



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología

**AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE  
PROTEASAS DE LA ESPONJA *Neopetrosia subtriangularis***

**T E S I S**

que para optar por el grado de

**Maestro en Ciencias del Mar y Limnología  
(Biología Marina)**

p r e s e n t a

**LIC. EN BIOL. ANDREA PATRICIA BELTRÁN ROBLES**

Tutor principal:

**Dr. Roberto Arreguín Espinosa**

Instituto de Química

Comité Tutor:

**Dr. Edgar Zenteno Galindo**

Facultad de Medicina

**Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez**

Instituto de Neurobiología

**Dra. María Alejandra Rojas Molina**

Universidad Autónoma de Querétaro

**Dra. Nuria Sánchez Puig**

Instituto de Química

México D.F. Junio de 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Roberto Arreguín Espinosa por haber dirigido esta investigación y por el apoyo que siempre me ha brindado.

Quiero agradecer también al Dr. Edgar Zenteno, y al Dr. Manuel Aguilar, integrantes de mi Comité Tutoral por el interés mostrado y por el impulso que recibí de parte de ellos.

Al Dr. Enrique García Hernández por su apoyo incondicional y sus buenos consejos en los momentos más oportunos y al Dr. Eneas Alejandro Chavelas Adame por su ayuda en las revisiones del trabajo.

A CONACyT por la beca otorgada con el número de registro 211221 y a la Dirección del Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología.



5.3.3	Electroforesis en gel .....	26
5.4	Caracterización bioquímica de proteasas .....	27
5.4.1	Isoelectroenfoque .....	27
5.4.2	Espectrometría de masas .....	27
5.4.3	Efecto del pH .....	28
5.4.4	Uso de inhibidores de actividad proteolítica .....	28
VI.	Resultados y discusión .....	30
VII.	Conclusiones .....	42
VIII.	Bibliografía .....	44
IX.	Anexos .....	52
X.	Abreviaturas .....	57

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Algunos miembros del phylum Porifera. ....	4
<b>Figura 2.</b> El agua con partículas de alimento es llevada a la cavidad interna de la esponja a través de los poros y es expulsada por los ósculos .....	5
<b>Figura 3.</b> Planes corporales del Phylum Porifera: asconoide (A), siconoide (B) y leuconoide (C). 1: atrio, 2: ósculo, 3: canal vibrátil o radial, 4: cámara flagelada o vibrátil, 5: poro inhalante, 6: canal inhalante. ....	6
<b>Figura 4.</b> Clases de esponja: A) Demospongiae; B) Calcarea; C) Hexactinellida. ....	7
<b>Figura 5.</b> Ejemplares de <i>Neopetrosia subtriangularis</i> . ....	19
<b>Figura 6.</b> Espículas de <i>Neopetrosia subtriangularis</i> . ....	19
<b>Figura 7.</b> Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano. ....	22
<b>Figura 8.</b> SDS-PAGE del extracto crudo a diferentes concentraciones de proteína: I) 1 mg/mL; II) 2.2 mg/mL; III) 4 mg/mL y IV) marcadores de peso molecular: miosina (250.0 kDa), albúmina sérica bovina (98.0 kDa), deshidrogenasa glutámica (64.0 kDa), alcohol deshidrogenasa (50.0 kDa), anhidrasa carbónica (36.0 kDa), mioglobina (30.0 kDa), lisozima (16.0 kDa). ....	31
<b>Figura 9.</b> Cantidad de proteína total y actividad específica del extracto crudo y de cada una de las fracciones precipitadas mediante sulfato de amonio. ....	32
<b>Figura 10.</b> (A) SDS-PAGE de la fracción 0-30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a distintas concentraciones: I, marcadores de alto peso molecular; II, 1.6 mg/mL; III, 0.8 mg/mL y IV, marcadores de bajo peso molecular. (B) Zimograma de la fracción 0-30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : I, papaína 5 mg/mL; II, papaína 2.5 mg/mL; III, 2 mg/mL; IV, 1mg/mL y V, 0.35 mg/mL. ....	33
<b>Figura 11.</b> Cromatografía de filtración en gel de la fracción 0-30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de <i>N. subtriangularis</i> . La fracción 0-30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (24.7 mg) fue aplicada a una columna Sephadex	

G-100 de 390 mL (2.5 x 80 cm); fueron colectadas fracciones de 2 mL a una velocidad de flujo de 0.08 mL/min. .... 34

**Figura 12.** Electroforesis SDS-PAGE de la proteasa purificada (A): I, marcadores de alto peso molecular; II y III: 300 µg/mL de la fracciones de filtración en gel; zimograma de estas mismas fracciones por duplicado a 7 µg/mL (B). Los marcadores de peso molecular fueron: miosina (220 kDa), macroglobulina-α<sub>2</sub> (170 kDa), β-galactosidasa (116kDa), transferrina (76 kDa) y deshidrogenasa glutámica (53 KDa). .... 35

**Figura 13.** Isoelectroenfoco de la proteasa purificada de *N. subtriangularis*. Línea I: Mezcla de proteínas estándar: aminoglucosidasa (pI 3.50), inhibidor de tripsina (4.55), β-lactoglobulina A (5.20), anhidrasa carbónica bovina (5.85), anhidrasa carbónica humana (6.55), mioglobina banda ácida (6.85), mioglobina banda básica (7.35), lectina de lenteja banda ácida (8.15), lectina de lenteja banda media (8.45), lectina de lenteja banda básica (8.65) y tripsinógeno (9.30). Línea II: Proteasa purificada, indicada con una flecha (300 µg/mL). .... 36

**Figura 14.** Efecto del pH sobre la actividad específica de la proteasa de *N. subtriangularis* sobre Hide-RBB a pH 3-10. .... 38

**Figura 15.** Efecto de inhibidores en la actividad residual de la proteasa de *Neopetrosia subtriangularis*. .... 40

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Compuestos bioactivos de esponjas con licencia para el desarrollo de fármacos. .... 9

**Tabla 2.** Proteasas de diversas especies de esponjas. .... 17

**Tabla 3.** Purificación de proteasa de *N. subtriangularis*. .... 37

## RESUMEN

Las esponjas son los metazoos más antiguos que existen actualmente. Poseen una gran diversidad de compuestos bioactivos y actualmente son objeto de diversos estudios para aplicaciones farmacológicas y biotecnológicas. El objetivo de este trabajo fue la purificación y caracterización bioquímica de una proteasa de la esponja marina *Neopetrosia subtriangularis* a partir de su extracto crudo. Esta enzima fue purificada en un proceso constituido de 2 pasos: precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de filtración en gel. La fracción obtenida de la filtración en gel presentó una sola banda mediante electroforesis SDS-PAGE con un peso molecular aproximado de 240 kDa y un punto isoeléctrico de 6.1 por isoelectroenfoque. Mostró actividad hacia caseína, gelatina, Hide Remazol Brilliant Blue (Hide-RBB) y  $N_{\alpha}$ -Benzoil-L-Arginina 4-nitroanilida (BAPNA). Por espectrometría de masas MALDI-TOF se determinó un peso molecular de 236,417.8 Da. El pH óptimo para su actividad fue 8.0 lo que indica que es una proteasa alcalina. La enzima purificada fue inhibida por el inhibidor de serina proteasas Fenil Metil Sulfonil Floruro (PMSF) pero no fue inhibida por N-(trans-Epoxisuccinil)-L-leucina 4-guanidinobutilamida (E-64) ni por EDTA lo que sugiere que es una serina proteasa. Fue resistente a guanidina, DTT y SDS pero su actividad se vio reducida de manera importante en presencia de TCEP, que al ser un fuerte agente reductor, disminuyendo la actividad proteolítica de la proteasa a un 12.2%, nos indica la presencia de al menos un puente disulfuro en la proteína el cual es importante en la conservación de su estructura y por ende de su actividad catalítica.

## I. INTRODUCCIÓN

Los océanos son una de las fuentes más abundantes y biodiversas de diferentes productos naturales, que se encuentran acumulados principalmente en algunos invertebrados marinos, tales como esponjas, tunicados, briozoos y moluscos. Actualmente existe un gran interés en el estudio de estos compuestos, lo cual ha sido estimulado principalmente por el reconocimiento de macromoléculas biológicas con nuevas estructuras moleculares y debido al descubrimiento de diferentes compuestos con propiedades farmacológicas.

Históricamente, las esponjas fueron el primer grupo de invertebrados marinos en ser estudiados en la búsqueda de nuevos compuestos (Bergquist 1978), y desde entonces se ha identificado un gran número de nuevos compuestos de un espectro químico muy diverso. Las esponjas poseen una variedad sorprendente de compuestos bioactivos que usan para evitar la depredación y en la competencia por el sustrato que han desarrollado en el curso de su larga historia evolutiva; entre estos compuestos se encuentran esteroides, alcaloides, terpenoides, derivados de aminoácidos y proteínas, entre otros. Estos compuestos cubren una amplia gama de efectos tales como la inhibición del crecimiento de microorganismos y efectos tóxicos en contra de otros organismos marinos; también se ha reportado que poseen actividades antivíricas, antitumorales y antiinflamatorias, entre otras, con una amplia aplicación en el ámbito biomédico (Faulkner 2000).

Sin embargo, los estudios de productos bioactivos de esponjas se han enfocado principalmente a compuestos moleculares pequeños, mientras que proteínas, polipéptidos y otras macromoléculas han recibido una modesta atención, a pesar de la gran importancia biológica que tienen. La visión que se tenía hasta hace relativamente poco tiempo era que las proteasas simplemente eran enzimas que degradaban

proteínas, relevantes en la digestión y en el recambio proteico celular. Sin embargo, este punto de vista ha cambiado drásticamente y ahora se comienzan a ver como moléculas de señalización extremadamente importantes en diferentes procesos metabólicos que están involucradas en numerosos procesos vitales tales como el desarrollo, gametogénesis (Mykles, 1998), morfogénesis, sistema inmune y apoptosis. (Wiens *et al.* 2003, 2007).

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 PHYLUM PORIFERA

Las esponjas (phylum Porifera) son los metazoos más antiguos. Son organismos invertebrados multicelulares que carecen de auténticos tejidos. Son organismos sésiles, bentónicos y filtradores, por lo que dependen de partículas suspendidas en el agua para alimentarse.

Actualmente se estima que existen 15,000 especies de esponjas (Leys *et al.* 2005), pero solamente alrededor de la mitad de ellas han sido descritas y nombradas. Son organismos predominantemente marinos (98%). Son un grupo exitoso en ambientes acuáticos antiguos y recientes con su origen en tiempos precámbricos hace 800 millones de años. La simplicidad y flexibilidad en la organización de las esponjas le han conferido muchas ventajas evolutivas. Ocupan todos los hábitats marinos desde los océanos profundos (hasta 5000 m) hasta las zonas intermareales, desde las aguas del Ártico hasta los cálidos mares tropicales, y también han colonizado agua dulce como ríos y arroyos (Fig. 1).

A diferencia de la mayoría de los metazoos, carecen de simetría, cabeza o extremo anterior. Sus células no están organizadas en tejidos u órganos verdaderos, pero entre ellas existe reconocimiento celular que las cohesionan y las mantiene organizadas (Curtis y Barnes 2004). Una de las características distintivas de las esponjas es su potencial regenerativo; las células que componen su cuerpo pueden diferenciarse en cualquiera de los otros tipos celulares según sus necesidades.



Fig. 1. Algunos miembros del phylum Porifera (Williamson y Bramlett 2013; Charpin 2013).

Las esponjas poseen células con un collar apical de largas microvellosidades alrededor de un solo flagelo llamadas coanocitos (Fig. 2), que bombean una corriente de agua a través de su cuerpo, el cual se estructura en torno a una serie de canales por donde circula el agua (Bergquist 2001) filtrando partículas nutritivas (fitoplancton, bacterias y detritus orgánico). Todos los procesos digestivos se llevan a cabo dentro de las células individualmente. Una esponja bombea/filtra aproximadamente un volumen de agua equivalente a su volumen corporal cada 10 a 20 s. Individuos de 1 x 10 cm<sup>2</sup> de la esponja *Leuconia* bombean alrededor de 22.5 L de agua diariamente a través de su cuerpo y se han reportado velocidades de 0.002 a 0.84 mL de agua por segundo por centímetro cúbico de esponja (Brusca y Brusca 2003). Entre las células epiteliales y los coanocitos hay una capa intermedia gelatinosa, llamada mesohilo, en la cual se encuentran usualmente espículas (depósitos minerales), fibrillas orgánicas (espongina y fibras de colágeno) y amebocitos (arqueocitos), células que tienen una potencia de proliferación casi ilimitada y desempeñan varias funciones fundamentales de las esponjas, como en la formación de gémulas en la reproducción asexual, secreción del esqueleto de espículas inorgánicas o fibras orgánicas como la espongina y transporte de partículas de alimento desde los coanocitos a las células epiteliales y a

otras células (Brusca y Brusca, 2003). También existen esponjas que no poseen espículas y presentan solo espongina como elemento estructural como en el caso de la esponja *Spongia officinalis*, especie importante comercialmente que es muy utilizada como esponja de baño y con fines cosméticos (Sipkema *et al.* 2005).

