



Universidad del mar
Campus Puerto Ángel

EXTRACCIÓN, SEMIPURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA
DE UNA LECTINA DE LA ANÉMOMA DE MAR
Phymactis papillosa var. *rubra* (Cnidaria: Anthozoa) (Lesson, 1830)

Tesis

Que para obtener el Título Profesional de:

Licenciado en Biología Marina

Presenta

Francisco Humberto Olvera Lucio

Director

M. en C. Ulises Hernández Guzmán

Co-director

Dr. Francisco Benítez Villalobos

Puerto Ángel, Oaxaca, 2018

Agradecimientos

Al **M. en C. Ulises Hernández Guzmán (UNAM)**, por haberme brindado su tiempo, apoyo y confianza, así como sus brillantes consejos que construyeron el presente trabajo.

Al **Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros (UNAM)**, por sus recomendaciones y recursos otorgados para este proyecto, sin los cuales no hubiera sido posible su realización.

Al **Dr. Francisco Benítez Villalobos (UMAR)** por su atención, apoyo y flexibilidad en todo momento, que permitieron complementar el desarrollo de esta tesis.

A mi comité revisor, **M. en C. María del Rocío Gutiérrez Ortiz (UMAR)** y **M. en C. Germán Enrique Anaya (UMAR)**, por su tiempo e interés hacia el presente trabajo, cuyas observaciones, comentarios y recomendaciones lograron enriquecerlo.

A la **Dra. Ivonne Sandra Santiago Morales (UMAR)**, por haberme instruido en el ámbito de la extracción y purificación de proteínas, y por haber fomentado mi interés en las lectinas.

Al **Dr. Efrén García Maldonado (UNAM)**, por su confianza, consejos y conocimientos proporcionados sobre lectinas marinas, los cuales fueron pilares importantes en mi aprendizaje.

Al **M. en C. Miguel Cuevas (UNAM)** por haberme brindado su valiosa amistad, enseñanza y sugerencias para la elaboración de este proyecto.

A los estudiantes de la **UNAM María Vanegas, Abigail Ramírez, Leonardo Estrada y Francisco García**, por la donación de los diferentes grupos sanguíneos, así como por su colaboración durante la realización de este trabajo.

A mi familia.

Que sin duda alguna les debo el origen de mi amor por la naturaleza,
pasión por la ciencia y curiosidad
por lo desconocido.

El orgullo y agradecimiento no caben en su propia palabra
para expresar que es por ustedes
que esto es posible.

Su cariño siempre será mi fuente de inspiración,
la cual nunca me ha permitido terminar el día
sin haber aumentado mis sueños...

...porque en sueños es libre el hombre. Walt Whitman.

Índice general

Agradecimientos.....	i
Índice general	iii
Índice de tablas.....	vi
Índice de figuras.....	vii
Resumen.....	ix
Abstract.....	x
I Introducción	1
I.I Cnidarios	1
I.I.I Biología general.....	1
I.I.II Sustancias bioactivas	6
I.II <i>Phymactis papillosa</i> (Lesson, 1830)	9
I.II.I Características anatómicas (Häussermann 2004)	9
I.II.II Distribución	12
I.II.III Sustancias bioactivas	12
I.III Lectinas	13
I.III.I Características generales.....	13
I.III.II Lectinas en organismos marinos.....	13
I.IV Lectinas en cnidarios	17
I.IV.I Simbiosis y reconocimiento de patógenos.....	17
I.IV.II Desarrollo de nematocistos (morfogénesis)	19
I.V Importancia y aplicaciones	20
I.V.I Hemaglutinación.....	20
I.V.II Conservación de ecosistemas marinos	22
I.V.III Biología evolutiva.....	22
I.V.IV Biotecnología y biomedicina	24
II Antecedentes	25
III Justificación	28
IV Hipótesis	28

V	Objetivos	28
V.I	Objetivo general	28
V.II	Objetivos específicos	28
VI	Metodología	29
VI.I	Obtención y limpieza de muestras	29
VI.II	Identificación de ejemplares	30
VI.III	Extracción de proteínas solubles	30
VI.IV	Determinación de la concentración de proteínas	31
VI.V	Semipurificación y caracterización bioquímica	32
VI.V.I	Lavado y almacenamiento de eritrocitos	33
VI.V.II	Actividad hemaglutinante.....	33
VI.V.III	Efecto de iones divalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+})	35
VI.V.IV	Fraccionamiento del extracto crudo por FPLC.....	35
VI.V.V	Fraccionamiento del extracto crudo por HPLC	36
VI.VI	Identificación y estimación de la masa molecular de las proteínas contenidas en las fracciones con actividad hemaglutinante	36
VI.VI.I	Identificación de las proteínas contenidas en las fracciones con actividad hemaglutinante por MS-MALDI-TOF/TOF.....	37
VI.VI.II	Estimación de la masa molecular de las proteínas contenidas en las fracciones con actividad hemaglutinante	37
VII	Resultados y discusión	38
VII.I	Identificación de ejemplares	38
VII.II	Extracción de proteínas solubles	42
VII.III	Semipurificación y caracterización bioquímica	43
VII.III.I	Efecto de iones divalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+})	43
VII.III.II	Fraccionamiento del extracto crudo por FPLC.....	45
VII.III.III	Fraccionamiento del extracto crudo por HPLC	48

