



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE FARMACIA

**ESTUDIOS PROTEÓMICOS DE TOXINAS MARINAS EXTRAÍDAS  
DE LA ANÉMONA *Condylactis gigantea* PROCEDENTE DE  
LA BAHÍA DE MOCHIMA, EDO. SUCRE - VENEZUELA**

Autora: Viviana Martini Tortone

Caracas, Octubre 2012



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA



FACULTAD DE FARMACIA

POSTGRADO DE TOXICOLOGÍA

**ESTUDIOS PROTEÓMICOS DE TOXINAS MARINAS EXTRAÍDAS  
DE LA ANÉMOMA *Condylactis gigantea* PROCEDENTE DE  
LA BAHÍA DE MOCHIMA, EDO. SUCRE - VENEZUELA**

LICENCIADA EN BIOANÁLISIS VIVIANA MARTINI TORTONE

Trabajo de Grado presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela  
para optar al Título de Magíster Scientiarum en Toxicología

TUTORES: DRA. NARDY DIEZ, MSC. GLADYS ROMERO DE GALÍ

## VEREDICTO



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE FARMACIA  
DIRECCIÓN DE POSTGRADO



## VEREDICTO

Quienes suscriben, miembros del jurado designado por el Consejo de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, para examinar el **Trabajo de Grado** presentado por la **LICENCIADA EN BIOANÁLISIS VIVIANA MARTINI TORTONE C.I. V- 14.123.335**, bajo el título “**ESTUDIOS PROTEÓMICOS DE TOXINAS MARINAS EXTRAÍDAS DE ORGANISMOS INVERTEBRADOS PROCEDENTES DE LA BAHÍA DE MOCHIMA EDO. SUCRE - VENEZUELA**”, a fin de cumplir con el requisito legal para optar al grado académico de **MAGISTER SCIENTIARUM EN TOXICOLOGIA**, dejan constancia de lo siguiente:

1.- Leído como fue dicho trabajo por cada uno de los miembros del jurado, se fijó el día **10 de octubre de 2012** a la **10:00 a.m.**, para que **la autora** lo defendiera en forma pública, lo que **la autora** hizo en **el aula 703**, del piso **7** de la Facultad de Farmacia, mediante un resumen oral de su contenido, luego de lo cual **respondió** a las preguntas que le fueron formuladas por el jurado, todo ello conforme con lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado.

2.- Finalizada la defensa del trabajo, el jurado decidió **APROBARLO** por considerar, sin hacerse solidario con la ideas expuestas por **la autora**, que **se ajusta** a lo dispuesto y exigido en el Reglamento de Estudios de Postgrado

Para dar este veredicto, el jurado estimó que el trabajo examinado: Es la primera caracterización del extracto de una anemona colectada en las costas venezolanas, logrando caracterizar posibles moléculas de interés biotecnológico tales como actinoporinas, fosfolipasas y por primera la caracterización parcial de proteasas que puedan tener aplicaciones de interés. Enriqueciendo los estudios de toxicología marina en el país. El jurado recomendó cambiar el título por:

Página 1 de 2

*[Handwritten signatures and initials on the right margin]*

**“ESTUDIOS PROTEÓMICOS DE TOXINAS MARINAS EXTRAÍDAS DE LA ANEMONA *Condilactys gigantea* PROCEDENTES DE LA BAHÍA DE MOCHIMA EDO. SUCRE - VENEZUELA”,**

En fe de lo cual se levanta la presente ACTA, a los **diez** días del mes de **octubre** del año **2012**, conforme a lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado, actuó como Tutora Coordinadora del jurado la Doctora Nardy Diez

El presente trabajo fue realizado bajo la dirección de la Dra. Nardy Diez y la MSc. Gladys Romero de Gali



---

Dra. Alba M. Vargas  
C.I. V 2.964.178  
FACULTAD DE FARMACIA U.C.V.



---

Dr. Tomas Hermoso  
C.I. V- 4.809.228  
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL  
UC.V.



---

Dra. Nardy Diez  
C.I. V- 6.285.121  
FUNDACIÓN IDEA  
Tutora - Coordinadora



ap. 10/10/2012.

## **DEDICATORIA**

*...A mi pilar fundamental de vida,  
que ha hecho de mí lo que hoy soy..*

***...Mi Familia***

## AGRADECIMIENTOS

A la *Divinidad*, por acompañarme siempre y hacer posible la culminación de esta meta.

A mi familia, *Pá, Mañu, Hermane y Nonnita linda*...gracias por su infinito apoyo, por creer en mí y estar conmigo siempre; y a los que yo no están aquí físicamente, gracias por esa lucecita que me envían desde donde quiera que estén.

A *Gladys*, por tus consejos, paciencia y tolerancia, por tu apoyo incondicional.. Por estar... Gracias, como 14..12..8.

