

Caracterización de moléculas bioactivas presente en los extractos de la anémona *Condylactis gigantea*

Characterization of bioactive molecules present in extracts *Anemone Condylactis gigantea*

Nardy Diez García^{1, 2, 3, *}, José Faks¹, Jais Nieves¹, Daynet Sosa^{2, 3, 4}

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Fecha de recepción: 20 de Febrero de 2018

Fecha de aceptación: 28 de Febrero de 2018

Resumen

Los organismos marinos en las últimas décadas han sido blanco de interés para la búsqueda de moléculas con actividad biológica. *Condylactis gigantea* es una anémona presente en el suelo del fondo del océano; contiene células productoras de veneno (nematocistos) utilizadas para la caza y defensa. El objetivo del presente trabajo es evaluar el extracto de este organismo en busca de moléculas con actividad biológica. Del extracto total del cuerpo, se caracterizaron las actividades proteolíticas mediante zigmograma en geles SDS-PAGE, así como la actividad hemolítica y fosfolipasa A2. Encontrándose una actividad proteolítica de aproximadamente 23KDa que se activa con la temperatura y es independiente de pH e iones y dos actividades de naturaleza metaloproteasas con afinidad al Na⁺, Ca²⁺ y Zn²⁺ de alto peso molecular, se determinó la capacidad hemolítica y la actividad fosfolipasa A2, lo que nos permite concluir que las proteínas presentes pueden ser de interés como compuestos bioactivos.

Palabras Clave:

Compuestos bioactivos, metaloproteasas de matriz, organismos marinos.

Clasificación JEL: O13; P28.

Abstract

In recent decades, marine organisms have been targets of interest in the search for molecules with biological activity. *Condylactis gigantea* is an anemone present in the ocean floor soil; it contains venom-producing cells (nematocyst) used for hunting and self-defense. The aim of this study is to evaluate this organism's extract in order to search for molecules with biological activity. From the total body extract, proteolytic activities were characterized by zigmogram in SDS-PAGE gels, as well as hemolytic activity and phospholipase A2. Proteolytic activity was found in an approximately 23KDa that is activated with temperature and is independent of pH and ions and two activities of metalloprotease nature with affinity to Na⁺, Ca²⁺ and Zn²⁺ of high molecular weight; the hemolytic capacity and phospholipase A2 activity was determined; this leads us to the conclusion that the proteins present may be of interest as bioactive compounds.

Keywords:

Bioactive compound, marine organisms, matrix metalloprotease.

JEL Classification: O13; P28.

¹ Fundación Instituto de Estudios Avanzados (Fundación IDEA). Valle de Sartenejas, carretera Baruta-Hoyo de la Puerta, Edificio B. Laboratorio de Genómica y Proteómica. Baruta, Edo. Miranda. Caracas – Venezuela.

² Escuela Superior Politécnica del Litoral (CIBE), ESPOL, Km. 30.5 Vía Perimetral, Guayaquil, Ecuador.

³ Escuela Superior Politécnica del Litoral (FCV), ESPOL, Km. 30.5 Vía Perimetral, Guayaquil, Ecuador.

⁴ Universidad Estatal de Milagro. UNEMI. Facultad de Ingeniería. Milagro, Guayas. 091050. Ecuador

* Autor de correspondencia: Nardy Diez García Escuela Superior Politécnica del Litoral (CIBE), ESPOL, Km. 30.5 Vía Perimetral, Guayaquil, Ecuador.
E-mail: ndiez@espol.edu.ec.
Tlf: (593-4) 226-9610

Introducción

Los organismos marinos proporcionan una gran variedad de compuestos con estructuras moleculares novedosas o poco conocidas, pudiendo ser proteínas de peso molecular tanto alto como bajo, polipéptidos, enzimas, lípidos, esteroides, compuestos halogenados, mucopolisacáridos, del tipo proteasas y sus inhibidores, neurotoxinas, citolisinas, etc., susceptibles de ser manipuladas o sintetizadas para la producción de productos útiles con potencial biotecnológico (Klassen & Watkins, 1999).

Muchos de los compuestos sintéticos que existen actualmente están basados en moléculas originalmente obtenidas de la naturaleza. La investigación oceanológica biomédica proporciona importante información en la nutrición, medicina, química y desarrollo de nuevas drogas a partir de organismos de naturaleza marina, un ejemplo es el desarrollo de fármacos oncológicos de origen marino como el agente antitumoral trabectedina (Yondelis®) descubierto en el tunicado colonial del Caribe *Ecteinascidia turbinata* que ha sido comercializado por la empresa Pharmamar (García-Rocha *et al.*, 1996; Pommier *et al.*, 1996).

Considerando que las Costas venezolanas presentan una fauna marina con gran biodiversidad biológica, esta investigación responde a la necesidad de estudiar el perfil proteico de moléculas marinas extraídas de las anémonas *Condylactis gigantea* procedente de la

Bahía de Mochima, Edo. Sucre, Venezuela.

Los inhibidores proteolíticos presentes en diversos invertebrados marinos, incluido *Condylactis Gigantea*, han sido ampliamente caracterizados (González *et al.*, 2016), pero no ocurre lo mismo con las enzimas proteolíticas, que dado su potencial biotecnológico e industrial se ha referido en otros organismos. En el mercado mundial de enzimas industriales, las proteasas son las más importantes alcanzando más del 60% (Banik & Prakash, 2004).

La caracterización de las actividades proteolíticas en el presente trabajo utiliza la zimografía como técnica, basándonos en la separación e identificación de proteínas en geles SDS-PAGE, que son re-naturalizadas e incubadas en un tampón apropiado para observar la actividad proteolítica. La visualización de dicha actividad aparece como bandas claras sobre un fondo azul oscuro en el gel luego de la tinción con Coomassie producto de la degradación de un sustrato proteico (Hawkes *et al.*, 2001; Troeberg & Nagase, 2001; Wilkesman & Kurz, 2009). Además de esta actividad se evaluó la actividad hemolítica del extracto y la actividad fosfolipasa A2 previamente descritas en estas y otras anémonas (Hu *et al.*, 2011).

