



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE UNA NUEVA METALO PROTEASA EN LA
PARED CORPORAL DEL PEPINO DE MAR *Holothuria inornata* SEMPER, 1868.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
**MAESTRO EN CIENCIAS
(QUÍMICA ACUÁTICA)**

PRESENTA:

ALAN GERARDO HERNÁNDEZ MELGAR

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. ROBERTO A. ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

Dra. ALEJANDRA HERNÁNDEZ SANTOYO
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

Dr. ALEXEI F. LICEA NAVARRO
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA, CICESE

Dr. JOSÉ ESTUARDO LÓPEZ VERA
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM

Dra. NURIA SÁNCHEZ PUIG
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR EXTERNO:

Dr. SERGIO AGUSTIN ROMÁN GONZÁLEZ
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

CD . MX., JULIO 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE UNA NUEVA METALO PROTEASA EN LA PARED CORPORAL DEL PEPINO DE MAR *Holothuria inornata* SEMPER, 1868.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
**MAESTRO EN CIENCIAS
(QUÍMICA ACUÁTICA)**

PRESENTA:

ALAN GERARDO HERNÁNDEZ MELGAR

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. ROBERTO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

Dra. ALEJANDRA HERNÁNDEZ SANTOYO
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

Dr. ALEXEI F. LICEA NAVARRO
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA, CICESE

Dr. JOSÉ ESTUARDO LÓPEZ VERA
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM

Dra. NURIA SÁNCHEZ PUIG
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR EXTERNO:

Dr. SERGIO AGUSTIN ROMÁN GONZÁLEZ
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

MÉXICO, CD. MX., JULIO 2019



El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Química de Biomacromoléculas 2 del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) bajo la dirección del Dr. Roberto A. Arreguín Espinosa de los Monteros investigador Nivel III del Sistema Nacional de Investigadores (SNI).

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultad de Química que me formó.

Al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología por confiar en mí y darme la oportunidad de continuar mis estudios.

Al Instituto de Química por prestarme sus instalaciones para desarrollar mi trabajo.

A el apreciable apoyo de los miembros de mi comité la Dra. Nuria Sánchez Puig, el Dr. José Estuardo López Vera, a la Dra. Alejandra Hernández Santoyo, al Dr. Alexei F. Licea Navarro y al Dr. Sergio Agustín Román González por tomarse el tiempo de revisar continuamente mi trabajo, así como sus comentarios, asesorías y consejos para desarrollar esta tesis.

Al Dr. Roberto Alejandro Arreguín Espinosa de los Monteros por su paciencia y apoyo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada con número: 464806.

Al CICESE, en particular al Dr. Aldo Moreno Ulloa y al M. C. Fernando Díaz por permitirme llevar a cabo la identificación de la proteína aislada.

A los compañeros del laboratorio al M.C. Ulises Hernández Guzmán, al Q.F.B. Francisco Miguel García Guerrero y Guerrero, al M.C. Esteban López Sampedro, al cDr. Miguel Cuevas Cruz, al M.C. Noé Salgado Ortiz, M.C. María Vanegas Reza, Dra. Magaly Honey Escandón, al B. Jorge Augusto Osorio Kuan, al Dr. Fernando Lazcano Pérez, al B.M. Noel Fabián Hernández y finalmente pero no menos importante a la B.M. Martha Mayela Manzano Mora por su apoyo, paciencia y sobre todo amistad; con muchos compartí momentos de alegría y de roces que afortunadamente logramos superar y que me dejaron una gran enseñanza. Sin su apoyo mucho de esto no hubiera sido posible.

Dedicatorias

Este trabajo va dedicado a mis padres, Mercedes Ivett Melgar Uresty y Juan Gerardo Hernández Parra, por soportarme, por su tolerancia y la crianza. Este trabajo es una pequeña manera de reeditarles todo lo que dan por mí, sin ustedes no sería lo que soy.

A mis abuelas María Eugenia Parra y Mercedes Uresty Daniel por seguir conmigo a lo largo de estos años y siempre apoyarme, espero este trabajo las llene de orgullo.

A mi tío Ivan Hernandez Parra por que el también fue participe en mi formación.

Finalmente un gran agradecimiento a todas las personas que estuvieron ahí conmigo a pesar de que muy probablemente ya no tenemos contacto mucho de lo que hicieron por mí lo llevaré siempre en mi mente y mi agradecimiento será eterno para ustedes.

Tabla de contenido

Índice de Figuras	c
Índice de Gráficos	c
Índice de Tablas	d
Abreviaturas	1
Resumen	3
Abstract	4
I. Introducción	5
II. Marco Teórico	9
1. Enzimas	9
1.1 Clasificación de las enzimas.....	9
1.1.1 Proteasas.....	10
1.1.1.1 Metaloproteasas.....	11
2. Filo Echinodermata	14
3. Clase Holotheroidea	14
4. Proteasas identificadas en la Clase Holotheroidea	15
5. <i>Holothuria (Halodeima) inornata</i> Semper 1868	17
III. Hipótesis	18
IV. Objetivos	18
V. Materiales y métodos	19
1. Sitio de estudio	19
2. Especie de estudio	19
3. Obtención del extracto a partir de los tejidos	20
4. Cuantificación de proteínas por BCA	20
5. Determinación del peso molecular mediante la técnica de Electroforesis Desnaturalizante SDS-PAGE	20
6. Detección de la actividad proteolítica mediante Zimografía	21
7. Precipitación con sulfato de amonio	21
8. Diálisis de las muestras	22
9. Purificación mediante el empleo de una matriz de afinidad	22
10. Determinación de la actividad proteolítica mediante el kit EnzCheck® Protease Assay, Green fluorescence	¡Error! Marcador no definido.
11. Determinación de la actividad proteolítica mediante el ensayo reportado por Buroker-Kilgore & Wang (1993)	23
12. Espectrometría de Masas en Tándem	24

VI.	<i>Resultados y Discusión</i>	25
1.	Precipitación de proteínas con Sulfato de Amonio ((NH ₄) ₂ SO ₄) y análisis electroforético	25
2.	Efecto de los iones sobre la actividad proteolítica	26
3.	Cromatografía de afinidad por metales inmovilizados	27
4.	Espectrometría de masas en Tándem	31
VII.	<i>Conclusiones</i>	35
VIII.	<i>Referencias</i>	37
A.	<i>Anexo 1, resultados ProteinPilot</i>	44
B.	<i>Anexo 2 Metodología detallada</i>	49
	SDS-PAGE	49
	Zimografía	50
	Precipitación de proteínas con sulfato de amonio	52
	Purificación de metaloproteasas mediante el microcompuesto Bentonita-Acrilamida-Cisteína	53
C.	<i>Anexo 3 Soluciones</i>	57

Índice de Figuras

Figura 1. Mecanismo de acción de una enzima (Tomado y modificado de Mathews & et al.,2002).	9
Figura 2. Representación del sitio catalítico con los tres residuo de histidina de unión al cation divalente de zinc.	11
Figura 3. Diagrama tridimensional del proMMP-2 humano y el complejo TIMP-2. El pro-dominio se muestra en verde, el dominio catalítico en rojo, los dominios de fibronectina tipo II en azul, el dominio de hemopexina en naranja y el TIMP-2 en rosa. El ión de cinc está como una esfera color verde, el ión de calcio como una esfera azul y los enlaces disulfuro en amarillo (Modificado de Murphy and Nagase 2009).	12
Figura 4. Clasificación estructural de las MMPs según la organización de su dominio. (Modificada de Fanjul-Fernández et al., 2010).	13
Figura 5 <i>Holothuria (Halodeima) inornata</i> Semper, 1868 o pepino de mar arenoso; en inglés “Red Sea Cucumber”. (Solís-Marín et al. 2013).	17
Figura 6 Mapa de Isla La Roqueta frente a las costas de Guerrero donde se colectaron los organismos de estudio.	19
Figura 7. Análisis electroforético de cada fraccionamiento obtenido con SA, la P indica que es de la pared corporal y el número inmediato el porcentaje de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ empleado para su obtención. a) SDS-PAGE al 10% de las fracciones. b) Zimograma al 10% copolimerizado con caseína. c) Zimograma al 10% copolimerizado con gelatina.	25
Figura 8. Representación de la interacción entre la cisteína y el catión divalente de zinc de una metaloproteasa.	27
Figura 9. Fotografía de SEM de la bentonita.	28
Figura 10. Fotografías de SEM del microcompuesto BAC (Bentonita-acrilamida-cisteína).	28
Figura 11. SDS-PAGE de proteína parcialmente purificada por cromatografía de afinidad de la pared corporal de <i>H. inornata</i> . 1. Marcador de masa molecular; 2. Desorción con 0.75 M de NaCl; 3. Desorción con 0.25 M de NaCl.	29
Figura 12. Zimograma y gráfica de actividad de las desorciones obtenidas de la “unión” proteínas del extracto de viscera al microcompuesto bentonita-acrilamida-cisteína. A. Zimograma copolimerizado con caseína de los lavados, (A) Desorción con 0,25 M de NaCl. 2. Desorción con NaCl 0,75 M. 3. Desorción con NaCl 1M. (B) Actividad hidrolítica de los lavados utilizando el ensayo reportado por Buroker-Kilgore & Wang.	30
Figura 13. Topografía de las ADAM's y MMP's relacionadas. Se muestran las estructuras de dominio generalizadas de las familias ADAM, SVMP, ADAM-TS y MMP. Se debe tener en cuenta que los miembros de la familia ADAM-TS tienen un número variable de motivos similares a la trombospondina (TS). La MMP que se muestra es de la clase de las gelatinasas. Otras subclases de MMP's carecen de secuencias tipo hemopexina y/o secuencias tipo fibronectina tipo II. La subclase de MT-MMPs tiene dominios transmembrana y colas citoplásmicas además de los dominios mostrados (Tomado de Seals and Courtneidge 2003).	33
Figura 14. Absorbancia a 595 nm contra la concentración de proteína	55
Figura 15. Absorbancia a 595 nm contra la concentración de proteína entre 0 y 0,1 mg/mL.	55
Figura 16. Caseína hidrolizada por la tripsina.	56

Índice de Gráficos

Gráfico 1. Resultados obtenidos de la búsqueda de artículos científicos que contienen las palabras claves “marine enzymes” de 1934 a 2019 en SCOPUS (https://www.scopus.com/); suman un total de 14872 resultados. Datos obtenidos el 20 de febrero de 2019.	8
Gráfico 2. Distribución de la venta de enzimas (Singh et al. 2016; Mala et al. 1998).	10
Gráfico 3 Efecto de algunos cationes divalentes sobre la actividad proteolítica del extracto total precipitado al 40% de saturación con SA.	26
Gráfico 4. Concentración de proteína promedio para cada lavado del BAC.	29

Índice de Tablas

<i>Tabla 1. Productos naturales o derivados obtenidos de organismos marinos y que se han utilizado como agentes terapéuticos (Tomado y modificado de Armstrong et al. 2013 en Marine Enzymes for Biocatalysis).</i>	6
<i>Tabla 2. Clasificación internacional de las enzimas.</i>	9
<i>Tabla 3. Proteínas detectadas por el software respecto a la base de datos de metalo proteasas.</i>	31
<i>Tabla 4. Secuencias identificadas al 99% de confianza con base en su espectro de fragmentación.</i>	32
<i>Tabla 5. Péptidos identificados respecto a la base de datos de equinodermos.</i>	33
<i>Tabla 6. Alineamiento de los péptidos identificados utilizando la herramienta BLAST del NCBI, filtrando los resultados solo para el phylum Echinodermata.</i>	33
<i>Tabla 7 Proteínas detectadas por grupo.</i>	44
<i>Tabla 8 Péptidos identificados en la muestra con base en su espectro y que podrían aparecer en la secuencia de la proteína candidato.</i>	45
<i>Tabla 9 Cobertura de la secuencia de la proteína candidato.</i>	45
<i>Tabla 10 Proteínas detectadas por grupo.</i>	46
<i>Tabla 11 Péptidos identificados en la muestra con base en su espectro y que podrían aparecer en la secuencia de la proteína candidato.</i>	46
<i>Tabla 12 Cobertura de la secuencia de la proteína candidato.</i>	46
<i>Tabla 13 Proteínas detectadas por grupo.</i>	46
<i>Tabla 14 Péptidos identificados en la muestra con base en su espectro y que podrían aparecer en la secuencia de la proteína candidato.</i>	47
<i>Tabla 15 Cobertura de la secuencia de la proteína candidato.</i>	47
<i>Tabla 16 Resultado del alineamiento de las secuencias identificadas con base en la herramienta BLAST.</i>	48
<i>Tabla 17. Concentración de caseína y absorbancia correspondiente para determinar el rango de respuesta lineal.</i>	54

Abreviaturas

a.C	Antes de Cristo
ADAM	A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs
ADAM-TS	A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs with Thrombospondin-like
ADN	Acido Desoxiribonucleico
ATP	Adenosín Trifosfato
BAC	Bentonita-Acrilamida-Cisteína
BCA	Bicinchoninic Acid Assay
BD	Bidestilada
BODIPY	Boron-Dipyrromethene
Co ²⁺	Ion Divalente De Cobalto
Cu ¹⁺	Ion monovalente de cobre
Cu ²⁺	Ion Divalente De Cobre
Da	Dalton. Unidad de medida de masa molecular
ΔA_{595}	Diferencia de Absorbancia a una longitud de onda de 595 nm
ECM	Extracelullar Matrix
°C	Grados Celsius
g	Gramos
GMP	Gelatinolytic Metalloproteinase
h	Horas
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IMAC	Innmobilized Metal Affinity Chromatography
kDa	Kilo Dalton. 10 ³ Dalton
kg	kilogramo
kg/m ²	Kilogramo por metro cuadrado
L	Litro
m	metros
M	Molar. Unidad de medida de concentración
μ L	Micro Litro. 10 ⁻⁶ litro
m/v	Masa por volúmen
m/z	Relación masa carga
mg/mL	Miligramo por mililitro
Mg ²⁺	Ion divalente de Magnesio
μ L/min	Microlitro por minuto
mL	Mililitro. 10 ⁻³ litro
mm	Milimetro. 10 ⁻³ metro

mM	Milimolar. 10^{-3} Molar
MMP	Matrix Metalloproteinase
MS/MS	Mass Spectometry/Mass Spectometry
MS2	Mass Spectometry second level
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nano metro. 10^{-9} metro
pH	Potencial de hidrógeno.
SA	Sulfato de Amonio
SCUBA	Self-Contained Underwater Breathing Apparatus
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SEM	Scanning Electron Microscope
SVMP	Snake Venom Metalloprotease
<i>sp.</i>	Especie
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TOF	Time of Flight
Tris-HCl	Tris Hydrochloride
UNDP	United Nations Development Programme
UV-Vis	Ultravioleta-Visible. 200-800 (nm)
V	Volts. Unidad De Medida De Potencial Eléctrico
Zn ²⁺	Ion Divalente de Zinc

Resumen

Se aisló una metalo proteasa de un extracto obtenido a partir de la pared corporal del pepino de mar *Holothuria inornata* (organismo bentónico, detritívoro y con amplia distribución a lo largo del Pacífico mexicano), mediante la síntesis de un micro compuesto de bentonita-acrilamida-cisteína; que permitió la adsorción de la enzima y su posterior elución con cloruro de sodio. La metalo proteasa aislada se dializó y presentó una masa aproximada de 22 kDa en un gel desnaturalizante (SDS-PAGE). Después se digirió para su análisis por espectrometría de masas en tándem. Se identificaron péptidos trípticos que con base en su patrón de fragmentación se relacionan con metalo proteasas de *Borrelia burgdorferi*, *Streptococcus pneumoniae* y una metalo proteasa putativa de *Strongylocentrotus purpuratus*, un erizo de mar que pertenece al mismo filo del pepino. Debido a que la homología es poca con las metalo proteasa previamente descritas, se sugirió que esta proteasa es una enzima novedosa.

Abstract

A metallo protease was isolated from an enzyme extract that was obtained from the body wall of *Holothuria inornata*, a sea cucumber (benthic organism, detritivore and widely distributed throughout the Mexican Pacific), this was possible by the synthesis of the bentonite-acrylamide-cysteine, it facilitated the adsorption and subsequent elution with sodium chloride.

The detached metalloprotease was dialyzed and presented an approximate mass of 22 kDa in a denaturing gel (SDS-PAGE). Then it was digested for the corresponding analysis by the tandem mass spectrometry. Three-fold peptides were identified based on their fragmentation pattern, they're related to the metal proteases from *Borrelia burgdorferi*, *Streptococcus pneumoniae* and a putative metallo protease of *Strongylocentrotus purpuratus*, this last is an urchin belonging to the same phylum of the sea cucumber. Due to the poor homology with no other metal protease that was previously described, it was suggested that this protease is a novel enzyme.

I. Introducción

A lo largo de la evolución, el ser humano se ha dedicado a buscar en la naturaleza organismos o sustancias que le puedan aportar algún beneficio, este puede ser tanto en la salud, para combatir infecciones o tratar diversos padecimientos, como en el ámbito comercial, ya sea en la obtención de pigmentos o comida. Esta práctica recibe el nombre de Bioprospección; el Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo o UNDP (por sus siglas en inglés), lo define como: “La Búsqueda sistemática de información bioquímica y genética en la naturaleza para desarrollar productos comercialmente valiosos para aplicaciones farmacéuticas, agrícolas, cosméticas y otras”.

La continua búsqueda de compuestos en animales o plantas, es una actividad ancestral y constante, orientándose principalmente a selvas y bosques debido a la amplia biodiversidad y al fácil acceso que poseemos a estos ambientes. Sin embargo, se sabe que la superficie de la Tierra está cubierta por más de 70% de agua, y los océanos constituyen un bioma con elevado potencial de diversidad biológica y química, pues contienen a 28 representantes de los 35 filos descritos actualmente, además de que un tercio de estos filos solo se pueden hallar en este ambiente (Primack, 2010 en *Mar. Enzym. Biocatal.*, 2013). La Dra. Sylvia Earle, menciona que solo se ha explorado el 10% de los océanos. Por lo anterior, este tipo de ecosistemas, pueden desempeñar un papel importante en esta búsqueda.

Diversos organismos marinos se han adaptado al medio y han desarrollado compuestos atractivos, para la producción de antibióticos o moléculas útiles para el tratamiento del dolor. Existen claros ejemplos de bioprospección de moléculas de origen marino, algunos tan milenarios como el de la 6,6'-bromoindigotina, un colorante conocido como el “Tinte Púrpura Imperial”, comercializado en oriente y distribuido por los fenicios en todo el mediterráneo. Investigaciones de diversos arqueólogos basadas también en los escritos de Plinio el Viejo, Estrabón y Plutarco, entre otros, indican la importancia de este colorante en la vestimenta de la realeza. Se sabe por ejemplo que el barco de Cleopatra mostró una vela púrpura en la batalla de Actium, o Accio en el siglo I a.C., por lo que el emperador Nerón lo decretó para su uso exclusivo y nadie podía utilizarlo; este colorante se extraía de las secreciones de las glándulas hipobranquiales de los moluscos gasterópodos (*Murex brandaris*, *Murex trunculus* y *Purpura hemastoma*) del mediterráneo (McGovern and Michel 1985). Otro ejemplo relevante es el del ámbar-gris, una concreción (acumulación de sustancias transportadas en disolución que precipitan produciendo una masa) formada dentro del tracto intestinal del cachalote azul y muy apreciada por los perfumistas debido a sus propiedades como fijador de fragancias; de este se pudieron identificar terpenos como la Ambreina, el Ambroxan y el Ambrinol, que son los componentes principales del olor y su poder como fijador (Christenson et al. 1982).