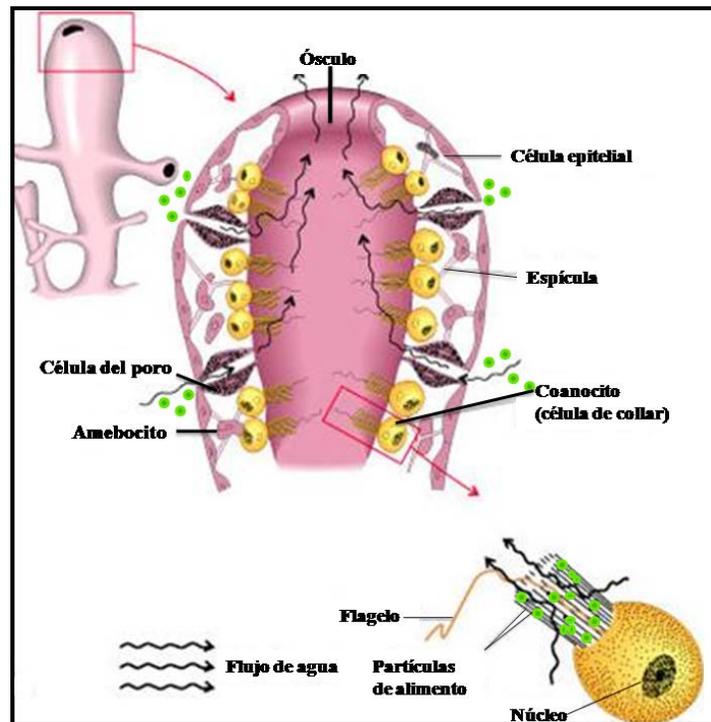


Fig. 2. El agua con partículas de alimento es llevada a la cavidad interna de la esponja a través de los poros y es expulsada por los ósculos (Modificado de Curtis y Barnes, 2004).

El cuerpo de la esponja está altamente organizado, particularmente el sistema acuífero compuesto de canales inhalantes y exhalantes, pasando por las cámaras de coanocitos. La cavidad interna de la esponja, llamada atrio, se comunica con el ambiente por medio de dos tipos de orificios: células del poro o porocitos y los poros inhalantes u ostia, por eso a este Phylum se le denomina Porifera. Las esponjas presentan tres tipos de planes corporales: asconoide, siconoide y leuconoide.

La forma asconoide, la más simple de las tres, se encuentra solo en esponjas pequeñas y está caracterizada por unas ostia que conducen directamente al atrio, el cual está cubierto por coanocitos. En la forma siconoide los coanocitos no logran cubrir el atrio, pero una multitud de pequeños canales (canales radiales) le dan la ventaja de incrementar la superficie de contacto entre el agua y las células, conduciendo a una mayor absorción de alimento (Fig. 3). Finalmente la forma leuconoide es la más compleja, las ostia y los canales conducen a muchas cámaras tapizadas de coanocitos.

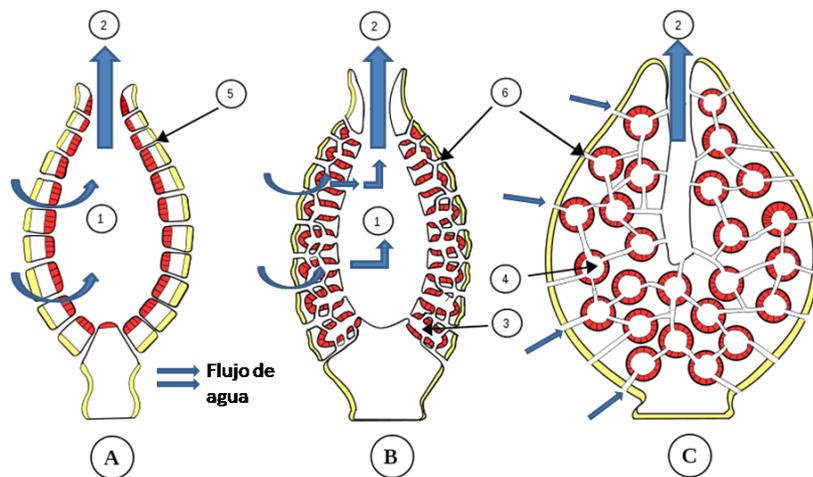


Fig. 3. Planes corporales del Phylum Porifera: asconoide (A), siconoide (B) y leuconoide (C). 1: atrio, 2: ósculo, 3: canal vibrátil o radial, 4: cámara flagelada o vibrátil, 5: poro inhalante, 6: canal inhalante (Modificado de Ruppert *et al.* 2004).

Actualmente el phylum Porifera se agrupa en tres clases de acuerdo a su estructura esquelética (Brusca y Brusca 2003; Gundacker *et al.* 2001; Pechenik 2000):

- a) Clase Demospongiae: La clase más numerosa (contiene el 90% de todas las especies de esponjas). Casi todos sus miembros son de organización leuconoide. Las espículas y fibras de Demospongiae pueden estar constituidas de espongina y/o sílice o solo de fibras de colágeno, pero nunca de carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ). Posee megascleras y microscleras diferenciadas (espículas de longitud mayor de 0.1 mm y espículas menores

de 0.1 mm respectivamente) pero nunca de 6 radios. Viven a cualquier profundidad en aguas marinas, salobres y son las únicas que habitan agua dulce (Fig. 4).

b) Clase Calcarea: Sus miembros producen espículas solamente constituidas de  $\text{CaCO}_3$  en forma de calcita de uno, tres o cuatro radios que no están diferenciadas en mega y microscleras. Podemos encontrar representantes de los tres tipos de construcción en esta clase. Todas son marinas y en general viven en aguas costeras poco profundas.

c) Clase Hexactinellida: Estas esponjas, conocidas como esponjas vítreas, presentan espículas silíceas de 3 o 6 radios. Siempre presentan tanto megascleras como microscleras. No presenta espongina. Presentan organización leuconoide o siconoide. Son exclusivamente marinas, fundamentalmente de aguas profundas.

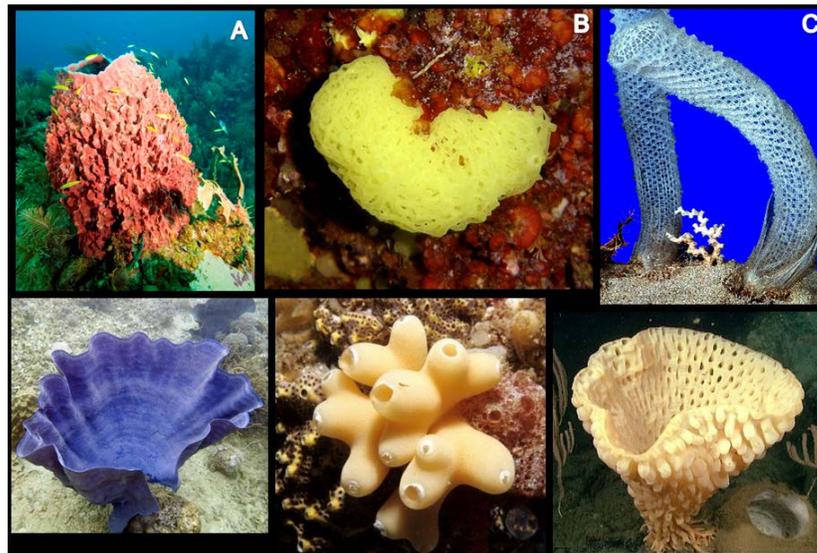


Fig. 4. Clases de esponja: A) Demospongiae; B) Calcarea; C) Hexactinellida (Messersmith 2004; University of Aberdeen 2013)

## 2.2 COMPUESTOS BIOACTIVOS

Las esponjas marinas han sido consideradas durante las últimas décadas como una veta rica de diversos productos naturales para aplicaciones químicas y biotecnológicas. Producen una gran diversidad de compuestos bioactivos como nucleósidos, macrólidos, porfirinas, terpenoides, ácidos grasos, peróxidos cíclicos alifáticos, esteroides, alcaloides, derivados de aminoácidos y péptidos (Faulkner 2000).

El interés farmacéutico de las esponjas se despertó en los 50's por el aislamiento de manera sistemática de tres nucleósidos de la esponja del Caribe *Cryptotethia crypta* por Bergmann y Feeney (1950 y 1951). Después fueron demostradas las propiedades de estos nucleósidos y fueron la base para la síntesis de análogos que condujeron al primer compuesto antiviral y antitumoral extraído de esponjas, Ara-A y Ara-C.

Después de este trabajo pionero, diversas moléculas bioactivas con efectos farmacológicos han sido descubiertas, como citotoxinas, antibióticos, compuestos con propiedades antiinflamatorias, cardiovasculares, gastrointestinales, antivíricas, antitumorales, etc. que están siendo investigadas intensamente (Proksch *et al.* 2002). Varias de ellas incluso han sido aprobadas para su uso terapéutico, como el mesilato de eribulina (Halaven®), cuya estructura fue desarrollada basada en la halicondrina B, aislada de la esponja marina *Halichondria okadai* (Hirata y Uemura 1986) y aprobada en los EUA para su uso en tumores sólidos. Algunos de los productos bioactivos derivados de esponja que están actualmente en el mercado o en fase clínica se enlistan en la Tabla 1. Los compuestos Ara-A, Ara-C y mesilato de eribulina son los únicos compuestos relacionados a esponjas que están en uso clínico.

Tabla 1. Compuestos bioactivos de esponjas con licencia para el desarrollo de fármacos.

<b>Compuesto</b>	<b>Especies</b>	<b>Propiedad</b>	<b>Estado actual</b>	<b>Referencia</b>
Ara-C	<i>Cryptotethia crypta</i>	Anticáncer	Aprobado por FDA	Bergmann y Feeney 1950
Ara-A	<i>Cryptotethia crypta</i>	Antiviral	Aprobado por FDA	Bergmann y Feeney 1951
Eribulina (derivado de halicondrina B)	<i>Halichondria okadai</i>	Antitumoral	Aprobado por FDA	Hirata y Uemura 1986
Manoalido	<i>Luffariella variabilis</i>	Antiinfla- matoria	Fase II	Bennet <i>et al.</i> , 1987
IPL 576,092 (Contignasterol)	<i>Petrosia contignata</i>	Antiinfla- matoria/anti- asmática	Fase II	Coulson y O'Donnell, 2000
KRN7000	<i>Agelas mauritianus</i>	Anticáncer	Fase I	Kikuchi <i>et al.</i> , 2001
LAF389	<i>Jaspis digonoxea</i>	Anticáncer	Fase I	Rudi <i>et al.</i> , 1994

## 2.3 PROTEÍNAS BIOACTIVAS

Las esponjas a pesar de carecer de tejidos u órganos verdaderos, contienen los elementos básicos requeridos para la formación de tejido. En ellas están presentes proteínas características del reino Metazoa que son prerequisite para la formación de órganos como: colágeno (Exposito y Garrone 1990), fibronectina (Labat-Robert *et al.* 1981), receptor integrina (Pancer *et al.* 1997) o moléculas de adhesión (galectinas; Pfeifer *et al.* 1993), factor de agregación (Schütze *et al.* 2001), receptores de tirosina cinasa (RTK) (Schäcke *et al.* 1994) y receptores depuradores (scavenger) ricos en dominios de cisteína (Pancer *et al.* 1997).

En esponjas han sido identificadas algunas moléculas específicas (precursores) de inmunidad adquirida, como aquellas que contienen dominios tipo inmunoglobulina como es el receptor RTK de *Geodia cydonium* (Blumbach *et al.* 1999; Müller *et al.* 1999).

Del mismo modo, estudios revelaron que las esponjas están provistas con elementos clave del sistema inmune innato como TIR (receptor Toll/IL-1) y DD (Death Domain) (Wiens *et al.* 2007) y la proteína de unión a (1->3)- $\beta$ -D-glucano de defensa antifúngica (Perović-Ottstadt *et al.* 2004). Otro buen ejemplo es la defensa antiviral vía (2'-5') oligoadenilato sintetasa (sistema (2-5)A sintetasa), (Wiens *et al.* 1999). La (2-5)A sintetasa es activada por algunas clases de RNA, principalmente RNA de doble cadena, y sintetiza 2'-5' oligoadenilatos, llamados (2-5)A. (2-5)A actúa como un activador alostérico de una ribonucleasa latente, la RNAasa L, la cual degrada RNA celular, viral o de una sola cadena (Greibenjuk *et al.* 2002). Además, la vía de activación de LPS (Lipopolisacáridos) ha sido caracterizada y han sido identificadas las principales moléculas (por ejemplo receptor y adaptador) en *Suberites domuncula* (Wiens *et al.* 2005,2007).

En un estudio anterior en la esponja *Tethya lyncurium* (Mangel *et al.* 1992), ha sido descrita una proteína formadora de poros que se asemeja en el tamaño a otras toxinas con el mismo efecto, por ejemplo la hemolisina de *E. coli* (Bhakdi *et al.* 1986). Recientemente fue clonado un cDNA de una proteína formadora de poro de *Suberites domuncula* (Thakur *et al.* 2003), donde se encontró que había una alta similitud en las bases de datos entre la perforina I humana y la de *S. domuncula*. En la perforina humana, ésta forma poros en las membranas celulares blanco, iniciando una lisis osmótica.

Similarmente, se han encontrado moléculas clave de la ruta apoptótica en el genoma de poríferos. Hasta ahora, han sido identificadas varias proteínas semejantes a caspasas en las demosponjas (Wiens *et al.* 2002, 2003, y 2007). Las caspasas son efectores especiales y reguladores de apoptosis, necrosis e inflamación. A su vez ha sido presentada evidencia experimental de que las esponjas marinas, por ejemplo *Geodia cydonium* y *Suberites domuncula*, presentan apoptosis durante la formación de las gémulas (cuerpos de reproducción asexual) (Wagner *et al.* 1998), en la embriogénesis y también en respuesta al estrés ambiental (Batel *et al.* 1993). Los nuevos descubrimientos de que las esponjas tienen sistemas regulatorios complejos de genes que permiten la formación de planes corporales distintos, sugiere que estos metazoos están provistos del mecanismo regulador de la muerte celular genéticamente programada, apoptosis.