El presente trabajo aporta novedosa y valiosa información sobre el extracto de la anémona *C. gigantea* venezolana y la presencia de moléculas que puedan considerarse por su potencial uso biotecnológico.

Materiales y métodos

Identificación y recolección de las anémonas Condylactis gigantea

Los organismos en estudio (anémonas *Condylactis gigantea*) fueron recolectados de manera aleatoria en la Bahía de Mochima, Estado Sucre (oriente de Venezuela, Figura 1) específicamente en el sector Isla Larga e Isla Caracas del Este ($10^{\circ}15'41''\text{N } 64^{\circ}28'48''\text{O}$), con el apoyo de un biólogo marino de la Estación Experimental - IDEA en Mochima, para su identificación *in situ* y apropiada recolección, considerando la conservación y explotación racional de la biodiversidad marina. Los ejemplares se conservaron en bolsas de plástico con cierre hermético conteniendo agua de mar en hielo, la conservación por tiempo prolongado para posterior procesamiento se realizó -80°C .

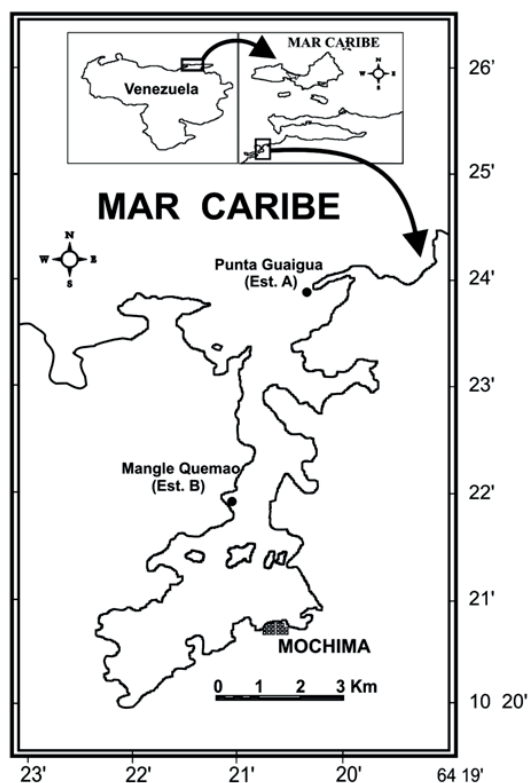


Figura 1. Detalle de la Bahía de Mochima, Estado Sucre-Venezuela.

Extracción y cuantificación de las proteínas.

Las muestras congeladas (-80°C) fueron pulverizadas mecánicamente en nitrógeno líquido. El material obtenido fue conservado nuevamente a -80°C en alícuotas, para el proceso de extracción de proteínas que se realizó con tampón RIPA (Radio Immuno Precipitation Assay buffer), el cual está compuesto por Tris HCl 50mM pH 8,0; NaCl 150mM; NP-40 1%; SDS 0,1%; β -mercaptoetanol 5mM (Harlow & Lane, 1988). Las muestras se incubaron por 30 min en hielo con agitación en vórtex cada 10 min. Posteriormente fue centrifugado a 12.000 rpm durante 10 min a 4°C . Se conservó el sobrenadante separado en alícuotas a -80°C .

Para la determinación cuantitativa de proteínas en las muestras (extracto) se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando el reactivo de Bradford® (BIO-RAD) por triplicado, siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

Identificación y caracterización de la actividad proteolítica en el extracto total de la anémona C. gigantea

Zimogramas de Gelatina

Se siguió el protocolo descrito por Mazzonni *et al.*, (2007), con algunas modificaciones. Se realizaron geles de poliacrilamida (Laemmli, 1970) al 5% para el gel de apilamiento y en gradiente de 10 a 20% para el gel de separación en condiciones disociantes (SDS-PAGE) no reductoras (tampón de carga sin β -mercaptoetanol y sin calentar la muestra antes de la corrida).

En este caso la polimerización de la poliacrilamida se realizó en presencia de gelatina soluble (Sigma®) a una concentración final de 1mg/mL.

La corrida electroforética se llevó a cabo con temperatura controlada en dos etapas a 80 Voltios para el gel de apilamiento y 100 Voltios constantes para el gel de separación hasta el final de la corrida. Una vez finalizada, los geles fueron lavados primero con H₂O milliQ y posteriormente con Tritón X-100 al 2,5% a temperatura ambiente por 1 hora para la remoción de SDS del gel. Se lavaron una vez más con H₂O milliQ antes de ser incubados con una solución activadora compuesta de Tris HCl 50mM pH 7,0; CaCl₂ 5mM; NaCl 0,2M y ZnCl₂ 0,1μM durante 15 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo, se descartó la solución activadora y se lavó con H₂O milliQ.

Finalmente, los geles fueron teñidos con Azul Brillante de Coomassie® R-250 y decolorados con mezcla ácido acético 10% - metanol 30%, hasta observarse las bandas claras sobre el fondo oscuro correspondientes a proteínas con actividad proteolítica. El marcador de Peso Molecular empleado en este caso fue BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder.

Efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica del extracto total de la anémona Condylactis gigantea observada en Zimogramas de Gelatina

Se siguió el protocolo para zimogramas anteriormente detallado. Una vez realizada la corrida electroforética, se incubó el gel con la

solución activadora (Tris HCl 50mM pH 7,4; CaCl₂ 5mM; NaCl 0,2M y ZnCl₂ 0,1μM) durante 15 horas pero en este caso variando la temperatura de incubación. Para esto se ensayó la incubación desde los 10°C aumentando en 5°C hasta llegar a 80°C.

Efecto del pH sobre la actividad proteolítica del extracto total de la anémona Condylactis gigantea observada en Zimogramas de Gelatina

Una vez identificada la temperatura óptima, se procedió a caracterizar el pH al cual se ve favorecida la actividad proteolítica. Para esto, posterior a la corrida electroforética se realizaron incubaciones del gel igualmente durante 15 horas a la temperatura seleccionada como resultado del punto anterior pero en este caso variando el pH de la solución activadora (Tris HCl 50mM; CaCl₂ 5mM; NaCl 0,2M y ZnCl₂ 0,1μM). Las incubaciones se realizaron a pH 3,0 - 4,0 - 5,0 - 6,0 - 7,0 - 8,0 - 9,0 y pH 10,0.