VII.IV	Identificación y estimación de la masa molecular de las proteínas contenidas en las fracciones con actividad hemaglutinante.....	52
VII.IV.I	Identificación de las proteínas contenidas en las fracciones con actividad hemaglutinante por MS-MALDI-TOF/TOF.....	52
VII.IV.II	Estimación de la masa molecular de las proteínas contenidas en las fracciones con actividad hemaglutinante	55
VII.V	Determinación de la afinidad de las proteínas contenidas en las fracciones con actividad hemaglutinante.....	57
VIII	Conclusiones	59
IX	Referencias.....	61
X	Anexos.....	76

Índice de tablas

Tabla 1. Sustancias bioactivas en cnidarios.....	8
Tabla 2. Lectinas presentes en organismos marinos.....	15
Tabla 3. Lectinas de cnidarios.....	25
Tabla 4. Estándares de ASB.....	32
Tabla 5. Amortiguadores evaluados.....	35
Tabla 6. Concentración de proteínas del extracto crudo.....	42
Tabla 7. Actividad hemaglutinante del extracto crudo.....	43
Tabla 8. Concentración de proteínas de las fracciones resueltas por FPLC.....	45
Tabla 9. Actividad hemaglutinante de las fracciones resueltas por FPLC.....	46
Tabla 10. Concentración de proteínas de las fracciones resueltas por HPLC.....	49
Tabla 11. Actividad hemaglutinante de las fracciones resueltas por HPLC.....	49
Tabla 12. Identificación de las proteínas contenidas en las fracciones 2 y 3-HPLC.....	52
Tabla 13. Inhibición de la actividad hemaglutinante de las fracciones 2- y 3-HPLC.....	57

Índice de figuras

Figura 1. Principales tipos de células de los cnidarios	1
Figura 2. Pólipo.....	2
Figura 3. Medusa	3
Figura 4. Tipos de nematocistos, espirocistos y pticocistos	4
Figura 5. Esquema filogenético del <i>phylum</i> Cnidaria.....	5
Figura 6. Micrografía electrónica de barrido del filamento de un estenotele descargado	6
Figura 7. Electroforesis bidimensional de proteínas membranales de células gastrodérmicas	7
Figura 8. Morfos	9
Figura 9. Características de la columna de <i>P. papillosa</i>	10
Figura 10. Vesículas de <i>P. papillosa</i> var. <i>rubra</i>	11
Figura 11. Distribución de <i>P. papillosa</i>	12
Figura 12. DRC de las familias de lectinas mejor caracterizadas.....	14
Figura 13. RRP's para la detección directa de los PMAMs.....	17
Figura 14. Nematogalectinas.	19
Figura 15. Actividad hemaglutinante.....	20
Figura 16. Antígenos ABH humanos.....	21
Figura 17. Bindina. Lectina tipo “F” de seis DRC	23
Figura 18. Evolución y desarrollo de nematocistos asociado al ensamblaje de lectinas	23
Figura 19. Organismos de trabajo.....	29
Figura 20. Cuantificación de proteínas por BCA.	31
Figura 21. Regresión lineal de los estándares de ASB	32
Figura 22. Lavado y almacenamiento de eritrocitos.....	33
Figura 23. Microtitulación de muestras y determinación de su actividad hemaglutinante.....	34
Figura 24. Ejemplares de <i>P. papillosa</i> var. <i>rubra</i>	39
Figura 25. Disco oral de <i>P. papillosa</i> var. <i>rubra</i>	40
Figura 26. Columna de <i>P. papillosa</i> var. <i>rubra</i>	40
Figura 27. Cnidoma de <i>P. papillosa</i> var. <i>rubra</i>	41