A mis tutoras, *Dra. Nardy Diez*, gracias por abrirme las puertas de su laboratorio, por confiar en mí y por permitirme formar parte de ese gran equipo; y *MSc. Gladys Romero de Galí*, gracias por aceptar el reto y comprometerse conmigo en esta meta... Por su apoyo gracias a ambas.

A mis compañeras, amigas y hermanas de postgrado, *las winas: Mariana y Geraldine*, gracias por todos esos momentos vividos, por los trasnchos de estudios, por el apoyo, por las alegrías y tristezas compartidas; *la Dianeichon*, gracias por tu amistad incondicional, eres un ser muy valioso y especial... a todas gracias por hacer de esta etapa un matiz de experiencias.

A mis compañeros y amigos de laboratorio, *Vero, Antonini, Pedrín, Annamil, Mariale, Pedro, Elizabeth, Riward, Orlando, Jais, Ainhoa, Deisybiris, Iraima, Sra. Nubia, Bexi, Irina, Sabrina, Yuli, Moniquin, Carolina, Katherine, Marsh, Marigabi*, gracias a todos por la colaboración prestada en algún momento, *Leín* gracias enormes, y especialmente *Jose*, quien fue mi guía en todo este andar..Gracias a todos, por todo.

A mis colegas *Yuyibeth y Aurora*, por la colaboración prestada y por esas palabras de aliento en los duros momentos y sus buenas energías, gracias muchachas.

A esos seres especiales que me Acompañaron y caminaron de la mano conmigo algún trayecto de este largo camino...Gracias por ese apoyo tan valioso. El éxito de hoy también lo comparto con ustedes.

A todas las personas que en algún momento me dieron una palmada en la espalda alentándome a continuar, muchas de ellas sin tener ni idea de lo que yo estaba haciendo y de lo que consistía esto...Gracias.

A esos angelitos camuflajeados que me mandó Dios, *mis loquitos*...gracias por la compañía en los trasnochos, por esas miradas llenas de amor que tantas energías me transmitieron.

A todos los profesores de este postgrado, por sus enseñanzas y por confiar en mi...en especial a aquellos quienes además me brindaron su amistad.

A la Fundación IDEA y su Estación Experimental en Mochima, por permitirme realizar este proyecto en sus instalaciones y por el apoyo brindado, en particular al Laboratorio de Genómica y Proteómica del Centro de Biotecnología.

A la Casa que Vence las Sombras...Hoy y siempre...mi querida UCV...

...a todos...Gracias Totales!

## RESUMEN

### **ESTUDIOS PROTEÓMICOS DE TOXINAS MARINAS EXTRAÍDAS DE LA ANÉMOMA *Condylactis gigantea* PROCEDENTE DE LA BAHÍA DE MOCHIMA, EDO. SUCRE – VENEZUELA**

Las toxinas marinas proporcionan una gran variedad de compuestos con estructuras moleculares poco conocidas, susceptibles de ser manipuladas y/o sintetizadas para la obtención de productos de interés por su gran potencial biotecnológico en diferentes áreas de la industria y la medicina. Las perspectivas de obtención de nuevos compuestos bioactivos, sin análogos con los terrestres, justifica el interés de su aplicación en las investigaciones y en la práctica clínica. En tal sentido, considerando que las Costas Venezolanas presentan una fauna marina con gran biodiversidad biológica, aunado a la escasez de estudios sobre este tema en nuestro país, el presente trabajo responde a la necesidad de estudiar por vez primera el perfil proteico de toxinas marinas extraídas de la anémoma *Condylactis gigantea* procedentes de la Bahía de Mochima, Edo. Sucre, Venezuela. El extracto total obtenido de la anémoma en estudio, rindió una concentración de proteínas de  $8,69 \pm 0,57 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  y presentó un perfil electroforético de aproximadamente 20 bandas con un amplio rango de pesos moleculares entre 9,86kDa y más de 220kDa. Por técnicas de zimografía en gelatina, se logró caracterizar las condiciones óptimas de actividad proteolítica con pH 8,0 y 40°C, y se demostró la presencia de un grupo de proteínas de alto peso molecular con actividad gelatinolítica tipo metaloproteasas y una posible cisteínproteasa de aprox 23kDa. El extracto total presentó una actividad hemolítica sobre eritrocitos humanos con una  $\text{CH}_{50} \sim 15 \mu\text{g}/\text{mL}$  y actividad fosfolipasa  $\text{A}_2$  de 14,1U/mL. El análisis de los geles bidimensionales permitió obtener el proteoma del extracto total de la anémoma en estudio, donde se señalan en cinco regiones las proteínas de interés, posiblemente relacionadas a las descritas en la literatura como actinoporinas, citolisinas, fosfolipasa  $\text{A}_2$  y proteasas. Este trabajo representa un valioso aporte al área de la toxinología, siendo la primera caracterización del extracto de la anémoma *C.gigantea* del Caribe venezolano.