Efecto de los Iones sobre la actividad proteolítica del extracto total de la anémona Condylactis gigantea observada en Zimogramas de Gelatina

Luego de caracterizados la temperatura y pH óptimos para la actividad enzimática observada, se procedió a incubar los geles con la solución activadora de la siguiente forma: Tris HCl 50 mM sin iones; Tris HCl 50 mM sólo con CaCl₂ 5mM; Tris HCl 50 mM sólo con NaCl 0,2M; Tris HCl 50 mM sólo con ZnCl₂ 0,1μM y Tris HCl 50 mM en combinación CaCl₂ 5mM y NaCl

0,2M. El tiempo de incubación no fue modificado (15 horas).

Efecto de los Inhibidores de Proteasas sobre la actividad proteolítica del extracto total de la anémona Condylactis gigantea observada en Zimogramas de Gelatina

Para evidenciar este efecto, se empleó la técnica de zimograma.

La incubación de los geles se realizó durante 15 horas a la temperatura y pH óptimos obtenidos en la caracterización. Al volumen final de solución activadora (Tris HCl 50mM; CaCl₂ 5mM; NaCl 0,2M y ZnCl₂ 0,1μM) empleado en la incubación, se añadió por separado los inhibidores de proteasas. Se ensayaron inhibidores de metalo-proteasas a una concentración final de 10mM para EDTA (ácido etilendiamino-tetraacético) y 20mM para EGTA (ácido etilenglicol-tetraacético) e inhibidor de serinproteasas PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) a 3 mM. Luego del período de incubación (15 horas), los geles fueron lavados con H₂O milliQ y posteriormente teñidos con azul brillante de Coomassie® R-250 y se observó si en presencia de cada inhibidor dejaba de evidenciarse o no alguna de las bandas que presentaba actividad proteolítica.

Determinación de la Actividad Hemolítica del extracto total de la anémona Condylactis gigantea (Mochima)

Para determinar la actividad hemolítica del extracto de la anémona *Condylactis gigantea*, se siguió el protocolo descrito por Hu *et al.*, (2001), con pequeñas modificaciones.

Se tomó muestras de sangre de donante voluntario sano en tubos con citrato de sodio a una concentración de 0,129M (3,8%) manteniendo una relación anticoagulante/sangre 1:9. Los glóbulos rojos fueron lavados con PBS pH 7,4 hasta quedar completamente claro el sobrenadante. Los eritrocitos fueron re-suspendidos en el mismo tampón hasta llevarlos a una concentración final de 0,5%. Luego se incub 1 mL de esta suspensión con diferentes concentraciones de proteínas del extracto de anémonas *Condylactis gigantea* (0,625 μg/mL; 1,25 μg/ml; 2,5 μg/mL, 5 μg/mL, 10μg/ml, 15 μg/mL; 20 μg/mL; 25 μg/mL y 30 μg/mL), por 30 min, a 37°C y a 40°C. Finalizado este tiempo, se centrifugó a 2500 rpm por 10 min y posteriormente se leyó la absorbancia del sobrenadante a 420 y 540 nm.

El blanco empleado fue el sobrenadante obtenido de la incubación de la suspensión de glóbulos rojos al 0,5% en PBS y el 100% de hemólisis se obtuvo de la lectura del sobrenadante proveniente de la incubación de la suspensión de glóbulos rojos al 0,5% con Tritón X-100 al 1% en PBS.

El porcentaje de hemólisis fue calculado empleado la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{(\text{Abs muestra} - \text{Abs blanco})}{(\text{Abs } 100\% \text{ hemólisis} - \text{Abs blanco})} \times 100$$

La actividad hemolítica del extracto de las anémonas *C. gigantea* fue expresada en función de la Concentración Hemolítica 50 (CH₅₀), que no es más que la concentración de proteínas del extracto total que produce la hemólisis del 50% de

los eritrocitos. La CH_{50} se determinó por la construcción de curvas dosis-respuesta con los datos obtenidos del porcentaje de hemólisis producido por las diferentes concentraciones de proteína ensayadas.

Los datos fueron tratados en función de la media \pm desviación estándar ($n=6$) para los gráficos. Se realizó un análisis estadístico aplicando ANOVA (Kruskal-Wallis) con $p < 0,01$ para la comparación de datos.

Determinación de la actividad de la enzima Fosfolipasa A₂ del extracto total de la anémona Condylactis gigantea

Para determinar la actividad de la Fosfolipasa A₂, se utilizó el método fluorimétrico EnzChek Phospholipase A₂ Assay kit (Invitrogen), el cual permite la monitorización de la actividad de la fosfolipasa A₂ (PLA₂) a través de la detección de cambios en la intensidad de emisión a 515/575 nm con excitación a ~460 nm. El sustrato de PLA₂ EnzChek[®], es selectivo sólo para la isoforma A₂. En el ensayo se utilizó una solución patrón de PLA₂, con la que se realizaron diluciones seriadas de la enzima desde 0 hasta 10 U/mL para la construcción de la curva estándar. La determinación se llevó a cabo en placas oscuras de 96 pozos, sirviendo 50 μ L del extracto total de la anémona *C. gigantea* y de sus diluciones (1/100 y 1/200), todos por triplicado. Seguidamente se prepararon 30 μ L del reactivo llamado "mezcla de lípidos" (10 μ L de Dioleoilfosfatidilcolina 10 mM; 10 μ L de Dioleoilfosfatidilglicerol 10 mM y 10 μ L sustrato de PLA₂ 1mM) de esta mezcla se tomaron 15 μ L y se le

adicionaron a 1,5 mL de buffer de corrida, se mantuvo mezclando por 1 minuto y de allí se tomaron 50 μ L para servirlos en cada pozo de la placas donde estaban las muestras, la curva patrón y los controles (positivos y negativos). El control positivo se preparó con 3 μ L del sustrato de PLA₂ en 150 μ L de buffer de corrida, y el control negativo fue buffer de corrida únicamente. La reacción fue incubada por 10 minutos a temperatura ambiente protegida de la luz, luego se realizó la lectura en un espectrofotómetro (Biotech, modelo Synergy HT) a un rango de excitación de 450/490nm y emisión de fluorescencia de 515/575 nm.

