



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE  
ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL PARA LA DETECCIÓN  
DE CITOLISINAS CON ACTIVIDAD DE PLA2 PRODUCIDAS  
POR EL “CORAL DE FUEGO” *Millepora alcicornis*.”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

**VÍCTOR HUGO HERNÁNDEZ ELIZÁRRAGA**

DIRIGIDA POR

**Dra. ALEJANDRA ROJAS MOLINA**

SANTIAGO DE QUERETARO, QUERETARO, 2015



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE  
ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL PARA LA DETECCIÓN  
DE CITOLISINAS CON ACTIVIDAD DE PLA2 PRODUCIDAS  
POR EL “CORAL DE FUEGO” *Millepora alcicornis*.”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

**VÍCTOR HUGO HERNÁNDEZ ELIZÁRRAGA**

DIRIGIDA POR

**Dra. ALEJANDRA ROJAS MOLINA**

SINODALES

Dra. Alejandra Rojas Molina

\_\_\_\_\_

DIRECTOR

Dr. César Ibarra Alvarado

\_\_\_\_\_

SINODAL

Dr. Alejandro García Arredondo

\_\_\_\_\_

SINODAL

Dra. Juana Isela Rojas Molina

\_\_\_\_\_

SINODAL

## RESUMEN

Las especies del género *Millepora* (clase Hydrozoa, Phylum Cnidaria) son hidrocorales abundantes en aguas tropicales del Caribe Mexicano y son los segundos organismos más importantes formadores de arrecifes. Estas especies son llamadas comúnmente corales de fuego, ya que el contacto con ellas causa lesiones similares a quemaduras. Además, el contacto con estos organismos puede causar falla renal aguda, síndrome nefrótico y edema pulmonar. Los agentes causales de estas condiciones son toxinas proteicas contenidas en los nematocistos (organelos exclusivos de los Cnidarios), los cuales están involucrados en la captura de presas y la defensa. Nuestro grupo de investigación ha demostrado que el extracto acuoso de *M. alcicornis* presenta actividad hemolítica, vasoconstrictora e induce letalidad en ratones a una dosis letal media (DL<sub>50</sub>) de 17 µg proteína/g de peso corporal. Se encontró también que dosis menores a la DL<sub>50</sub> producen daños histopatológicos en tejido pulmonar y renal asociados con la presencia de citolisinas, algunas de las cuales poseen actividad de fosfolipasa A2 (PLA2) y otras son posiblemente toxinas formadoras de poros. El presente trabajo de tesis tuvo por objetivo estandarizar y optimizar, mediante la técnica de electroforesis bidimensional, un método analítico para detectar las citolisinas con actividad de PLA2 presentes en el extracto acuoso de *Millepora alcicornis*. Mediante esta técnica se lograron establecer las condiciones experimentales que permiten una resolución electroforética adecuada para la detección y separación de las citolisinas de interés. Estas condiciones podrán ser utilizadas en futuros proyectos encaminados a purificar y elucidar la estructura química de PLA2 producidas por los hidrocorales del género *Millepora*.

## ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	Página
<b>ÍNDICE GENERAL</b>	i
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	iv
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	v
<b>RESUMEN</b>	
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. ANTECEDENTES</b>	3
2.1 Phylum Cnidaria	3
2.1.1 Forma de pólipo	3
2.1.2 Forma de medusa	4
2.1.3 Clasificación del Phylum Cnidaria	5
2.1.4 Cnidocito y cnidocisto	6
2.2 Toxinas de los Cnidarios	6
2.2.1 Citolisinas	6
2.2.1.1 Fosfolipasas A2 (PLA2)	7
2.2.1.2 Clasificación de las PLA2	8
2.2.1.3 Diversidad estructural y funcional de las PLA2	9
2.2.1.3.1 Fosfolipasas A2 citosólicas (cPLA2)	9
2.2.1.3.2 Fosfolipasas A2 calcio-independientes (iPLA2). Variedades citosólicas	10
2.2.1.3.3 Otras variedades calcio-independientes	11
2.2.1.3.4 Fosfolipasas A2 secretoras (sPLA2)	11
2.2.1.3.5 Fosfolipasas A2 PAF-AH (PLA2G7 y PLA2G8)	12
2.2.1.3.6 Rol de las PLA2 en la comunicación celular	12
2.2.1.3.7 Mecanismo directo de las Fosfolipasas A2 en la	

comunicación celular	12
2.2.1.3.8 Mecanismo indirecto. PLA2 como un mediador celular del tipo citoquina	13
2.2.1.4 PLA2 presentes en venenos	14
2.2.1.5 PLA2 en Cnidarios	15
2.2.1.6 Secuenciación de PLA2	16
2.3 Género <i>Millepora</i>	16
2.3.1 Corales de fuego	17
2.3.1.1 Estudios sobre <i>Millepora</i>	18
2.3.1.2 <i>Millepora alcicornis</i>	19
2.3.2 Simbioses del género <i>Symbiodinium</i>	21
2.3.2.1 Fenómeno de blanqueamiento	21
2.3.2.2 Mecanismos de producción del blanqueamiento	22
2.3.2.3 Efectos del blanqueamiento sobre la actividad enzimática de citolisinas	23
2.4 Electroforesis bidimensional	23
2.4.1 Isoelectroenfoque (IEF)	24
2.4.2 Electroforesis en gel SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)	24
2.4.3 Proteómica marina	27
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	29
<b>4. HIPÓTESIS</b>	30
<b>5. OBJETIVOS</b>	31
5.1 General	31
5.2 Específicos	31
<b>6. METODOLOGÍA</b>	32
6.1 Recolección de los especímenes de <i>Millepora alcicornis</i>	32
6.2 Preparación del extracto acuoso de <i>Millepora alcicornis</i>	32
6.3 Determinación de la actividad de PLA2 del extracto acuoso de <i>Millepora alcicornis</i>	32
6.4 Determinación del perfil electroforético del extracto acuoso de <i>Millepora alcicornis</i>	33

6.5 Detección de las proteínas con actividad de PLA2, mediante la técnica de zimografía	33
6.6 Estandarización y optimización de la técnica de electroforesis bidimensional para la detección de citolisinas con actividad de PLA2 presentes en el extracto acuoso de <i>Millepora alcicornis</i>	34
6.7 Determinación del peso molecular y el punto isoeléctrico de las PLA2 detectadas en el extracto acuoso de <i>Millepora alcicornis</i>	35
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>36</b>
7.1 Determinación de proteínas totales en el extracto acuoso de <i>M. alcicornis</i>	36
7.2 Determinación de la actividad de PLA2 del extracto acuoso de <i>M. alcicornis</i>	36
7.3 Determinación del perfil electroforético del extracto acuoso de <i>M. alcicornis</i>	37
7.4 Detección de las toxinas con actividad de PLA2, mediante la técnica de zimografía	39
7.5 Estandarización y optimización la técnica de electroforesis bidimensional para la detección de citolisinas con actividad de PLA2 presentes en el extracto acuoso de <i>M. alcicornis</i>	41
<b>8. CONCLUSIONES</b>	<b>51</b>
<b>9. REFERENCIAS</b>	<b>52</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		Página
1	Morfología de los Cnidarios	4
2	Cladograma del Phylum Cnidaria	5
3	Corte en la posición <i>sn2</i> por una PLA2	7
4	Clasificación de las PLA2	9
5	<i>Millepora alcicornis</i> , forma de cuerno de alce (izquierda)	
	<i>Millepora complanata</i> , forma de plato (derecha)	18
6	Clasificación taxonómica de <i>Millepora alcicornis</i>	21
7	Dispositivo de electroforesis en gel	26
8	Reacción de polimerización de la acrilamida y bis-acrilamida	27
9	Desnaturalización de las proteínas mediante dodecil sulfato de sodio.	28
10	Determinación de la actividad de PLA2	38
11	Perfil electroforetico del extracto acuoso de <i>M. alcicornis</i>	39
12	Zimograma para la detección de citolisinas con actividad de PLA2	41
13	Comportamiento del voltaje durante el IEF	43
14	Comportamiento de la corriente eléctrica durante el IEF	44
15	Gel de electroforesis bidimensional del extracto acuoso de <i>M. alcicornis</i>	47
16	Número de spots proteicos detectados en el extracto acuoso de <i>M. alcicornis</i>	49
17	Áreas de identificación de los spots	50

## ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO		Página
1	Efectos farmacológicos de las PLA2 presentes en el veneno de serpientes	15
2	Condiciones estandarizadas para el corrimiento del extracto acuoso de <i>Millepora alcicornis</i>	42
3	Condiciones estandarizadas para la electroforesis en segunda dimensión	45
4	Posibles citolisinas con actividad de PLA2 detectadas en el extracto acuoso de <i>Millepora alcicornis</i>	48

## 1. INTRODUCCIÓN

*Millepora alcicornis* es un Cnidario perteneciente a la clase Hydrozoa, que se encuentra ampliamente distribuido en el Caribe mexicano. Las 13 especies pertenecientes al género *Millepora* son conocidas como “corales de fuego” debido a que al contacto con la piel humana producen una serie de complicaciones dolorosas similares a las quemaduras (Rojas-Molina y col., 2012). Estas lesiones por lo general incluyen eritema, formación de ampollas y escozor, por efecto de toxinas contenidas en los nematocistos, organelos característicos que emplean los Cnidarios como mecanismos de defensa, sujeción y para la obtención de alimento mediante la captura de presas. Los estudios realizados sobre los organismos del género *Millepora* indican que las toxinas liberadas a partir de los nematocistos son capaces de producir efectos tóxicos locales y sistémicos en humanos, los cuales incluyen dolor severo, erupción, ampollas, síndrome nefrótico, daño renal agudo y edema pulmonar. Investigaciones realizadas sobre *M. alcicornis* por nuestro grupo de trabajo mostraron que el extracto acuoso de este hidrocoral presenta actividad hemolítica, vasoconstrictora e induce letalidad en ratones a una dosis letal media (DL<sub>50</sub>) de 17 µg protein/g de peso corporal. Se encontró también que dosis menores a la DL<sub>50</sub> producen daños histopatológicos en tejido pulmonar y renal asociados con la presencia de citolisinas, algunas de las cuales poseen actividad de fosfolipasa A2 (PLA2) y otras son posiblemente toxinas formadoras de poros. Por otra parte, investigaciones realizadas sobre *M. dichotoma* y *M. platyphyla* indican que los extractos acuosos preparados a partir de estos organismos muestran efectos letales en ratones y poseen actividad hemolítica, dermonecrótica y antigénica. En otra investigación que llevó a cabo nuestro grupo de trabajo se encontró que el extracto acuoso de *M. complanata* muestra actividad de PLA2 y contiene proteínas que inducen contracciones, dependientes de calcio, en el músculo liso del íleon de cobayo y de aorta de rata. Adicionalmente, se encontró evidencia que demostró que este hidrocoral produce neurotoxinas termoestables, muy probablemente metabolitos especializados que provocan letalidad en ratones (García-Arredondo y col., 2015). Existe relativamente poca información con respecto a las toxinas producidas por los

hidrocorales del género *Millepora* y gran parte del interés científico se ha centrado en los efectos tóxicos producidos por estos organismos. Desde el punto de vista ecológico, los hidrocorales contribuyen con la formación de la estructura de los arrecifes coralinos y proveen protección para muchas otras especies; en sus ramas, las colonias individuales de *Millepora* albergan algas simbiotas dinoflageladas del género *Symbiodinium*, las cuales les proporcionan nutrientes a sus hospederos. El fenómeno de blanqueamiento consiste en la expulsión de los simbiotas durante el estrés provocado por las altas temperaturas, el cual ha comprometido la población de los hidrocorales durante los últimos 30 años dejándolos susceptibles y desprotegidos (Fitt, 2012). Indudablemente estos organismos marinos constituyen una fuente invaluable de moléculas bioactivas que pudieran perderse, de tal manera que es muy importante continuar con su estudio a fin de generar información que pudiera contribuir a su preservación.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Phylum Cnidaria

Los Cnidarios (corales, anémonas de mar, medusas e hidroides) conforman un Phylum que contiene aproximadamente 9000 especies, que viven en ambientes acuáticos (predominantemente marinos). El rasgo característico del Phylum Cnidaria es la presencia de células conocidas como cnidocitos y orgánulos como los nematocistos, los cuales son utilizados para la depredación, adhesión y defensa. Los Cnidarios se encuentran clasificados filogenéticamente en dos grandes grupos: Anthozoa (anémonas de mar, corales y plumas de mar) que viven como pólipos sésiles; y Medusozoa (medusas, avispas marinas e hidras). Los Cnidarios en ambos grupos tienen simetría radial externa y asimetría interna y cuentan solo con una apertura que actúa como boca y ano, la cual se encuentra generalmente rodeada por un cojinete de nematocitos que forman los tentáculos (Technau y col., 2011). La morfología de los organismos de este Phylum incluye dos capas celulares, el ectodermo y el endodermo; también una matriz extracelular conocida como mesoglea que se encuentra presente entre las dos capas celulares. Estos organismos son comúnmente depredadores y ciertas especies también pueden recoger animales muertos u obtener alimento de forma intracelular mediante algas fotosintéticas unicelulares, con las que viven en simbiosis, llamadas zooxantelas (Frazao y col., 2012). Existen dos tipos de ciclos de vida que sirvieron como base para poder clasificar el Phylum Cnidaria. En el Subphylum Anthozoa el pólipo es la forma productora de gametos y el ciclo de vida se describe como embrión > larva > pólipo. En tanto que las especies del Subphylum Medusozoa, generalmente tienen un ciclo de vida descrito como embrión > larva > pólipo > medusa, en el cual la medusa es la típica forma sexual.

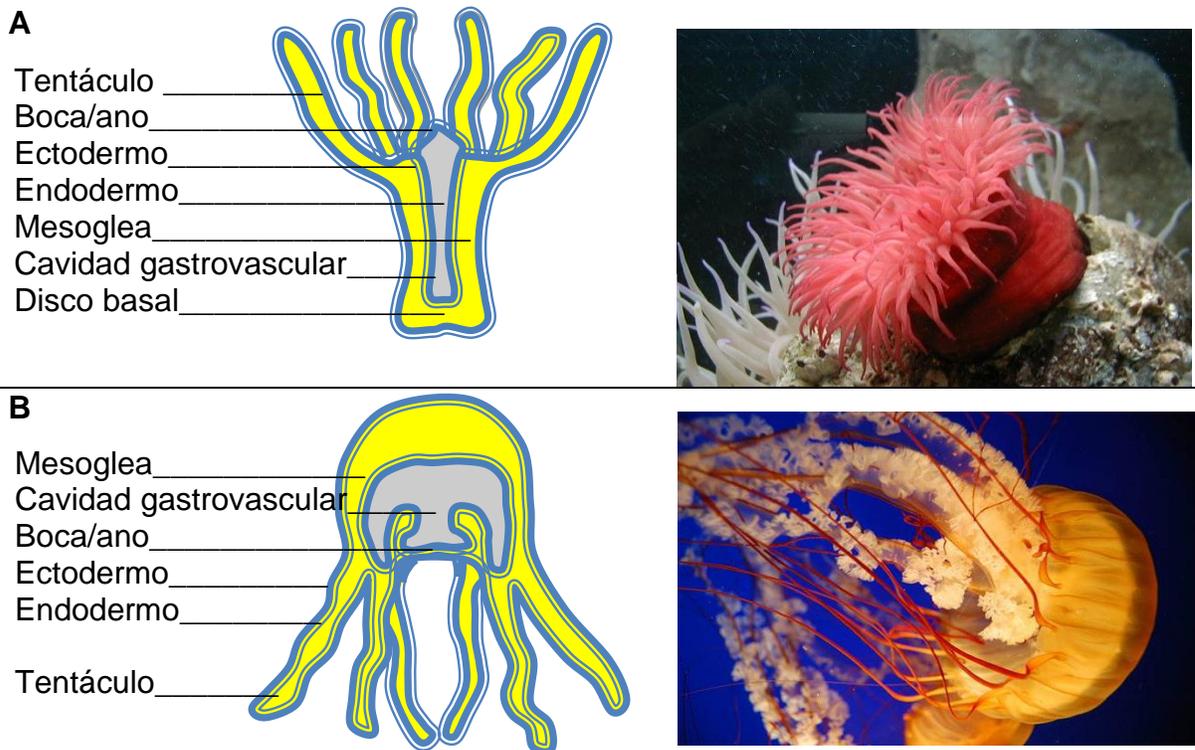
#### 2.1.1 Forma de pólipo

Los pólipos son mayoritariamente sésiles y pueden ser solitarios o coloniales. El cuerpo es cilíndrico y la boca rodeada de una o varias coronas de tentáculos,

comunica con la cavidad gastrovascular. La capa de mesoglea suele estar poco desarrollada (Figura 1A).

