

Cuernavaca, Morelos a 28 de febrero de 2022.

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES
P R E S E N T E.

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **SANDRA IRENE SALAZAR GARCÍA**, con el título del trabajo: **Identificación de un polipéptido con actividad citolítica de la anémona *Anthopleura dowii* Verrill, 1869.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para contar con el voto aprobatorio para que pueda optar por la Modalidad de Titulación por Tesis como lo marca el artículo 4° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

A T E N T A M E N T E
Por una humanidad culta

JURADO REVISOR

PRESIDENTE: DRA. MARÍA DEL CARMEN GUTIERREZ
VILLAFUERTE
SECRETARIO: DRA. IRENE DE LA CONCEPCIÓN PEREA
ARANGO

VOCAL: DRA. CLAUDIA RODRÍGUEZ ALMAZÁN

SUPLENTE: DRA. ANABEL ORTIZ CALTEMPA

SUPLENTE: DR. EDGAR DANTÁN GONZÁLEZ

FIRMA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ANABEL ORTIZ CALTEMPA | Fecha:2022-02-28 18:23:35 | Firmante

T/G5p79TxBuAKtNJK37Ut97qj+vLPyzMirzLULsWR6zMtcCuwl82+aFgz1PSiZiArFvfh5mYVxIs7nPTYOX8cob68yjsDL3pmruQmhWj4dVQYROR7polcx+FcRfAT7rBLIrQ/hW4ERzIo0wYrHHXBmItt81Sjq1YPKc/eUgGqxO+RyFd7Ei5rex6egT6E0BakUPL7CbZRqW216ufQBKPNnnyumh/x6QyEtWKBjUmftEKrB7qjZqfcgGNjnuLSUZGBEhdc3IV1qE4LL3NphvrbqrY4t2U4aXoGw5rVErutua6VcMRxyV2PcQg6Yj4jF9eZnHJaEFnRF+tBiaBDD1w==

CLAUDIA RODRÍGUEZ ALMAZÁN | Fecha:2022-03-01 12:41:24 | Firmante

i70Oelf7882+jyYNDPjpdgZiQ9JWSf9jDiyT/ie7NSMkmZWiqRm7PsW19XCX45TUpVYEohYSc+dbSnI/gGqOFr28YHxbj8vBAgKQ0CLcS6FTkdNGUmelvuCPIKE6TwwKi4Kir8dC2ntWBanMeD2M4zoEfa9duTTtGQX+n6g2ddgiEqEB4rJkdFosulxOb8HvEw2plJeYJ6O8VBdjK0j1IOYr7Fb5avGYiXngdOmmik7mKTLBVLwZ6Pp+UzKvYXBfb5KVcFqYJr0H0QIKML11r4Rsay/JuNqumMJeNscTOF2iVnhullwhO6Rjt4iXwAERSb0leB74337pTdk91Inw==

EDGAR DANTAN GONZALEZ | Fecha:2022-03-01 18:35:32 | Firmante

f4YQPskcQ0GRhFTLcBe4iaE1wbFyV9yu8RjktXS3cohaK1A0UnriW0HCsmRFRPyBETAe2HKP/zBcbgBhXfWdZWNzwqympLhiB9Kr00Gj9OTP8+eqBv5BVQEaCYPyF6bl8TCZmkYh0WZRVMlG2zoBYgKqix/PRvM7T5/2bJHChu+I2Rvt84ENM1HgCW9GM6OMWunW7FUTtL47UZpAgo1/6YyVp1pHwc5Y0k9xhvqNA+WYHhBDz6adzpVzMOjUVcaUd5vaalUrcVMqg5B6PayYL4/z+Erm1qJP0iaPaXBlJnVuObmvR3he6sulbmd1m58H6lJQTsasXR5elciHafg==

MARIA DEL CARMEN GUTIERREZ VILLAFUERTE | Fecha:2022-03-01 21:04:29 | Firmante

S7Y23sF4nJh1kHS8AuQ7z/9dmrS7Uqi36ERxnaRhZQGaRxAUo+A9zVTT+pJrvUG8bMsJvcrxRwOcd/9zXew11Z/CghW2q4TMNhHtiyon6T8ZJEIOmbRUkYmpEI7sUxOSrDeh8UoMIUPVhLz8yHx46cpfnqv1s7xnaAuf5hmCwxBBBZG3JIRHg21iWcRLRdmqka03YpQdcCy1muUI2YzoG67GJ75BUYPpV4cZO+SHkdp7aBjsf+NjshHEm+rYlmlLqQ/0ewF0fJfo5+JwWuLdtXpaplNLwcoeyFDhdWOWC2nzYrx50xXbvg+1BuUOGHCvI4rCabin9TbS+GEMV2nBg==

IRENE DE LA CONCEPCION PEREA ARANGO | Fecha:2022-03-03 18:41:11 | Firmante

dbOHFHfybxBDiMxB6/L2ejimgjQ9qcfSYKX3+tFRf5oAn0xBQwaxqVLnEkiQ+g1ZHV88Hvvc3Wf/9PICOGJ8IKgrFjchYw50P8NdbcvRkoPdcDZNN/Es8CdMaDOljok48E4msRDx3UZwvHrRXwpGMnW+B3XWCOaFN3/0oTCA9wwGVD73jnvryn/zXeVFNqJi7KOCZ6Kh3iZB1mhKij+bjmJuo2OBzXrgP2rJIA3h9aT/5ROvEvyEbtGCCieW6913FXgOuFvhu1ZBX51b07YurmioYcYmY69AKVSRHe16QpwjM7CdM7m0kGPGjooXbkrF5B5jVtXE/fdhB/2zQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



YNMpL81dG

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/4NZtoqvgtDmVXMoXJdBboS7NXznRi46H>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Identificación de un polipéptido con actividad citolítica de la anémona
Anthopleura dowii Verrill, 1869**

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A:
SANDRA IRENE SALAZAR GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS
DRA. CLAUDIA RODRÍGUEZ ALMAZÁN

CUERNAVACA, MORELOS

09/2021

Reconocimientos institucionales

Se agradece a la máxima casa de estudios la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, así como a la Facultad de Ciencias Biológicas por crear un espacio para compartir el conocimiento y así como de dar la oportunidad de crear profesionales con crecimiento en lo académico y personal, a todo su personal académico y administrativo por prestar sus servicios, disposición y conocimiento, se agradece de igual forma al Instituto de Biotecnología de la UNAM por abrir sus puertas y compartir sus instalaciones para la realización de este proyecto.

Se agradece al proyecto PAPIIT-UNAM (IT 200819) que me otorgó apoyo financiero durante el presente proyecto de investigación.

Reconocimientos académicos

Este trabajo se llevó a cabo bajo la dirección de la Dra. Claudia Rodríguez Almazán en el laboratorio de Biología Estructural, se agradece en demasía al Dr. Enrique Rudiño Piñera, jefe de grupo de dicho laboratorio perteneciente al Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Se reconoce y agradece el trabajo del Comité Tutoral que asesoró el desarrollo y revisión de manuscrito de este proyecto, el cual se conformó por:

Presidente: Dra. Gutiérrez Villafuerte María del Carmen

Secretaria: Dra. Ortiz Caltempa Anabel

Primer vocal: Dra. Rodríguez Almazán Claudia

Se agradece el valioso apoyo de la Dra. Rosario Vera del departamento de Biología Molecular en plantas, así como del Dr. Fernando Zamudio Zuñiga del departamento de Biología Molecular y Bioprocesos y, de la Dra. María del Carmen Beltrán Núñez del departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular por compartir sus espacios de trabajo, tiempo y asesoramiento en la parte experimental en cuanto a procesamiento de muestras y análisis secuencial.

Agradecimientos personales

Dra. Claudia le agradezco infinitamente todo el tiempo, conocimiento adquirido, paciencia y dedicación que me brindó, me llevo una gran experiencia y recuerdos muy bonitos del tiempo que estuve bajo su tutoría, de verdad muchas gracias.

Al "Team Dra. Claudia" conformado por el Dr. Santos Ramírez Carreto y la M. en C. Beatriz Miranda Zaragoza, gracias por toda la enseñanza, consejos, regaños, amistad y todos y cada uno

de los momentos que pasamos juntos y que me brindaron durante toda la tesis; Santos, recuerdo cuando me enseñaste a hacer amortiguadores y que estuve a nada de llorar, pero gracias a tu lema “la letra a sangre entra” aprendí a preparar amortiguadores. Betti gracias por la amistad, todos esos momentos en cuando nos reuníamos a ver el mundo arder, gracias.

A mi familia. Primero que nada, mi gran ejemplo de vida, mi madre Aurelia, comparto este logro contigo por todo el esfuerzo, dedicación y amor que nos has brindado, eres mi gran inspiración y motivación, si bien la licenciatura de Biología no era lo que tenías en mente para mí, nunca en ningún momento me detuviste de seguir esta carrera, sino que al contrario siempre me impulsaste y me apoyaste a seguir mi propio camino, gracias por el esfuerzo y por apoyarme, te amo mucho. A mis hermanas, Raquel y Luz, me han inspirado de distintas formas para seguir mi carrera, gracias por el apoyo que me brindaron.

A Sebastián. Mi compañero, mi amigo y my love, te agradezco tanto toda la ayuda y los ánimos que me has brindado en cada paso que he dado durante la carrera, siempre motivándome y haciéndome ver todo lo que puedo lograr, gracias por esas comidas deliciosas que preparaste y llevaste para aliviar la fatiga del día, por los consejos y el gran amor que me brindaste.

Índice

Resumen	7
Introducción	8
Marco Teórico	9
Phylum Cnidaria	9
Clase Anthozoa	10
Anthopleura dowii Verrill, 1869.....	12
Toxinas.....	13
Membrana celular	14
Antecedentes	16
Actinoporinas	17
Aplicaciones	21
Fosfolipasa	24
Aplicaciones	27
Hipótesis.....	28
Justificación.....	28
Objetivo general	29
Objetivos particulares.....	29
Metodología.....	29
Objetivo 1	29
Objetivo 2	33
Objetivo 3	35
Objetivo 4	38
Resultados y Discusión	40
Objetivo 1	40
Objetivo 2, 3	42
Objetivo 3, 4	48
Conclusiones	62
Perspectivas.....	62
Bibliografía	63

Índice de Figuras

FIGURA 1. CICLO DE VIDA EN EL PHYLUM CNIDARIA.	9
FIGURA 2. ANATOMÍA GENERAL DE CNIDOCITO.....	10
FIGURA 3. ANATOMÍA GENERAL DE ANÉMONAS.	13
FIGURA 4. FOSFOLÍPIDOS EN LA MEMBRANA CELULAR.	15
FIGURA 5. ESTRUCTURA GENERAL DE LÍPIDOS DERIVADOS DE ESFINGOSINA.....	15
FIGURA 6. ESQUEMA DE BALSAS LIPÍDICAS Y SUS DISTINTOS COMPONENTES.....	16
FIGURA 7 ACTINOPORINAS MEJOR CARACTERIZADAS.	18
FIGURA 8. MODELO DE FORMACIÓN DE PORO DE ACTINOPORINAS..	20
FIGURA 9. ESQUEMA DE LAS PRIMERAS INMUNOTOXINAS DESARROLLADAS A PARTIR DE ACTINOPORINAS.....	23
FIGURA 10. CLASIFICACIÓN DE FOSFOLIPASA.	24
FIGURA 11. REPRESENTACIÓN TRIDIMENSIONAL DE FOSFOLIPASA.	26
FIGURA 13. SDS-PAGE DE LAS FRACCIONES DE PRECIPITACIÓN, ASÍ COMO SU RESPECTIVO PORCENTAJE DE HEMÓLISIS.....	44
FIGURA 14. ACTIVIDAD FOSFOLIPASA..	47
FIGURA 15. CROMATOGRAMA SEFAROSA DEAE DE FRACCIÓN DE 60% (ECM).....	49
FIGURA 16. SDS-PAGE DE LAS FRACCIONES DE LA CROMATOGRAFÍA FIGURA 15.....	49
FIGURA 17. ACTIVIDAD FOSFOLIPASA DE LAS FRACCIONES DE CROMATOGRAFÍA DEAE EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE $CaCl_2$	50
FIGURA 18. FRACCIONES HEMOLÍTICAS QUE SE ANALIZARON MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y SHOTGUN ACOPLADO A MASAS.....	52
FIGURA 19. ALINEAMIENTO DE SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE BANDAPORINA (DELTA-ACTITOXIN-AAS1A) DE <i>A. ASIATICA</i> Y FRAGMENTO DE ACTINOPORINA DE <i>H. PRODUCTO</i>	53
FIGURA 20. CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO CATIONICO PARA EL SOBRENADANTE (EC2DA).....	56
FIGURA 21. GEL DESNATURALIZANTE Y ENSAYO DE FOSFOLIPASA DE FRACCIONES A PARTIR DE LA CROMATOGRAFÍA CATIONICA DEL SOBRENADANTE DE EC2DA..	57
FIGURA 22. MUESTRA ANALIZADA MEDIANTE DEGRADACIÓN EDMAN.	58
FIGURA 23. FRACCIONES ANALIZADAS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS	58
FIGURA 24. ALINEACIÓN DE SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE LA PLA2.	59
FIGURA 25. ALINEAMIENTO DE SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LAS PLA2 ÁCIDA NATRATOXINA DE LA SERPIENTE <i>NAJA ATRA</i>	60

Índice de Tablas

Tabla 1. Trabajos más destacables sobre actinoporinas en las especies mejor estudiadas donde se aplica en distintos modelos biológicos para evaluar el efecto que pueden provocar las actinoporinas.....	18
Tabla 2. Algunas fosfolipasas A2 en anémonas de mar, modo de acción y modelos biológicos.	26
Tabla 3. Procedimiento de ensayo colorimétrico de Bradford, utilizado durante el proyecto.....	30
Tabla 4. Volúmenes que se utilizaron de las soluciones para preparar los geles de poliacrilamida, resolvidor y concentrador.....	31
Tabla 5. Composición de la solución lítica para electroforesis.....	32
Tabla 6 Rendimiento de extractos crudos y sus fracciones durante el primer paso de purificación con precipitación con sulfato de amonio.	45
Tabla 7 Rendimiento de fracciones de cromatografía de intercambio aniónico como segundo paso de purificación para la fracción 60%.....	51

Resumen

En el estudio de venenos, las moléculas con mayor relevancia por lo general son aquellas capaces de dañar la membrana celular. En anémonas, las principales especies que mejor se han estudiado son las de los géneros *Actinia*, *Heteractis*, *Anthopleura* y *Stychodactyla* de las cuales se han identificado y caracterizado moléculas que pueden alterar la membrana celular ya sean o no de naturaleza proteica, entre las que destacan las toxinas formadoras de poro y neurotoxinas. Otra molécula capaz de dañar la membrana celular pero que a diferencia de las formadoras de poro no son tan estudiadas en anémonas son las fosfolipasas tipo A2; si bien ya se conoce una gran gama de estas proteínas, es importante el estudio de nuevas especies para contribuir al repertorio de moléculas que puedan aportar nuevo conocimiento para el desarrollo de futuras herramientas biotecnológicas. Para la identificación de estas proteínas en la anémona de mar *Anthopleura dowii*, se optó por emplear el extracto total de los organismos, una serie de pasos de purificación tales como precipitación con sulfato de amonio, así como cromatografías de intercambio iónico, y para la identificación de secuencia de aminoácidos de las toxinas se emplearon técnicas como degradación EDMAN y espectrometría de masas. En cada paso de purificación se evaluó la actividad lítica en eritrocitos de humano y la actividad de fosfolipasa en cajas de agar con yema de huevo como sustrato de lípidos, dado que el objetivo de este trabajo era identificar las posibles toxinas que presentan estas actividades se logró identificar a más de dos posibles toxinas involucradas, entre ellas una actinoporina y otras toxinas pertenecientes a diferentes familias formadoras de poro, metaloproteinasas y fosfolipasas tipo A2, neurotoxinas como la natratoxina y las U-metrotoxinas, e inhibidores de activación plaquetario tales como la isoforma S11-61. Los resultados de este trabajo sugieren que *A. dowii* presenta gran potencial como medio de estudio de nuevas citolisinas con una posible aplicación biotecnológica.

Introducción

En el Phylum Cnidaria se ha encontrado una amplia variedad de moléculas ¹⁻³ esto debido a que han desarrollado, a lo largo de su historia evolutiva, células urticantes llamados cnidocitos que pueden producir compuestos tóxicos con el fin de conseguir alimento, contra depredadores y/o competencia intraespecífica por el territorio ^{4,5}.

Durante las últimas décadas la composición del veneno de estos organismos ha llamado la atención científica, ya que comprende moléculas de naturaleza proteica como enzimas, polipéptidos y péptidos, así como de naturaleza no proteica como aminos biogénicas potenciales para el desarrollo de nuevos fármacos ^{6,7}. Dentro de ese grupo tan diverso de componentes se han identificado polipéptidos conocidos como citolisinas, moléculas capaces de dañar y/o lisar células.

Dentro del Phylum Cnidaria se encuentra la Clase Anthozoa, en donde se clasifican las anémonas ⁸. Las anémonas producen diversos tipos de citolisinas, entre ellas las proteínas formadoras de poro que se han clasificado de acuerdo a su tamaño o peso molecular, el cual varía desde 5 kDa hasta 80 kDa ⁹, siendo las de 20 kDa las más estudiadas y conocidas como actinoporinas. Las actinoporinas deben su nombre al hecho de que son exclusivas del orden Actinidae ¹⁰. Una característica particular de estas citolisinas es su afinidad por la esfingomielina ¹¹, debido a ello se les ha puesto un particular interés por su potencial biomédico en el desarrollo de herramientas moleculares para una posible aplicación como anticancerígeno, antimicrobiano, biosensor, entre otros ¹²⁻¹⁴.

Otras moléculas con capacidad citolítica presentes en el veneno de anémonas son las fosfolipasas, en específico fosfolipasa A2 (PLA2) que debido a su actividad para hidrolizar fosfolípidos liberan un ácido graso y un lisofosfolípido desestabilizando la membrana celular. Por esta razón promete ser un importante modelo para el estudio y aplicación en enfermedades inflamatorias, y como modelo de estudio del comportamiento lipídico en la membrana celular ¹⁵⁻¹⁷.

El presente estudio está enfocado en la identificación, de al menos, un componente citolítico del veneno de la anémona de mar *Anthopleura dowii* Verrill, 1869. El estudio se realizó a partir del extracto total de los organismos, y el análisis de actividad citolítica mediante

bioensayos en eritrocitos de humano para identificar proteínas formadoras de poro, así como en placas con yema de huevo para identificar actividad de fosfolipasa. Para la purificación de esta molécula se realizó mediante precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico. Los resultados de este proyecto de investigación aportan un nuevo conocimiento que genera innovadoras propuestas para futuras aplicaciones de toxinas citolíticas.

Marco Teórico

Phylum Cnidaria

Los animales pertenecientes a este Phylum son invertebrados muy antiguos, con más de 11000 especies ⁸, tienen simetría radial, son diblásticos (su desarrollo embrionario termina en la fase de gástrula, por lo que sólo poseen dos capas celulares, ectodermo y endodermo), presentan alternancia de generaciones entre la forma sésil y bentónica (Figura 1) ¹⁸. La principal característica de estos animales es la presencia de células especializadas llamadas cnidocitos (Figura 2), células encargadas de formar cnida: nematocistos, espirocistos y pticocistos, estos dos últimos exclusivos de la clase Anthozoa ¹⁹. Los cnida son vacuolas derivadas del aparato de Golgi que, una vez maduras, el nematocisto queda compuesto por la cápsula, un túbulo que está provisto de espinas (Figura 2A), y el cnidocilio que reacciona ante estímulos químicos o físicos ²⁰. Los cnidarios usan estas estructuras principalmente para depredación o defensa, ya que se le atribuye la función de inocular una mezcla de componentes tóxicos que ayudan en el envenenamiento de la presa ²¹.

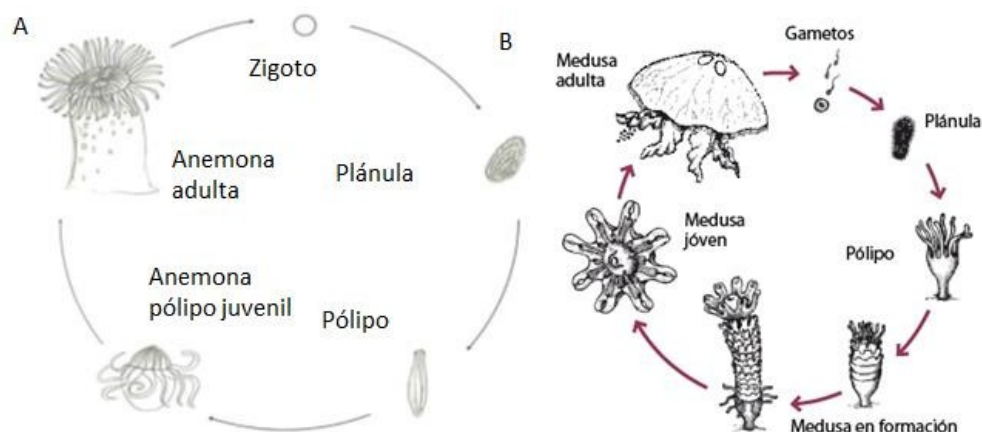


Figura 1. Ciclo de vida en el Phylum Cnidaria. A) Reproducción de la clase Anthozoa (forma de vida sésil). Modificado ². B) Reproducción en la clase Medusozoa (forma de vida sésil, libre o bentónica) ²².

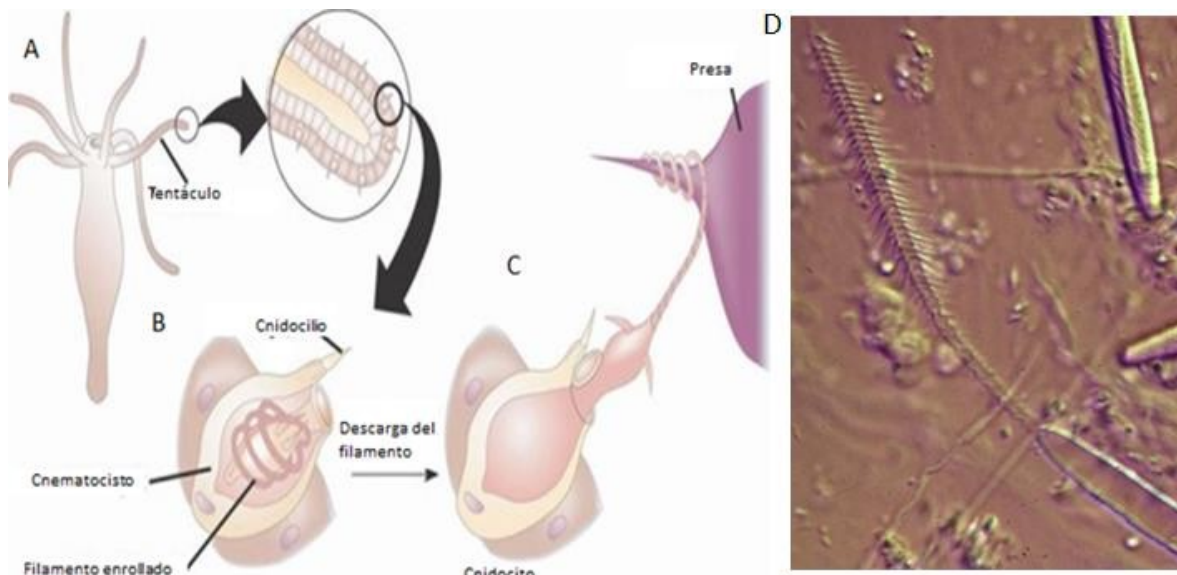


Figura 2. Anatomía general de cnidocito. A) Vista superficial de tentáculo de un organismo hidrozario. B) Cnidocito intacto. C) Descarga del filamento a través del opérculo. Modificado ²³. D) Micrografía de nematocisto descargado. Modificado ²⁴.

Existen cinco clases para este Phylum, Anthozoa, Schyphozoa, Cubozoa, Hydrozoa y la más reciente Staurozoa ⁸. Presentan una amplia distribución, principalmente en los trópicos, aunque también se les encuentra en zonas árticas y mar profundo.

Clase Anthozoa

Dentro de este grupo encontramos, corales blandos y duros, así como anémonas. Comprende un aproximado de más de 7500 especies conocidas ⁸ siendo la más diversa en el Phylum; pueden vivir de manera solitaria o en colonias, tienen reproducción sexual y asexual; también una amplia distribución por todo el mundo, todos los miembros son marinos y solo presentan fase pólipo en su ciclo de vida. Esta clase se divide en dos subclases, Hexacorallia y Octocorallia, en donde Hexacorallia posee dos órdenes, Actiniaria y Zoantharia ⁸.