Resultados y discusión

Un total de 12 anémonas fueron colectadas en la Bahía de Mochima, Estado Sucre (Venezuela) para el presente estudio, en la fauna de Mochima se han registrado tres especies de anémonas, siendo la más abundante *Condylactis gigantea*, y en menor cantidad *Lebrunia danae* y *Bartholomea annulata* (Robaina & Jiménez, 1994). Para la identificación *in situ* de la especie de interés se utilizaron las características morfológicas de que la hacen fácilmente diferenciable e identificable, especialmente los tentáculos con las puntas característicamente de color fucsia (Figura 1).

Las muestras de *Condylactis gigantea* trituradas y procesadas, poseen una concentración de proteínas en el extracto total de $8,69 \pm 0,57 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($n=8$) por el método de Bradford (1976). Entre las proteínas presentes unas de las que poseen particular interés son las proteasas que se

caracterizan por poseer un atractivo potencial desde el punto de vista industrial y farmacológico (Wilkesman & Kurz, 2009), organismos marinos como el pepino de mar *Stichopus japonicus* (Liao, 1997) y más recientemente la especie *Isostichopus fuscus*, presente en las costas mexicanas (Hernández-Sámano *et al.*, 2015), se les ha caracterizado sus actividades proteolíticas ya que las enzimas marinas cuando se comparan con las de animales terrestres o las microbianas poseen ventajas por su estabilidad en condiciones de reacción extremas, tales como eficiencia catalítica y estabilidad a pH neutros y alcalinos, como resultado de la adaptación de estos organismos a las condiciones ambientales del mar (Haard & Simpson, 2000), por ello nuestro interés de estudiar la actividad proteolítica en organismos como *Condylactis gigantea* que representa una fuente natural conocida de moléculas bioactivas.

En la Figura 2, se pueden apreciar las bandas con actividad proteolítica a diferentes

masas moleculares en un rango de incubación a temperaturas desde 10°C hasta 80°C, el extracto no mostró ninguna actividad (carriles 2 al 6) en temperaturas menores a los 35 °C. En la incubación a 37°C y 40°C (carriles 8 y 9) se observan varias bandas de altos y bajos pesos moleculares. Debido a que a 40°C, los dos grupos de proteínas poseen actividad enzimática se escoge esta temperatura como la óptima para los ensayos, pero es importante señalar que la proteína de peso molecular aproximado de 23kDa parece poseer actividad hemofílica ya que se mantiene presente hasta los 80 °C.

Cuando se evaluó el efecto del pH sobre el extracto de la anémona, las proteínas de alto peso molecular (321 kDa – 60 kDa) presentan actividad gelatinolítica favorecida al realizar la incubación a pH alcalino (8,0 – 9,0 y 10,0), observada con mayor intensidad a pH 8. Sin embargo, claramente se observa en la Figura 3, que la banda de aproximadamente 23 kDa, presenta actividad enzimática en todo el rango de pH empleados

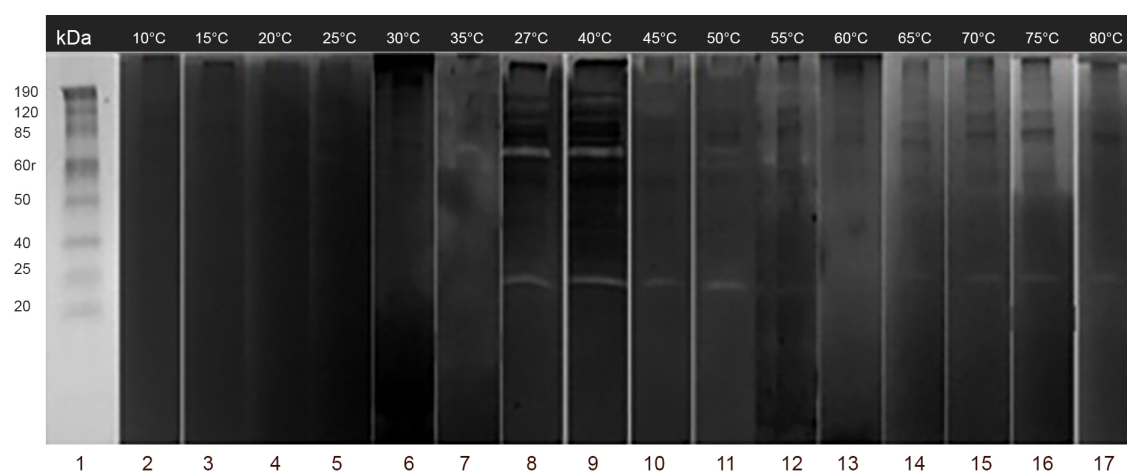


Figura 2. Efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica del extracto total de la anémona *C.gigantea* (Mochima). Zimograma de gelatina (1mg/mL) en gradiente al 10-20%, condiciones disociantes/no reductoras, teñido con azul brillante de Coomassie. (1): Marcador de Peso Molecular preteñido BenchMark™. (2-17): Extracto proteico de anémonas *C. gigantea* (15,8µg) con incubación a las temperaturas señaladas.