### 2.1.2 Forma de medusa

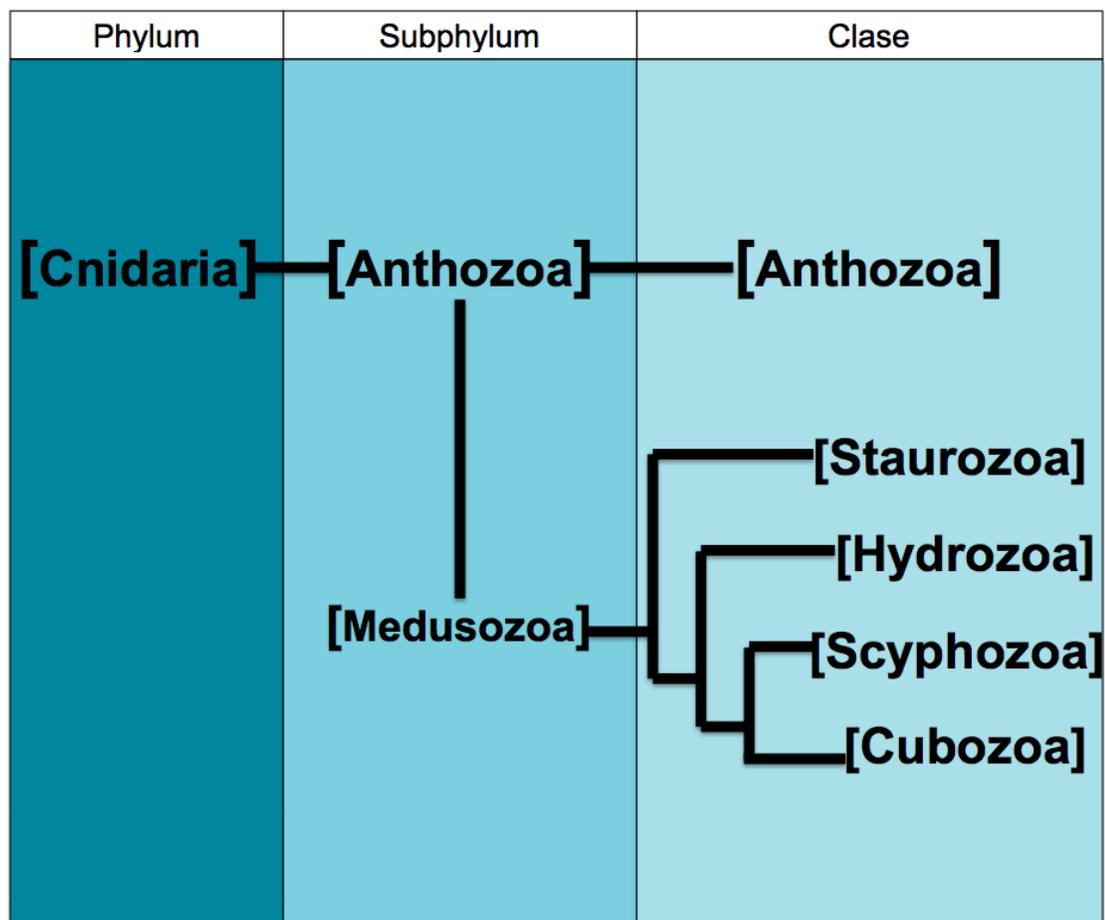
Las medusas son la forma nadadora y de dispersión. El cuerpo está formado por una estructura acampanada llamada umbrela. La cavidad gastrovascular comunica al exterior por la boca situada en el extremo del manubrio. La cavidad gástrica comunica los canales radiales con el canal anular situado en el borde umbrelar. De dicho borde cuelgan los tentáculos umbrelares y en algunas medusas una proyección contráctil llamada velo (Figura 1B).



**Figura 1.** Morfología de los Cnidarios. Tomado de wikipedia

### 2.1.3 Clasificación del Phylum Cnidaria

Los Cnidarios se encuentran clasificados en dos grupos principales (Cladas) Anthozoa y Medusozoa (Figura 2); a su vez cada uno de estos Subphylum cuenta con clases que difieren muy poco en sus características morfológicas. Actualmente, la clasificación del Phylum Cnidaria se encuentra en debate con el conocimiento del tipo de DNA de cada una de las especies. De manera sistemática se conoce una clasificación para el Phylum, pero por ejemplo de acuerdo a metodologías basadas en la secuenciación del DNA, Anthozoa, el grupo basal de los Cnidarios tiene DNA mitocondrial circular, mientras que Hydrozoa, Scyphozoa y Cubozoa tienen DNA lineal (Frazao y col., 2011).



**Figura 2.** Cladograma del Phylum Cnidaria (Modificado de Frazao y col., 2011)

#### 2.1.4 Cnidocito y cnidocisto

El tipo celular característico de los Cnidarios se conoce como cnidocito, el cual es una célula especializada urticante. Los cnidocitos se desarrollan en ambas capas celulares, y su función es variada: defensa, captura de presas, locomoción y fijación. Estas células son de tipo glandulares, sintetizan una cápsula (cnida) de la cual pueden existir tres tipos de cnidocistos: espirocistos, pticocistos y nematocistos. Los cnidocistos tienen una cápsula de naturaleza proteica con un filamento hueco muy enrollado en su interior. Al producirse un estímulo adecuado, el filamento se expulsa al exterior, descargando una sustancia que puede ser tóxica, urticante o pegajosa de acuerdo a la función y ubicación del cnidocisto. En algunos casos la cápsula posee un opérculo, y un cnidocilio, que es un filamento mecanoreceptor que al ser estimulado induce la descarga del cnidocisto. Los cnidocitos son muy abundantes en la región oral y en los tentáculos (Otsman, 2000).

#### 2.2 Toxinas de los Cnidarios

El Phylum Cnidaria se caracteriza por incluir a los organismos animales más venenosos. La composición del veneno de los Cnidarios no es conocida a detalle, pero se estima que está constituido de aproximadamente unos 250 compuestos de naturaleza proteica, de los cuales se tienen identificados péptidos, proteínas, enzimas e inhibidores de proteinasas; también compuestos de naturaleza no proteica como purinas, compuestos cuaternarios de amonio, aminas biogénicas y betaínas. Poco se sabe de los genes que codifican para las toxinas producidas por los Cnidarios y solamente se han descrito pocas estructuras proteicas tridimensionales (Frazao y col., 2012).

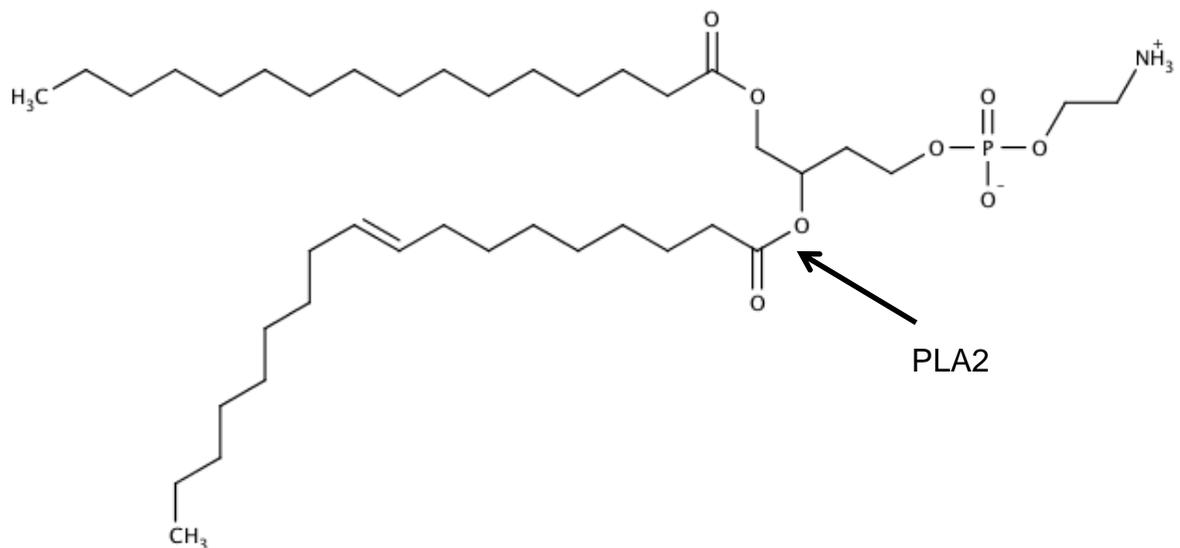
##### 2.2.1 Citolisinas

Los Cnidarios son fuentes ricas en proteínas y péptidos con actividad biológica, incluyendo neurotoxinas, enzimas y citolisinas. Dentro de las citolisinas se encuentran las Actinoporinas o citolisinas formadoras de poro, las cuales son de naturaleza proteica de aproximadamente 20 kDa que interactúan con la

esfingomiélin presente en membranas celulares (Bo y col., 2011); y las Fosfolipasas, enzimas que hidrolizan glicerofosfolípidos liberando lisofosfolípidos y ácidos grasos que participan en rutas metabólicas como la vía del ácido araquidónico (Timo y col., 2008).

#### 2.2.1.1 Fosfolipasas A2 (PLA2)

En los últimos 25 años se ha presentado un creciente interés en la superfamilia de las fosfolipasas A2 (PLA2). Las PLA2 hidrolizan el ácido graso de la posición *sn*-2 de la membrana de los fosfolípidos (Figura 3), los cuales frecuentemente contienen ácidos grasos insaturados, y cuando son liberados, pueden ser metabolizados como varios eicosanoides y participar como mediadores bioactivos de naturaleza lipídica.



**Figura 3.** Corte en la posición *sn*2 por una PLA2

Los lisofosfolípidos restantes pueden tener roles importantes en procesos biológicos (Burke y col., 2009). Las fosfolipasas de mamíferos juegan un rol importante en la fertilización, proliferación celular, contracción del músculo liso y enfermedades de hipersensibilidad e inflamación crónica. Las fosfolipasas también tienen importancia

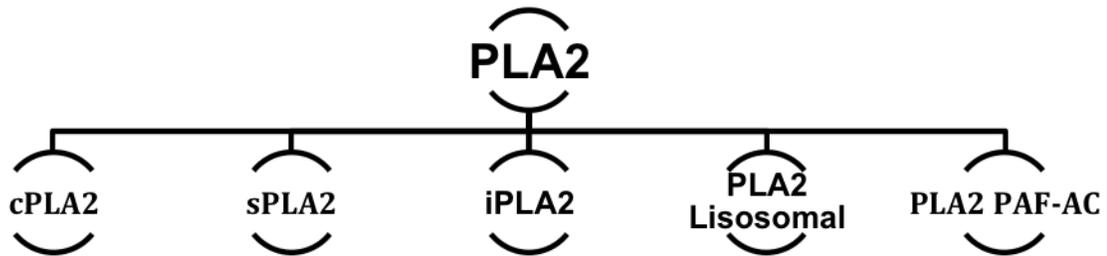
por estar involucradas en diversas funciones celulares, que incluyen vías de señalización para la biosíntesis de prostaglandinas y leucotrienos, además de la homeostasis de la membrana incluyendo, la mantención de reservas de fosfolípidos membranales y reparación de las membranas (Manjunatha y col., 2003).

#### 2.2.1.2 Clasificación de las PLA2

Las PLA2 son enzimas de tipo hidrolasa-lipasa, las cuales inducen cambios en la composición membranal, activan la cascada inflamatoria y generan vías de señalamiento celular. Son responsables de la movilización de ácidos grasos poli-insaturados liberados desde la posición *sn2* de los glicerofosfolípidos, los cuales incluyen al ácido araquidónico (García G y col., 2008)

La familia de las PLA2 pertenece a la superfamilia de las lipasas y a la megafamilia de las hidrolasas y para nombrarlas, se emplea la nomenclatura propuesta por la IUBMB (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*). Las PLA2 se han podido clasificar por su funcionalidad y localización celular y tisular en dos grandes tipos: citosólicas de alto peso molecular y secretorias de bajo peso molecular. Por su dependencia de calcio, en variedades: calcio-dependientes y calcio-independientes. Se utilizan números romanos para los dieciséis grupos, es decir del I al XVI, con diversos subgrupos nominados con letras mayúsculas, incluyendo a la totalidad de enzimas conocidas en acariotas (virus), procariotas (bacterias) y eucariotas (hongos, reptiles y mamíferos). La asignación a los distintos grupos depende de los mecanismos catalíticos de las enzimas, lo que ha determinado que la actividad hidrolasa puede ser por la presencia de cualquiera de los tres siguientes mecanismos consistentes en diadas aminoacídicas presentes en los centros catalíticos: a) *histidina, aspartato*; b) *serina, aspartato* y c) *serina, histidina, y aspartato*. Los 16 grupos a su vez se pueden clasificar en cinco tipos enzimáticos principales: 1) enzimas secretorias (sPLA2); 2) enzimas citosólicas (cPLA2); 3) enzimas calcio-independientes (iPLA2) que pueden ser citosólicas, secretorias o mixtas; 4) enzimas degradantes de los mediadores autocoides conocidos como factores activadores plaquetarios (PLA2-PAF-AH) y 5) enzimas

lisosomales calcio-independientes (L-PLA2), que también poseen actividades de 1-O-acil-ceramida-sintasa y transacilasa (Figura 4) (García y col., 2009).



**Figura 4.** Clasificación de las PLA2

### 2.2.1.3 Diversidad estructural y funcional de las PLA2

#### 2.2.1.3.1 PLA2 citosólicas (cPLA2)

Muchas enzimas también muestran actividad de lisofosfolipasa y transacilasa y, de manera preponderante, hidrolizan ácido araquidónico. Estas enzimas son de peso molecular variable entre 61 y 114 kiloDaltones (kDa) y su centro catalítico utiliza un residuo de serina. La fosforilación de la serina del centro catalítico aumenta la actividad enzimática. Ellas pertenecen al grupo IV y se distinguen seis subgrupos: IVA, IVB, IVC, IVD, IVE y IVF. Todas, excepto la tipo IVC, poseen un dominio C2, que les permite, en presencia de calcio, ser reclutadas en las membranas celulares, ya que en esta forma reconocen fosfolípidos. Las PLA2 tipo IVC son aciladas, por medio de farnesilación a la membrana plasmática, lo cual explica su fijación en las membranas. La presencia del dominio C2 no solo les permite ser reclutadas en presencia de calcio, sino que al unirse a los fosfolípidos son activadas (García y col., 2009).

La cPLA2 $\alpha$ , es decir la PLA2 tipo IVA es regulada por fosforilación en tres sitios claves: a) un residuo de serina (ser505), fosforilado por diversas serina/treonina-kinasas del tipo MAPKs (mitogen-activated protein kinase); b) un residuo de serina (ser505) fosforilada por CaMKII (calmodulina kinasa II); y c) un residuo de serina (ser727) fosforilado por MNK1 (mitogen-activated protein kinase-interacting serine/threonine kinase1) (Ghosh y col., 2006; Shimizu y col., 2006).

La actividad de la cPLA2 $\alpha$  es regulada también por la interacción directa con la proteína citoesquelética vimentina; por miembros de la familia proteica 2100 y por miembros de la familia proteica de las anexinas. La cPLA2 es también regulada en forma positiva por la proteína PLIP (PLA2-interacting protein), la cual es una proteína derivada del mismo gen codificante de TIP60/HTATIP (HIV-1 TAT- interacting protein, 60-KD). TIP60 es una enzima del tipo histona-desacetilasa, es decir, que está involucrada en la regulación de la expresión génica, y una variedad por corte y empalme alternativo de su ARNm (splicing) produce una proteína con actividad reguladora de la actividad de la cPLA2 $\alpha$  (Sheridan y col., 2001).

Aun no hay claridad sobre el papel de los mecanismos de transducción de señales conocidos como “sistemas de proteínas G triméricos”, si su activación que se ejercería es directa o indirecta. Los sistemas de proteínas G que poseen subunidades  $\alpha$  G0 o Gi (Gi1, Gi2 y Gi3) se acoplan al señalamiento dependiente de fosfolipasas tales como PLC, PLD y PLA2, mientras que las subunidades G12 o G13 se ligan a la activación de las proteínas G monoméricas de la familia Rho que comúnmente activan a las PLD. Este sistema activador posee un bucle en el cual las proteínas G monoméricas Rho activan de manera directa a las MAPK-ERK, las cuales pueden luego fosforilar y activar a las cPLA2 (García y col., 2009).

