tesis de Licenciatura, Universidad del Mar, Puerto Ángel, Oaxaca, México.
- Markland Jr. FS & Swenson S. 2013. Snake venom metalloproteinases, *Toxicon* 62: 3-18.
- Marroquín-de Jesús A, & Viguera-Morales, YS. 2019. Enzimas proteolíticas: generalidades y la importancia de las aspartil proteasas fúngicas. *CIERMMI Mujeres En La Ciencia T.4*, 1–15.
- Martinuzzo M. 2017. Blood coagulation system physiology. *Revista Argentina de Hematología*, 21: 31-42.
- Milla ME, Leesnitzer MA, Moss ML, Clay WC, Carter HL, Miller AB, Su JL, Lambert MH, Willard DH, Sheeley DM, Kost TA, Burkhart W, Moyer M, Blackburn RK, Pahel GL, Mitchell JL, Hoffman CR y Becherer JD. 1999. "Specific sequence elements are required for the expression of functional tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE)." *Journal of Biological Chemistry*, 274(43): 30563-70.
- Miranda, LS, Collins AG & Marques AC. 2010. Molecules clarify life cycle-The "Hydrozoan" *Microhydrula limopsicola* is an early life stage of the Staurozoan *Haliclystus antarcticus*. *PLoS One* 5(4).
- Moran Y, Billen B, Derua R, Waelkens E, Debaveye S, Béress L & Tytgat J. 2011. A bifunctional sea anemone peptide with Kunitz type protease and potassium channel inhibiting properties. *Biochemical Pharmacology* 82(1): 81-90.

- Moran Y, Praher D, Schlesinger A, Ayalon A, Tal Y, Technau U. 2013. Analysis of soluble protein contents from the nematocysts of a model sea anemone sheds light on venom evolution. *Marine Biotechnology (NY)*;15(3):329-39.
- Müller-Esterl W. 2008. *Bioquímica. Fundamentos para medicina y ciencias de la vida.* Reverte, 657 pp.
- Nadeem, M, Javed I, Shahjahan B & Qurat-ul-ain S. 2007. Studies on commercially important alkaline protease from *Bacillus licheniformis* N-2 isolated from decaying organic soil. *Turkish Journal of Biochemistry* 32(4): 171-177.
- Narahashi T, Moore JW & Scott WR. 1964. Tetrodotoxin blockage of sodium conductance increase in lobster giant axons. *The Journal of General Physiology* 47: 965-974.}
- Uzbek S, Balasubramanian PG & Holstein TW. 2009. Cnidocyte structure and the biomechanics of discharge. *Toxicon* 54: 1038-1045.
- Ortiz C, Lazo F, Bedillo C, Gonzales E & Yarlequé A. 2012. Variaciones en las actividades enzimáticas del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* "JERGÓN", de tres zonas geográficas del Perú. *Revista Peruana de Medicina experimental y Salud Pública*,29(2): 198-205.
- Pareja A, Montoya OI & Gutiérrez PA. 2009. Prueba cuantitativa para proteasas usando películas fotográficas. *Acta Biológica colombiana*, 14(3): 217-222.
- Pechenik, J. A. (2016). *Biología dos invertebrados* (7th ed.). Sao Paulo: McGraw-Hill Brasil.
- Pereañez JA, Jimenez S, Quintana J, Nuñez V, Fernández M, & Restrepo Y. 2008. Inhibition of proteolytic, coagulant and indirect hemolytic activities induced by *Bothrops asper* venom, by ethanolic extracts from three heliconia's species. *Vitae*, 15(1), 157–164.
- Pereira, CF, Fernandez, CM, Zuliani, JP y Zamuner, SF. 2005. Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. *Mem. I. Oswaldo Cruz*, 100: 181-184
- Pérez-Nogués M, Rojo-Solís C, de Vicente Ruíz ML & Encinas-Cerezo MT. 2008. Estudio del veneno de serpientes: tipos y tratamientos. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 2(2): 100-104.