Sin embargo, a pesar de los esfuerzos realizados en los últimos años en la identificación de proteínas de esponja, permanece hasta ahora un desarrollo limitado en la caracterización de proteínas con actividad catalítica y proteolítica.

## 2.4 PROTEASAS

Las enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos también conocidas como proteasas, proteinasas, peptidasas o enzimas proteolíticas pertenecen al grupo de las hidrolasas, ya que catalizan la degradación de otras proteínas hidrolizando los enlaces peptídicos con diferentes grados de intensidad y de selectividad (Barret 2001). Las podemos encontrar en todos los organismos y se encuentran involucradas en una gran cantidad de procesos metabólicos, incluyendo la digestión, proteólisis limitada en la activación de proenzimas y hormonas (Khan; James 1998), regulación de la coagulación sanguínea, activación del sistema inmune, fertilización, muerte celular programada o apoptosis (caspasas) (Rathmell; Thompson 1999).

## 2.5 CLASIFICACIÓN DE PROTEASAS

Dependiendo de la naturaleza del sitio sobre el cual actúan las proteasas a lo largo de la cadena polipeptídica, el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB, 1992) las divide en dos grupos principales: aquellas que hidrolizan enlaces peptídicos proximales a los grupos amino o carboxilo terminal, conocidas como exopeptidasas y 2) las que hidrolizan enlaces peptídicos internos o distales a los grupos terminales del sustrato, conocidos como endopeptidasas. Ambas actúan de manera conjunta, las endopeptidasas para una degradación inicial de polipéptidos largos produciendo fragmentos más pequeños, los cuales pueden ser atacados a continuación por las exopeptidasas produciendo extremos amino o carboxilo terminales (Devlin 2000).

De acuerdo al pH al que la proteína presenta mayor actividad se puede dividir en proteasas ácidas (pH 2 a 6), neutras y alcalinas (pH 8 a 13) (Syed *et al.* 2012).

Finalmente, basándose en el mecanismo catalítico de los grupos funcionales del sitio activo (Barret 1994), las proteasas se pueden dividir en cuatro grandes clases: serina, cisteína, aspártico y metaloproteasas.

- a) Las serina proteasas utilizan un residuo de serina en el sitio activo como nucleófilo, el cual es indispensable para su actividad catalítica. Este tipo de proteínas son extremadamente numerosas. Comparten un sistema catalítico común que está conservado entre diferentes especies de organismos. Casi siempre un residuo de histidina y de ácido aspártico trabajan con la serina para completar la tríada catalítica.

La triada catalítica Asp-His-Ser se puede encontrar en al menos cuatro diferentes contextos estructurales, indicando que esta maquinaria catalítica ha evolucionado cuando menos en cuatro ocasiones separadas (Dodson y Wlodawer 1998), originando varios clanes que contienen familias de serina proteasas con plegamientos de proteína completamente diferentes. La química del grupo hidroxilo de la serina es tal que estas proteasas son por lo general más activas a valores de pH neutrales o ligeramente alcalinos, y normalmente no requieren cofactores para su actividad. Estas propiedades se adaptan particularmente para funciones extracelulares. Más recientemente, serina proteasas con nuevas triadas y diadas catalíticas han sido descubiertas (Hedstrom 2002).

- b) Cisteína proteasas, también conocidas como tiol proteasas, son una familia de enzimas proteolíticas que contienen en su sitio activo un residuo de cisteína, donde el grupo sulfhidrilo sirve como el nucleófilo en la catálisis. La catálisis actúa a través de un intermediario de tioéster y es facilitado por una cadena lateral de histidina actuando como base general; una asparagina completa la triada catalítica esencial.

La mayoría de las cisteína proteasas son endopeptidasas, pero algunas actúan adicionalmente o exclusivamente como exopeptidasas. Las cisteína proteasas tienen topologías moleculares características, que se pueden ver no solo en las estructuras tridimensionales, sino comúnmente también en sus estructuras secundarias

- c) Las aspártico proteasas dependen para su actividad de la interacción de los grupos carboxilos de dos residuos de ácido aspártico. Han sido identificadas por la presencia de la secuencia Asp-Thr-Gly en su sitio activo. Esta secuencia es crítica ya que en esta secuencia el ácido aspártico proporciona la mitad de la maquinaria catalítica de estas enzimas; la secuencia Thr-Gly seguida del Asp es esencial para la formación de una conformación catalítica única que también define a las enzimas de esta clase. Las proteasas aspárticas comúnmente actúan a valores de pH ácidos, y todas las proteasas aspárticas conocidas son endopeptidasas.

En enzimas de una sola cadena polipeptídica se requiere de dos secuencias de Asp-Thr-Gly separadas por 170 a 190 aminoácidos para formar el sitio catalítico completo. En enzimas homodiméricas cada unidad monomérica tiene una secuencia Asp-Thr-Gly. En ambos tipos de aspártico proteasas el plegamiento de las cadenas permite que los dos aspartatos se encuentren cercanos para crear el aparato catalítico.

- d) Las metaloproteasas contienen un ion metálico divalente en el sitio activo. El ion metálico catalítico es usualmente coordinado por cadenas laterales de tres aminoácidos ligandos. Una molécula de agua es esencial para la hidrólisis del enlace peptídico y también se coordina con el ion metálico como un cuarto ligando en la forma activa de la metaloproteasa. En la mayoría de los casos el ión metálico es zinc, pero en algunas ocasiones es cobalto, manganeso o

níquel. Los ligandos para estos iones metálicos que se conocen en las metaloproteasas son His-Glu-Asp, o Lys.

## 2.6 PROTEASAS DE ESPONJAS

En los primeros estudios realizados a esponjas en busca de proteasas, en 1993 y 1995 Arreguín *et al.* purificó y caracterizó bioquímicamente una metaloproteasa de la esponja *Sphaciospongia vesparia* con un peso molecular de 29,600 Da. La enzima presentó actividad para caseína, N<sub>α</sub>-benzoil-L-arginina etil éster (BAEE), Hipuril-L-fenilalanina (HLPA) y Hide-Remazol Brilliant Blue; es decir fue capaz de hidrolizar enlaces éster y amida, y fue inhibida por EDTA y 1,10- fenantrolina por lo que se propuso ser una metaloproteasa, es decir que un átomo de metal era esencial para presentar su actividad. No presentó actividad hacia gelatina por lo que se propuso que esta proteasa no interviene en el proceso del metabolismo de esponjas.

Después Krasko *et al.* (1997) purificaron, caracterizaron y clonaron la catepsina de la esponja *Geodia cydonium* (Tabla 2), aislándola de los lisosomas basándose en la premisa de que su digestión es intracelular y lo hace mediante fagocitosis. La actividad proteolítica primero fue medida en el extracto crudo, y fue más fuertemente inhibida por los inhibidores de cisteína-proteasa que con otros inhibidores que usaron, por lo que suponen que la catepsina es la principal proteasa en el extracto crudo. La proteasa purificada fue activada por compuestos tiol e inhibida por inhibidores específicos de cisteína proteasas, y puesto que el perfil de inhibición de proteasas fue igual que el del extracto crudo determinaron que la catepsina era la principal proteasa de *G. cydonium*.

Mebis *et al.* (1997) midió la actividad proteolítica del extracto crudo de 25 diferentes especies de esponjas marinas, y a partir de la especie *Callispongia schulzi* purifican y caracterizan una proteasa, por ser la que presentaba de manera notable una mayor actividad. La proteasa hidrolizó BAEE y caseína, mas no BAPNA; su actividad

se inhibió con EDTA y 1,10-fenantrolina, por lo que consideraron que es una metaloproteasa similar a la enzima proteolítica purificada de *Speciospongia vesparia* (Arreguín *et al.* 1993).

Posteriormente con el objetivo de poder conocer más del metabolismo de las espículas silíceas en Demospongiae, en el grupo de Morse (Shimizu *et al.* 1998) encontraron una enzima, la silicateína, que cataliza la formación de biosílice. Sin embargo estudios posteriores revelan que la silicateína no solo media la formación de biosílice a partir de compuestos de silicio monoméricos (Schröder *et al.* 2003), sino que también presenta actividad proteolítica la cual es específica para enzimas de la familia catepsina L (Müller *et al.* 2003 y 2007); se propuso que la maduración de la pro-silicateína a silicateína es el resultado de una acción autocatalítica (Schöder *et al.* 2012). En la Tabla 2 se enlistan las principales proteasas purificadas y caracterizadas de esponjas.

Asimismo, se han caracterizado serina proteasas de esponjas mediante técnicas zimográficas y electroforéticas de la esponja *Geodia cydonium* (Wilkesman y Schröder 2007); se determinaron sus condiciones óptimas de pH, temperatura, diferentes sustratos e inhibidores y diversos agentes desnaturizantes para observar su estabilidad (Tabla 2); estos autores resaltan que su peso molecular de 200 kDa viene siendo un poco elevado de acuerdo a los trabajos ya reportados de esponjas; asimismo presenta una alta resistencia térmica, hasta los 80° C, y estructuralmente se mostró estable frente a los diferentes agentes desnaturizantes.

Tabla 2. Proteasas de diversas especies de esponjas.

<b>Proteasa</b>	<b>Especie</b>	<b>Referencia</b>
Metaloproteasa	<i>Sphaciospongia vesparia</i>	Arreguin <i>et al.</i> 1993
Catepsina	<i>Geodia cydonium</i>	Krasko <i>et al.</i> 1997
Metaloproteasa	<i>Callyspongia schulzi</i>	Mebs <i>et al.</i> 1997
Silicateína $\alpha$	<i>Tethya aurantia</i>	Shimizu <i>et al.</i> 1998
Serina proteasa	<i>Verongia aurea</i>	Rojas y Dolittle 2002
Serina proteasa	<i>Geodia cydonium</i>	Wilkesman y Schröder, 2002 y 2007
Caspasas y survivinas	<i>Suberites domuncula</i>	Luthringer <i>et al.</i> 2011

En los últimos años los trabajos realizados con proteasas de esponjas marinas han consistido en identificación y/o expresión de cDNA. Se han identificado serina proteasas de la esponja *Verongia aurea* (Rojas y Dolittle 2002), y caspasas y proteínas como survivinas (SUVRL) de *Suberites domuncula*; estos trabajos sugieren que desempeñan un papel importante en la morfogénesis, en la apoptosis y en el ciclo de división celular de la esponja (Pfeifer *et al.* 1993; Luthringer *et al.* 2011).

### **2.7 *Neopetrosia subtriangularis***

La esponja marina *Neopetrosia subtriangularis* es una especie endémica y característica en el Atlántico Tropical Occidental, registrada desde la costa oeste de Florida hasta Brasil (Soest y Stentof 1988). En México se localiza a lo largo del Caribe y

el Sistema Arrecifal Veracruzano (SAV) (Green 1977; Gómez y Green 1984; Green *et al.* 1986) siendo en este último una de las especies más abundantes con algunos valores de densidad de 0.32 esponjas por m<sup>2</sup> a 0.042 esponjas por m<sup>2</sup> (Vázquez 1998). Su color varía desde el amarillo en la parte superior a guinda o vino en la base de fijación con el sustrato (Fig. 5 y 6). Pertenece a la clase Demospongiae, y es de forma leuconoide.

La mayor parte de los trabajos que han sido realizados a la esponja *N. subtriangularis* en el Sistema Arrecifal Veracruzano se han enfocado en estudiar sus metabolitos secundarios tales como esteroides, alcoholes, terpenoides etc. y sus posibles efectos en diversas actividades biológicas, donde han demostrado tener alto potencial por su actividad antimicrobiana, antiviral, antitumoral, fungicida, ictiotóxica entre otras (Green 1977, 1986; Vázquez 1998; Nakamura *et al.* 2005). Asimismo también se han realizado valoraciones de fuentes potenciales de alimentación de *N. subtriangularis* empleando técnicas de análisis elemental de carbono y nitrógeno (González 2009). Sin embargo, hasta ahora no se han realizado estudios de ninguna proteína con actividad proteolítica de *N. subtriangularis*, por lo cual este sería el primer trabajo en realizarlo.



Fig. 5. Ejemplares de *Neopetrosia subtriangularis*

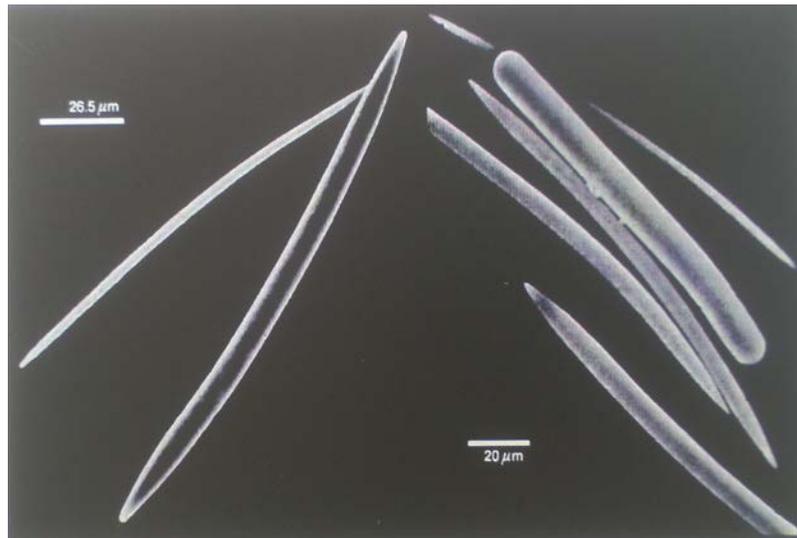


Fig. 6. Espículas de *Neopetrosia subtriangularis* (Vázquez, 1998).