Fue en 1953, cuando Guy Newton y Edward Abraham de la Escuela de Patología Sir William Dunn en la Universidad de Oxford, descubren la cefalosporina en los

medios de cultivo proporcionados por Giuseppe Brotzu, el cual, aisló al hongo *Cephalosporium acremonium* en el agua de mar de las costas de Cerdeña, Italia y notó su potente capacidad inhibitoria contra la bacteria *Salmonella typhi* causante de la fiebre tifoidea (Abraham 1987; Armstrong et al. 2013 en Marine Enzymes for Biocatalysis). En esa misma década, Werner Bergman y Robert J. Fenney reportan el aislamiento de “esponjotimidina” y posteriormente de “esponjouridina”, dos nuevos nucleósidos que poseían D-arabinosa en lugar de D-ribosa y no se habían reportado antes en la esponja del Caribe *Cryptotethia cripta*.

El Dr. R. Arreguín-Espinosa (com. pers.) menciona que la química de productos naturales de origen marino tiene cerca de 50 años de existencia. Inicialmente el trabajo se centraba en aislar, purificar e identificar las estructuras de los compuestos presentes en estos organismos, sin embargo, en la década de los 70’s se vio la necesidad de ampliar estos estudios a péptidos y proteínas con sus posibles aplicaciones en el área biomédica y es así como hoy en día, existen al menos una decena de compuestos de origen proteico en el mercado y muchos otros en fases finales de investigación clínica como se resume en la Tabla 1 (Armstrong et al. 2013 en Marine Enzymes for Biocatalysis).

Tabla 1. Productos naturales o derivados obtenidos de organismos marinos y que se han utilizado como agentes terapéuticos (Tomado y modificado de Armstrong et al. 2013 en Marine Enzymes for Biocatalysis).

Estado Clínico	Nombre del compuesto	Organismo de origen	Padecimiento en que se ha utilizado	Información Adicional
Aprobado	Citarabina (Ara-C)	Esponja, <i>Cryptotethia cripta</i>	Cáncer	Derivado de la esponjotimidina. Recibió la aprobación de la FDA en 1969.
	Vidarabina (Ara-A)	Esponja, <i>Tethya cripta</i>	Antiviral	Derivado de la esponjouridina. Recibió la aprobación de la FDA en 1976. Retirado en 2001.
	Ziconotide	Caracol marino, <i>Conus magus</i>	Tratamiento del dolor	Producto natural. Recibió la aprobación de la FDA en 2004.
	Mesilato de Eribulina (E7389)	Esponja, <i>Halichondria okadai</i>	Cáncer	Derivado de la Halicondrina B. Recibió la aprobación de la FDA en 2010.
	Etil esteres de ácidos del Omega-3	Pescado	Hipertrigliceridemia	Derivado de los ácidos grasos Omega-3. Recibió la aprobación de la FDA en 2004.
	Trabectedina (ET-743)	Tunicado, <i>Ecteinascidia turbinata</i>	Cáncer	Producto natural. Recibió la aprobación de la EMEA en 2007. En ensayos de fase clínica III en Estados Unidos.

	Brentuximab vedotina (SGN-35)	Molusco, <i>Dollabella auricularia</i>	Cáncer	Derivado. Recibió la aprobación de la FDA en 2011.
Ensayos clínicos de Fase III	Plitidepsina	Tunicado, <i>Aplidium albicans</i>	Cáncer	Producto natural.
Ensayos clínicos de Fase II	DMXBA (GTS-21)	Gusano marino, <i>Amphiporus angulatus</i>	Esquizofrenia, cognición	Derivado
	Plinabulina (NPI 2358)	Hongo, producido por <i>Aspergillus ustus</i> , aislado de un cultivo de <i>Halimeda lacrimosa</i>	Cáncer	Derivado
	Elisidepsina	Molusco, <i>Elysia rufescens</i>	Cáncer	Derivado
	PM00104	Nudibranquio, <i>Jorunna funebris</i>	Cáncer	Derivado
	CDX-011	Molusco, <i>Dollabella auricularia</i>	Cáncer	Derivado
	PM01183	Tunicado, <i>Ecteinascidia turbinata</i>	Cáncer	Derivado
Ensayos clínicos de Fase I	Marizomib (Salinosporamida A; NPI-0052)	Bacteria, <i>Salinispora tropica</i>	Cáncer	Producto natural
	PM060184	Esponja, <i>Lithoplocamia lithistoides</i>	Cáncer	Derivado
	SGN-75	Molusco, <i>Dollabella auricularia</i>	Cáncer	Derivado
	ASG-5ME	Molusco, <i>Dollabella auricularia</i>	Cáncer	Derivado

Aunque gran parte de la investigación en productos naturales de origen marino se ha orientado a la búsqueda de moléculas para el tratamiento de diversas afecciones o padecimientos, existen enzimas dentro de estos productos y que poseen un amplio potencial desde una perspectiva biotecnológica general. Estas enzimas pueden ofrecer propiedades relacionadas con las condiciones en las que se encuentran que son muy apreciadas a nivel industrial, por ejemplo, algunas son activas a bajas temperaturas, mientras que otras presentan alta actividad proteolítica en elevadas concentraciones de saturación de NaCl (30%) (Nasri et al. 2010); la aplicación de estas enzimas permitiría el desarrollo de procesos industriales con menores requerimientos de energía y podría evitarse con ello el uso de catalizadores químicos (Armstrong et al. 2013 en Marine Enzymes for Biocatalysis). Aunado a lo anterior, existe también la posibilidad de ofrecer propiedades aún más interesantes, debido a que podrían presentar nuevas características a nivel molecular, ya sea una mayor presencia de enlaces del tipo covalente que les confieren una mayor estabilidad entre otras (Armstrong et al. 2013 en Marine Enzymes for Biocatalysis).

Como se mencionó anteriormente, la investigación relacionada a enzimas de origen marino es escasa, sin embargo en las últimas dos décadas ha tenido un desarrollo considerable, como se puede observar en el Gráfico 1.

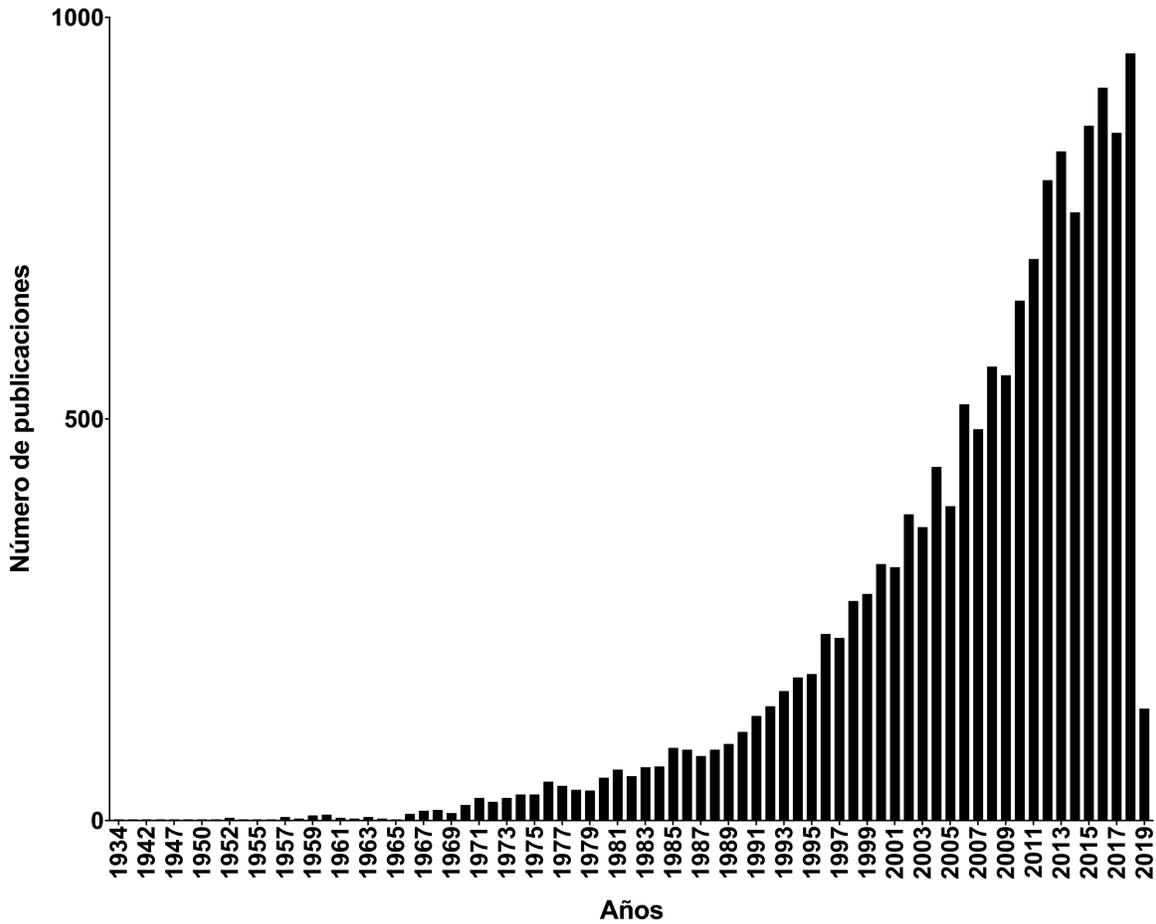


Gráfico 1. Resultados obtenidos de la búsqueda de artículos científicos que contienen las palabras claves “marine enzymes” de 1934 a 2019 en SCOPUS (<https://www.scopus.com/>); suman un total de 14872 resultados. Datos obtenidos el 20 de febrero de 2019.

Por todo lo anterior, conscientes de la complejidad, relevancia y amplio potencial en la investigación con organismos marinos, en este proyecto se aisló y caracterizó de manera parcial una metalo proteasa presente en la pared corporal del pepino de mar *Holothuria inornata*.

II. Marco Teórico

1. Enzimas

Entre las diversas proteínas presentes en los organismos, se encuentran las enzimas. Estas catalizan reacciones químicas en todos los seres vivos y los aspectos más relevantes que diferencian una enzima de un catalizador químico ordinario son:

1. Se obtienen velocidades de reacción más elevadas.
2. No son consumidas en el proceso.
3. Actúan en condiciones de reacción más suaves.
4. Tienen mayor especificidad de reacción.
5. Capacidad para la regulación de la reacción.

El siguiente diagrama explica a *grosso modo* cómo llevan a cabo su mecanismo de acción:



Figura 1. Mecanismo de acción de una enzima (Tomado y modificado de Mathews & et al.,2002).

1.1 Clasificación de las enzimas

Se clasifican y designan con base en la naturaleza de las reacciones químicas que catalizan. Son seis las clases principales de reacciones que catalizan las enzimas (Tabla 2), así como subclases y sub-subclases dentro de las clases (Tipton and Boyce 2000; Martínez Cuesta et al. 2015).

Tabla 2. Clasificación internacional de las enzimas.

Clasificación	Tipo de reacción catalizada
1. Oxidorreductasas	Óxido-reducción.
2. Transferasas	Transferencia de grupos funcionales.
3. Hidrolasas	Reacciones de hidrólisis.
4. Liasas	Eliminación de grupo para formar enlaces dobles.
5. Isomerasas	Isomerización.
6. Ligasas	Formación de enlace acoplada a la hidrólisis de ATP.

1.1.1 Proteasas

Un tipo particular de hidrolasas son las proteasas o peptidasas; amplia familia de enzimas cuya función catalítica consiste en hidrolizar los enlaces peptídicos que componen a las proteínas (Rani, Rana, and Datt 2012). Se encuentran distribuidas en todos los seres vivos; en organismos superiores, cerca del 2% de su material genético codifica para estas enzimas (Rani, Rana, and Datt 2012). Son responsables de catalizar reacciones altamente específicas de procesamiento proteolítico, produciendo nuevos productos proteicos (López-Otín and Bond 2008). Así mismo, son usadas en procesos biológicos cruciales como la regulación del metabolismo, modificación enzimática, activación del sistema del complemento, vías apoptóticas, activación de cascadas de señalización, en la activación de zimógenos, la reproducción, la gametogénesis, la inmunidad y la regeneración celular, entre otras (Rani, Rana, and Datt 2012; Tarlton et al. 2000).

A la fecha se han descrito diversas proteasas en organismos terrestres y aunque también se encuentran presentes en organismos marinos como ya se mencionó, su estudio es escaso, pero resulta de interés debido a que se expresan en diferentes condiciones fisicoquímicas respecto a sus homólogas en tierra, como bien lo ejemplifica lo descubierto por Nasri et al. en el 2010, ya que reportan una enzima con alta actividad proteolítica a altas concentraciones de NaCl. Así mismo, el estudio de estas enzimas proteolíticas es importante por el valor comercial que representan, dado que muchas son utilizadas en diversos ámbitos a nivel industrial, ya sean con fines terapéuticos, clínicos en procesos de manufactura o hasta su comercialización como reactivos de laboratorio (Rani, Rana, and Datt 2012). En relación a lo anterior, es necesario añadir que las proteasas generan una derrama económica importante, ya que aproximadamente el 60% de la venta mundial de enzimas es ocupado por la comercialización de proteasas (Rao et al. 1998; Rani, Rana, and Datt 2012; Verma, Dixit, and Pandey 2016) como lo muestra el siguiente gráfico:

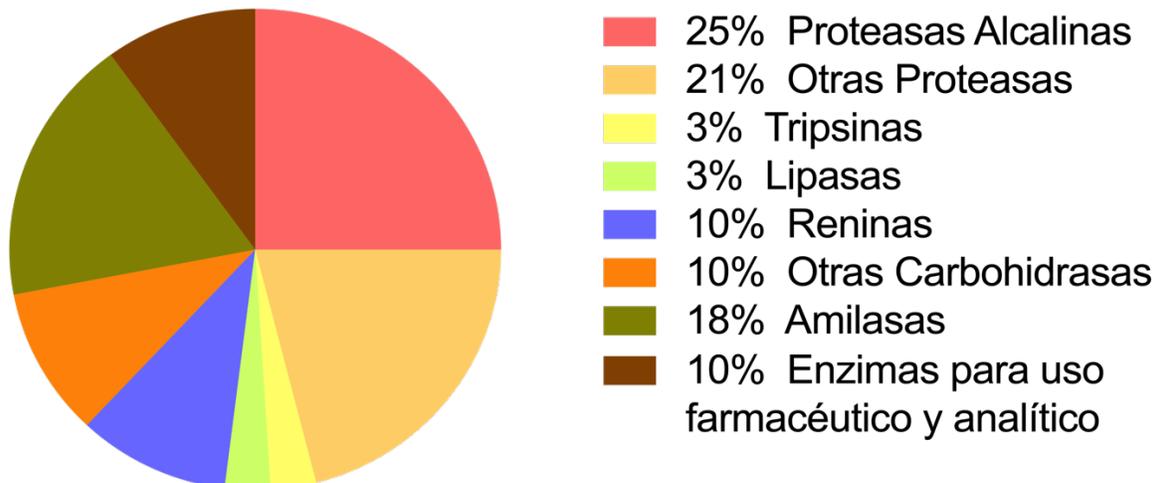


Gráfico 2. Distribución de la venta de enzimas (Singh et al. 2016; Mala et al. 1998).

1.1.1.1 Metaloproteasas

La matriz extracelular (ECM) es un conjunto de moléculas que provee soporte estructural y bioquímico a las células adyacentes (Gurvan et al. 2010). Está compuesta por polisacáridos como proteoglicanos y proteínas como el colágeno, elastina, fibronectina y laminina, y varía dependiendo la estructura multicelular. Sin embargo, sus principales funciones son la adhesión celular, la comunicación de célula a célula y la diferenciación (Abedin and King 2011).

Las metaloproteasas o matriz metaloproteinasas (MMP), es una familia variada y particular de endoproteinasas dependientes de Zinc (poseen un ion metálico de Zn^{2+} en su sitio activo, de ahí el prefijo metalo). Se encuentran presentes en todos los organismos y en conjunto son capaces de degradar todos los componentes que constituyen la matriz extracelular (Fanjul-Fernández et al. 2010; López-Otín and Bond 2008). Son sintetizadas como zimógenos con un péptido señal que permite dirigirlos y anclarlos a la membrana plasmática o secretarse desde la célula, limitando con ello su actividad catalítica al espacio extracelular o a la superficie celular (Fanjul-Fernández et al. 2010).

El arquetipo de una MMP (Figura 3) se compone por un propéptido (~80 aminoácidos) con un motivo de *switch*-cisteína que mantiene a la MMP en su forma de zimógeno (proMMP) donde la cisteína quela el Zn^{2+} del sitio catalítico, un dominio catalítico metaloproteinasa (~170 aminoácidos) que contiene el motivo de unión a Zn^{2+} (HEXXHXXGXXH, Figura 2) y una metionina conservada localizada ocho residuos río abajo la cual da soporte a la estructura del sitio activo alrededor del zinc catalítico, un péptido de enlace de longitud variable (también llamada “región bisagra”) compuestos por residuos flexibles (glicina y serina) permitiendo que los dominios de proteínas adyacentes se muevan entre sí y un dominio de hemopexina (~200 aminoácidos) que reconoce los sustratos en los que puede ser activa y a los inhibidores naturales que se identifican como TIMP (tissue inhibitor of matrix proteinase), este último no se encuentra presente en las matrilisinas (Sternlicht and Werb 2001; Visse and Nagase 2003; Galleguillos C. et al. 2014; Raffetto and Khalil 2008; Fanjul-Fernández et al. 2010; Murphy and Knäuper 1997).

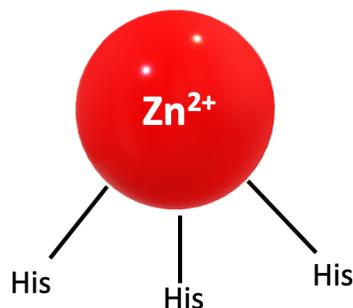


Figura 2. Representación del sitio catalítico con los tres residuo de histidina de unión al cation divalente de zinc.

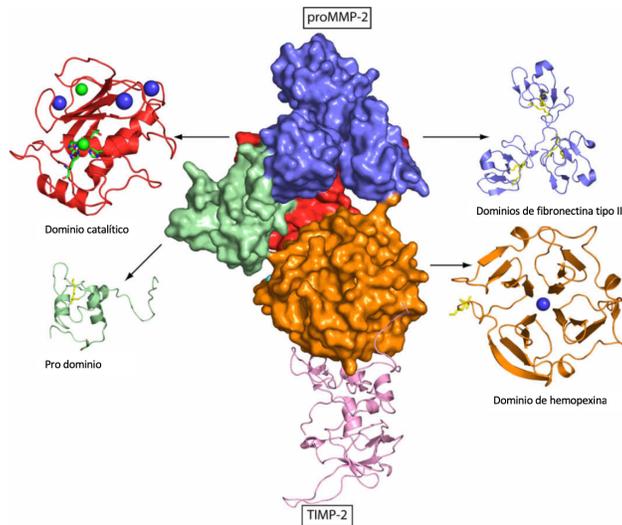


Figura 3. Diagrama tridimensional del proMMP-2 humano y el complejo TIMP-2. El pro-dominio se muestra en verde, el dominio catalítico en rojo, los dominios de fibronectina tipo II en azul, el dominio de hemopexina en naranja y el TIMP-2 en rosa. El ión de cinc está como una esfera color verde, el ión de calcio como una esfera azul y los enlaces disulfuro en amarillo (Modificado de Murphy and Nagase 2009).