#### 2.2.1.3.2 PLA2 calcio-independientes (iPLA2). Variedades citosólicas

Las variedades citosólicas calcio-independientes pertenecen al grupo VI y se conocen dos miembros y por ende dos genes: la variedad PLA2G6A con cinco tipos distintos por corte y empalme alternativo (splicing) del ARNm y la variedad PLA2G6A con dos tipos distintos de GPVIB por el mismo mecanismo. Lo que caracteriza desde

el punto de vista bioquímico a este grupo es la presencia de un tipo muy particular de repeticiones proteicas. Estas secuencias están repetidas en un número variable de siete a ocho veces. Las repeticiones son responsables de la formación de oligómeros o de la asociación con otras proteínas que también contengan este tipo de repeticiones. Con respecto a las variantes por corte y empalme alternativo, hay evidencia de que son inhibidores competitivos enzimáticos por oligomerización. El ATP estabiliza la estructura de la PLA2G6A (Mosavi y col., 2004).

#### 2.2.1.3.3 Otras variedades calcio-independientes

Las PLA2-VIA son citosólicas y las PLA2-VIB y VIC son membranales. Las PLA2-VID, PLA2-VIE y PLA-VIF se han identificado como variedades enzimáticas involucradas en el metabolismo lipoproteico, dada su actividad como acil-glicerol-transacilasas y tri-acil-glicerol-lipasas. Las PLA2G6C poseen también actividad de lisofosfolipasas. Además, es probable que la PLA26D, también denominada adiponutrina y la PLA2G6E denominada desnutrina, poseen actividad hormonal. De ellas, la PLA2G6C muestra además una actividad esterasa detoxificante en el sistema nervioso (Akiba y col., 2004).

#### 2.2.1.3.4 PLA2 secretorias (sPLA2)

Estas PLA2 se encuentran en cnidarios, insectos, moluscos, reptiles, mamíferos, parvovirus, hongos y bacterias simbióticas y mamíferos. Las variedades secretorias (sPLA2) son proteínas de bajo peso molecular (14-18 kDa) y estructuralmente contienen de cinco a ocho puentes disulfuro. Su actividad enzimática depende de una diada histidina-aspartato en su centro catalítico y requieren de calcio en concentraciones micromolares. Las sPLA2 corresponden a los grupos IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X, y XII (XIIA y XIIB). Las PLA2 de los grupos sPLA2IIA y sPLA2V poseen una región carboxilo terminal con amino-ácidos básicos que les permiten interactuar con los glicosaminoglicanos (GAG) del tipo heparan-sulfato y heparina, presentes en proteinglicanos (PG), en especial PG membranales y en particular, los glipicanos (GPC), de los cuales se conocen seis en nuestra especie: GPC1, GPC2 (también denominado cerebroglucano), GPC3, GPC4 (también denominado glipicano

K), GPC5 y GPC6. La interacción con GPC desencadena cascadas de señalización intracelular desde la membrana plasmática (Frasson, 2003).

#### 2.2.1.3.5 PLA2 PAF-AH (PLA2G7 y PLA2G8)

Estas enzimas tienen un núcleo catalítico con una triada serina-histidina-aspartato. Hidrolizan ácidos grasos de cadenas corta y mediana a partir de di-acil-gliceroles, tri-acil-gliceroles y fosfolípidos, pero en particular, a la fosfatidilcolina. También poseen una actividad de hidrolasa tipo PLA1, aunque esta actividad depende del tipo de los ácidos grasos presentes en la posición sn2. Una enzima particular dentro de este grupo es la PLA2G7 secretoria inflamatoria mieloide, conocida clásicamente como la acetil-hidrolasa para los PAF, enzima que es producida en las células inflamatorias de origen mieloide y que se caracteriza por estar en estrecha asociación con lipoproteínas plasmáticas y lesiones de *novo*. La PLA2G7 forma parte de un mecanismo protector y proinflamatorio que se encarga de remover fosfolípidos oxidados (Arai, 2002).

#### 2.2.1.3.6 Rol de las PLA2 en la comunicación celular

Las PLA2 poseen dos mecanismos de acción: el directo, está relacionado con su actividad enzimática y el indirecto, consiste en su acción como mediador comunicador celular (García y col., 2009).

#### 2.2.1.3.7 Mecanismo directo de las PLA2 en la comunicación celular

Las PLA2 pueden liberar ácidos grasos insaturados (por lo regular el ácido araquidónico y en menor grado, el ácido linoleico) a partir de fosfolípidos de la membrana plasmática, para que éste sea tomado como sustrato para la biosíntesis de autocoides. La afinidad por sustratos varía entre las distintas PLA2, es así que las sPLA2 poseen preferencia catalítica por tres fosfolípidos: fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina y fosfatidilserina. Todas las membranas plasmáticas y las de los compartimientos subcelulares pueden ser blanco de las PLA2. Existen varias rutas para la biosíntesis de lípidos autocoides eicosanoides, como la de la ciclo-oxigenasa (que origina prostaglandinas y tromboxanos) (Cook, 2005); la ciclo-oxigenasa

acetilada por aspirina, que genera lípidos muy especiales, denominados protectinas y resolvinas; la de las lipo-oxigenasas que da lugar a leucotrienos; la ruta biosintética de los endocannabinoides (por ejemplo anandamida) (Smita y col 2007); las rutas que participan en la biosíntesis de los PAFs (factores activadores de las plaquetas); la de los citocromos (por ejemplo HETEs-ácidos hidroxi-eicosa-tetraenoicos y EETs-ácidos eicosa-tetraenoicos); la de los endovaniloides (por ejemplo araquidonil-dopamina) y también las rutas biosintéticas que se llevan a cabo por medio de mecanismos no enzimáticos, es decir, en ausencia de enzimas. En estas vías, los ácidos grasos se pueden ciclar mediante la oxidación dependiente de radicales libres, donde los productos finales, denominados isoprostanos, poseen actividades biológicas. Los ácidos grasos libres *per se*, pueden actuar por medio de receptores, como los del tipo serpiente, asociados con sistemas de proteínas G triméricas GPR (*Gprotein-cupled receptor*) como son GPR40 para ácidos grasos de cadena media, GPR41 para ácidos grasos de cadena corta y GPR120 para ácidos grasos de cadena larga. También poseen receptores nucleares como los miembros de la familia PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*) (Van-Dert y col., 2004).

#### 2.2.1.3.8 Mecanismo indirecto: PLA2 como un mediador de la comunicación celular del tipo citoquina

El término “mediador de la comunicación celular” se refiere a toda sustancia sintetizada por las células de un organismo o una organización multicelular con la finalidad de generar comunicación entre sus diversos componentes y de ese modo favorecer las respuestas orquestadas, frente a estímulos de índole endógeno o exógeno, todo ello con el objeto de mantener la homeostasis, situación que incluye fenómenos como la morfogénesis, la cicatrización y la regeneración. El término mediador de la comunicación celular equivale al de “primer mensajero o ligando”. Los mediadores de la comunicación celular son de naturaleza química variada. Desde hace tiempo se conocen los receptores denominados tipo “N” expresados en las membranas de las células cerebrales en los mamíferos y que median los efectos neurotóxicos de ciertas PLA2, aunque aún no han sido del todo aislados y clonados.

En los últimos años, se ha estudiado a fondo el papel del llamado receptor tipo “M”, pues miembros de las sPLA2 tienen actividad funcional como mediadores de la comunicación celular, actuando a través del receptor membranal específico denominado PLA2R1 (*phospholipase A2 receptor 1*), el cual es una proteína de 180 kDa, transmembranal del tipo 1, cuyo gen codificante se encuentra en el cromosoma 2. El PLA2R1 es miembro de la familia de las lectinas, proteínas que reconocen carbohidratos libres o en forma de glicolípidos o glicoproteínas. Este receptor pertenece al subgrupo VI de las lectinas (Burke y col., 2009).

#### 2.2.1.4 PLA2 presentes en venenos

Las PLA2 presentes en el veneno de las serpientes juegan un papel importante en la digestión de las presas, pero también presentan una amplia variedad de efectos farmacológicos por su intervención en procesos fisiológicos normales (Cuadro 1). Algunos de los efectos farmacológicos y tóxicos más potentes de los componentes activos de los venenos de serpientes son atribuidos a las PLA2 y a las mezclas proteicas complejas. Por ejemplo, se sabe que algunas neurotoxinas presinápticas del veneno de serpiente son PLA2, también las PLA2 que actúan como miotoxinas son más potentes y actúan más rápido que sus contrapartes no enzimáticas. La habilidad para inducir efectos farmacológicos con alta potencia indica la importancia de las PLA2 en la toxicidad del veneno de las serpientes (Manjunatha, 2003).

**Cuadro 1.** Efectos farmacológicos de las PLA2 presentes en el veneno de las serpientes. Modificado de Manjunatha, 2003

<b>Efectos farmacológicos de las PLA2</b>
Neurotoxicidad
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neurotoxicidad presináptica</li> <li>• Neurotoxicidad postsináptica</li> </ul>
Miotoxicidad
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mionecrosis local</li> </ul>

• Miotoxicidad sistémica
Cardiotoxicidad
Efectos anticoagulantes
Iniciación de la agregación plaquetaria
Inhibición de la agregación plaquetaria
Actividad hemolítica
Inducción de hemoglobinuria
Hemorragia interna
Actividad convulsiva
Actividad hipotensiva
Actividad inductora de edema
Daño de órganos o tejidos

#### 2.2.1.5 PLA2 presentes en Cnidarios

Las PLA2 han sido identificadas en invertebrados marinos como por ejemplo: corales duros, corales de fuego, estrellas de mar, pepinos de mar, esponjas marinas y en la mayoría de los tentáculos de Cnidarios (Martins y col., 2009). Por ejemplo, *Bunodosoma caissarum* es una anémona marina perteneciente al Phylum Cnidaria, la cual es encontrada en aguas de las costas de Brasil, se ha reportado que extractos alcohólicos de *B. caissarum* tienen efecto antimitótico y además el extracto del veneno de los nematocistos de ésta anémona posee actividad hemolítica en eritrocitos de diferentes especies de vertebrados; este efecto ha sido atribuido a una proteína de 20 kDa con actividad de PLA2 llamada caissarolisina I (Martins y col., 2009).

La actividad de las PLA2 ha sido medida en clases representativas de Cnidarios, y algunas sPLA2 de las anémonas marinas *Adamisia carciniopados* y *Urticina*

*crassicornis* han sido clonadas. Por otra parte, la secuencia del genoma de la anemona marina *Nematostella vectensis* fue publicada en el 2007 (Nevalainen, 2008). Adicionalmente, la presencia de una proteína de aproximadamente 30 kDa con actividad de PLA2 ha sido confirmada e identificada en *Millepora platyphylla* (Radwan y col., 2004). Nuestro grupo de trabajo, también identificó la presencia de PLA2 en los extractos acuosos de *M. complanata* y *M. alcicornis*, recolectadas en el Caribe Mexicano (García-Arredondo y col., 2015; Hernández-Matehuala y col., 2015).

#### 2.2.1.6 Secuenciación de PLA2s

Según lo reportado por Martins y col.. (2009), fue posible la secuenciación de PLA2s presentes en el extracto crudo de la anémona marina *B. caissarum*, empleando un análisis mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia en fase reversa RP-HPLC. En ese análisis se detectaron tres PLA2s (BcPLA2 I, BcPLA2 II y BcPLA2 III). La espectrometría de masas en la modalidad MALDI-TOF, para BcPLA2 I mostró un pico principal a 14.7 KDa. La secuencia de aminoácidos N-terminal de BcPLA2 I muestra una secuencia de aminoácidos idéntica a las PLA2 del Grupo III encontradas en especies de lagartos mexicanos, y también muestra similitud con las PLA2 de abeja *Apis mellifera*, adicionalmente BcPLA2 I mostró homología total a la PLA2 de abeja.

### 2.3 Género *Millepora*

Las especies del género *Millepora* son Cnidarios en forma de pólipos coloniales, pertenecientes a la clase Hydrozoa, los cuales producen esqueletos de carbonato de calcio. Hasta ahora, se conocen 13 especies pertenecientes al género *Millepora*, cuyas colonias se extienden por muchos metros formando un denso bosque de arrecifes coralinos en aguas superficiales de mares tropicales alrededor del mundo. De hecho, con excepción de los corales escleratinios (clase Anthozoa), las especies del género *Millepora* son los Cnidarios mas importantes formadores de arrecifes coralinos, y por lo tanto juegan un rol importante en la ecología marina (Rojas y col, 2011).

### 2.3.1 “Corales de fuego”

*Millepora* spp. (familia Milleporidae, clase Hydrozoa, Phylum Cnidaria) son hidrocorales abundantes en aguas superficiales tropicales y subtropicales (Figura 5). Estos organismos son llamados “corales de fuego” o corales urticantes, puesto que el contacto con ellos causa dolor severo y una serie de erupciones en la piel y ampollas (Sagi y col., 1987; Bianchini y col., 1988).

Existen reportes de que el contacto con las especies de *Millepora* puede causar falla renal aguda, síndrome nefrótico, y edema pulmonar. Los agentes causales de estas condiciones son toxinas de naturaleza proteica contenidas en los nematocistos, los cuales son organelos exclusivos de los Cnidarios, que están involucrados en la captura de presas y la defensa. Los nematocistos inyectan el veneno a través de agujas o aguijones en respuesta a estímulos mecánicos o químicos (Iguchi y col., 2008).



**Figura 5.** Izquierda) *Millepora alcicornis*, forma de cuerno de alce. Derecha) *Millepora complanata*, forma de plato. Modificado de Garcia-Arredondo, 2011

### 2.3.1.1 Estudios sobre *Millepora*

Existen algunos reportes relacionados con el aislamiento y la caracterización de componentes tóxicos de los extractos crudos de los corales de fuego. Por ejemplo, se ha reportado que los extractos crudos de *M. alcicornis* (Wittle y col., 1971) y *M. tenera* (Middlebrook y col., 1971) tienen propiedades hemolíticas y dermonecróticas con actividad letal en ratones. En el caso particular de *M. complanata*, nuestro grupo de trabajo encontró que el extracto acuoso preparado a partir de este hidrocoral contiene una proteína de 30 kDa con efecto hemolítico y actividad de PLA2 y dos proteínas de 15 y 17 kDa, respectivamente que inducen vasoconstricción en aorta aislada de rata (Ibarra Alvarado y col., 2007). También se detectó la presencia de proteínas con un rango de peso molecular de 17 a 44 kDa y péptidos pequeños de menos de 1.8 kDa que estimulan las contracciones del íleon aislado de cobayo, mediante un mecanismo que involucra la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de la células del músculo liso intestinal (Rojas y col., 2002). Adicionalmente, se encontró que el extracto acuoso de *M. complanata*, administrado por vía intravenosa, induce violentas convulsiones y la muerte en ratones en menos de un minuto, con una dosis letal media ( $\text{DL}_{50}$ ) de 4.62  $\mu\text{g}$  de proteína/g de peso. Se encontró también que dosis menores a la  $\text{DL}_{50}$  produjeron daños histopatológicos en tejido pulmonar y renal asociados con la presencia de citolisinas. El análisis cromatográfico del extracto acuoso de *M. complanata* permitió la purificación de una proteína de 61 kDa con efecto vasoconstrictor. Adicionalmente, se detectó la presencia de compuestos vasoconstrictores de naturaleza no proteica (García-Arredondo y col., 2015). Por otra parte, el extracto acuoso de *M. alcicornis* fue letal para los ratones con una  $\text{DL}_{50} = 17 \mu\text{g}$  proteína/g e indujo daños histopatológicos en riñones, hígado y pulmones. Se evidenció también que este extracto contiene dos tipos de hemolisinas, unas de éstas tienen pesos moleculares entre 28 y 30 kDa y poseen actividad de PLA2. En tanto que otras, de aproximadamente 200 kDa, no presentan actividad de PLA2 (Hernandez-Matehuala y col., 2015).

Finalmente, nuestro grupo de investigación comparó las actividades de PLA2, hemolítica y vasoconstrictora del extracto acuoso preparado a partir de

especímenes de *M complanata* normales con los efectos provocados por el extracto acuoso de hidrocorales que habían sido sometidos a un proceso de “blanqueamiento” experimental. Los resultados indicaron que el blanqueamiento disminuye pero no elimina las actividades de PLA2 y hemolítica. (García-Arredondo y col., 2011).