En el orden Actiniaria se encuentran alrededor de 1000 especies distribuidas en 41 familias. En este orden se agrupan las anémonas las cuales viven de manera solitaria o clonales (individuos idénticos al progenitor, gemación) pero no coloniales, carecen de esqueleto calcáreo, aunque algunas secretan una cutícula quitinosa; su anatomía general (Figura 3A) comprende tres divisiones principales: el disco oral, columna y disco pedal. La composición epitelial externa de las anémonas presenta células mioepiteliales (células epiteliales capaces de contraerse como los músculos lisos), bordes granulares de células

epiteliales, células sensoriales y nematocistos, así como células glandulares. La siguiente capa que los conforma es la mesoglea, la cual es derivada del ectodermo y no produce órganos complejos como en metazoos triploblásticos (acelomados, pseudoacelomados y celomados). La última capa endodermo, constituye el tubo digestivo, llamado gastrodermis el cual está constituido por células glandulares enzimáticas, células glandulares de mucosa, mioepiteliales. En algunas especies de anémona del género *Anthopleura*, se pueden observar estructuras especializadas, tales como la acrorragia, los cuales son proyecciones del mesenterio cubiertos de nematocistos y verrugas adhesivas presumiblemente como protección y adhesión ^{18,21,25}.

La reproducción de las anémonas puede ser de dos tipos, reproducción sexual la cual produce un cigoto, plánula, un organismo juvenil y finalmente una anémona adulta (Figura 1A), mientras en la reproducción asexual, encontramos dos tipos de gemación: fisión longitudinal y laceración pedal. El disco pedal prolifera y la anémona simplemente se mueve dejando atrás fracciones de su disco pedal, que posteriormente se desarrollarán en anémonas juveniles, llamadas clonas ¹⁸. Resulta conveniente poseer dos tipos de reproducción, ya que de esa forma los organismos aseguran su descendencia, dependiendo de las condiciones en las que se encuentre la anémona, por ejemplo, estrés ambiental (salinidad, nivel intermareal, etc.), nutrición y tamaño de la anémona ^{26,27}.

Algunas especies de anémonas exhiben interacciones de mutualismo con peces del género *Amphiprion* y *Dascyllus*. Se ha visto que estos organismos alteran su moco tal vez por la acumulación de moco de la propia anémona para no ser atacados por los nematocistos ²⁸, y con crustáceos del género *Periclimenes*. La relación simbiótica que tienen con algunas cianobacterias les proporciona sus coloraciones, estas algas conocidas como Zooxanthellae les proporcionan oxígeno y azúcares a la anémona y se desarrollan en los tejidos de estos, como la epidermis y gastrodermis ²⁹.

Anthopleura dowii Verrill, 1869

La especie de anémona con la que se trabajará presenta la siguiente taxonomía ³⁰.

Reino Animalia

Phylum Cnidaria

Clase Anthozoa

Subclase Hexacorallia

Orden Actiniaria

Familia Actiniidae

A.dowii habita en zona intermareal, presentes en la península de Baja California, México hasta Panamá, presenta tamaños de hasta 10 cm de radio con los tentáculos extendidos, coloraciones del disco oral van de rojizo, marrón o naranja, los tentáculos son delgados, y presentan de tres a cuatro ciclos (pares de seis alrededor del disco oral) de tentáculos; la columna presenta arrugas adhesivas y posee coloraciones como el marrón a verde opaco, el acrorhagi es de color blanquecino, y está ubicado en el margen de la parte superior de la columna (Figura 3B) ^{31,32}. Estos organismos son carnívoros, y con la ayuda de sus nematocistos provistos en los tentáculos capturan a su presa para metabolizarlo en el celenterón y gastrodermis. Al carecer de sistema circulatorio la cavidad gastrovascular distribuye los componentes, internalizando los nutrientes a través de vacuolas; el desperdicio de alimento es arrojado por la misma cavidad oral ¹⁸.

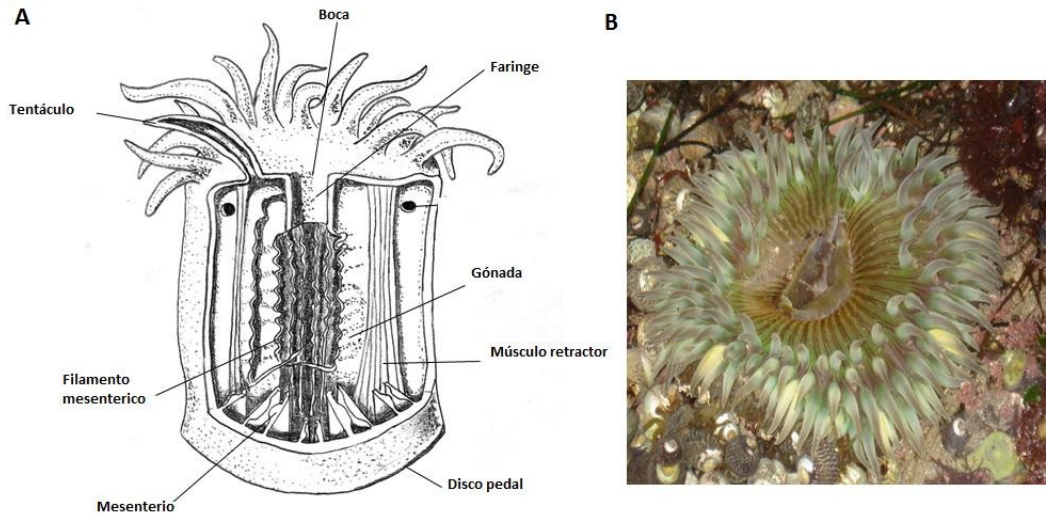


Figura 3. Anatomía general de anémonas. A) Vista longitudinal de anémona con los distintos órganos que presenta, modificado ³³. B) fotografía de *A. dowii*.

Toxinas

Las toxinas son aquellas moléculas capaces de generar alguna alteración celular, produciendo reacciones sistémicas y locales, generadas por grupos celulares especializadas en animales (glándulas venenosas) o como metabolitos secundarios en plantas y microorganismos ^{34–36}. Estas moléculas tóxicas han sido seleccionadas a lo largo de la historia evolutiva de los organismos que los presentan dándoles una ventaja de supervivencia ^{36,37}. La mayoría de los compuestos presentes en los venenos de animales tienen una tasa evolutiva muy alta dado que presentan diversas funciones para los organismos, como lo es el conseguir alimento, defensa intra o inter específica ^{38,39}. La clasificación de estos compuestos está dada principalmente por el daño que pueda provocar (células o tejidos blanco) y su origen ³⁵. El estudio de estos compuestos ha sido de gran interés ya que, pudiendo comprender sus mecanismos de acción, origen y formas de inhibición permitirá el diseño y su posible aplicación de los compuestos tóxicos como herramientas en distintos campos como farmacología y biotecnología ^{7,36}.

El veneno de los organismos que pertenecen al orden Actiniaria, presenta una composición diversa ^{2,3,6}, se han identificado enzimas (fosfolipasas, metaloproteasas, etc.) ⁴⁰, inhibidores de proteasas, polipéptidos y péptidos pequeños que actúan en su mayoría como neurotoxinas, así como moléculas no proteicas como aminas biogénicas (histamina,

serotonina, etc.), betaínas (derivados de colina) entre otros ¹.

Membrana celular

Del veneno de las anémonas, las citolisinas son de las moléculas más estudiadas. Su modo de acción es atacar la membrana celular mediante la hidrólisis de lípidos (fosfolipasa) ⁴¹ o alterando la biofísica de esta estructura celular mediante la formación de poros ⁴². A continuación, se describe un panorama general de la membrana celular.

La membrana celular tiene como principal función delimitar a la célula de su entorno, permitiéndole crear así un ambiente propio donde llevar a cabo sus procesos metabólicos ⁴³. De esta manera la membrana es altamente selectiva con las sustancias que son transportadas a través de ella ⁴⁴. Entre otra de sus funciones se encuentra la comunicación con otras células a través de los mismos lípidos que la componen, para llevar a cabo procesos tales como hemostasis (proceso de coagulación sanguínea), sistema endócrino de mamíferos, sistema inmune, etc. ⁴⁵.

Así bien, la homeostasis celular puede verse comprometida por daños causados a la membrana, su papel es de vital importancia y existen muchas maneras de comprometer su integridad, pudiendo ser afectada por daño mecánico ⁴⁶, cambios de temperatura, compuestos químicos ⁴⁷, e incluso componentes enzimáticos ³⁴.

La composición de la membrana celular está principalmente dada por fosfolípidos, esteroides y grasas. En la membrana celular se encuentran mayormente tres tipos de lípidos: los fosfoglicéridos son los más abundantes, entre ellos la fosfatidilcolina, cuya composición está dada por dos acilos grasos generalmente uno insaturado y otro saturado unidos por enlaces éster a los grupos –OH en la posición 1 y 2 de una molécula de glicerol 3-fosfato. La longitud y saturación de sus ácidos grasos así como los grupos unidos al R3 del glicerol o al grupo fosfato le conceden características químicas fundamentales como lo es contar con un extremo hidrofílico y un extremo hidrofóbico (Figura 4A), el cual ayudará en el ensamblaje automático de estos para formar la bicapa celular (Figura 4B) ⁴⁸, entre otras estructuras como micelas o liposomas, la distribución y abundancia de estas moléculas se verá en función en cada tipo de célula ⁴⁹.

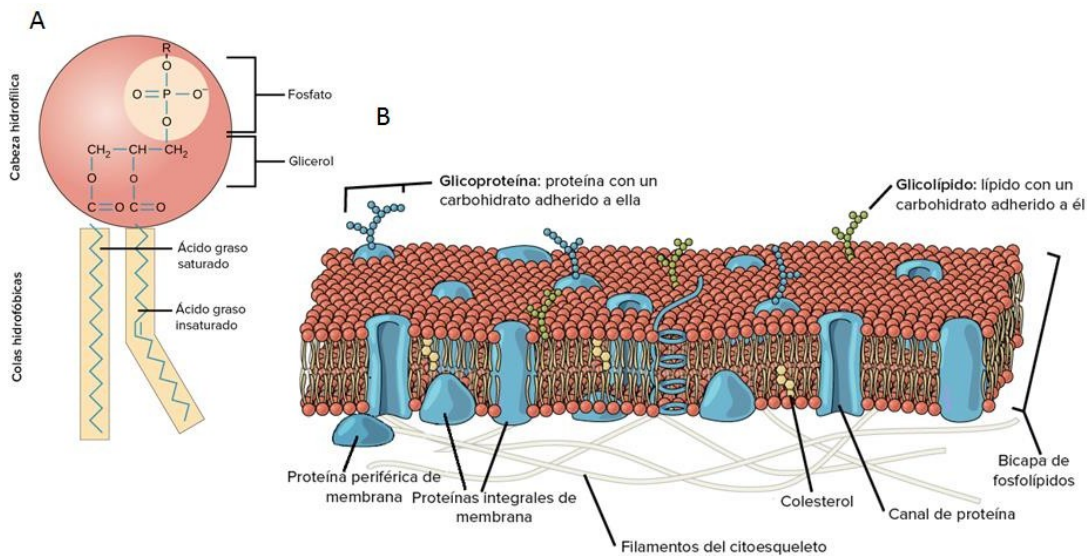


Figura 4. Fosfolípidos en la membrana celular. A) Estructura general de un glicerofosfolípido, por la naturaleza de los distintos elementos que los componen adquieren una organización anfipática, donde la cabeza que presenta cargas parciales interactúa con grupos polares, mientras los acilos grasos representan los grupos hidrofóbicos. B) Estructura general una bicapa lipídica con sus distintos componentes proteicos y lipídicos. modificado ⁵⁰.

Otro grupo importante de fosfolípidos presentes en la membrana celular, son los esfingolípidos, los cuales son derivados del aminoalcohol de cadena larga esfingosina, los cuales tienen un ácido graso unido al grupo amida en la posición 2, y en modificaciones posteriores, mediante la adición al -OH del carbono 1 como fosfocolina o azúcares recibe el nombre de esfingomielina o glucoesfingolípidos respectivamente (Figura 5) ⁵¹. Los glucoglicerolípidos, el cual son glicerofosfolípidos con un azúcar unido también juegan funciones importantes en la membrana plasmática, son poco frecuentes en membranas animales, no así en membranas vegetales y bacterianas ³⁴.

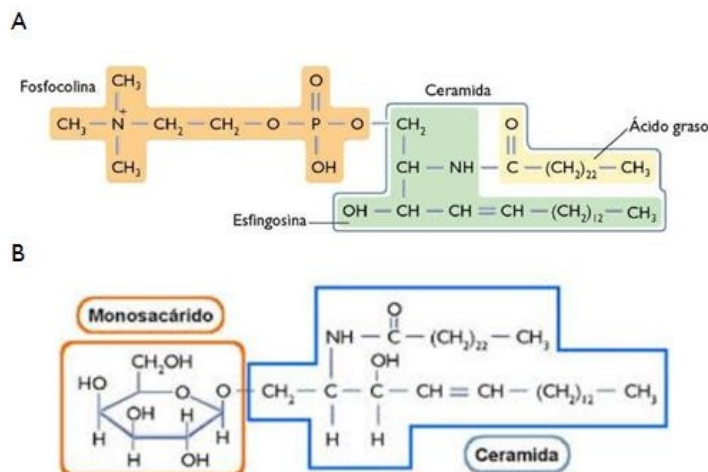


Figura 5. Estructura general de lípidos derivados de esfingosina. A) Esfingomielina, el cual es el segundo componente lipídico con mayor relevancia en la membrana celular. B) Glucoesfingolípidos, los cuales son especialmente frecuentes en membranas de células nerviosas. Modificado ⁵².

Una de las particularidades que se presenta en la membrana celular es la distribución lipídica en donde se hayan agrupaciones especializadas en diferentes bioactividades, como la señalización y dinámica celular ⁵³, llamadas balsas lipídicas (“Lipid rafts”) (Figura 6), cuya composición está principalmente dada por esfingolípidos con ácidos grasos en su mayoría saturados, colesterol el cual juega un papel importante en la rigidez y, proteínas transmembranales que son específicas de esta agrupación y que son variables dándoles identidad, esta combinación de moléculas le permite tener una mayor rigidez y compactación que cualquier otra zona membranaral ⁵⁴ así como le confiere resistencia contra detergentes como el Tritón-100 ⁵⁵. Estas regiones, aunque son pequeñas zonas en la membrana, tienen una amplia distribución y abundancia pudiendo representar hasta el 50% de la superficie total de la membrana celular, además de que es sitio blanco de virus y patógenos para la célula y por ello también está implicado en procesos inmunológicos ⁵⁶.

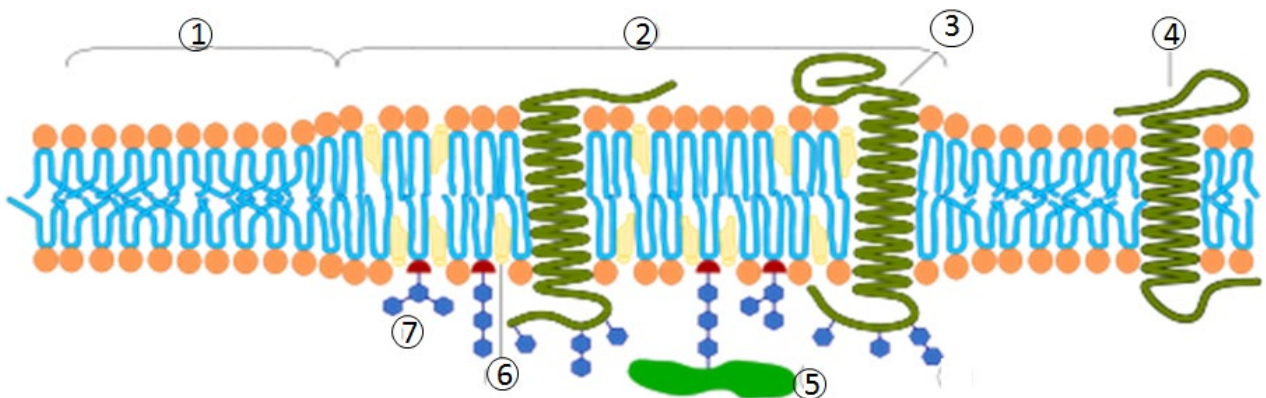


Figura 6. Esquema de balsas lipídicas y sus distintos componentes. 1) Membrana sin balsa lipídica. 2) Balsa de membrana. 3) Proteína transmembranal asociada a balsa lipídica. 4) Proteína transmembranal no asociada a balsa lipídica. 5) Proteína con anclaje GPI. 6) Colesterol. 7) Glicolípido. Modificado ⁵⁷.

Antecedentes

De las citolisinas que se han identificado en anémonas podemos mencionar dos grupos importantes, la primera es una enzima que hidroliza el éster en la segunda posición de los fosfolípidos y así libera un ácido graso y un lisofosfolípido, las fosfolipasas tipo A2 son ampliamente distribuidas en los venenos de muchos animales, no así se les adjudica esta exclusiva función, sino que se les encuentra en las células llevando a cabo varias funciones metabólicas ^{41,51,58,59}. El otro gran grupo citolítico de las anémonas son las formadoras de poro, estas proteínas no enzimáticas se pueden dividir en cuatro grupos teniendo en cuenta

su peso molecular, 1) péptidos con actividad antihistamínica de 5 - 8 kDa cuya actividad hemolítica es menor en comparación con las de mayor peso molecular ⁶⁰; 2) formadoras de poro inhibidas por esfingomiélin, 20 kDa son las más representativas en anémonas las cuales son las más estudiadas; 3) citolisinas con o sin actividad fosfolipasa A2, 30 - 40 kDa que presentan residuos de cisteína además de ser cardioestimuladoras ⁵; 4) y por último el grupo con un único integrante hasta ahora, representado por metridiolisina de *Metridium senile* con un peso de 80 kDa la cual es inhibida por colesterol ⁴¹. El estudio de estas moléculas ofrece una gran oportunidad para entender las interacciones entre proteína y membrana celular así como sus posibles aplicaciones en el ámbito biotecnológico ^{4,7,61}.

Actinoporinas

Dentro del orden Actiniaria se han identificado proteínas con capacidad lítica exclusivas de este orden ^{40,62}. Este subgrupo es denominado actinoporinas ⁶³. Estas moléculas son clasificadas en el grupo de las citolisinas de 20 kDa y de las α -PFT (PFT por las siglas en inglés, Pore Forming Toxins) ⁶⁴, cuyo modo de acción es el ensamblaje de monómeros en la bicapa lipídica para así formar poros selectivos catiónicos afectando el flujo de componentes que alteran la homeostasis celular, si bien no son los únicos organismos en producir toxinas formadoras de poro ⁶⁴, han llamado la atención por la gran estabilidad que tienen y la afinidad que presentan con los distintos componentes lipídicos que conforman la membrana, y que es de gran interés para el estudio de interacciones en la membrana celular ^{42,64,65}.

Hoy en día los géneros más estudiados sobre la composición de sus venenos son *Actinia*, *Anthopleura*, *Heteractis*, *Stichodactyla*, *Nematostella*, entre otros (Tabla 1) ⁶⁶. Las actinoporinas más estudiadas y mejor caracterizadas son las Equinotoxina II (EqtlII) de la anémona *Actinia equina* ⁶⁷, Fragaceatoxina C (FraC) de *Actinia fragacea* ⁶⁸, y las Sticolisinas I y II (Stn I y II) de *Stichodactyla helianthus* ⁶⁹, las RTX-A, -G, -S y -SII de *Heteractis crista* ⁷⁰ y magnificalisina I y II, HMgIII de *Heteractis magnifica* de las cuales se sabe que tienen una alta identidad en secuencia y de igual manera su estructura tridimensional está muy bien conservada (Figura 7), la cual consta de un sándwich- β que contiene dos láminas β que a su vez está conformado por cinco cadenas β asociada con dos α -hélice a los lados ^{9,64}.

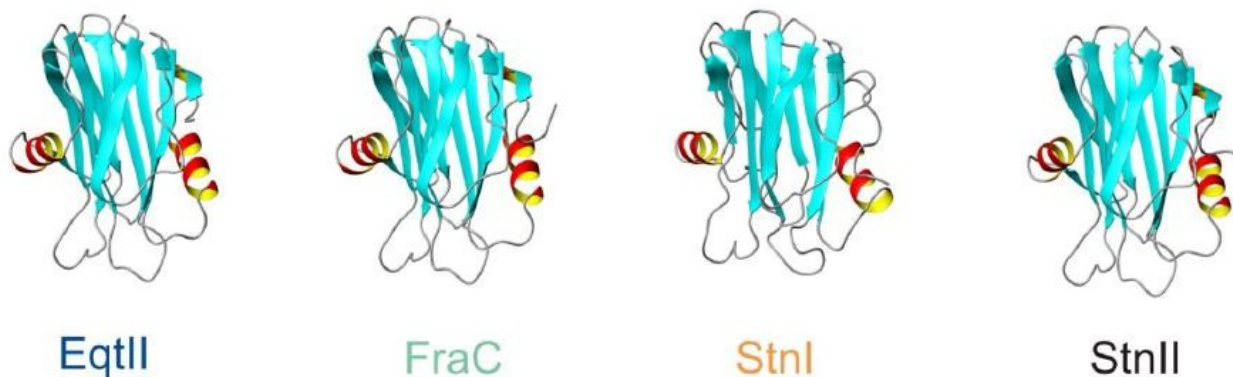


Figura 7 Actinoporinas mejor caracterizadas, EqtlI (PDB- 1IAZ), FraC (PDB- 4WDC), StnI (PDB- 2KS4) y StnII (PDB- 1GWY). Modificada ⁶⁵.

Tabla 1. Trabajos más destacables sobre actinoporinas en las especies mejor estudiadas donde se aplica en distintos modelos biológicos para evaluar el efecto que pueden provocar las actinoporinas.

Especie	Toxina	Efectos observados	Modelo Biológico	Potencia de la toxina*	Referencia
<i>Stichodactyla gigantea</i>	Gigantoxin-4	Efectos cardiovasculares y respiratorios en ratas. Citolítica.	Ratas SD y eritrocitos humanos.	HA ₅₀ =40 ng/ml (eritrocitos); 30 ng/kg provoca fallas cardiovasculares en ratas SD y muerte con 60 µg/kg	⁷¹
<i>Actinia equina, Bunodosoma caissarum</i>	EqtlI y Bc2	Factor de dispersión de drogas anticancerígena	Glioblastomas de humano (líneas celulares U87 y A172)	Cytosine arabinoside, inhibidor de DNAP (Ara-C) IC ₃₀ = 8.4 µmol/l. Ara-C + EqtlI IC ₃₀ = 0.5 mmol/l Ara-C + Bc2 IC ₃₀ = 0.6 mmol/l	⁷²
<i>Heteractis magnifica</i>	Magnificalisina I y II, HMgIII	Citolisina	Eritrocitos humanos	Magnificalisina I= 3.6 HU/mg Magnificalisina II= 3.3 HU/mg	⁷³
<i>Actinia fragacea</i>	FraC	Estudio de interacción lípido-proteína; estudio cristalográfico	Liposoma 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfolina (DOPC)-esfingomielina (SM) 1:1	Calorimetría isotérmica de titulación KD=0.22±0.04 mM	^{74,75}
<i>Stychodactyla helianthus</i>	Stn I y II	Citolítica	Eritrocito de humano, Lipid Unilaminar Vesicles (LUVs)	UH ₅₀ StnI= 3.0 mM; UH ₅₀ StnII= 0.4 mM.	⁶⁵

<i>Stychodactyla helianthus</i>	HT (toxina hemolítica)	Inmunotoxicidad	Eritrocitos humanos; células monoclonales mielocíticas HL-60; células mononucleares periféricas humanas, ratón in vivo	Eritrocitos: - ± 0.06 (75) µg/mL, Células HL-60: ED ₅₀ : 2.5 µg/mL, Células periféricas: ED ₅₀ : 1 µg/mL, Ratón: LD ₅₀ : 2.8 mg/Kg.
--	------------------------	-----------------	--	--

*HA50: Hemolytic activity por sus siglas en inglés, es la concentración de proteína que lisa el 50% de eritrocitos.

*IC30 y 50: Concentración que induce el 30% y 50% de citotoxicidad.

*HU: Hemolytic unit por sus siglas en inglés.

*ED50: Cantidad de inmunotoxina requerida para dar el 50% de inhibición de síntesis de proteínas en las células después de 4h.

*LD50: Lethal dose por sus siglas en inglés.

