



Universidad del Mar
Campus Puerto Ángel

Fraccionamiento e identificación de la actividad proteolítica del veneno de
Palythoa caribaeorum (CNIDARIA: ANTHOZOA: ZOANTHARIA)

Tesis

Que para obtener el Título Profesional de
Licenciada en Biología Marina

Presenta

Martha Mayela Manzano Mora

Director

M. en C. Miguel Cuevas Cruz

Codirector

M. en C. Yolanda Huante González

Puerto Ángel, Oaxaca 2018

Resumen

Palythoa caribaeorum es una especie perteneciente al orden Zoantharia, su amplia distribución y alta densidad poblacional es probablemente el resultado de varios factores como la plasticidad de la colonia, tolerancia fisiológica y mecanismos antidepredantes. Es productor de la palitoxina, veneno que le permite catalogarse como un competidor territorial agresivo. Actualmente se sabe que la composición química del veneno de los cnidarios puede incluir péptidos, proteínas, enzimas e inhibidores de proteasas. Sin embargo, en organismos marinos incluyendo a los cnidarios, no se han aislado ni caracterizado proteasas presentes en el veneno. Por tanto, en este trabajo se propuso determinar la actividad proteolítica del veneno de *P. caribaeorum*. Las fracciones obtenidas, presentan de enzimas proteolíticas con una masa molecular aproximada de 72KDa. La identificación de proteasas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF no se pudo llevar a cabo debido a ue solo existen proteasas putativas en la base de datos de cnidarios

Palabras clave: Anémonas coloniales, cromatografía de exclusión molecular, enzimas, proteasas, veneno.

Abstract

Palythoa caribaeorum is a broadly distributed Zoanthid species due to factors such as the colony phenotypic plasticity, physiological tolerance and anti-depredatory mechanisms like toxin (palytoxin) production which accounts for its label as an aggressive territorial competitor. It is well known that Cnidarian poison is a complex mixture of molecules like peptides, proteins, enzymes and proteases inhibitors. However, very few proteases have been isolated from marine venoms (Cnidarians included). Therefore, the present work aims to determine the proteolytic activity from the venom of *P. caribaeorum*.

Proteolytic activity was evident in different fractions from *P. caribaeorum* venom (75kDa molecular mass). The protein identification trough matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) tandem mass spectrometry was not carried out due to the presence of only putative proteases in the Cnidarian database.

Keywords: Colonies anemones, molecular exclusion chromatography, enzymes, proteases, venom

Dedicatoria

A mis padres Martha y Alejandro, por ser el ejemplo perfecto de la dedicación y pasión. Por su apoyo incondicional, su amor y comprensión. Por ser mi fuente de inspiración y mi fuerza en cada momento, sin ustedes no estaría hoy aquí. Los amo.

Al mejor regalo que me dio la vida, mis hermanas Mire y Monse, por estar conmigo en todo momento, ustedes son mi ejemplo y fuerza para seguir adelante, las amo infinitamente.

A mi abuela Socorro por su amor incondicional, porque siempre creíste en mí y estuviste ansiosa por verme terminar la carrera. Estoy segura que desde arriba estás observando y cuidando cada paso que doy.

A mis primos Sandra, Ivón, Arturo, Marco, Kary y a mis tíos Salomón y Rosaura por siempre estar al pendiente de mí, por su cariño y confianza.

A mis mejores amigos Andsony y Rebeca, por nunca dejarme sola, por creer en mí, aconsejarme y no dejar que me rindiera en ningún momento. Mi vida es perfecta teniéndolos a ustedes conmigo.

A Carlos, Brandon, Héctor, Oscar, Roberto, Gio y Miry, por ser mis amigos y estar conmigo con el pasar de los años, por creer en mí y llenar de felicidad mi vida.

Al Dr. Rolando Bastida, a los M. en C. Esteban Leyte, Luz María Ballesteros, Darla Alejandra Torres Ariño y Yolanda Huante, por creer en mí, brindarme su amistad, confianza y siempre animarme a ser mejor cada día. Sus enseñanzas y las experiencias vividas con ustedes están muy grabadas en mi corazón.

Al Dr. Roberto Arreguín, por enseñarme en cada momento que lo que importa no es qué tan importante es uno profesionalmente, sino lo que uno está dispuesto a dar por el bien de los demás. Gracias por su apoyo, confianza y enseñanzas que día con día aprendí de usted. ¡Qué fortuna haber formado parte de su grupo!