### 2.3.1.2 *Millepora alcicornis*

*M. alcicornis* es un hidrocoral que pertenece al orden Anthoathecata (Figura 6). Habita los arrecifes de coral en la zona tropical del océano Atlántico, en el mar Caribe y el golfo de México. Muestra una gran variedad de morfologías, dependiendo de su ubicación. Se alimenta de plancton y obtiene una parte de sus necesidades energéticas de algas simbiotas que se encuentran dentro de sus tejidos. Es un miembro importante de la comunidad arrecifal y está sujeto a las mismas amenazas que los demás corales (Obura y col., 2008).

*M. alcicornis* no es un coral verdadero de la clase Anthozoa, pues pertenece a la clase Hydrozoa, y está más estrechamente relacionado con las medusas que con los corales pétreos. La especie fue descrita por primera vez por Linnaeus en 1758. Su nombre científico proviene del latín para *Millepora* que significa miles de poros y *alcicornis* que significa cuernos de alce en referencia a su forma ramificada (Boschma, 1948).

La morfología de *M. alcicornis* es muy variada. La mayoría de las colonias probablemente comiencen como formas incrustantes y adoptan una estructura ramificada en la medida que crecen. Numerosos pólipos microscópicos están incrustados en el esqueleto calcáreo de *Millepora*. Se conectan internamente por medio de un sistema de canales que están ocultos detrás de los poros del esqueleto, cuya superficie es suave. Tienen tres tipos de pólipos con funciones especializadas: los gastrozoides procesan y digieren los alimentos capturados por los dactilozoides que se agrupan en torno a ellos. Los dactilozoides tienen tentáculos parecidos a los cabellos, cubiertos de cnidoblastos. Estos liberan cnidocitos cuando las presas se encuentran muy cerca, las picaduras de los

cnidocitos inmovilizan a la presa y los tentáculos las dirigen hacia la boca de un gastrozoide adyacente, donde pasa a la cavidad gastrovascular para la digestión. Y los pólipos gonozoides, que se encargan de la reproducción. Los pólipos también secretan carbonato, el material calcáreo que forma el esqueleto (Lewis y col., 1996).

## *Millepora alcicornis*

---

<b>Reino:</b>	Animalia
<b>Phylum:</b>	Cnidaria
<b>Clase:</b>	Hydrozoa
<b>Subclase:</b>	Hydroidolina
<b>Orden:</b>	Anthoathecata
<b>Suborden:</b>	Capitata
<b>Familia:</b>	Milleporidae
<b>Género:</b>	<i>Millepora</i>
<b>Especie:</b>	<i>alcicornis</i>



---

**Figura 6.** Clasificación taxonómica de *Millepora alcicornis*. Modificado de Marine Species Identification Portal

### 2.3.2 Simbiontes del género *Symbiodinium*

Los corales e hidrocorales viven en simbiosis con algas fotosintéticas del género *Symbiodinium*, conocidas comúnmente como zooxantelas, y esta simbiosis constituye la base del ecosistema de los arrecifes coralinos, proporcionando el complejo marco estructural que soporta la increíble biodiversidad de estos hábitats (Knowlton y col., 2010), el crecimiento del coral y la calcificación. La evolución de esta asociación les ha permitido a los corales e hidrocorales prosperar en ambientes marinos oligotróficos tropicales, donde el alimento y los nutrientes son generalmente escasos. Las algas, mediante la fotosíntesis, proporcionan a los cnidarios una fuente de energía metabólica. La fotosíntesis de los simbiontes, además promueve el proceso de calcificación, mediante el suministro de precursores de la matriz orgánica del esqueleto y por el almacenamiento de protones, producido durante la precipitación del esqueleto de carbonato de calcio de los corales (Moya y col., 2006). Las zooxantelas se alojan en la capa gastrodérmica de los cnidarios, en tanto que las células del ectodermo están involucradas en el intercambio de compuestos con el ambiente externo y la formación del esqueleto del coral. Los *Symbiodinium* son adquiridos por las células gastrodermales del cnidario, vía fagocitosis, favoreciéndose la formación de un compartimiento intracelular cerrado y delimitado por una membrana, conocido como “simbiosoma” (Roth y col., 1988). El hospedero proporciona la membrana que formará parte del simbiosoma, el cual sufre un proceso de maduración y a su vez, el alga desarrolla un complejo membranal a través del cual interactúa con el hospedero. Debido a su localización intracelular, las zooxantelas suministran carbono inorgánico disuelto y nutrientes para el crecimiento de los cnidarios, todo esto transportado a través de múltiples membranas que permiten el intercambio (Barott y col., 2014).

#### 2.3.2.1 Fenómeno de blanqueamiento

Desde el punto de vista ecológico, los hidrocorales contribuyen con la estructura de los arrecifes coralinos y proveen en sus ramas protección para otras especies. Las colonias individuales de *Millepora* son de crecimiento rápido, las puntas blancas en

sus ramas indican la presencia de pocas algas simbiotes, este fenómeno es conocido como “blanqueamiento” o expulsión de los simbiotes dinoflagelados durante el estrés que causa la elevación de la temperatura, lo cual ha comprometido las poblaciones de hidrocorales durante los últimos 30 años, dejándolos susceptibles. *M. alcicornis* y *M. complanata* fueron las primeras especies en exhibir blanqueamiento en la región del Caribe (Fitt., 20012).

#### 2.3.2.2 Mecanismos de producción del blanqueamiento

El fenómeno de blanqueamiento refiere la pérdida del color generado por la simbiosis entre las algas dinoflageladas del género *Symbiodinium* y los corales e hidrocorales marinos. El blanqueamiento, generalmente produce la disminución del crecimiento y el incremento de la mortalidad de los cnidarios, además puede ser considerado como una respuesta fisiológica deletérea o enfermedad. El fenómeno de blanqueamiento comprende tres elementos principales: los factores externos o detonadores, por ejemplo la elevada temperatura; los síntomas, que incluyen la eliminación de las células de las algas simbiotes y la pérdida del pigmento; y finalmente, el mecanismo que genera el blanqueamiento, que da como resultado la presentación de los síntomas. El grado de blanqueamiento observado en diferentes simbiosis y en respuesta a diferentes detonadores implica mecanismos que actualmente no son completamente conocidos (Douglas, 2003).

El blanqueamiento se debe a que los hábitats marinos costeros en particular están expuestos y parecen ser susceptibles a una amplia gama de alteraciones, incluyendo tormentas, precipitación y escorrentía terrestre, enfermedades, brotes de equinodermos depredadores (Wilson, et al., 2006), contaminación, estrés antropogénico, erosión, sedimentación, variación de la salinidad, infecciones bacterianas, exposición durante la marea baja, radiación solar (incluida la radiación ultravioleta) y la elevación de la temperatura de la superficie del mar debido al cambio climático global, que es el más importante factor entre todos (Ali 2009; Hume y col., 2013).

### 2.3.2.3 Efectos del blanqueamiento sobre la actividad enzimática de citolisinas

Experimentos preliminares llevados a cabo por nuestro grupo de trabajo, sugieren que la pérdida de algas fotosintéticas simbiotes provocada por un aumento en la temperatura del agua de su ambiente no afecta la síntesis de citolisinas con actividad de PLA2 en las especies de cnidarios *M. complanata* y *M. alcicornis* (Garcia-Arredondo y col., 2011). Estos resultados sugieren que posiblemente estas especies de cnidarios, que desde hace tiempo han sido expuestas a incrementos térmicos provocados por el calentamiento global de la tierra, han empezado a desarrollar mecanismos bioquímicos que les permiten adaptarse a las nuevas condiciones ambientales de su entorno (Olguin, 2014). Sin embargo, este hecho tiene que confirmarse y comprobarse con más investigación al respecto.

## 2.4 Electroforesis bidimensional

La electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida (2DE) es una técnica clásica empleada para la separación de proteínas. Fue en la década de 1970 cuando ésta tuvo su aparición, pero por mucho tiempo estuvo limitada en cuanto a sus aplicaciones (Fountoulakis y col., 2000). La 2DE ha sido generalmente una herramienta indispensable en todos los laboratorios para el análisis de macromoléculas como las proteínas, polipéptidos y fragmentos de ácidos nucleicos (Westermeyer, 20014). Recientemente, la electroforesis bidimensional ha sido mejorada con la implementación de gradientes inmovilizados de pH y el desarrollo de métodos analíticos capaces de identificar proteínas presentes en cantidades verdaderamente bajas. La 2DE representa el núcleo metodológico de las nuevas tecnologías empleadas en proteómica. El objetivo de la proteómica es el análisis de alta eficiencia del proteoma de organismos completos o tejidos. Para incrementar la resolución es necesario acoplar dos separaciones independientes (Rabilloud y col., 2010). Este análisis consiste en dos pasos: 1) la separación de mezclas proteicas por 2DE y 2) la identificación de las proteínas separadas por técnicas analíticas, como por ejemplo espectrometría de masas y análisis de la composición de aminoácidos. El proceso es facilitado además, por el uso de software altamente

sofisticado y por el análisis de imágenes. La 2DE por si misma involucra la separación de proteínas con base en diferencias en: a) su carga neta y b) su masa molecular (Fountoulakis y col., 2000). Los diferentes criterios de separación del enfoque isoelectrico y la SDS-PAGE se conjuntan en la electroforesis bidimensional (Stryer, 2013).

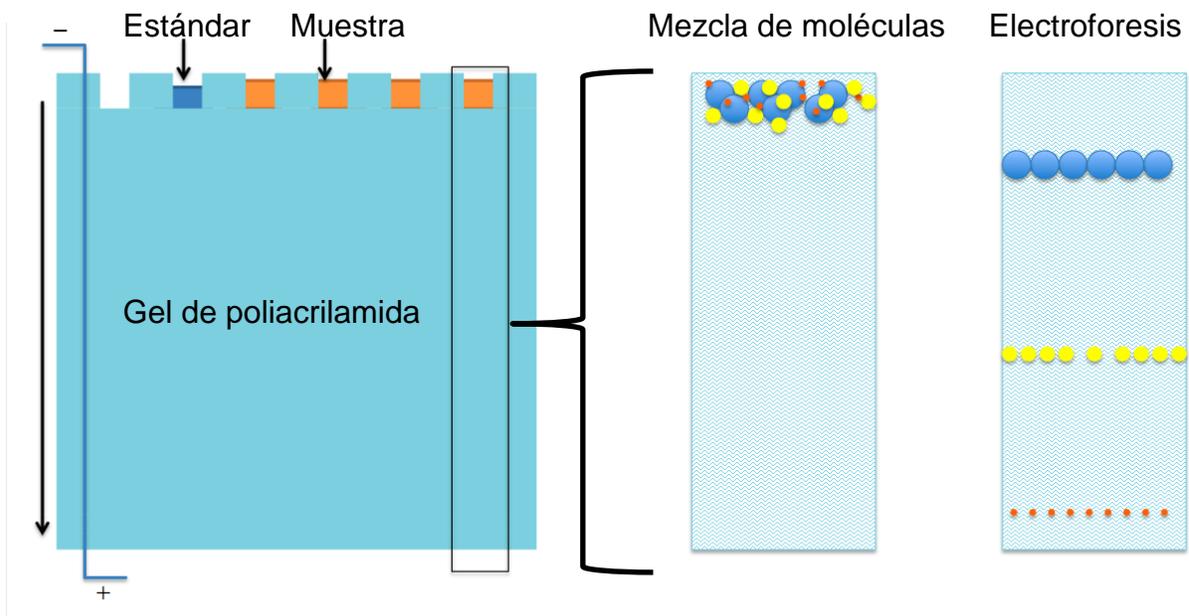
#### 2.4.1 Isoelectroenfoque (IEF)

Las proteínas pueden separarse electroforéticamente en base a sus contenidos relativos de aminoácidos ácidos o básicos. El punto isoelectrico (PI) de una proteína se define como el pH en el que su carga neta es cero (Stryer, 2013); las cargas ácidas y básicas de las cadenas laterales de las proteínas están en equilibrio y la proteína ya no se desplaza en un campo eléctrico (Muller-Esterl, 2004). En este pH, su movilidad electroforética es prácticamente cero. Este método de separación de proteínas con base en las diferencias en sus puntos isoelectricos se conoce como “isoelectroenfoque”. El gradiente de pH se consigue sometiendo a electroforesis previa una mezcla de poli-anfolitos con diferentes valores de PI. El Isoelectroenfoque permite distinguir proteínas que difieren en su PI por tan solo 0.01, lo que significa que puede separar proteínas que difieran en una sola carga neta (Stryer, 2013).

#### 2.4.2 Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las moléculas con carga eléctrica se mueven por efecto de un campo eléctrico; este fenómeno es conocido como electroforesis, el cual proporciona un procedimiento potente para la separación de proteínas y otras macromoléculas como DNA y RNA.

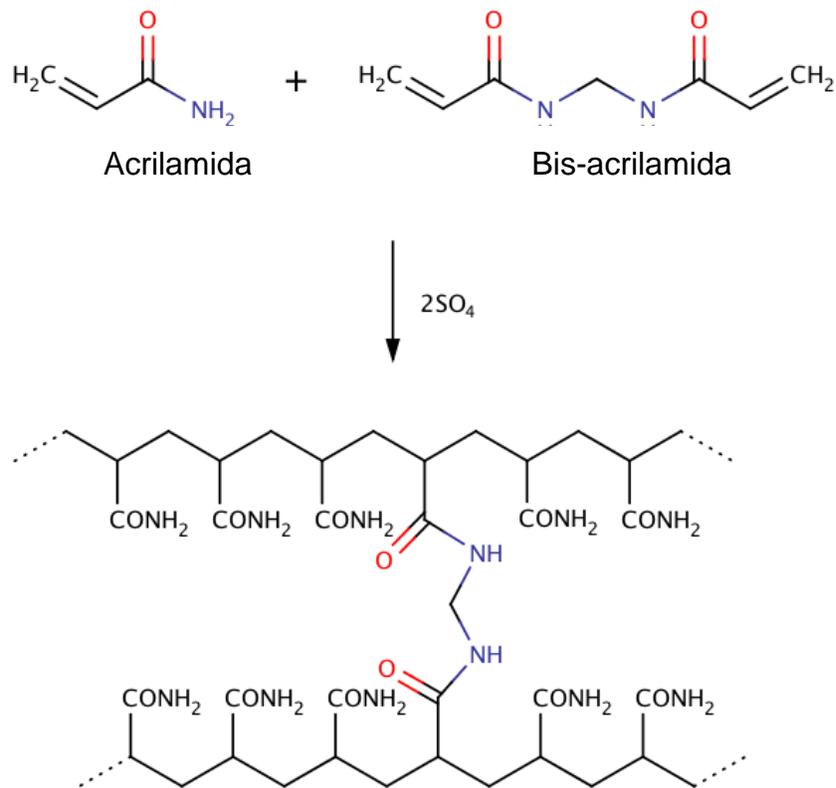
La separación electroforética (Figura 7) se realiza sobre geles porosos que sirven como un tamiz molecular que potencia la separación. Las moléculas más pequeñas que los poros del gel se desplazan fácilmente a través de él, mientras que las moléculas mayores que los poros permanecen casi inmóviles. Las moléculas de tamaño intermedio se desplazan a través del gel con diversos grados de dificultad. El campo eléctrico se aplica de modo que las proteínas migren del electrodo negativo al positivo, normalmente de arriba abajo (Haalem, 2008).