Estas proteínas son producidas como monómeros solubles cuya formación de poro se puede describir en tres pasos ^{64,75} (Figura 8A).

1. Los monómeros se unen con el receptor/aceptor membranal, mayormente lípidos siendo el más común es esfingomiolina (SM), aunque puede haber otros receptores como glicolípidos o glicoproteínas.
2. La mayoría de los monómeros se ensamblan en la membrana celular mediante cambios conformacionales en el N-terminal (Figura 8B) que consta en gran parte de aminoácidos hidrofóbicos el cual logra insertarse en la bicapa
3. Oligomerización de los monómeros.

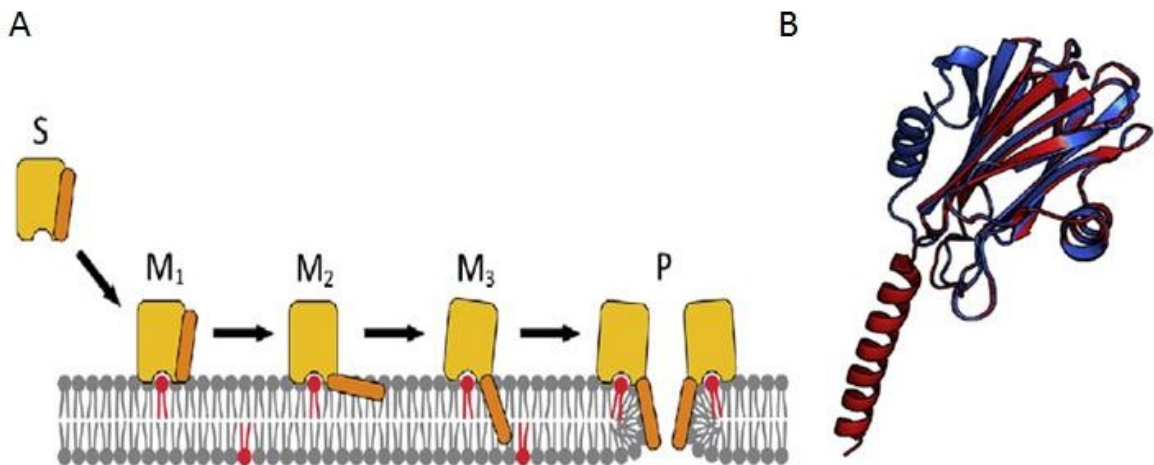


Figura 8. Modelo de formación de poro de Actinoporinas. A) Monómero soluble (S) se une a receptor lipídico (M1), la α -hélice es transferida a la interfase lípido-agua de la membrana (M2) inserción del α -hélice en la bicapa lipídica (M3) formación del poro (P). B) Estructura 3-D de FraC en el cual se observa los cambios conformacionales de elongación del α -hélice del N-terminal y que se mueve lejos del Sándwich- β estable, el cual esta propuesto como la fracción transmembranal. Modificado ⁹.

El tamaño del poro para estos complejos puede ser variable dependiendo del número de monómeros que formen el poro, pueden ir de 4 a 50 y dictan el tamaño del poro que puede ser de 1 a 30 nm y las moléculas que viajen a través de él irán en dependencia del tamaño del poro que les permita el acceso ^{10,64,77}. En FraC se ha comprobado la oligomerización de hasta ocho moléculas componiendo el poro ⁷⁸.

Se propone que la SM no solo funge como receptor, sino que también participa en el ensamblaje de los monómeros en la bicapa, llenando las perforaciones de los poros del α -hélice ensamblada en la bicapa ⁷⁷, así pues se ha visto la inhibición de la formación del poro con previa incubación de actinoporina y SM ^{64,79}. Aunque la SM no es el único receptor que se ha visto interactuando para la unión de los monómeros con la membrana ^{9,80} se ha propuesto

que le es favorable los sitios con dominios en la membrana como lo son las balsas lipídicas ⁸¹ las cuales son ricas en SM y colesterol.

Aplicaciones

Las toxinas en general son de gran interés no solo por su impacto sobre el sector salud a nivel mundial, sino porque entre otras aplicaciones el estudio de estas moléculas permite desarrollar alternativas para enfermedades o padecimientos que necesitan de un catalizador más selectivo, tal es el caso de las proteínas quiméricas que han tenido un gran auge en las últimas décadas por su especificidad, entre las más destacables están las inmunotoxinas las cuales son una de las posibles aplicaciones donde se puede emplear las citolisinas.

Hoy en día se administran tratamientos para padecimientos como el cáncer que son bastante dañinos ⁸², ya que los medicamentos son inespecíficos para células normales y células cancerígenas, como por ejemplo las antraciclinas las cuales actúan a nivel del ciclo celular de las células anormales alterando la replicación del ADN y que fueron aislados de hongos del género *Streptomyces* ⁸³; otros son los antimetabolitos que se clasifican de acuerdo a la sustancia con la que interfieren como Ara-C que es antagonista de la pirimidina ⁸⁴, o los alcaloides de plantas como vincristina el cual es un potente inhibidor de la topoisomerasa ⁸², todas estos tratamientos contra el cáncer presentan una serie de efectos secundarios severos, desde disminución de glóbulos rojos y blancos, mareos, náusea, hasta problemas neurodegenerativos y cardiovasculares ⁸⁵.

Es por ello que se busca, mediante el empleo de proteínas recombinantes, desarrollar tratamientos que sean específicos y menos dañinos sobre el paciente. Uno de los problemas a los que se enfrenta el desarrollo de nuevos medicamentos contra distintos tipos de cáncer son las características que presentan estas células al compactar y alterar la composición lipídica en la membrana, haciendo difícil la internalización de las sustancias ⁸⁶. Por esta razón que las citolisinas, al actuar sobre la membrana celular son un modelo idóneo para el tratamiento de algunos tipos de cáncer, dado que se ha observado que hay cánceres en los que se puede encontrar más concentración de SM que en células normales hacen de las actinoporinas que cuentan con una preferencia de unión por dicho fosfolípido, un modelo de estudio muy interesante para su posible explotación en este campo ⁸⁶.

Las inmunotoxinas son proteínas recombinantes o quiméricas donde se emplean

anticuerpos monoclonales y toxinas de distinto origen, con el fin de obtener una actividad específica ⁸⁷ sobre células blanco como las cancerígenas, células infectadas, células parasitarias o un conjunto de células normales.

La primera inmunotoxina en base a una actinoporina en la que se trabajó fue con la fracción hemolítica de *Stichodactyla helianthus*, ésta se conjugó con un anticuerpo monoclonal (mAb por sus siglas en inglés monoclonal antibody) que reconocía el receptor IOR-T6 de linfocitos T inmaduros mediante puentes disulfuro artificiales ⁷⁶ en este primer trabajo, el híbrido IOR-T6-HT no mostró actividad hemolítica a menos que fuera reducido y se observó una toxicidad contra las células que expresaban el antígeno IOR-T6; en un segundo estudio la EqtII de *Actinia equina* se recombinó con un mAb (IOR-C5) que reconoce el antígeno IOR-C2 de tumor de colon línea celular SW 948, en este trabajo se demostró que al unir a la actinoporina con el anticuerpo, la citolisina es siete veces más efectiva que la citolisina sola ⁸⁸. La EqtII se conjugó con la Transferrina (Tfn) que es un potente inmunógeno para varios tipos de tumores, en este trabajo se vio que la previa incubación con Tfn y SM disminuyen la actividad de la inmunotoxina para actuar sobre línea celular de linfoma de Burkitt humano ⁸⁹ (Figura 9). Otro ejemplo son las EqtII de *A. equina* y Bc2 de *B. caussarum* que en concentraciones nano molares facilita la entrada de agentes quimioterapéuticos (Ver Tabla 1), de esta manera se puede reducir el daño provocado por las altas dosis de estos medicamentos y prevenir sus efectos secundarios ^{4,72}.

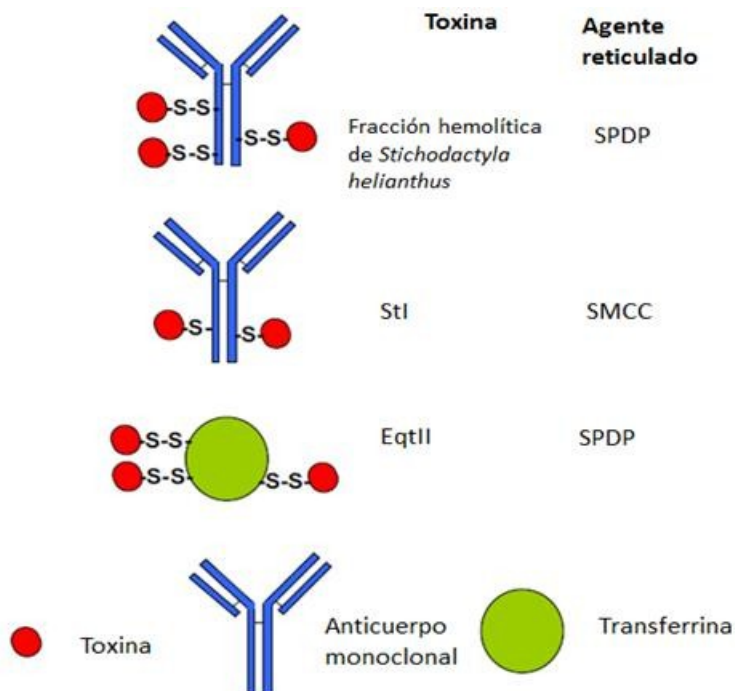


Figura 9. Esquema de las primeras inmunotoxinas desarrolladas a partir de actinoporinas. Los agentes reticulados son las moléculas que se utilizaron para unir las proteínas que formarían la inmunotoxina, SPDP (N-succinimidil 3- (2-piridilditio) propionato), SMCC (sulfosuccinimidil 4- (N-maleimidometil) - ciclohexano-1-carboxilato). Modificado ⁴

Otro de los campos en donde las citolisinas formadoras de poro han tenido un gran impacto es en el diseño de nanoporos, en donde se busca nuevas herramientas para el análisis de moléculas dentro de una gran gama de analitos.

Los nanoporos son sensores que detectan moléculas individuales basadas en la alteración o bloqueo parcial de la corriente eléctrica generada por moléculas que pasan a través de ellos, pueden ser clasificados como sintéticos o mejor conocidos como nanoporos de estado sólido (solid-state nanopores) los cuales son hoyos de escala nanométrica perforados en membranas delgadas de grafeno, nitrado de silicona, etc., o de naturaleza biológica los cuales son poros proteicos anclados a bicapas fosfolípicas, o así bien, híbridos ⁹⁰. Los nanoporos están anclados a una membrana con dos compartimentos (cis y trans) que contiene una solución de electrolitos y electrodos, la técnica se basa en que, cuando un voltaje de polarización se aplica a través de la membrana el paso de iones por el nanoporo genera una corriente constante que indica un poro abierto, cuando una molécula difunde a través del poro el flujo iónico es parcialmente interrumpido y resulta en un cambio en la corriente iónica que es detectado como una señal eléctrica ^{91,92}. Esta técnica se llama pulso resistivo, y durante el proceso permite conocer el volumen, concentración de la muestra además de la interacción que tiene con el poro ^{90,93}.

En 1993 Bezrukov *et al.* ⁹⁴ hicieron el primer reporte de detección de ácidos nucleicos en poros proteicos, en el cual moléculas de ARN y ADN monocatenario (ssDNA, single-stranded DNA) fueron electroforéticamente dirigidas a través de la toxina α hemolisina de *Staphylococcus aureus* (α -HL), y la traslocación de estas moléculas condujo a modulaciones de corriente, estas fueron correspondientes a la concentración del analito, mientras que la duración del bloqueo fue proporcional al largo de las moléculas ⁹⁴.

Recientemente en el 2016, Wloka *et al.* ⁹⁵ diseñaron poros usando FraC en donde se analizó homopolímeros de ssADN a diferentes potenciales y pH

Algunas de las ventajas del uso de los poros silvestres para la detección de analitos es la reproducibilidad a nivel atómico que a menos que sea modificado puntualmente mantendrá su geometría, forma y propiedades superficiales; los poros proteicos cuentan con la especificidad de la que carecen los nanoporos sintéticos, además pueden ser modificados

para extender la capacidad de estabilidad ^{93,96,97}.

Fosfolipasa

Otra molécula con capacidad lítica que se ha identificado en los venenos de anémonas es la Fosfolipasa A2 (PLA2) ^{1,15}. Esta molécula se clasifica de acuerdo al sitio de corte que tienen en el glicerofosfolípido (GPL) (Figura 10A). La PLA2 hidroliza la unión éster del sn-2 de GPL ⁹⁸, liberando un ácido graso (generalmente ácido araquidónico) y un lisofosfolípido ⁹⁹. Esta enzima está implicada en muchos procesos metabólicos ⁵⁸, principalmente en el remodelamiento de lípidos en la membrana celular, procesos del sistema inmune, como defensa en venenos o procesos metabólicos ^{15,100,101}.

Otra clasificación que se le puede adjudicar es por el sitio celular donde se encuentra, fosfolipasas citosólicas (cPLA2), fosfolipasas secretorias (sPLA2), fosfolipasas lisosomales (IPLA2), factores activadores plaquetarios (PAF-AC PLA2 por sus siglas en inglés) y fosfolipasas citosólicas independiente de calcio (Figura 10B) ^{98,102}; que a su vez están ampliamente distribuidas y actualmente están clasificadas en dieciséis grupos con sus respectivos subgrupos ¹⁶.

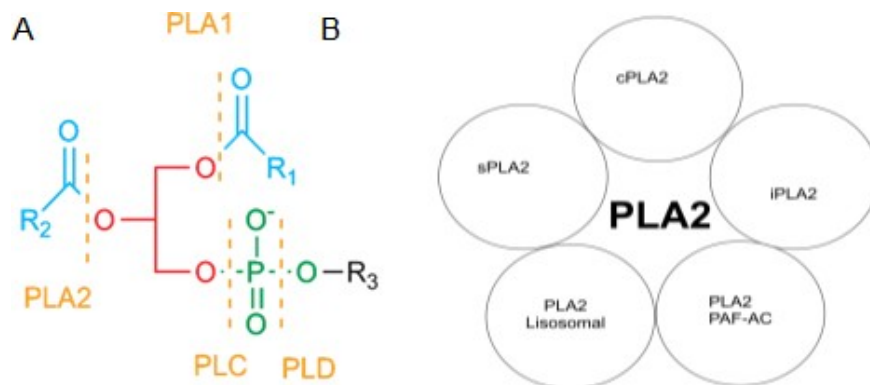


Figura 10. Clasificación de fosfolipasa A) De acuerdo a su sitio de corte, PLA1 hidroliza la unión éster del acilo graso unido en la posición uno del fosfoglicérido, PLA2 corta en la posición dos, PLC corta el enlace diéster fosfórico y finalmente la PLD actúa en el sitio de unión entre el fosfato y el grupo R ¹⁰³. B) Las PLA2 se clasifican también de acuerdo a la ubicación celular donde se ha visto que actúan ⁵⁸.

Las PLA2 son moléculas consideradas como citolisinas por el daño que causan hidrolizando los GPL de la membrana celular, que por su amplia distribución en venenos de muchos organismos lo han desarrollado como una herramienta, principalmente para metabolizar a sus presas, como factor de dispersión de los demás componentes del veneno, o

para infligir daño a depredadores, así bien las PLA2 en anémonas no han sido tan ampliamente estudiadas, al contrario de las bien caracterizadas en serpientes y arácnidos ¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. La PLA2 no solo provoca daño en la membrana directamente hidrolizando sus fosfolípidos sino también indirectamente a través de sus productos ^{100,107}, los lisofosfolípidos tienen acción de detergente y de esta manera emulsionan los lípidos ¹⁷ de la membrana afectando la estabilidad, estos están implicados de manera natural en formar parte de la membrana celular para auxiliar en el transporte pasivo, sin embargo en cantidades mayores daña la membrana celular alterando el transporte a través de la membrana. El ácido graso liberado generalmente es ácido araquidónico, este está vinculado en procesos inflamatorios ya que de este derivan prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos que están implicados en homeostasis y vasodilatación entre otros ¹⁰⁸.

Existen escasos trabajos en anémonas sobre PLA2, el primer trabajo reportado fue en la anémona *Aiptasia pallida* ⁴¹, siguiendo las investigaciones en UcPLA2 de *Urticina crassicornis* ¹⁰⁹, caisarolisina I de *Bunodosoma caissarum* ¹⁰¹, α - y β -PLA2 de *Aiptasia pallida* ¹⁰⁵, Anch TxI y II PLA2 de *Anthothoe chilensis* ¹⁰⁴ y CgPLA2 de *Condylactis gigantea* ¹¹⁰.

Las fosfolipasas secretorias se han identificado como enzimas con alto contenido de Cys así, algunos grupos de sPLA2 como el I, II, III, IV, V, X, XI, XII y XIV presentan de 6-8 puentes disulfuro ¹⁶, son de bajo peso molecular de entre 14-18 kDa (excepto las del grupo III) y como es sabido de las sPLA2 tienen en su sitio activo His/Asp como diada catalítica, aunque también se ha identificado una sustitución de Lys en la posición 69 en lugar del Asp (aunque las proteínas que presentan este cambio de aminoácido no presentan actividad enzimática) y son dependientes de calcio ⁹⁹. Dentro de las PLA2 identificadas en anémonas (Tabla 2), se ha encontrado que tienen una gran homología con PLA2 de grupos importantes como el I y III ⁹⁸ estos tienen agrupadas a las PLA2 de serpientes, abeja y lagartos del género *Heloderma*. Están compuestas por α - hélices, y dos laminas- β entrelazadas conocidas como alas- β , un asa de unión a calcio y la diada catalítica de His/Asp (Figura 11). También se ha visto que el ion calcio no es el único que pueden utilizar estas enzimas sino también estroncio y magnesio, aunque en concentraciones más altas ⁴¹.

La importancia del estudio de estas moléculas citolíticas permite entender las interacciones proteína-lípido ^{81,102,111}, los diferentes cambios conformacionales que puede sufrir una proteína ¹¹², las interacciones que forman las proteínas que interactúan entre sí para

formar complejos transmembranales y la futura aplicación que pueda tener ese conocimiento para campos farmacológicos, biomédicos y biotecnológicos ^{7,14} (Tabla 1 y 2).

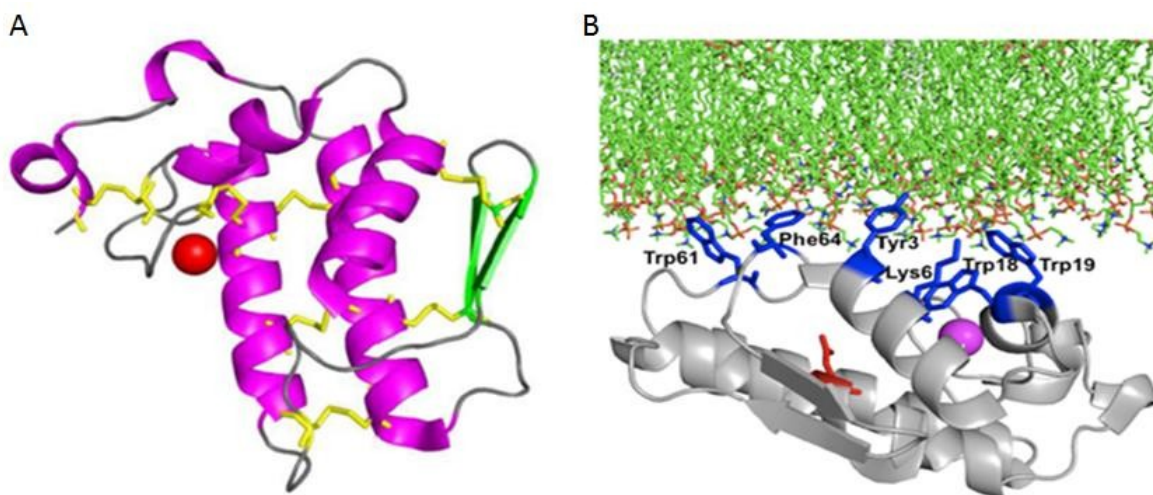


Figura 11. Representación tridimensional de fosfolipasa A2. A) Modelo estructural de PLA2 del grupo 1A, el calcio es representado por la esfera roja, y de color amarillo las uniones disulfuro. B) Representación de unión interfacial con membrana, residuos hidrofóbicos estableciendo unión con la membrana. Modificado ¹¹³.

Tabla 2. Algunas fosfolipasas A2 en anémonas de mar, modo de acción y modelos biológicos.

Especie	Toxina	Efectos observados	Modelo biológico	Referencia
<i>Urticina crassicornis</i>	UcPLA2	-	-	114
<i>Bunodosoma caissarum</i>	Caisarolisina I	Promueve efectos renales y secreción de insulina.	Efecto en riñón y en células β -pancreáticas.	101
<i>Aiptasia pallida</i>	α - y β -PLA2	-	Vesículas Tritón X-100 (TX-100) y dipalmitol fosfatidilcolina (DPPC)	105
<i>Anthothoe chilensis</i>	Anch TxI y II PLA2	Inducción de edema.	Wistar rats	104

<i>Condylactis gigantea</i>	CgPLA2	Inducción de edema, actividad anticoagulante.	Ratones machos Swiss	¹¹⁰
------------------------------------	--------	---	----------------------	----------------

Aplicaciones

Las fosfolipasas pertenecen a una de las familias de proteínas enzimáticas más utilizadas en todo el mundo, esto debido a la gran variedad de procesos en los que participan biológicamente, pudiendo extrapolarse como herramientas para la vida diaria de los seres humanos. Como se menciona previamente, las fosfolipasas participan en una gran variedad de procesos dentro y fuera de la célula y en muchos de estos procesos son independientes de la actividad catalítica; esta gran variedad de funciones, así como la especificidad varía según el grupo o subgrupo al que pertenece la fosfolipasa, estas características maleables son las que han llamado la atención de la comunidad científica en los últimos años.

Uno de los campos en los que se ha demostrado mayor potencial es en el biomedicina, las PLA2 son proteínas constitutivas de la célula, solo en humanos se pueden encontrar en mayor o menor concentración de acuerdo al tejido o sistema en el que se presente, uno de los sistemas en el que tienen mayor presencia es en el sistema inmune, donde participan como citolisinas de patógenos, se ha demostrado que estas enzimas pueden desempeñar actividades bactericidas contra bacterias Gram positivas del género *Streptococcus*¹¹⁵, se observa que para que las enzimas puedan desempeñar dicha actividad es necesaria la presencia de los carbohidratos de Lancefield, estos carbohidratos son estructurales de las paredes celulares¹¹⁶, estas son unas de las características que representan la serología de las bacterias y que es esencial para que la hGIIA (PLA2 de humano del grupo IIA) presente actividad bactericida.

Se ha demostrado que puede presentar actividad antiviral como en las cepas de VIH-1 que infectan las células linfoides en humanos¹¹⁷, en este trabajo se pusieron a prueba a más de diez fosfolipasas A2, entre las cuales se hallaban mayormente provenientes de venenos de serpiente y Heloderma, y otras PLA2 recombinantes de humano; se observó que varias pero no todas las PLA2 son capaces de inhibir la replicación del virus en etapas tempranas de la infección, la acción antiviral que demostraron estas fosfolipasas son independientes de su actividad catalítica, mostrando que estas enzimas fueron capaces de prevenir la liberación de la proteína Gag24 y así de evitar la síntesis del ADN proviral en el citosol del huésped, impidiendo que el virión se desprenda y se disocie el complejo de retro transcripción del virus al huésped.

Hipótesis

Con base a los antecedentes de citolisinas en el Phylum Cnidaria y sobre todo en el Orden Actiniaria, han demostrado gran potencial para su aplicación como herramientas biológicas en distintos campos por su variabilidad y maleabilidad, se espera identificar al menos una toxina capaz de dañar la membrana celular presente en *A. dowii*.

Justificación

Ya que la función principal de la membrana es crear un entorno adecuado para la célula y que pueda llevar a cabo su funcionamiento muchos organismos han hecho de la membrana el blanco idóneo para alterar o dañar células en específico o al azar. Una de las estrategias con mayor éxito en la naturaleza son las toxinas que actúan en la membrana ya sea para desestabilizarla, alterar su funcionamiento de selectividad o romperla, teniendo como resultado una serie de reacciones que pueden llegar incluso a la muerte celular. A lo largo de la historia evolutiva de los organismos se han desarrollado una gran variabilidad de estas moléculas capaces de dañar la membrana, entre las mejor conocidas están las de naturaleza proteica que pueden agruparse en grupo de acuerdo al tipo de función que presentan, las que actúan a nivel membrana lo hacen desestabilizando la composición de la membrana y/o sus componentes tales como sus proteínas asociadas, entre estas toxinas están presentes las neurotoxinas y metaloproteinasas; otras toxinas como las formadoras de poro y fosfolipasas, son aquellas que actúan sobre el principal componente de la membrana, los fosfolípidos, haciéndolo su medio de unión u objetivo de ataque.