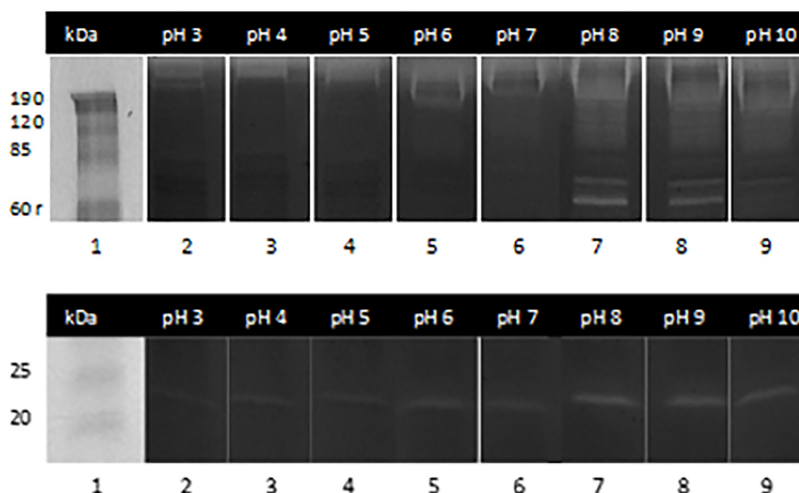


Figura 3. Efecto del pH sobre las actividades proteolíticas. Zimograma de gelatina (1mg/mL) en gradiente al 10-20%, condiciones disociantes/no reductoras, teñido con azul brillante de Coomassie. (1): Marcador de Peso Molecular preteñido BenchMark™. (2-9): Extracto proteico de anémonas *C. gigantea* (15,8µg) con incubación a los pH señalados.

(desde pH 3 hasta pH 10 ambos inclusive; Figura 3).

Dada la coincidencia de presentar actividad todas las proteasas (alto y bajo peso molecular) al pH 8, este fue considerado para la evaluación del resto de los factores.

Cuando se caracterizó el efecto de los iones

sobre la actividad, algunas proteínas de alto peso molecular del extracto en estudio requieren la presencia de los mismos, lo que lleva a pensar en la posible presencia de metalo-proteasas activas con los iones Ca^{+} , Na^{2+} y Zn^{2} donde se observa una mayor intensidad en la actividad proteolítica, mientras que la actividad de las proteínas de 23 kDa es independiente de la presencia o iones (Figura 4).

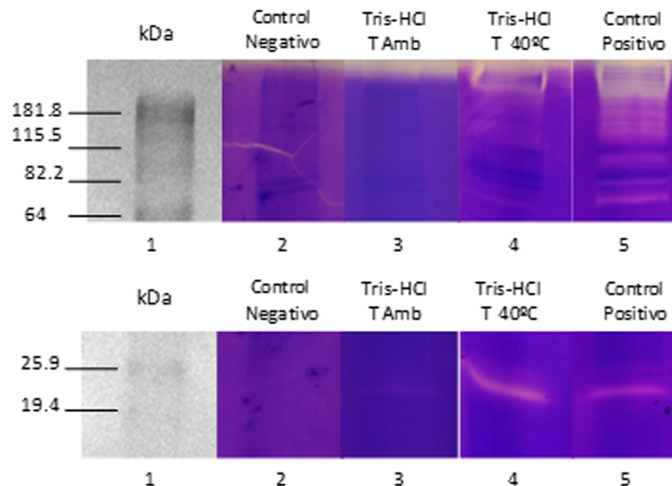


Figura 4. Comparación de las actividades proteolíticas en presencia y ausencia de iones. Zimograma de gelatina (1mg/mL) en gradiente al 10-20%, condiciones disociantes/no reductoras, teñido con azul brillante de Coomassie. (1): Marcador de Peso Molecular preteñido BenchMark™. (2): Control Negativo: Sin incubación; (3): Incubación en Tris-HCl 50mM pH 8,0/Temperatura Ambiente; (4) Incubación en Tris-HCl 50mM pH 8,0/40°C; (5) Control Positivo: Incubación con solución Activadora pH 8,0/40°C. En todos los caso se empleó extracto proteico de anémonas *C. gigantea* (15,8µg).

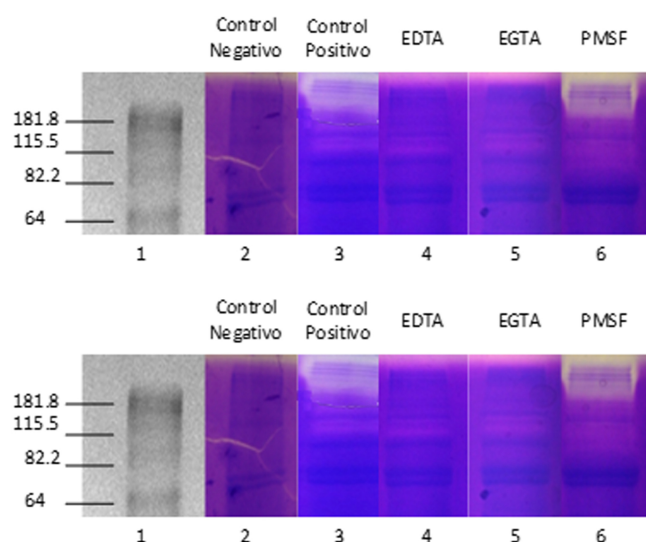


Figura 5. Efecto de los inhibidores de proteasas sobre las actividades proteolíticas. Zimograma de gelatina (1mg/mL) en gradiente al 10-20%, condiciones disociantes/no reductoras, teñido con azul brillante de Coomassie. (1): Marcador de Peso Molecular preteñido BenchMark™. (2): Control Negativo: sin incubación; (3): Control Positivo: Incubación en Tris-HCl 50mM pH 8,0/40°C sin inhibidores; (4): Incubación en Tris-HCl 50mM pH 8,0/40°C + EDTA 10mM; (5): Incubación en Tris-HCl 50mM pH 8,0/40°C + EGTA 20mM; (6): Incubación en Tris-HCl 50mM pH 8,0/40°C + PMSF 3mM. En todos los casos se empleó extracto proteico de anémonas *C. gigantea* (15,8µg).

Cuando se probaron los iones de manera independiente no se observó la misma actividad que posee la mezcla (Data no mostrada). Los inhibidores específicos EDTA y EGTA para las metalo-proteasas y el PMSF para serin-proteasas fueron evaluados para determinar su efecto sobre las actividades proteolíticas caracterizadas. La actividad proteolítica de alto peso molecular se vio inhibida como era de esperar en presencia de los agentes EDTA y EGTA lo que confirma que se trata de una actividad metaloproteasa, mientras que conserva la actividad en presencia de PMSF, por lo que se descarta la presencia de serin-proteasas. La actividad observada a los 23 kDa no cambia su actividad en presencia de ninguno de los compuestos inhibidores por lo que no se trata de ni de una metalo o serin-proteasa.