**Figura7.** Dispositivo de electroforesis en gel, normalmente se separan varias muestras por electroforesis. Modificado de Stryer, 2013

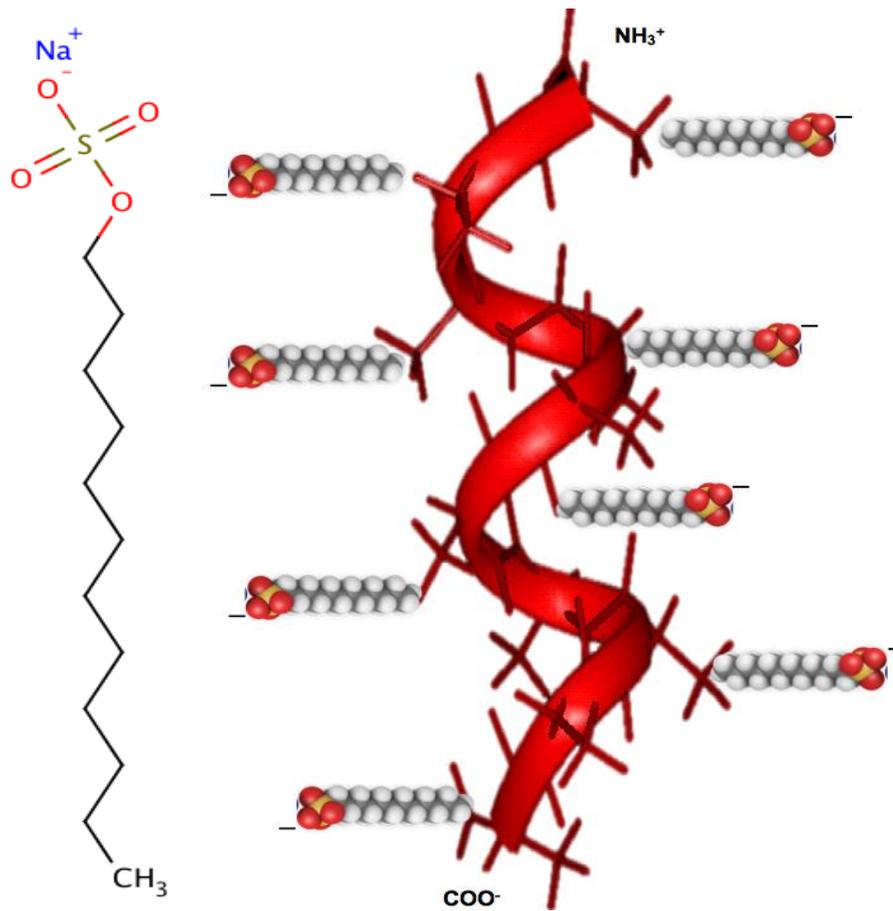
La electroforesis se lleva a cabo en un bloque delgado, vertical de “poliacrilamida”, éste se forma con la polimerización de acrilamida (Figura 8) con una pequeña cantidad de agente entrecruzador metilenbisacrilamida en una reacción iniciada con N,N,N',N'-1,2-diamina tetrametil-etano y persulfato de amonio (Gelfi y col., 1999; Bradley y col., 1989).

La mezcla de proteínas se disuelve primero en un medio con dodecilsulfato de sodio (SDS), un detergente aniónico que rompe casi todas las interacciones no covalentes en las proteínas nativas. También se añade  $\beta$ -mercaptoetanol para reducir los puentes disulfuro. Los aniones de SDS se unen a la cadena principal de la proteína a razón de un anión SDS por cada dos residuos de aminoácido (Tasheba, 1992).



**Figura 8.** Reacción de polimerización de la acrilamida y bis-acrilamida. Modificado de Gelfi y col., 1999.

Este complejo de SDS con una proteína desnaturalizada tiene una gran carga negativa, normalmente mucho mayor que la carga de la proteína nativa; la contribución de la proteína a la carga total del complejo SDS-proteína se vuelve de esta forma insignificante (Figura 9). Como resultado, este complejo del SDS con la proteína desnaturalizada tiene una carga negativa neta que es aproximadamente proporcional a la masa de la proteína. Los complejos SDS-proteína se someten entonces a electroforesis. Después de la electroforesis, las proteínas se pueden visualizar en el gel tiñéndolas con plata o con un colorante como el azul de Coomassie, que revelan una serie de bandas (Zehr y col., 1989).



**Figura 9.** Desnaturalización de las proteínas mediante dodecil sulfato de sodio. Por medio de la ordenación de las moléculas de SDS alrededor de la cadena polipeptídica se forma un complejo SDS-proteína con fuerte carga negativa.

### 2.4.3 Proteómica marina

La aplicación de la proteómica a las ciencias marinas ha incrementado en los últimos años puesto que el proteoma representa la interface entre el genotipo y la variabilidad del fenotipo. De tal manera que, las técnicas proteómicas constituyen una excelente herramienta para detectar y analizar biomarcadores adecuados para estudiar respuestas ecofisiológicas y adaptaciones en los organismos. Adicionalmente, estas técnicas posibilitan la obtención de información importante

con respecto a las rutas biosintéticas y los posibles de mecanismos de acción de un nuevo producto natural marino (Slattery y col., 2012).

La abundancia y diversidad de productos naturales marinos con actividad biológica constituye una oportunidad para el descubrimiento de nuevos fármacos. Considerando que la biodiversidad marina es mucho mayor que la que se puede encontrar en organismos terrestres; existen expectativas de que el descubrimiento de nuevos productos naturales de origen marino aumentará en los años que están por venir, con lo cual se prevé un aumento en el desarrollo de nuevos fármacos de origen marino que posibiliten alternativas nuevas y mejores para el tratamiento de las enfermedades (Slattery y col., 2012). En este contexto, es evidente que las herramientas proteómicas, entre las que se encuentran la electroforesis bidimensional y la espectrometría de masas, representan una estrategia analítica robusta para la investigación fenotípica de organismos marinos de interés. Esas herramientas permiten conocer información acerca de los patrones de expresión, modificaciones post-traduccionales o mecanismos de interacción proteica. Esta información es extremadamente útil para la optimización de procesos biotecnológicos. Actualmente, las técnicas de proteómica de alto rendimiento han sido recientemente acopladas a nuevas herramientas bioinformáticas, con lo que se cuenta con estrategias más poderosas para la identificación y caracterización de péptidos y proteínas, algunos de los cuales pueden representar prototipos estructurales para el desarrollo de fármacos o de herramientas de investigación (Piñeiro y col., 2003).

### 3. JUSTIFICACION

Los hidrocorales del género *Millepora* (Phylum Cnidaria; clase Hydrozoa) son considerados como los segundos organismos principales implicados en la formación de arrecifes coralinos alrededor del mundo. Al igual que muchos organismos marinos, el “coral de fuego” *Millepora alcicornis* constituye una fuente potencial valiosa de nuevos compuestos bioactivos. Estudios realizados previamente por nuestro grupo de investigación han demostrado que *M. alcicornis* produce dos tipos de citolisinas proteicas, unas con actividad de PLA2 y otras que son capaces de formar poros en las membranas celulares. Sin embargo, a la fecha se desconoce la estructura química de dichas citolisinas. Adicionalmente, durante los últimos años *M. alcicornis*, al igual que muchos Cnidarios formadores de arrecifes, se ha visto afectada por episodios de “blanqueamiento” que implican el deterioro y susceptibilidad de los arrecifes coralinos. En este contexto resulta muy importante abordar el estudio de las toxinas producidas por *M. alcicornis*, mediante el empleo de disciplinas como la proteómica, no solamente porque este organismo constituye una fuente invaluable de moléculas bioactivas que pudieran perderse, sino también para generar información que pudiera contribuir a su preservación. Específicamente, la presente tesis tiene como objetivo principal estandarizar la técnica de electroforesis bidimensional para la detección de citolisinas con actividad de PLA2 producidas por *M. alcicornis*. Esta técnica estandarizada permitirá generar información inédita acerca de la identidad de las toxinas producidas por las especies del género *Millepora*, ya que a la fecha se desconoce en gran medida su estructura química y se tiene poca información acerca de sus mecanismos de acción.

#### **4. HIPÓTESIS**

Es posible detectar, mediante las técnicas de zimografía y electroforesis bidimensional, citolisinas con actividad de PLA2 producidas por el “coral de fuego” *M. alcornis*

## 5. OBJETIVOS

### a. General

Estandarizar y optimizar la técnica de electroforesis bidimensional para la detección de citolisinas con actividad de PLA2 producidas por el “coral de fuego” *M. alcicornis*

### b. Específicos

- Obtener los especímenes del hidrocoral *M. alcicornis*
- Obtener el extracto acuoso del hidrocoral *M. alcicornis*
- Determinar la actividad de PLA2 del extracto acuoso de *M. alcicornis*
- Determinar el perfil electroforético del extracto acuoso de *M. alcicornis*
- Detectar, mediante la técnica de zimografía, las proteínas con actividad de PLA2 presentes en el extracto acuoso de *M. alcicornis*
- Estandarizar y optimizar de la técnica de electroforesis bidimensional para la detección de PLA2s
- Determinar el IP y el PM de las PLA2s presentes en el extracto acuoso de *M. alcicornis*

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Recolección de los especímenes de *M. alcicornis*

Se recolectaron fragmentos del hidrocoral *M. alcicornis* por medio de inmersiones de buceo de entre 4 y 10 metros de profundidad en arrecifes coralinos situados en el Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos en Quintana Roo México. El trabajo de recolección se llevó a cabo en octubre del 2013 por técnicos especializados de la Estación Puerto Morelos del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Después de la recolección, el material se congeló y transportó al laboratorio de Investigación Química y Farmacológica de Productos Naturales de nuestro grupo de investigación en la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro.

### 6.2 Preparación del extracto acuoso de *M. alcicornis*

Para la descarga de las toxinas provenientes de los nematocistos, los fragmentos del hidrocoral fueron sometidos a agitación en agua desionizada (pH 7) durante 18 horas a 4 °C. El sobrenadante que contenía las toxinas de interés, se liofilizó y se almacenó a -20 °C. El polvo liofilizado se utilizó para los estudios posteriores resuspendiéndose en agua destilada y centrifugándose a 2400 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente y se determinó la concentración de proteínas totales por el método de Bradford (Bradford, 1976).

### 6.3 Determinación de la actividad de PLA2 del extracto acuoso de *M. alcicornis*

Se utilizó un ensayo de hemólisis indirecta para medir la actividad de PLA2 del extracto de *M. alcicornis* (Campos y col., 2013). Se empleó como sustrato a la fosfatidilcolina presente en la yema de huevo, basándose en la capacidad que tienen las PLA2 de hidrolizar este sustrato produciendo ácidos grasos libres y lisofosfolípidos, los cuales se acumulan en las membranas eritrocitarias favoreciendo su ruptura, dando como resultado hemólisis. Dicho ensayo se realizó por triplicado en microplacas de 96 pocillos; la mezcla de reacción contenía 140 µL de Tris-HCl 50

mM a pH 7.4 adicionado con 140 mM de NaCl y 2.5 mM de CaCl<sub>2</sub>, también se adicionaron 20 µL de solución de eritrocitos lavados al 1%, 20 µL de solución de yema de huevo al 6.4% y 20 µL del extracto con diferentes concentraciones de proteína.

#### 6.4 Determinación del perfil electroforético del extracto acuoso de *M. alcornis*

Se realizó el análisis electroforético del extracto acuoso de *M. alcornis*, utilizando como soporte geles de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio en condiciones desnaturizantes y desnaturizantes reductoras, según la metodología descrita previamente (Schägger y Von-Jagow, 1987). Para la determinación del perfil electroforético se utilizaron geles de acrilamida al 18%, empleando como buffer de corrida Tris-glicina. Dichos geles se corrieron durante 20 minutos a 120 V y transcurrido este tiempo, a 150 V durante 1.5 h. Para la visualización de las bandas, se empleó la técnica de tinción de Comassie y para la determinación de los pesos moleculares se utilizó un estándar preteñido de amplio peso molecular (Prestained SDS-PAGE Standards cat #161-0318).

#### 6.5 Detección de las citolisinas con actividad de PLA2, mediante la técnica de zimografía

Para la detección de las citolisinas con actividad de PLA2 presentes en el extracto acuoso de *M. alcornis*, se utilizó la técnica de zimografía en gel con algunas modificaciones (Campos y col., 2013). Para este ensayo se empleó un gel de electroforesis y 135 µg de proteína, la concentración de poliacrilamida al 18% y como control positivo 5 µg de PLA2 de *A mellifera*. Las muestras fueron corridas en condiciones desnaturizantes no reductoras a una temperatura de 4 °C a un voltaje de 120 V durante 20 minutos y posteriormente a 150 V durante 1.5 h. Posteriormente, los geles se lavaron con solución Tris-HCl 100 mM a pH 7.4 y después, se incubaron durante 5 horas en contacto con otro gel de agarosa al 2% preparado con solución de Tris-HCl (50 mM) a un pH 7.4, adicionada con NaCl (140 mM), CaCl<sub>2</sub> (2.5 mM) y 6% de yema de huevo. Este procedimiento se realizó por duplicado, incubando un

zimograma a 37 °C y el segundo a 25 °C. La aparición de zonas claras en el gel que contenía el sustrato indicó la actividad de PLA2.

#### 6.6 Estandarización y optimización la técnica de electroforesis bidimensional para la detección de citolisinas con actividad de PLA2 presentes en el extracto acuoso de *M. alvicornis*

Para estandarizar la técnica de electroforesis bidimensional para la detección de citolisinas con actividad de PLA2 presentes en el extracto acuoso de *M. alvicornis*, se utilizaron 450 µg de proteína total. El extracto se limpió, empleando el kit de limpieza “Readyprep 2D clean up Kit” (cat. # 163-2130), se utilizaron tiras IPG de 11 cm con un rango de pH lineal de 3-10 (cat. # 163-2000). La muestra limpia del extracto acuoso de *M. alvicornis* se diluyó en 125 µl del buffer “Readyprep Rehidratation/simple buffer” (cat. # 163-2105), se aplicó en las tiras IPG y se sometió a un corrimiento en una cámara de Isoelectroenfoco “Protean i12 IEF system” (cat. # 164-6000) con rehidratación activa durante 12 horas, empleando una corriente de 100 V. Posteriormente, se sometió a Isoelectroenfoco automático con cuatro pasos: 1) 250 V de forma lineal durante 20 minutos con una corriente máxima de 50 µA, 2) 8000 V de forma lineal durante 2.5 horas con una corriente máxima de 50 µA, 3) 8000 V de forma rápida con una corriente máxima de 50 µA hasta alcanzar 20,000 V/hora y 4) 750 V en Hold. Una vez terminado el enfoque isoelectroenfoco, las tiras que contenían la muestra se lavaron y se equilibraron, empleando buffers de equilibrio “Equilibration buffer I y II” (cat. # 163-2105). Las tiras se colocaron en geles precast de poli-acrilamida al 18% en su versión “stainfree”. Después, las tiras se corrieron en una cámara “Criterion” a 150 V durante aproximadamente 1.5 horas. La visualización de los “spots” o bandas que correspondían a las diferentes proteínas contenidas en el extracto acuoso de *M. alvicornis* se realizó empleando el sistema para captura de imágenes “ChemiDoc MP” asistido por el software “Imagelab”.

## 6.7 Determinación del peso molecular y el punto isoeléctrico de las PLA2s detectadas en el extracto acuoso de *M. alcornis*

Se seleccionaron aquellas bandas, cuya actividad de PLA2 fue evidenciada previamente, mediante la técnica de zimografía. Sus respectivos puntos isoeléctricos y pesos moleculares se determinaron, de acuerdo a sus desplazamientos en la tira IPG y en el gel de electroforesis.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

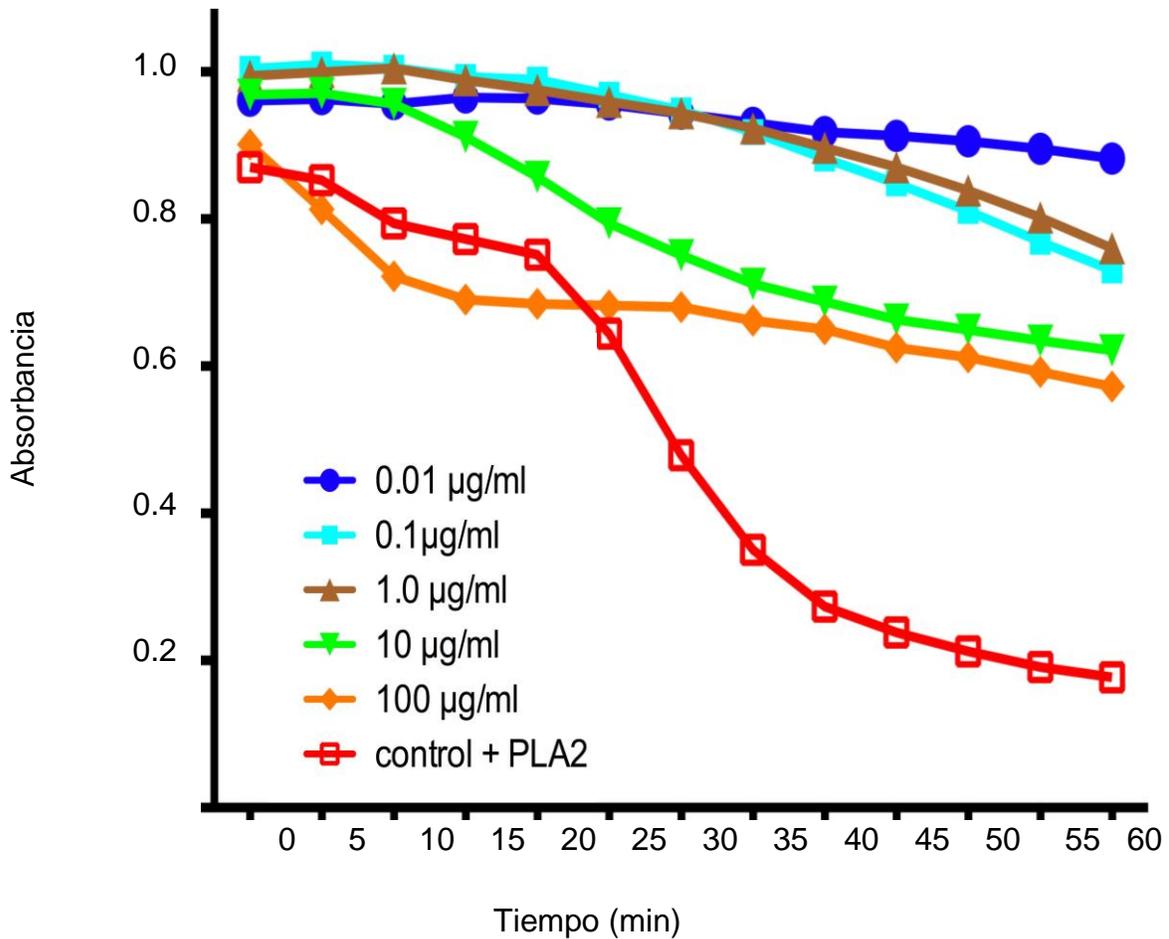
Los hidrocorales del género *Millepora* (Phylum Cnidaria) además de ser importantes formadores de arrecifes coralinos alrededor del mundo, constituyen una fuente importante de moléculas bioactivas. En el caribe mexicano se encuentran ampliamente distribuidas poblaciones de *M. alcicornis* (Lewis., 2006). Investigaciones bioquímicas y toxicológicas realizadas previamente, por nuestro grupo de trabajo y por otros investigadores, sobre Cnidarios del género *Millepora*, demuestran que sus toxinas son principalmente de naturaleza proteica. En este estudio se estandarizaron, por primera vez, las condiciones para el empleo de la técnica de electroforesis bidimensional en la detección de citolisinas con actividad de PLA2 producidas por el “coral de fuego” *M. alcicornis*.