**Palabras Clave:** anémoma, *Condylactis gigantea*, toxinas marinas, proteómica, fosfolipasa, proteasas, citolisinas, Mochima.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
VEREDICTO	iii
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
RESUMEN	viii
TABLA DE CONTENIDO	ix
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABLAS	xvi
INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO	5
1. Toxinas Marinas	5
2. Toxinas Marinas como Compuestos Bioactivos	7
3. Anémonas	10
3.1 Toxinas de Anémonas Marinas	13
3.1.1 Tipo de Citolisinas	13
3.1.1.1 Citolisinas (PM ~ 30 kDa)	14
3.1.1.2 Actinoporinas ( PM ~ 20kDa)	14
3.1.2 Proteasas e Inhibidores de Proteasas	16
4. Proteómica como Herramienta en la Investigación	18
5. Mochima como fuente de biotoxinas marinas	24

5.1 Mochima	24
5.1.1 Bahía de Mochima	25
5.2 Fauna de Mochima	27
5.2.1 Cnidarios	28
5.2.1.1 Anémonas de la Bahía de Mochima	28
OBJETIVOS	33
1. Objetivo General	33
2. Objetivos Específicos	33
MARCO METODOLÓGICO	35
1. Identificación y Recolección de las anémonas <i>Condylactis gigantea</i>	35
2. Extracción de Proteínas	36
3. Cuantificación de proteínas en el extracto total de la anémona <i>C.gigantea</i> (Mochima)	37
4. Verificación de las proteínas del extracto total de la anémona <i>C.gigantea</i> (Mochima)	38
5. Identificación y Caracterización de la Actividad Proteolítica del extracto total de la anémona <i>Condylactis gigantea</i> (Mochima)	40
5.1 Zimogramas de Gelatina.	40
5.2 Efecto de la Temperatura sobre la actividad proteolítica del extracto total de la anémona <i>Condylactis gigantea</i> , observada en Zimogramas de Gelatina.	41
5.3 Efecto del pH sobre la actividad proteolítica del extracto total de la anémona <i>Condylactis gigantea</i> , observada en Zimogramas de Gelatina.	42

5.4 Efecto de los Iones sobre la actividad proteolítica del extracto total de la anémona <i>Condylactis gigantea</i> , observada en Zimogramas de Gelatina.	42
5.5 Efecto de los Inhibidores de Proteasas sobre la actividad proteolítica del extracto total de la anémona <i>Condylactis gigantea</i> , observada en Zimogramas de Gelatina.	43
6. Determinación de la Actividad Hemolítica del extracto total de la anémona <i>Condylactis gigantea</i> (Mochima)	44
7. Determinación de la actividad de la enzima Fosfolipasa A <sub>2</sub> del extracto de total de la anémona <i>Condylactis gigantea</i> (Mochima)	46
8. Determinación y Caracterización del perfil proteico del extracto total de la anémona <i>Condylactis gigantea</i> (Mochima) mediante Electroforesis Bidimensionales	47
8.1. Rehidratación de las tiras	47
8.2. Primera Dimensión o Isoelectroenfoque (IEF)	48
8.3. Equilibración de tiras	49
8.4. Segunda Dimensión o SDS-PAGE	49
8.5. Tinción de Plata	50
8.6. Caracterización del perfil proteico del extracto total de la anémona <i>Condylactis gigantea</i> (Mochima) mediante el análisis de los geles Bidimensionales.	52
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>53</b>
1. Identificación y Recolección de las anémonas <i>Condylactis gigantea</i>	53
2. Cuantificación de las proteínas presentes en el extracto total de la anémona <i>C. gigantea</i> (Mochima).	57
3. Perfil electroforético del extracto total de la anémona <i>C. gigantea</i> (Mochima).	57

4. Identificación y Caracterización de la Actividad Proteolítica del extracto total de la anémona <i>C. gigantea</i> (Mochima).	60
4.1 Efecto de la Temperatura sobre la actividad proteolítica del extracto total de la anémona <i>C.gigantea</i> , observada en Zimogramas de Gelatina.	61
4.2 Efecto del pH sobre la actividad proteolítica del extracto total de la anémona <i>C.gigantea</i> , observada en Zimogramas de Gelatina.	65
4.3 Efecto de los Iones sobre la actividad proteolítica del extracto total de la anémona <i>C.gigantea</i> , observada en Zimogramas de Gelatina	67
4.4 Efecto de los Inhibidores de Proteasas sobre la actividad proteolítica del extracto total de la anémona <i>C.gigantea</i> , observada en Zimogramas de Gelatina	73
5. Determinación de la Actividad Hemolítica del extracto total de la anémona <i>Condylactis gigantea</i> (Mochima)	79
6. Determinación de la actividad de la enzima Fosfolipasa A <sub>2</sub> (PLA <sub>2</sub> ) del extracto total de la anémona <i>Condylactis gigantea</i> (Mochima)	88
7. Determinación y Caracterización del proteoma del extracto total de la anémona <i>Condylactis gigantea</i> (Mochima)	90
CONCLUSIONES	100
RECOMENDACIONES	102
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1: Estructura de la anémona de mar	11
Figura 2: Estructura del nematocisto.	12
Figura 3: Parque Nacional Mochima.	25
Figura 4: Hábitats marinos en la Bahía de Mochima – Parque Nacional Mochima.	26
Figura 5: Fotos referenciales de Anémonas del Parque Nacional Mochima.	28
Figura 6: Foto Satelital de la Bahía de Mochima.	53
Figura 7: Foto de la anémona <i>Condylactis gigantea</i> en el lugar de muestreo, Bahía de Mochima.	54
Figura 8: Proceso de recolección y almacenamiento de las anémonas <i>C.gigantea</i> . Isla Larga - Bahía de Mochima.	56
Figura 9: Tanques de almacenamiento. Estación experimental IDEA - Bahía de Mochima.	57
Figura 10: Perfil Electroforético del extracto total de la anémona <i>C. gigantea</i> . (Bahía de Mochima).	58
Figura 11: Efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica del extracto total de la anémona <i>C.gigantea</i> (Bahía de Mochima).	62
Figura 12a: Efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica del bloque de proteínas de Alto Peso Molecular.	63
Figura 12b : Efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica de la proteína de Mediano Peso Molecular.	63