Actualmente los organismos mejor estudiados son aquellos que tienen un impacto directo sobre la vida diaria de los humanos que afecta principalmente en el sector salud, entre estas se encuentran los organismos como serpientes, arañas y alacranes, los cuales tienen el mayor número de incidentes al año, seguido por los animales ponzoñosos terrestres y marinos.

Entre los animales marinos, los organismos del Phylum Cnidaria presentan una amplia distribución por lo que han aumentado los casos de envenenamiento, entre ellos la clase Anthozoa ha sido objeto de estudio por la gran diversidad de componentes presentes en su veneno, en especial las citolisinas tan características de estos organismos, las cuales cuentan con secuencias, plegamiento y modo de acción diferente a las citolisinas presentes en otros organismos. Con base a la función biológica de las citolisinas y el impacto que tienen sobre la membrana celular, se buscan nuevas propuestas para la aplicación de estas moléculas en el

campo de la biotecnología, biomedicina y farmacología.

Por tal motivo se ha considerado a la anémona *A. dowii* como un candidato en potencia para la obtención de nuevas citolisinas competentes con una futura aplicación.

Objetivo general

Identificar una molécula con actividad citolítica presente en el veneno de anémona *A. dowii*.

Objetivos particulares

- Obtener extracto crudo de la anémona *A. dowii*.
- Identificar actividad de la molécula lítica presente en el extracto crudo de la anémona *A. dowii* mediante bioensayos.
- Purificar el polipéptido con actividad lítica presente en el extracto crudo.
- Analizar estructura primaria de la citolisina de la anémona *A. dowii*.

Metodología

Objetivo 1

Obtener el extracto crudo de la anémona *A. dowii*.

Los especímenes utilizados en este trabajo fueron colectados en Ensenada, Baja California, México. Se liofilizaron y guardaron a -20°C hasta su uso. La identificación de esta especie se llevó a cabo en colaboración con la Dra. Estefanía Rodríguez, del museo de Historia Natural de Nueva York ¹¹⁸.

Extracto total.

- Cuarenta gramos del organismo liofilizado se resuspendió en 125 mL de amortiguador fosfato de sodio 50 mM a pH 7.5 (fosfato de sodio monobásico 200 mM, fosfato de sodio dibásico 200 mM, 16% y 84% v/v respectivamente) al cual se le agregó un coctel de inhibidores de proteasas (cOmplement Protease Inhibitor Cocktail, Roche).
- La muestra fue mezclada con ayuda de agitador magnético durante 12 h a 4°C.
- La muestra se sometió a tres ciclos de congelado y descongelado a -20°C.
- Para eliminar restos de tejido, se llevó dos pasos de centrifugación de 25,400 x g, 30 min a 4°C.

- El sobrenadante se mantuvo a -20°C hasta el subsecuente uso.

Determinación de la concentración de proteínas

Durante la purificación se determinó la concentración total de las proteínas, se llevó a cabo mediante el método colorimétrico de Bradford ¹¹⁹. Es una técnica sencilla y económica que con el colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 interaccionan los grupos aniónicos de los aminoácidos en las proteínas, esta reacción se detecta a una longitud de onda de 595 nm. En este método es necesario usar una proteína que sea de referencia, en este caso se usó la albúmina sérica de bovino (BSA, Bovine Serum Albumin).

Este ensayo se realizó con BSA a una concentración conocida de 1mg/mL, la Tabla 3 muestra las unidades utilizadas durante el siguiente procedimiento:

- En microtubos de 1 mL se incorporó el agua mili Q con la BSA en las cantidades establecidas en la Tabla 3.
- Se mezclaron las muestras.
- Se agregó el reactivo de Bradford, aforando a 1 mL.
- Después de cinco minutos de incubación a temperatura ambiente, se midió absorbancia en el espectrofotómetro a 595 nm.

Tabla 3. Procedimiento de ensayo colorimétrico de Bradford, utilizado durante el proyecto.

Tubo	BSA (µL)	H ₂ O mili Q (µL)	Reactivo de Bradford (µL)	Volumen total (mL)
1	-	800	200	1
2	1	799	200	1
3	3	797	200	1
4	4	796	200	1
5	5	795	200	1
6	6	794	200	1
7	7	793	200	1

- Se realizó por duplicado.
- Se obtuvo la media de acuerdo con las lecturas de BSA, que se empleó para realizar una gráfica de regresión lineal, y aplicando la fórmula de regresión lineal de “y” sobre “x”, se obtiene la ecuación de la recta, que posteriormente se despejó para obtener los

valores de concentración de las muestras.

Electroforesis SDS-PAGE

Este método de separación se basa en la movilidad de las moléculas a través de una matriz sólida aplicando un campo eléctrico ^{120,121}. Se llevó a cabo durante todo el proceso de purificación para dar seguimiento de la molécula teniendo en cuenta que en condiciones desnaturalizantes se separan por tamaño en peso molecular y en conjunto con lo ya reportado en la literatura, se espera obtener bandas en los pesos moleculares de proteínas conocidas ya antes reportadas y caracterizadas que nos indiquen la presencia de la molécula deseada. Para este proyecto se trabajó con geles SDS-PAGE a 15% de concentración de acrilamida.

Se realizó de la siguiente manera:

Preparación del gel

1. Se siguió las instrucciones del fabricante para el ensamble de los vidrios que se usaron para la electroforesis.
2. Se prepararon 8 mL de la solución para el gel resolvente a 15% de acrilamida (Tabla 4), se mezcló suavemente.
3. Inmediatamente se colocó la solución del gel resolvente en los vidrios hasta haber cubierto $\frac{3}{4}$ del volumen dejando un espacio suficiente para colocar el peine. Dejar de 10 a 15 minutos para gelificar. Cubrir con agua o etanol lo que resta de espacio entre la solución y el borde del vidrio.
4. Se procedió a preparar la solución del gel concentrador 2 mL (Tabla 4), teniendo en cuenta que el porcentaje de acrilamida, así como la solución de Tris que presenta un pH distinto utilizado en el gel concentrador es diferente al resolvente. Se mezcló suavemente.
5. Se colocó en lo que resta del espacio de los vidrios y se colocó el peine que ayuda a crear posos en los cuales se colocan las muestras. Se dejó gelificar de 10 a 15 minutos.

Tabla 4. Volúmenes que se utilizaron de las soluciones para preparar los geles de poliacrilamida, resolvente y concentrador.

Reactivo	Solución al 15% de acrilamida (8 mL)	Solución concentradora
----------	--------------------------------------	------------------------

Agua mili Q	1.8 mL	1.1 mL
Acrilamida/bis acrilamida 30%	3.9 mL	2.5 mL
Tris 1.5 M pH 8.8 (resolvedor)	1.9 mL	1.3 mL
Tris 1.5 M pH 7.5		
SDS (10%)	0.08 mL	0.05 mL
Persulfato de amonio	0.08 mL	0.05 mL
TEMED	0.005	0.002 mL

Preparación de las muestras:

1. En microtubos de 0.6 mL se procedió a colocar las muestras a evaluar, se tuvo en cuenta que debían ir de acuerdo a una concentración homogénea para todas las muestras, el volumen de cada muestra varió por la concentración independiente que tuvo, pero en general se mantuvo una concentración casi constante de 15 μg , se agregó mezcla lítica (Tabla 5), ésta de acuerdo al volumen de cada muestra se recomienda sea el 10% del volumen de acuerdo a la muestra.
2. Se mezclaron y se calentaron a 90°C durante 5 minutos. Nota: si el volumen de la muestra y la mezcla lítica es muy poco perceptible, se recomienda agregar amortiguador o agua mili Q para un mejor manejo.

Tabla 5. Composición de la solución lítica para electroforesis.

Reactivo	Concentración final
Tris 0.5, pH 7	0.125 mM
SDS 10%	2.5%
2-Mercaptoetanol	25%
Glicerol	25%
Azul de bromofenol	0.1 mg/mL

Electroforesis:

1. Se ensambló el casete que contiene el gel en la cámara electroforética guiando el vidrio pequeño hacia dentro siguiendo las instrucciones del fabricante.
2. Para asegurar que el casete estuviera bien colocado y no hubiera fugas del

amortiguador durante la corrida, se llenó hasta el borde con amortiguador 1X, el cual contiene Tris, SDS y glicina.

3. Una vez que no hubo fugas. Se procedió al cargado de muestras en los pozos que se hicieron con el peine.
4. Se conectó a la fuente eléctrica, teniendo especial cuidado en que los electrodos estuvieran en posición correcta guiándose por los colores que marca el fabricante; se encendió a la fuente eléctrica y se programó en tiempo y voltaje.

Detección de las proteínas:

1. Una vez terminada la electroforesis, se procedió a la tinción del gel para visualizar las proteínas.
2. Se retiró el casete de la cámara, se separaron los vidrios para poder sacar el gel de forma cuidadosa para evitar romperlo, se colocó en un recipiente limpio y con la base plana, se procedió con el protocolo de tinción.

Nota: Si la concentración de proteína es muy poco, se recomienda una tinción en plata, la cual es mucho más sensible que los colorantes orgánicos, como el Coomassie R-250, así permitirá visualizar todas las bandas de proteína.

Objetivo 2

Identificar actividad de la molécula lítica presente en el extracto crudo de la anémona *A. dowii* mediante bioensayos.

Ensayo de hemólisis

El primer bioensayo es el de hemólisis, que pretende evaluar la actividad lítica presente en el extracto total y sus fracciones durante la purificación, esto se midió cuantitativamente mediante la liberación de hemoglobina en eritrocitos de humano, siguiendo el protocolo de ¹²². La muestra de sangre (1 mL) de humano se obtuvo de un voluntario sano. El tratamiento que se le dio a los eritrocitos fue el siguiente.

- Un mililitro de sangre de humano se lavó tres veces con 15 mL con amortiguador Alsever (0.1 M dextrosa, 0.07 M NaCl, 0.002 M ácido cítrico y 0.027 M citrato de sodio a pH 7.5). Esto se hizo centrifugando a 804 x g 4°C durante cinco minutos, con una

pipeta se quitó el sobrenadante y los eritrocitos se resuspendieron con nuevo amortiguador así tres veces, esto se hace para eliminar plasma y células blancas.

- Los eritrocitos se calibraron para tener los grupos control, 0% de hemólisis (amortiguador + eritrocitos) y el 100% de hemólisis (agua + eritrocitos), la calibración es la manipulación del volumen del amortiguador que contiene los eritrocitos, para tener una concentración de eritrocitos de $1-2 \times 10^6$ células/ml. Las absorbancias a 415 nm del 0% de hemólisis es de 0.003 y de 100% es de 1.003, si las absorbancias eran mayores a esos valores, los eritrocitos se centrifugaban y se agregaba menos amortiguador del que tenía antes, viceversa si los valores eran menores. Este ensayo se hizo por triplicado para cada muestra o fracción durante la purificación.
- El ensayo se llevó a cabo en placas de micro titulación de 96 pozos teniendo un volumen total de 200 μ L por pozo, así en los pozos se colocó 20 μ l de solución de eritrocito, diferentes volúmenes (en dependencia de la concentración) de las fracciones a evaluar y se ajustó los volúmenes de amortiguador Alsever para el volumen final.
- Las muestras se incubaron a 37°C durante 60 min.
- Se centrifugaron a 804xg durante 5 min a 4°C.
- La cantidad de hemoglobina liberada fue monitoreada espectrofotométricamente a $\lambda = 415$ nm.

Para calcular el porcentaje de hemólisis se calculó usando la siguiente ecuación

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{(A_V - A_{\text{amortiguador}})}{(A_{\text{agua}} - A_{\text{amortiguador}})} \times 100$$

Donde A_V , $A_{\text{amortiguador}}$, A_{agua} son las absorbancias (A) de los sobrenadantes del veneno (V), amortiguador (0% hemólisis), y agua (100% hemólisis) ¹²³.

Ensayo de fosfolipasa

El segundo bioensayo que se empleó fue el ensayo de fosfolipasa el cual pretende evaluar cualitativamente la actividad enzimática de fosfolipasas presentes en el extracto de la anémona *A. dowii* a través de un sencillo ensayo en caja Petri con yema de huevo como sustrato ¹²⁴, esto debido a que la composición lipídica de la yema de huevo tiene más del 50% de fosfatidilcolina ¹²⁵ y se esperó observar halos de actividad enzimática.

- Solución A. 12 mL de yema de huevo con 36 mL de 0.86% de NaCl (este último se filtrado

con filtro de 0.22 nm).

- Solución B. 300 mg de agarosa en 50 mL de amortiguador tris (filtrado 0.22 nm) 50 mM pH 7.5.
- Solución C. CaCl₂ 10 mM (filtrada 0.22 nm).
- Solución D. Rodamina 6G (0.010 g en 1 mL).

Todas las soluciones se manejaron en condiciones estériles, para la solución A el huevo se lavó con SDS al 1% antes de extraer la yema, después se manejó en campana de extracción para preservar solo la yema de huevo y se mezcló con el NaCl, se centrifugó a 804 xg y se trabajó con el sobrenadante.

Para preparar las cajas con yema de huevo, la solución B se disolvió en microondas hasta el punto de ebullición, se enfrió en baño María hasta que alcanzó una temperatura de entre 45°- 43°C, en condiciones de esterilidad se añadió 500 µL de la solución C, 100 µL de la solución D y por último 500 µL de la solución A, una vez se mezcló suavemente, con la ayuda de una probeta estéril se midió 25 mL de solución para cada caja Petri y se dejó enfriar en campana.

Posteriormente con la ayuda de puntas de micropipeta de 20 µL se elaboran los pozos en el gel. El ensayo se hizo con las muestras del extracto total y sus resultantes durante la purificación teniendo como constante de concentración 15 µg a evaluar. Se incubó a 37°C durante veinte horas. Los ensayos de actividad de fosfolipasa se hicieron por duplicado.

Objetivo 3

Purificar el polipéptido con actividad lítica presente en el extracto crudo.

Precipitación con sulfato de amonio

El primer paso de purificación del extracto fue la precipitación con sulfato de amonio, en esta técnica las partículas precipitarán de acuerdo a su hidrosolubilidad; teniendo en cuenta que las moléculas están en contacto con el agua, añadiendo solutos al medio (en su mayoría iones (sales) aunque también suelen usarse solventes (urea, acetona, etc.) las moléculas del soluto formarán unión con el agua ¹²⁶, lo cual provoca que las moléculas presentes en el extracto precipiten debido a que no hay interacción con el agua, el sulfato de amonio es el

agente para el salting-out por excelencia, ya que de acuerdo a la serie de Hofmeister el catión amonio actúa como agente caotrópico, y el anión sulfato actuará acelerando la precipitación¹²⁷.

También lo hace ideal como primer paso de purificación ya que no desnaturaliza las proteínas y así mantienen su actividad, es bastante útil en cuanto separa los compuestos y facilita los siguientes pasos de purificación en los cuales son más selectivos¹²⁸.

Esto se hizo en agitación constante, a 4°C con la ayuda del programa que ofrece EnCor Biotechnology Inc.¹²⁹, realizó el cálculo de la cantidad de sal que se agrega en cada paso de la precipitación basándose en “Current Protocols in Protein Science”; se hizo un gradiente de (NH₄)₂SO₄: 0, 40, 50, 60, 80 y 90% de saturación.

En cada concentración de sulfato de amonio, la solución se mantuvo en saturación durante más de 1 hora, aproximadamente, para permitir que la solución llegue a un equilibrio. Después se centrifugó a 25, 400 xg durante 15 minutos a 4°C, cada precipitado se resuspendió en volúmenes distintos de amortiguador fosfatos de sodio 50 mM pH: 7.5, esto de acuerdo al tamaño del pellet para tratar de mantener las muestras en una misma cantidad de proteína total; las fracciones se dializaron contra el mismo amortiguador de fosfatos de sodio. Por último, para remover proteínas no solubles en las fracciones dializadas, se centrifugó a 25, 400 xg, 15 minutos a 4°C, y se mantuvieron a esta misma temperatura hasta su posterior uso.

Cromatografía aniónica

Como segundo paso de purificación se decidió utilizar cromatografía de intercambio aniónico con resina Sefarosa DEAE (Dietilaminoetil) para la fracción que presentó la mayor actividad hemolítica, esto siguiendo el protocolo de¹³⁰. Las técnicas de cromatografía en líquidos son ampliamente utilizadas como método de separación de moléculas en investigación e industria, las de intercambio iónico tienen como fundamento que las cargas opuestas interactúan, de este modo las cromatografías de intercambio iónico tienen una matriz estacionaria a la cual tienen unido un ligando con carga positiva o negativa que al pasar una mezcla de moléculas, estas interaccionarán de acuerdo a las cargas que presenten^{131,132}. La resina Sefarosa DEAE presenta carga positiva por lo que las proteínas presentes en el extracto que tengan una carga parcial o neta negativa interactúan y se unen con la resina y, para eluir las (separarlas de la matriz) se usa un amortiguador con solutos que al disociarse en iones compitan con las proteínas para interaccionar con la carga de la resina,

este es el principio de todas las cromatografías de intercambio iónico.

En el presente trabajo se empleó 10 mL de resina de Sefarosa DEAE la cual se regeneró de la siguiente manera

1. Cinco volúmenes de agua mili Q (50 mL).
2. Cinco volúmenes de HCl 1N.
3. Ocho volúmenes de agua mili Q para quitar el HCl.
4. Cinco volúmenes de NaOH 1M.
5. Ocho volúmenes de agua mili Q para quitar el NaOH.
6. Se equilibró la columna con tres volúmenes de amortiguador fosfatos de sodio 50 mM pH 7.5.

Se usó esta columna para separar las moléculas de la fracción de 60% la cual mostró la mayor actividad hemolítica, esta fracción presentó una concentración de 2.8 mg/mL. La resina resuelve un gramo de proteína por mililitro de resina, por lo cual se colocaron 10 mg de resina para purificar 3.6 mL de muestra y para la elución de proteínas se realizó con un gradiente escalonado con NaCl. La cromatografía se realizó de la siguiente manera:

1. Una vez equilibrada la columna se colocó la muestra a un flujo de 0.5 mL/min.
2. Se procedió a realizar tres lavados (10 mL cada uno) con amortiguador fosfatos de sodio 50 mM pH 7.5 a un flujo de 1.5 mL/min.
3. Se realizó el gradiente con NaCl: 40, 60, 80, 100, 150, 200, 300 mM a un flujo constante de 1.5 mL/min.
4. Las fracciones se colectaron de manera manual de acuerdo al perfil cromatográfico, es decir que se trató de coleccionar cada pico de absorbancia que se apreciaba conforme avanzaba la cromatografía.

Cromatografía catiónica

Esta cromatografía sigue el mismo fundamento que la cromatografía de intercambio aniónico y se utilizó para separar los compuestos proteicos de la fracción que mostró la mayor actividad de fosfolipasa, la resina CM Sefarosa está unida a una matriz de agarosa y carboximetil, este último presenta carga negativa la cual interactúa con las proteínas que presenten carga contraria.

Se usó 3 mL de resina CM Sefarosa (carboximetil) la cual se regeneró de la siguiente manera:

1. Cinco volúmenes de agua mili Q (50 mL).
2. Cinco volúmenes de NaOH 1M.
3. Ocho volúmenes de agua mili Q para quitar el NaOH.
4. Cinco volúmenes de HCl 1N.
5. Ocho volúmenes de agua mili Q para quitar el HCl.
6. Se equilibró la columna con tres volúmenes de amortiguador fosfatos de sodio 50 mM pH 7.5.

Se usó esta columna para, además de separar los compuestos de la fracción del sobrenadante EC2da, también se pretendía concentrar las proteínas ya que esta es la fracción más diluida de las fracciones resultantes del precipitado. El sobrenadante tenía una concentración de 0.2 mg/mL. Se colocó 5 mg/25mL de muestra y para la elución de proteínas se realizó con un gradiente escalonado con NaCl. La cromatografía se realizó de la siguiente manera:

1. Una vez equilibrada la columna se colocó la muestra a un flujo de 0.5 mL/min.
2. Se procedió a realizar tres lavados con amortiguador fosfatos de sodio 50 mM pH 7.5 a un flujo de 1.5 mL/min.
3. Se realizó el gradiente con NaCl: 40, 60, 80, 100, 150, 200, 250, 300 y 500 mM a un flujo constante de 1.5 mL/min.
4. Las fracciones se colectaron de manera manual de acuerdo al perfil cromatográfico, es decir que se trató de coleccionar cada pico de absorbancia que se apreciaba conforme avanzaba la cromatografía.

Objetivo 4

Analizar mediante técnicas de secuenciación de aminoácidos la estructura primaria de la citolisina de la anémona *A. dowii*.

Degradación EDMAN

La secuenciación EDMAN emplea la reacción que ocurre entre el fenilisotiocianato y el grupo amino de los aminoácidos de las proteínas. En esta técnica, una vez unido el fenilisotiocianato con el grupo amino pasa a ser feniltiocarbamil, este último en condiciones

ácidas se rompe de la cadena peptídica y el derivado queda como un heterocíclico que es extraído por un solvente orgánico y convertido en un isómero más estable (feniltiohidantoína), este se resolverá mediante cromatografía en HPLC y se compararán los tiempos de retención de la muestra con los estándares. Esto se hará para cada aminoácido, por lo cual se irá degradando la proteína conforme la secuencia avanza ¹³³.

Se recurrió a esta técnica para analizar las fracciones F2-4 del sobrenadante luego de la cromatografía catiónica. Se corrió un gel SDS-PAGE 15% y se transfirió de manera semi-húmeda a una membrana de PVDF (Difluoruro de polivinilideno, la cual es de naturaleza hidrofóbica por lo que debe ser previamente activada con metanol o etanol), esta se corrió en amortiguador CAPS (3-(Ciclohexilamino)-1-ácido sulfonipropano) 10 mM, 10% v/v metanol a pH: 11. Se cortó la banda más prominente de peso aproximado a 15 kDa. La secuenciación se realizó de forma automatizada en PPSQ-31A protein sequencer (SHIMADZU BIOTECH).

Espectrometría de masas

Esta técnica pretende analizar la secuencia de aminoácidos de las proteínas vaporizándolas mediante alto vacío y así ionizarlas para luego viajar por un campo magnético y ser detectadas en relación masa-carga ¹³⁴. Se analizó la banda de 20 kDa de la fracción FH, para este se hizo un gel SDS-PAGE 15% de acrilamida el cual por la sensibilidad de la técnica se manejó de la forma más limpia posible para no contaminar la muestra, así también se filtró las soluciones en una membrana de 0.2 μm , luego de cortar la banda, ésta se guardó con 1 μL de agua mili Q filtrada a -80°C .

También se analizó mediante la técnica de proteómica de Shotgun acoplado a espectrometría de masa. Esta técnica de secuenciación masiva permite identificar un gran número de polipéptidos presentes en la muestra, rompe los polipéptidos en una colección de pequeños fragmentos de péptidos que se ordenan de forma individual. Un programa de computadora busca coincidencias en las secuencias de aminoácidos y las utiliza para colocar los fragmentos individuales en el orden correcto para reconstruir la proteína.

La muestra que fue analizada por Proteómica de Shotgun acoplado a espectrometría de masas se hizo por duplicado y fue preparada de la siguiente manera:

- Se diluyó una concentración de 20 μg en un volumen de 100 μL .
- A la muestra se le agregó en el siguiente orden: 50 μL de TE (10 mM Tris/ HCl

pH 7.6, 1 mM EDTA pH: 8), 50 μ L 0.1% NaDoc (sodio desoxicolato), 50 μ L de TCA (ácido tricloroacético).

- La muestra se incubó en hielo por una hora.
- Se centrifugó a 7705x g durante 20 minutos a 4°C.
- A los microtubos se le aspiró el sobrenadante en vacío.
- Se resuspendió el pellet en acetona 90% a temperatura ambiente (resuspendió al volumen inicial de la muestra, 100 μ L).
- Se incubaron a -20°C.
- Se realizó una última centrifugación a 7705x g durante 20 minutos a 4°C.
- Se aspiró el sobrenadante en vacío.
- Las muestras se preservaron a -80°C.

Resultados y Discusión

Objetivo 1

Obtención de extracto crudo de *A. dowii*.