### 7.1 Determinación de proteínas totales en el extracto acuoso de *M. alcicornis*

Mediante el método de Bradford se determinó que el extracto acuoso de *M. alcicornis* contenía 45 µg de proteínas totales/ mg de extracto liofilizado.

### 7.2 Determinación de la actividad de PLA2 del extracto acuoso de *M. alcicornis*

Para la determinación de la actividad de PLA2 del extracto acuoso de *M. alcicornis*, se realizó el ensayo de hemólisis indirecta; el cual se basa en la capacidad que tienen las PLA2 de degradar la fosfatidilcolina contenida en la yema de huevo, generando ácidos grasos libres y lisofosfolípidos. Estos últimos se acumulan en las membranas de los eritrocitos, provocando su ruptura, lo cual se refleja en una disminución de la absorbancia en la mezcla de reacción. Los resultados obtenidos a partir de esta evaluación muestran que el extracto acuoso de *M. alcicornis* provoca una degradación, dependiente de la concentración, de la fosfatidilcolina presente en la yema de huevo (Figura 10). Estos resultados indican la presencia de toxinas con actividad de PLA2 en el extracto acuoso de este hidrocoral.

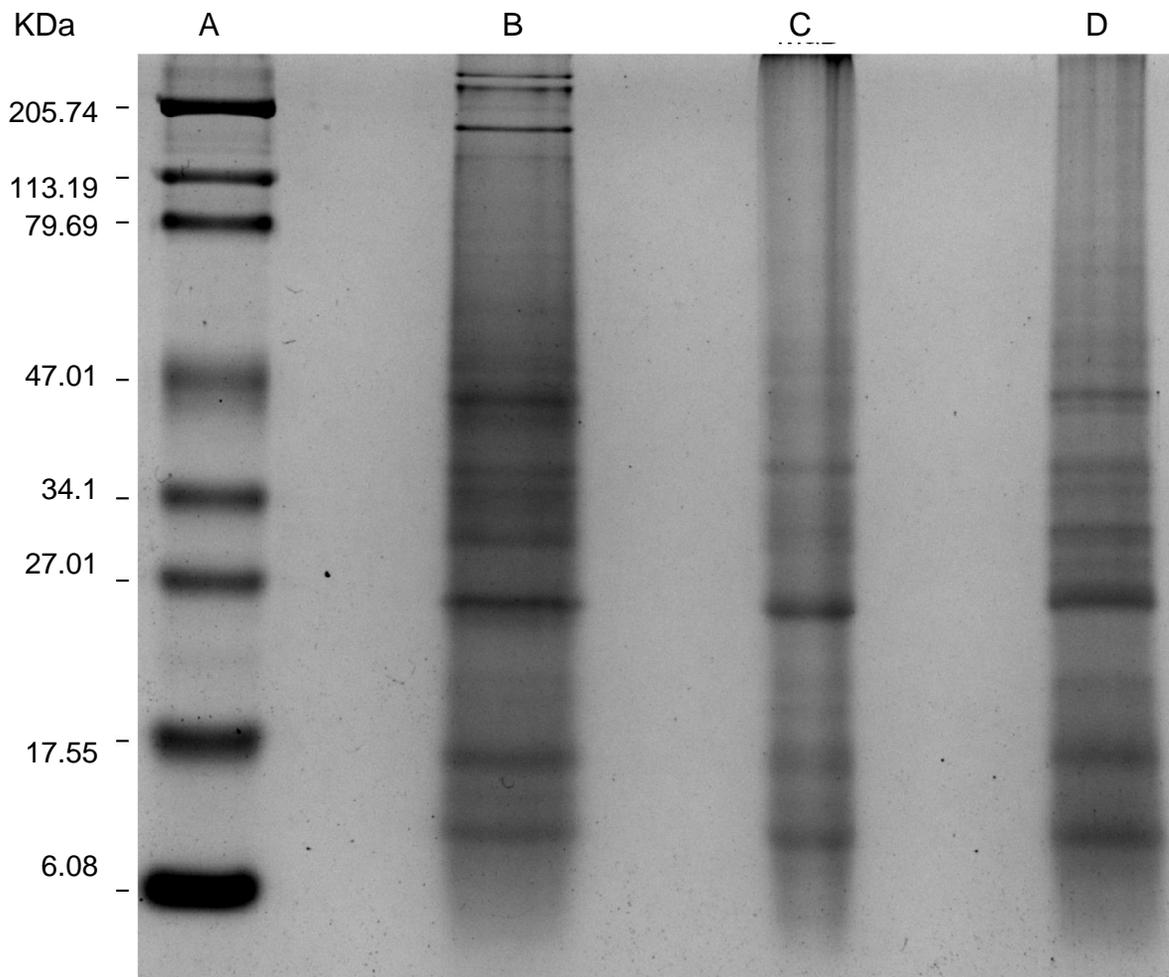


**Figura 10.** Determinación de la actividad de PLA2 del extracto acuoso de *M. alcicornis*.

### 7.3 Determinación del perfil electroforético del extracto acuoso de *M. alcicornis*

En la Figura 11 se muestra el perfil electroforético obtenido al correr el extracto acuoso de *M. alcicornis*, sometido a diferentes condiciones, en un gel de electroforesis unidimensional. El gel de electroforesis muestra en el carril A, el marcador de amplio peso molecular. En el carril B, correspondiente al extracto sometido a condiciones desnaturizantes, se pueden observar bandas que pertenecen a proteínas, cuyo peso molecular abarca un rango desde 6 hasta 205 kDa. Destacan particularmente bandas con pesos moleculares de aproximadamente 205, 47, 34, 27, 17 y 10 kDa. Tras someter el extracto acuoso de *M. alcicornis* a

condiciones desnaturalizantes y reductoras (carril C), la desaparición de las bandas cercanas a los 205 kDa, sugiere que dichas bandas podrían corresponder a proteínas poliméricas, no obstante, bajo estas condiciones se conservan las bandas menores a 34 kDa. Con la finalidad de eliminar interferencias para la estandarización de la técnica de electroforesis bidimensional, el extracto fue sometido a un protocolo de limpieza (carril D), lo cual tuvo como resultado la pérdida de las 3 bandas cercanas a los 205 kDa pero un corrimiento muy similar al de las condiciones desnaturalizantes.

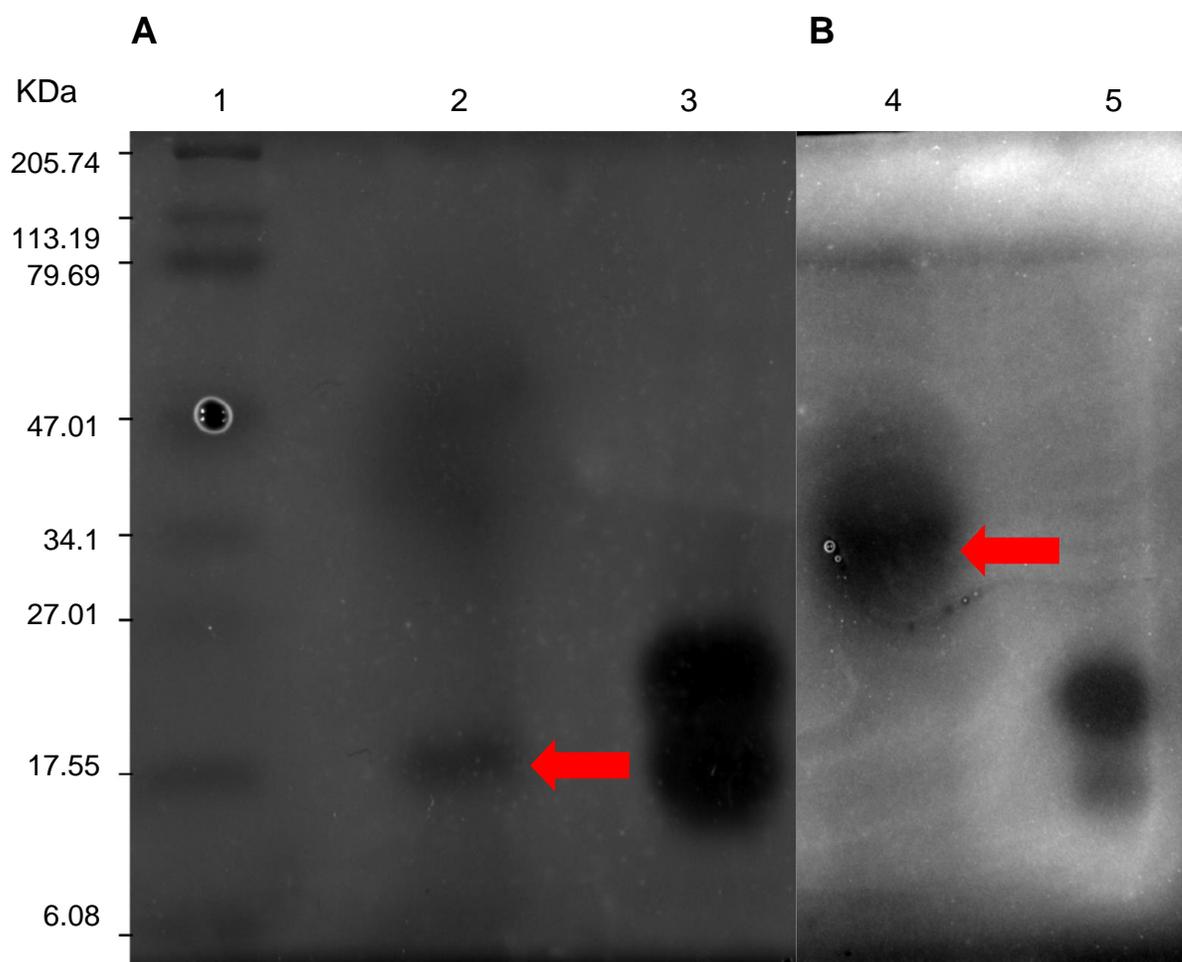


**Figura 11.** Perfil electroforetico del extracto acuoso de *M. alcornis*

#### 7.4 Detección de las toxinas con actividad de PLA2, mediante la técnica de zimografía

Con la finalidad de detectar las citolisinas con actividad de PLA2 presentes en el extracto acuoso de *M. alcicornis*, se empleó la técnica de zimografía en gel utilizando como sustrato la fosfatidilcolina presente en la yema de huevo y como control positivo PLA2 de *Apis mellifera*. Los resultados obtenidos a partir del análisis por zimografía mostraron que el extracto contenía citolisinas de aproximadamente 17 kDa, cuya actividad de PLA2 se presentó a una temperatura de 25 °C. Adicionalmente, cuando la zimografía se sometió a una temperatura de 37 °C, se detectaron PLA2s cuyo rango de pesos moleculares se encontraba entre 27 y 34 kDa. Es importante mencionar que estas últimas citolisinas indujeron un efecto enzimático más evidente en la zimografía (Figura 12).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que *M. alcicornis* produce citolisinas con actividad de PLA2 similares, por lo menos en el peso molecular, a las citolisinas detectadas en el hidrocoral *M. platyhylla*, la cual produce una PLA2 de 32.5 kDa (Radwan., 2004) y *M. complanata* que sintetiza una hemolisina con actividad de PLA2 de 30 kDa (Ibarra-Alvarado., 2007). En el caso de la presente investigación, además se detectó, por primera vez, una PLA2 producida por un organismo del género *Millepora*, cuyo peso molecular aproximado es de 17 kDa.



**Figura 12.** Zimograma para la detección de citolisinas con actividad de PLA2 en el extracto acuoso de *M. alcornis*. A) Zimografía realizada a 25 °C: marcador de peso molecular (carril 1); extracto acuoso de *M. alcornis* (carril 2); PLA2 de *Apis mellifera* (carril 3). B) Zimografía realizada a 37 °C: extracto acuoso de *M. alcornis* (carril 4); PLA2 de *A. mellifera* (carril 5).

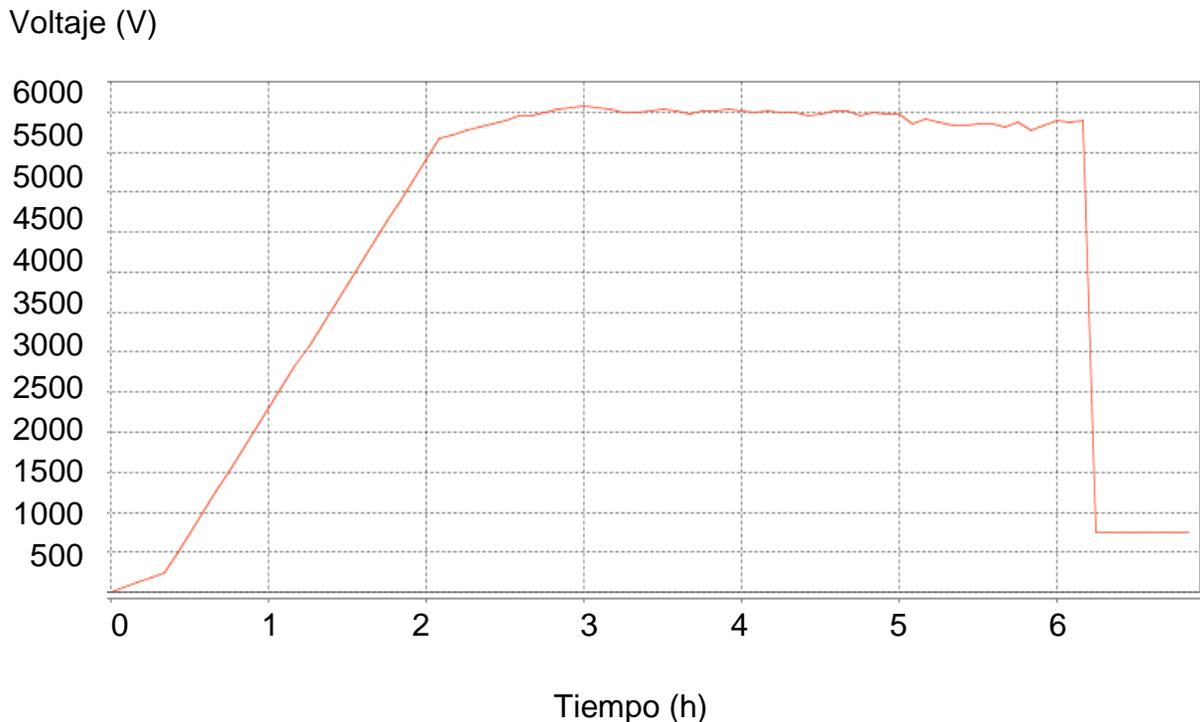
7.5 Estandarización y optimización la técnica de electroforesis bidimensional para la detección de citolisinas con actividad de PLA2 presentes en el extracto acuoso de *M. alcornis*

Las condiciones estandarizadas para el corrimiento del Isoelectroenfoque (IEF) en el dispositivo Bio-rad i12 se muestran en el Cuadro 2. A fin de eliminar la presencia de sales en el extracto acuoso de *M. alcornis*, se determinó que era necesario emplear un proceso de rehidratación activa de la tira IPG (pH 3-10 de 11 cm) y utilizar un voltaje de 100 V. Los pasos de isoelectroenfoque 1 y 2 se corrieron a 250 V durante 20 minutos y 8000 V durante 2.5 horas, respectivamente y ambos con un gradiente lineal, el cual es recomendado para mezclas que contienen péptidos y proteínas con distintos PI. El paso de isoelectroenfoque 3 se corrió a 8000 V con un gradiente rápido hasta aplicar 20000 V/hora, con la finalidad de separar mejor aquellas proteínas con PI muy cercanos entre sí. Finalmente, en el paso 4, se mantuvieron 750 V en la modalidad “Hold”. La corriente máxima aplicada en todos los pasos del isoelectroenfoque no sobrepaso los 50  $\mu$ A, con objeto de no poner en riesgo la integridad de la tira IPG.