Figura 28. Actividad hemaglutinante de las proteínas solubles del extracto crudo.....	44
Figura 29. Concentración mínima requerida del extracto crudo	44
Figura 30. Cromatograma del extracto crudo. FPLC - SEC.....	45
Figura 31. Actividad de las fracciones resueltas por FPLC.....	47
Figura 32. Actividad hemaglutinante de las fracciones 1- y 2-FPLC.....	47
Figura 33. Cromatograma del extracto crudo. HPLC - SEC	48
Figura 34. Actividad de las fracciones resueltas por HPLC	49
Figura 35. Actividad hemaglutinante de la fracción 2-HPLC (goteo 90°)	50
Figura 36. Actividad hemaglutinante de la fracción 3-HPLC (goteo 90°)	50
Figura 37. Actividad hemaglutinante de las fracciones 5- y 7-HPLC (goteo 90°).....	51
Figura 38. Actividad hemaglutinante de la fracción 3-HPLC	51
Figura 39. Secuencias de lectinas de unión a L-Fucosa	54
Figura 40. SDS-PAGE en Tris-glicina al 1X.....	55
Figura 41. SDS-PAGE. Tinción en AgNO ₃	56

Resumen

El estudio de nuevas proteínas aisladas de cnidarios ha permitido entender sus principios biológicos, fisiológicos y evolutivos, además fomenta su importancia como un recurso sustancial en la investigación biotecnológica, biomédica y ecológica. En este trabajo se realizó la extracción de las proteínas solubles de la anémona de mar *Phymactis papillosa* var. *rubra*. Los extractos obtenidos fueron caracterizados bioquímicamente mediante pruebas de actividad hemaglutinante y la dependencia de la actividad a la presencia de Ca^{2+} y Mg^{2+} . Los extractos fueron fraccionados mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC) en dos sistemas cromatográficos (HPLC y FPLC). Se evaluó la actividad de las fracciones obtenidas y aquellas con actividad hemaglutinante fueron identificadas mediante técnicas de espectrometría de masas en tándem (MS-MALDI-TOF/TOF). Se estimó la masa molecular mediante electroforesis de una dimensión en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) en condiciones reductoras y no reductoras sugiriendo la presencia de dímeros y trímeros. En el presente trabajo se determinó que la presencia de hemaglutininas en extractos acuosos obtenidos de *P. papillosa* var. *rubra* es de tipo inespecífico sobre diferentes antígenos sanguíneos e independiente de la presencia los iones Ca^{2+} y Mg^{2+} . Aunque dos fracciones con actividad específica sobre el grupo sanguíneo B+ fueron obtenidas utilizando el sistema cromatográfico SEC en HPLC. El análisis de las secuencias obtenidas por espectrometría de masas mostró la presencia de proteínas en el extracto con una secuencia homóloga a un precursor de proteína Apa, rica en alanina y prolina (proteína de unión a fibronectina) de la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, asociada a procesos de migración, agregación y regeneración celular, respuestas inmunes y asociaciones microbianas acopladas al control de respuestas celulares en la mesoglea. Finalmente la actividad hemaglutinante fue inhibida por L-Fucosa y D-Manosa.

Palabras clave: Cnidarios, lectinas, *P. papillosa*, cromatografía SEC, hemaglutinación, L-Fucosa, FPLC, HPLC.

Abstract

The study of new proteins isolated from cnidarians has allowed us to understand its biological, physiological and evolutionary principles, further promotes its importance as a substantial resource in biotechnological, biomedical and ecological research. In this work the extraction of the soluble proteins from the sea anemone *Phymactis papillosa* var. *rubra* was carried out. The extracts obtained were characterized biochemically by tests of haemagglutinating activity and the dependence to the activity on the presence of Ca^{2+} and Mg^{2+} . The extracts were fractionated by molecular exclusion chromatography (SEC) in two chromatographic systems (HPLC and FPLC). The activity of the obtained fractions was evaluated and those with hemagglutinating activity were identified by tandem mass spectrometry techniques (MS-MALDI-TOF/TOF). The molecular mass was estimated by one-dimensional electrophoresis in polyacrylamide gel in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) under reducing and non-reducing conditions suggesting the presence of dimers and trimers. In the present work it was determined that the presence of hemagglutinins in aqueous extracts obtained from *P. papillosa* var. *rubra* is non-specific on different blood antigens and independent of the presence of Ca^{2+} and Mg^{2+} ions. Although two fractions with specific activity on blood group B+ were obtained using the SEC chromatographic system on HPLC. The analysis of the sequences obtained by mass spectrometry showed the presence of proteins in the extract with a homologous sequence to an Apa protein precursor, rich in alanine and proline (fibronectin binding protein) from the bacterium *Mycobacterium tuberculosis*, associated with processes of migration, aggregation and cellular regeneration, immune responses and microbial associations coupled to the control of cellular responses in the mesoglea. Finally the hemagglutinating activity was inhibited by L-Fucose and D-Mannose.

Key words: Cnidarians, lectins, *P. papillosa*, SEC chromatography, hemagglutination, L-Fucose, FPLC, HPLC.