Figura 13a: Efecto del pH sobre la actividad proteolítica de las proteínas de Alto Peso Molecular .	65
Figura 13b: Efecto del pH sobre la actividad proteolítica de la proteína de Mediano Peso Molecular.	66
Figura 14a: Comparación de la actividad proteolítica de las proteínas de Alto Peso Molecular en presencia y ausencia de iones.	68
Figura 14b: Comparación de la actividad proteolítica de la proteína de Mediano Peso Molecular en presencia y ausencia de iones.	69
Figura 15a: Efecto de los iones sobre la actividad proteolítica de las proteínas de Alto Peso Molecular.	71
Figura 15b: Efecto de los iones sobre la actividad proteolítica de la proteína de Mediano Peso Molecular.	71
Figura 16a: Efecto de los inhibidores de proteasas sobre la actividad proteolítica de las proteínas de Alto Peso Molecular.	74
Figura 16b: Efecto de los inhibidores de proteasas sobre la actividad proteolítica de la proteína de Mediano Peso Molecular.	74
Figura 17: Espectro de absorción del extracto total de la anémona <i>C.gigantea</i> y de la hemoglobina.	80
Figura 18: Actividad Hemolítica <i>in vitro</i> del extracto total de la anémona <i>C.gigantea</i> .	82
Figura 19: Gel Bidimensional del proteoma del extracto total de la anémona <i>Condylactis gigantea</i> (Mochima).	91
Figura 20: Representación de regiones de interés en el gel bidimensional del proteoma del extracto total de la anémona <i>Condylactis gigantea</i> (Mochima).	92
Figura 21: Ampliación de las Regiones I y IV señaladas en el gel bidimensional de la Figura 20.	94

Figura 22: Ampliación de las Regiones II, III y V señaladas en el gel bidimensional de la Figura 20. 96

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla I: Componentes de los geles unidimensionales de poliacrilamida (SDS-PAGE)	38
Tabla II: Protocolo de enfoque isoeléctrico empleado.	48
Tabla III: Concentración Hemolítica 50 (CH <sub>50</sub> µg/mL) del extracto total de la anémona <i>Condylactis gigantea</i> (Mochima), en función de la temperatura de incubación y la longitud de onda empleada.	84
Tabla IV. Matriz de datos (pI y PM) correspondientes a las manchas agrupadas en las Regiones I y IV del proteoma del extracto total de la anémona <i>C.gigantea</i> (Mochima).	94
Tabla V: Matriz de datos (pI y PM) correspondientes a las manchas agrupadas en las Regiones II, III y V del proteoma del extracto total de la anémona <i>C.gigantea</i> (Mochima).	96

## INTRODUCCIÓN

El presente trabajo titulado “Estudios Proteómicos de toxinas marinas extraídas de la anémona *Condylactis gigantea* procedente de la Bahía de Mochima, Edo. Sucre – Venezuela”, forma parte del proyecto del Laboratorio de Genómica y Proteómica del Centro de Biotecnología de la Fundación IDEA (Instituto de Estudios Avanzados) el cual se lleva a cabo en conjunto con el Centro de Estudios de Proteínas (CEP) de la Universidad de la Habana (UH) Cuba y se titula “Identificación de moléculas bioactivas de interés biotecnológico y biomédico procedentes de organismos marinos”.

Esta investigación tiene como propósito realizar estudios proteómicos del extracto obtenido de la anémona *Condylactis gigantea* procedente de la Bahía de Mochima, Edo. Sucre – Venezuela.