**Cuadro 2.** Condiciones estandarizadas para el corrimiento del extracto acuoso de *M. alcornis* en un dispositivo de IEF Bio-rad i12 con una tira IPG pH 3-10 lineal de 11 cm

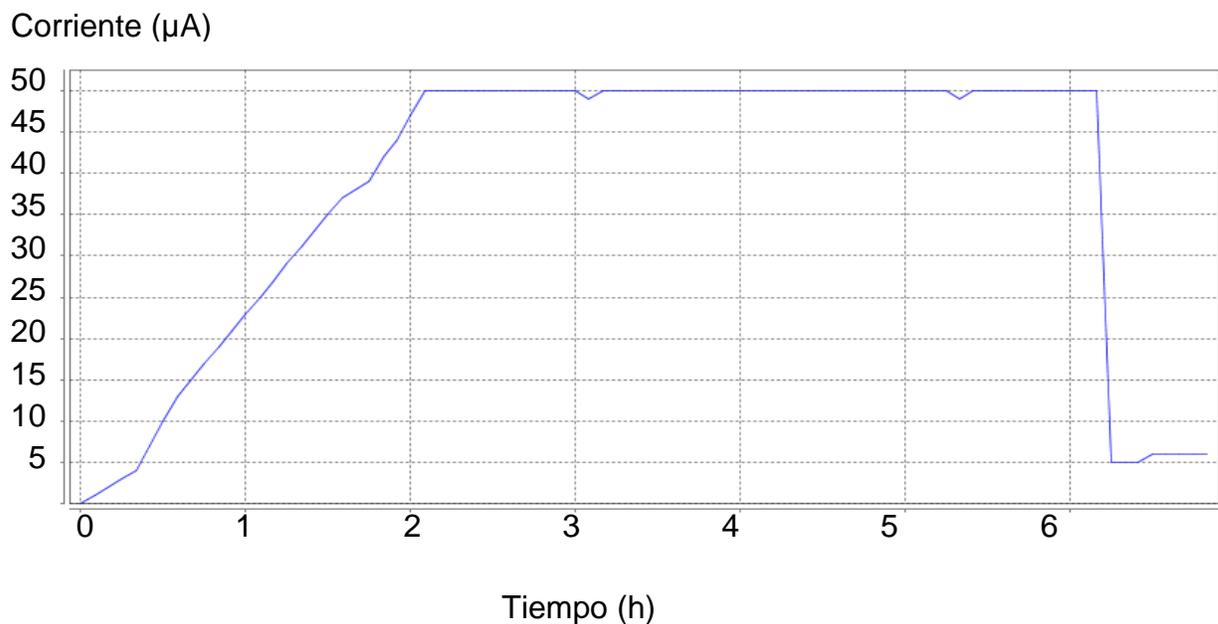
Paso	Voltaje (V)	Gradiente	Corriente ( $\mu$ A)	Tiempo	Unidad
Rehidratación Activa	100	-----	-----	12:00	HH:MM
1	250	Lineal	50	0:20	HH:MM
2	8000	Lineal	50	2:30	HH:MM
3	8000	Rápido	50	20000	Volt Hr
4	750	Hold	50	----	----

El comportamiento del voltaje durante el isoelectroenfoco se muestra en la Figura 13. Durante el paso 1, se suministró un voltaje de 250 V para que algunos iones salieran de la tira y no interfirieran en el corrimiento de las proteínas contenidas en el extracto acuoso de *M. alcicornis*. En el transcurso del paso 2, el gradiente lineal fue programado hasta los 8000 V, no obstante, dadas las condiciones propias de la muestra, el máximo voltaje registrado alcanzó los 6000 V. Durante el paso 3, se siguieron suministrando 8000 V, sin embargo, el voltaje se mantuvo en 6000 V. En este punto es importante mencionar que cuando se emplean tiras de 11 cm es recomendable que, durante el paso 3, se alcancen los 8000 V. En el caso de nuestro experimento, a pesar de no haberse alcanzado el voltaje recomendado, el isoelectroenfoco fue satisfactorio. Finalmente, a fin de evitar que las proteínas difundieran a través de la tira, una vez terminado el isoelectroenfoco, se aplicó el paso 4 con un voltaje de 750 V que se mantuvo constante.



**Figura 13.** Comportamiento del voltaje durante el IEF.

Por otra parte, los resultados de la corriente eléctrica obtenida con las condiciones estandarizadas para el protocolo de corrimiento del extracto acuoso de *M. alcicornis* muestran que, a partir del paso de isoelectroenfoco 3, la corriente se mantuvo constante en 50  $\mu\text{A}$  (Figura 14). Es recomendable, para cualquier tira IPG, que la corriente se mantenga por debajo de dicho valor, ya que a valores mayores a 50  $\mu\text{A}$  es posible que se dañe o altere la composición de la tira IPG. En el caso del presente estudio, el hecho de no poder obtener valores de corriente menores a 50  $\mu\text{A}$ , indicaron que la muestra, al ser de origen marino, aún después de someterse a un proceso de limpieza, rehidratación activa y el paso 1 del isoelectroenfoco, todavía contenía sales que no pudieron eliminarse y que impidieron que se pudieran alcanzar menores valores de corriente.



**Figura 14.** Comportamiento de la corriente eléctrica durante el IEF.

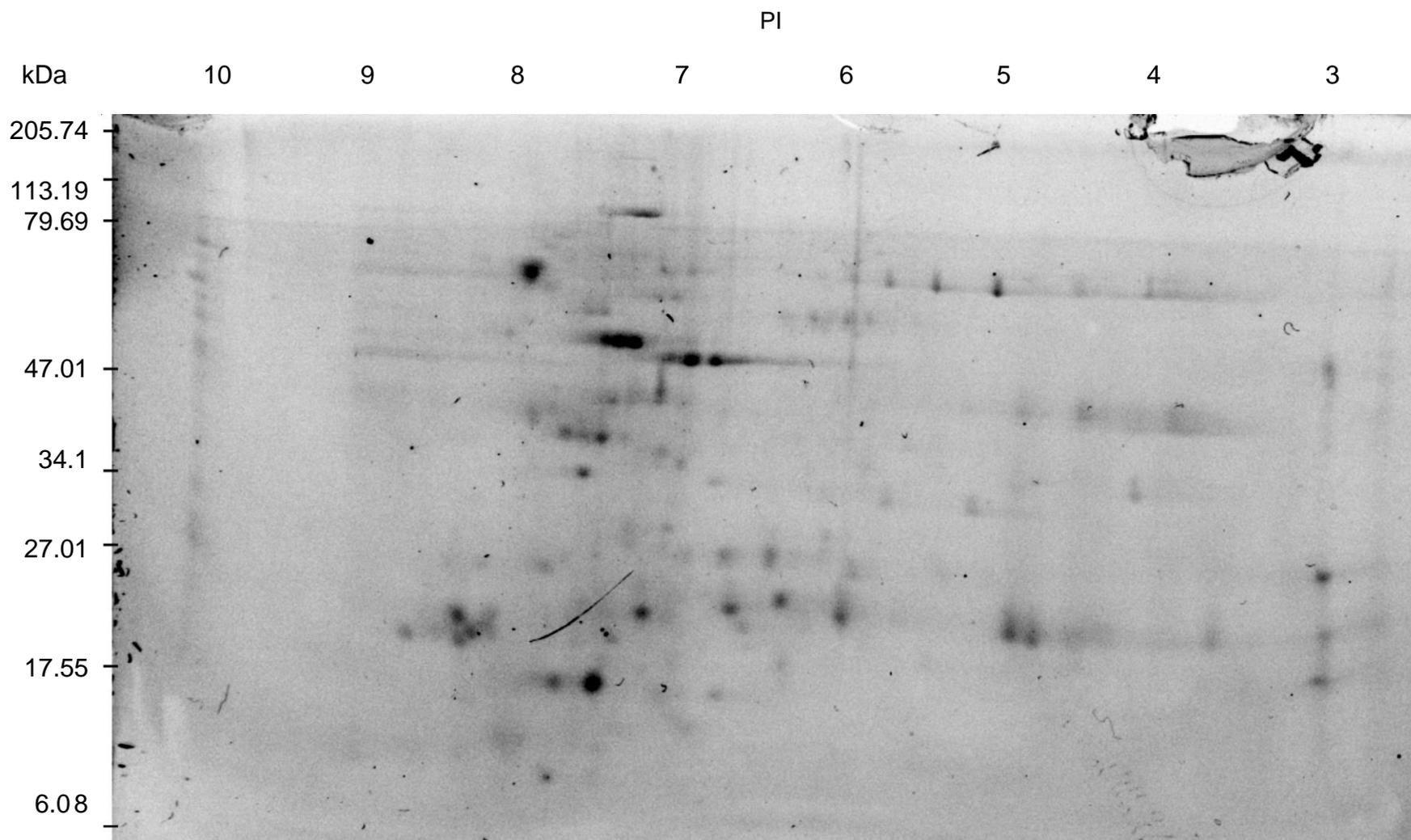
Al término del isoelectroenfoque, la tira IPG (pH 3-10 lineal) fue lavada y equilibrada 10 minutos con 4 ml de la solución de equilibrio I y posteriormente, 10 minutos con 4 ml de la solución de equilibrio II. Para el corrimiento de la electroforesis en segunda dimensión, se utilizó un gel de poli-acrilamida Criterion precast TGX al 18 % en la modalidad stainfree en una cámara Criterion, empleando como buffer de corrida Tris-glicina. Se determinó que las condiciones óptimas para el corrimiento de la electroforesis bidimensional eran aplicar un voltaje de 150 V durante 1.5 horas (Cuadro 3). Una vez finalizada la corrida de la muestra en la electroforesis bidimensional, la detección de las manchas o los spots se realizó, empleando un foto-documentador ChemiDoc MP, usando el protocolo de visualización de proteínas en modo “stainfree”.

**Cuadro 3.** Condiciones estandarizadas para la electroforesis en segunda dimensión.

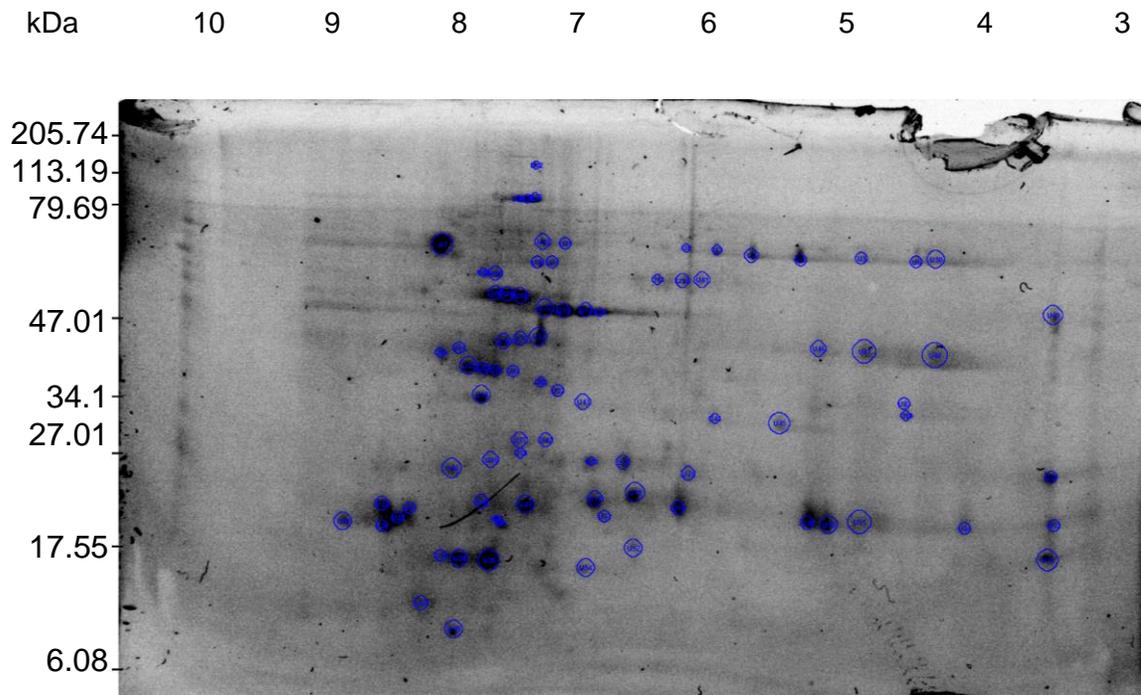
Gel	Gel Criterion Precast TGX stain free 18 %
Cámara de electroforesis	Criterion
Condiciones de corrida	150 Volts durante 1.5 h
Análisis de imágenes	ChemiDoc MP asistido por Imagelab

En la Figura 15 se muestra el corrimiento de las proteínas del extracto acuoso de *M. alcicornis*, empleando las condiciones que se estandarizaron en el presente trabajo para el isoelectroenfoque y la electroforesis en segunda dimensión. Mediante el empleo de las condiciones estandarizadas, fue posible detectar, por electroforesis bidimensional, la presencia de 84 spots proteicos en el extracto acuoso de *M. alcicornis* (Figura 16).

Para realizar el conteo de los spots, se empleó el software Imagelab y a cada spot detectado se le asignó la letra U y un número. Los spots que fueron identificados como posibles citolisinas con actividad de PLA2 se enlistan en el Cuadro 4. Para la detección de estas citolisinas, presentes en el extracto acuoso de *M. alcornis*, se seleccionaron aquellos spots o puntos, cuyos pesos moleculares correspondían a los de las bandas que presentaron actividad enzimática de PLA2 en la zimografía, es decir, los spots con pesos moleculares aproximados de 17 kDa y 27-34 kDa. Los valores de los puntos isoelectricos de las proteínas detectadas en los rangos de pesos moleculares seleccionados, se encontraban entre 7 y 8.