### III. HIPÓTESIS

La esponja marina *Neopetrosia subtriangularis* posee una cantidad importante de enzimas con actividad proteolítica que participan en su metabolismo.

### IV. OBJETIVOS

#### 4.1 OBJETIVO GENERAL:

- Purificar y caracterizar bioquímicamente las proteasas más abundantes que se encuentren presentes en la esponja marina *Neopetrosia subtriangularis*.

#### 4.2 OBJETIVOS PARTICULARES:

- Aislar y purificar las proteasas más abundantes y con mayor actividad proteolítica de *Neopetrosia subtriangularis* por métodos cromatográficos.
- Detectar la actividad proteolítica de las proteasas purificadas mediante zimografía.
- Determinar peso molecular punto isoeléctrico y efecto del pH en la actividad de las proteasas purificadas de *Neopetrosia subtriangularis*.
- Clasificar el grupo de proteasas responsables de la actividad proteolítica de *N. subtriangularis* mediante ensayos con diferentes inhibidores de actividad enzimática.

## V. METODOLOGÍA

### 5.1 ÁREA DE MUESTREO

La esponja *Neopetrosia subtriangularis* fue recolectada en las costas del Golfo de México dentro del Sistema Arrecifal Veracruzano en el arrecife La Anegada de Afuera (-2 m, 28° C) en agosto del 2007.

El Sistema Arrecifal Veracruzano se encuentra dividido en dos áreas por la desembocadura del río Jamapa. El arrecife la Anegada de Afuera pertenece al grupo del sur que se encuentra frente al poblado de Antón Lizardo junto con los arrecifes Blanca, Giote, Isla de Enmedio, Rizo, Cabezo, Chopas, Polo, Topatillo, Santiago y Anegadilla (Fig. 7). El SAV en conjunto ocupa una superficie aproximada de 52,000 ha. El arrecife La Anegada de Afuera se localiza a los 19° 09' latitud norte y 95° 51' longitud oeste. Posee un área de 7.69 km<sup>2</sup> y su distancia a la costa es de 17.2 km.

La recolección del material biológico se llevó a cabo de manera aleatoria mediante buceo libre. Una vez recolectada la esponja del arrecife se limpió con agua de mar para eliminar material extraño u otros organismos, se colocó en bolsas de plástico etiquetadas con los datos de temperatura, profundidad, fecha y clave de recolecta y posteriormente fueron trasladadas en hielo seco al Departamento de Química de Biomacromoléculas del Instituto de Química, UNAM en la Ciudad de México donde fueron guardadas en un ultracongelador a -20°C para su conservación previa a su uso. La identificación de la especie se realizó en el Laboratorio de Esponjas del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología UNAM a cargo de la Biól. Patricia Gómez siguiendo el método previamente establecido (Green y Gómez, 1984).

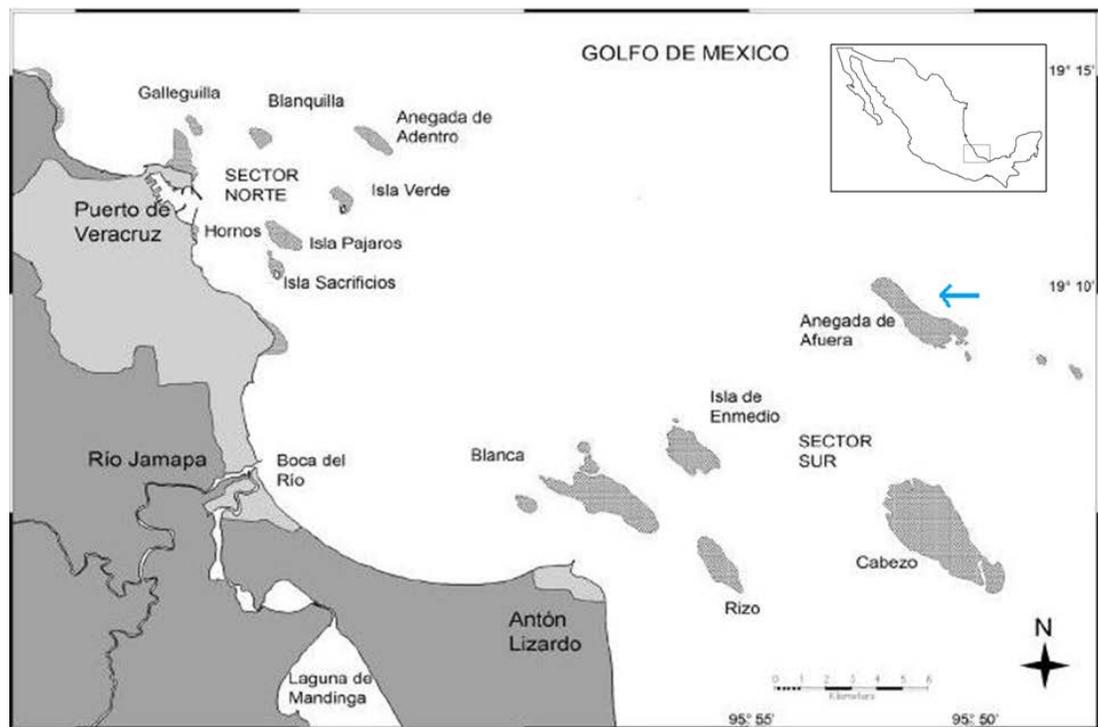


Fig. 7. Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano (Winfield et al. 2010).

## 5.2 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

La esponja (350 g) se cortó en pequeños trozos de aproximadamente 1 cm<sup>3</sup>, se trituró en un mortero y después en un homogenizador en una relación 1:1 peso/volumen en un regulador Tris-HCl 0.05 M pH 7.6 con NaCl 0.3 M. Para evitar la desnaturalización de las proteínas, todo el procedimiento se realizó a 4° C. El homogenizado se centrifugó en una centrífuga Beckman modelo J2-21 a 18,000 x g por 40 min a 4° C y el precipitado se descartó. Para clarificar el sobrenadante, este fue filtrado a través de una membrana Millipore de 0.22 µm. Este filtrado obtenido será denominado como extracto crudo.

### 5.2.1 DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

La concentración de la proteína soluble total se determinó mediante el ensayo de BCA (BCA Protein Assay Kit, Pierce) y como estándar se utilizó albúmina sérica bovina (BSA) incluida en el kit, a diferentes concentraciones. Se realizaron dos réplicas a todas las determinaciones incluyendo las de la curva patrón. Los valores de absorbancia fueron medidos a 562 nm en un espectrofotómetro Thermo/Milton Roy Spectronic Genesys 5.

### 5.2.2 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

Para determinar la actividad proteolítica se utilizó el sustrato Hide-Remazol Brilliant Blue (Hide-RBB) (Rinderknecht *et al.* 1968). El ensayo se realizó mezclando 2 mL de muestra de cada una de las etapas de purificación a una concentración de 0.35 mg/mL con 2 mg/mL de Hide-RBB. El tiempo de incubación fue de 1 h y la absorbancia de la solución filtrada fue medida a 595 nm.

La medición de actividad tipo tripsina se realizó con  $N_{\alpha}$ -Benzoil-L-Arginina 4-nitroanilida (BAPNA) de acuerdo a Erlanger *et al.* (1961) utilizando 0.5 mg/mL de sustrato previamente estabilizado con amortiguador a 37° C 5 min antes de agregar la muestra; la concentración de la enzima fue de 0.35 mg/mL, se dejó incubando durante 15 min y posteriormente se midió la absorbancia de las muestras a 410 nm.

Para medir la actividad de la proteasa frente a un sustrato natural se utilizó caseína como sustrato. Se llevó a cabo incubando la caseína al 2% con 0.350 mg/mL de proteasa a 37° C durante 15 minutos y se detuvo con una solución de ácido tricloroacético al 5%. Posteriormente, la muestra se centrifugó durante 10 minutos a 3300 x g en una microcentrífuga Bio-Rad modelo 14K (Bio-Rad Laboratories Inc.,

California, USA) y se midió la absorbancia del sobrenadante a una longitud de onda de 280 nm en un espectrofotómetro.

La actividad proteolítica para Hide-RBB, BAPNA y caseína fueron reportadas como unidades, donde una Unidad se definió como la cantidad de proteína requerida para producir un incremento de 0.01 de absorbancia por minuto bajo las condiciones mencionadas anteriormente. Los resultados fueron expresados en actividad específica como la Unidad de actividad proteolítica (U) por mg de proteína (U/mg).

### **5.2.3 ZIMOGRAFÍA**

Para la detección de proteasas por técnicas zimográficas, se prepararon geles de poliacrilamida al 11% copolimerizada con gelatina al 0.1% usando una modificación al método descrito por Lantz y Ciborowski (1994). Las muestras se disolvieron en un amortiguador de carga no reductor (Tris-HCl 50 mM, pH 6.8, 10% glicerol, 6% SDS, 0.02% azul de bromofenol). Se aplicó un voltaje constante de 120 V a 4° C. Posteriormente los geles se incubaron por 1 h en agitación en Triton X-100 al 2.5% a temperatura ambiente, se enjuagaron con agua destilada y se incubaron con el regulador de activación (Tris-HCl 50 mM, pH 7.6, 0.3 M NaCl) por 12 h a 37° C. Después los geles fueron teñidos durante 1 h con una solución teñidora con azul de Coomasie 0.025 % (anexo A) y decolorados con una solución de metanol 30% y ácido acético 10% hasta obtener bandas claras con un fondo azul oscuro.

## 5.3 PURIFICACIÓN DE PROTEASAS

### 5.3.1 PRECIPITACION CON SULFATO DE AMONIO

El extracto crudo de *N. subtriangularis* fue tratado mediante precipitación fraccionada con sulfato de amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , donde las proteínas se mantienen disueltas gracias a sus interacciones con el agua. Cuando se añade sulfato de amonio a una solución de proteína, una parte del agua forma enlaces ion-dipolo con la sal. Al haber menos agua disponible para hidratar a las proteínas, éstas comienzan a actuar hidrofóbicamente entre ellas, causando que se precipite la proteína (Campbell y Farrell, 2004).

La primera fracción (0-30% de saturación) se mantuvo en agitación suave y constante a 4° C durante 12 h (posteriormente abreviado como fracción 0-30%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ). Se centrifugó a 30,000 x g durante 30 min, se tomó el precipitado y se resuspendió en el mismo amortiguador de homogenización. El sobrenadante se llevó a 60% y 100% de saturación bajo las mismas condiciones.

La fracción con mayor actividad proteolítica (0-30%) fue dializada en una membrana de 12 a 14 kDa (Spectra) en el mismo amortiguador para eliminar los sulfatos residuales. Posteriormente el dializado fue ultrafiltrado a través de una celda de ultrafiltración Amicon utilizando una membrana Millipore de polietersulfona (PES) con un tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$ , y su actividad fue probada con Hide-Remazol Brilliant Blue y zimogramas.

### 5.3.2 FILTRACIÓN EN GEL CON SEPHADEX G-100

El dializado, una vez que fue ultrafiltrado, se inyectó con un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  a una columna Sephadex G-100 (GE-Healthcare). La columna contenía 390 mL de matriz

(2.5 de diámetro x 80 cm de altura), en un sistema AKTA FPLC (Amersham Biosciences) equilibrada con un regulador Tris-HCl 0.05 M pH 7.6 con NaCl 0.3 M. Para calcular el volumen vacío de la columna se utilizó como estándar azul de dextran.

La elución se realizó a una velocidad de flujo de 0.08 mL/min a 4° C. Las fracciones obtenidas de 2 mL cada una fueron medidas a 280 nm. Se obtuvo un pico del cual sus fracciones fueron mezcladas y concentradas en la celda de ultrafiltración (Amicon ultra) con una membrana de 10 kDa y se probó su actividad proteolítica mediante la técnica de Hide-RBB descrita anteriormente, de BAPNA y con zimogramas.

### 5.3.3 ELECTROFORESIS EN GEL

Durante las diferentes etapas de purificación del extracto de *N. subtriangularis* se realizaron análisis electroforéticos en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) bajo condiciones desnaturalizantes para observar la pureza y las propiedades de las proteínas obtenidas en geles al 12 y 8% (80 x 73 x 0.75 mm) conteniendo 0.1% de dodecilsulfato de sodio, de acuerdo al método de Laemmli (1970) a 110 V durante aproximadamente 2 h, en una solución amortiguadora de corrida Tris-glicina en el sistema Mini-Protean 3 Electrophoresis System (Bio-Rad). Como agente reductor de los enlaces disulfuro de las proteínas se utilizó  $\beta$ -mercaptoetanol al 1%. La preparación y proporciones de los componentes usados durante la formulación de las soluciones están descritas en el anexo A.

Para la determinación de los pesos moleculares relativos de las proteínas se utilizaron los siguientes marcadores: para alto peso molecular SeeBlue Pre-Stained Stasndard (Invitrogen): miosina (250.0 kDa), albúmina sérica bovina (98.0 kDa), deshidrogenasa glutámica (64.0 kDa), alcohol deshidrogenasa (50.0 kDa), anhidrasa carbónica (36.0 kDa), mioglobina (30.0 kDa), lisozima (16.0 kDa). Estándares para bajo

peso molecular: SDS-PAGE Molecular Weight Standards (Bio-Rad); fosforilasa b (97.4 kDa), albúmina sérica bovina (66.2 kDa), ovoalbúmina (45.0 kDa), anhidrasa carbónica (31.0 kDa), inhibidor de tripsina de soya (21.5 kDa), lisozima (14.4 kDa). Los geles fueron teñidos en una solución con azul de Coomasie R-250 0.025% (anexo A) para poder observar las bandas y decolorados con una solución de metanol al 30% y ácido acético al 10%.