Las MMP pueden clasificarse con base en la estructuración de su dominio y su preferencia por sustratos en cuatro grupos diferentes: MMP arquetípicas, matrilisinas, gelatinasas y MMP activables por furina como se muestran en la Figura 4 (Fanjul-Fernández et al. 2010; Murphy and Nagase 2009). Generalmente escinden un enlace peptídico antes de un residuo con una cadena lateral hidrofóbica, como leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina o tirosina. Estos residuos embonan en el “saco” de especificidad de la enzima, este saco varía en tamaño y forma entre las diferentes MMPs (Bode et al. 1999; Murphy and Nagase 2009).

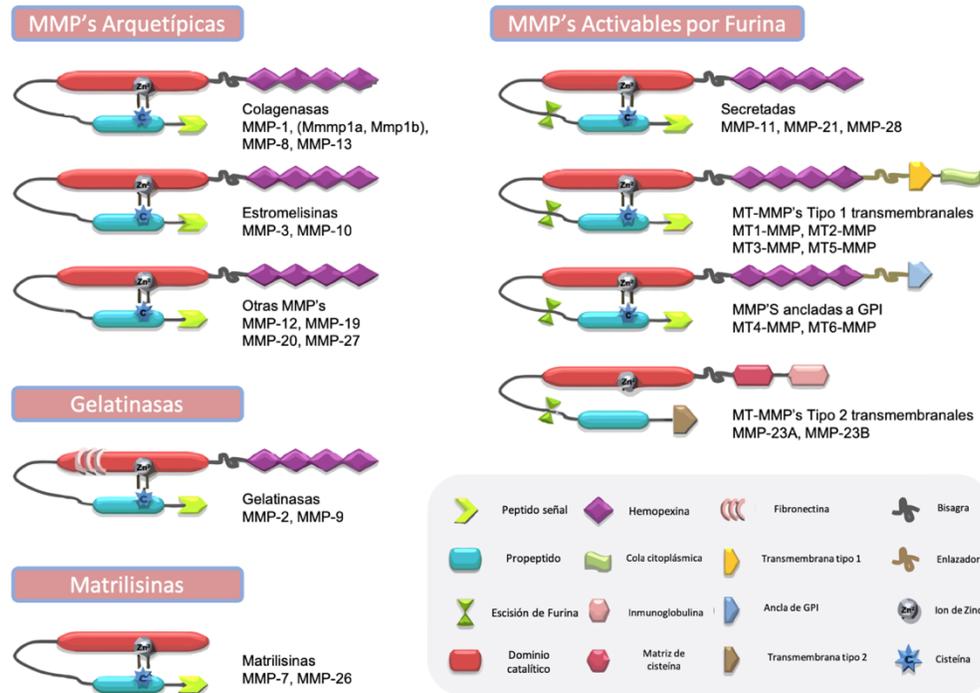


Figura 4. Clasificación estructural de las MMPs según la organización de su dominio. (Modificada de Fanjul-Fernández et al., 2010).

Los análisis genómicos comparativos sugieren que las MMPs han evolucionado en los distintos grupos al eliminar o incorporar dominios ausentes en el arquetipo básico. Así mismo, estos análisis han arrojado que el origen de estas endopeptidasas es muy antiguo, debido a la identificación de ortólogos de MMP en plantas como en vertebrados, así como el hallazgo de que las MMP de plantas y de invertebrados tienen una relación más estrecha entre ellas, sugiriendo con ello, la existencia de una MMP primitiva. También es notable que la mayoría de los genes MMP que se encuentran en los invertebrados tienen un ortólogo en *Ciona intestinalis*, uno de los parientes invertebrados más cercanos de los vertebrados. Por lo tanto, estas enzimas probablemente evolucionaron ante la divergencia entre los linajes de vertebrados y urocordado. Antes de la aparición de vertebrados, la familia de MMP se había mantenido relativamente estable a lo largo de la evolución según lo evaluado por el bajo número de genes de MMP conservados presentes en los protoestomas (2 MMP en *Drosophila melanogaster*) y urocordados (5 MMP en *Ciona intestinalis*). Sin embargo, cabe destacar la presencia en el genoma del erizo de mar de al menos 26 genes MMP con una similitud significativa con las MMP de vertebrados, aunque se agrupan y se separan de los grupos de MMP de vertebrados. Estos hallazgos sugieren que los genes MMP encontrados en el último ancestro común de vertebrados y equinodermos, se sometieron a una duplicación y divergencia independientes, luego de la separación de estos dos grupos (Fanjul-Fernández et al. 2010; Angerer et al. 2006).

2. Filo Echinodermata

El *Phylum* Echinodermata del griego *echinus* (espinoso) y *dermatos* (piel) incluye a los organismos que mejor ejemplifican al reino marino, tales como los lirios de mar, erizos de mar, dólares de arena, erizos de corazón, pepinos de mar y las estrellas de mar. Son invertebrados estrictamente marinos compuestos por cerca de 7300 especies conocidas (Brusca, Moore, and Shuster 2016).

Los Equinodermos presentan una amplia variedad de tamaños, desde los pequeños pepinos de mar de menos de 1 cm de largo, hasta estrellas marinas que exceden 1 m de diámetro de brazo a brazo. Su amplia distribución geográfica abarca desde los trópicos hasta los polos (Pawson 2007). En el caso de los adultos y algunas especies pelágicas y batipelágicas, comúnmente habitan el fondo marino (bentónicos) en ciertas regiones del mar profundo a partir de los 200 m (Low Pfeng and Peters 2014), desempeñando papeles fundamentales en el ecosistema marino bentónico, como en el aprovechamiento del alimento en suspensión y el que se deposita (principalmente pepinos de mar y lirios marinos), en la predación (particularmente ciertas especies de estrellas de mar), pastoreo (muchos erizos de mar), y en el procesamiento de los sedimentos y recambio de estos (como los erizos corazón). En cambio, en su etapa larvaria son miembros relevantes en las comunidades pelágicas, particularmente en la ecología de las comunidades planctónicas. (Brusca, Moore, and Shuster 2016; Pawson 2007).

Con base en su desarrollo embrionario se incluyen dentro de los deuterostomados, poseen un endoesqueleto compuesto por elementos calcáreos conocidos como espiculas y una simetría penta-radial (Brusca, Moore, and Shuster 2016).

3. Clase Holothuroidea

Los holoturoideos, mejor conocidos como pepinos de mar, presentan un cuerpo cilíndrico y alargado, con simetría pentámera (compuesta por cinco bandas musculares que corren de cada extremo a lo largo del cuerpo) y bilateral secundaria (dada por la presencia de una boca en un extremo y un ano en el otro) (Solís-Marín et al. 2009). Esta Clase es representada por aproximadamente 25 familias, 199 géneros y 1400 especies (Solís-Marín et al. 2009); en México existe un registro de 113 especies pertenecientes a esta Clase (Solís-Marín, Laguarda-Figueras, and Honey-Escandón 2014). La mayoría son bentónicos y se les puede encontrar en fondos de arena, entre rocas, pastos marinos y en los arrecifes de coral (Santos-Beltrán and Salazar-Silva 2011). Presentan una distribución cosmopolita contando con representantes en fondos marinos someros hasta en las trincheras abisales (Jamieson et al. 2011).

El valor ecológico de esta Clase radica en el tipo de alimentación que llevan a cabo dentro de la red trófica. Se les considera principalmente como sedimentívoros o alimentadores de depósito, ya que con sus tentáculos orales ingieren los sedimentos para el aprovechamiento de la materia orgánica que ahí se deposita y

el posterior reciclamiento de los componentes químicos dentro de los ecosistemas (Coulon and Jangoux 1993; Ruiz, Ibáñez, and Cáceres 2007). Por ejemplo *Holothuria arenicola* una especie que vive sobre fondos de arena, es capaz de procesar 47 kg/m² por año de sedimento seco; así mismo en los arrecifes de los océanos Indo-Pacífico, donde la presencia de los pepinos de mar supera los 35 individuos por metro cuadrado, pueden procesar hasta 80 g de peso seco de sedimento al día (Pawson 2007). En un reciente estudio (Schneider et al. 2011) se demostró el importante rol que juegan los pepinos de mar en el balance de carbonato de calcio (CaCO₃) disponible en el agua de mar para el desarrollo eficiente y “sano” de los arrecifes de coral.

Por otra parte, el valor comercial de los pepinos de mar es elevado. La pesca activa de este organismo ha existido por al menos 1,000 años y actualmente al menos 13 mil toneladas son desembarcadas cada año, provenientes principalmente de las pesquerías japonesas y coreanas (Pawson 2007).

4. Proteasas identificadas en la Clase Holothuroidea

Muchas investigaciones se han enfocado en la actividad proteolítica de diferentes especies marinas para comprender mejor su capacidad digestiva y el rol que desempeñan dentro de su entorno. Actualmente existen diversos reportes sobre enzimas proteolíticas presentes en pepinos de mar; principalmente en su capacidad para poder utilizar los nutrientes captados del entorno, señalando que esta capacidad depende principalmente de la actividad desarrollada por sus enzimas digestivas (Fu et al. 2005) y particularmente en la especie *Stichopus japonicus* debido al elevado valor comercial que representa.

En 1981 se reportó la actividad peptídica sobre di- y tri-péptidos en extractos intestinales de *Holothuria forskali* y *Neopendactyla mixta* (McGettigan et al. 1981); poco tiempo después (1985) el mismo grupo, publicó la presencia de una aminopeptidasa soluble en la mucosa intestinal del pepino de mar *H. forskali* con una masa aparente de 319 kDa y compuesta por seis subunidades de 54 kDa (O'Donoghue and Johnson 1986).

En 1990 se reportó actividad enzimática en extractos del fluido celómico provenientes del pepino de mar *Holothuria polii*, por sus estudios *in vitro* y respuesta a inhibidores. Determinaron que probablemente se trataba de una proteasa serínica tipo tripsina (Canicattí 1990).

Más adelante (2005), se reportó la presencia de al menos tres proteasas presentes en el tracto digestivo de *Stichopus japonicus*. Como particularidad, estas tenían un elevado carácter alcalino (Fu et al. 2005).

En 2006 se realizó un ensayo con *S. japonicus*, en donde se evalúa la variación estacional en la actividad de las proteasas presentes en diferentes secciones del tracto digestivo (Fu et al. 2006). Otro ensayo con esta misma especie fue publicado

en 2007; en él se reportaba el aislamiento y caracterización de una proteasa tipo cisteína con una masa alrededor de los 35.5 kDa y con una sorprendente estabilidad térmica, soportando hasta los 60°C (Qi et al. 2007).

Además de su capacidad digestiva, las proteasas presentan una increíble acción autolítica. Esto se ha comprobado aislando una serie de enzimas proteolíticas responsables de la autólisis de los tejidos de diversas especies de peces y equinodermos (Qi et al. 2007). Los holoturoideos han demostrado su excepcional capacidad de regenerar apéndices externos y órganos internos, una vez que son expulsados de su organismo debido a factores ambientales o mecánicos. Ya existen reportes de proteasas involucradas en el mecanismo de regeneración; en el 2012 se evaluó el efecto de algunos inhibidores durante la regeneración intestinal en *Holothuria glaberrima*, encontrando que los inhibidores afectaban de manera importante la degradación de colágeno, la proliferación celular y con todo ello, la regeneración (Pasten et al. 2012). Esta capacidad está relacionada con la remodelación de la ECM en donde participan activamente una clase de proteasas denominadas metalo proteasas de matriz o MMP's (Woessner 1991).

En 2013 dos artículos señalan la presencia de MMP's en dos diferentes especies de pepino de mar. El primero de ellos en *Eupentacta fraudatrix*, reporta la presencia de cuatro proteasas en un amplio intervalo de masas, siendo una de ellas sensible a un inhibidor de metalo proteasas de mamíferos. Así mismo el uso de inhibidores disminuía marcadamente la tasa de restauración *in vivo* (Lamash and Dolmatov 2013). El segundo reporta el aislamiento de una metalo proteasa del tipo gelatinolítica (GMP) en la pared corporal de *S. japonicus*, esta GMP reveló alta actividad a pH alcalino y una temperatura óptima entre los 40 y 45 °C (Wu et al. 2013).

En México, existen también reportes de proteasas presentes en especies de costas mexicanas. En 2012 se reporta la presencia de proteasas en algunos órganos de los pepinos de mar *Isostichopus fuscus* y *Holothuria impatiens* (Hernández-Samano 2010), mientras que en 2015 se reporta la presencia de una posible nueva metalo proteasa en *I. fuscus*; esto debido a que no se encuentra homología con las reportadas (Hernández-Samano et al. 2015).

5. *Holothuria (Halodeima) inornata* Semper 1868

La especie *Holothuria inornata* se encuentra distribuida en México, en los estados de Baja California, Baja California Sur, Sonora, Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Chiapas y el archipiélago de Revillagigedo. Mientras que en Centro y Sudamérica se encuentra en la Isla del Coco, Costa Rica; Panamá; Perú; hasta Ecuador e Islas Galápagos. Su distribución batimétrica abarca aguas someras, desde los 3 hasta los 18 m de profundidad, en la interfase roca-arena o entre piedras asociadas al sustrato (Solís-Marín et al. 2009; Honey-Escandón and Solís-Marín 2018), siempre cubierto con una capa de arena fina y con escombros finos o gruesos que imitan el fondo (Honey-Escandón and Solís-Marín 2018), lugar donde lleva a cabo su alimentación a partir de depósitos de arena, lodo, sedimento y detritos (Bakus, 1973), incorporando así materia orgánica a su sistema y desechando materia rica en aminoácidos y otros compuestos aprovechables intersticiales u otros detritívoros (Coulon y Kangoux, 1993). Regularmente los organismos de gran talla presentan una relación simbiótica con *Holothuriophilus trapeziformis*, un pequeño cangrejo que habita en la cloaca (Campos, Peláez-Zárate, and Solís-Marín 2012).

H. inornata alcanza hasta 30 mm de longitud y 7 mm de ancho (Santos-Beltrán and Salazar-Silva 2011). El color de los individuos es casi negro con un tinte rojizo a gris, verrugas rojizas, apéndices oscuros y tentáculos negros o café oscuro (Honey-Escandón and Solís-Marín 2018) (Figura 5).

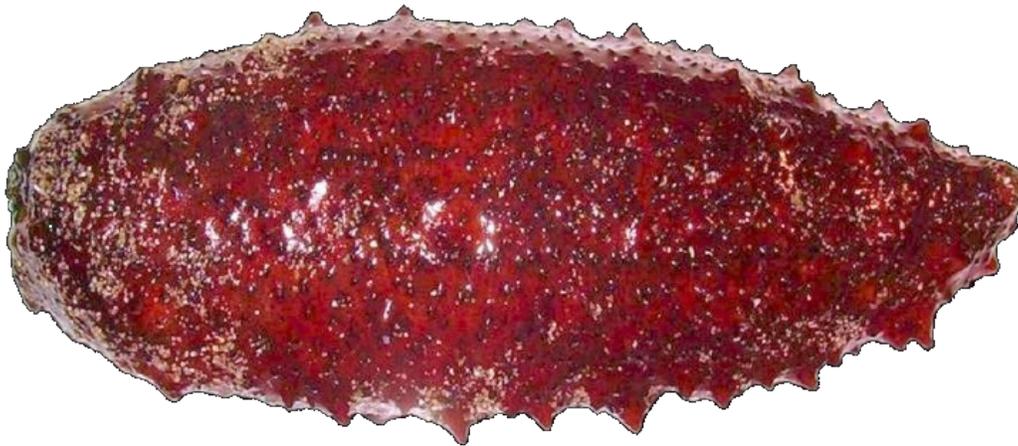


Figura 5. *Holothuria (Halodeima) inornata* Semper, 1868 o pepino de mar arenoso; en inglés "Red Sea Cucumber". (Solís-Marín et al. 2013).

III. Hipotésis

Debido a la elevada presencia de colágeno en su composición y a que estas enzimas intervienen en la regeneración, un rasgo particular del Filo Echinodermata. La pared corporal de *H. inornata* poseerá metaloproteasas susceptibles de ser identificadas mediante LC MS/MS

IV. Objetivos

El objetivo general de este trabajo es aislar y caracterizar una metalo proteasa de la pared corporal del pepino de mar *H. inornata*.

En tanto que los objetivos particulares consisten en:

- a) Purificar una proteasa de *H. inornata* utilizando diferentes técnicas cromatográficas.
- b) Conocer la complejidad de los extractos obtenidos.
- c) Caracterizar bioquímicamente a la enzima, esto es determinar su actividad y masa molecular.
- d) Proceder a su identificación contrastando los datos obtenidos por LC MS/MS.

V. Materiales y métodos

1. Sitio de estudio

Los especímenes de *Holothuria inornata* fueron recolectados por la Dra. Magali Honey-Escandón, en la costa del puerto de Acapulco, ubicado en el municipio de Acapulco de Juárez, estado de Guerrero, en el suroeste del Pacífico Mexicano a 420 km de la ciudad de México. Estas costas colindan al Norte con los municipios de Coyuca de Benítez, Chilpancingo, al Este con San Marcos y al Sur con el Océano Pacífico. La Bahía de Acapulco se encuentra en las coordenadas 16° 49' 25.29" N y 99° 54' 42.67" E quedando delimitada por la sierra Madre del Sur.

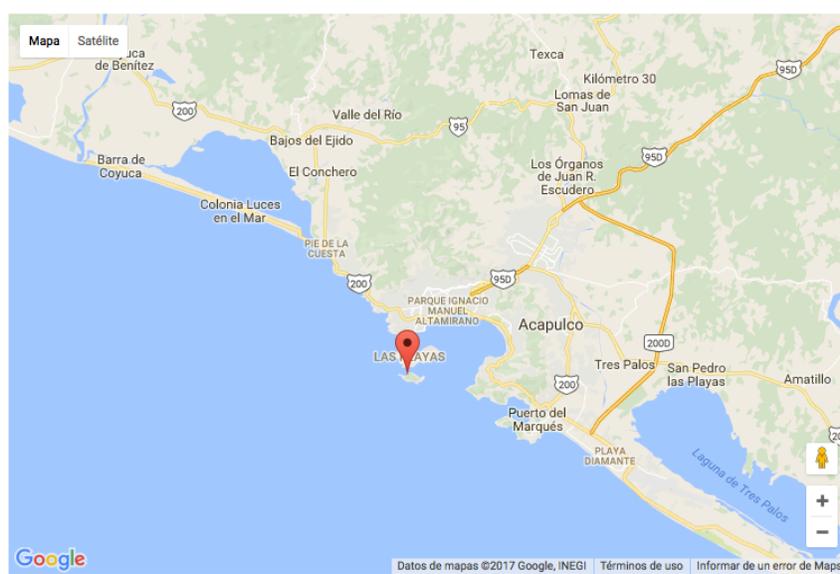


Figura 6. Mapa de Isla La Roqueta frente a las costas de Guerrero donde se colectaron los organismos de estudio.

2. Especie de estudio

Como ya se describió anteriormente, *H. inornata*, habita desde la zona intermareal hasta los 18 m de profundidad. Fueron recolectados con equipo de respiración autónoma bajo el agua (SCUBA, por sus siglas en inglés) en una cubeta con agua de mar para su traslado y posterior identificación taxonómica.

Para llevar a cabo la identificación, se revisaron la forma y diversidad de las espículas; se realizó un corte de la piel del organismo y se colocó en un portaobjetos, se le depositaron tres gotas de NaClO al 7% (m/v) dejando reposar durante un minuto con el fin de desprender el tejido de las espículas. Posteriormente, se observaron con ayuda de un microscopio empleando un objetivo de 40X y se contrastaron con las reportadas (Solís-Marín et al. 2009).

Para su traslado al laboratorio de Química de Biomacromoléculas 2 del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, las holoturias se almacenaron dentro de bolsas de plástico en un tanque que contenía nitrógeno líquido.