A mis compañeros y amigos del laboratorio Fran, Ulises, Noel, Jorge, Mari y Esteban por las experiencias gratas que he vivido a su lado y por todo lo que he aprendido con ustedes. Mi cariño es suyo.

A Miguel Cuevas, por creer en mí, por tu apoyo y darme la oportunidad de formar parte de tu vida. Las experiencias que he vivido contigo me han enseñado a disfrutar más de la vida. ¡Qué afortunada soy de ser tu alumna y tu amiga!

A Alan G. Hernández Melgar por estar a mi lado, por no dudar ni un segundo en ayudarme y enseñarme todo lo que hasta ahora sé. Tú eres partícipe de este triunfo. Tenemos mucha vida para disfrutar. Te quiero ojitos bonitos.

A mis amigos de la universidad, Lucero, Danay, Jeni, Scarlett, Ibra, Marco, Itzahí, Julio, Ángeles, Moni, Bell, Isaac y Abraham por todos los momentos que juntos pasamos, la vida es una y a su lado disfruté cada instante. Todos los logros y tropiezos a su lado, me enseñaron a ser mejor persona, los quiero.

A la familia Olvera Salinas, por siempre preocuparse por mí, por su cariño y confianza.

A Francisco Olvera, por todo lo que aprendí y disfruté a tu lado, por siempre haber sido mi refugio, mi amigo, mi compañero de aventuras y desventuras. Porque contigo supe disfrutar cada instante. Por todo el amor que me brindaste. Gracias por nunca dejarme caer y por siempre creer en mí incluso cuando ni yo misma lo hacía. No hay palabra que describa todo el cariño que siento por ti. Por fin te puedo decir: ¡Lo hice!

Agradecimientos

Al Laboratorio de Biomacromoléculas 2 del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, que me proporcionó los medios necesarios para realizar este trabajo.

Al Dr. Roberto Alejandro Arreguín Espinosa de los Monteros, por aceptarme en este laboratorio y permitirme concluir este trabajo, así como su apoyo incondicional durante toda mi estancia.

Al Q.F.B. Alan Gerardo Hernández Melgar por ser mi guía y apoyo incondicional en la realización de esta tesis, por la confianza y el cariño brindado.

Al M. en C. Miguel Cuevas Cruz por ser mi guía en este trayecto, por su apoyo incondicional y por permitirme formar parte de su vida.

A la M. en C. Yolanda Huante González y a la M. en C. Darla Alejandra Torres Ariño por siempre estar al pendiente de mí, por su apoyo, dedicación a este trabajo y por la amistad brindada.

A la Q.B. Concepción Martínez Liévana y al Dr. Edson Edinho Robles Gómez por sus recomendaciones y correcciones acertadas para el escrito.

Al Dr. Sergio Agustín Román González por su ayuda en la identificación de las enzimas proteolíticas.

Al Dr. Ricardo González Muñoz quien lideró el muestreo de *P. caribaeorum* e identificó a los ejemplares empleados en esta tesis.

Al químico Rogerio Alejandro Saavedra Barrera y al M. en C. Gerardo Esteban Leyte Morales por la ayuda en el análisis estadístico.

Al Dr. Fernando Lazcano por proporcionar las muestras para realizar el proyecto.

Al biólogo Jorge Augusto Osorio Kuan, por la ayuda en la redacción del escrito.

A Amauri Castillejos Hernández por la realización del mapa de muestreo.

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	1
Índice de abreviaturas	3
1. Introducción	4
1.1 <i>Phylum Cnidaria</i>	4
1.2 Orden Zoantharia	6
1.3 <i>Palythoa caribaeorum</i> (Duchassaing & Michelotti, 1860).....	6
1.4 Clasificación taxonómica Y DIAGNÓSIS.....	7
1.5 Venenos aislados de organismos marinos.	7
1.6 Enzimas.	8
1.6.1 Proteasas.	9
1.7 Purificación de enzimas.	10
1.8 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC, por sus siglas en inglés).....	10
1.8.1 Exclusión molecular.	11
1.8.2 Intercambio iónico.....	12
1.9 Gel SDS-PAGE.....	13
1.10 Zimografía.....	13
2. ANTECEDENTES	14
3. justificación	15
4. Hipótesis	15
5. Objetivos.....	15
4.1 Objetivo general.....	15
4.2 Objetivos específicos.....	15
5. Materiales y métodos.....	16
5.1 Trabajo de campo (obtención del material biológico).	16
5.2 Área de estudio.....	16
5.3 Trabajo en el Laboratorio de Biomacromoléculas 2	17
5.3.1 Identificación taxonómica.....	17
5.3.2 Obtención del extracto crudo.	17
5.3.3 Fraccionamiento mediante cromatografía de exclusión molecular de baja presión. 18	
5.3.4 Separación por cromatografía de intercambio catiónico (HPLC).	18
5.4 Determinación de la masa molecular mediante la técnica de electroforesis SDS-PAGE. 18	
5.5 Determinación de actividad proteolítica en zimograma.	19
5.5.1 Ensayo de microplaca Caseína- azul de Coomassie para actividad de proteasas. 20	
5.8 Identificación de proteasas mediante espectrometría de masas (MALDI TOF/TOF).	22