## **5.4 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA**

### **5.4.1 ISOELECTROENFOQUE**

Para determinar el punto isoelectrico de la proteína de interés se utilizaron microgeles PhastGel IEF (GE Healthcare) con dimensiones de 50 x 43 x 0.45 mm. Dicho gel fue corrido bajo un gradiente de pH 3-10 en un equipo PhastSystem (GE-Pharmacia) usando los protocolos sugeridos por la compañía y utilizando estándares de proteínas con pI conocido (Broad pI kit GE Healthcare): aminoglucosidasa (pI 3.50), inhibidor de tripsina (4.55),  $\beta$ -lactoglobulina A (5.20), anhidrasa carbónica bovina (5.85), anhidrasa carbónica humana (6.55), mioglobina banda ácida (6.85), mioglobina banda básica (7.35), lectina de lenteja banda ácida (8.15), lectina de lenteja banda media (8.45), lectina de lenteja banda básica (8.65) y tripsinógeno (9.30).

### **5.4.2 ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

Para determinar el peso molecular de la proteasa se realizó una espectrometría de masas utilizando la técnica de MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight) en un espectrómetro de masas Micro-Flex Bruker Esquiver.

El procedimiento utilizado fue usando una matriz preparada con una solución de ácido sinapínico en una mezcla de 30% acetonitrilo, 70% agua y 0.1% de ácido trifluoroacético. Se usaron proteínas de masa molecular conocida como estándar.

#### **5.4.3 EFECTO DEL pH**

Para determinar el efecto que tiene el pH del medio en la actividad proteolítica de la enzima se realizó un ensayo enzimático variando el pH de reacción en un intervalo de 3 a 10 por 10 min a 37° C. Para ello se prepararon las soluciones con BAPNA y Hide Remazol Brilliant Blue a diferentes valores de pH. Para el intervalo de pH de 6 a 10 se utilizó el regulador Tris-HCl 0.05 M con NaCl 0.3 M y para el intervalo entre 3 a 5 se usó un amortiguador de acetatos 0.1 M con NaCl 0.3 M.

#### **5.4.4 USO DE INHIBIDORES DE ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA**

Para comprobar la especificidad del sitio activo de la proteasa purificada se emplearon inhibidores específicos de proteasas con diferentes mecanismos de acción: fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1mM, E-64 10 µM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 5 mM, Urea 8 M, guanidina 4 M, Tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP) y ditioneitol (DTT) 20 mM, SDS 6%, preparados en un amortiguador Tris-HCl 0.05 M pH 7.6 con NaCl 0.3 M. Fueron estudiados por separado preincubando las fracciones purificadas con los inhibidores en tubos diferentes durante 30 min a 37° C y después durante 1 h a una temperatura de 37° C con el sustrato Hide-RBB en tubos diferentes de 2 mL con todos los componentes.

Se determinaron las actividades proteolíticas correspondientes utilizando como testigo de 100% de actividad las determinaciones enzimáticas en ausencia de

inhibidores. La actividad residual se expresó en porcentaje tomando como referencia el valor obtenido en ausencia de inhibidor.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se aisló y caracterizó bioquímicamente una proteasa de *Neopetrosia subtriangularis* en un proceso de dos pasos de purificación, para lo cual se verificó primeramente la presencia de actividad proteolítica en el extracto crudo del cuerpo completo de la esponja, utilizando como sustrato Hide-RBB.

Con la finalidad de conocer la complejidad molecular de proteínas del extracto crudo se realizó una electroforesis SDS-PAGE bajo condiciones desnaturizantes con marcadores moleculares de amplio espectro, observándose que presenta una diversidad de proteínas de diferentes pesos moleculares, desde masas inferiores a 16 kDa hasta 240 kDa aproximadamente, concentradas de manera importante en la zona de alto peso molecular (Fig. 8).

Los datos obtenidos mediante el análisis del gel SDS-PAGE, indican que el extracto crudo contiene proteínas con diferentes pesos moleculares. Tres de estas proteínas muestran pesos moleculares altos, 240, 180 y 140 kDa, mientras que el resto tienen pesos moleculares más pequeños. El contenido total de proteínas del extracto crudo obtenido a partir de la esponja *Neopetrosia subtriangularis* fue de 453.22 mg con una actividad específica de 0.29 U/mg.

Por otro lado, se observan varias bandas de proteínas con una intensidad mayor que las del resto, las cuales poseen pesos moleculares de aproximadamente 40, 74, 180 y 240 kDa (Fig. 8), que indican que se encuentran en una mayor concentración.

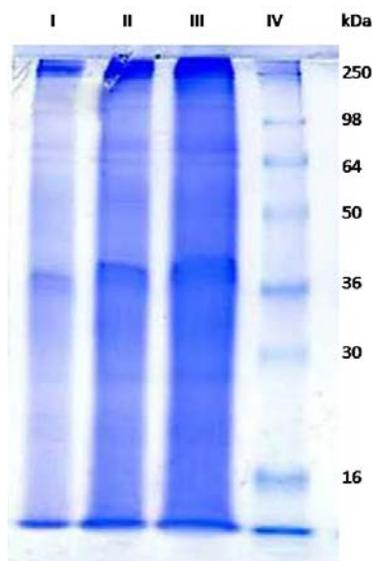


Fig. 8. SDS-PAGE del extracto crudo a diferentes concentraciones de proteína: I) 1 mg/mL; II) 2.2 mg/mL; III) 4 mg/mL y IV) marcadores de peso molecular: miosina (250.0 kDa), albúmina sérica bovina (98.0 kDa), deshidrogenasa glutámica (64.0 kDa), alcohol deshidrogenasa (50.0 kDa), anhidrasa carbónica (36.0 kDa), mioglobina (30.0 kDa), lisozima (16.0 kDa).

Una vez comprobada la presencia de enzimas con actividad proteolítica en el extracto crudo utilizando como sustrato Hide-RBB, se siguió el método de purificación midiendo a cada una de las fracciones precipitadas con sulfato de amonio la cantidad de proteína y la actividad proteolítica. La fracción que presentó mayor cantidad de proteína total fue de 30-60% de saturación (anexo B), con 90.28 mg, constituyendo el 20% de proteína del extracto crudo, seguida por la fracción 0-30% con 24.7 mg totales de proteína (Fig. 9).

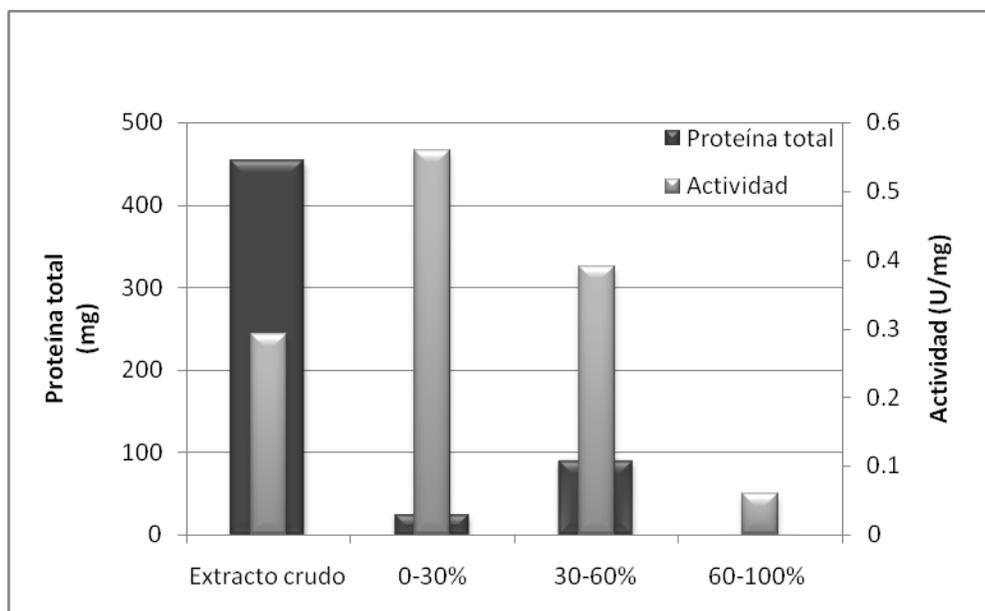


Fig. 9. Cantidad de proteína total y actividad específica del extracto crudo y de cada una de las fracciones precipitadas mediante sulfato de amonio.

Después de determinar la actividad de las tres fracciones precipitadas con sulfato de amonio, la que presentó mayor actividad proteolítica fue la fracción 0-30% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Esta fracción presentó una actividad específica de 0.56 U/mg, en contraste con la obtenida de la fracción 30-60% de 0.39 U/mg que fue inferior. La fracción de 0-30% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  fue analizada mediante un gel SDS-PAGE (Fig. 10), donde se observa una disminución en la diversidad de proteínas con respecto al extracto crudo, y la mayor parte de las proteínas corresponden a proteínas de alto peso molecular, conservándose al menos una de las bandas proteicas que también se encontraba en el perfil electroforético del extracto crudo con un peso aproximado entre 200 y 240 kDa.

La fracción obtenida al 0-30% de saturación nos indica que ésta interactúa débilmente con el agua, ya que con una cantidad menor de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  su solubilidad disminuye hasta el punto de precipitarse. Esta fracción, que contiene la mayor actividad proteolítica de las tres precipitadas, aún teniendo una cantidad de proteína total inferior a la fracción 30-60% fue seleccionada al presentar la actividad específica más alta para realizar los pasos de purificación subsecuentes.

A esta fracción se le realizó un zimograma para seguir su actividad proteolítica (Fig. 10). Las bandas decoloradas sobre el fondo azul indican la actividad proteolítica de cada una de las proteasas, y el fondo color azul es causado por el azul de Coomasie con el sustrato no digerido de gelatina. Se observa una elevada actividad proteolítica en la región de alto peso molecular coincidiendo con los resultados obtenidos del perfil electroforético. Asimismo se observó actividad proteolítica a lo largo de todo el carril, indicando que también posee otras proteasas de más bajo peso molecular.

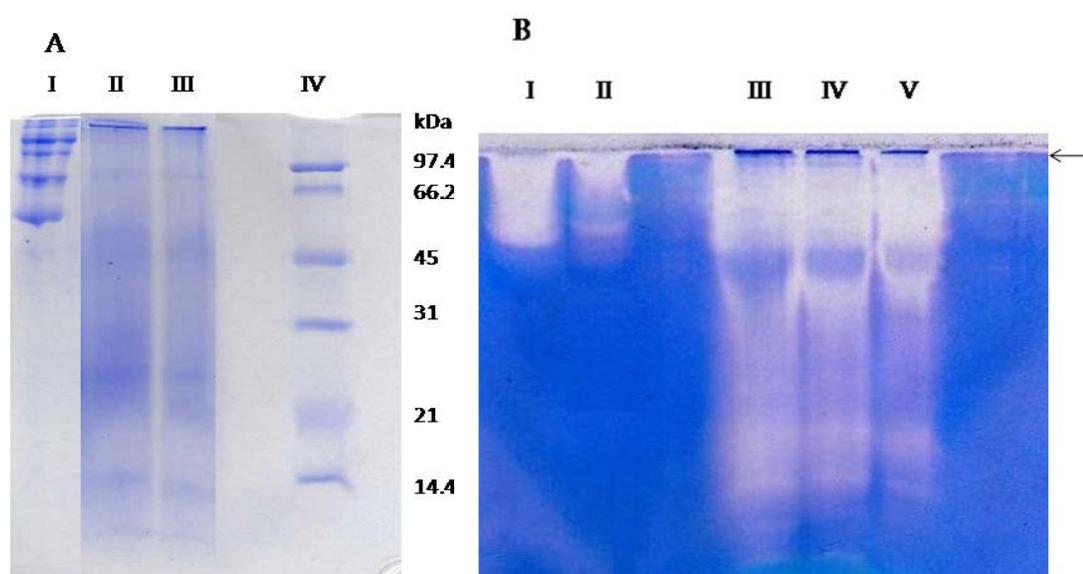


Fig. 10. (A) SDS-PAGE de la fracción 0-30%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a distintas concentraciones: I, marcadores de alto peso molecular; II, 1.6 mg/mL; III, 0.8 mg/mL y IV, marcadores de bajo peso molecular. (B) Zimograma de la fracción 0-30%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : I, papaína 5 mg/mL; II, papaína 2.5 mg/mL; III, 2 mg/mL; IV, 1mg/mL y V, 0.35 mg/mL.

La fracción resultante de precipitar con 30% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  fue purificada mediante cromatografía de exclusión molecular con Sephadex G-100 con un volumen total de 390 mL y un diámetro interno de columna de 2.5 cm y 80 cm de altura. El volumen muerto de la columna fue de 107.45 mL. En el cromatograma de la Figura 11 se muestra el perfil de elución de las proteínas de la cual se obtuvo un solo pico prominente y simétrico a 280 nm, a un volumen de elución de 133 mL; sus fracciones fueron mezcladas y concentradas a 2 mg de proteína total en un sistema de

ultrafiltración Amicon (Millipore). La actividad proteolítica específica obtenida mediante Hide-RBB para este concentrado fue 6.07 U/mg.