3. Obtención del extracto a partir de los tejidos

Se procesaron 0.869 kg del material colectado, estos fueron cortados por el eje anteroposterior para extraer cuidadosamente sus órganos, se diseccionaron las vísceras de la piel (pared corporal), posteriormente se utilizaron 50 mL de agua destilada para homogenizar la pared corporal. En seguida la solución obtenida se congeló a -20 °C.

4. Cuantificación de proteínas por BCA

La cuantificación se llevó a cabo mediante un método colorimétrico basado en la interacción del cobre con ácido bicinconínico (BCA). Consiste a grosso modo en la reducción del ion cúprico (Cu^{2+}) al ion cuproso (Cu^{1+}) por los enlaces peptídicos de las proteínas; posteriormente cada Cu^{1+} interacciona con dos moléculas de ácido bicinconínico, que lo quelan y producen un complejo color púrpura intenso con elevada absorción a una longitud de onda de 562 nm. El color producido es soluble, estable y aumenta de manera proporcional a la concentración de proteína (Smith et al. 1985). Para determinar la concentración de proteína de cada muestra estudiada se agregaron 25 μL de cada extracto a cada pozo de una microplaca de 96 pozos, posteriormente se añadieron 200 μL del reactivo de trabajo compuesto por la mezcla de la solución de ácido bicinconínico y la solución de sulfato cúprico; esta se dejó reaccionar durante 30 minutos a una temperatura de 37 °C y se determinó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 562 nm en un equipo lector de microplacas Synergy HT® de la marca BioTek®. Esto se realizó por triplicado, tanto para las muestras de cada paso de purificación, así como para el estándar de la curva. Se empleó como referencia una curva estándar de albúmina sérica bovina donde la ecuación de la recta fue $y=0.0014x$; $R^2= 0.9981$.

5. Determinación de la masa molecular mediante la técnica de Electroforesis Desnaturalizante SDS-PAGE

La electroforesis en gel con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés) es una técnica que permite identificar y monitorear la presencia de proteínas durante un proceso de purificación; también se emplea para la estimación de la masa molecular de las proteínas al ser comparadas respecto a un estándar. Las muestras se cargan en un gel polimerizado de acrilamida y bis-acrilamida. Se les hace circular un campo eléctrico, que da como resultado la migración de las proteínas a través del gel que obedece a: la diferencia de masa y su carga (punto isoléctrico).

Para este fin se emplearon geles unidimensionales al 10%, la preparación de estos y el procedimiento se detalla en el anexo 2. Para la electroforesis se cargaron 10 µg de proteína de cada muestra con 4 µL de amortiguador de carga 4X (Anexo 2) y 3 µL de marcador de masa molecular en su respectivo carril. Se corrieron a 90 V por 2 horas.

6. Detección de la actividad proteolítica mediante Zimografía

En la electroforesis no desnaturizante se separan las proteínas en su estado nativo (García, 2000). La zimografía es un tipo de electroforesis no desnaturizante, que permite visualizar el número y el tamaño aproximado de las proteasas en una muestra basándose en su capacidad de hidrolizar un sustrato de proteína embebido en un gel, tal como proteoglicano (Barrett 1966), gelatina (Itoh, Ijuin, and Takenawa 1998) o caseína (Leber and Balkwill 1997; Zeng et al. 2002). La técnica es particularmente útil para analizar la composición de proteasas de muestras biológicas complejas, porque la visualización depende directamente de la actividad proteolítica (Feitosa et al. 1998; Jain et al. 2001) Las soluciones y metodología para llevar a cabo la zimografía fueron adaptadas de Troeberg & Nagase, 2004. Se emplearon geles unidimensionales al 10%, en este caso copolimerizados con caseína y gelatina. Su preparación y el procedimiento se detallan en el anexo 2. Para la electroforesis se cargaron 10 µg de proteína de cada muestra con 4 µL de amortiguador de carga No-desnaturizante 4X (Anexo 2) y 3 µL de marcador de masa molecular en su respectivo carril. Se corrieron a 150 V por 1 hora.

7. Precipitación con sulfato de amonio

En cualquier nivel, ya sea de investigación o bien a nivel industrial, el fraccionamiento de las proteínas requiere separar de manera rápida y masiva las proteínas respecto a otros componentes que no pueden resultar de utilidad o interés. La precipitación ofrece esas propiedades además de ser un proceso rápido, suave, escalable y poco costoso. Si bien, existen diversos métodos para llevar a cabo la precipitación de proteínas, la precipitación con sales, comúnmente llamada precipitación por insolubilización por salado o “salting out” es una técnica ampliamente utilizada para purificar proteínas, ya que permite separarlas de impurezas como ADN, lípidos y otros contaminantes presentes en la muestra. Cabe destacar que la sal de sulfato de amonio (SA), ha permanecido como uno de las más usadas para este fin (Burgess and Deutscher 2009).

Estudiada por Franz Hofmeister (1887-1890) la precipitación de proteínas empleando sales neutras permite mantener la actividad, así como la estructura de la proteína (Burgess and Deutscher 2009), en contraste con la precipitación obtenida empleando ácido tricloro acético o acetona.

El mecanismo general consiste en que la adición de sales elimina el agua de la proteína hidratada, permitiendo la interacción entre las regiones hidrofóbicas que componen a la proteína y su posterior combinación intermolecular (Glatz, 1990).

Citado en Tejada, Montesinos, & Guzmán, 2011). A mayor número de regiones hidrofóbicas, mayor número de agregados y por ende una rápida precipitación (Tejada, Montesinos, and Guzmán 2011). Para llevar a cabo este procedimiento, se siguió el protocolo publicado por el Instituto Max Planck de Biología Celular Molecular y Genética¹, el cual se detalla en el Anexo 2. Así mismo, se complementó con la aplicación que ofrece EnCor Biotechnology Inc.² para el cálculo preciso de las cantidades de SA a utilizar.

Se realizó una precipitación fraccionada partiendo de 500 mL del homogeneizado de la pared corporal, se adicionó sulfato de amonio necesario para conseguir el 20%, 40%, 60%, y 80% de saturación; en cada paso se dejó formar el precipitado en agitación durante 60 minutos a 4 °C. Posteriormente el precipitado se recuperó mediante centrifugación utilizando una ultracentrífuga marca BeckmanCoulter® modelo J2-21 con un rotor Type 45 Ti a una aceleración 30,000 g durante 1 hora a 4 °C. El precipitado se recuperó mediante centrifugación en las condiciones ya mencionadas. Una vez recuperado, se resuspendió con una solución amortiguadora de fosfatos pH 7.0 a una concentración 20 mM.

8. Diálisis de las muestras

Diálisis es la separación con base en el tamaño de las moléculas en solución por su difusión a través de una membrana semipermeable (Burgess and Deutscher 2009). Para remover el SA presente en nuestras muestras, se utilizaron membranas para diálisis con un tamaño de corte entre 12,000 y 14,000 Da para remover sales y otros componentes de baja masa molecular.

9. Purificación mediante el empleo de una matriz de afinidad

La cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC, por sus siglas en inglés) ha demostrado ser una poderosa técnica para la purificación y aislamiento de muchas proteínas (Block et al. 2009; Sulkowski 1985). Fue reportada por primera vez por Porath et al. (1975), y se basa en la afinidad de algunos metales de transición como el Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , y Co^{2+} con los aminoácidos histidina y cisteína en solución acuosa (Block et al. 2009). Cabe mencionar que este procedimiento ha tenido un particular desarrollo orientado a la búsqueda de nuevas resinas que sirvan como soporte para los iones metálicos.

Para llevar a cabo esta técnica cromatográfica se realizó la síntesis de un micro compuesto de Bentonita-Acrilamida-Cisteína (BAC) para la adsorción y posterior purificación de las metalo proteasas con base en lo reportado por Yavuz et al., 2017. Este procedimiento se detalla en el anexo 2. Para la adsorción de las metalo proteasas al BAC, se preparó una solución de proteínas a partir de las obtenidas de la precipitación con sulfato de amonio a una concentración de 3 mg/mL en

¹ https://hymanlab.mpi-cbg.de/hyman_lab/wp-content/uploads/2012/07/Ammonium_Sulfate_Precipitation.pdf

² <http://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm>

amotiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0; se incubaron con 3.0 g del microcompuesto BAC y se dejaron en agitación durante 2 h. Posteriormente se removió la fase líquida y la proteína adsorbida se desorbió utilizando lavados de una solución 1 M de NaCl, con cada paso de desorción se evaluó la actividad proteolítica en placa y en zimogramas.

10. Determinación de la actividad proteolítica mediante el ensayo reportado por Buroker-Kilgore & Wang (1993).

Para realizar la prueba de actividad proteolítica, se siguió el método propuesto por Buroker-Kilgore and Wang 1993. El ensayo se basa en la unión del agente colorante (Coomassie azul brillante G-250) con las proteínas, pero no con los productos proteolíticos generados durante la digestión con una proteasa. Este ensayo resulta económico respecto a otros ensayos caseinolíticos además de que no requiere tratamientos particulares para la muestra. Consta de dos pasos fundamentales, el primero consiste en la incubación de la enzima de interés junto con el sustrato (en este caso caseína) y el segundo paso consiste en la incubación con el reactivo colorante. Para poder realizar la prueba, se hizo una dilución tomando 5 µg de proteína de cada fracción en 95 µL de buffer de fosfatos 25 mM, pH 7.0. Se utilizó como control positivo la tripsina y como control negativo, albúmina. Se agregaron 10 µL de la mezcla anterior para cada fracción en cada pozo de la microplaca de 96 pozos y se dejó reaccionar durante 3 h con 90 µL de solución de caseína a una temperatura de 37°C. En el caso de los blancos, se añadieron 80 µL de agua MQ a los pozos vacíos con 20 µL de las fracciones con sustrato. Se midió la absorbencia de las muestras 595 nm en un equipo lector de microplacas Synergy HT® de la marca BioTek®.

Para determinar la actividad se sigue la siguiente relación:

$$\Delta A_{595} = A_{-Proteasa} - A_{+Proteasa}$$

Donde $A_{-Proteasa}$ está dado por el valor de la absorbancia de los pozos que contienen el sustrato sin la proteasa y $A_{+Proteasa}$ el valor obtenido de la incubación de aquellos pozos que contienen al sustrato junto con la proteasa.

Para determinar los mg de caseína hidrolizada se emplean la pendiente (**9.08179**) y la ordenada al origen (**0.44437**) de la recta generada en la estandarización.

$$U = \frac{\mu M \text{ caseína hidrolizada}}{\text{min}}$$

La actividad enzimática específica corresponderá:

$$U \text{ específica} = \frac{U}{\text{mg proteína}}$$

El proceso estandarizado y detallado se presenta en el Anexo 2.

11. Espectrometría de Masas en Tándem

La espectrometría de masas, es una herramienta analítica que provee información importante del analito, como lo es su estructura, pureza y composición (El-Aneed, Cohen, and Banoub 2009). Una variante es la espectrometría de masas en tándem, abreviada como MS/MS (por sus siglas en inglés), y que se define en términos generales como: “cualquier método que involucre al menos dos etapas de análisis de masas” (Hoffmann 2007), haciendo fragmentar los iones obtenidos del espectro de masas primario, obteniendo el espectro de masas secundario y con ello nueva información (Watson and Sparkman 2007). Esto se logra conectando múltiples analizadores de masa en serie donde el aislamiento del ion se lleva a cabo en el primer analizador seguido de una fragmentación en la celda de colisión mientras que el analizador final separa los fragmentos del ion basándose en su relación masa/carga (m/z) (El-Aneed, Cohen, and Banoub 2009).

La estrategia de digestión de proteínas para la generación de péptidos y su secuenciación utilizando espectrometría de masas en tándem, se le conoce como **Shotgun Proteomics**, la identificación de los péptidos a partir de los espectros MS/MS se desarrolla utilizando diversos programas que analizan las bases de datos disponibles (Nesvizhskii 2006, bk. Mass Spectrom. Data Anal. Proteomics).

El siguiente ensayo se llevó a cabo en el Departamento de Innovación Biomédica (DIB) del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). La enzima purificada se digirió con tripsina para obtener los péptidos tripticos y una vez obtenidos se inyectaron 5 μL a través de un equipo de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) Eksigent NanoLC 400 (AB SCIEX, Foster City, CA), utilizando una columna HALO Phenyl Hexyl 0.5x5cm para la separación analítica. Las fases móviles estaban compuestas por agua/ácido fórmico y acetonitrilo/ácido fórmico (A: 99.8/0.2%, B: 99.8/0.2%). El análisis se llevó a cabo a un flujo de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ durante 120 minutos.

La adquisición de datos se realizó con un espectrómetro de masas TripleTOF 5600 (AB SCIEX, Concord, ON) equipado con una fuente DuoSpray. Los datos fueron procesados con el programa Protein Pilot v4.5 (AB SCIEX, Foster City, CA) utilizando el algoritmo Paragon. Dicho software convierte los datos en bruto (.wiff) en listas de picos para ser comparados e identificados empleando la base de datos de todas las MMP's reportadas en la página web de UniProt (<https://www.uniprot.org/>), descargada en formato FASTA el 15 de octubre del 2018.

VI. Resultados y Discusión

1. Precipitación de proteínas con Sulfato de Amonio ((NH₄)₂SO₄) y análisis electroforético

Para conocer a qué porcentaje de saturación de SA precipitaba nuestra proteína de interés, se hizo un fraccionamiento con distinto porcentaje de saturación 20%, 40%, 60% y 80%. De cada fraccionamiento se tomó una muestra y se cargó en un gel de poliacrilamida al 10% así como en dos zimogramas igual al 10%, uno copolimerizado con caseína y el otro con gelatina (para las MMP's con actividad de gelatinasa) (Figura7).

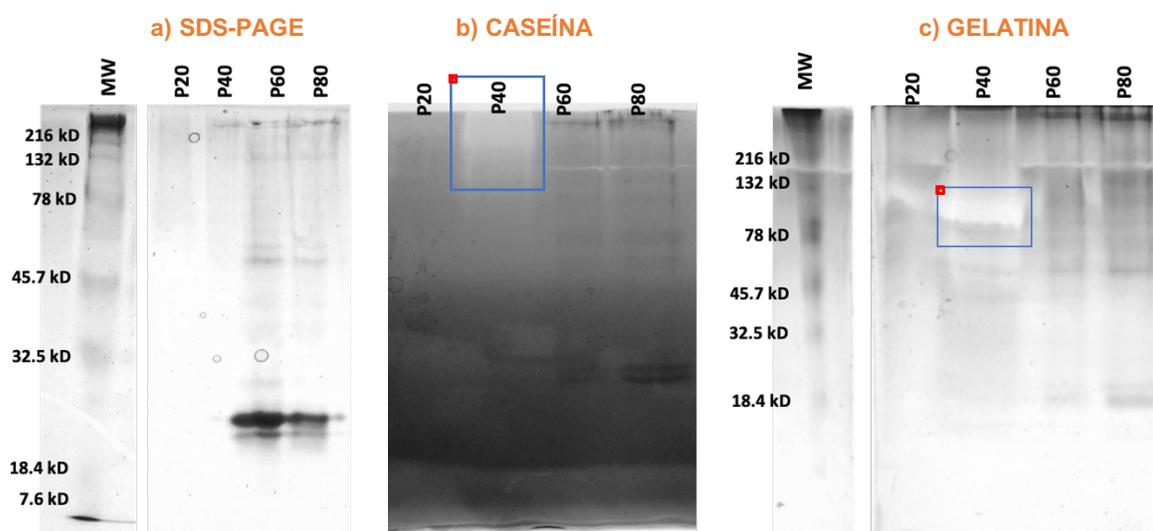


Figura 7. Análisis electroforético de cada fraccionamiento obtenido con SA, la P indica que es de la pared corporal y el número inmediato el porcentaje de (NH₄)₂SO₄ empleado para su obtención. a) SDS-PAGE al 10% de las fracciones. b) Zimograma al 10% copolimerizado con caseína. c) Zimograma al 10% copolimerizado con gelatina.

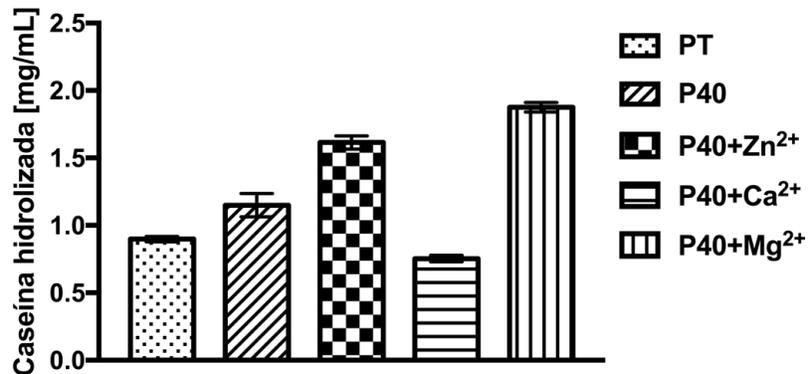
Como se puede apreciar en la Figura 7, la visualización de los extractos con SDS-PAGE, permitió conocer la complejidad de la muestra, observando proteínas entre los 15 kDa y los 200 kDa.

Así mismo, resulta evidente que a partir del 40% de saturación con SA se precipitaban las proteínas con actividad proteolítica, tanto en el zimograma copolimerizado con gelatina ((Figura 7c), P40 recuadro rojo) como con caseína ((Figura 7b), P40 recuadro rojo).

Estos resultados sugieren la presencia de enzimas con actividad proteolítica a ese porcentaje de saturación, por lo cual se empleó como el idóneo para el fraccionamiento.

2. Efecto de los iones sobre la actividad proteolítica

Gráfico 3 Efecto de algunos cationes divalentes sobre la actividad proteolítica del extracto total precipitado al 40% de saturación con SA.



A fin de caracterizar de manera preliminar el tipo de enzimas presentes en el fraccionamiento obtenido a partir de la pared corporal de *H. Inornata*; se probó el efecto de distintos iones metálicos divalentes sobre la actividad proteolítica. Se incubaron 30 μg de proteína con el sustrato (caseína 5 mg/mL) durante 1 h. Así mismo se estudió el efecto de los siguientes iones (5 mM) como sales de cloro, Zn^{2+} , Ca^{2+} y Mg^{2+} en la actividad proteolítica respecto al control (extracto crudo, PT).

Primeramente se observó que la muestra que se fraccionó con el 40% de saturación de SA, presenta mayor actividad que el extracto crudo. Esto posiblemente se debe a un enriquecimiento en la actividad específica dada por la remoción de otros componentes que pueden afectar la actividad proteolítica.

Por otra parte, en presencia de 5 mM de ZnCl_2 existe una mayor actividad respecto a las muestras sin presencia de ningún otro ion divalente, así como respecto a las que se incubaron con CaCl_2 . Se ha reportado la presencia de metalo proteasas o metalo proteinasas de matriz en otras especies de pepino de mar (Lamash and Dolmatov 2013; Wu et al. 2013), estas enzimas se caracterizan por poseer en su centro un ion metálico de Zinc catalítico (Fanjul-Fernández et al. 2010), que podría relacionarse al aumento observado en la actividad, aunque este resultado contrasta con los reportes previos, ya que estos indican que en presencia de este catión no existe un aumento significativo en la actividad (Yavuz et al. 2017) o esta se ve ligeramente afectada (Hernández-Samano et al. 2015).

Los resultados obtenidos en presencia de CaCl_2 mostraron un marcado efecto inhibitorio y son consistentes con la literatura (Wu et al. 2013; Hernández-Samano et al. 2015; Fu et al. 2005; Qi et al. 2007; O'Donoghue and Johnson 1986) ya que no se ha reportado la presencia de proteasas tipo calpaína (dependientes de Ca^{2+}).