6. Resultados.....	24
6.1 Fraccionamiento del veneno.....	24
6.2 Análisis electroforético.....	26
7. Discusiones	30
8. Conclusiones	32
9. Literatura citada	33
Anexo 1.....	41
Anexo2.....	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Protocolo para preparación de gel SDS PAGE15

Tabla 2. Protocolo para preparación de zimograma.....16

Tabla 3. Promedio para cada fracción correspondiente a la actividad enzimática utilizando el método reportado por Buroker-Kilgore & Wang (1993) con una incubación de 3 horas y su respectivo porcentaje de digestión del sustrato, tomando como 100% el porcentaje de digestión del sustrato con tripsina.....24

Tabla 4. Concentraciones de caseína con su respectiva absorbancia para la curva de calibración.....38

Tabla 5. Límite de detección para la curva de calibración.....39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Etapas de vida de los cnidarios.....	4
Figura 2. Etapas en la descarga de un cnidocisto mediante estímulo químico o mecánico (A); penetración del filamento del cnidocisto en otro organismo (B).....	6
Figura 3. Elución típica en exclusión molecular.....	12
Figura 4. Elución típica del gradiente en intercambio catiónico.....	13
Figura 5. Diagrama de flujo del procedimiento experimental, desde la colecta hasta la identificación de proteasas.....	16
Figura 6. Área de estudio. Sistema Arrecifal Veracruzano.....	17
Figura 7. Espectrometría de masas MALDI TOF del veneno de <i>P. caribaeorum</i> usando ácido sinapínico como matriz.....	24
Figura 8. Perfil cromatográfico de exclusión molecular del veneno de <i>Palythoa caribaeorum</i>	25
Figura 9. Perfil cromatográfico del intercambio catiónico de F1.....	25
Figura 10. Gel SDS-PAGE de las fracciones de <i>Palythoa caribaeorum</i>	26
Figura 11. Zimograma de las fracciones de <i>Palythoa caribaeorum</i>	26
Figura 12. Perfil cromatográfico de exclusión molecular de la fracción FC del veneno de <i>Palythoa caribaeorum</i>	27
Figura 13. Diferencias significativas entre las medias de cada una de las fracciones....	29
Figura 14. Diferencia de medias de las fracciones respecto al control positivo (tripsina).....	29
Figura 15. Concentraciones de la caseína con su respectiva absorbancia.....	43
Figura 16. Curva de calibración de la caseína.....	44
Figura 17. Curva de calibración de la caseína donde la ecuación de la recta fue $y=2.8414x + 0.7917$; $R^2= 0.8052$	45

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Tetradotoxina	TTX
Nicotinamida Adenina Dinucleótido	NADH
Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato	NADPH
Adenosín Trifosfato	ATP
Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular	IUBMB
Cromatografía Líquida de Alta Resolución	HPLC
Cloruro de Sodio	NaCl
Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico	SDS-PAGE
Dodecil sulfato sódico	SDS
N,N,N,N'tetrametilendiamina	TEMED
Proteínas esqueléticas de la matriz orgánica	SOMP's
Revoluciones por minuto	rpm
Fosfato disódico	Na ₂ HPO ₄
Bifosfato de sodio	NaH ₂ PO ₄
Ácido clorhídrico	HCl
Volts	V
Milimolar	mM
Molar	M
Ácido trifluoroacético	TFA
Acetonitrilo	ACN
Ionización mediante láser asistida por matriz	MALDI
Tiempo de vuelo	TOF
Análisis de la varianza	ANOVA