Adicionalmente, al incubar en presencia

tanto de EDTA como de EGTA, se mantiene la actividad proteolítica, y además se visualiza una nueva banda de menor peso molecular y con una actividad menos intensa que es más evidente en presencia de EGTA (Figura 5). Esto puede ser debido a que las proteasas son normalmente sintetizadas como una proenzima inactiva (zimógeno) y de acuerdo a sus requerimientos sufren un cambio bioquímico en su estructura por proteólisis limitada, convirtiéndola en una enzima activa (Wilkesman & Kurz, 2009). En este caso la activación de la enzima fue promovida por la quelación de los iones presentes en el extracto, que probablemente mantenían bloqueado el sitio activo de la misma.

Nuestros resultados descartan que las actividades mostradas se traten de alguna asparto-proteasas ya que estas suelen presentar una actividad óptima a pH ácidos (1,5 a 5) (Wilkesman & Kurz,

2009), mientras que las del presente trabajo presenta una actividad óptima a pH 8,0. No fue evaluada la presencia o ausencia de actividad cisteína proteasa, para ello se requiere un inhibidor específico. Aunque, Alonso del Rivero *et al.*, (2009) a través del ensayo enzimático y uso de inhibidores específicos, hallaron una metalocarboxipeptidasa en el extracto del anélido marino *Sabellastarte magnifica*, no se encontró esta actividad en ninguno de los extractos de otras 25 especies marinas pertenecientes a diferentes Filos, entre ellos la anémona *C. gigantea* (Costa de la Habana – Cuba), pero no ahondaron en el estudio de otras proteasas. Entre las metaloproteasas reportadas hasta la fecha, se encuentran las denominadas de matriz (MMP) a las que pertenecen las colagenasas y elastasas y muchas de ellas se han asociado a la aparición del cáncer donde sus niveles se ven aumentados como puede ocurrir en el cáncer de mama (Hojilla *et al.*, 2008). Pero también poseen un importante rol, en la curación de heridas y reparación de los tejidos, caracterizándose por requerir un ion Zn^{2+} , en su sitio activo, tal como es requerido por las actividades de alto peso molecular evaluadas en el presente trabajo.

Ha sido ampliamente reportado que las moléculas de organismos marinos podrían formar poros en membranas celulares, lipídicas y artificiales, más eficientemente cuando la membrana contiene esfingomielina como es el caso de los eritrocitos (Bernheimer *et al.*, 1982; Alvarez *et al.*, 2003; Martínez *et al.*, 2007; Alvarez *et al.*, 2009; Ravindran *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2011; Berne *et al.*

2016). En tal sentido, en el presente estudio la actividad hemolítica del extracto de anémonas *C. gigantea* fue evaluada y se determinó Concentración Hemolítica 50 (CH⁵⁰) definida como la concentración de proteínas del extracto que produce la lisis del 50% de los eritrocitos.

En base a los resultados obtenidos, resumidos en la Tabla 1, se concluye que la actividad hemolítica del extracto de anémonas *C. gigantea* (Mochima) presenta una CH⁵⁰ ≈15 µg/mL sin diferencias estadísticamente significativas entre las temperaturas de incubación de 37°C y 40°C ($p < 0,01$) así como tampoco en las longitudes de onda empleadas ($p < 0,01$). De la misma forma se determinó que con una concentración de proteínas de 30 µg/mL del extracto, se obtiene entre el 95 y 100% de hemólisis para ambas temperaturas.

Tabla 1.

Concentración Hemolítica 50 (CH⁵⁰ µg/mL) del extracto total de la de anémona *C. gigantea* (Mochima), en función de la temperatura de incubación y la longitud de onda empleada.

Temperatura	420 nm	540 nm
37°C	15,04 µg/mL*	14,3 µg/mL***
40°C	15,2 µg/mL**	14,7 µg/mL****

No se observó diferencia estadísticamente significativa entre * y ** ($p < 0,01$); *** y **** ($p < 0,01$); * y *** ($p < 0,01$); ** y **** ($p < 0,01$).

Numerosas investigaciones han descrito la existencia de moléculas formadoras de poros, denominadas actinoporinas (proteínas de aproximadamente 20 kDa), provenientes de diversas familias de anémona marinas del Orden Actiniaria que presentan actividad hemolítica (Maček,

1992; Lanio *et al.*, 2001; Bellomio *et al.*, 2009; Tejuca *et al.*, 2009; Anderluh *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2011, Rojko *et al.*, 2016).

Bernheimer *et al.* (1982), aislaron y caracterizaron una toxina citolítica de la anémona *C. gigantea* (proveniente de un acuario en New York), de peso molecular 19 kD, con una actividad hemolítica inhibida por esfingomiélin, lo que confirmaría la teoría de la presencia de una actinoporina en esta anémona. La actividad hemolítica de esa toxina fue ensayada con 0,6 mg/mL en glóbulos rojos de diferente origen, mostrando mayor sensibilidad en orden decreciente los de oveja, humanos, perro, conejo y caballo, obteniendo 5000; 1700; 450; 330 y 100 HU/mL respectivamente, siendo una unidad hemolítica (HU) la cantidad de toxina necesaria para la liberación de hemoglobina del 50% de los eritrocitos.