Debido a que los cnidarios no presentan una estructura especializada para la producción del veneno como en otros grandes grupos de animales que presentan glándulas venenosas, se ha recurrido a trabajar con extractos de estos organismos, como en anémonas para obtener la FraC de *A. fragacea*, se colectaron y colocaron juntos a los especímenes para estresarlos y así liberaran el exudado ⁶⁸; para Eqt II y III, se utilizó una mezcla de exudados de organismos completos y de tentáculo, donde este último mostró ser la muestra más limpia y hemolítica ⁶⁷; también se han aislado los cnidocitos como en ¹³⁵ donde se utilizaron los cnidae de tentáculo para extraer el contenido tóxico presente en *A. equina*; además de conocer los compuestos tóxicos se han aislado los cnidocitos para entender el funcionamiento del cnidae ^{136,137}. Emplear el extracto crudo de organismos completos permite, manejar grandes cantidades de proteína total, aprovechar el tejido de todo el organismo (ya que, aunque se utilice solo tentáculos, por ejemplo, se terminará sacrificando al animal) así como posibilita hallar otros componentes que presenten actividad lítica que no estén necesariamente siendo secretados por los cnidocitos.

A partir de 40 g de organismos liofilizados se realizaron varios lotes de extracción de proteína, se obtenía un promedio de 80 mL de extracto crudo de los cuales se usó 60 mL para analizar y purificar. La concentración promedio que se obtenía fue 8-2 $\mu\text{m}/\text{mL}$, teniendo que durante las primeras extracciones había una mayor concentración e iba disminuyendo conforme se obtenía extracto.

En el presente trabajo se obtuvieron tres extractos que procedían a partir del mismo lote de organismos, teniendo que durante la primera extracción no se presencié la actividad hemolítica, pero sí de fosfolipasa, por ello se realizó una segunda extracción (EC2da) en la cual se apreciaban ambas actividades y se realizó análisis de actividades y purificación. Posteriormente se trabajó con otro extracto (ECm) que es el resultado de mezclar sobrenadantes restantes de las dos extracciones previas. De este último extracto se obtuvo un aumento de casi el doble de actividad hemolítica, en el diagrama (Figura 12) se muestra de una manera más gráfica el proceso de extracción que se realizó para el presente trabajo.

Durante la primera extracción se realizó solo un ciclo de congelado y descongelado a -20°C a lo cual se le adjudica la falta de actividad hemolítica, en este paso de obtención del extracto se pretende lisar la mayor cantidad de cnidocitos en el tejido del organismo y liberar el contenido tóxico así que, omitiendo este paso es posible que sea la razón de porque se aprecia una nula actividad hemolítica. Sin embargo, se ha empleado de forma muy general en la obtención de extractos en anémonas ^{67,135}. Cabe mencionar que utilizar estos ciclos de congelado y descongelado para la obtención de extractos dependerá de que tan lábil sea la proteína de interés, por ejemplo, se sabe que para purificar proteínas recombinantes en *E. coli* pudiera no ser la mejor opción ¹³⁸ por la enorme posibilidad de dañar las proteínas.



Actividad	Primer extracto	Actividad	Segundo extracto (EC2da)	Actividad	Extracto mezclado (Ecm)
Hemólisis	-	Hemólisis	49.58%	Hemólisis	83%
Fosfolipasa	Si	Fosfolipasa	Si	Fosfolipasa	Si

Figura 12. Extractos crudos de *A. dowii* con sus respectivas actividades. Estas pertenecen al mismo lote de extracción.

Objetivo 2, 3

Identificar actividad mediante bioensayos, purificar el polipéptido con actividad citolítica presente en el extracto de *A. dowii*.

Precipitación con sulfato de amonio

Como antecedentes para la purificación de citolisinas en anémonas usando este método, se tiene a la citolisina Bandaporina de *Anthopleura asiatica*, la cual fue la primera citolisina del género *Anthopleura* en ser purificada y caracterizada, mostrando un porcentaje de identidad del 75% con Eqt II y V de *A. equina* (140). Y en otro trabajo más reciente se obtuvo la secuencia parcial de una actinoporina identificada en la anémona *A. dowii* que tiene 32% de identidad con Bandaporina de la anémona *A. asiatica*¹³⁰, siguiendo el mismo protocolo se realizó la precipitación con sulfato de amonio para el extracto de *A. dowii* donde para este trabajo se agrega un porcentaje de saturación extra, llevando a 90% de saturación el extracto y no 80% como lo ya reportado.

Esta técnica permite dar una idea de la naturaleza de las citolisinas de interés dado que separa los compuestos de acuerdo a su hidrosolubilidad, esto de acuerdo a la carga superficial que presente las proteínas, además de que no desnatura las proteínas y así conservan su actividad, esto último en contraste con la precipitación usando solventes como

acetona.

A partir de la precipitación se obtuvieron seis fracciones para ambos extractos, en contraste con el extracto de *A. asiatica* al cual solo se le hicieron dos saturaciones con sulfato de amonio (50 y 80%) ¹³⁹; las fracciones de *A. dowii* se analizaron mediante los bioensayos y geles en condiciones desnaturalizantes SDS-PAGE.

Se obtuvo al sobrenadante como la muestra más limpia para el EC2da (Figura 13A). En una electroforesis con gel desnaturalizante se observó una banda bastante marcada con peso molecular alrededor de 15 kDa, que pudiera indicarnos la presencia de fosfolipasas secretorias; en las fracciones de 50%, 60% y 90% de saturación se puede apreciar bandas de proteína mejor definidos en alrededor de 20 kDa que, de acuerdo a los antecedentes podrían ser actinoporinas. Para el ECm mostró un sobrenadante más saturado en pesos moleculares de 15-30 kDa, y en el resto de las fracciones del precipitado se aprecian bandas en alrededor de 20 kDa mucho más definidas, sobre todo en la fracción 50% y 60% (figura 13B).

El extracto de *A. dowii* mostró una complejidad de proteínas que los extractos de otras anémonas no han mostrado hasta ahora, la fracción hemolítica precipitada en *A. asiatica* fue con 80% de saturación con sulfato de amonio ¹³⁹ mientras que con *A. dowii* precipitó con 60% de saturación, estos coincidiendo con el exudado de *R. macrodactylus* que, para separar sus componentes la fracción hemolítica también precipitó con 80% de saturación con acetona ^{70,140}, el perfil electroforético muestra apenas tres poblaciones en el exudado de *R. macrodactylus* y posteriormente de las cromatografías de afinidad se observa una sola banda en los pesos moleculares de 20 kDa. En cuanto al extracto de *A. dowii* al ser del organismo completo, trae consigo en su mayoría una gran cantidad de material celular como lípidos, carbohidratos, material genético y proteínas de la maquinaria general que no son solo del cnidocito sino principalmente de células musculares, por ello no se trabajaron técnicas de cromatografía de filtración en gel o de afinidad como primer paso de purificación para este extracto a diferencia de la mayoría de reportes que se tiene sobre citolisinas de anémonas.

Ensayo de actividad hemolítica

Para identificar la actividad lítica presente en las fracciones se usaron eritrocitos de humano de un individuo sano. El ensayo pretende medir espectrofotométricamente la liberación de hemoglobina debido a la acción de las citolisinas sobre los eritrocitos, lo cual se

detecta mejor a 415 nm.

Cumpliendo con el segundo objetivo se analizaron las fracciones resultantes de la purificación mediante los bioensayos, donde se obtuvo que a partir del EC2da, el EC tiene la mayor actividad hemolítica seguida de las fracciones del 60%, 50% y 40% en donde estas dos últimas exhiben casi el mismo porcentaje de hemólisis (Figura 14A) el resto de las fracciones tienen prácticamente nula actividad.

En cuanto al ECm las fracciones EC, 50% y 60% se obtuvo un aumento del doble en la actividad hemolítica (figura 14B) aunque se vio reducida la actividad del 40%, el resto de las fracciones se mantuvo con actividad reducida o nula.

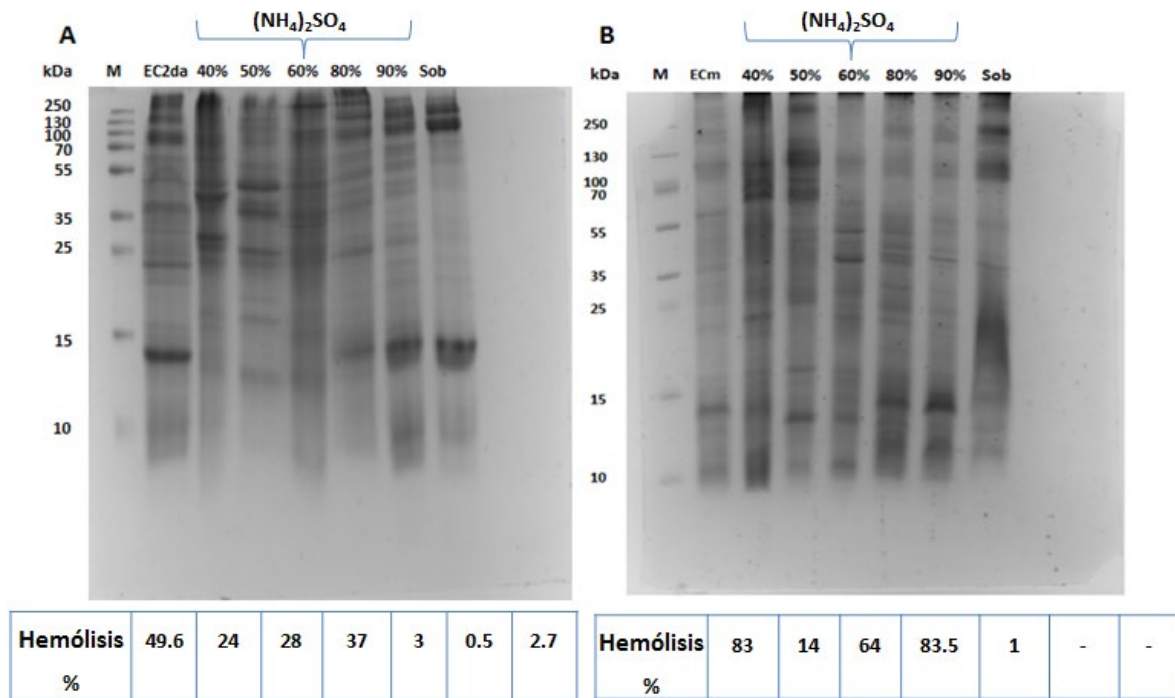


Figura 13. SDS-PAGE de las fracciones de precipitación, así como su respectivo porcentaje de hemólisis. A) fracciones resultantes a partir del segundo extracto crudo (Ec2da), B) fracciones del extracto mezclado (ECm), para ambos extractos se observa las fracciones del 60% y 50% son las más hemolíticas. M- marcador de peso molecular está dado en kDa y el gel se tiñó con azul de Coomassie R-250. Tanto en los gels como en los ensayos se utilizó 15 µg de proteína.

El rendimiento de los extractos EC2da y ECm (Tabla 6) indica que la fracción del 60% es la más hemolítica para ambos casos coincidiendo con lo ya reportado sobre esta especie¹³⁰, teniendo un rendimiento de 74.6% y 100% respectivamente.

Se ha trabajado técnicas de hemólisis como un bioensayo básico para la purificación de citolisinas de anémonas, esto para identificar la actividad lítica de las proteínas presentes en

el extracto del veneno de estos organismos. De acuerdo a ¹³⁰ donde se probaron distintas concentraciones de extracto crudo de *A. dowii*, se determinó que la cantidad total de proteína que induce el 50% de hemólisis (HU₅₀) sobre eritrocitos humanos es 15 µg, en una concentración total de 0.1% de suspensión de eritrocitos. En los artículos acerca de citolisinas de anémonas, una vez puras se reporta que el HU₅₀ de las actinoporinas presentan unidades de nanogramos, por ejemplo St I y II presentan un HU₅₀ de 30-45 ng/mL ⁶⁹, mientras que el HU₅₀ de *A. asiatica* y *HMIII* de *H. magnifica* son de 8.8 ng/mL y 0.33 ng/mL respectivamente ^{139,141}, esto en eritrocitos humanos, mientras que en *A. dowii* presenta unidades de microgramo debido a la complejidad de la fracción, por lo que no se descarta que con la fracción hemolítica de *A. dowii* presentando un grado de pureza mayor pueda presentar un HU₅₀ en iguales unidades de los que ya están reportados.

Por lo anterior y para cumplir con los objetivos de purificar y obtener la secuencia de aminoácidos de esta citolisina se decidió realizar un paso de cromatografía de intercambio aniónico sobre la fracción del 60% ya que mostró la mayor actividad lítica sobre las fracciones.

Tabla 6 Rendimiento de extractos crudos y sus fracciones durante el primer paso de purificación con precipitación con sulfato de amonio. El porcentaje en la columna de muestra se refiere al porcentaje de saturación al que precipitaron.

***Se representa con una diagonal marcada en negrita las fracciones que tuvieron más actividad de lipasa.**

Muestra	Concentración de proteína (mg/mL)	Cantidad total de proteína (mg/ mL)	Actividad hemolítica (%)	Rendimiento (%)	Actividad lipasa (halo de actividad) *
EC2da	5	354	49.6	100	/
40%	5.8	26	24	48	-
50%	5.2	20.8	28	56	-
60%	5.2	18.2	37	74.6	-
80%	5.2	26	3	6	-
90%	3.7	14.8	0.5	1	-
Sob	0.2	10	2.7	5	/

Muestra	Concentración de proteína (mg/mL)	Cantidad total de proteína (mg/ mL)	Actividad hemolítica (%)	Rendimiento (%)	Actividad lipasa (halo de actividad) *
---------	-----------------------------------	-------------------------------------	--------------------------	-----------------	--

ECm	4.4	242	83	100	/
40%	2.9	21.7	14	17	/
50%	2.5	8.7	64	77	-
60%	2.8	18.7	83.5	100	-
80%	2.6	9	1	1	-
90%	2.9	11.6	-	-	-
Sob	2.9	2.9	-	-	-

Ensayo de actividad fosfolipasa

Para evaluar la actividad de fosfolipasa A2 presente en el extracto de *A. dowii* se realizó el bioensayo en placas Petri con agarosa y como substrato se utilizó yema de huevo, teniendo en cuenta que es un ensayo cualitativo donde se pretendía observar la actividad de fosfolipasa mediante halos de actividad presente en las fracciones a evaluar, cabe mencionar que no es la primera vez que se usa esta técnica para identificar fosfolipasas A2 en el Phylum Cnidaria ¹⁴².

De los dos lotes de extracción ambas fracciones parecían tener actividad, sin embargo, se debe destacar que para el segundo extracto (EC2da) la mayor actividad de lipasa se encuentra en el sobrenadante, seguido del 40% y el EC (Figura 14A), contrario en cuanto al extracto mezclado (ECm) donde se tiene una mayor actividad en la fracción del 40%, EC, y en el sobrenadante se tiene poca actividad (Figura 14B).

Para el estudio de venenos de animales los de mayor interés son las fosfolipasas A2 secretorias, en este trabajo al utilizar el extracto crudo de todo el organismo se tiene fosfolipasas que no solo podrían estar presentes en el veneno, sino también fosfolipasas de la maquinaria celular de todo el organismo, esto es de igual importancia debido a que actúan sobre la membrana plasmática. Las fosfolipasas tipo A2 identificadas a partir de anémonas, presentan puntos isoeléctricos entre 9-10, y presentan un mejor rendimiento de actividad en pH alrededor de 7 ¹⁰⁵ por lo que pudiera coincidir con las fosfolipasa presentes en *A. dowii*.

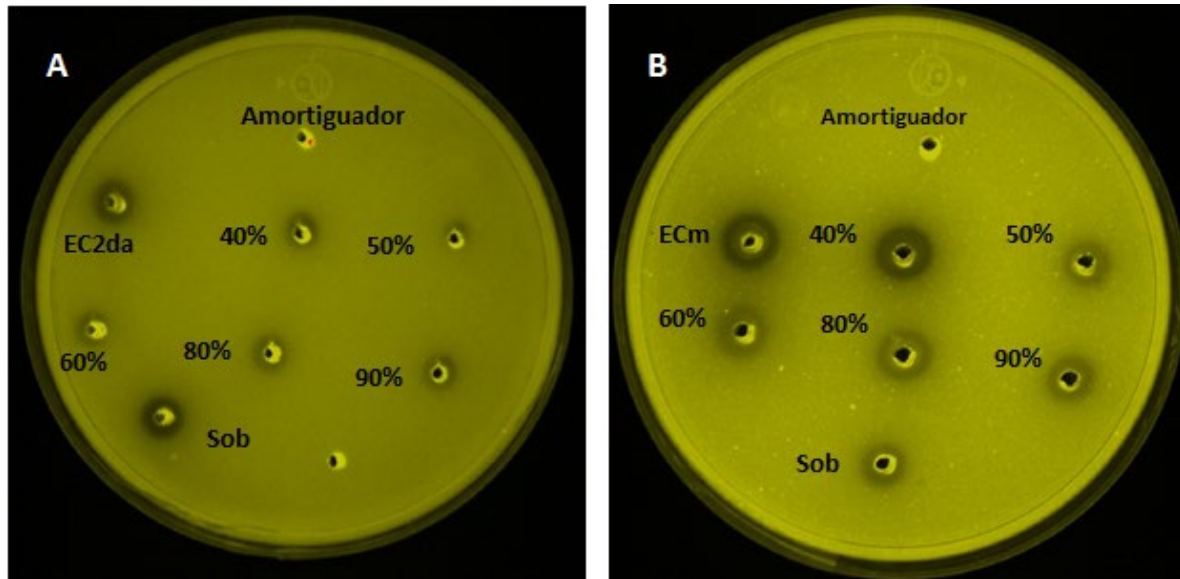


Figura 14. Actividad fosfolipasa. A) Ensayo realizado con las fracciones del segundo extracto. B) en las fracciones del extracto mezclado se observa un patrón de actividad distinto comparado al del extracto anterior en donde se observa que el 40% y extracto crudo tienen mayor actividad. Todas las cajas tienen una concentración de proteína de 15 μg y se tiene como control negativo el amortiguador de fosfatos de sodio 50 mM pH 7.5, mismo que tienen las muestras. El porcentaje representa la concentración de sulfato de amonio a la que precipitaron.

La precipitación con sulfato de amonio tiene como fundamento el precipitar las proteínas de acuerdo a su hidrosolubilidad, lo anterior en conjunto con los resultados del ensayo de actividad fosfolipasa sugieren que el extracto de *A. dowii* presenta una gran abundancia de fosfolipasas, debido a que en todas las fracciones se hallan halos de actividad ya sea en mayor o menor intensidad, además cabe mencionar que en estos halos (Figura 14B, fracción 80%) se puede apreciar un halo superpuesto de menos intensidad que se sabe son producidas por fosfolipasas de otro tipo (C o D). En las fracciones del segundo extracto, se observa una clara diferenciación de actividades en las fracciones de la precipitación comparándolas con el sobrenadante que, indica la mayor actividad de lipasa, al igual se observa en las fracciones del extracto mezclado que presentaron halos de actividad, pero donde se invierten las actividades del 40% y sobrenadante la cual tiene muy poca actividad comparándola con el EC y el 40%.

Se propone que las fosfolipasas de interés tuvieron una mayor presencia en las primeras extracciones debido a que al ser secretorias están presentes de forma extracelular y no se necesita mucho extraerlas al contrario de las intracelulares que se debe lisisar la célula para obtenerlas.

De acuerdo a lo anterior y en conjunto con el análisis electroforético de cada extracto

(Figura 13) se decidió que para la citolisina con actividad fosfolipasa, se seguirá analizando el sobrenadante del segundo extracto (EC2da) en una cromatografía de intercambio catiónico, debido a que es una muestra más limpia en comparación con las otras fracciones especialmente el sobrenadante del ECm además de que se aprecia una mejor actividad de lipasa y esta sigue el patrón de halos de actividad con otros lotes de extracción y purificación de experimentos previos (datos no mostrados).

Objetivo 3, 4

Purificar y analizar estructura primaria de polipéptido con actividad citolítica presente en el extracto de *A. dowii*.

Fracción hemolítica

De acuerdo con la literatura, el punto isoeléctrico de las actinoporinas es de alrededor de 9.2, por lo cual al estar en solución con el amortiguador fosfatos de sodio 50 mM pH: 7.5 se espera que las actinoporinas adquieran carga positiva y por ello se optó por usar una resina de intercambio iónico siguiendo el protocolo de ¹³⁰.

A partir de la cromatografía de la fracción de 60% (ECm) se obtuvieron 23 fracciones (Figura 15) las cuales se concentraron en filtros Amicon Ultra 0.5 mL de 3 NMWL, y se quitó la sal (NaCl) en el mismo filtro agregando amortiguador fosfatos de sodio 50 mM pH 7.5.

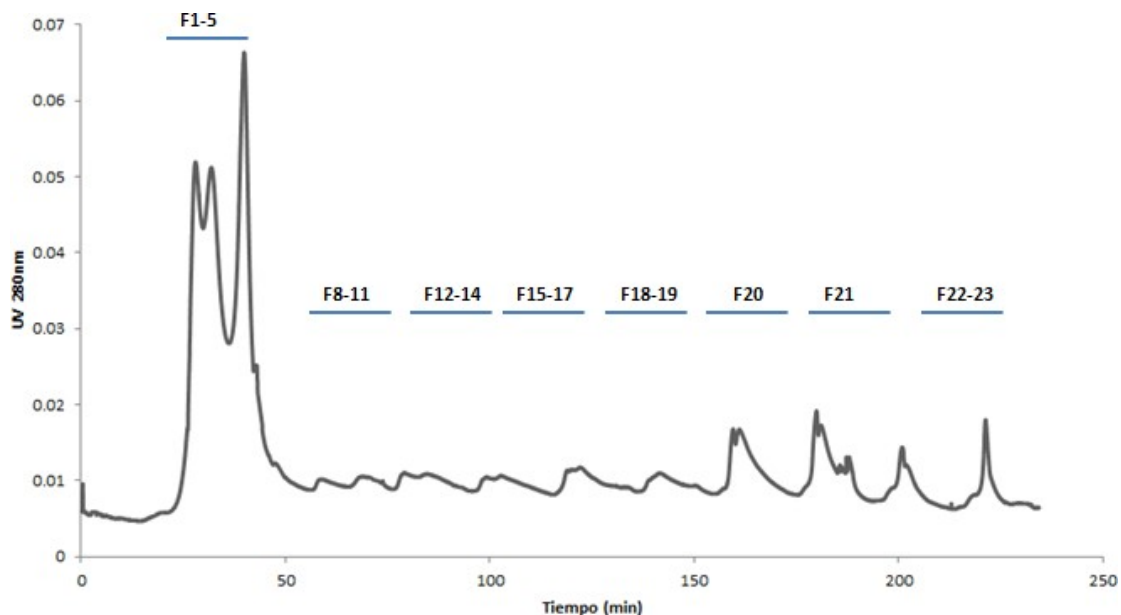


Figura 15. Cromatograma Sefarosa DEAE de fracción de 60% (ECm). Las fracciones FH (F3-5) y Elu (F1-2), F8-11: 40 mM NaCl, F12-14: 60 mM NaCl, F15-17: 80 mM NaCl, F18-19: 100 mM NaCl, F20: 150 mM NaCl, F21: 200 mM NaCl, F22-23: 300 mM NaCl.

Se puede observar la separación en las fracciones (Figura 16), especialmente en las fracciones FH y Elu en las cuales se obtuvo la mayor actividad lítica, se aprecian dos bandas tenues en pesos moleculares de alrededor de 20 kDa lo cual puede indicar que hay por lo menos una actinoporina presente en la fracción de 60% de saturación con sulfato de amonio.

A partir del ensayo de hemólisis se destacan las primeras fracciones, estas no interactuaron con la resina coincidiendo con Ramírez-Carreto, et al, 2019¹³⁰, si bien ambas muestras pertenecen al mismo paso de elución estas fueron colectadas en tiempos distintos y como muestra Figura 16 si hubo una separación de proteínas, al evaluar individualmente las cinco fracciones del eluyente que no interactúa con la resina se observó solo tres fracciones F3-5 (FH) que presentaban gran actividad hemolítica. Posteriormente al juntar las fracciones de acuerdo a su molaridad de NaCl para realizar los ensayos restantes, las fracciones F1 y 2 (Elu) mostraron un aumento de más del 50% de hemólisis, actividad que en fracciones individuales no presentaron (Figura 16).