Por último, en presencia de MgCl_2 , se observó un aumento sustancial en la actividad, Fu et al. en el 2005 reportaron un recobro y aumento en la actividad en

presencia de Mg^{2+} aunque otros estudios señalan una ligera disminución en la actividad (Hernández-Samano et al. 2015) (Gráfico 3).

3. Cromatografía de afinidad por metales inmovilizados

Para llevar a cabo el aislamiento de la metalo proteasa, se siguió el método reportado por Yavuz *et al.* en 2017 en el cuál se realiza la preparación de un microcompuesto, formado por la polimerización de bentonita-acrilamida-cisteína (BAC) para la purificación de una metalo proteasa de *Candida kefyr*; este microcompuesto se empleó como material de soporte para la adsorción de metalo proteasas y con ello, la posterior purificación; esto debido a que si bien en la literatura existen diversos reportes para la purificación de este tipo de enzimas (Krizkova et al. 2011; Gross and Lapiere 1962; Lamash and Dolmatov 2013; Bode, Gomis-Rüth, and Stöckler 1993) estos resultan complejos y en algunos casos requieren el uso de columnas con anticuerpos inmovilizados (Imai and Okada 2008) lo que eleva mucho los costos.

La bentonita, es un depósito de arcilla que se genera comúnmente por la alteración de material piroclástico o tefra volcánica. Consiste generalmente de montmorillonita, un hidroxisilicato de magnesio y aluminio (Huff 2016). Las arcillas tienen muchas virtudes en diversas áreas, se han utilizado por ejemplo: en la remoción de agentes patógenos, herbicidas, pesticidas, virus, toxinas, metales pesados (Celis et al. 2007; Pierce et al. 2004; Pal and Vanjara 2001; Ulusoy and Akkaya 2009) e incluso, la inmovilización de enzimas (Yeşiloğlu 2005).

Para el uso de la bentonita como material adsorbente, esta se mezcló con acrilamida y bis-acrilamida como agente de entrecruzamiento en presencia de un elemento iniciador de la polimerización y la cisteína como ligando pseudo-específico. Esta técnica es denominada "Cromatografía de Afinidad por Metal Inmovilizado (IMAC, por sus siglas en inglés).

Esta técnica se fundamenta en la interacción del azufre de la cisteína con el catión divalente de zinc presente en el sitio catalítico de la metalo proteasa, la cisteína adsorberá a la enzima y se mantiene unida al material de soporte (bentonita) a través del polímero formado entre la acrilamida y la bis-acrilamida (Figura 8).

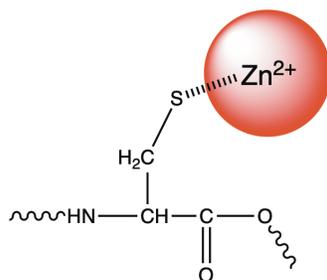


Figura 8. Representación de la interacción entre la cisteína y el catión divalente de zinc de una metaloproteasa.

Para conocer si la síntesis del microcompuesto se había llevado a cabo de manera satisfactoria, se tomaron fotografías mediante microscopía electrónica de barrido (SEM por sus siglas en inglés), la cual nos permitió caracterizar los cambios morfológicos en la superficie de la bentonita (Figura 6) y compararlos con los obtenidos previamente por los autores de este método (Akkaya 2012; Akkaya and Akkaya 2012).

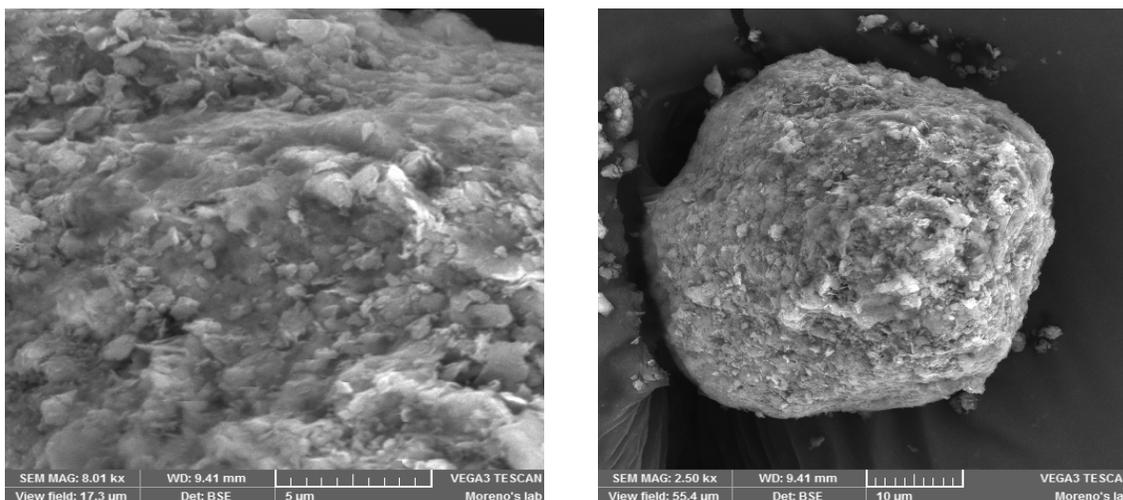


Figura 9. Fotografía de SEM de la bentonita.

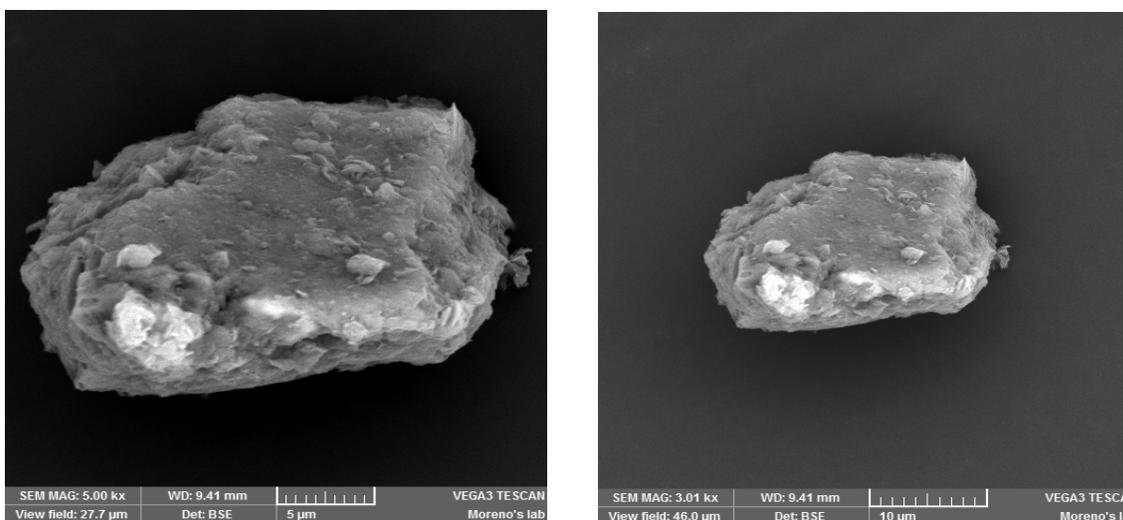


Figura 10. Fotografías de SEM del microcompuesto BAC (Bentonita-acrilamida-cisteína).

Con base en las imágenes obtenidas mediante SEM, se puede apreciar que sí se presentan cambios morfológicos entre la bentonita y el microcompuesto (BAC) (Figuras 6 y 7). En el caso de la bentonita sin reaccionar (Figura 6), se aprecia una superficie más porosa en comparación con la superficie del microcompuesto BAC (Figura 7). Esto se debe a la presencia de la cisteína copolimerizada con la acrilamida, lo que disminuye con ello la porosidad (Akkaya 2012).

Una vez corroborada la correcta formación del microcompuesto BAC, este se utilizó para la adsorción de la proteasa a la superficie formada.

La desorción de la metalo proteasa del BAC se realizó con una concentración creciente de NaCl (0,25 M, 0,75 M y 1 M) y se procedió a determinar la concentración de estos lavados con un espectrofotómetro UV-Vis BioSpec Nano® de la marca Shimadzu® y se determinaron las siguientes concentraciones (Gráfico 5).

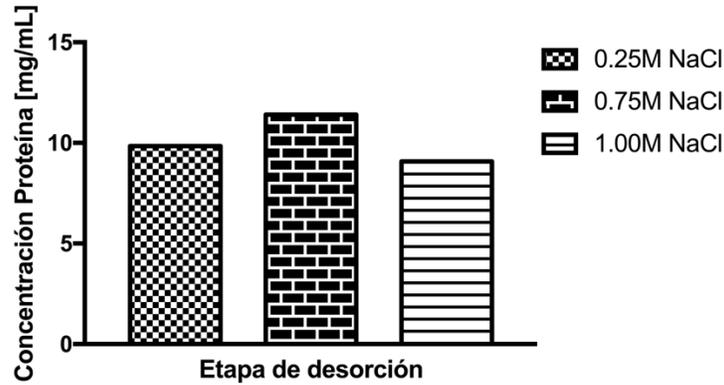


Gráfico 4. Concentración de proteína promedio para cada lavado del BAC.

Posteriormente se procedió a realizar un análisis electroforético en gel de poliacrilamida de la proteína parcialmente purificada (Gráfico 4 (L1 y L2)) y la actividad proteolítica se siguió por zimografía, así mismo por la técnica propuesta por Buroker-Kilgore and Wang 1993, modificada (Gráfico 5 (B)).

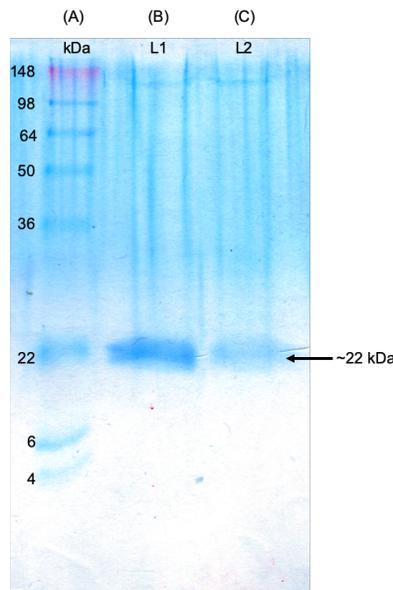


Figura 11. SDS-PAGE de proteína parcialmente purificada por cromatografía de afinidad de la pared corporal de *H. inornata*. 1. Marcador de masa molecular; 2. Desorción con 0.75 M de NaCl; 3. Desorción con 0.25 M de NaCl.

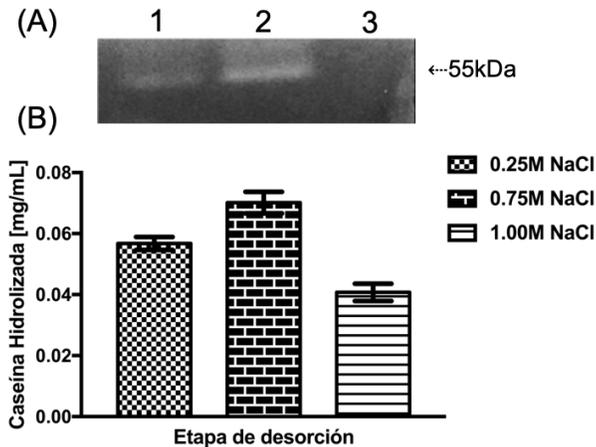


Figura 12. Zimograma y gráfica de actividad de las desorciones obtenidas de la “unión” proteínas del extracto de víscera al microcompuesto bentonita-acrilamida-cisteína. A. Zimograma copolimerizado con caseína de los lavados, (A) Desorción con 0,25 M de NaCl. 2. Desorción con NaCl 0,75 M. 3. Desorción con NaCl 1M. (B) Actividad hidrolítica de los lavados utilizando el ensayo reportado por Buroker-Kilgore & Wang.

Con base en los resultados obtenidos de la desorción (Gráfico 4), se comprueba que el microcompuesto BAC, es efectivo para la adsorción de la proteasa en su superficie. Al realizar el corrimiento electroforético en un zimograma copolimerizado con caseína, destaca una banda que indica una hidrólisis positiva y la cual posee una masa aproximada a los 55 kDa que contrasta con la del gel desnaturizante SDS-PAGE, esto posiblemente se debe a una migración anómala en el gel no desnaturizante (zimograma). Tanto en los carriles 1 y 2 del gráfico 5, la definición de la banda, sinónimo de la hidrólisis de la caseína copolimerizada, aumenta al elevarse la fuerza iónica empleada para despegarla del microcompuesto BAC llegando su máximo a 0.75 M de NaCl. Estos resultados son concordantes con la determinación de la concentración de proteína y se corroboraron por medición de la hidrólisis en placa de 96 pozos utilizando la caseína como sustrato y en ambos resulta consistente ya que en la concentración de 0.75 M de NaCl, la enzima adsorbida en el microcompuesto BAC se despega en una mayor cantidad.

4. Espectrometría de masas en Tándem.

Las muestras anteriores, se digirieron con tripsina y a los péptidos obtenidos se les inyectaron 5 µL de la digestión a través de un equipo de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) acoplado a un espectrómetro de masas Triple TOF. Con base en los espectros de fragmentación MS2 generados en la espectrometría de masas en tándem, se pudo conocer la posible secuencia de los péptidos trípticos con base en las bases datos proporcionados, para así saber si teníamos alguna proteína candidata.

Utilizando un parámetro de confianza al 90% se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 3. Proteínas detectadas por el software respecto a la base de datos de metalo proteasas.

Proteins Detected							
N	Unused	Total	% Cov	Accession #	Name	Species	Peptides(95%)
1	2.00	2.00	4.531000182	sp B7J0N5 FTSH_BORBZ	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH OS= <i>Borrelia burgdorferi</i> (strain ZS7) OX=445985 GN=ftsH PE=3 SV=1	BORBZ	1
2	2.00	2.00	8.765999973	sp Q22495 TSP12_CAEEL	Tetraspanin-12 OS= <i>Caenorhabditis elegans</i> OX=6239 GN=tsp-12 PE=1 SV=1	CAEEL	1
3	2.00	2.00	3.756000102	sp Q8DQN5 ZMPB_STTR6	Zinc metalloprotease ZmpB OS= <i>Streptococcus pneumoniae</i> (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101	STTR6	1

Realizando diversos análisis con los patrones de fragmentación generados por espectrometría de masas (Tablas 7 a 12, Anexo 1) observamos que dos de las proteínas identificadas correspondan a metalo proteasas (Tabla 4); si bien es relevante señalar que para cada proteína solo se identificó una secuencia con un porcentaje de hasta el 99% de confianza).

Tabla 4. Secuencias identificadas al 99% de confianza con base en su espectro de fragmentación.

Proteína	Secuencia al 99% de confianza.
Zinc Metalo proteasa dependiente de ATP de <i>Borrelia burgdorferi</i> .	DVAGQEEVK
Tetraspanina-12 de <i>Caenorhabditis elegans</i> .	NTFVNMLSK
Zinc metalo proteasa de <i>Streptococcus pneumoniae</i> .	DLTEEEK

Para corroborar que estas secuencias no resultaran redundantes, se procedió a analizar cada una mediante un BLAST utilizando los servidores del National Center for Biotechnology Information (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y el servidor UniProt dado por la combinación de E Swiss-Prot, TrEMBL y PIRt (<https://www.uniprot.org/>).

El resultado derivado de estos análisis para la primera secuencia, arroja que ese péptido se encuentra conservado en diversas metalo proteasas dependientes de ATP. Para la segunda secuencia se presentan resultados similares, si bien el servidor de UniProt solo presenta resultados de diversas tetraspaninas hipotéticas y revisadas, el servidor del NCBI (por sus siglas en inglés) no solo mostró resultados para tetraspaninas si no también para otras proteínas, principalmente proteínas hipotéticas de *Clostridium sp.* ó *Micromonas commoda*.

Finalmente la última secuencia, resulta redundante con la base de datos del NCBI debido que arroja resultados para muy diversas proteínas tales como titina de *Chelonia mydas*, hemolisinas de *Magnetococcus marinus*, dineína de *Desmodus rotundus* y proteínas transportadoras de *Fusobacterium necrophorum*; por otro lado en la base de datos del UniProt, la secuencia no arroja ningún resultado.

Para contar con mayor información y más certeza de los datos obtenidos por la espectrometría de masas, se procedió a hacer un análisis con las metalo proteasas reportadas en el filo Echinodermata, tanto de proteínas revisadas como de las hipotéticas, y también con ello, descartar que las metalo proteasas parcialmente identificadas por sus espectros derivaran de una posible contaminación.

Los espectros se asociaron a diversos péptidos trípticos, pero resaltaron los siguientes:

Tabla 5. Péptidos identificados respecto a la base de datos de equinodermos.

Conf	Sequence	Modifications
88.9599979	IAVDDFR	Val->Ala@3
74.7200012	KYNPCPEK	Carbamidomethyl(C)@5; Oxidation(P)@6

Estos se relacionan principalmente a una enzima predicha del erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus*. Concretamente se trata de una desintegrina y metalo proteinasa con motivos de trombospondina similares al tipo 6 (Tabla 6 y Tabla 16, Anexo 1).

Tabla 6. Alineamiento de los péptidos identificados utilizando la herramienta BLAST del NCBI, filtrando los resultados solo para el phylum Echinodermata.

PREDICTED: A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 6-like [<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>]				
Sequence		ID: XP_011681419.1		
Length: 448		Number of Matches: 1		
Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
29.9 bits(63)	0.053	9/13(69%)	9/13(69%)	0/13(0%)
Query 3	NPCPEKIAVDDFR		15	
	NPCP I DDFR			
Sbjct 73	NPCPGIISADDFR		85	

Esta proteína pertenece a la superfamilia de las zinc proteasas, si bien son similares a las MMP's en sus dominios metalo proteasa poseen un único dominio de desintegrina de unión al receptor de integrinas (Seals and Courtneidge 2003). Estas enzimas se caracterizan por estar implicadas en el control de la fusión de membranas, eliminación de citoquinas y factores de crecimiento durante la inflamación así como en la morfogénesis tisular y la fertilización (Seals and Courtneidge 2003; Kelwick et al. 2015).

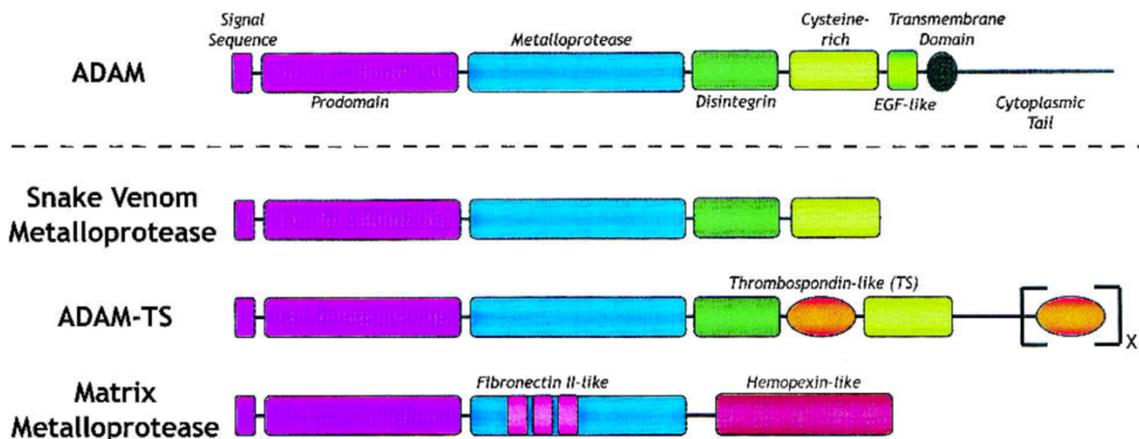


Figura 13. Topografía de las ADAM's y MMP's relacionadas. Se muestran las estructuras de dominio generalizadas de las familias ADAM, SVMP, ADAM-TS y MMP. Se debe tener en cuenta que los miembros de

la familia ADAM-TS tienen un número variable de motivos similares a la trombospondina (TS). La MMP que se muestra es de la clase de las gelatinasas. Otras subclases de MMP's carecen de secuencias tipo hemopexina y/o secuencias tipo fibronectina tipo II. La subclase de MT-MMPs tiene dominios transmembrana y colas citoplásmicas además de los dominios mostrados (Tomado de Seals and Courtneidge 2003).