También fueron realizados ensayos para medir la actividad proteolítica con sustratos naturales y sintéticos, como la caseína y el BAPNA respectivamente. Los ensayos se realizaron a una concentración de 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de proteína, donde evidenció su capacidad de degradar ambos sustratos. Con caseína presentó una actividad específica de 0.76 U/mg y con BAPNA una actividad de 0.907 U/mg.

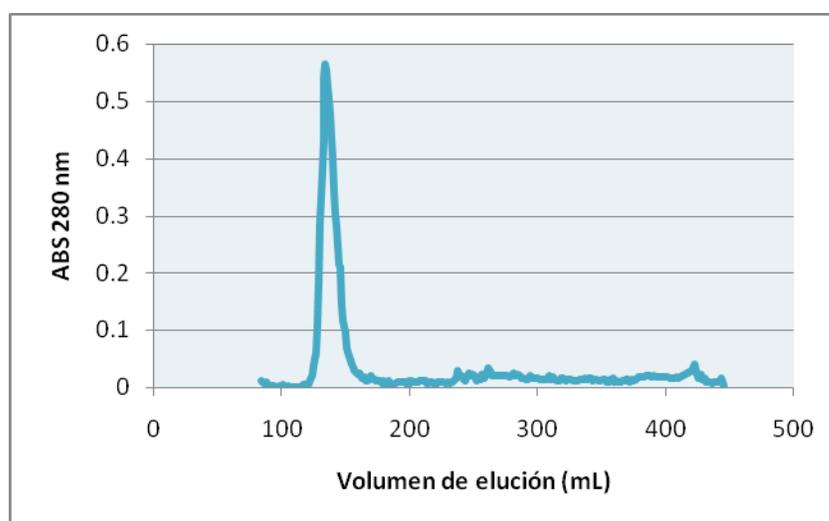


Fig. 11. Cromatografía de filtración en gel de la fracción 0-30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  de *N. subtriangularis*. La fracción 0-30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (24.7 mg) fue aplicada a una columna Sephadex G-100 de 390 mL (2.5 x 80 cm); fueron colectadas fracciones de 2 mL a una velocidad de flujo de 0.08 mL/min.

Para corroborar el estado de pureza de las fracciones obtenidas, se realizó un SDS-PAGE en condiciones reductoras, cuyos resultados se observan en la figura 12. Durante la purificación se observa la desaparición de bandas de proteínas debido a la eliminación de fracciones proteicas durante las etapas del proceso de purificación y se puede observar que se mantiene una sola banda con un peso molecular estimado de 240 kDa, valor bastante cercano a los 200 kDa de la serina proteasa ya reportada de *Geodia cydonium* (Wilkesman y Schröder 2002).

Para probar la presencia de actividad proteolítica se hizo una zimografía de las fracciones obtenidas de la filtración en gel a una concentración de 7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , de la cual se obtuvo una sola banda clara bien definida, demostrándose que la actividad de proteasa es debida a una sola proteína y confirmando que la banda de proteína con un peso molecular de aproximadamente 240 kDa posee la actividad proteolítica (Fig. 12).

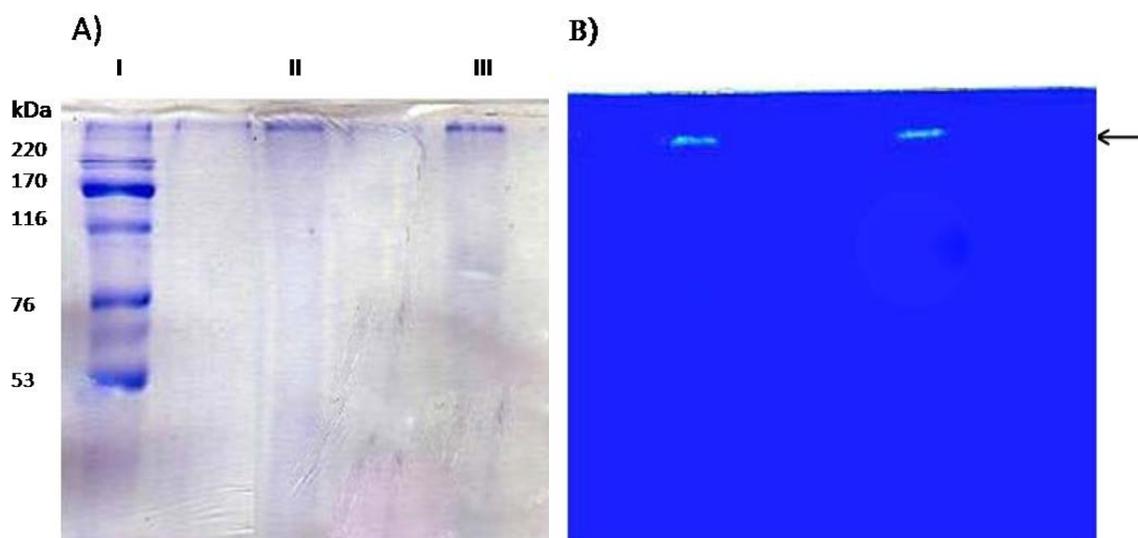


Fig. 12. Electroforesis SDS-PAGE de la proteasa purificada (A): I, marcadores de alto peso molecular; II y III: 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de la fracciones de filtración en gel; zimograma de estas mismas fracciones por duplicado a 7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (B). Los marcadores de peso molecular fueron: miosina (220 kDa), macroglobulina- $\alpha_2$  (170 kDa),  $\beta$ -galactosidasa (116kDa), transferrina (76 kDa) y deshidrogenasa glutámica (53 KDa).

Posteriormente para confirmar la pureza de la proteasa obtenida y para conocer su punto isoelectrico (pI) se realizó isoelectroenfoque en gel (IEF). La determinación del pI de la proteasa se realizó mediante una curva de calibración obtenida al graficar los pI de proteínas estándar en función de la distancia recorrida por ellas, tomando como referencia la posición del cátodo. En la figura 13 se observó una sola banda en el

gel, la cual tiene un pI de 6.1, es decir la proteína posee una carga negativa neta ya que el valor de pH del medio de 7.6 es superior a su punto isoeléctrico.

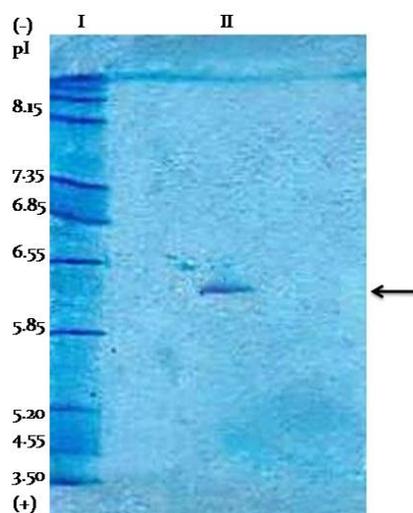


Fig. 13. Isoelectroenfoque de la proteasa purificada de *N. subtriangularis*. Línea I: Mezcla de proteínas estándar: aminoglucosidasa (pI 3.50), inhibidor de tripsina (4.55),  $\beta$ -lactoglobulina A (5.20), anhidrasa carbónica bovina (5.85), anhidrasa carbónica humana (6.55), mioglobina banda ácida (6.85), mioglobina banda básica (7.35), lectina de lenteja banda ácida (8.15), lectina de lenteja banda media (8.45), lectina de lenteja banda básica (8.65) y tripsinógeno (9.30). Línea II: Proteasa purificada, indicada con una flecha (300  $\mu$ g/mL).

Una vez realizado el isoelectroenfoque de la enzima proteolítica, se determinó su actividad específica, la cual resultó ser de 6.07 U/mg; se obtuvo un rendimiento final de 9.12% mg y la proteasa se purificó 20.8 veces, resultado similar al promedio de los valores obtenidos para las proteasas purificadas de esponja de *G. cydonium*, *V. aurea* y *S. vesparia* (10.9%) (Wilkesman y Schröder 2002; Rojas y Dolittle 2002; Arreguin *et al.* 1993). En la tabla 3 se muestra el proceso de purificación, donde se representa una unidad como la cantidad de proteína requerida para producir un incremento de 0.01 de absorbancia por minuto. Cabe señalar que todas las muestras fueron estandarizadas usando como sustrato Hide-RBB.

Tabla 3. Purificación de proteasa de *Neopetrosia subtriangularis*.

Etapa de purificación	Volumen total (mL)	Proteína total (mg)	Actividad total (U)	Actividad* específica (U/mg)	Rendimiento (%)	Purificación (veces)
1. Extracto crudo	43	453.22	132.44	0.292	100	1.0
2. Precipitación de 30% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10.6	24.69	13.57	0.55	10.23	1.9
3. Sephadex G-100	6.50	1.99	12.09	6.07	9.12	20.8

\* Los resultados fueron expresados en actividad específica como la Unidad de actividad proteolítica (U) por mg de proteína (U/mg).

La técnica que nos indicó el peso molecular de la proteasa purificada de una manera precisa fue la espectrometría de masas MALDI TOFF. Ésta mostró que el peso de la proteasa pura es de 236,417.8 kDa. Se trata de una proteasa de alto peso molecular, la mayor que se ha reportado hasta ahora para esponjas marinas, que tienen en promedio masas moleculares entre 20 y 50 kDa, siendo únicamente cercana a su peso molecular la serina proteasa purificada de *G. cydonium*, con 200 kDa aproximadamente (Wilkesman y Schröder 2002).

Los resultados obtenidos con respecto al efecto del pH en la actividad proteolítica de la proteasa de *N. subtriangularis* indican que el pH es una variable que sí afecta su actividad enzimática. Los valores de actividad son diferentes bajo los valores de pH evaluados.

Como se observa en la Fig. 14, los valores de actividad más altos hacia Hide-RBB fueron obtenidos en el intervalo de pH entre 7.0 y 8.5 (70.51%). Su valor más alto fue obtenido a pH 8.0, y la actividad de la enzima disminuye a pH 9. Al mostrar la proteasa una mayor estabilidad y actividad a valores de pH básicos, ésta sería una proteasa alcalina, similar a las proteasas alcalinas de la esponja *Callyspongia schulzi* donde estas presentan una alta actividad a valores de pH de 9 a 11 (Mebs *et al.* 1997).

En contraste, a valores de pH ácidos, sufre una pérdida considerable de su actividad proteolítica en relación con los valores de actividad a pH básico mostrados, donde disminuye su solubilidad y se precipita (anexo C).

Estos resultados reflejan lo reportado en varios estudios donde se ha descrito que las especies fundamentalmente carnívoras poseen mayores niveles de actividad de proteasas ácidas en comparación con las especies omnívoras o herbívoras (Jonas *et al.* 1983; Johnston y Freeman 2005), lo que explicaría la baja actividad a valores de pH ácidos de la mayoría de las proteasas de la esponja hasta ahora estudiadas, ya que su alimentación es mediante filtración.

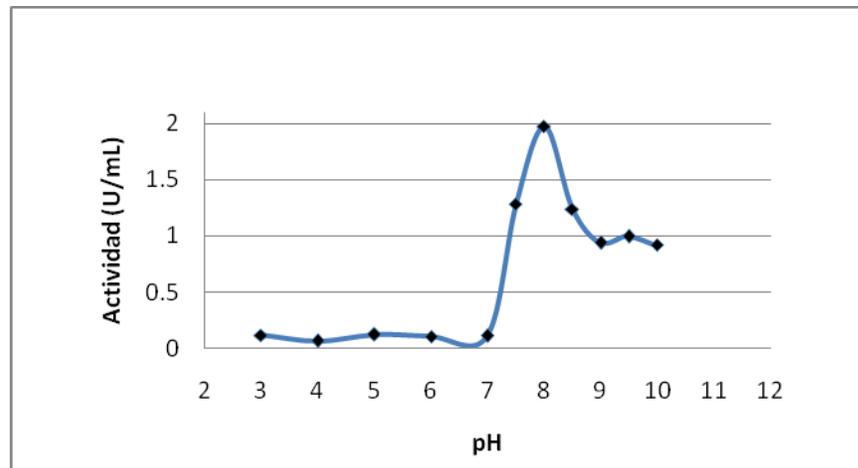


Fig. 14. Efecto del pH sobre la actividad específica de la proteasa de *N. subtriangularis* sobre Hide-RBB a pH 3-10.

La estabilidad de la actividad proteolítica a pH alcalino puede deberse a una adaptación de especies que se alimentan de forma constante (Guillaume y Choubert, 1999) y por tanto ingieren grandes cantidades de agua de mar a un pH entre 7.5 y 8.1 (Hernández-Ayón *et al.* 2007), y a que posiblemente estos organismos necesitan de sistemas de digestión alternos.

En los primeros estudios realizados en relación al sistema digestivo de esponjas se encontró que su digestión era eminentemente intracelular, y se identificó que el pH óptimo de los coanocitos es de 4.4 (Hammen y Florkin 1968). En el caso de la catepsina intracelular obtenida de los lisosomas de la esponja *Geodia cydonium* (Krasko *et al.* 1997), posee una actividad óptima a valores de pH ácido a neutro (6.5 a 7.0).

El uso de inhibidores específicos para proteasas arrojó resultados variables en la mayoría de los casos (fig. 15). No fue afectada su actividad por el inhibidor E-64, conocido inhibidor de cisteína proteasas, y las actividades residuales más bajas se presentaron con el inhibidor de serina proteasas PMSF con un 2.4% de actividad, lo que sugiere se trata de una serina proteasa. El tratamiento con agentes desnaturalizantes químicos como el TCEP, Urea y SDS mostraron una actividad residual de 12.2, 29.87 y 31.69% respectivamente (anexo C), lo cual sugiere que la enzima purificada posee uno o más puentes disulfuro que contribuyen de manera importante a su estabilidad, ya que las actividades más afectadas de las proteasas ocurrieron cuando se utilizaron los inhibidores PMSF y TCEP, al ser este último un fuerte agente reductor. Cabe mencionar que la actividad de la proteasa también fue afectada por Guanidina y DTT pero esta reducción de actividad fue menor que la observada con TCEP. La actividad de la proteasa también muestra una inhibición parcial con el inhibidor EDTA, presentando una actividad residual de 86.1% lo que podría indicar que la presencia de un ion metálico podría ser importante al ser el EDTA un agente quelante.