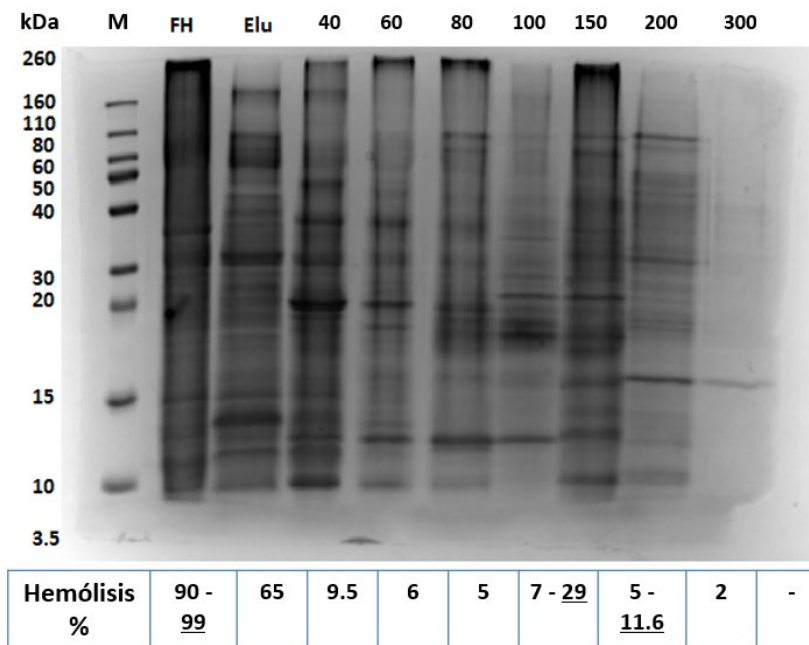


Figura 16. SDS-PAGE de las fracciones de la cromatografía Figura 15. FH- fracción hemolítica que presentó la mayor actividad en los eritrocitos junto con la fracción Elu ambas pertenecen a las fracciones que no se unieron a la resina. 40 mM- 300 mM representan las fracciones F8-23 que eluyeron con NaCl. Los porcentajes que están subrayados son los que se obtuvieron agregando CaCl₂ al ensayo de hemólisis.

También se realizó una prueba con CaCl_2 en eritrocitos para evaluar la posible cinestesia que pudiera haber entre ambas citolisinas (fosfolipasa y actinoporina) y que pudiese ser la razón de la actividad hemolítica de la fracción Elu, teniendo como resultado un aumento de actividad en las fracciones FH (9%), 100 mM (22%), 150 mM (6.5%), y nula actividad en el resto de fracciones (Figura 16), en cuanto a la fracción Elu que era de especial interés no se pudo realizar en este ensayo por falta de muestra.

En ensayos de fosfolipasa las fracciones mostraron actividad enzimática incluso en ausencia de CaCl_2 (Figura 17). Para ambos casos (con CaCl_2 y sin CaCl_2) hubo un aumento de halo de actividad en las fracciones FH y especialmente la fracción Elu en comparación con la fracción de origen (60%), por lo que se enriqueció la actividad de fosfolipasas en estas dos muestras, seguidas del 40, 60, 100 y 150 mM de NaCl estas en presencia del cofactor (Figura 17A), sin este último se mantiene una buena actividad de fosfolipasa en 60%, FH, 40 mM pero principalmente en Elu (Figura 17B), lo cual puede ser un aumento de fosfolipasas independientes de calcio en la fracción.

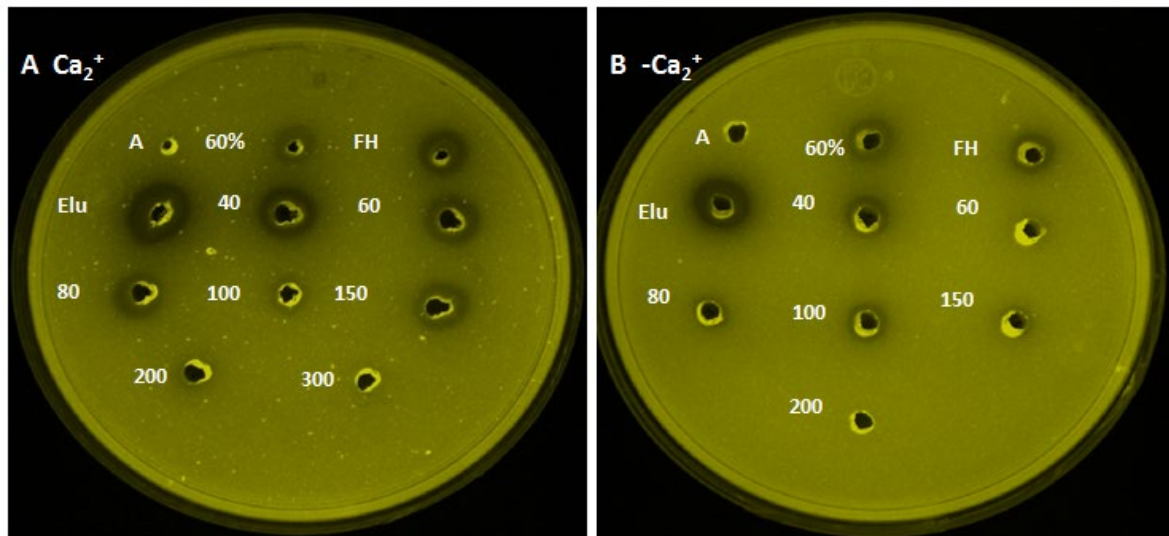


Figura 17. Actividad fosfolipasa de las fracciones de cromatografía DEAE en presencia A) y ausencia B) de CaCl_2 . Los halos de actividad muestran la fracción Elu como la más activa, seguida de las fracciones FH y 40. El pozo A es el amortiguador fosfatos 50 mM como control negativo, 60% es la fracción antes de la cromatografía DEAE, 40-200 son las fracciones que eluyeron a esa concentración de NaCl en milimolar.

En base a los ensayos de actividad que se emplearon y la cromatografía de intercambio aniónico, se adjudicó que la actividad hemolítica presente de la fracción 60% (ECm) estaría siendo provocada por la presencia de una actinoporina, esto debido a que se enriqueció la zona de alrededor de 20 kDa, las fracciones FH y Elu tuvieron un rendimiento

(Tabla 7) de 108% y 78% respectivamente, posteriormente con los ensayos de actividad lipasa se propone que pueda haber una cinestesia en las fracciones FH y Elu debido a que presentan buena actividad fosfolipasa sin CaCl₂, con el ensayo de hemólisis más cloruro de calcio se observó que en la FH hubo un aumento del 9% lo cual aumentó un 10% su rendimiento.

En la mayoría de los trabajos ya reportados, se emplean estas técnicas de cromatografía de intercambio iónico para la separación en los extractos en anémonas, en el presente trabajo se obtuvo muy poca cantidad de fracción lítica resultante de este paso de purificación, en promedio se obtenía 2.3 mg/ 0.5 mL, lo cual representó muy poca muestra para ser analizada mediante otra cromatografía de afinidad.

Tabla 7 Rendimiento de fracciones de cromatografía de intercambio aniónico como segundo paso de purificación para la fracción 60% del ECm.

-mM se refiere a la concentración de NaCl en la que las fracciones eluyeron. Se representa con un asterisco las fracciones que tuvieron más actividad de lipasa y en diagonal las que presentan un halo de actividad más tenue.

Muestra	Concentración de proteína (mg/mL)	Cantidad total de proteína (mg/ mL)	Actividad hemolítica (%)	Rendimiento (%)	Actividad lipasa (halo de actividad)
60%	2.8	18.7	83.5	100	/
FH	2.3	3.45	90	108	*
Elu	0.3	0.24	65	78	*
40 mM	0.72	1.4	9.5	11	*
60 mM	0.7	0.7	6	7	/
80 mM	0.57	0.85	5	6	/
100 mM	-	-	7	8	-
150 mM	0.2	0.5	5	6	/
200 mM	0.22	0.44	2	2	-
300 mM	-	-	-	-	-

A partir de los resultados de las fracciones hemolíticas se analizó la fracción FH mediante la técnica de espectrometría de masas y para ello se realizó un gel SDS-PAGE (Figura 18B) donde se cortó banda en alrededor de los pesos moleculares de 20 kDa, se tiñó

con GelCode Blue Safe Protein Stain, este colorante es libre de solventes como metanol y ácido acético los cuales interfieren con la técnica de espectrometría de masas; para Elu se analizó mediante la técnica de Shotgun donde se precipitó 20 µg de muestra con TCA y se congeló a -80°C para ser analizadas (Figura 18A).

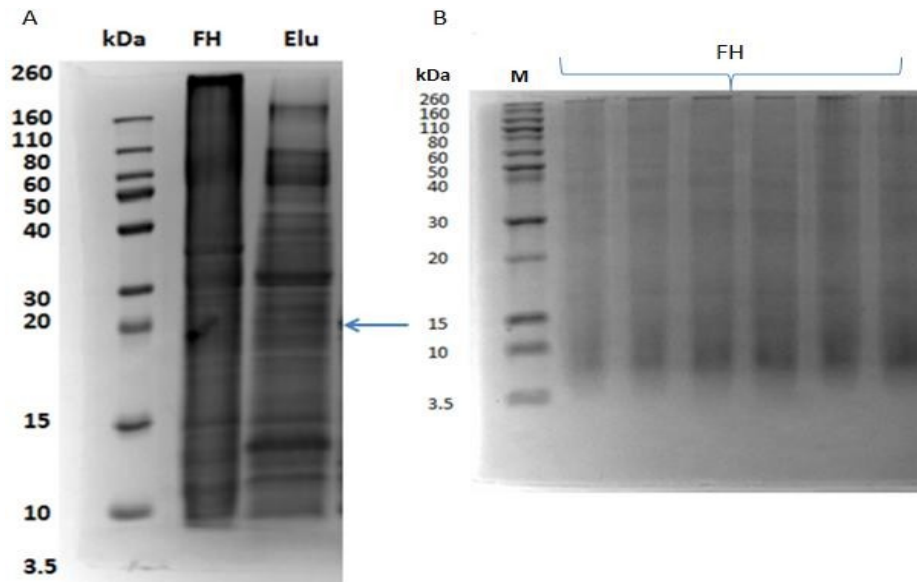


Figura 18. Fracciones hemolíticas que se analizaron mediante espectrometría de masas y Shotgun acoplado a masas, A) Gel SDS-PAGE teñido con azul Coomassie R-250, B) Gel SDS-PAGE teñido con GelCode Blue Safe Protein Stain, para este último solo los dos carriles de en medio se analizaron.

De las secuencias obtenidas mediante espectrometría de masas se identificó solo un péptido de siete aminoácidos (Figura 19) con una probabilidad de identidad del 86% con una actinoporina de la anémona *Haloclava producta* (UniProtKB A0A2Z2E5W1_9CNID), a este péptido se decidió nombrarlo como Ad-FH1, no se identificaron más debido a que los pesos relativos y generales de las actinoporinas son de 20 kDa, aunque también las hay de otros pesos moleculares ^{71,143} o las mismas limitantes de la técnica de espectrometría no lo permitieron; para la fracción que se analizó mediante la técnica de Shotgun acoplado a masas no se obtuvo secuencias, esto podría deberse a cuestiones técnicas del manejo de la muestra o que las proteínas no pudieron ser ionizadas adecuadamente y por lo cual no se obtuvo lectura de la muestra ¹³⁴. Los resultados del presente trabajo coinciden con lo ya reportado sobre *A. dowii* en cuanto a la poca variabilidad (debido a que no se han identificado isoformas) esto en comparación con *A. equina* la cual se sabe tiene la mayor familia multigénica de actinoporinas conocidas hasta el momento ¹⁴⁴ o de la anémona *S. helianthus* que es otra especie con variabilidad en sus actinoporinas ¹⁴⁵; y la poca cantidad de actinoporinas (debido a la baja cobertura que se obtuvo) ya sea por el estado metabólico en el que se encontraban

cuando fueron recolectados ya que se ha visto que en estados de estrés cambia considerablemente el contenido proteico del veneno ³⁹ o porque esta especie no necesita producir tantas actinoporinas.

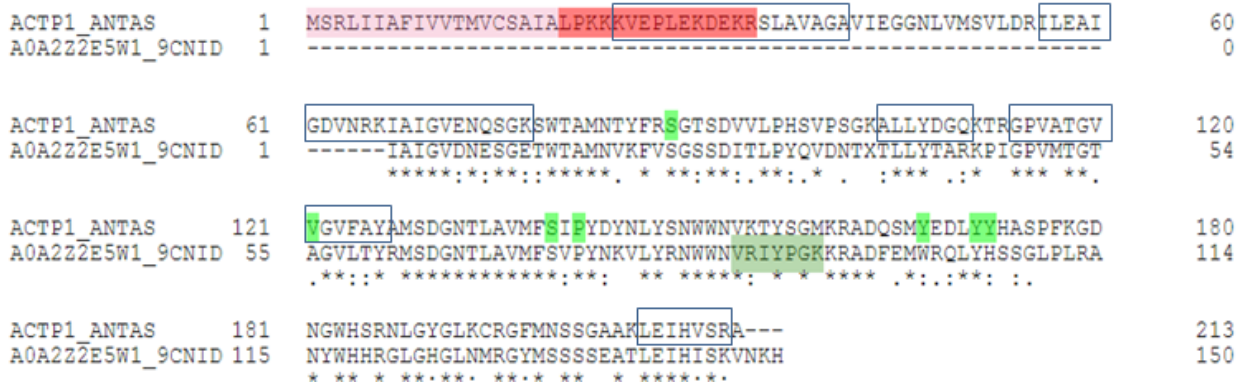


Figura 19. Alineamiento de secuencia de aminoácidos de Bandaporina (DELTA-actitoxin-Aas1a) de *A. asiatica* y fragmento de actinoporina de *H. producta*, estas fueron las actinoporinas con las que se alineó Ad-FH1 que es el péptido obtenido de la fracción que precipitó a 60% de sulfato de amonio de *A. dowii*. Péptido señal sombreado en color rosa, propéptido sombreado en rojo y los aminoácidos que participan en la unión al fosfolípido sombreados en verde claro; los cuadros muestran los péptidos que se identificaron en Ramirez-Carreto, et al, 2019 ¹³⁰ de *A. dowii*, el péptido que se identificó en este trabajo está sombreado en verde oscuro.

A partir del experimento de espectrometría de masas se obtuvo un total de 3783 espectros de absorción, si bien no se encontró más de una actinoporina, se pudo identificar las siguientes proteínas:

La proteína de adhesión a membrana 32 *A. elegantissima* (NCBI AAF65308.1) la cual se ha observado juega un rol importante en la interacción simbiótica con las algas zooxanthellae mediando las interacciones célula-célula y que de alguna manera controla la expresión de genes del huésped ¹⁴⁶ que ayudan en la asociación cnidaria-alga.

Heme-binding protein 2 *E. pallida* (NCBI XP_020913734.1) se une a las proteínas hemo y porfirinas para evitar que estas formen agregados ya que son poco solubles en soluciones acuosas, puede promover la permeabilidad de la membrana interna de la mitocondria que a su vez desencadena apoptosis y muerte celular por necrosis ^{147,148} esto debido al estrés oxidativo y altas concentraciones de calcio.

Inhibidores de serin proteasa tipo Kunitz, entre ellos APEKTx1 *A. elegantissima*, Delta-actitoxina-Axm1f y Axm1a *A. xanthogrammica* (UniProtKB/Swiss-Prot: P86862.1,P0C5G1.1 y P01530.1 respectivamente), Delta-actitoxin-Axm1h, Axm1f y Avd1g de *A. xanthogrammica* y *A. viridis* (UniProtKB/Swiss-Prot: P01530.1, P0C5G1.1 y B1NWT5.1 respectivamente), estos inhibidores tienen un gran impacto en los venenos de animales y en las anémonas, en arañas y

escorpiones se ha reportado actividad bifuncional, esto quiere decir que además de su actividad como inhibidor de endoproteasa también actúa sobre canales de potasio (Axm1f y Axm1a) o canales de sodio (Axm1h, Axm1f y Avd1e) dependientes de voltaje ¹⁴⁹⁻¹⁵², uno de los posibles roles biológico de estas moléculas puede ser paralizar a su presa y proteger al organismo de proteasas externas ya sea de presas o depredadores ¹⁵³.

Metaloproteasas dependientes de Zinc *E. pallida* (NCBI geneBank KXJ13069.1 y XP_028512430.1) y una proteína predicha *E. diaphana* (NCBI XP_020893266.1) así como metaloproteasas dependientes de zinc con regiones trombospondin 1, 5-like, 6, y 9 *E. pallida* y 10 *E. diaphana* (NCBI XP_020910696.1-DECOY, XP_028517020.1-DECOY, KXJ26203.1, KXJ20042.1-DECOY y XP_028514068.1 respectivamente), estas pertenecen a la familia Asticina, que juegan importantes roles donde además de su actividad de degradar polipéptidos actúan en la activación de factores de crecimiento y procesamiento de proteínas extracelulares ^{154,155} y en venenos de animales puede actuar como un acelerador de distribución del veneno en el tejido de la presa, estas pueden inducir hemorragia y necrosis por la degradación de la matriz extracelular y la prevención en formación de coágulos, si bien durante el proceso de obtención del extracto crudo se añadió un coctel de inhibidor de proteasas que incluye agentes quelantes y estas proteínas no deberían actuar en el ensayo de hemolisis, es importante mencionarlas ya que pueden estar presentes en el veneno inyectado por *A. dowii*.

Se identificó una toxina AvTX-60A, estas proteínas tienen una región de gran homología con las Membrane Attack Complex Perforin Family (MACPF por sus siglas en ingles), las MACPF son mejor estudiadas en el sistema inmune, estas son proteínas que forman poros de alrededor de 20 nm causando lisis y muerte celular ¹⁵⁶. La AvTX-60A presenta una fuerte acción hemolítica, esto se debe a la región MACPF ¹⁵⁷.

Por último, las toxinas de la familia CaTX/CrTX están mejor caracterizadas por los miembros de la clase Cubozoa (*C. fleckeri*, *C. rastoni* y *C. alata*) son α -PFT pero, a diferencia de las actinoporinas las primeras tienen al menos tres residuos cisteína ^{158,159}. Se identificaron tres de estas citolisinas, toxina CfTX- 2, CaTX- A y CrTX- A de *A. pallida* (NCBI GeneBank KXJ26098.1, KXJ13296.1 y KXJ09512.1), se sabe que causan dolor, inflamación y necrosis durante el envenenamiento además que tienen una buena actividad hemolítica, por lo que no se descarta que estén actuando en la actividad hemolítica del presente trabajo, lo cual podría explicar el por qué hay un aumento de actividad en los extractos crudos.

La fracción hemolítica identificada presenta un gran potencial debido a su habilidad de lisar eritrocitos humanos, y representa un gran modelo para el diseño de modelos biotecnológicos, así como el estudio de interacciones lípido-proteína.

Para la fracción Elu la cual se analizó mediante la técnica de Shotgun y era la de mayor interés por presentar un aumento de actividad fosfolipasa sin cloruro de calcio, así como un aumento del 10% de rendimiento de hemolisis en presencia de este cofactor no se obtuvo secuencia alguna, esto pudiera deberse a errores en el manejo de la muestra ya que se debe mantener en absoluta esterilidad y/o que haya acarreado algún componente que le impida a la técnica poder analizarlo, o que no haya podido ser analizada por falta de proteína ya que se requiere de una cierta cantidad de la proteína para poder ser ionizada, o bien, que no se haya logrado leer por la poca abundancia de la proteína de interés en la muestra total.

Fosfolipasa

De acuerdo a la literatura se espera que las fosfolipasas A2 secretorias presenten un punto isoeléctrico de alrededor de 9 o hasta 10, por lo cual al estar en solución con amortiguador fosfatos de sodio 50 mM pH: 7.5 se espera que adquieran carga positiva, por lo tanto, se eligió una columna de carga negativa pensando que habría una separación de los componentes que integran la fracción del sobrenadante, especialmente con los de alto peso molecular (Figura 13A).

A partir de la cromatografía se obtuvieron 11 fracciones (Figura 20) en la cual se aprecia un pico prominente no resuelto que comprende las primeras fracciones las cuales son aquellas que no se unieron a la resina y es donde se encontró la mayor actividad de cada fracción, aunque también hay que tener en cuenta que se puso un exceso de sobrenadante sobre la resina.

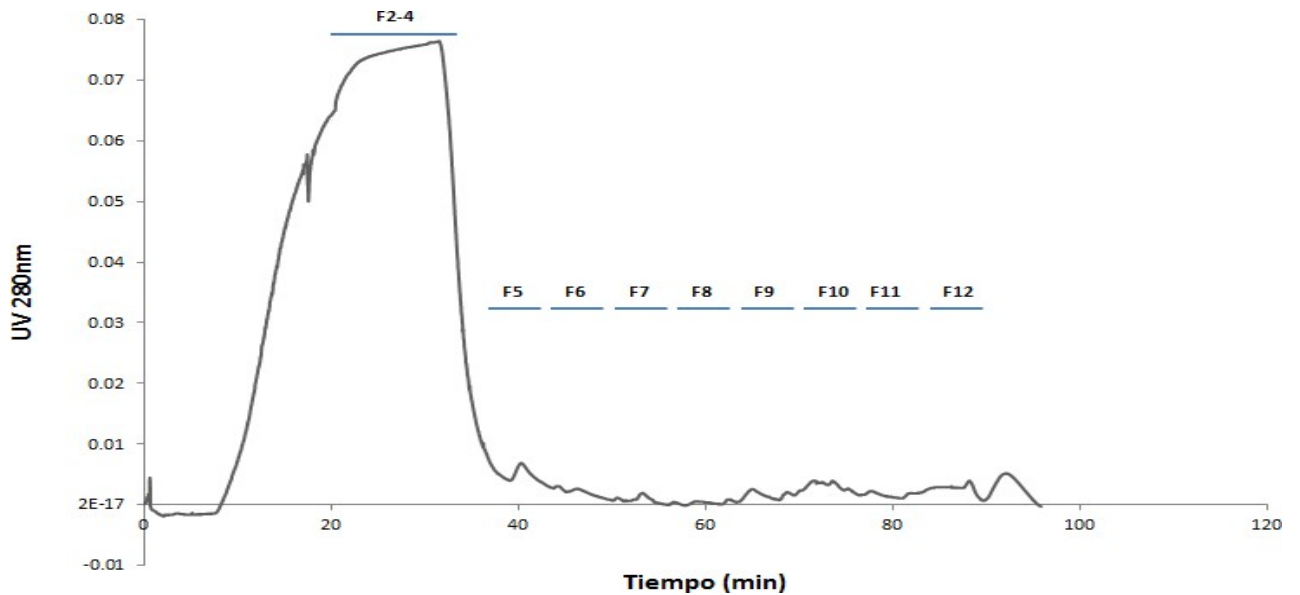


Figura 20. Cromatografía de intercambio catiónico para el sobrenadante (EC2da). Se pudo observar que, por el exceso de muestra, el pico más prominente no se resolvió como se esperaba, F2-3: no interactuó con la resina, F5: 40 mM NaCl, F6: 60 mM NaCl, F7: 80 mM NaCl, F8: 100 mM NaCl, F9: 150 mM NaCl, F10: 200 mM NaCl, F11: 300 mM NaCl, F12: 500 mM NaCl.

Se analizó mediante electroforesis y se observó que las fracciones F2-4 (las cuales se juntaron en un pool para ser analizadas en actividad (Figura 21A)) presentaron una banda de 14-15 kDa más marcada además de que la cromatografía resolvió las proteínas de 10 kDa y, en las fracciones restantes se observó que hubo poca o nula resolución de la muestra, también cabe mencionar que de las fracciones F9-F12 no se mostró gel SDS-PAGE debido a que no se logró apreciar bandas, esto pudo haber sido porque no había proteína suficiente para ser visible luego de teñir el gel; en un ensayo de actividad previo se mostró las fracciones 2-4 como las más activas por lo cual se decidió juntar estas fracciones en un pool (F2-4) (figura 21B), una de las posibles razones de que estas fracciones muestren toda la actividad de lipasa pudo deberse al hecho de que se puso un exceso de muestra y por ello no se haya resuelto en la cromatografía, aunque otra posible razón es que las proteínas presentes en el sobrenadante tengan en su mayoría carga negativa que les impidiera interactuar con la resina. También se ha visto que las fosfolipasas pueden holigomerizarse impidiendo así que interactúen con la resina ¹⁶⁰, lo cual explicaría las dos poblaciones de alto y bajo peso molecular presentes en el sobrenadante. Es importante mencionar que a pesar de que en la cromatografía y el gel desnaturizante no se aprecia una separación de los componentes proteicos, si hubo un aumento significativo de actividad en las fracciones F2-4 comparando con la fracción de origen (sobrenadante) Figura 21B.