**Figura 15.** Gel de electroforesis bidimensional del extracto acuoso de *M. alcicornis*.



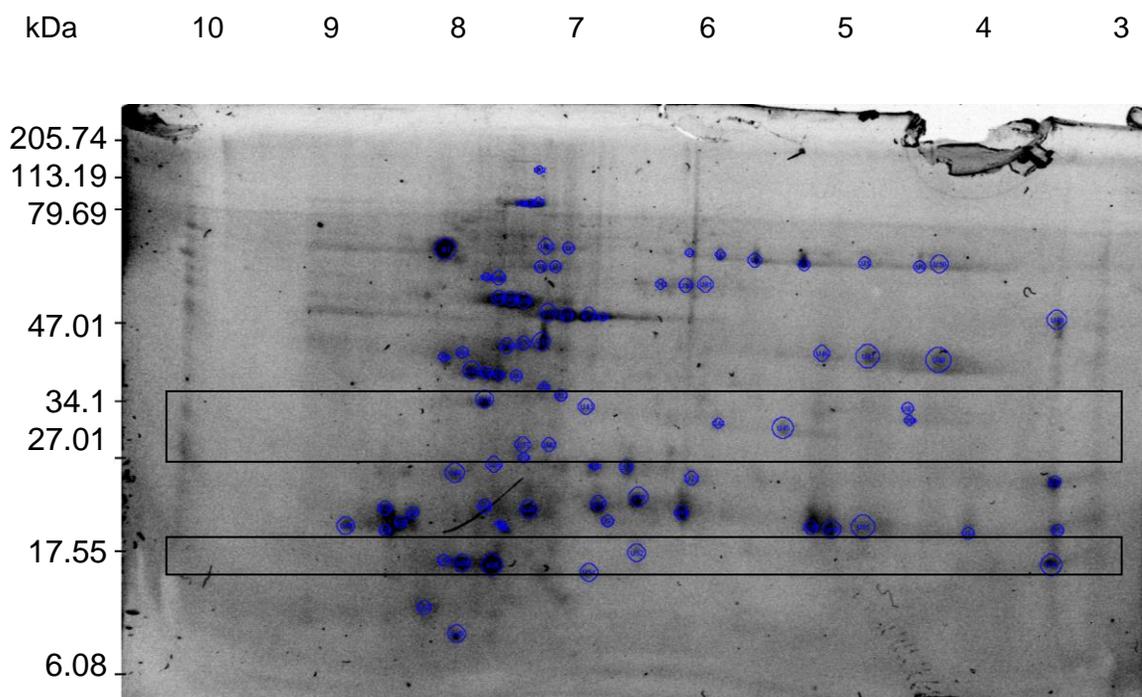
**Figura 16.** Número de spots proteicos detectados en el extracto acuoso de *M. alcornis*.

**Cuadro 4.** Posibles citolisinas con actividad de PLA2 detectadas en el extracto acuoso de *M. alcornis*.

Posibles citolisinas con actividad de PLA2 con peso molecular aproximado de 17 kDa		
Número	Spot	PI
1	U24	8.5
2	U26	7.6
3	U28	7.9
4	U33	3.5

5	U52	6.7
6	U54	7.0
7	U78	8.1
<b>Posibles citolisinas con actividad de PLA2 con un rango de pesos moleculares entre 27 y 34 kDa</b>		
Número	Spot	PI
1	U16	7.7
2	U20	6.9
3	U21	6.6
4	U31	3.4
5	U42	7.3
6	U43	7.0
7	U44	5.9
8	U45	5.5
9	U56	8.0
10	U57	7.5
11	U58	7.5
12	U59	7.7
13	U80	4.5
14	U83	4.5

Las áreas empleadas para la detección de los spots en el gel de electroforesis bidimensional se muestran en la Figura 17. En dichas secciones del gel, se pudieron ubicar aquellos spots que pudieran corresponder a las citolisinas con actividad de PLA2, sin embargo, en este punto del trabajo no es posible definir con exactitud, cuales spots efectivamente pertenecen a las citolisinas de interés. Para lograr la identificación inequívoca de estas toxinas, será necesario cortar dichos spots, a partir del gel de electroforesis bidimensional, y analizarlos, mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas, para lograr su caracterización estructural.



**Figura 17.** Áreas de identificación de los spots correspondientes a los pesos moleculares de las bandas con actividad de PLA2

En el presente trabajo se encontró que, tras someter el extracto acuoso de *M. alcicornis* a electroforesis bidimensional, fue posible detectar la presencia de 84 spots proteicos. Este constituye el primer reporte del perfil proteómico del extracto acuoso de *M. alcicornis*. Como resultado de este análisis proteómico, fue posible determinar que el extracto de este hidrocoral contiene proteínas con un amplio rango de pesos moleculares, que se encuentran entre 6 y 113 kDa y puntos isoeléctricos con valores entre 3 y 10. Es muy factible que varias de las proteínas y péptidos detectados, correspondan a toxinas producidas por este Cnidario como mecanismo de defensa y depredación. En este sentido, se ha estimado que los venenos de los Cnidarios están constituidos por una amplia variedad de hasta 250 compuestos de naturaleza proteica (Frazao y col., 2012).

Con relación a los valores de los puntos isoeléctricos determinados para las proteínas y péptidos contenidos en el extracto acuoso de *M. alcicornis*, la mayoría de estos valores oscilan entre 6 y 8. Esto contrasta con lo reportado acerca de una citolisina con actividad de PLA2 producida por la anémona *Aiptasia pallina* y para una toxina formadora de poro producida por *Urticina psicivora*, cuyos puntos isoeléctricos son mayores a 8.8 y con pesos moleculares entre 30 y 45 kDa. (Anderluh y col., 2002).

Las posibles toxinas con actividad de PLA2 detectadas, mediante la técnica de electroforesis bidimensional, que presentaron un peso molecular aproximado de 17 kDa muestran puntos isoeléctricos cercanos a 8. Mientras que aquellas, cuyos pesos moleculares tenían un rango entre 27 y 34 kDa, poseían valores de PI cercanos a 7. La PLA2 aislada de *A. pallida* tiene dos isoformas, con pesos moleculares de 43 y 45 kDa y un punto isoeléctrico de 8.8 (Grotendorst y col., 1999).

Las toxinas con actividad de PLA2 son componentes principales del arsenal de toxinas contenidas en los nematocistos de los Cnidarios, sin embargo, su estructura química es a la fecha desconocida. Por lo que esta representa un área de investigación que merece ser explorada.

## 8. CONCLUSIONES

- En el presente trabajo se logró la estandarización de la técnica de electroforesis bidimensional para detectar la presencia de citolisinas con actividad de PLA2 contenidas en el extracto acuoso de *M. alcornis*.
- Se reporta por primera vez el perfil proteómico del extracto acuoso de *M. alcornis*, el cual pone en evidencia la compleja mezcla de péptidos y proteínas de diversos pesos moleculares que podrían estar involucradas en los mecanismos de defensa y sobrevivencia de estos organismos marinos.
- Mediante la técnica de zimografía en gel, se detectó la presencia de citolisinas con peso molecular aproximado de 17 kDa, cuya actividad enzimática se presenta a 25 °C. Adicionalmente, se detectaron PLA2 con pesos moleculares de entre 27 y 34 kDa, que son activas a 37 °C.
- El análisis del extracto acuoso de *M. alcornis*, mediante la técnica de electroforesis bidimensional, indica la presencia de 84 “spots” proteicos, de los cuales 7 podrían representar PLA2 con pesos moleculares de 17 kDa y 17 PLA2 con pesos moleculares entre 27 y 34 kDa. Los puntos isoeléctricos de dichas proteínas tienen valores entre 7 y 8.
- Gracias al desarrollo de este trabajo se detectaron “spots” proteicos, varios de los cuales seguramente son citolisinas con actividad de PLA2. En trabajos futuros, dichos “spots” pueden ser cortados a partir del gel de electroforesis bidimensional, para ser analizados, mediante técnicas de secuenciación, a fin de conocer su estructura química.

## 9. REFERENCIAS

- Akiba**, S., Sato, T. 2004. Cellular function of calcium-independent phospholipase A2. *Biol Pharm Bull.* 27(8): 1174-78.
- Ali**, M. 2009. Coral bleaching: Processes, extent and implications: A Review. *Mesop. J. Mar. Sci.* 24 (1):35-42.
- Arai**, H. 2002. Platelet-activating factor acetylhydrolase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69: 83-94.
- Barott**, KL., Venn, A., Perez, S., Tambutté, S., Tresguerres, M. 2014. Coral host cells acidify symbiotic algal microenvironment to promote photosynthesis. *PNAS.* 112:607-6012.
- Bianchini**, G., Lotti, T., Campolmi, P., Casigliani, R., Panconesi, E. 1988. Coral ulceras a vasculitis. *Int. J. Dermatol.* 27:506-507.
- Boschma**, H. 1948. The species problem in *Millepora*. *Zool. Verhandelingen.* 1: 1-115.
- Boschma**, H. 1956. Milleporina and Stylasterina. *In: Treatise on Invertebrate Paleontology. Part F. Coelenterata* (R.C. Moore, ed.) Geological Society of America and University of Kansas Press: F90-F106.
- Boschma**, H. 1956. The species problem in *Millepora*. *Verhandelingen.* 1:1-115.
- Branching fire coral** (*Millepora alcicornis*) Marine Species Identification Portal. Consultado el 18 de junio de 2015.
- Burke**, E., Dennis, E. 2014. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *ASMB.* 50:S237-S242.
- Burke**, JE., Dennis, EA. 2009. Phospholipase A2 biochemistry. *Cardiovasc Drugs Ther.* 23(1): 49-59.
- Campos**, L., Pucca, M., Roncolato, E., Bertolini, T., Netto, J., and Barbosa, J. 2013. In vitro comparison of enzymatic effects among Brazilian Bothrops spp. venoms. *Toxicon.* 76:1-10.
- Cook**, JA. 2005. Eicosanoids. *Crit Care Med.* 33(12 Suppl): S488-2491.
- Douglas**, A. 2003. Coral bleaching-how and why?. *Mar. Pollut. Bull.* 46:385-392.
- Fitt**, W., 2012. Bleaching of the fire corals *Millepora*. *Proceedings of the 12th*

International Coral Reef Symposium, Cairns, Australia.

**Fraza**, B., Vasconcelos V, Antunes A. 2012. Sea Anemone (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria) Toxins. *Mar Drugs*. 10:1812-1851.

**García-Arredondo**, A., Rojas-Molina, A., Bah, M., Ibarra-Albarado, C., Gallegos-Corona, MA. García-Servin, M., 2015. Systemic toxic effect induced by the aqueous extract of the fire coral *Millepora complanata* and partial purification of thermostable neurotoxins with lethal effects in mice. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*.169:55-64.

**García-Arredondo**, A., Rojas-Molina, A., Ibarra-Alvarado, C., and Iglesias-Prieto, R. 2011. Effects of bleaching on the pharmacological and toxicological activities elicited by the aqueous extracts prepared from two “fire corals” collected in the Mexican Caribbean. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol*. 396:171–176.

**García-Arredondo**, A., Rojas, A., Iglesias-Prieto, R., Zepeda-Rodriguez, A., Palma-Tirado, L. 2012. Structure of nemoatocytes isolated from the fire corals *Millepora alcicornis* and *Millepora complanata* (Cnidaria: Hydrozoa). *J. Venom. Anim. Toxins*. 18(1):109-115.

**García**, GA., Gaitán, AA., García-Cardona, A., Clavijo, D., Mejía, ÓR., Cobos, C. 2008. Aspectos biomédicos de las fosfolipasas A2 en la especie humana. *Med UNAB*. 11(1): 14-27

**García**, GA., García-Cardona A. 2009. Fosfolipasas A2: grandes familias y mecanismos de acción. *Medicina y cirugía*. 18:199-209.

**Gelfi**, C., Debesi, P., Alloni, A., Righetti, PG. 1992 Investigation of the Properties of Novel Acrylamido Monomers by Capillary Zone Electrophoresis. *J Chromatogr*. 608:333-41.

**Haalem**, J., D. Veentra, I., D Veentra, T. 2008. Two- dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE): advances and perspectives. *Biotechniques*; 44:697-700.

**Hernández-Matehuala**, R., Rojas-Molina, A., Vuelvas-Solórzano, A., García-Arredondo, A., Ibarra-Alvarado, C., Olguín, N., Aguilar, M. Cytolytic and systemic toxic effects induced by the aqueous extract of the fire coral *Millepora alcicornis*

collected in the Mexican Caribbean and detection of two types of cytolisins. JVAT.

**Hume**, B., D'Angelo, C., Burt, J., Baker, A. C., Riegl, B., and Wiedenmann, J. 2013. Corals from the Persian/Arabian Gulf as models for thermotolerant reef-builders: Prevalence of clade C3 Symbiodinium, host fluorescence and ex situ temperature tolerance. *Marine. Poll. Bull.* 72(2):313-322

**Iguchi**, A., Iwanaga, S., and Nagai, H. 2008. Isolation and characterization of a novel protein toxin from fire coral. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365(1):107-112.

**Knowlton**, N. 2010. Life in the World's Oceans: Diversity, Distribution, and Abundance (John Wiley and Sons West Sussex, UK). 1:65–77.

**Lewis**, B., Crooks, R. 1996. Foraging cycles of the amphinomid polychaete *Hermodice carunculata* preying on the calcareous hydrozoan *Millepora complanata*. *Bull Mar Sci.* 58: 853-6.

**Manjunatha-Kini**, R. 2003. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. *Toxicon.* 42:827-840.

**Martins**, R., Alves, R., Martins, A., Barbosa, P., Evangelista, S., Evangelista, J., Ximenes, R. y col. 2009. Purification and characterization of the biological effects of phospholipase A2 from sea anemone *Bunodosoma caissarum*. *Toxicon.* 54:413-420.

**Mosavi**, L., Cammett, T., Desrosiers, D., Peng, Z. 2004. The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Sci.* 13(6): 1435-48.

**Moya**, A. 2006. Study of calcification during a daily cycle of the coral *Stylophora pistillata*: Implications for 'light-enhanced calcification'. *J Exp Biol.* 209(17):3413–3419.

**Murakami**, M., Kudo, I. 2004. Secretory phospholipase A2. *Biol Pharm Bull.* 27(8): 1158-1164.

**Nevaleinen**, T.J., 2008. Phospholipases A2 in the genome of the sea anemone *Nematostella vectensis*. *Elsevier D3*:226-233.

**Obura**, D., Fenner, D., Hoeksema, B., Devantier, L. & Sheppard, C (2008). «*Millepora alcicornis*». *Lista Roja de especies amenazadas de la UICN 2012.2.*

- Olguin, N.**, 2014. Efecto del blanqueamiento de arrecifes coralinos inducido por el incremento térmico sobre la actividad enzimática de citolisinas en los corales de fuego *Millepora complanata* y *Millepora alcicornis*. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias Químico Biológicas. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Ostman, C.** 2000. A guideline to nematocyst nomenclature and classification, and some notes on the systematic value of nematocyst. *Sci Mar.* 64(1):34-46.
- Piñeiro, C.** Barros-Velázquez, J. Vázquez, J. Figueroas, A. and Gallardo, J.M. Proteomics as a Tool for the Investigation of Seafood and Other Marine Products. *JOP.* 2:127-135.
- Rabilloud, T.**, Chevallet, M., Luche, S., Lelong, C. 2010. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: past, present and future. *J Proteomics.* 73:2064-2077.
- Radwan, F.F.Y.**, and Aboul-Dahab, H. M. 2004. Milleporin-1, a new phospholipase A2 active protein from the fire coral *Millepora platyphylla* nematocysts. *Comp. Biochem. Physiol., C.* 139:267-272.
- Rojas, A.**, Torres, M., Rojas, J.I., Feregrino, A., and Heimer-de la Cotera, E.P. 2002. Calcium-dependent smooth muscle excitatory effect elicited by the venom of the hydrocoral *Millepora complanata*. *Toxicon.* 40:777-785.
- Roth, E.**, Jeon, K., Stacey, G. 1988. Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN. 220–225.
- Sagi, A.**, Rosenberg, L., Ben-Meir, P., and Hauben, D.J. 1987. The "fire coral" (*Millepora dichotoma*) as a cause of burns: a case report. *Burns. Incl. Therm. Inj.* 13:325-326.
- Schägger, H.**, and Von-Jagow, G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166:368-379.
- Slattery, M.**, Ankiesetty S, Corrales J, Marsh-Hunkin E, Gochgeld D, Willett K, Rimoldi J. 2013. Marine Proteomics: A Critical Assessment of and Emerging Technology. *JPN.* 75:1833-1877.
- Smita, K.**, Sushil-Kumar, V., Premendran, JS. 2007 Anandamide: an update.

Fundam Clin Pharmacol. 21(1): 1-8.

**Tasheba**, B., Dessev, G. 1983. Artifacts in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis due 2-mercaptoethanol. Anal. Biochem. 129:98-102.

**Technau**, U., Steele RE. 2012. Evolutionary crossroads in developmental biology: Cnidaria. Development. An Overview. Mar drugs; 10:1812-1851.

**Van-Der**, SM., Di-Marzo V. 2004. Endovanilloids. Putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. Eur J Biochem. 271(10): 1827-34.

**Wertermeier**, R. 2014. Lookin at proteins from two dimensions: a review on five decades of 2D electrpforesis. Arch. Physiol. Biochem. 220(5):168-172.

**Wikipedia**. [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org). Fotografias de cnidarios.

**Wilson**, S. K., Graham, N. A., Pratchett, M. S., Jones, G. P. and Polunin, N. V. 2006. Multiple disturbances and the global degradation of coral reefs: are reef fishes at risk or resilient? Global Change Biol. 12(11):2220-2234.

**Zehr**, B., Savin, T., Hall, R. 1989. A one-step, low background Coomasie staining procedure for polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 182;157-159.