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

Todos los compuestos anteriormente mencionados, pueden ser un potencial biotecnológico. Las proteasas por su parte, constituyen dianas terapéuticas muy atractivas en múltiples enfermedades sistémicas e infecciosas. Sus contrapartes moleculares, los inhibidores de proteasas, son reguladores endógenos de la actividad

proteolítica, por lo que pueden ser utilizadas como posibles medicamentos en el tratamiento de enfermedades tan diversas como el cáncer y los desórdenes neurodegenerativos como el Alzheimer, las enfermedades inflamatorias, inmunológicas, respiratorias, cardiovasculares e infecciosas parasitarias, micóticas y virales, entre las que se encuentran la malaria, el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) y la hepatitis, entre otros.

Otro ejemplo de moléculas biológicamente activas, son las toxinas formadoras de poros, las cuales son moléculas hidrosolubles capaces de incorporarse a membranas naturales y formar poros en ellas de un tamaño definido. La desestabilización y formación de poros en las membranas celulares conducen a la muerte celular, lo que condiciona las posibles aplicaciones biomédicas de estas proteínas, entre ellas; la construcción de inmunotoxinas dirigidas contra células indeseadas, como las parasitarias o las cancerosas.

Las proteínas formadoras de poros también muestran propiedades interesantes para el diseño de novedosos sistemas de entrega de moléculas al citosol celular, hoy en día considerado un problema científico directamente asociado al desarrollo de vacunas contra el cáncer, entre otras enfermedades. (Diez y col., 2009).

Ciertamente, es conocido por exploraciones científicas con organismos terrestres que muchos de los compuestos sintéticos que existen actualmente están basados en moléculas originalmente obtenidas de la naturaleza. De igual forma, la investigación oceanológica biomédica proporciona importante información en la nutrición, medicina, química y desarrollo de nuevas drogas a partir de organismos de naturaleza marina. En la actualidad, el avance tecnológico en los equipos de buceo y el interés derivado de los

nuevos hallazgos científicos han fomentado la curiosidad por explorar un mundo sorprendente y enigmático no sólo por su belleza sino por las enormes posibilidades de utilización de estos recursos naturales de las profundidades marinas.

Las perspectivas de obtención de nuevos compuestos, sin análogos con los terrestres, justifica el interés de su aplicación en las investigaciones biomédicas y en la práctica clínica. Posiblemente muchas estructuras podrán ser sintetizadas o servirán como precursores para la obtención de fármacos más específicos y de productos de interés industrial; otras por sus características estructurales, tendrán siempre que ser obtenidas a partir de la fuente natural, por lo que se impone una explotación racional de estos recursos que permita la conservación del ecosistema marino.

En tal sentido, considerando que las Costas Venezolanas presentan una fauna marina con gran biodiversidad biológica, aunado a la escasez de estudios sobre este tema en nuestro país, el presente trabajo de investigación responde a la necesidad de estudiar el perfil proteico de toxinas marinas extraídas de las anémonas *Condylactis gigantea* procedentes de la Bahía de Mochima, Edo. Sucre, Venezuela. Para ello se contó con el Laboratorio de Genómica y Proteómica del Centro de Biotecnología de la Fundación IDEA (Instituto de Estudios Avanzados) en donde se desarrolló el presente estudio, así como con la Estación de la Fundación IDEA en Mochima, para realizar el muestreo respectivo.

En virtud de lo anteriormente planteado, el presente trabajo aporta novedosa y valiosa información sobre el proteoma del extracto de la anémona *C.gigantea* venezolana, estudiado únicamente por nuestro equipo de investigación, fomentando además el

desarrollo de futuras investigaciones para conseguir su purificación, caracterización y determinación de las propiedades farmacológicas, en miras del desarrollo y síntesis de sustancias de gran interés en diversas áreas tanto de la industria a través del uso ampliamente conocido de las proteasas como por ejemplo en el mejoramiento de los detergentes, ablandamientos de las carnes, en investigación para proteólisis limitada, etc., así como de interés biomédico en productos potencialmente terapéuticos en el tratamiento de diversos procesos patológicos, entre otros.

## **MARCO TEÓRICO**

### **1.- Toxinas Marinas**

La existencia de sustancias naturales de origen marino con actividades de provecho para el hombre ha sido conocida desde la más remota antigüedad, sin embargo debido al profundo desconocimiento de los efectos fisiológicos resultantes del contacto con plantas y animales venenosos, a menudo las biotoxinas eran abordadas con un aura de misterio y superstición.

La historia de las toxinas marinas y su relación con la humanidad se remonta a los albores del surgimiento del lenguaje escrito, en los que por ejemplo se demuestra a través de jeroglíficos que los egipcios de la V Dinastía (2700 a.C.) sabían distinguir los peces comestibles de los venenosos. Así mismo, los documentos bíblicos presentan el primer testimonio escrito del carácter tóxico de las “mareas rojas” y recomendaban no ingerir peces sin escamas (Antiguo Testamento, Ex. 7; 19-20., Deut. 14; 9-10). Incluso Aristóteles (384-322 a.C.), conocido como uno de los grandes biólogos de la Antigüedad, estaba familiarizado con las toxicidades de las medusas y algunos peces (Garateix, 1997).