Si bien esta proteína solo es predicha y pertenece a otro organismo, podría compartirse con otros equinodermos como los pepinos de mar ya que pertenecen al mismo phylum. Aunque esto puede resultar aventurado, se propone con base en la evidencia que se obtuvo, ya que resulta importante señalar que el estudio en estos organismos es escaso y las bases de datos con las que disponemos resultan escasas para dicho fin.

VII. Conclusiones

Existe aún una escasa investigación respecto a la bioquímica de organismos marinos. Si bien se ha desarrollado investigación a profundidad para ciertas especies, la riqueza y potencial de muchas aun es incierto. Las enzimas de organismos marinos, particularmente las proteasas, poseen propiedades únicas que pueden tener un cierto potencial biotecnológico o incluso, permitirían conocer aspectos relacionados a la evolución de las proteasas dado que la aparición de los echinodermos se remonta a inicios del cámbrico (Brusca, Moore, and Shuster 2016).

La investigación en proteasas de pepino de mar es abundante en los países asiáticos, principalmente en Japón. En México ya existen algunos trabajos previos con *S. japonicus*, pero con otras especies no han ahondado lo suficiente para tener más información sobre estas enzimas en los holoturoideos.

Se determinó que al 40% de saturación de SA era la concentración idónea para llevar a cabo la precipitación de las proteasas basados en la actividad observada en los zimogramas de hidrólisis de caseína y gelatina; el efecto de los iones metálicos sugirió la presencia de metalo proteasas. Se propuso la síntesis de un micro compuesto el cual resultó eficaz y facilitó el trabajo desarrollado, disminuyendo los tiempos de purificación y permitiendo la adsorción de una proteína.

Con la cromatografía de líquida tándem espectrometría de masas, se identificó una metalo proteasa con una masa de 22 kDa (en gel desnaturizante, SDS-PAGE) en la pared corporal del pepino de mar. Si bien la homología es baja, las bases de datos de las que se dispone es pobre y resulta problemático que la identificación se asocie a metalo proteasas de bacteria.

VIII. PERSPECTIVAS

La secuenciación de la metalo proteasa aislada, con el fin de conocer su estructura y permitir hacer ensayos posteriores orientados a su homología con otras metalo proteasas reportadas.

IX. Referencias

1. Abedin, Monika, and Nicole King. 2011. "Diverse Evolutionary Paths to Cell Adhesion." *Trends Cell Biol.* 20 (12): 734–42. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.08.002>.Diverse.
2. Abraham, E. P. 1987. "Cephalosporins 1945-1986." *Drugs* 34: 1–14. <https://doi.org/https://doi.org/10.2165/00003495-198700342-00003>.
3. Akkaya, Birnur. 2012. "IgG Purification by Bentonite-Acrylamide-Histidine Microcomposite." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 92: 151–55. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.11.033>.
4. Akkaya, Birnur, and Recep Akkaya. 2012. "Bentonite-Acrylamide-Histidine-Cu (II) Microcomposite for Cytochrome c Adsorption." *Polymers & Polymer Composites* 20 (9): 829–36.
5. Angerer, Lynne, Sofia Hussain, Zheng Wei, and Brian T. Livingston. 2006. "Sea Urchin Metalloproteases: A Genomic Survey of the BMP-1/Tolloid-like, MMP and ADAM Families." *Developmental Biology* 300 (1): 267–81. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.07.046>.
6. Barrett, A. J. 1966. "Chondromucoprotein-Degrading Enzymes." *Nature* 211 (5054): 1188–89. <https://doi.org/10.1038/2111188a0>.
7. Block, Helena, Barbara Maertens, Anne Spriestersbach, Nicole Brinker, Jan Kubicek, Roland Fabis, Jörg Labahn, and Frank Schäfer. 2009. "Chapter 27 Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC). A Review." *Methods in Enzymology* 463 (C): 439–73. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63027-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63027-5).
8. Bode, Wolfram, C. Fernandez-Catalan, H Tschesche, F Grams, H Nagase, and K Maskos. 1999. "Structural Properties of Matrix Metalloproteinases." *CMLS, Cell. Mol. Life Sci* 55: 639–52. <https://doi.org/10.1007/s000180050320>.
9. Bode, Wolfram, Franz Xaver Gomis-Rüth, and Walter Stöckler. 1993. "Astacins, Serralysins, Snake Venom and Matrix Metalloproteinases Exhibit Identical Zinc-Binding Environments (HEXXHXXGXXH and Met-Turn) and Topologies and Should Be Grouped into a Common Family, the 'Metzincins.'" *FEBS Letters* 331 (1–2): 134–40. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80312-I](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80312-I).
10. Brusca, Richard C, Wendy Moore, and Stephen M Shuster. 2016. *Invertebrates*.
11. Burgess, Richard R., and Murray P. Deutscher, eds. 2009. *Guide to Protein Purification*. 2nd ed. San Diego, CA: Academic Press.
12. Buroker-Kilgore, M., and K.K.W. Wang. 1993. "A Coomassie Brilliant Blue G-250-Based Colorimetric Assay for Measuring Activity of Calpain and Other Proteases." *Analytical Biochemistry* 208 (2): 387–92. <https://doi.org/10.1006/abio.1993.1066>.
13. Campos, Ernesto, Víctor Arturo Peláez-Zárate, and Francisco A. Solís-Marín. 2012. "Rediscovery, Hosts and Systematics of Holothuriophilus Trapeziformis Nauck, 1880 (Crustacea, Brachyura, Pinnotheridae)." *Zootaxa* 1880 (3528): 57–62.

14. Canicattí, Calogero. 1990. "Protease Activity in Holothuria Polii Coelomic Fluid and Coelomocyte Lysate." *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry And* 95 (1): 145–48. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(90\)90261-Q](https://doi.org/10.1016/0305-0491(90)90261-Q).
15. Celis, Rafael, Carmen Trigo, Gracia Facenda, María Del Carmen Hermosín, and Juan Cornejo. 2007. "Selective Modification of Clay Minerals for the Adsorption of Herbicides Widely Used in Olive Groves." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (16): 6650–58. <https://doi.org/10.1021/jf070709q>.
16. Christenson, Philip A, Brian J Willis, Felix W Wehrli, and Suzanne Wehrli. 1982. "Chemistry of Ambergris. 1. A Short Synthesis of (.+.-)-Delta.-Ambrinol." *The Journal of Organic Chemistry* 47 (24): 4786–89. <https://doi.org/10.1021/jo00145a040>.
17. Coulon, P., and M. Jangoux. 1993. "Feeding Rate and Sediment Reworking by the Holothuroid *Holothuria Tubulosa* (Echinodermata) in a Mediterranean Seagrass Bed off Ischia Island, Italy." *Marine Ecology Progress Series* 92 (1–2): 201–4. <https://doi.org/10.3354/meps092201>.
18. El-Aneed, Anas, Aljandro Cohen, and Joseph Banoub. 2009. "Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers." *Applied Spectroscopy Reviews* 44 (3): 210–30. <https://doi.org/10.1080/05704920902717872>.
19. Fanjul-Fernández, Miriam, Alicia R. Folgueras, Sandra Cabrera, and Carlos López-Otín. 2010. "Matrix Metalloproteinases: Evolution, Gene Regulation and Functional Analysis in Mouse Models." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1803 (1): 3–19. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.07.004>.
20. Feitosa, Loara, Waldemiro Gremski, Silvio S. Veiga, M. Carolina Q.B. Elias, Edgard Graner, Oldemir C. Mangili, and Ricardo R. Brentani. 1998. "Detection and Characterization of Metalloproteinases with Gelatinolytic, Fibronectinolytic and Fibrinogenolytic Activities in Brown Spider (*Loxosceles Intermedia*) Venom." *Toxicon* 36 (7): 1039–51. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(97\)00083-4](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(97)00083-4).
21. Fu, Xueyan, Chang Hu Xue, Ben Chun Miao, Zhao Jie Li, Xin Gao, and Wen Ge Yang. 2005. "Characterization of Proteases from the Digestive Tract of Sea Cucumber (*Stichopus Japonicus*): High Alkaline Protease Activity." *Aquaculture* 246 (1–4): 321–29. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.01.012>.
22. Fu, Xueyan, Changhu Xue, Benchun Miao, Zhaojie Li, Xin Gao, and Takashi Hirata. 2006. "Distribution and Seasonal Activity Variation of Proteases in Digestive Tract of Sea Cucumber *Stichopus Japonicus*." *Fisheries Science* 72 (5): 1130–32. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2006.01268.x>.
23. Galleguillos C., Marco, Raúl Carrillo G., Gladys Flores, and Héctor Adarmes A. 2014. "Metaloproteinases y Osteoartritis." *Avances En Ciencias Veterinarias* 28 (1): 19–24. <https://doi.org/10.5354/0716-260x.2013.27865>.
24. Gross, J., and C. M. Lapiere. 1962. "Collagenolytic Activity in Amphibian Tissues: A Tissue Culture Assay." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 48 (6): 1014–22. <https://doi.org/10.1073/pnas.48.6.1014>.

25. Gurvan, Michel, Thierry Tonon, Delphine Scornet, J. Mark Cock, and Bernard Kloareg. 2010. "The Cell Wall Polysaccharide Metabolism of the Brown Alga *Ectocarpus Siliculosus*. Insights into the Evolution of Extracellular Matrix Polysaccharides in Eukaryotes." *New Phytologist* 188 (1): 82–97. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03374.x>.
26. Hernández-Samano, A.C., X. Guzmán-Gracia, R. García-Barrientos, F. Ascencio-Valle, A. Sierra-Beltrán, B. Vallejo-Córdoba, A.F. González-Córdoba, M.J. Torres-Llanez, and I. Guerrero-Legarreta. 2015. "Extracción y Caracterización de Proteasas de Pepino de Mar *Isostichopus Fuscus* Recolectado El El Golfo de California, México." *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 10 (1): 17–28.
27. Hernández-Samano, Arisai del Carmen. 2010. "Identificación y Caracterización de Proteasas de Pepino de Mar." UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA.
28. Hoffmann, E.D. 2007. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. Edited by John Ltd. 3rd ed. Wiley-Interscience.
29. Honey-Escandón, Magali, and Francisco Alonso Solís-Marín. 2018. "A Revision of *Holothuria* (*Halodeima*) *Kefersteinii* (Selenka, 1867) and the Revival of *Holothuria Inornata* Semper, 1868 from Sea Cucumbers Collected in Mexico and Central America." *Zootaxa* 4377 (2): 151. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4377.2.1>.
30. Huff, Warren D. 2016. "K-Bentonites: A Review." *American Mineralogist* 101 (1): 43–70. <https://doi.org/10.2138/am-2016-5339>.
31. Imai, Kazushi, and Yasunori Okada. 2008. "Purification of Matrix Metalloproteinases by Column Chromatography." *Nature Protocols* 3 (7): 1111–24. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.74>.
32. Itoh, Toshiki, Takeshi Ijuin, and Tadaomi Takenawa. 1998. "A Novel Phosphatidylinositol-5-Phosphate 4-Kinase (Phosphatidylinositol-Phosphate Kinase II γ) Is Phosphorylated in the Endoplasmic Reticulum in Response to Mitogenic Signals." *Journal of Biological Chemistry* 273 (32): 20292–99. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.32.20292>.
33. Jain, Abhilash, Jagdeep Nanchahal, Linda Troeberg, Patricia Green, and Fionula Brennan. 2001. "Production of Cytokines, Vascular Endothelial Growth Factor, Matrix Metalloproteinases, and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 1 by Tenosynovium Demonstrates Its Potential for Tendon Destruction in Rheumatoid Arthritis." *Arthritis and Rheumatism* 44 (8): 1754–60. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200108\)44:8<1754::AID-ART310>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200108)44:8<1754::AID-ART310>3.0.CO;2-8).
34. Jamieson, A. J., A. Gebruk, T. Fujii, and M. Solan. 2011. "Functional Effects of the Hadal Sea Cucumber *Elpidia Atakama* (Echinodermata: Holothuroidea, Elaspodida) Reflect Small-Scale Patterns of Resource Availability." *Marine Biology* 158 (12): 2695–2703. <https://doi.org/10.1007/s00227-011-1767-7>.
35. Kelwick, Richard, Ines Desanlis, Grant N Wheeler, and Dylan R Edwards. 2015. "The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs) Family." *Genome Biology* 16 (1). <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0676-3>.

36. Krizkova, Sona, Ondrej Zitka, Vojtech Adam, Rene Kizek, Michal Masarik, Marie Stiborova, Tomas Eckschlager, and Grace J. Chavis. 2011. "Assays for Determination of Matrix Metalloproteinases and Their Activity." *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 30 (11): 1819–32. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.06.016>.
37. Lamash, Nina E., and Igor Yu Dolmatov. 2013. "Proteases from the Regenerating Gut of the Holothurian Eupentacta Fraudatrix." *PLoS ONE* 8 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058433>.
38. Leber, Thomas M., and Frances R. Balkwill. 1997. "Zymography: A Single-Step Staining Method for Quantitation of Proteolytic Activity on Substrate Gels." *Analytical Biochemistry* 249 (1): 24–28. <https://doi.org/10.1006/abio.1997.2170>.
39. López-Otín, Carlos, and Judith S. Bond. 2008. "Proteases: Multifunctional Enzymes in Life and Disease." *Journal of Biological Chemistry* 283 (45): 30433–37. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800035200>.
40. Low Pfeng, Antonio, and Edward Peters. 2014. *La Frontera Final: El Océano Profundo*. SEMARNAT-INE.
41. Martínez Cuesta, Sergio, Syed Asad Rahman, Nicholas Furnham, and Janet M. Thornton. 2015. "The Classification and Evolution of Enzyme Function." *Biophysical Journal* 109 (6): 1082–86. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.04.020>.
42. Matthiesen, Rune, ed. 2006. *Mass Spectrometry Data Analysis in Proteomics*. *Mass Spectrometry Data Analysis in Proteomics*. Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1597452750>.
43. McGettigan, S., M. Canning, G. O'Cuinn, and D. B. Johnson. 1981. "Peptide Hydrolases in Holothurian Intestinal Mucosa." *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Comparative* 69 (1): 169–70. [https://doi.org/10.1016/0306-4492\(81\)90123-4](https://doi.org/10.1016/0306-4492(81)90123-4).
44. McGovern, Patrick E., and Rudolph H. Michel. 1985. "Royal Purple Dye: Tracing Chemical Origins of the Industry." *Analytical Chemistry* 57 (14): 1514A-1522A. <https://doi.org/10.1021/ac00291a753>.
45. Murphy, Gillian, and Vera Knäuper. 1997. "Relating Matrix Metalloproteinase Structure to Function: Why the 'Hemopexin' Domain?" *Matrix Biology* 15 (8–9): 511–18. [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(97\)90025-1](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(97)90025-1).
46. Murphy, Gillian, and Hideaki Nagase. 2009. "Progress in Matrix Metalloproteinase Research." *Molecular Aspects of Medicine* 29 (5): 290–308. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.05.002>.
47. Nasri, Moncef, Kemel Jellouli, Rafik Balti, Nabil Souissi, Ali Bougatef, and Rim Nasri. 2010. "Biochemical Properties of Anionic Trypsin Acting at High Concentration of NaCl Purified from the Intestine of a Carnivorous Fish: Smooth Hound (*Mustelus Mustelus*)." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (9): 5763–69. <https://doi.org/10.1021/jf100534a>.
48. O'Donoghue, Gerard V., and Desmond B. Johnson. 1986. "A Soluble Aminopeptidase of *Holothuria Forskali* Intestinal Mucosa: Purification and Active Centre Studies." *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry And* 85 (2): 397–405. [40](https://doi.org/10.1016/0305-

</div>
<div data-bbox=)

- 0491(86)90019-2.
49. Pal, O. R., and A. K. Vanjara. 2001. "Removal of Malathion and Butachlor from Aqueous Solution by Clays and Organoclays." *Separation and Purification Technology* 24 (1–2): 167–72. [https://doi.org/10.1016/S1383-5866\(00\)00226-4](https://doi.org/10.1016/S1383-5866(00)00226-4).
 50. Pasten, Consuelo, Rey Rosa, Stephanie Ortiz, Sebastián González, and José E. García-Arrarás. 2012. "Characterization of Proteolytic Activities during Intestinal Regeneration of the Sea Cucumber, *Holothuria Glaberrima*." *International Journal of Developmental Biology* 56 (9): 681–91. <https://doi.org/10.1387/ijdb.113473cp>.
 51. Pawson, David L. 2007. "Phylum Echinodermata*." *Zootaxa* 764: 749–64.
 52. Pierce, Richard H., Michael S. Henry, Christopher J. Higham, Patricia Blum, Mario R. Sengco, and Donald M. Anderson. 2004. "Removal of Harmful Algal Cells (*Karenia Brevis*) and Toxins from Seawater Culture by Clay Flocculation." *Harmful Algae* 3 (2): 141–48. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2003.09.003>.
 53. Porath, Jerker, Jan Carlsson, Ingmar Olsson, and Greta Belfrage. 1975. "Metal Chelate Affinity Chromatography, a New Approach to Protein Fractionation." *Nature* 258 (5536): 598–99. <https://doi.org/10.1038/258598a0>.
 54. Qi, H., X. P. Dong, L. N. Cong, Y. Gao, L. Liu, T. Mikiro, and B. W. Zhu. 2007. "Purification and Characterization of a Cysteine-like Protease from the Body Wall of the Sea Cucumber *Stichopus Japonicus*." *Fish Physiology and Biochemistry* 33 (2): 181–88. <https://doi.org/10.1007/s10695-007-9129-6>.
 55. Raffetto, Joseph D., and Raouf A. Khalil. 2008. "Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Vascular Remodeling and Vascular Disease." *Biochemical Pharmacology* 75 (2): 346–59. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.07.004>.
 56. Rani, Kirti, Rachita Rana, and Sanchi Datt. 2012. "Review on Latest Overview of Proteases." *International Journal of Current Life Sciences* 2 (1): 12–18.
 57. Rao, Mala B., Aparna M. Tanksale, Mohini S. Ghatge, and Vasanti V. Deshpande. 1998. "Molecular and Biotechnological Aspects of Proteases." *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS* 62 (3): 597–635.
 58. Ruiz, J. Francisco, Christian M. Ibáñez, and Cristian W. Cáceres. 2007. "Morfometría Del Tubo Digestivo y Alimentación Del Pepino de Mar *Athyonidium Chilensis* (Semper, 1868) (Echinodermata: Holothuroidea)." *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 42 (3): 269–74.
 59. Santos-Beltrán, C., and P. Salazar-Silva. 2011. "Holoturoideos (Echinodermata: Holothuroidea) de Playas Rocosas, Zona Norte de Bahía de Banderas, Nayarit, México." *Ciencia y Mar* 15 (45): 3–11.
 60. Schneider, Kenneth, Jacob Silverman, Erika Woolsey, Hampus Eriksson, Maria Byrne, and Ken Caldeira. 2011. "Potential Influence of Sea Cucumbers on Coral Reef CaCO₃ Budget: A Case Study at One Tree Reef." *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences* 116 (4): 2–7. <https://doi.org/10.1029/2011JG001755>.