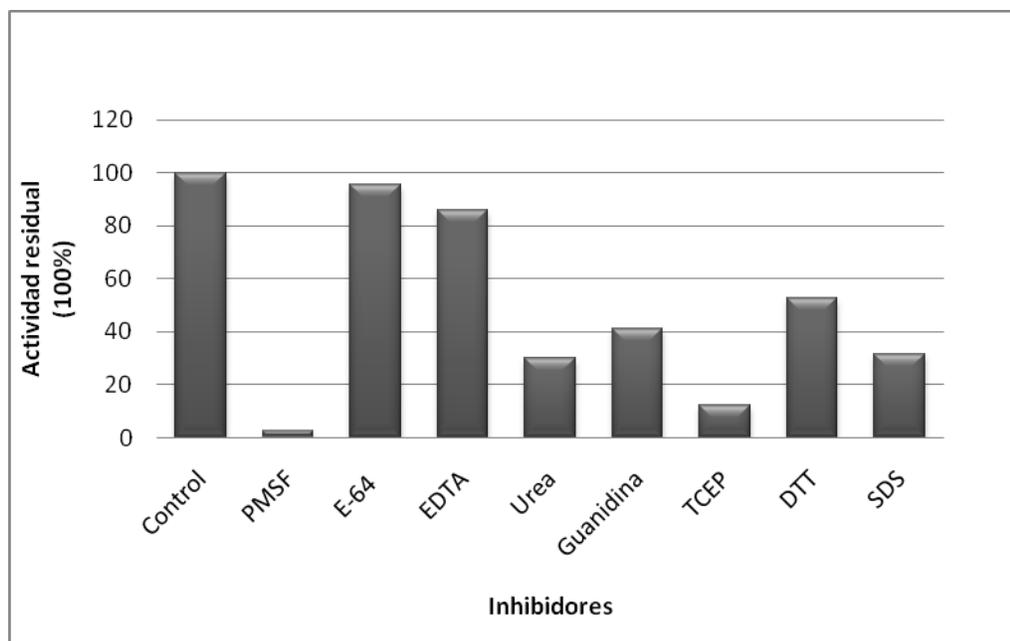


Fig. 15. Efecto de inhibidores en la actividad residual de la proteasa de *Neopetrosia subtriangularis*.

Debido a que la proteasa de *N. subtriangularis* fue altamente inhibida por el agente reductor TCEP, se puede inferir que en este caso resulta de suma importancia la presencia de puentes disulfuro en el mantenimiento de su función enzimática. Los puentes disulfuro son sintetizados principalmente en el lumen del retículo endoplásmico, y al ser el citosol un ambiente reductor, es posible que la proteasa sea una proteína extracelular ya que usualmente las tiorredoxinas reducen los puentes disulfuro en el ambiente del citoplasma, el cual compite con proteínas por equivalentes oxidantes (Sevier y Kaiser 2002). Todo esto sugiere que estos organismos presentan capacidades proteolíticas alternas a su sistema digestivo intracelular, como en el caso de las esponjas carnívoras, donde existen indicios de que pueden llevar a cabo su digestión extracelularmente (Vacelet y Duport 2004), o bien en otros procesos metabólicos de la esponja como en morfogénesis, sistema inmune o apoptosis.

Las actividades digestivas en el caso de los crustáceos varían de acuerdo a la etapa del ciclo de muda y a la ontogenia (Lemos *et al.* 1999). En invertebrados marinos

como *Penaeus monodon*, *P. japonicus*, *Litopenaeus vanamei* y *Macrobrachium rosenbergii*, se presentan serina proteasas, donde el hepatopáncreas es el órgano responsable de la síntesis de las enzimas (Tsai *et al.* 1986).

## VII. CONCLUSIONES

- Se diseñó un protocolo con el que se logró purificar de manera efectiva una proteasa de *Neopetrosia subtriangularis* en solo dos pasos, por precipitación fraccionada con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y cromatografía de filtración en gel utilizado una matriz Sephadex G-100.
- La enzima fue purificada 20.8 veces con un rendimiento de 9.12%.
- La proteasa purificada presentó un peso molecular de 236,417.8 Da por espectrometría de masas y un punto isoeléctrico de 6.1, siendo la proteasa de esponja con mayor peso molecular reportada hasta ahora.
- Presentó una sola banda en SDS-PAGE bajo condiciones reductoras lo que podría indicar que está constituido por una sola cadena polipeptídica.
- La proteasa presentó actividad sobre Hide-Remazol Brilliant Blue, BAPNA, gelatina y caseína lo cual sugiere que participa en el metabolismo de la esponja.
- La enzima presenta al menos un puente disulfuro al ser altamente inhibida por el inhibidor TCEP.
- La proteasa fue resistente a los desnaturalizantes guanidina, DTT y SDS, no afectando de manera significativa a su actividad proteolítica.
- La proteasa permaneció estable en valores de pH de 7 a 9 mostrando su actividad más alta a pH 8, lo que indica que es una proteasa alcalina,

mientras que a valores de pH ácidos (3 a 7) mostró una baja actividad proteolítica.

- La enzima purificada es semejante a las serina proteasas al ser altamente inhibida por PMSF y es sensible a la presencia de metales al haber sido parcialmente inhibida por EDTA, lo cual indica que un ion metálico podría participar en su actividad proteolítica.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

Arreguín, R., Arreguín, B., Soriano, M., Hernández, A., Rodríguez, A. 1993. Isolation and characterization of a protease from the marine sponge *Sphaciospongia vesparia*. *FEBS Lett.* 320: 235–238.

Arreguín, R., Arreguín, B., Hernández, A., Rodríguez, A. 1995. Metal content and conformation of the metalloprotease from the marine sponge *Sphaciospongia vesparia*. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 36(4): 827–833.

Barrett, A.J. 1994. Classification of peptidases. *Methods Enzymol.* 24: 1–15.

Barret, A.J. 2001. *Proteases*. Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons, Ltd.

Batel, R., Bihari, N., Rinkevich, B., Dapper, J., Schäcke, H., Schröder, H.C., Müller, W.E.G. 1993. Modulation of organotin-induced apoptosis by the water pollutant methyl mercury in a human lymphoblastoid tumor cell line and a marine sponge. *Mar. Ecol.* 93: 245– 251.

Bennet, C.F., Mong S., Clark M.A., Kruse L.J., Crooke S.T. 1987. Differential effects of manoalide on secreted intracellular phospholipases. *Biochem. Pharmacol.* 36: 2079–2086.

Bergmann, W., Feeney, R.J. 1950. The isolation of a new thymine pentoside from sponges. *J. Am. Chem. Soc.* 72: 2809–2810.

Bergmann, W., Feeney, R.J. 1951. Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges. *J. Org. Chem.* 16: 981–987.

Bergquist, P.R. 1978. *Sponges*. Hutchinson & Co. Publ. U.S.A.

Bergquist, P.R. 2001. *Porifera*. Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons, Ltd.

Bhakdi, S., Mackman, N., Nicaud, J.M., Holland, I.B. 1986. *Escherichia coli* hemolysin may damage target cell membranes by generating transmembrane pores. *Infect. Immun.* 52: 63–69.

Blumbach, B., Diehl-Seifert, B., Seack, J., Steffen, R., Müller, I.M., Müller, W.E.G. 1999. Cloning and expression of new receptors belonging to the immunoglobulin superfamily from the marine sponge *Geodia cydonium*. *Immunogenetics* 49:751-763.

Brusca, R.C., Brusca G. J. 2003. *Invertebrates*. Sinauer Assoc. Inc. Publ. U.S.A.

Campbell, M.K., Farrell, S.O. 2004. *Bioquímica*. International Thomson Editores. México.

Ceccaldi, H.J. 1997. Anatomy and physiology of the digestive system. *Crustacean Nutrition Advances in World Aquaculture*. Vol. 6 The World Aquaculture Society, Louisiana, USA, 261-291.

Charpin, F. 2013. Florent's Guide To The Tropical Reefs. [<http://reefguide.org/>]. Consulta: 28/01/2013.

Coulson, F.R., O'Donnell, S.R. 2000. The effects of contignasterol (IZP-94,005) on allergen-induced plasma protein exudation in the tracheobronchial airways of sensitized guinea-pigs in vivo. *Inflamm. Res.* 49: 123-127.

Curtis, H., Barnes N.S. 2004. *Biología*. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.

Devlin, T. M. 2000. *Bioquímica: Libro de Texto con Aplicaciones Clínicas*. Editorial Reverté. Barcelona.

Dodson, G., Wlodawr, A. 1998. Catalytic triads and their relatives. *Trends Biochem. Sci.* 23: 347-352.

Erlanger, B.F., Kokowski, N., Cohen, W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95: 271- 278.

Exposito, J.Y., Garrone, R. 1990. Characterization of a fibrillar collagen gen in sponges reveals the early evolutionary appearance of two collagen families. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 6669-6673.

Faulkner, D.J. 2000. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 17: 7-55.

Gómez, P., Green G. 1984. Sistemática de las esponjas de Puerto Morelos, Quintana Roo, México. *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología*. UNAM. 11: 65-90.

González, E. 2009. Variación intraespecífica en la composición isotópica y elemental de especímenes de *Xestospongia subtriangularis* perteneciente al Sistema Arrecifal Veracruzano (SAV). Tesis de maestría en ciencias del mar y limnología. UNAM.

Grebenjuk, V.A., Kuusksalu, A., Kelve, M., Schütze, J., C. Schröder, H.C., Müller, W.E.G. 2002. Induction of (2'-5') oligoadenylate synthetase in the marine sponges *Suberites domuncula* and *Geodia cydonium* by the bacterial endotoxin lipopolysaccharide. *Eur. J. Biochem.* 269: 1382-1392.

Green, G. 1977. Sinopsis taxonómica de trece especies de esponjas del arrecife La Blanquilla, Veracruz, México. *Anales del Centro de Ciencias del Mar y Limnología*. UNAM. 4: 79-98.

Green, G., Fuentes-Velazquez L.E., P. Gómez-López. 1986. Nuevos registros de Porifera del arrecife La Blanquilla, Veracruz, México. *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología*. UNAM. 13: 127-146.

Guillaume, J., Choubert, G. 1999. Physiologie digestive et digestibilité des nutriments chez les poissons. *Nutrition et Alimentation des Poissons et Crustacés*. INRA-IFREMER. Versailles, Francia.

Gundacker, D., Leys S.P., Schröder H.C., Muller I.M., Muller W.E. 2001. Isolation and cloning of a C-type lectin from the hexactinellid sponge *Aphrocallistes vastus*: a putative aggregation factor. *Glycobiology* 11: 21-29.

Hammen, C.S., Florin, M. 1968. Chemical composition and intermediary metabolism—Porifera. *Chemical Zoology*. New York: Academic Press, vol II: 53-64.

Hedstrom, L. 2002. Serine Protease Mechanism and Specificity. *Chem. Rev.* 102: 4501-4523.

Hernández-Ayón, J.M., Zirino-Weiss, A., Delgadillo-Hinojosa, F., Galindo-Bect, S. 2007. *Carbono en ecosistemas acuáticos de México*. INECOL. México.

Hirata, Y., Uemura, D. 1986. Halichondrins-antitumor polyether macrolides from a marine sponge. *Pure Appl. Chem.* 58: 701-710.

International Union of Biochemistry and Molecular Biology. *Enzyme Nomenclature 1992*. Academic Press, Inc. Orlando, Florida.

Johnston, D., Freeman, J. 2005. Dietary Preference and Digestive Enzyme Activities as Indicators of Trophic Resource Utilization by Six Species of Crab. *Biol. Bull.* 208: 36-46.

Jonas, E., Ragyanski, M., Olah, J., Borros, L. 1983. Proteolytic digestive enzymes of carnivorous (*Silurus glanis*, L.), herbivorous (*Hypophthalmichthys molitrix*) and omnivorous (*Cyprinus carpio*, L.) fishes. *Aquacul.* 30: 145-154.

Khan, A.R., James M.N.G. 1998. Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein Sci.* 7: 815-836.

Kikuchi, A., Nieda, M., Schmidt, C., Koezuka, Y., Ishihara, S., Ishikawa, Y., Tadokoro, K., Durrant, S., Boyd, A., Juji, .T, Nicol, A. 2001 In vitro anti-tumour activity of  $\alpha$  galactosylceramide-stimulated human invariant V $\alpha$ 24+NKT cells against melanoma. *Br. J. Cancer.* 85: 741-746.

Krasko, A., Gamulin, V., Seack, J., Steffen, R., Schröder, H.C., Müller W.E. 1997. Cathepsin, a major protease of the marine sponge *Geodia cydonium*: purification of the enzyme and molecular cloning of cDNA. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 6: 296-307.

Labat-Robert, J., Robert, L., Auger, C., Lethias, C., Garrone, R. 1981. Fibronectin-like protein in Porifera: its role in cell aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78:6261-6265.

Laemmli, U.K. 1970 Cleavage of structural proteins during assembly of the bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lantz, M.S., Ciborowski, P. 1994. Zymographic techniques for detection and characterization of microbiological proteases. *Methods Enzymol.* 235: 563-594.