Existen así, diversos ejemplos a lo largo de la historia que ilustran la contribución de diferentes civilizaciones al conocimiento biotóxico, pero es hasta el Siglo XX cuando se desarrolla un gran interés en las zootoxinas y sus propiedades inmunológicas, entre otras. Específicamente a partir de la década de los años 60, los estudios de

Narahashi, Shapiro y Béress con la tetradoxina y otras toxinas de origen marino como las anémonas, dieron comienzo a las investigaciones que apuntan en esta dirección. (Shapiro, 1968; Narahashi y col., 1969; Béress y col., 1976; Béress, 1982 y Garateix, 1997).

En Venezuela, durante la década de los 90, comienza el auge de la búsqueda de nuevas sustancias bioactivas a partir de organismos marinos. Estas sustancias vienen despertando el interés de investigadores de las áreas de biología, química, bioquímica y taxonomía. Sólo escasos trabajos de investigación se han publicado en revistas científicas en donde se describen la potencialidad de los productos marinos de origen venezolano con propiedades bioactivas (antibacterianas, antimicóticas, hemolisantes, hemaglutinantes, citotóxicas, antiparasitarias, etc.), siendo los poríferos el que mayor atención ha recibido (Hernández y Hernández, 2005).

## 2.- Toxinas Marinas como Compuestos Bioactivos

El mar constituye una fuente extraordinariamente promisorio para la búsqueda de sustancias bioactivas; cerca del 80% de los organismos vivos del reino animal habitan en el mar, de los cuales 1200 especies de organismos marinos se sabe que son ponzoñosos o venenosos y sin embargo, menos del 1% de éstas han sido investigadas en la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos. (Klassen y Watkins III, 1999).

Los organismos sésiles e invertebrados de cuerpo blando que carecen de defensas físicas son los primeros candidatos a tomar en consideración en la búsqueda de metabolitos bioactivos.

Debido a la alta competitividad del ecosistema marino, las diferentes especies que lo habitan, han desarrollado una amplia variedad de armas ofensivas y defensivas en respuesta a necesidades vitales (alimentación, supervivencia, reproducción y protección de su territorio), desarrollando diferentes estructuras corporales, una gran agresividad y voracidad, despliegue de grandes velocidades, hasta diversas formas de camuflaje, siendo uno de los mecanismos más sofisticados y específicos, la producción y liberación de **toxinas**.

También se conoce que las toxinas de los animales marinos son mucho más variadas en su composición química que las de animales terrestres, sin embargo, hay cierto grado de constancia de los componentes dentro de un género o especie particular debido a que se encuentran condicionados por los factores ambientales tales como, temperatura del agua,

salinidad, turbidez, profundidad, oxigenación, luz, nutrientes, etc. (Garateix, 1997; Klassen y Watkins III, 1999).

Varios de estos organismos (esponjas, moluscos, anémonas, etc.) han sido objeto de estudio en investigaciones biomédicas, obteniendo resultados significativos en el desarrollo de la industria farmacéutica e incrementando el conocimiento acerca de nuevos efectos citotóxicos, antimicrobianos, bloqueadores de canales iónicos específicos y muchas otras propiedades asociadas a sus estructuras químicas. (Souto Suárez, 1997; Claro, 2001; Aneiros y Garateix, 2004 y Hernández y Hernández, 2005).

Las esponjas del Phylum Porífera constituyen una de las especies extensamente distribuidas tanto en aguas bajas como hasta en la profundidad del océano. Han sido tradicionalmente conocidas como fuente de metabolitos bioactivos tipo terpenoides, alcaloides, macrólidos y muchos otros compuestos orgánicos. Los análogos sintéticos de la C-nucleósido Spongouridina y Spongotimidina aislados de esponjas del Caribe, llevaron luego al desarrollo de la *Cytosine Arabinoside* como un compuesto anticancerígeno. (Wall, 1992)

De igual forma se han realizado estudios con péptidos provenientes de tunicados (Phylum Cordados), los cuales poseen estructuras novedosas con funciones biológicas como las Didemninas aisladas inicialmente de tunicados del Caribe *Trididemnum solidum* las cuales son una familia de péptidos con actividades antitumorales, antivirales e inmunosupresoras (Singh y col., 2008).

Otro ejemplo son las Dolastatinas, péptidos citotóxicos hallados en moluscos, que presentan una actividad supresora de las células de crecimiento. (Aneiros y Garateix, 2004 y Singh y col., 2008)

Así como otros animales marinos de vida sésil, los cnidarios (anémonas, medusas, corales) también han desarrollado a lo largo de la evolución dentro de sus mecanismos de defensas, la producción de toxinas. Las **anémonas** por su parte, carentes de otros mecanismos de inmovilización, contactan inicialmente a sus presas con su tentáculo y consecuentemente han desarrollado la capacidad de producir una mezcla de toxinas con potentes efectos sobre sus presas para poder alimentarse y/o defenderse, entre las que se encuentran enzimas del tipo fosfolipasas, citolisinas o proteínas formadoras de poros (actinoporinas), proteasas y sus inhibidores y una variedad de toxinas capaces de unirse a proteínas de membrana que conforman los canales iónicos (sodio y potasio). (Berés, 1982; Castañeda, 2000; Garateix y col., 2003; Haefner, 2003; Aneiros y Garateix, 2004 y Molinski y col, 2009).