- Ponce D, Brinkman D, Potriquet J, & Mulvenna J. 2016. Tentacle transcriptome and venom protease of the Pacific Sea Nettle, *Chrysaora fuscescens* (Cnidaria: Scyphozoa). *Toxins* 8(4): 102.
- Rabelo EF, Soares MO & Matthews-Cascon H. 2013. Competitive interactions among zoanthids (Cnidaria: Zoanthidae) in an intertidal zone of northeastern Brazilian *Journal of Oceanography* 61: 35-42.
- Ramírez-Carreto S, Vera-Estrella R, Portillo-Bobadilla T, Licea-Navarro A, Bernaldez-Sarabia J, Rudiño-Piñera E, Verleyen, JJ, Rodríguez E & Rodríguez-Almazán C. 2019. Transcriptomic and Proteomic Analysis of the Tentacles and Mucus of *Anthopleura dowii* Verrill, 1869. *Marine Drugs*, 17(8), 1–23.
- Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV.1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Review.*;62(3):597-635.
- Retuerto F, Arbaiza E, Quiroz-Garrido Y, Estrada R & Zavala J. 2007. Actividad biológica del veneno de *Anthothoe chilensis* (Lesson, 1830) (Actiniaria: Sagartiidae). *Revista Peruana de Biología* 14(2): 277-282.
- Roach JC. 2002. Clade of trypsins found in cold-adapted fish. *Proteins: structure, function, and genetics*, 47: 31-44.
- Rodríguez-Casariego J, Perdomo-Morales, R & Perera E. 2012. *Revista de Investigaciones Marinas*, 32(1): 1-8.
- Rojas, A & Doolittle RF. 2002. The occurrence of type S1A serine proteases in sponge and jellyfish. *Journal of Molecular evolution*, 55(6):790-794.
- Sentíes-Gómez MD, Gálvez-Gastélum J, Meza-García E & Armendáriz-Borunda J. 2005. Fibrosis hepática. El papel de las metaloproteinasas y de TGF-B. *Gaceta Médica de México*. 141(4):315-322.
- Sigmaaldrich.com. 2021. PMSF Phenylmethylsulfonyl fluoride | Sigma-Aldrich. [online] Available at: <<https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/product/roche/pmsfro#>> [Accessed 28 August 2021].

- Silva JF, Gomes PB, Santana EC, Silva JM, Lima EP, Santos AM & Pérez CD. 2015. Growth of the tropical zoanthid *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria: Anthozoa) on reefs in northeastern Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*. 87(2): 985-96.
- Sinniger F, Montoya-Burgos JI, Chevaldonné P & Pawlowski J. 2005. Phylogeny of the order Zoantharia (Anthozoa, Hexacorallia) based on the mitochondrial ribosomal genes. *Marine Biology* 147: 1121-1128.
- Soares CLS, Pérez CD, Maia MBS, Silva RS, Melo & Melo LFA. 2006. Avaliação da atividade antiinflamatória e analgésica do extrato bruto hidroalcoólico do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860), *Revista Brasileira de Farmacognisia*, 16(4):463-468.
- Sorimachi H & Suzuki K. 2001. The structure of calpain. *Journal of Biochemistry* 129: 653-664.
- Stocker K, Fischer H, Meier J. 1982. Thrombin-like snake venom proteinases. *Toxicon*, 20(1):265-73.
- Tasoulis T, Isbister GK. 2017. A Review and Database of Snake Venom Proteomes. *Toxins (Basel)*, 18;9(9):290.
- Technau U. & Steele RE. 2011. Evolutionary crossroads in developmental biology: Cnidaria. *Development*, 138: 1447-1458.
- Tricone A. 2013. *Marine Enzymes for Biocatalysis*. Marine Enzymes for Biocatalysis. Woodhead Publishing Limited.
- Trivedi J, Ghosh P & Mitra D. 2020. N-p-Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK) inhibits HIV-1 by suppressing the activity of viral protease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 527: 167-172.
- Varela C, Guitart B, Ortiz M & Lalana R. 2002. Los zoantídeos (Cnidaria, Anthozoa, Zoantharia), de la región occidental de Cuba. *Revista de Investigaciones Marinas* 23(3): 179-184.
- Vega-Castro NA & Reyes-Montaña EA. 2020. Introducción al análisis estructural de proteínas y glicoproteínas. Universidad Nacional de Colombia 1a. Ed. 263 pp.