61. Seals, Darren F, and Sara A Courtneidge. 2003. "The ADAMs Family of Metalloproteases : Multidomain Proteins with Multiple Functions." *Genes & Development*, no. 616: 7–30. <https://doi.org/10.1101/gad.1039703.GENES>.
62. Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, and D. C. Klenk. 1985. "Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid." *Analytical Biochemistry* 150 (1): 76–85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7).
63. Solís-Marín, Francisco Alonso, J. A. Arriaga-Ochoa, A. Laguarda-Figueras, S. C. Frontana-Urbe, and A. Durán-González. 2009. *Holoturoideos (Echinodermata: Holothuroidea) Del Golfo de California. Journal of Experimental Psychology: General*. 1st ed. Vol. 136. Mexico: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
64. Solís-Marín, Francisco Alonso, Alfredo Laguarda-Figueras, and Magali Honey-Escandón. 2014. "Biodiversidad de Equinodermos (Echinodermata) En México." *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85 (SUPPL.): 441–49. <https://doi.org/10.7550/rmb.31805>.
65. Sternlicht, Mark D., and Zena Werb. 2001. "How Matriz Metalloproteinases Regulate Cell Behavior." *Annu Rev Cell Dev Biol*. 17: 463–516. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.17.1.463>.
66. Sulkowski, Eugene. 1985. "Trends in Biotechnology Purification of Proteins by IMAC." *Proteins*, no. January.
67. Tarlton, J F, C V Whiting, D Tunmore, S Bregenholt, J Reimann, M H Claesson, and P W Bland. 2000. "The Role of Up-Regulated Serine Proteases and Matrix Metalloproteinases in the Pathogenesis of a Murine Model of Colitis." *The American Journal of Pathology* 157 (6): 1927–35. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64831-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64831-6).
68. Tejada, Armando, R.M Montesinos, and R Guzmán. 2011. *Bioseparaciones*. Edited by Carlos Mario Ramírez Torres and Marianna Lyubarets. 2nd ed. Pearson.
69. Tipton, Keith, and Sinéad Boyce. 2000. "History of the Enzyme Nomenclature System." *Bioinformatics* 16 (1): 34–40.
70. Trincone, Antonio, ed. 2013. *Marine Enzymes for Biocatalysis. Marine Enzymes for Biocatalysis*. Woodhead Publishing Limited.
71. Troeberg, Linda, and Hideaki Nagase. 2004. "Zymography of Metalloproteinases." *Current Protocols in Protein Science*, 21.15.1-21.15.12. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps2115s33>.
72. Ulusoy, Ulvi, and Recep Akkaya. 2009. "Adsorptive Features of Polyacrylamide-Apatite Composite for Pb²⁺, UO₂²⁺ and Th⁴⁺." *Journal of Hazardous Materials* 163 (1): 98–108. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.06.064>.
73. Verma, Sonia, Rajnikant Dixit, and Kailash C. Pandey. 2016. "Cysteine Proteases: Modes of Activation and Future Prospects as Pharmacological Targets." *Frontiers in Pharmacology* 7 (APR): 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00107>.
74. Visse, Robert, and Hideaki Nagase. 2003. "Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry." *Circulation Research* 92 (8): 827–39.

- <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D>.
75. Watson, Jack Throck, and Orrin David Sparkman. 2007. *Introduction to Mass Spectrometry. Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation. Journal of Chemical Information and Modeling*. Vol. 53. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
76. Woessner, J. F. 1991. "Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Connective Tissue Remodeling." *The FASEB Journal* 5 (8): 2145–54. <https://doi.org/10.1096/fasebj.5.8.1850705>.
77. Wu, Hai Long, Ya Qin Hu, Jian Dong Shen, Qiu Feng Cai, Guang Ming Liu, Wen Jin Su, and Min Jie Cao. 2013. "Identification of a Novel Gelatinolytic Metalloproteinase (GMP) in the Body Wall of Sea Cucumber (*Stichopus Japonicus*) and Its Involvement in Collagen Degradation." *Process Biochemistry* 48 (5–6): 871–77. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.04.011>.
78. Yavuz, Sevgi, Samet Kocabay, Serap Çetinkaya, Birnur Akkaya, Recep Akkaya, Ali Fazil Yenidunya, and Mustafa Zahir Bakıcı. 2017. "Production, Purification, and Characterization of Metalloprotease from *Candida Kefyr* 41 PSB." *International Journal of Biological Macromolecules* 94: 106–13. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.006>.
79. Yeşiloğlu, Yeşim. 2005. "Utilization of Bentonite as a Support Material for Immobilization of *Candida Rugosa* Lipase." *Process Biochemistry* 40 (6): 2155–59. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.08.008>.
80. Zeng, Zhao-Shi, Wei-Ping Shu, Alfred M. Cohen, and José G. Guillem. 2002. "Matrix Metalloproteinase-7 Expression in Colorectal Cancer Liver Metastases: Evidence for Involvement of MMP-7 Activation in Human Cancer Metastases." *Clinical Cancer Research* 8 (1): 144–48. <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L34101470%5Cnhttp://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE&issn=10780432&id=doi:&title=Matrix+metalloproteinase-7+expression+in+colorectal+cancer+liver+metastases%3A+Evidence+for+invo>.

A. Anexo 1, resultados ProteinPilot

Tabla 7 Proteínas detectadas por grupo.

Proteins in Group					
N	Unused	Total	Accession #	Name	Species
1	2.00	2.00	sp B7J0N5 FTSH_BORBZ	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH OS=Borrelia burgdorferi (strain ZS7) OX=445985 GN=ftsH PE=3 SV=1	BORBZ

Tabla 8 Péptidos identificados en la muestra con base en su espectro y que podrían aparecer en la secuencia de la proteína candidato.

Peptides in Group										
Contrib	Conf	Sequence	Modifications	Cleavages	ΔMass	Prec MW	z	Sc	Spectrum	Type
2.00	99	DVAGQEEVK			0.0148	973.49	2	11	1.1.1.3638.2	Winner
0	91.9	QVTVSLPDIKEREAILNIHSLKTK	Gln->Asp@1; Deamidated(N)@17	missed K-E@10; missed R-E@12; missed K-T@22	-0.2086	2719.3	4	10	1.1.1.8314.2	Winner
0	91.9	QVTVSLPDIK	Deamidated(Q)@1; Val->Ala@2		-0.1115	1071.5	2	11	1.1.1.4318.2	Winner
0	< 1	DKILMGVAK		missed K-I@2	-0.0182	973.54	2	3	1.1.1.9976.2	Winner
0	< 1	DMEEARDK		missed R-D@6	0.0382	992.46	2	5	1.1.1.6823.2	Winner
0	< 1	DMEEARDK		missed R-D@6	0.0355	992.46	2	6	1.1.1.6824.2	Winner
0	< 1	DMEEARDK		missed R-D@6	0.0377	992.46	2	6	1.1.1.6860.3	Winner
0	< 1	DMEEARDK		missed R-D@6	0.0377	992.46	2	6	1.1.1.6863.2	Winner
0	< 1	KNSPCIIFIDELDAVGR	Carbamidomethyl(C)@5; Ile->Asp@7	missed K-N@1	-0.1205	1947.8	3	8	1.1.1.9692.2	Winner
0	< 1	MVTEWGMGEEVGPIF	Gly->Ser@12	cleaved F-L@C-term	0.0238	1710.8	2	6	1.1.1.10872.2	Winner
0	68	NKKVELSSGK	Deamidated(N)@1; Carbamyl(K)@3	missed K-K@2; missed K-V@3	-0.0644	1132.5	2	10	1.1.1.2996.2	Winner
0	< 1	SMTITDR			0.0141	822.4	2	6	1.1.1.8894.2	Winner
0	< 1	SMTITDR			0.0137	822.4	2	6	1.1.1.8900.2	Winner
0	< 1	SNNKKNK		missed K-K@4; missed K-K@5; missed K-N@6	-0.0246	959.53	2	4	1.1.1.9921.2	Winner

Tabla 9 Cobertura de la secuencia de la proteína candidato.

Protein Sequence Coverage
MNGNNMNNNGK SNNKKNK NWILGLVVVFLISAIFMSYFIRGGESYKNVPYSTFQSYLDNGLVESVVIDKNLIQFVVKGSNFAKSYFSTSIPLYLDINLLSEL NKKVELSSGK SQASLI GVLLQTLPWILFFIFRQTQGGGKVFTEFGKSNAQKYEAGKNKITFK DVAGQEEVK QELREVVEFLKNPKKFEKIGAKIPKGVLLVGSPGTGKTLAKAVAGEAGVSFFHMSGSD FVEMFVGVGASRVRLFDNARKNSPCIIFIDELDAVGRSRGAGLGGGHDEREQTLNQLLVEMDGFTHTNVIVMAATNRPDVLDSALLRPGRFDRQVTVSLPDIKEREAILNIHSLKTK LSKDINLQVIARATPGASGADLANLINEGALIAARNNQDEILMK DMEEARDK ILMGVAKK SMTITDR QKLETAYHEAGHALLHYYLEHADPLHKVTIIPRGRALGVAFSLPREDRLSINKH QILDKIKICYGGYASEQINLGVTTAGVQNDLMQATSLAKK MVTEWGMGEEVGPIF LVDDDEAPIFLPKEFSKAKAYSENTADKVDREVKRILEECLKEASDILLKHKDQLVKLAKELVLKET LTDKEVRELLGFEANKDEYDLFSSDSTTKEVKGEDVKG

Tabla 10 Proteínas detectadas por grupo.

Proteins in Group					
N	Unused	Total	Accession #	Name	Species
2	2.00	2.00	sp Q22495 TSP12_CAEEL	Tetraspanin-12 OS=Caenorhabditis elegans OX=6239 GN=tsp-12 PE=1 SV=1	CAEEEL

Tabla 11 Péptidos identificados en la muestra con base en su espectro y que podrían aparecer en la secuencia de la proteína candidato.

Peptides in Group										
Contrib	Conf	Sequence	Modifications	Cleavages	ΔMass	Prec MW	z	Sc	Spectrum	Type
2.00	99	NTFVNMLSK	Phospho(S)@8		0.035845	1132.53	2	7	1.1.1.3035.2	Winner
0	<1	SDILAQR			-0.0511923	801.383301	2	4	1.1.1.7500.2	Winner
0	<1	YAPGAGGESEI		cleaved I-S@C-term	-0.0217568	1049.44482	2	6	1.1.1.4925.2	Winner

Tabla 12 Cobertura de la secuencia de la proteína candidato.

Protein Sequence Coverage
MANRRQPVQHRAQQRVYRQSQIR YAPGAGGESEI SCCVKYSVFSFNVIFFLLGFGLLLFGVWAQIEK NTFVNMLSK ASKLYLDPTWPLLIVGFLTFIIGFSGCVGSLRENTSFLTFYSTL LGLLLIAEFSAGVFAYACRDQLDNYIRNLLNDVVGYRDDPDLQLLIDSMQETWMCCGINGADDWDRNTYFSIEAREVASPEAGGVPFSCCINSSKLEFKNYFCGHGVRLKPESHMAA HLAAQRVMAHTASIYTEGCLPKLQLWLNMMMLLVAVSMVIIQVVGICFAQNLK SDILAQR AKWYYTH

Tabla 13 Proteínas detectadas por grupo.

Proteins in Group					
N	Unused	Total	Accession #	Name	Species
3	2.00	2.00	sp Q8DQN5 ZMPB_STRR6	Zinc metalloprotease ZmpB OS=Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6) OX=171101	STTR6

Tabla 14 Péptidos identificados en la muestra con base en su espectro y que podrían aparecer en la secuencia de la proteína candidato.

Peptides in Group										
Contrib	Conf	Sequence	Modifications	Cleavages	ΔMass	Prec MW	z	Sc	Spectrum	Type
2.00	99	DLTEEEK			0.00702878	862.399048	2	9	1.1.1.378.2	Winner
0	<1	LDSREK		missed R-E@4	-0.04183	746.350464	2	3	1.1.1.2634.2	Winner
0	<1	TDESNLVK	Phospho(S)@4	cleaved L-T@N-term	0.0415358	984.458069	2	5	1.1.1.4641.2	Winner
0	<1	SSVALDSAEVK	Phospho(S)@7	cleaved L-S@N-term	-0.047396	1184.48523	2	5	1.1.1.5798.2	Winner
0	<1	SKQIQSISQAEA	Phospho(S)@1; Deamidated(Q)@5; Phospho(S)@8	cleaved A-D@C-term; missed K-Q@2	-0.014666	1449.56433	2	7	1.1.1.7045.2	Winner
0	<1	APQDEIIK	Phospho(D)@4	cleaved Q-A@N-term	-0.0033531	992.454651	2	7	1.1.1.7464.2	Winner
0	<1	DLAGMDDKNIK	Ala->Ser@3	missed K-N@8	0.0109115	1234.59729	2	8	1.1.1.8961.2	Winner
0	<1	SDEVAEKALLK		cleaved N-S@N-term; missed K-A@7	-0.0571778	1201.59827	2	4	1.1.1.11183.2	Winner
0	<1			cleaved I-S@C-term	-0.0217568	1049.44482	2	6	1.1.1.4925.2	Winner
0	<1	GTQEEGKEGQA		cleaved A-P@C-term; missed K-E@7	-0.0067521	1132.49292	2	7	1.1.1.224.2	Winner
0	<1	GTQEEGKEGQA		cleaved A-P@C-term; missed K-E@7	-0.0067521	1132.49292	2	7	1.1.1.226.2	Winner

Tabla 15 Cobertura de la secuencia de la proteína candidato.

Protein Sequence Coverage
MFKKDRFSIRKIKGVVGSVFLGSLLMAPSVVDAATYHYVNKEIISQEAKDLIQTGKPDREVVYGLVYQDKQLPQTGTEASVLTAFGLLTVGSLLLIYKRKIASVFLVGTMLVLP GAVDPVATLALASREGVEMEGYRYVGYLSGDILKTLGLDVTLEETSAPKPEVTVVEVETPQSTTNQEQARTENQAVVETEEAPKEEAPKTEESPKEEPKSEVKPTDDTLPKVEEGKE DSAEPAPVEEVGGEVESKPEEKVAVKPESQPSDKPAEESKVEQAGEPVAPRKDEQAPVEPENQPEAPEEESKVEEETPKQEESTPDTKAEETVEPKKEETKTAK GTQEEGKEGQA PV QEVNPEYKVTGTVEKSTESSELDFTTEVVPDDTKYVDEEVVERQSGKGVQVTKTYETVEVETDKVLSTTTEVKTPVVPKVVKKGTCPVETREEVIFPATKEQEDDTLKRGTRQVAQ EGVNGKKQITETYKTIRGEKTNEAPTVEETVLQ APQDEIIK KGTGKLEKPTLQWANTEKDLVKKSATASYTLTKPAGVEIKSIKALKDKDGQLVKEVVAENLNATLDKLYYQGYTL STTMVYDRGEGEETEKLEDKQIQLDLKKVEIKNIKETSLMNVDAEGNETDKSLLSEKPTDVSQYLRLVTTHDNKVTRLAVSSVEEVVDGKTLKYVVAKAPDLVQRADDTLSEEYVHY FEKQLPKVNNVYVNFNELVKDMQANPMGEFKLGADLNAVNVKPAKAYVMAKFRGTLSSVENHQYTIHNLERPLFNEAEGATLKNFNLGNVNINMPWADKVAPIGNMFKKSTLENIK VVGSVTGNNNDVTGAVNKLDEANMRNVAFIGKINSLGDKGWWWSGGLVSESWRSNTDSVYFDGDIVGNNSKFGGLVAKVNHGNSQWVDVKQKGRLTNSVVKGTMTLKNHGQSGGLV HENYDWGWVENNISMVMKVNNGEIMYGSISIDGDPYFGDFYFKNNYVYKDVATGESTYKR SKQIQSISQAEA DAKIANMGITANTFAIQDPVVNKLNRIRDSEYKAIQDYQETRNL YRNLEKLPFYNKWIVNQGNKL TDESNLVK KTVLSVTGMKSGQFVTDLSSVDKIMIHADGTKEEFVSAISDSRVKQVKEYNVDDLGVVYTPNMVVDKNRDSLITKVKEKLSVALD SAEVKSITNPNASLYLEESFAEVRETLDKLVKSLLENEDHQLN SDEVAEKALLK KVEDNKAKIILALTYLNRYGIDYDGLNFKHLMFMFKPDFYGTPTSDILDFLIRIGSAEKNLKGDRSLE AYREVIGGTIGKAGELNGLLGYNMRLFTKYTDLNDWFIHAANKVYVSEPTTTDFKDKRHRIYDGLNNDVHGRMILPLLNLKKAHIFVISTYNTIAFSSFEKYGKNTTEERNAYKAEIDRV AKAQQRYLDFWSRLALPKVRNQLLKSQNSVPTPVWDNQVYVGLGGANRMGYGDGGRVPTVRELFGPTDRWHQINWNMGAMAKIYERPWKDDQVYFMVTNMMPEFGISAFTHE TTHVNDRMAYYGGDWHREGTDLEAFAQGMLQTPDKSTTNGEY GALGINMAYERKNDGEQLYNYDPEK LDSREK IDSYMKNYNESMMMLDYLEASAVIRQNLSDNSKWFKKMDKE WRTNADRNRILIGEPHQWDLR DLTEEEK KLPIDSIDKLVENNFVTLHGMPKNGRYRTEGFDSSYQPVNMMAGVFGGNTSKSTVGSISFKHNAFRMWGYGYENGFIPIVYVSNKLGKGA ANKENKGLLGDDFIKKVSKNQFNLEEWKHHWYHEVYDKAQKGFVEIEVDGKISTYAQLQSLFEEAVSK DLAGMDDKNIK NHYQYTENLKWIKYKQLLKNNTDGFSSDLFTAPQA

Tabla 16 Resultado del alineamiento de las secuencias identificadas con base en la herramienta BLAST.

	query acc.ver	subject acc.ver	% identity	alignment length	mismatches	gap opens	q. start	q. end	s. start	s. end	e-value	bit score	% positives
PREDICTED: A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 6-like [<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>]	Query_109943	XP_011681419.1	69.231	1 3	4	0	3	1 5	7 3	8 5	0.053	29.9	6 9 . 2 3
hypothetical protein BSL78_07736 [<i>Apostichopus japonicus</i>]	Query_109943	PIK55366.1	6 0	1 5	0	1	6	1 4	495	509	1 . 2	26.1	6 0
PREDICTED: uncharacterized protein LOC579064 [<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>]	Query_109943	XP_011665649.1	1 0 0	7	0	0	9	1 5	1692	1698	1 . 2	26.1	1 0 0
importin-11-like [<i>Acanthaster planci</i>]	Query_109943	XP_022099682.1	1 0 0	7	0	0	8	1 4	540	546	1 . 7	25.7	1 0 0
PREDICTED: importin-11 [<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>]	Query_109943	XP_011672007.1	1 0 0	7	0	0	8	1 4	540	546	1 . 7	25.7	1 0 0

B. Anexo 2 Metodología detallada.

SDS-PAGE

Para la preparación de los geles unidimensionales SDS-PAGE se prepararon las siguientes soluciones (Anexo 3):

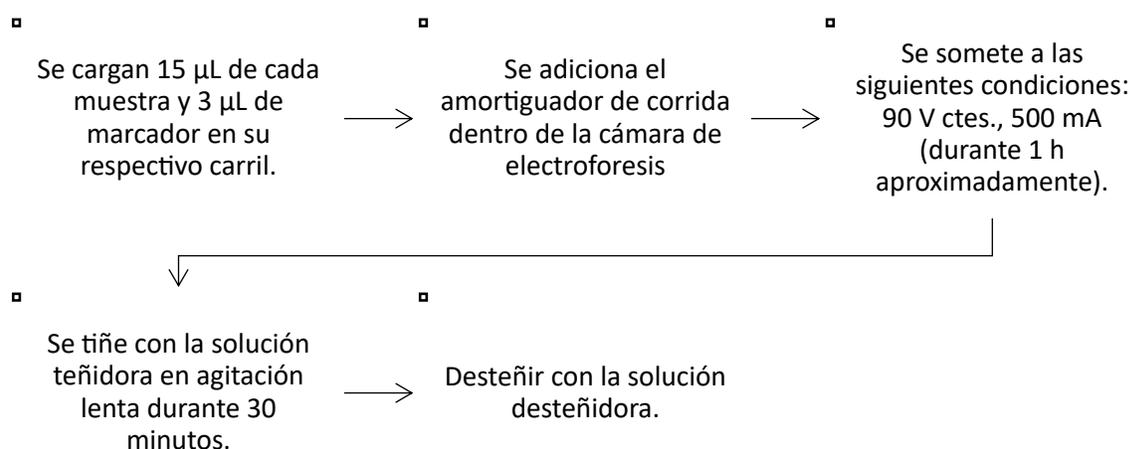
- A) Acrilamida/bis (30 % T, 2.67 % C).
- B) Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8.
- C) Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8.
- D) Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10 %.
- E) Amortiguador muestra: SDS al 10 %, mercaptoetanol al 5 %, azul de bromofenol al 0.05 %, glicerol al 10 % y Tris-HCl 0.5M, pH 6.8.
- F) Amortiguador de corrida pH 8.3: Tris base al 1.5 %, glicina al 0.7 % y SDS al 0.5 %.
- G) Solución teñidora: Azul de Coomassie R-250 al 0.1 %, metanol al 40 % y ácido acético al 10 %.
- H) Solución desteñidora: metanol al 40 % y ácido acético al 10 %.
- I) Agua destilada

Una vez listas las soluciones correspondientes, se prepararon los geles de separación y concentración según lo indica la siguiente tabla.