Más recientemente, Falcón *et al.*, (2009) trabajaron también con anémonas *C. gigantea* provenientes de las costas del Mar Caribe Mexicano. En su estudio determinaron que 2 µg de proteínas totales del extracto crudo producían 96% de hemólisis. El extracto crudo mostró cinco bandas mayoritarias dentro de las que se encuentra una de 20 kDa. La concentración necesaria reportada en el presente trabajo es 7,5 veces mayor a la descrita por Falcón *et al.*, (2009) pero ya en otros trabajos se ha reportado diferencia entre la actividad de esta proteína en el mismo organismo de diferentes orígenes tal como ocurre con la actividad hemolítica del veneno de nematocistos de la anémona de mar *Bunodosoma caissarum* donde la CH⁵⁰

varió entre 2,9 y 7,6 µg/mL del veneno según el eritrocito en el que es probado (peces, sapos, serpientes, ratones y ratas) y el 95% de hemólisis se obtuvo con concentraciones superiores a 33,6 µg/mL, superior a la reportada por nosotros. Mientras que Oliveira *et al.*, (2012) reportaron en su estudio que el extracto crudo de esa misma anémona de la costa norte de São Paulo - Brasil, presentó una actividad hemolítica en eritrocitos humanos (CH⁵⁰ = 3,36 µg/mL) 4,5 veces mayor a la del extracto de *C. gigantea* del presente estudio.

La fosfolipasa A₂ (PLA₂) representa una familia de enzimas que hidroliza del enlace sn-2 ester de los fosfolípidos, liberando ácidos grasos, principalmente ácido araquidónico y lisofosfolípidos. Es una de las enzimas más interesantes presente en los venenos de animales vertebrados e invertebrados debido a su variable comportamiento biológico, ya que muestra múltiples acciones farmacológicas dependientes del veneno que la contiene y no de su actividad enzimática. De esta manera, participa en la digestión de la presa o induce alguna de las siguientes acciones patológicas: neurotoxicidad, cardiotoxicidad, miotoxicidad, hemólisis, efecto anticoagulante, hemorragia interna y actividad inductora de edema. En las anémonas marinas algunas de las fosfolipasas tipo A₂ son consideradas hemolisinas (Aneiros & Garateix, 2004; Romero *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2012). La determinación de la fosfolipasa A₂ en el extracto total de la anémona en estudio, posee una actividad de 14,1 U/mL (1,62 U/mg proteína), siendo mucho mayor a la reportada por Lanio *et al.*, (2001) para las

Sticolisinas I y II (~10-3 U/mg).

El extracto total de la anémona *C. gigantea* del presente estudio, presentó tanto actividad hemolítica como fosfolipasa A₂, por lo que se podría sugerir que tanto proteínas citolíticas tipo actinoporinas como citolisinas enzimáticas (fosfolipasa A₂) podrían estar interviniendo en la actividad hemolítica, sin embargo, esto se podría confirmar realizando un fraccionamiento del extracto total y posteriormente detectando cuál de las fracciones presenta actividad hemolítica y/o fosfolipasa A₂.

Conclusiones

El interés en el estudio de compuestos de origen marino se basa en su potencial aplicación como compuestos bioactivos. En el presente trabajo se caracterizó las actividades proteasas encontradas en el extracto de *Condylactis gigantea*, donde destaca la actividad proteolítica de bajo peso molecular 23kDa, con acción independiente de pH y activación a altas temperaturas, lo que la hace una excelente candidata para bioprocesos que requieren condiciones extremas. Se observó también la presencia de una actividad metaloproteasas sobre sustratos gelatinolíticos y con dependencia de los iones Ca⁺, Na²⁺ y Zn²⁺ que podrían señalar su posible actividad de metaloproteasa de matriz interesante para su uso en la industria cosmética como compuesto activo en la regeneración de la piel.

Una actividad hemolítica fue detectada, menor a la reportada previamente para la misma anémona pero

que posee una concentración de hemólisis total similar a la descrita en la literatura, así como una la actividad fosfolipasa A₂ que dada la naturaleza multifuncional de estas proteínas (Romero *et al.*, 2010) puede estar relacionada con una actividad hemolítica también descrita en este trabajo.

Agradecimientos

Los autores del presente trabajo expresan su gratitud al Fondo para el Desarrollo Nacional (Fonden) que financió esta investigación en el marco del Convenio Cuba-Venezuela, para el proyecto “Identificación de moléculas bioactivas de interés biotecnológico y biomédico procedentes de organismos marinos”. Se agradece al Proyecto Prometeo por la beca financiada por la Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología de Ecuador (Senescyt).

Referencias

- Alonso-del-Rivero, M., Trejo, S.A., Rodríguez de la Vega, M., González, Y., Bronsoms, S., Canals, F., Delfin, J., Diaz, J., Aviles, F.X., & Chávez, M.A. (2009). A novel metallo-carboxypeptidase-like enzyme from the marine annelid *Sabellastarte magnifica* –a step into the invertebrate world of proteases. *FEBS Journal*, 276, 4875–4890.
- Alvarez, C., Casallanovo, F., Shida, C.S., Nogueira, L.V., Martinez, D., Tejuca, M., Pazos, I.F., Lanio, M.E., Menestrina, G., Lissi, E., & Schreier, S. (2003). Binding of sea anemone pore-forming toxins sticholysins I and II to interfaces--modulation of conformation and activity, and lipid-protein interaction. *Chemistry and physics of lipids*, 122, 97–105.