- Vera C, Kolbach M, Zegpi MS, Vera F, Lonza JP. 2004. Picaduras de medusas: actualización. *Revista Médica de Chile* 132: 233-241.
- Vivas-Ruiz D, Sandoval GA, Lazo F, Rodríguez E, Yarlequé A, Flores-Sánchez E. 2015. Caracterización de la enzima similar a trombina del veneno de *Bothrops pictus* “Jergón de costa”. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 32(4):652-8.
- Voet D & Voet J. 2006. *Bioquímica*. 3ª. Edición. Ed. Médica Panamericana, 1176 pp.
- Walsh K. (1970) Trypsinogens and trypsins of various species. *Methods in Enzymology* 19, 41-63.
- Wang C, Wang B, Wang B, Wang Q, Liu G, Wang T, He Q, & Zhang L. 2019. Unique Diversity of Sting-Related Toxins Based on Transcriptomic and Proteomic Analysis of the Jellyfish *Cyanea capillata* and *Nemopilema nomurai* (Cnidaria: Scyphozoa). *Journal of Proteome Research*, 18(1), 436–448.

Anexo 1

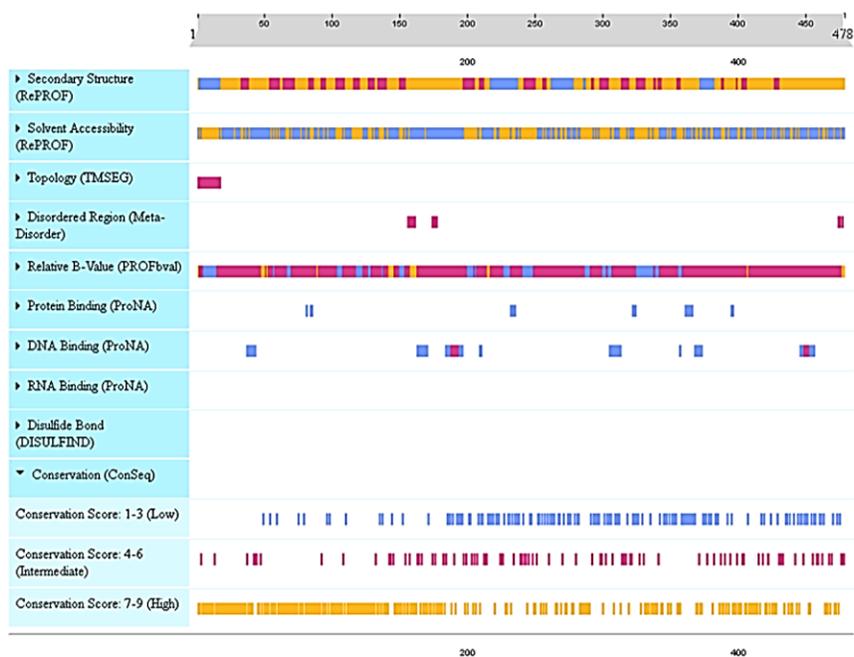


Figura 34. Identificación de sitios conservados en una metaloproteasa (Tipo II) del veneno de *Crotalus horridus*. Se muestran las características principales de la secuencia de la metaloproteasa (Tipo II) en entre las que se destacan los sitios conservados catalogados como bajos de 1-3 péptidos, intermedio de 4-6 péptidos y altos de 7-9 péptidos.