Volumen para el Gel de separación (mL)				
	12%	10%	8%	6%
Agua destilada	0.560	1.28	1.996	2.72
Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8	3	3	3	3
SDS 10%	0.08	0.08	0.08	0.08
Bis/Acrilamida	4.32	3.6	2.884	2.16
Persulfato de Amonio 20%	0.040	0.040	0.040	0.040
TEMED	0.005	0.005	0.005	0.005

Volumen para el Gel de concentración (mL)	
	4.8%
Agua destilada	2.8
Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	0.6625
SDS 10%	0.050
Bis/Acrilamida	1
Persulfato de Amonio	0.025
TEMED	0.005

Una vez listos los geles se continuó con la siguiente metodología:



Zimografía

Las soluciones y metodología para llevar a cabo la zimografía fueron adaptadas de Troeberg & Nagase, 2004.

La preparación de las soluciones es similar que para la SDS-PAGE excepto por las siguientes las cuales se detallan en el anexo 3:

- Solución de sacarosa 1.46 M
- Solución de sustrato de caseína 10X
- Buffer de carga no reductor

Volumen para el Gel separador (mL)				
	12%	10%	7.5%	6%
Agua destilada	0.13	0.42	0.74	0.94
Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8	1.0	1.0	1.0	1.0
Solución de sustrato de caseína 10x	0.4	0.4	0.4	0.4
Solución de sacarosa	0.86	0.86	0.86	0.86
Bis/Acrilamida	1.61	1.32	1.0	0.8
Persulfato de Amonio	0.014	0.014	0.014	0.014
TEMED	0.0015	0.0015	0.0015	0.0015

Volumen para el Gel de concentración (mL)	
	4.8%
Agua destilada	0.428
Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	0.285
Solución de sacarosa	0.285
Bis/Acrilamida	0.142
Persulfato de Amonio	0.014
TEMED	0.003

Una vez listos los geles se continuó de la siguiente manera:

Δ

Se cargan 15 μ L de cada muestra con amortiguador de carga no reductor y 3 μ L de marcador en su respectivo carril.



Δ

Se adiciona el amortiguador de corrida dentro de la cámara de electroforesis



Δ

Se sometió a las siguientes condiciones: 150 V ctes., 500 mA (durante 1 h aproximadamente).

Δ

Transferir el gel a un contenedor con 30 mL de buffer de desarrollo e incubar dos horas o toda la noche a 37 °C



Δ

Lavar con 20 mL de buffer renaturalizante de enzima durante 15 minutos a temperatura ambiente. Repetir cuatro veces hasta una hora.



Δ

Terminada la electroforesis colocar los geles en un recipiente sellado.

Δ

Se tiñe con la solución teñidora en agitación lenta durante 30 minutos.



Δ

Desteñir con la solución desteñidora.

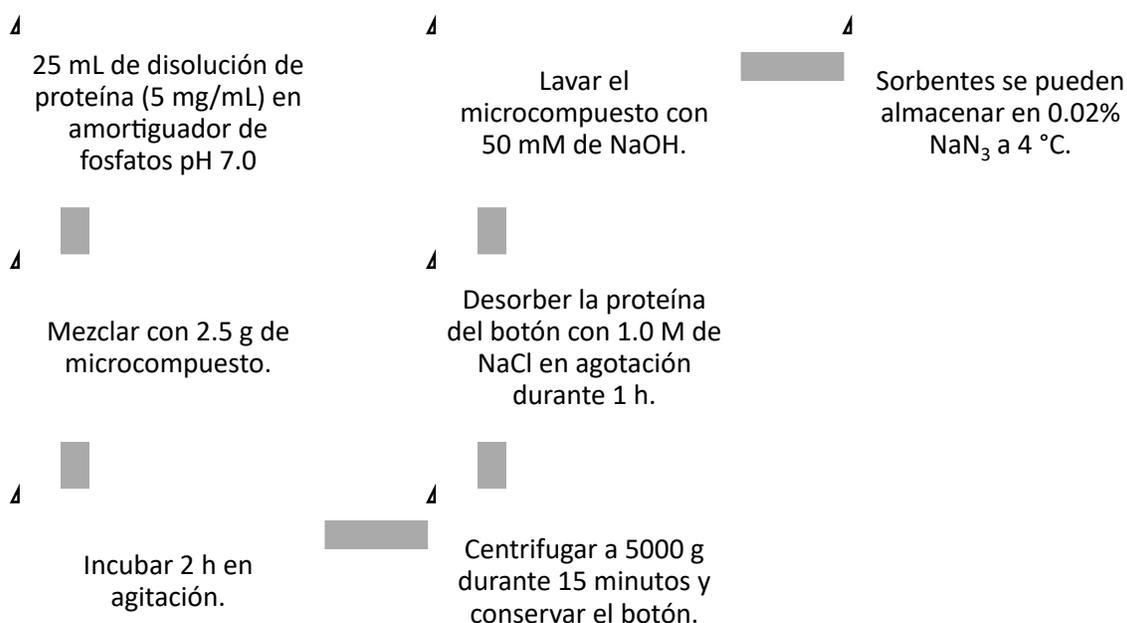
Precipitación de proteínas con sulfato de amonio

- a. Es muy importante usar sulfato de amonio fresco y desecado. Esto asegura una disolución uniforme y rápida.
- b. El día antes de su uso, coloque sulfato de amonio durante la noche en el horno de secado dentro de un vaso grande o un plato de secado (el sulfato de amonio se descompone a 220 ° C).
- c. Limpie el mortero previamente y muele el sulfato de amonio seco con cuidado hasta obtener un polvo fino. Use una máscara contra el polvo (si no necesita una máscara, el polvo no está lo suficientemente seco).
- d. Use el polvo molido inmediatamente.
- e. Agregue el polvo lenta pero constantemente con una mezcla minuciosa. No permita que se formen grumos.
- f. Deje que el precipitado se forme durante 30 minutos a 4 ° C con agitación.
- g. Recuperar el precipitado por centrifugación. Las soluciones altamente saturadas en sulfato de amonio son bastante densas y puede ser difícil de precipitar.
- h. Retire el sobrenadante.
- i. Resuspender los botones en un volumen de solución amortiguadora igual al volumen del extracto.

Purificación de metalo proteasas mediante el microcompuesto Bentonita-Acrilamida-Cisteína

1. Disolver 1 gramo de bentonita y un gramo de cisteína en 20 mL de dH₂O.
2. Mezclar con 20 mL de la solución de acrilamida (0.2 g/mL).
3. Agitar durante 5 minutos a 60 °C.
4. Retirar y adicionar 0.2 g de N,N'-metilenbisacrilamida.
5. Agregar 50 mg de APS en 10 mL de dH₂O.
6. Adicionar 50 µL de TEMED.
7. La polimerización es casi instantánea.
8. Centrifugar a 5000 g durante 5 minutos para remover lo no reaccionado.
9. Lavar con 10 mL de dH₂O y centrifugar nuevamente.
10. Sorbentes se pueden almacenar en 0.02% NaN₃ a 4 °C.

Una vez listo el microcompuesto se continuó de la siguiente manera:



Casein-Coomasie Blue Microplate Assay for Protease Activity

Reactivos:

- 90 ul de Solución de Caseína (0.5 mg/mL), 20 mM DTT en 50mM Tris-HCl (pH7.4).
- 10 uL de Muestra.

Incubar 30 min a 25 °C.

Añadir 150 uL de Bio-Rad® reactivo colorante concentrado diluido con agua (2:1). Incubar 10 minutos y leer en un lector de microplacas a una absorbancia de 595 nm.

Para determinar la actividad se sigue la siguiente relación:

$$\Delta A_{595} = A_{-Proteasa} - A_{+Proteasa}$$

Donde $A_{-Proteasa}$ esta dado por el valor de la absorbancia de los pozos que contienen el sustrato sin la proteasa y $A_{+Proteasa}$ el valor obtenido de la incubación de aquellos pozos que contienen al sustrato junto con la proteasa.

Para definir las unidades de actividad proteolítica se emplea la masa de 2061.98 g/mol y se divide entre el tiempo de incubación.

Para determinar los mg de caseína hidrolizada se emplean la pendiente (9.08179) y la ordenada al origen (0.44437) de la recta generada en la estandarización.

$$U = \frac{\mu M \text{ caseína hidrolizada}}{\text{min}}$$

La actividad enzimática específica corresponderá:

$$U \text{ específica} = \frac{U}{\text{mg proteína}}$$

Para la estandarización.

Primero se realizó una curva de calibración para determinar el rango de sensibilidad del método a distintas concentraciones de caseína.

Tabla 17. Concentración de caseína y absorbancia correspondiente para determinar el rango de respuesta lineal.

μM Caseina	[Casein] mg/ml	Abs 595 nm
242.4853781	0.5	1.94825
193.9883025	0.4	1.84925
145.4912269	0.3	1.84
96.99415125	0.2	1.71925
48.49707563	0.1	1.3015
38.7976605	0.08	1.1775
29.09824538	0.06	1.0375
19.39883025	0.04	0.838

9.699415125	0.02	0.6495
0	0	0.38675

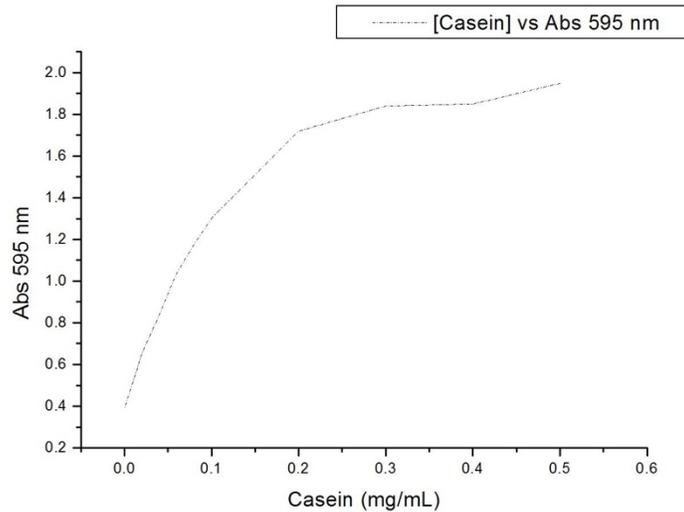


Figura 14. Absorbancia a 595 nm contra la concentración de proteína

Se observa que la parte lineal se encuentra entre 0 y 0.1 mg/mL de caseína, dado eso se toma solo esa parte obteniendo la siguiente gráfica:

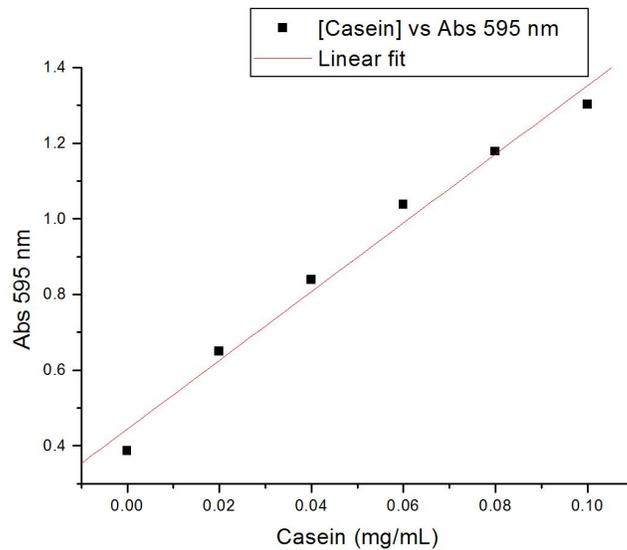


Figura 15. Absorbancia a 595 nm contra la concentración de proteína entre 0 y 0,1 mg/mL.

Donde la ecuación de la recta fue $y = 9.08179x + 0.44437$; $R^2 = 0.98336$.

Posteriormente se determinó la actividad de una muestra de Tripsina (1 ug/uL) con las concentraciones crecientes de caseína para obtener la cinética de la misma.

90 ul de cada Solución de Caseína.
10 uL de Tripsina (1 ug/uL).

Para las concentraciones superiores a 0.08 se hace el siguiente ajuste:

0.1 y 0.2 mg/mL tomar 40 uL de la mezcla de incubación y transferir a otro pozo con 60 uL de agua y posteriormente añadir los 150 uL de Bio-Rad® reactivo colorante concentrado diluido con agua (2:1). Incubar 10 minutos y leer en un lector de microplacas a una absorbancia de 595 nm.

0.3 a 0.5 mg/mL tomar 20 uL de la mezcla de incubación y transferir a otro pozo con 80 uL de agua y posteriormente añadir los 150 uL de Bio-Rad® reactivo colorante concentrado diluido con agua (3:1). Incubar 10 minutos y leer en un lector de microplacas a una absorbancia de 595 nm.

Para el análisis de los datos al ΔA_{595} obtenido de las muestras incubadas con 0.1 y 0.2 mg/mL caseína, dividir entre 0.4, esto por la diferencia de concentración. Para las muestras incubadas con 0.3 a 0.5 mg/mL caseína, dividir entre 0.2 esto por la diferencia de concentración.

Se obtuvo el siguiente gráfico para describir la cinética y se analizó utilizando el programa Origin® 5.0 para ver si embonaba con una cinética de Michaelis-Menten.

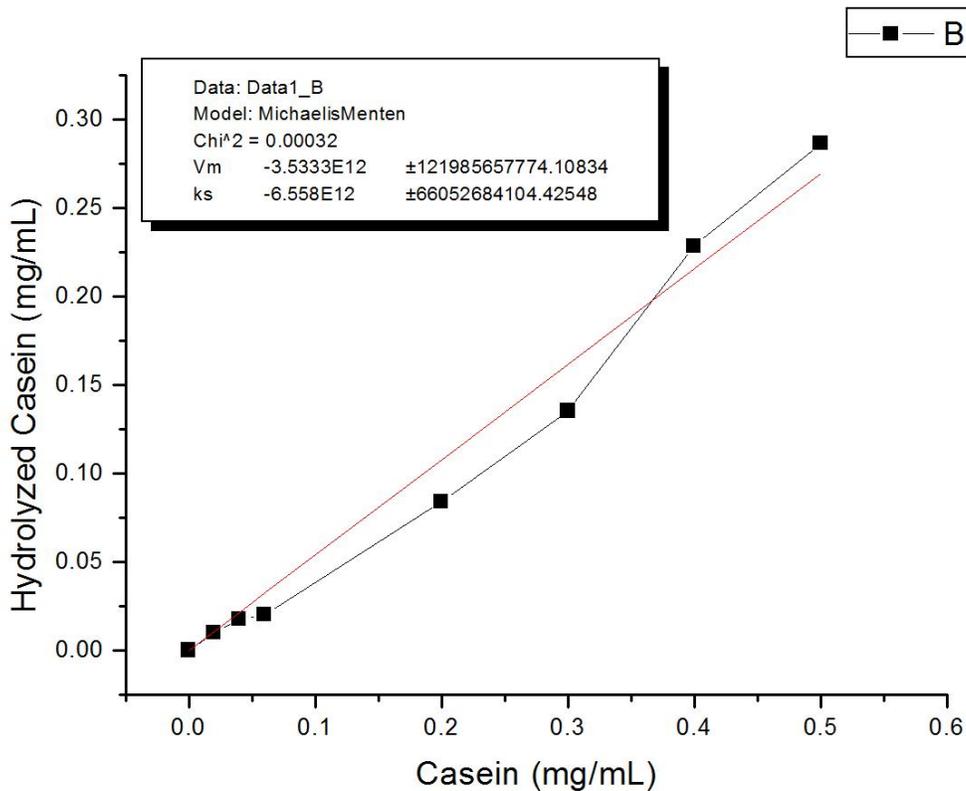


Figura 16. Caseína hidrolizada por la tripsina.

C. Anexo 3 Soluciones.

Acrilamida-Bisacrilamida (relación 37:1)

1. 22.2 g acrilamida
2. 0.6 g bis-acrilamida
3. Aforar a 100 ml con agua BD.

Buffer de corrida

1. 57.6 g Glicina
2. 12 g Tris base
3. 4 g SDS
4. Aforar a 4 L con agua BD

Solución de tinción

1. 2.5 g Azul Brillante Coomassie R-250
2. 450 mL metanol
3. 100 mL ácido acético glacial
4. Aforar a 1 L con agua BD

Solución desteñidora

1. 300 mL metanol
2. 400 mL ácido acético
3. Aforar a 4 L con agua BD

Buffer de carga 5X Reductor (10 mL)

1. 125 mL Tris-HCl 1 M, pH 6.8
2. 1 g de SDS
3. 2.5 mL de glicerol
4. 75 uL de azul de bromofenol al 2% disuelto en etanol puro.
5. 1 uL de 2-mercaptoetanol
6. Aforar a 10 mL con agua BD

Solución de sacarosa

1. Disolver 50 g de sacarosa y 0.02 g de NaN_3 en 50 mL de agua BD
2. Añadir 30 uL de tolueno
3. Aforar a 100 mL y almacenar un mes a 4 °C

Solución de sustrato de caseína 10x

1. Disolver 800 mg de caseína en 100 mL de NaOH 0.1 N
2. Calentar la solución a 37°C con vortexeadas ocasionales hasta que no haya material no disuelto.
3. Se puede almacenar a -20°C durante varios meses

Buffer de carga 2X No Reductor

1. Disolver 0.2 g SDS (2%) y 0.01 g de azul de bromofenol (0.01%) en 5 mL Tris-HCl 1.5 M pH 8.8
2. Añadir 5 mL de glicerol (40%)
3. Se puede almacenar hasta un mes a -20°C