Más de 32 especies de anémonas han sido reportadas como productoras de proteínas y péptidos con potente actividad hemolítica y citolítica inclusive con efecto letal en cangrejos, peces y mamíferos, sin embargo, todavía estas toxinas y venenos de cnidarios no han recibido la suficiente e importante atención científica a diferencia de la prestada a las toxinas de algunos animales terrestres como serpientes, escorpiones, arañas, etc. (Maček, 1992; Anderluh y Maček, 2002 y Turk y Kem, 2009).

### 3.- Anémonas

Las anémonas de mar o actinias, son animales marinos sésiles, que se encuentran en las costas de todo el Mundo, especialmente en aguas cálidas del Trópico.

Responden a la Clasificación Taxonómica: (Hickman y col, 2000)

Reino: Animal

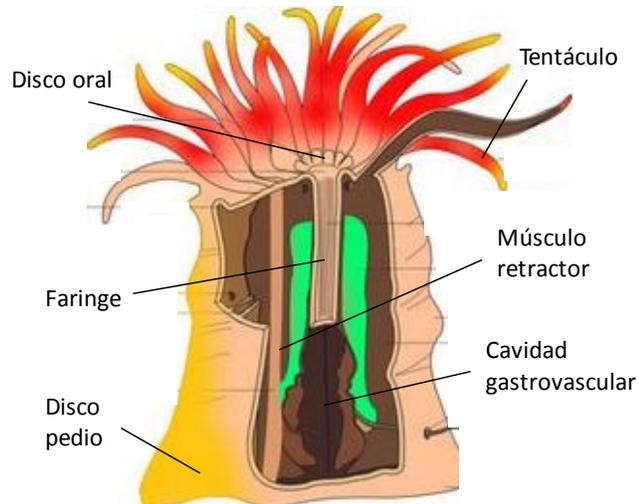
Filo: Cnidaria

Clase: Antozoos

Subclase: Hexacorales

Orden: Actiniaria

La anatomía de las anémonas (Figura 1) se basan en un cuerpo de forma cilíndrica, con un disco basal por el cual se fijan a la superficie (fondos arenosos o coralinos), y una corona de tentáculos dispuestos en uno o más círculos alrededor de la boca situada en el disco oral. La mayoría oscilan entre 5 a 100 mm de diámetro, y entre 5 y 200 mm de longitud, pero esto puede variar dependiendo de la especie, al igual que los colores. (Hickman y col, 2000).



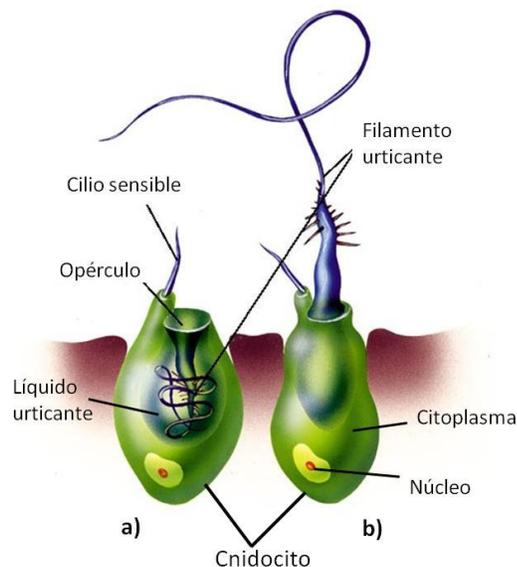
**Figura1: Estructura de la anémona de mar.** Tomado y modificado de *Aquaflash*.

Son carnívoras, se alimentan de peces o de cualquier animal vivo (y a veces muerto) de pequeños tamaños.

Puesto que las presas de las anémonas, a diferencia de éstas, tienen más movilidad y pueden desplazarse en diferentes direcciones, debe existir una fuerte selección para las sustancias tóxicas producidas por ellas de tal forma que sean capaces de causar una parálisis rápida en sus posibles víctimas, siendo esto posible ya que poseen tentáculos cargados con diminutas y sofisticadas armas denominadas **nematocistos**.

Los nematocistos (Figura 2) son producidos por las células llamadas cnidocitos, exclusivas de los cnidarios, las cuales liberan una vesícula gigante post-Golgi que consta de diferentes tipos de proteínas que se ensamblan en una estructura capsular grande con un túbulo largo espinoso dentro, recubierta por una pequeña tapa u opérculo.