Lemos, D., Hernández-Cortés, M.P., Navarrete, A., García-Carreño, F.L., Phan, V.N. 1999. Ontogenetic variation in digestive proteinase activity of larvae and

postlarvae of the pink shrimp *Farfantapenaeus paulensis* (Crustacea): Decapoda: Penaeidae). *Mar. Biol.* 135: 653-662.

Leys, S.P., Rohksar D.S., Degnan B.M. 2005. Sponges. *Curr. Biol.* 22; 15: 114-115.

Luthringer, B., Isbert S., Müller, W.E.G., Zilberberg, C., Thakur, N.L., Wörheide, G., Stauber R.H., Kelve, M., Wiens, M. 2011. Poriferan survivin exhibits a conserved regulatory role in the interconnected pathways of cell cycle and apoptosis. *Cell Death Differ.* 18: 201-213.

Mangel, A., Leitão, J.M., Batel, R., Zimmermann, H., Müller, W.E., Schröder, H.C. 1992. Purification and characterization of a pore-forming protein from the marine sponge *Tethya lyncurium*. *Eur. J. Biochem.* 210: 499-507.

Mebs, D., Benesch, S., König, B., Yamakawa, Y., Omori-Satoh, T. 1997. A protease from the marine sponge *Callyspongia schulzi*. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 42: 789-797.

Müller, W.E.G., Blumbach, B., Müller, I.M. 1999. Evolution of the innate and adaptive immune systems: Relationships between potential immune molecules in the lowest metazoan phylum [Porifera] and those in vertebrates. *Transplantation* 68: 1215-1227.

Müller, W.E.G., Krasko, A., Le Pennec, G., Schröder, H.C. 2003. Biochemistry and cell biology of silica formation in sponges. *Microsc. Res. Tech.* 62: 368-377.

Müller, W.E.G., Boreiko, A., Wang, X., Belikov, S.I., Wiens, M., Grebenjuk, V.A., Schloßmacher, U., Schröder, H.C. 2007. Silicateins, the major biosilica forming enzymes present in demosponges: Protein analysis and phylogenetic relationship. *Gene* 395: 62-71.

Mykles, D.L. 1998. Intracellular proteinases of invertebrates: calcium-dependent and proteasome/ubiquitin-dependent systems. *Int. Rev. Cytol.* 184: 157-289.

Nakamura, M., Kakuda, T., Qui, J., Hirata, M., Shintani, T., Yoshioka, Y., Okamoto, T., Oba, Y., Nakamura, H., Ojika, M., 2005. Novel relationship between cytotoxicity of marine-derived metabolite Xestoquinone and its family. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69: 1749-1752.

Pancer, Z., Münkner, J., Müller, I., Müller, W.E.G. 1997. A novel member of an ancient superfamily: sponge (*Geodia cydonium*, Porifera) putative protein that features scavenger receptor cysteine-rich repeats. *Gene* 193: 211-218.

Pechenik J.A. 2000. *Biology of invertebrates*. McGraw-Hill. U.S.A.

Perović-Ottstadt, S., Adell, T., Proksch, P., Wiens, M., Korzhev, M., Gamulin, V., Müller, I.M., Müller, W.E.G. 2004. A (1->3)-beta-D-glucan recognition protein from the sponge *Suberites domuncula*. Mediated activation of fibrinogen-like protein and epidermal growth factor gene expression. *Eur. J. Biochem.* 271: 1924-1937.

Pfeifer, K., Haaseman, M., Ugarkovic, D., Bretting, H., Fahrenholz, F., Müller, W.E.G. 1993. S-type lectins occurs also in invertebrates: unusual subunit composition and high conservation of the carbohydrate recognition domain in the lectin genes from the marine sponge *Geodia cydonium*. *Glycobiol.* 3: 179-184.

Proksch, P., Edrada, R.A., Ebel, R. 2002. Drugs from the seas – current status and microbiological implications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 125-134.

Rathmell, J.C., Thompson C.B. 1999. The central effectors of cell death in the immune system. *Annual Rev. of Immunol.* 17: 781-828.

Rinderknecht, H., Geokas, M.C., Silverman, P., Haverback, B.J. 1968. A new ultrasensitive method for the determination of proteolytic activity. *Clin. Chim. Acta.* 21: 197-203.

Rojas, A., Doolittle, R.F. 2002. The occurrence of type S1A serine proteases in sponge and jellyfish. *J. Mol. Evol.* 55: 790-794.

Rudi, A., Kashman, Y., Benayahu, Y., Schleyer, M. 1994. Amino acid derivatives from the marine sponge *Jaspis digonoxea*. *J. Nat. Prod.* 57: 829-832.

Ruppert, E.E., Fox, R.S., and Barnes, R.D. 2004. *Invertebrate Zoology*. Brooks/Cole. Belmont, CA.

Schäcke, H., Schröder, H.C., Gamulin, V., Rinkevich, B., Müller, I.M., Müller, W.E.G. 1994. Molecular cloning of a tyrosine kinase gene from the marine sponge *Geodia cydonium*: a new member belonging to the receptor tyrosine kinase class II family. *Mol. Memb. Biol.* 11: 101-107.

Schröder, H.C., Krasko, A., Le Pennec, G., Adell, T., Wiens, M., Hassanein, H., Müller, I.M., Müller, W.E.G. 2003. Silicase, an enzyme which degrades biogenous amorphous silica: contribution to the metabolism of silica deposition in the demosponge *Suberites domuncula*. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 33: 250–268.

Schütze, J., Krasko, A., Diehl-Seifert, B., Müller, W.E.G. 2001. Cloning and expression of the putative aggregation factor from the marine sponge *Geodia cydonium*. *J. Cell Sci.* 114: 3189-3198.

Sevier C.S., Kaiser C.A. 2002. Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3: 836-847.

Shimizu, K., Cha, J., Stucky, G.D., Morse, D.E. 1998. Silicatein  $\alpha$ : Cathepsin L-like protein in sponge biosilica. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 6234-6238.

Sipkema, D., Franssen, M.C.R., Osinga, R., Tramper, J., Wijffels, R.H. 2005. Marine Sponges as Pharmacy. *Mar. Biotechnol.* 7: 142-162.

Soest, R.W.M. van., Stentoft, N. 1988. Barbados deep-water sponges. *Studies on the fauna of Curacao and other Caribbean island.* 70: 1-175.

Syed, R., Rani, R., Sabeena, Massodi, T.A., Shafi, G., Alharbi, K. 2012. Functional analysis and structure determination of alkaline protease from *Aspergillus flavus*. *Bioinformation* 8: 175-180.

Thakur, N.L., Hentschel, U., Krasko, A., Pabel, C.T., Anil, A.C., Müller, W.E.G. 2003. Antibacterial activity of the sponge *Suberites domuncula* and its primmorphs: potential basis for epibacterial chemical defense. *Aquat. Microb. Ecol.* 31: 77–83.

Tsai, I.H., Chuang, K.L., Chuang, J.L., 1986. Chymotrypsins in digestive tracts of crustacean decapods (shrimps). *Comp. Biochem. Physiol.* 85B: 235-239.

University of Aberdeen. 2013. The Zoology Museum [<http://www.abdn.ac.uk/>]. Consulta: 05/02/2013.

Vacelet, J., Duport, E. 2004. Prey capture and digestion in the carnivorous sponge *Asbestopluma hypogea* (Porifera: Demospongiae). *Zoomorphology* 123: 179–190.

Vázquez, L.E. 1998. Estudio químico-biológico de la esponja marina *Xestospongia subtriangularis*. Tesis de maestría en Ciencias del Mar. UNAM.

Wagner, C., Steffen, R., Koziol, C., Batel, R., Lacorn, M., Steinhart, H., Simat, T., Müller, W.E.G. 1998. Apoptosis in marine sponges: A biomarker for environmental stress (cadmium and bacteria). *Mar. Biol.* 131: 411–421.

Wiens, M., Kuusksalu, A., Kelve, M., Müller, W.E.G. 1999. Origin of the interferon-inducible (2'- 5') oligoadenylate synthetases: cloning of the (2' - 5') oligoadenylate synthetase from the marine sponge *Geodia cydonium*. *FEBS Lett.* 462: 12–18.

Wiens, M., Luckas, B., Brümmer, F., Ammar, M.S.A., Steffen, R., Batel, R., Diehl-Seifert, B., Schröder, H.C., Müller, W.E.G. 2002. Okadaic acid: a potential defense molecule for the sponge *Suberites domuncula*. *Mar. Biol.* 142: 213–223.

Wiens, M., Krasko, A., Perovic, S., Müller, W.E.G. 2003. Caspase mediated apoptosis in sponges: cloning and function of the phylogenetic oldest apoptotic proteases from Metazoa. *Biochim. Biophys. Acta.* 1593: 179–189.

Wiens, M., Korzhev, M., Krasko, A., Thakur, N.L., Perović-Ottstadt, S., Breter, H.J., Ushijima, H., Diehl-Seifert, B., Müller, I.M., Müller, W.E.G. 2005. Innate immune defense of the sponge *Suberites domuncula* against bacteria involves a MyD88-dependent signalling pathway. Induction of a perforin-like molecule. *J. Biol. Chem.* 280: 7949–7959.

Wiens, M., Korzhev, M., Perović-Ottstadt, S., Luthringer, B., Brandt, D., Klein, S., Müller, W.E.G. 2007. Toll-like receptors are part of the innate immune defense system of sponges (Demospongiae: Porifera). *Mol. Biol. Evol.* 24: 792–804.

Wilkesman, J.G., Schröder H.C. 2002. Heat-stable protease from the marine sponge *Geodia cydonium*. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 48: 379–383.

Wilkesman, J.G., Schröder H.C. 2007. Analysis of serine proteases from marine sponges by 2-D zymography. *Electrophoresis* 28: 429–436.

Williamson, T. Bramlett, B. 2013. Silverscience47.  
[[http://silverscience47.wikispaces.com/Xestospongia+muta+\(Barrel+Sponges\)](http://silverscience47.wikispaces.com/Xestospongia+muta+(Barrel+Sponges))].  
Consulta: 07/02/2013.

## IX. ANEXOS

### ANEXO A

**Soluciones para electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras y para zimogramas.**

1. Solución concentradora

Tris-HCl 125 mM; pH 6.8

SDS 0.1 %

2. Solución separadora

Tris-HCl 375 mM; pH 8.3

SDS 0.1% 20 mL

3. Amortiguador de corrida

Tris 25 mM; pH 8.3

Glicina 250 mM

SDS 1%

pH 8.3

4. Amortiguador de carga

Tris-HCl 50 mM; pH 6.8

SDS 2%

Glicerol 10%

$\beta$ -Mercaptoetanol 1%

EDTA 12.5 mM

Azul de Bromofenol 0.02%

5. Solución teñidora

Azul de Coomasie R-250 0.025%

Metanol 40%

Ácido acético 7%

6. Solución desteñidora

Metanol 30%

Ácido acético 10%

## ANEXO B

### Purificación de fracciones precipitadas mediante $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

	Proteína total (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Purificación (veces)
Extracto crudo	453.2	132.44	0.292	1.0
0-30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	24.69	13.82	0.56	1.9
30-60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	90.28	35.21	0.39	1.3
60-100% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.52	0.091	0.06	0.20

## ANEXO C

### EFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA PROTEASA DE *Neopetrosia subtriangularis*.

pH	Actividad residual (%)
3	0.12
4	0.07
5	0.12
6	0.11
7	0.11
7.5	1.3
8	1.98
8.5	1.24
9	0.94
9.5	0.99
10	0.92

## ANEXO D

### INHIBIDORES DE PROTEASAS EMPLEADOS Y SU ACTIVIDAD RESIDUAL

Inhibidores	Concentración	Actividad residual (%)
PMSF	1mM	2.4
E-64	10 $\mu$ M	95.3
EDTA	5 mM	86.1
1-10 Fenantrolina	10 mM	72.4
Urea	8 M	29.87
Guanidina	4 M	40.98
TCEP	20 mM	12.2
DTT	20 mM	52.82
SDS	6%	31.69

## X. ABREVIATURAS

ABS	Absorbancia
BAEE	N <sub>α</sub> -benzoil-L-arginina etil éster
BAPNA	N <sub>α</sub> -Benzoil-L-Arginina 4 nitroanilida
BSA	Albúmina sérica bovina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
cm	Centímetros
DD	Death Domain
DTT	Ditiotreitol
E-64	N-(trans-Epoxisuccinil)-L-leucina 4-guanidinobutilamida
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramos
h	Hora(s)
HPLA	Hipuril-L-fenilalanina
IEF	Isoelectroenfoque
Ig	Inmunoglobulina
kDa	KiloDaltons
km	Kilómetros
L	Litros
LPS	Lipopolisacáridos
m	Metros
M	Molar

MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Militros
mM	Milimolar
NC-IUBMB	Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular
nm	nanómetros
PES	Polietersulfona
pI	Punto isoeléctrico
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
RBB	Remazol Brilliant Blue
RNA	Ácido ribonucleico
RTK	Receptores de tirosina cinasa
SAV	Sistema Arrecifal Veracruzano
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis Dodecilsulfato de sodio
TCEP	Tris (2-carboxietil) fosfina
TIR	Receptor Toll/IL-1
Tris	Tris(hidroximetil) aminometano
U	Unidad de actividad proteolítica
μM	Micromolar
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
V	Volt

## 10.1 ABREVIATURAS DE AMINOÁCIDOS

Aminoácidos	Código a tres letras	Código a una letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutámico	Glu	E
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T