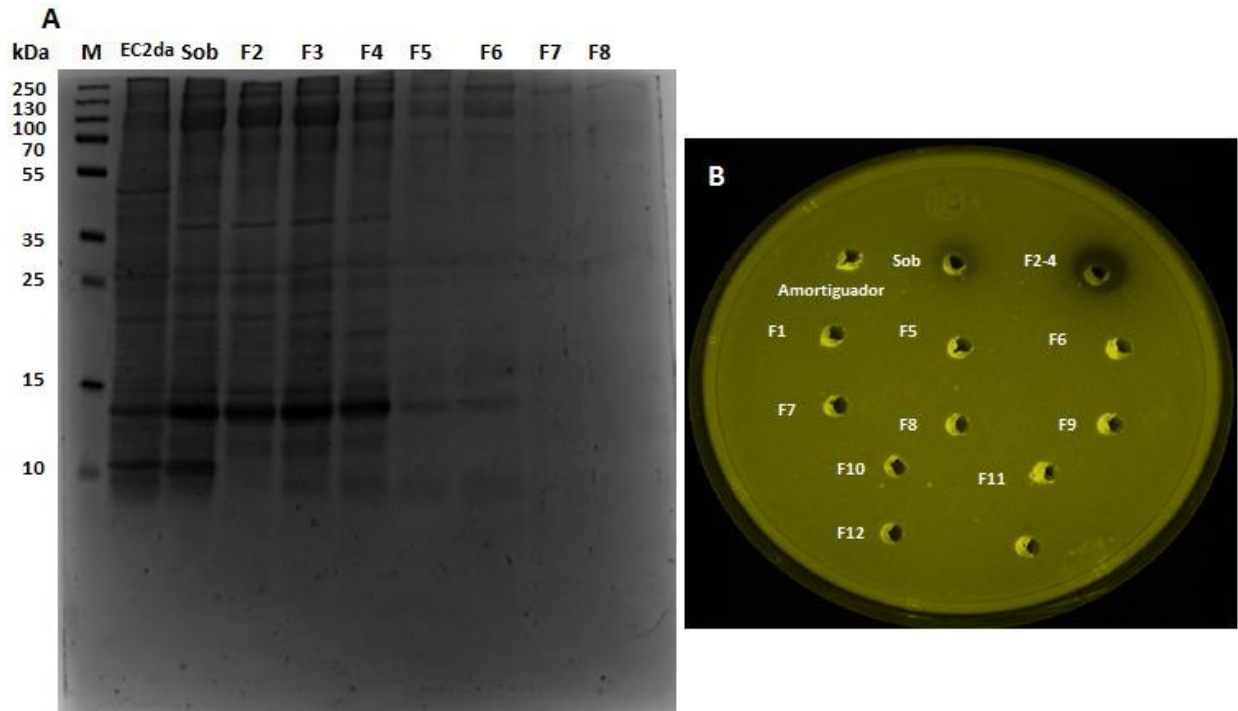


Figura 21. Gel desnaturizante y ensayo de fosfolipasa de fracciones a partir de la cromatografía catiónica del sobrenadante de EC2da. A) Gel SDS-PAGE de las fracciones que se obtuvieron de la cromatografía catiónica. B) ensayo de actividad fosfolipasa con las fracciones resultantes de la cromatografía. Se tiene el amortiguador fosfato de sodio 50 mM como control negativo, el Sob es la muestra antes de pasar por la cromatografía catiónica.

A partir de esta fracción de pool se analizó la secuencia mediante la técnica de degradación EDMAN (Figura 22) en la cual se obtuvo una pequeña secuencia de 15 aa GDDRM—SKANYITGN—E. Este organismo presenta una gran variedad de fosfolipasa, teniendo marcadas diferencias en proteoma del moco del organismo y el transcriptoma del tentáculo ^{118,161}. También se analizó mediante espectrometría de masas (Figura 23) cortando la banda marcada de peso alrededor de 15 Kda.

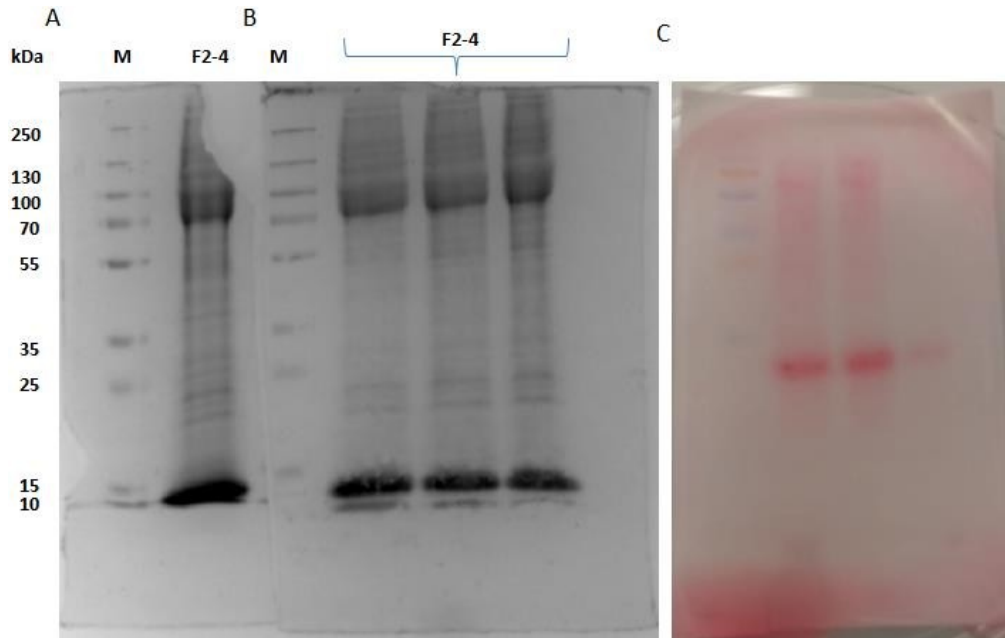


Figura 22. Muestra analizada mediante degradación EDMAN. A) y B) gel desnaturizante a 15% de acrilamida, pool de fracciones 2-4 en donde A) se tiñó con Azul de Coomassie R-250, B) teñido luego de la transferencia a C) membrana PDVF, luego de la transferencia, teñido con rojo de Ponceau.

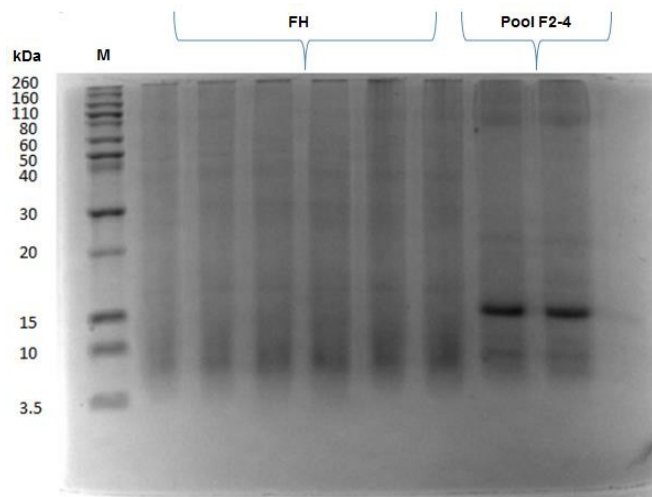


Figura 23. Fracciones analizadas mediante espectrometría de masas, FH- fracción hemolítica del precipitado a 60% de sulfato de amonio del ECM luego de la cromatografía aniónica, pool F2-4 fracción del sobrenadante de EC2da luego de la cromatografía catiónica.

De los 3783 espectros de absorbancia que arrojó la técnica de espectrometría de masas, dio como resultado similitud a 7 fosfolipasas, entre ellas la acetilhidrolasa de factor activador plaquetario 2 citoplasmático, 58/88 kDa PLA2 independiente de calcio, PLA2 acida natratoxina, PLA2 citosólica, PLA2 básica S11-61, fosfolipasa C hidrolizante de N-acil-fosfatidiletanolamina *A. pallida* (NCBI

XP_028512548.1, XP_0208989113.1-DECOY, XP_020902707.1, KXJ14048.1(+1), KXJ26406.1(+1) y KXJ11817.1-DECOY respectivamente).

Estas proteínas son de gran interés de estudio en *A. dowii* y en el estudio general de fosfolipasas en anémonas ya que se tienen muy pocas reportadas para este Phylum. Las acetilhidrolasa de factor activador plaquetario 2 citoplasmático *E. pallida* son enzimas que forman parte de las células del sistema inmune y son las encargadas de hidrolizar fosfolípido autacoide que es un potente mensajero lipídico que participa en una variedad de procesos fisiológicos principalmente inflamatorios y, al ser desacetilado pierde su actividad, las PAF-HA (por sus siglas en inglés Platelet-Activating Factor-Acetyl Hydrolase) son independientes de calcio y tiene pesos de alrededor de 40 kDa, a diferencia de las PAF-HA tipo I estas no presentan péptido señal por lo que se mantienen dentro de la célula, además de su función como antiinflamatorios también juegan un papel importante en la protección de estrés oxidativo en el cual los fosfolípidos oxidados están involucrados en procesos patológicos dañinos como la desorganización de la estructura de la membrana y acción proinflamatoria parecida al PAF 162,163.

La PLA2 básica S11-61 (Figura 24) es una isoforma de los inhibidores de activación plaquetaria superbina de la serpiente *Austrelaps superbus*, esta isoforma presenta un 87% de similitud en secuencia con la superbina “a” y presenta la mayor actividad antiplaquetaria ¹⁶⁴, a pesar de lo anterior estas proteínas no necesitan su actividad enzimática para actuar como anticoagulante; la estructura primaria de estas proteínas exhiben características del Grupo I de PLA2s donde se agrupan mayormente PLA2 de venenos de serpientes.

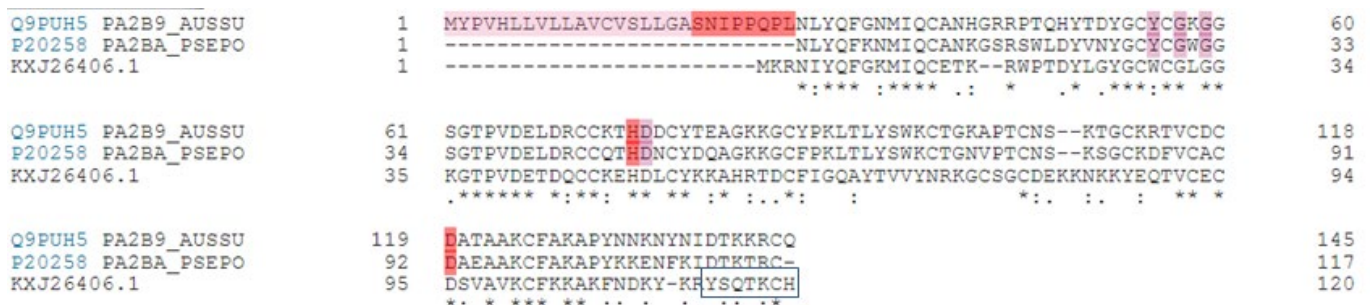


Figura 24. Alineación de secuencias de aminoácidos de la PLA2 S11-61 isoforma de la superbina “a” de la serpiente *Austrelaps superbus*, PLA2 pseudexina A de *Pseudechis porphyriacus* la cual tiene gran homología con las fosfolipasas básicas de venenos de serpientes ¹⁶⁵, PLA2 S11-61 de *Exaiptasia pallida*. De color rosa claro está marcado el péptido señal, de rojo el propéptido, así como de fucsia los aminoácidos de unión a calcio y de rojo los aa que participan en la catálisis, por último, el cuadro azul señala el péptido obtenido de espectrometría de masas a partir del pool F2-4 en *A. dowii* nombrada A2-Ad1.

La PLA2 ácida natratoxina (Figura 25) es una neurotoxina que se identificó en el veneno de la especie de serpiente *Naja atra* que actúa como inhibidor de canales de potasio, alterando la cinética de activación del canal, por lo que puede denominarse como un modificador de activación esto por la unión en el sitio S4 del canal que es un dominio de detección de voltaje. Esta actividad como neurotoxina es independiente de la actividad enzimática y se ha propuesto que su actividad como inhibidor es debido a la interacción del dominio C-terminal de la sPLA2 con el canal de potasio, los residuos que participan son Lys, Arg, Asp, Leu/Ile y residuos aromáticos en donde se observa que son las interacciones electrostáticas las que orientan la unión de la toxina con el canal ¹⁶⁶.

A4FS04	PA2A_NAJAT	1	-----NLYQFKNMIQCTVPS	15
A0A6P8H725	A0A6P8H725_ACTTE	1	MGALKLLVLLVVVACVACTSFDLAKLKKKSLSKTLKTVHTRARRSLYEFYQMIKCEI-G	59
XP_020902707.1		1	MGVFKLLTLLAMIVIASRSLE--EKKGGRHSTMVGHRLNRSKRSLWFEFWKMI SCET-G	57
			.*:.* :*:.* . .	
A4FS04	PA2A_NAJAT	16	RSWWDFAFYGCYCGKGGSGTTPVDDLDRCCQVHDNRYNEAEKIS--GCWPFYKTYSECSQ	73
A0A6P8H725	A0A6P8H725_ACTTE	60	RDWQDYNLYGCFGRGGKGTVPDLDLQCCFDHDECYDRAAA--TVCTWPYQIYLDYWHK	117
XP_020902707.1		58	RSWTDNFNGYGCWCGKGGGGKIVDDLDRCCYVHDNRYSKAQESGKCSWNGEIIYWNTRYHMT	117
			. *: **:*:*** ** ** **:* **:*:*** **:*:***	
A4FS04	PA2A_NAJAT	74	GTLT-CKGGNNACAAVDCRLAAICFAGAPYTDANYNIDLKARCQ	119
A0A6P8H725	A0A6P8H725_ACTTE	118	NCSECDASKNTACEQALCECDSDRAAKCFKNSKWDQO-YDDYPQDKCA	163
XP_020902707.1		118	GCSDCVKAEKNXACEQALCECDSDAARCFEASFWDAQ-YDDYPQSQCT	163
			. * * * * : * : * * * * * * * * : : * : : : *	

Figura 25. Alineamiento de secuencia de aminoácidos de las PLA2 ácida natratoxina de la serpiente *Naja atra* la cual fue la primera en ser identificada y caracterizada, mientras que las de *Actinia tenebrosa* y *Exaiptasia pallida* fueron identificadas en sus respectivos genomas más no se han identificado en cuanto a actividad experimentalmente. Los aminoácidos sombreados de rojo son aquellos que unen calcio mientras que los que participan en la catálisis son los sombreados en rojo, el cuadro azul muestra aquella secuencia que se identificó en *A. dowii* a la cual se nombró como A2-Ad2.

Se identificaron varias supuestas toxinas, como U-metritoxin-Msn2a de *M. senile* que actúa bloqueando canales de potasio y tiene 4 enlaces disulfuro ¹⁶⁷, U-actitoxin-Ate1c de *A. tenebrosa*, U-actitoxin-Avd8d de *E. pallida*, estas se identificaron en los genomas de dichas especies, si bien tienen similitud en las secuencia con otras toxinas ya conocidas, su actividad no ha sido probada.

De los datos obtenidos en el presente trabajo se observó que esta especie de anémona tiene gran variabilidad de fosfolipasas tipo A2 y es importante remarcar las secuencias que presentaron homología con las fosfolipasas básica S11-61 cuya secuencia de siete aminoácidos la cual fue nombrada como A2-Ad1 (Figura 24) y la secuencia de quince aminoácidos con similitud a la natratoxina que fue nombrada como A2-Ad2 (Figura 25) demuestran la importancia de seguir analizando el veneno de esta especie ya que no se tiene mucho conocimiento sobre estas enzimas en la clase Anthozoa además de que no se tienen reportes de fosfolipasas tipo A2 comparables a las de venenos de serpientes en anémonas, las fosfolipasas reportadas a pesar de no tener actividad hemolítica si presentan actividad neurotóxica e inflamatoria, por lo

que en cuanto a esta enzima se deberá seguir investigando su abundancia, variabilidad y actividades en esta especie de anémona.

Los resultados para la citolisina formadora de poro en conjunto con los datos obtenidos del proteoma y transcriptoma (127) de *A. dowii* sugieren que no tiene una gran abundancia o variabilidad de actinoporinas. No obstante en el presente trabajo se identificó a más de una proteína con capacidad de crear poros en la membrana plasmática que han demostrado una gran capacidad lítica en otras especies del Phylum, como lo son las AvTX-60A y CaTX/CrTX, así como fosfolipasas A2 de gran impacto en el estudio de venenos de animales tales como la parecida a la natratoxina, la PLA2 básica S11/61 y la PAF-HA las cuales deberán ser buscadas por igual en el transcriptoma de esta especie para tener más certeza y también la oportunidad de obtener el gen codificador para futuros estudios.

Conclusiones

De acuerdo a los datos obtenidos de los ensayos de actividad en conjunto con los datos de análisis de secuenciación de aminoácidos se demostró que hay dos tipos de citolisinas presentes en el extracto de *A. dowii* representando a ambos tipos de citolisinas de interés, formadora de poro y fosfolipasa.

Perspectivas

Si bien los resultados de este trabajo no dieron como resultado una secuencia de aminoácidos completa de las citolisinas de interés, se propone mejorar el proceso de purificación de este extracto para ser caracterizadas bioquímica y biológicamente.

- Al observar que hubo una nula o aumento de actividad en los extractos cuando la única variante fueron el número de ciclos de congelado y descongelado, se propone que es fundamental realizar los tres ciclos de congelado y descongelado cuando se emplea la extracción del organismo completo en *A. dowii*.
- Mejorar proceso de purificación para tener las secuencias de aminoácidos completa o bien buscar estas citolisinas en el transcriptoma que ya se tiene de esta especie.
- Emplear ensayos de actividad más precisos una vez purificada la proteína de interés para caracterizar mejor su actividad enzimática o lítica y así tener parámetros más puntuales para comparar con las ya reportadas.
- Hacer el gen codificador de la citolisina para ser expresada heterológicamente.
- Expresar, purificar y caracterizar estas citolisinas para caracterizar bioquímica y biológicamente.
- Evaluar las posibles funciones que en el presente trabajo propone, como son, modelos para el desarrollo de inmunotoxinas, dispersor de fármacos, biosensor de membrana, modelo para el estudio de interacciones lípido-proteínas, etc.

Bibliografia

1. Findlay E. Russell. Marine Toxins and Venomous and Poisonous Marine Animals. in *Advances in Marine Biology* vol. 3 255–384 (1965).
2. Frazão Bárbara, Vasconcelos Vitor & Antunes Agostinho. Sea Anemone (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria) Toxins: An Overview. *Marine Drugs* **10**, 1812–1851 (2012).
3. Lane, C. E. Toxins of Marine Origin. *Annual Review of Pharmacology* **8**, 409–426 (1968).
4. Tejuca Mayra, Anderluh Gregor & Dalla Serra Mauro. Sea anemone cytolytins as toxic components of immunotoxins. *Toxicon* **54**, 1206–1214 (2009).
5. Anderluh, G., Sepi, K., Turk, T. & Maek, P. Cytolytic Proteins from Cnidarians – an Overview. *Acta Chim. Slov.* **6** (2011).
6. Jouiaei, M. *et al.* Ancient Venom Systems: A Review on Cnidaria Toxins. *Toxins* **7**, 2251–2271 (2015).
7. King, G. F. Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics. *Expert Opinion on Biological Therapy* **11**, 1469–1484 (2011).
8. Daly, M. *et al.* The phylum Cnidaria: A review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus. *Zootaxa* **56** (2007).
9. Rojko, N., Dalla Serra, M., Maček, P. & Anderluh, G. Pore formation by actinoporins, cytolytins from sea anemones. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1858**, 446–456 (2016).
10. Peraro, M. D. & van der Goot, F. G. Pore-forming toxins: ancient, but never really out of fashion. *Nature Reviews Microbiology* **14**, 77–92 (2016).
11. Valcarcel, C. A. *et al.* Effects of Lipid Composition on Membrane Permeabilization by Sticholysin I and II, Two Cytolytins of the Sea Anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biophysical Journal* **80**, 2761–2774 (2001).
12. Tabakmakher, V. M. *et al.* Biologically active polypeptides of sea anemones: Structure, function, and prospects for application. *Russian Journal of Marine Biology* **39**, 311–320 (2013).
13. Alves, A. C., Ribeiro, D., Nunes, C. & Reis, S. Biophysics in cancer: The relevance of drug-membrane

- interaction studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1858**, 2231–2244 (2016).
14. Lazcano-Pérez, F. *et al.* Hemolytic, anticancer and anti-giardial activity of *Palythoa caribaeorum* venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* **24**, (2018).
 15. Nevalainen, T. J. *et al.* Phospholipase A₂ in Cnidaria. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **139**, 731–735 (2004).
 16. Dennis, E. A., Cao, J., Hsu, Y.-H., Magrioti, V. & Kokotos, G. Phospholipase A₂ Enzymes: Physical Structure, Biological Function, Disease Implication, Chemical Inhibition, and Therapeutic Intervention. *Chemical Reviews* **111**, 6130–6185 (2011).
 17. Osorio, J. H. & Vinazco, J. El metabolismo lipídico bovino y su relación con la dieta, condición corporal, estado productivo y patologías asociadas. *Biosalud* **9**, 56–66.
 18. Brusca, R. C. & Brusca, G. J. *Invertebrates*. (Sinauer Associates, Inc., 2003).
 19. Watson, G. M. Ultrastructure and cytochemistry of developing nematocysts. in *The Biology of Nematocysts* 143–164 (Elsevier, 1988). doi:10.1016/b978-0-12-345320-4.50014-6.
 20. Beckmann, A. & Özbek, S. The Nematocyst: a molecular map of the Cnidarian stinging organelle. *The International Journal of Developmental Biology* **56**, 577–582 (2012).
 21. Williams, R. B. Acrorhagi, catch tentacles and sweeper tentacles: a synopsis of ‘aggression’ of actiniarian and scleractinian Cnidaria. 216–217 (1991).
 22. Cnidarians Hydrozoa – Hydras Scyphozoa – Sea Jellies , “ Jelly fish” - ppt video online download. <https://slideplayer.com/slide/4442663/>.
 23. Ctenophorans, A., Metridium, Cnidarians, Cnidocyts, Hydra w m, Aurelia Anatomy. Cnidarians Hydrozoa – Hydras Scyphozoa – Sea Jellies , “ Jelly fish” - ppt video online download. <https://slideplayer.com/slide/4442663/>.
 24. Fautin, D. G. Structural diversity, systematics, and evolution of cnidae. *Toxicon* **54**, 1054–1064 (2009).
 25. Meinardi, E. N. Una nueva actividad citolítica en Antozoos : caracterización y significado biológico. (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires, 1995).
 26. Hand, C. & Uhlinger, K. R. The Culture, Sexual and Asexual Reproduction, and Growth of the Sea

- Anemone *Nematostella vectensis*. *The Biological Bulletin* **182**, 169–176 (1992).
27. *Coelenterate ecology and behavior*. (Springer-Verlag New York, 2013).
 28. Lubbock, R. Why are Clownfishes not Stung by Sea Anemones? *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **207**, 35–61 (1980).
 29. Walther-Mendoza, M., Reyes-Bonilla, H., LaJeunesse, T. C. & López-Pérez, A. Distribución y diversidad de dinoflagelados simbióticos en corales pétreos de la costa de Oaxaca, Pacífico de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **87**, 417–426 (2016).
 30. Ayala-Summano, J.-T., Licea-Navarro, A., Rudiño-Piñera, E., Rodríguez, E. & Rodríguez-Almazán, C. Sequencing and de novo transcriptome assembly of *Anthopleura dowii* Verrill (1869), from Mexico. *Genomics Data* **11**, 92–94 (2017).
 31. Avalos Aurora Vassallo. Composición y distribución de las anémonas (Cnidaria: Anthozoa: Actiniaria y Zoantharia) del intermareal rocoso en el Pacífico Occidental de la Península de Baja California, México. (Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), 2018).
 32. Carlgren, O. The Actinian Fauna of the Gulf of California. *Proceedings of the United States National Museum* **101**, 415–449, figures 78-84, plate 14 (1951).
 33. Class Anthozoa. <https://www.taxateca.com/claseanthozoa.html>.
 34. Bateman, D. F. & Basham, H. G. Degradation of Plant Cell Walls and Membranes by Microbial Enzymes. in *Physiological Plant Pathology* (eds. Heitefuss, R. & Williams, P. H.) 316–355 (Springer Berlin Heidelberg, 1976). doi:10.1007/978-3-642-66279-9_13.
 35. White, J. Venomous animals: clinical toxinology. in *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology* (ed. Luch, A.) vol. 100 233–291 (Birkhäuser Basel, 2010).
 36. Fry, B. G. *et al.* The Toxicogenomic Multiverse: Convergent Recruitment of Proteins Into Animal Venoms. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* **10**, 483–511 (2009).
 37. Casewell, N. R., Wüster, W., Vonk, F. J., Harrison, R. A. & Fry, B. G. Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms. *Trends in Ecology & Evolution* **28**, 219–229 (2013).
 38. Evans, T. G. Considerations for the use of transcriptomics in identifying the ‘genes that matter’ for

- environmental adaptation. *Journal of Experimental Biology* **218**, 1925–1935 (2015).
39. Macrander, J., Brugler, M. R. & Daly, M. A RNA-seq approach to identify putative toxins from acrorhagi in aggressive and non-aggressive *Anthopleura elegantissima* polyps. *BMC Genomics* **16**, 221 (2015).
 40. Macek, P. Polypeptide cytolytic toxins from sea anemones (Actiniaria). *FEMS Microbiology Immunology* **105**, 121–129 (1992).
 41. Hessinger, D. A., Lenhoff, H. M. & Kahan, L. B. Haemolytic, Phospholipase A and Nerve-affecting Activities of Sea Anemone Nematocyst Venom. *Nature New Biology* **241**, 125 (1973).
 42. Podobnik, M. & Anderluh, G. Pore-forming toxins in Cnidaria. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **72**, 133–141 (2017).
 43. Chen, R. R. Permeability issues in whole-cell bioprocesses and cellular membrane engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology* **74**, 730–738 (2007).
 44. Singer, S. J. & Nicolson, G. L. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* **175**, 720 (1972).
 45. Lodish, J. D. H. *et al. Biología Celular y Molecular*. (Panamericana).
 46. McNeil, P. L. & Steinhardt, R. A. Loss, Restoration, and Maintenance of Plasma Membrane Integrity: Table I. *The Journal of Cell Biology* **137**, 1–4 (1997).
 47. Grabski, A. C. Chapter 18 Advances in Preparation of Biological Extracts for Protein Purification. in *Methods in Enzymology* vol. 463 285–303 (Elsevier, 2009).
 48. Tang, S. K. Y. & Marshall, W. F. Self-repairing cells: How single cells heal membrane ruptures and restore lost structures. *Science* **356**, 1022 (2017).
 49. D. K. Mathews, K. E. Van Holde & K. G., Ahern. *Biochemistry*. (Pearson Educación, S. A., 2002).
 50. Estructura de la membrana plasmática. *Khan Academy*
<https://es.khanacademy.org/science/biology/membranes-and-transport/the-plasma-membrane/a/structure-of-the-plasma-membrane>.
 51. Spector, A. A. & Yorek, M. A. Membrane lipid composition and cellular function. 21.
 52. Esfingolípidos. *Naturaleza y turismo* <https://www.asturnatura.com/articulos/lipidos/esfingolipidos.php>.