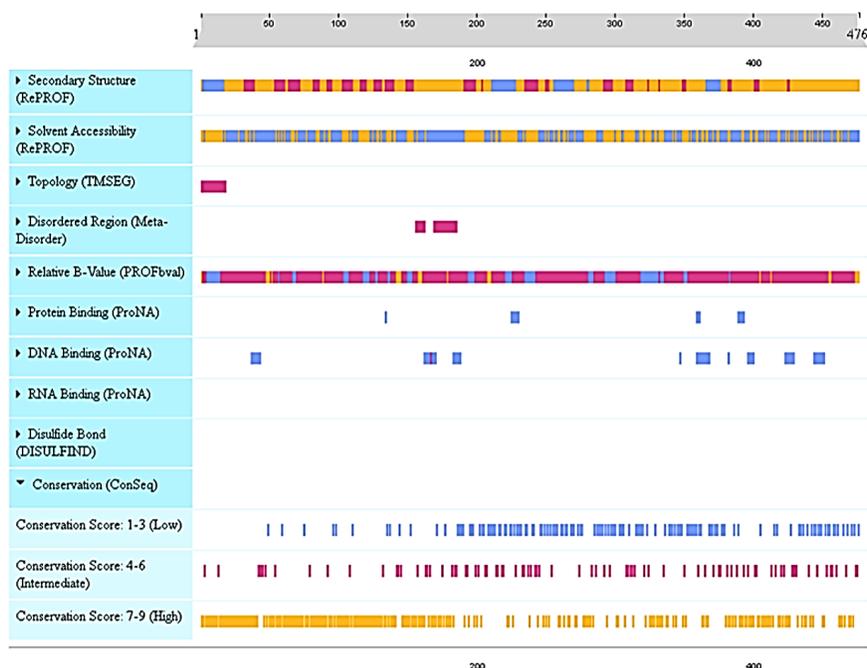


Figura 35. Identificación de sitios conservados en la metaloproteasa dependiente de Zinc/desintegrina del veneno de *Gloydius brevicaudus*. Se muestran las características principales de la secuencia de la metaloproteasa (Tipo II) en entre las que se destacan los sitios conservados catalogados como bajos de 1-3 péptidos, intermedio de 4-6 péptidos y altos de 7-9 péptidos.

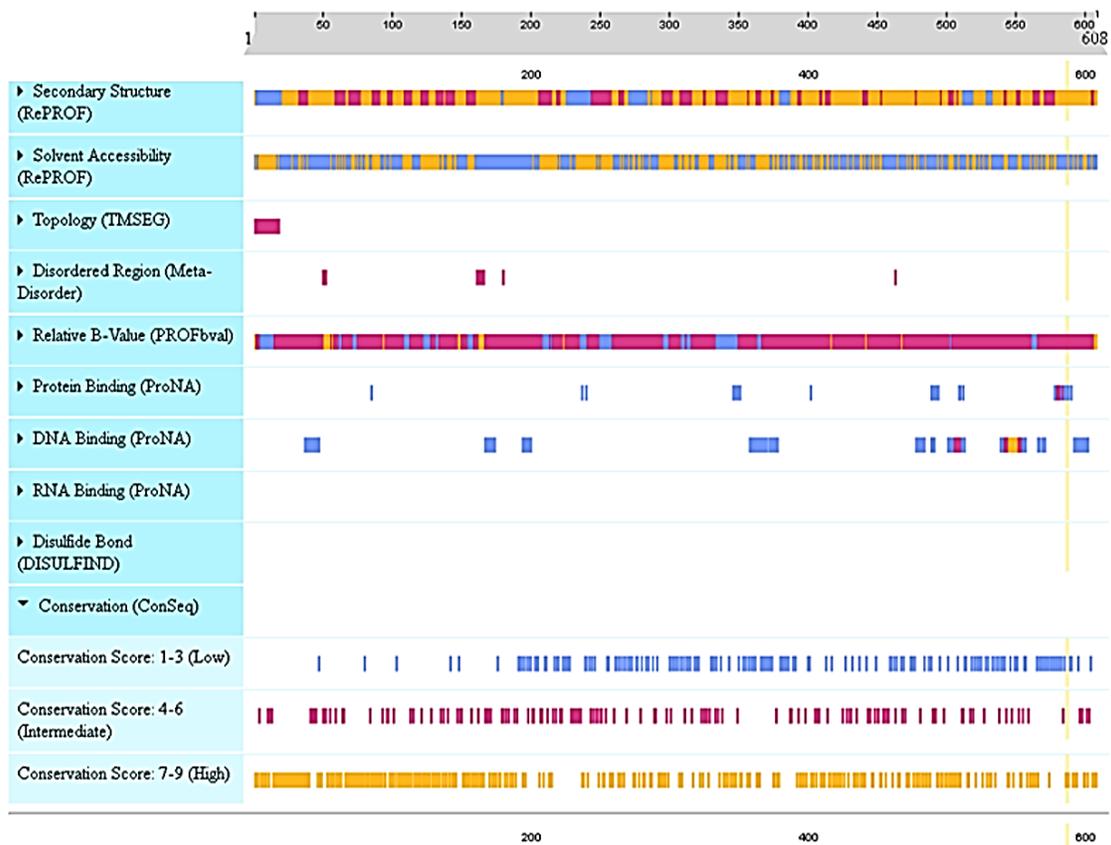


Figura 36. Identificación de sitios conservados en la metaloproteasa (Tipo III) del veneno de *Hyspigilena* sp. Se muestran las características principales de la secuencia de la metaloproteasa (Tipo III) entre las que se destacan los sitios conservados catalogados como bajos de 1-3 péptidos, intermedio de 4-6 péptidos y altos de 7-9 péptidos.