- Alvarez, C., Mancheño, J.M., Martínez, D., Tejuca, M., Pazos, F., & Lanio, M.E. (2009). Sticholysins, two pore-forming toxins produced by the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla helianthus*: their interaction with membranes. *Toxicon*, 54, 1135–1147.
- Anderluh, G., Sepčić, K., Turk, T., & Maček, P. (2011). *Acta Chimica Slovenica*. 58, 724–729.
- Aneiros, A., & Garateix, A. (2004). Bioactive peptides from marine sources: pharmacological properties and isolation procedures. *Journal of Chromatography B*, 803, 41–53.
- Banik, R.M., & Prakash, M. (2004). Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from *Bacillus cereus*. *Microbiological Research*, 159, 135–140.
- Bellomio, A., Morante, K., Barlic, A., Gutiérrez-Aguirre, I., Viguera, A.R., & González-Mañas, J.M. (2009). Purification, cloning and characterization of fragaceatoxin C, a novel actinoporin from the sea anemone *Actinia fragacea*. *Toxicon*, 54, 869–880.
- Berne, S., Kalauz, M., Lapat, M., Janussen, D., Kersken, D., Avguštin, J. A., Jokhadar, S. Z., Domen, Jaklič, Gunde-Cimerman, N., Lunder, M., Roškar, I. Eleršek, T., Turk, T. & Sepčić, K. (2016). Screening of the Antarctic marine sponges (Porifera) as a source of bioactive compounds. *Polar Biology*, 39 (5), 947–959.
- Bernheimer, A.W., Avigad, L.S., & Lai, C.Y. (1982). Purification and properties of a toxin from the sea anemone *Condylactis gigantea*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 214, 840–845.
- Bradford, M.M. (1976). 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.
- Falcón A., Bravo E., Aguilar M.B., & Heimer E.P. (2009). Extracción y purificación parcial de citolisinas provenientes de la anémona marina *Condylactis gigantea* (Cnidaria, Anthozoa). En: *XVI Jornadas Conmemorativas Universidad Nacional Autónoma de México*. México.
- García-Rocha, M., García-Gravalos, M.D., & Avila, J. (1996). Characterization of antimetabolic products from marine organisms that disorganise the microtubule network: ecteinascidin 743, isohomohalichondrin-B and LL-15. *British journal of cancer*, 73, 875–883.
- Haard, N., & Simpson, B. (2000). *Seafood Enzymes: Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality*. Editorial Marcel Dekker Inc., New York, USA.
- Hawkes, S.P., Li, H., & Taniguchi, G.T. (2001). Zymography and reverse zymography for detecting MMPs, and TIMPs. *Methods Mol. Biol.* En: *Matrix metalloproteinase protocols* (pp. 257-269). Humana Press, Totowa, NJ.
- Hernández-Sámamo, A.C., Guzmán-García, X., García-Barrientos, R., Ascencio-Valle, F., Sierra-Beltrán, A., Vallejo-Córdova, B., González-Córdova, A.F., Torres-Llanez, M.J., & Guerrero-Legarreta, I. (2015) Extracción y caracterización de proteasas de pepino de mar *Isostichopus fuscus* recolectado en el golfo de California, MÉxico. *Revista mexicana de ingeniería química*, 14(1), 35-47.
- Hojilla, C.V., Wood, G.A., & Khokha, R. (2008). Inflammation and breast cancer. Metalloproteinases as common effectors of inflammation and extracellular matrix breakdown in breast cancer. *Breast Cancer Research*, 10 (2), 205.
- Hu, B., Guo, W., Wang, L.-H., Wang, J.-G., Liu, X.-Y., & Jiao, B.-H. (2011). Purification and characterization of gigantoxin-4, a new actinoporin from the sea anemone *Stichodactyla gigantea*. *International journal of biological sciences*, 7 (6), 729.

- Klassen CD & Watkins III JB. Casarett & Doull, (1999). *Manual de Toxicología*, 5a ed. McGraw Hill Interamericana Editores.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Lanio, M.E., Morera, V., Alvarez, C., Tejuca, M., Gómez, T., Pazos, F., Besada, V., Martínez, D., Huerta, V., Padrón, G., & de los Angeles Chávez, M. (2001). Purification and characterization of two hemolysins from *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon*, 39, 187–194.
- Liao, Y.L. (1997). Fauna Sinica, *Phylum Echinodermata*, Class Holothuroidea. Science Press, Beijing, China 334.
- Maček, P. (1992). Polypeptide cytolytic toxins from sea anemones (Actiniaria). *FEMS microbiology immunology*, 5(1-3), 121-129.
- Martínez, D., Otero, A., Alvarez, C., Pazos, F., Tejuca, M., Lanio, M.E., Gutiérrez-Aguirre, I., Barlic, A., Iloro, I., Arrondo, J.L., González-Mañas, J.M., & Lissi, E. (2007). Effect of sphingomyelin and cholesterol on the interaction of St II with lipidic interfaces. *Toxicon*, 49, 68–81.
- Mazzoni, A., Mannello, F., Tay, F.R., Tonti, G. a. M., Papa, S., Mazzotti, G., Di Lenarda, R., Pashley, D.H., & Breschi, L. (2007). Zymographic analysis and characterization of MMP-2 and -9 forms in human sound dentin. *Journal of dental research*, 86(5), 436-440.
- Oliveira, J.S., Fuentes-Silva, D., & King, G.F. (2012). Development of a rational nomenclature for naming peptide and protein toxins from sea anemones. *Toxicon*, 60, 539–550.
- Pommier, Y., Kohlhagen, G., Bailly, C., Waring, M., Mazumder, A., & Kohn, K.W. (1996). DNA sequence- and structure-selective alkylation of guanine N2 in the DNA minor groove by ecteinascidin 743, a potent antitumor compound from the Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. *Biochemistry*, 35, 13303–13309.
- Ravindran, V.S., Kannan, L., & Venkateshvaran, K. (2010). Biological activity of sea anemone proteins: II. Cytolysis and cell line toxicity. *Indian Journal of Experimental Biology*, 48, 1233–1236.
- Robaina G., & Jiménez J. (1994). *Mochima “Tierra de muchas aguas”*; en: Caracterización de los Parques Nacionales Venezolanos. Fundación Ecológica Pampero, Proparques.
- Rojko, N, Dalla Serra, M, Macek, P, & Anderluh, G. (2016). Pore formation by actinoporins, cytolysins from sea anemones. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1858 (3) 446-456.
- Romero, L., Marcussi, S., Marchi-Salvador, D.P., Silva, F.P., Fuly, A.L., Stábeli, R.G., da Silva, S.L., González, J., Monte, A.D., & Soares, A.M. (2010). Enzymatic and structural characterization of a basic phospholipase A2 from the sea anemone *Condylactis gigantea*. *Biochimie*, 92, 1063–1071.
- Tejuca, M., Anderluh, G., & Dalla Serra, M. (2009). Sea anemone cytolysins as toxic components of immunotoxins. *Toxicon*, 54, 1206–1214.
- Troeberg, L., & Nagase, H. (2004) Zymography of metalloproteinases. *Current Protocols in Protein Science* 21: Unit 21 15.L.
- Wilkesman, J., & Kurz, L. (2009). Protease analysis by zymography: a review on techniques and patents. *Recent patents on biotechnology*, 3, 175–184.