53. Simons, K. & Toomre, D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 31–39 (2000).
54. Lingwood, D. & Simons, K. Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle. *Science* **327**, 46–50 (2010).
55. Simons, K. & Vaz, W. L. C. Model Systems, Lipid Rafts, and Cell Membranes. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **33**, 269–295 (2004).
56. Pike, L. J. Lipid rafts: bringing order to chaos. *Journal of Lipid Research* **44**, 655–667 (2003).
57. Balsas de membrana. <http://biomodel.uah.es/model2/lip/lipid-rafts.htm>.
58. García, G. A. Fosfolipasas A2: grandes familias y mecanismos de acción. *Repertorio de Medicina y Cirugía* **18**, 199–209 (2009).
59. Karim L. Jiménez, Amparo I. Zavaleta, Victor Izaguirre, & Armando Yarleque. Biología celular y molecular de las fosfolipasas A2. (2005).
60. A Zykova, T., Monastyrnaya, M., Apalikova, O., V Shvets, T. & P Kozlovskaja, E. Low-molecular cytolytic and trypsin inhibitors from sea anemone *Radianthus macrodactylus*. Isolation and partial characterization. **24**, (1998).
61. González-Bacero, J. & Hernández, J. R. Las lipasas: enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción interfacial. *Rev. Colom. Biotecnol.* **12**, 124–140 (2010).
62. Jouiaei, M. *et al.* Ancient Venom Systems: A Review on Cnidaria Toxins. *Toxins* **7**, 2251–2271 (2015).
63. Kem, W. R. Sea anemone toxins: structure and action. in *The Biology of Nematocysts* 375–405 (Elsevier, 1988). doi:10.1016/B978-0-12-345320-4.50025-0.
64. Iacovache, I., Bischofberger, M. & van der Goot, F. G. Structure and assembly of pore-forming proteins. *Current Opinion in Structural Biology* **20**, 241–246 (2010).
65. García-Linares, S. *et al.* Differential Effect of Membrane Composition on the Pore-Forming Ability of Four Different Sea Anemone Actinoporins. *Biochemistry* **55**, 6630–6641 (2016).
66. Anderluh, G. & Maček, P. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria). *Toxicon* **40**, 111–124 (2002).
67. Maček, P. & Lebez, D. Isolation and characterization of three lethal and hemolytic toxins from the sea anemone *Actinia equina* L. *Toxicon* **26**, 441–451 (1988).

68. Bellomio, A. *et al.* Purification, cloning and characterization of fragaceatoxin C, a novel actinoporin from the sea anemone *Actinia fragacea*. *Toxicon* **54**, 869–880 (2009).
69. Lanio, M. E. *et al.* Purification and characterization of two hemolysins from *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon* **39**, 187–194 (2001).
70. Klyshko, E. V. *et al.* Isolation, properties and partial amino acid sequence of a new actinoporin from the sea anemone *Radianthus macrodactylus*. *Toxicon* **44**, 315–324 (2004).
71. Hu, B. *et al.* Purification and characterization of gigantoxin-4, a new actinoporin from the sea anemone *Stichodactyla gigantea*. *International journal of biological sciences* **7**, 729–739 (2011).
72. Soletti, R. C. *et al.* Potentiation of anticancer-drug cytotoxicity by sea anemone pore-forming proteins in human glioblastoma cells: *Anti-Cancer Drugs* **19**, 517–525 (2008).
73. Wang, Y., Chua, K. L. & Khoo, H. E. A new cytolysin from the sea anemone, *Heteractis magnifica*: isolation, cDNA cloning and functional expression. *Biochimica et Biophysica Acta* **10**.
74. Tanaka, K., Caaveiro, J. M. M., Morante, K., González-Mañas, J. M. & Tsumoto, K. Structural basis for self-assembly of a cytolytic pore lined by protein and lipid. *Nature Communications* **6**, (2015).
75. Mechaly, A. E. *et al.* Pores of the toxin FraC assemble into 2D hexagonal clusters in both crystal structures and model membranes. *Journal of Structural Biology* **180**, 312–317 (2012).
76. Avila, A. D., de Acosta, C. M. & Lage, A. A new immunotoxin built by linking a hemolytic toxin to a monoclonal antibody specific for immature T lymphocytes. *International Journal of Cancer* **42**, 568–571 (1988).
77. Tanaka, K., Caaveiro, J. M. M., Morante, K., González-Mañas, J. M. & Tsumoto, K. Structural basis for self-assembly of a cytolytic pore lined by protein and lipid. *Nature Communications* **6**, 6337 (2015).
78. Mechaly, A. E. *et al.* Pores of the toxin FraC assemble into 2D hexagonal clusters in both crystal structures and model membranes. *Journal of Structural Biology* **180**, 312–317 (2012).
79. Linder, R., Bernheimer, A. W. & Kim, K.-S. Interaction between sphingomyelin and a cytolysin from the sea anemone *Stoichactis helianthus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **467**, 290–300 (1977).

80. Pedrera, L. *et al.* The Presence of Sterols Favors Sticholysin I-Membrane Association and Pore Formation Regardless of Their Ability to Form Laterally Segregated Domains. *Langmuir* **31**, 9911–9923 (2015).
81. Alegre-Cebollada, J., Rodriguez-Crespo, I., Gavilanes, J. G. & Pozo, A. M. Detergent-resistant membranes are platforms for actinoporin pore-forming activity on intact cells. *FEBS Journal* **273**, 863–871 (2006).
82. Rosenthal, S. Vincristine Neurotoxicity. 5.
83. Losada Buchillón, R. *et al.* Cardiotoxicidad en pacientes con leucemia aguda promielocítica tratados con altas dosis de antraciclinas. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia* **19**, 0–0 (2003).
84. Grant, S. AramC: Cellular and Molecular Pharmacology. 37.
85. Vincristine - Chemotherapy Drugs - Chemocare. <http://chemocare.com/chemotherapy/drug-info/Vincristine.aspx>.
86. Alves, A. C., Ribeiro, D., Nunes, C. & Reis, S. Biophysics in cancer: The relevance of drug-membrane interaction studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1858**, 2231–2244 (2016).
87. Gamboa, R. A. Un acercamiento a la producción de proteínas recombinantes terapéuticas de uso humano. **4**, 5 (2009).
88. Tejuca, M. *et al.* Construction of an immunotoxin with the pore forming protein StI and ior C5, a monoclonal antibody against a colon cancer cell line. *International Immunopharmacology* **4**, 731–744 (2004).
89. Pederzoli, C., Belmonte, J. G., Serra, J. M. D. & Menestrina, G. Biochemical and Cytotoxic Properties of Conjugates of Transferrin with Equinatoxin 11, a Cytolysin from a Sea Anemone. 8.
90. Laszlo, A. H., Derrington, I. M. & Gundlach, J. H. MspA nanopore as a single-molecule tool: From sequencing to SPRNT. *Methods* **105**, 75–89 (2016).
91. Oukhaled, A., Bacri, L., Pastoriza-Gallego, M., Betton, J.-M. & Pelta, J. Sensing Proteins through Nanopores: Fundamental to Applications. *ACS Chem. Biol.* **7**, 1935–1949 (2012).

92. Shi, W., Friedman, A. K. & Baker, L. A. Nanopore Sensing. *Anal. Chem.* **89**, 157–188 (2017).
93. Robertson, J. W. F. & Reiner, J. E. The Utility of Nanopore Technology for Protein and Peptide Sensing. *Proteomics* **18**, 1800026 (2018).
94. Bezrukov, S. M. & Kasianowicz, J. J. Current noise reveals protonation kinetics and number of ionizable sites in an open protein ion channel. *Phys. Rev. Lett.* **70**, 2352–2355 (1993).
95. Wloka, C., Mutter, N. L., Soskine, M. & Maglia, G. Alpha-Helical Fragaceatoxin C Nanopore Engineered for Double-Stranded and Single-Stranded Nucleic Acid Analysis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**, 12494–12498 (2016).
96. Shi, W., Friedman, A. K. & Baker, L. A. Nanopore Sensing. *Anal. Chem.* **89**, 157–188 (2017).
97. Ramírez-Carretero, S., Miranda-Zaragoza, B. & Rodríguez-Almazán, C. Actinoporins: From the Structure and Function to the Generation of Biotechnological and Therapeutic Tools. *Biomolecules* **10**, 539 (2020).
98. Schaloske, R. H. & Dennis, E. A. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1761**, 1246–1259 (2006).
99. Vasquez, A. M., Mouchlis, V. D. & Dennis, E. A. Review of four major distinct types of human phospholipase A 2. *Advances in Biological Regulation* **67**, 212–218 (2018).
100. Gutiérrez, José María. Mecanismo de acción de miotoxinas aisladas de venenos de serpientes. **32**, 213–221 (1984).
101. Martins, R. D. *et al.* Purification and characterization of the biological effects of phospholipase A2 from sea anemone *Bunodosoma caissarum*. *Toxicon* **54**, 413–420 (2009).
102. Murakami, M. *et al.* Different Functional Aspects of the Group II Subfamily (Types IIA and V) and Type X Secretory Phospholipase A2s in Regulating Arachidonic Acid Release and Prostaglandin Generation. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 31435–31444 (1999).
103. Dennis, E. A., Cao, J., Hsu, Y.-H., Magrioti, V. & Kokotos, G. Phospholipase A₂ Enzymes: Physical Structure, Biological Function, Disease Implication, Chemical Inhibition, and Therapeutic Intervention. *Chemical Reviews* **111**, 6130–6185 (2011).
104. Landucci, E. C. T. *et al.* Purification and inflammatory edema induced by two PLA2 (Anch TX-I and Anch

- TX-II) from sea anemone *Anthothoe chilensis* (Actiniaria: Sagartiidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **161**, 170–177 (2012).
105. Grotendorst, G. R. & Hessinger, D. A. Enzymatic characterization of the major phospholipase A2 component of sea anemone (*Aiptasia pallida*) nematocyst venom. *Toxicon* **38**, 931–943 (2000).
106. Manjunatha Kini, R. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. *Toxicon* **42**, 827–840 (2003).
107. Collu, R. *et al.* Altered arachidonic acid-derived inflammatory eicosanoids brain levels in a rodent model of anorexia nervosa. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 158578 (2019) doi:10.1016/j.bbalip.2019.158578.
108. Herrera, M. C. & Fernández, B. G. Los ácidos grasos omega 3 y omega 6: nutrición, bioquímica y salud. *REB* **25**, 72–79 (2006).
109. Razpotnik, A. *et al.* A new phospholipase A2 isolated from the sea anemone *Urticina crassicornis* - its primary structure and phylogenetic classification: New PLA2 from *Urticina crassicornis*. *FEBS Journal* **277**, 2641–2653 (2010).
110. Romero, L. *et al.* Enzymatic and structural characterization of a basic phospholipase A2 from the sea anemone *Condylactis gigantea*. *Biochimie* **92**, 1063–1071 (2010).
111. Zimmerberg, J. & Kozlov, M. M. How proteins produce cellular membrane curvature. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7**, 9–19 (2006).
112. Morante, K., Caaveiro, J. M. M., Tanaka, K., González-Mañás, J. M. & Tsumoto, K. A Pore-Forming Toxin Requires a Specific Residue for Its Activity in Membranes with Particular Physicochemical Properties. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 10850–10861 (2015).
113. Dennis, E. A., Cao, J., Hsu, Y.-H., Magrioti, V. & Kokotos, G. Phospholipase A₂ Enzymes: Physical Structure, Biological Function, Disease Implication, Chemical Inhibition, and Therapeutic Intervention. *Chemical Reviews* **111**, 6130–6185 (2011).
114. Razpotnik, A. *et al.* A new phospholipase A2 isolated from the sea anemone *Urticina crassicornis* - its primary structure and phylogenetic classification: New PLA2 from *Urticina crassicornis*. *FEBS Journal*

- 277**, 2641–2653 (2010).
115. van Hensbergen, V. P. *et al.* Streptococcal Lancefield polysaccharides are critical cell wall determinants for human Group IIA secreted phospholipase A2 to exert its bactericidal effects. *PLoS Pathog* **14**, e1007348 (2018).
116. McCarty, M. The lysis of group A hemolytic Streptococci extra-celular enzymes of Streptomyces albus. *Journal of Experimental Medicine* **96**, 569–580 (1952).
117. Fenard, D. *et al.* Secreted phospholipases A2, a new class of HIV inhibitors that block virus entry into host cells. *J. Clin. Invest.* **104**, 611–618 (1999).
118. Ayala-Summano, J.-T., Licea-Navarro, A., Rudiño-Piñera, E., Rodríguez, E. & Rodríguez-Almazán, C. Sequencing and de novo transcriptome assembly of *Anthopleura dowii* Verrill (1869), from Mexico. *Genomics Data* **11**, 92–94 (2017).
119. Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254 (1976).
120. Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
121. García, D. L. L. Instituto Nacional de Salud. 69 (2003).
122. Maček, P. & Lebez, D. Kinetics of hemolysis induced by equinatoxin, a cytolytic toxin from the sea anemone *Actinia equina*. Effect of some ions and pH. *Toxicon* **19**, 233–240 (1981).
123. Rodriguez-Almazan, C., de Escudero, I. R., Canto, P. E., Gill, S. S. & Sobero, M. The Amino- and Carboxyl-Terminal Fragments of the *Bacillus thuringiensis* Cyt1Aa Toxin Have Differential Roles in Toxin Oligomerization and Pore Formation. 9.
124. Habermann, E. & Hardt, K. L. A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases. *Analytical Biochemistry* **50**, 163–173 (1972).
125. Rossi, M. Chapter 27 Use of Lecithin and Lecithin Fractions. 11.
126. Wingfield, P. Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate. in *Current Protocols in Protein Science* (eds. Coligan, J. E., Dunn, B. M., Speicher, D. W. & Wingfield, P. T.) A.3F.1-A.3F.8 (John Wiley & Sons,

- Inc., 1998). doi:10.1002/0471140864.psa03fs13.
127. Duong-Ly, K. C. & Gabelli, S. B. Salting out of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation. in *Methods in Enzymology* vol. 541 85–94 (Elsevier, 2014).
128. Burgess, R. R. Chapter 20 Protein Precipitation Techniques. in *Methods in Enzymology* vol. 463 331–342 (Elsevier, 2009).
129. Ammonium Sulfate Calculator from EnCor Biotechnology Inc.
130. Ramírez-Carretero, S. *et al.* Identification of a pore-forming protein from sea anemone *Anthopleura dowii* Verrill (1869) venom by mass spectrometry. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* **25**, (2019).
131. Whitaker, S. Chromatographic techniques and their application to studies of conformational changes, stability and refolding of proteins. **11**, 15 (2012).
132. Jungbauer, A. & Hahn, R. Chapter 22 Ion-Exchange Chromatography. in *Methods in Enzymology* vol. 463 349–371 (Elsevier, 2009).
133. Niall, H. D. [36] Automated edman degradation: The protein sequenator. in *Methods in Enzymology* vol. 27 942–1010 (Elsevier, 1973).
134. Domon, B. Mass Spectrometry and Protein Analysis. *Science* **312**, 212–217 (2006).
135. Ferlan, I. & Lebez, D. Equinatoxin, a lethal protein from *Actinia equina*—I Purification and characterization. *Toxicon* **12**, 57–58 (1974).
136. McKay, M. C. & Anderson, P. A. V. ON THE PREPARATION AND PROPERTIES OF ISOLATED CNIDOCYTES AND CNIDAE1. in *The Biology of Nematocysts* 273–293 (Elsevier, 1988). doi:10.1016/B978-0-12-345320-4.50020-1.
137. Blanquet, R. & Lenhoff, H. M. A Disulfide-Linked Collagenous Protein of Nematocyst Capsules. *Science* **154**, 152–153 (1966).
138. Benov, L. & Al-Ibraheem, J. Disrupting *Escherichia coli*: A Comparison of Methods. *BMB Reports* **35**, 428–431 (2002).
139. Kohno, Y., Satoh, H., Iguchi, A. & Nagai, H. Characterization of a new hemolytic protein toxin from the

- sea anemone *Anthopleura asiatica*. *Fisheries Science* **75**, 1049–1054 (2009).
140. Monastyrnaya, M. M., Zykova, T. A., Apalikova, O. V., Shwets, T. V. & Kozlovskaya, E. P. Biologically active polypeptides from the tropical sea anemone *Radianthus macrodactylus*. *Toxicon* **40**, 1197–1217 (2002).
141. Wang, Y., Chua, K. L. & Khoo, H. E. A new cytolyisin from the sea anemone, *Heteractis magnifica*: isolation, cDNA cloning and functional expression¹The nucleotide sequence reported in this paper has been submitted to the GenBank Data Bank with accession number AF170706.1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1478**, 9–18 (2000).
142. Cuevas-Cruz, M. *et al.* A Novel Phospholipase A2 Isolated from *Palythoa caribaeorum* Possesses Neurotoxic Activity. *Toxins* **11**, 89 (2019).
143. Shiomi, K., Tanaka, E., Yamanaka, H. & Kikuchi, T. Isolation and characterization of a lethal hemolysin in the sea anemone *Parasicyonis actinostoloides*. *Toxicon* **23**, 865–874 (1985).
144. Anderluh, G. *et al.* Equinatoxins, pore-forming proteins from the sea anemone *Actinia equina*, belong to a multigene family. *Toxicon* **37**, 1391–1401 (1999).
145. Rivera-de-Torre, E. *et al.* Functional and Structural Variation among Sticholysins, Pore-Forming Proteins from the Sea Anemone *Stichodactyla helianthus*. *IJMS* **21**, 8915 (2020).
146. Reynolds, W. S., Schwarz, J. A. & Weis, V. M. Symbiosis-enhanced gene expression in cnidarian-algal associations: cloning and characterization of a cDNA, sym32, encoding a possible cell adhesion protein. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **126**, 33–44 (2000).
147. Chapter 17 - Heme Metabolism. 12.
148. Szigeti, A. *et al.* Induction of necrotic cell death and mitochondrial permeabilization by heme binding protein 2/SOUL. *FEBS Letters* **580**, 6447–6454 (2006).
149. Venom Kunitz-type family ~ VenomZone page. <https://venomzone.expasy.org/1456>.
150. García-Fernández, R. *et al.* The Kunitz-Type Protein ShPI-1 Inhibits Serine Proteases and Voltage-Gated Potassium Channels. *Toxins* **8**, 110 (2016).
151. Gladkikh, I. *et al.* Atypical Reactive Center Kunitz-Type Inhibitor from the Sea Anemone *Heteractis*

- crispa. *Marine Drugs* **10**, 1545–1565 (2012).
152. Kelso, G. J. & Blumenthal, K. M. Identification and characterization of novel sodium channel toxins from the sea anemone *Anthopleura xanthogrammica*. *Toxicon* **36**, 41–51 (1998).
153. Madio, B., King, G. F. & Undheim, E. A. B. Sea Anemone Toxins: A Structural Overview. *Marine Drugs* **17**, 325 (2019).
154. Bond', J. S. & Beynon, R. J. The astacin family of metalloendopeptidases. 15.
155. Park, J.-O. *et al.* Characterization of the astacin family of metalloproteases in *C. elegans*. *BMC Dev Biol* **10**, 14 (2010).
156. Moreno-Hagelsieb, G., Vitug, B., Medrano-Soto, A. & Saier Jr., M. H. The Membrane Attack Complex/Perforin Superfamily. *J Mol Microbiol Biotechnol* **27**, 252–267 (2017).
157. Oshiro, N. *et al.* A new membrane-attack complex/perforin (MACPF) domain lethal toxin from the nematocyst venom of the Okinawan sea anemone *ActinERIA villosa*. *Toxicon* **43**, 225–228 (2004).
158. Brinkman, D. & Burnell, J. Identification, cloning and sequencing of two major venom proteins from the box jellyfish, *Chironex fleckeri*. *Toxicon* **50**, 850–860 (2007).
159. Nagai, H. *et al.* Isolation and Characterization of a Novel Protein Toxin from the Hawaiian Box Jellyfish (Sea Wasp) *Carybdea alata*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **275**, 589–594 (2000).
160. del Monte-Martínez, A. *et al.* Improved purification and enzymatic properties of a mixture of Sticholysin I and II: Isotoxins with hemolytic and phospholipase A2 activities from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Protein Expression and Purification* **95**, 57–66 (2014).
161. Ramírez-Carretero, S. *et al.* Transcriptomic and Proteomic Analysis of the Tentacles and Mucus of *Anthopleura dowii* Verrill, 1869. *Marine Drugs* **17**, 436 (2019).
162. McIntyre, T. M., Prescott, S. M. & Stafforini, D. M. The emerging roles of PAF acetylhydrolase. *J. Lipid Res.* **50**, S255–S259 (2009).
163. Arai, H., Koizumi, H., Aoki, J. & Inoue, K. Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase (PAF-AH). *J. Biochem.* **131**, 6 (2002).

164. Singh, S. B., Armugam, A., Kini, R. M. & Jeyaseelan, K. Phospholipase A2 with Platelet Aggregation Inhibitor Activity from *Austrelaps superbis* Venom: Protein Purification and cDNA Cloning. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **375**, 289–303 (2000).
165. Schmidt, J. J. & Middlebrook, J. L. Purification, sequencing and characterization of pseudexin phospholipases A2 from *Pseudechis porphyriacus* (Australian red-bellied black snake). *Toxicon* **27**, 805–818 (1989).
166. Hu, P. *et al.* Crystal structure of Natratoxin, a novel snake secreted phospholipaseA2 neurotoxin from *Naja atra* venom inhibiting A-type K⁺ currents. *Proteins* **72**, 673–683 (2008).
167. Babenko, V. V. *et al.* Identification of unusual peptides with new Cys frameworks in the venom of the cold-water sea anemone *Cnidopus japonicus*. *Sci Rep* **7**, 14534 (2017).