Los cnidocitos tienen mecanorreceptores (cnidocilos o cilio sensible), los cuales son sensibilizados por la frecuencia de vibración de natación de la presa y por pequeñas moléculas orgánicas liberadas por esta, lo que produce la descarga del nematocisto con una cinética tan corta como de 700 ns, una velocidad de 2 metros por segundo y una aceleración de 5400000 veces la de la gravedad, de esta forma perfora un agujero en la cutícula de la presa a través del cual entra el túbulo largo, liberando sustancias hemolíticas y neurotóxicas provocando su paralización. Además de los tentáculos, los nematocistos también se encuentran en los filamentos gástricos así como en el cuerpo entero de la anémona, lo que permite la digestión de la presa una vez ingerida. (Hickman y col, 2000; Özbek y col, 2009 y Garateix y Rodríguez, 2010).



**Figura 2: Estructura del nematocisto.** a) Cnidocito en reposo, b) Cnidocito con nematocisto disparado. Tomado y modificado de Garateix y Rodríguez, 2010.

### **3.1- Toxinas de Anémonas marinas:**

Del cuerpo entero de las anémonas, tejidos ricos en nematocistos (como los tentáculos) y/o nematocistos aislados, han sido obtenidos diferentes compuestos bioactivos de naturaleza proteica, es decir, compuestos que ejercen algún efecto sobre los organismos vivos, incluyendo toxinas formadoras de poros o citolisinas, fosfolipasas, toxinas inhibitoras de los canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , otras neurotoxinas e incluso proteasas y sus inhibidores (Aneiros y Garateix, 2004; Shiomi, 2009; Šuput, 2009; Turk y Kem; 2009), las cuales son responsables de una variedad de respuestas patológicas (cardiotoxicidad, dermatitis, edema local, eritema, parálisis, dolor y necrosis) (Anderluh y Maček, 2002; Junqueira y col, 2008).

De este grupo de toxinas, las que más atención han recibido por los grupos de investigadores, son las Citolisinas (formadoras de poros), dado a su capacidad lítica y a la posibilidad de dirigirlas a tejidos específicos, han sido evaluadas como posibles agentes anti-tumorales, a través de la producción de inmunotoxinas (Tejuca y col, 2009; Ravindran y col, 2010). En este estudio, son de mayor interés las citolisinas y las proteasas.

#### **3.1.1 -Tipos de Citolisinas:**

Los principales tipos de citolisinas, clasificados con base en su Peso Molecular, se concentran en dos grupos fundamentales: las de PM ~20 kDa y las de PM~ 30kDa, sin embargo, hay un grupo de toxinas de bajo peso molecular (PM 5-8 kDa) con actividad

antihistamínica y otro grupo de proteínas representado hasta los momentos por sólo una citolisina de 80 kDa proveniente de *Metridium senile* (Anderluh y Maček, 2002).

#### 3.1.1.1 Citolisinas (PM ~30kDa)

A diferencia de las actinoporinas, estas proteínas citolíticas básicas contienen gran cantidad de residuos de cisteína. Tienen pesos moleculares alrededor de 30 kDa y carecen de actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> (Anderluh y col, 2011).

#### 3.1.1.2 Actinoporinas ( PM ~ 20kDa)

Las Actinoporinas, son las citolisinas más estudiadas de las toxinas formadoras de poros de las anémonas, especialmente debido a los estudios realizados con la equinatoxina II (EqII) de la anémona *Actinia equina* y con las Sticolisina I y II (StI y StII) de la anémona *Stichodactyla helianthus*. Estas proteínas tienen en común la carencia del aminoácido cisteína en su estructura, tienen pesos moleculares de alrededor de 20 kDa, son proteínas muy básicas (pI > 9) y muestran preferencia por las membranas que contienen el fosfolípido esfingomiélin. Una de las características más interesantes es que siendo moléculas hidrosolubles, poseen la capacidad de incorporarse a membranas naturales y artificiales y formar poros en ellas (Anderluh y col, 2011).

Es evidente que una misma especie pueda producir una variedad de isotoxinas de 20 kDa, así como que la producción de citolisinas en una anémona no excluye la

coexistencia de neurotoxinas de los canales de sodio y potasio (Anderluh y Maček, 2002).

El estudio de las actinoporinas es importante no sólo para entender sus propiedades tóxicas, sino también, en un sentido más general, para investigar los mecanismos de interacción lípidos-proteínas, así como la modulación de la conformación proteica por la unión a lípidos. Además estas toxinas podrían ser también una potencial herramienta para la construcción de inmunotoxinas dirigidas contra células indeseadas como las parasitarias o de tumores malignos (Álvarez y col, 2003; Tejuca y col, 2009; Pentón y col, 2011).

Algunos investigadores han demostrado que las toxinas Bc2 y EqtII, aisladas de las anémonas *Bunodosoma caissarum* y *Actinia equina* respectivamente, potencian de forma significativa la citotoxicidad inducida por bajas dosis de los agentes quimioterapéuticos arabinósido de citosina, doxorubicina y vincristina. La inducción de una citotoxicidad más eficaz para estos fármacos clásicos cuando se combinan con actinoporinas podrían permitir la reducción de sus dosis terapéuticas y en consecuencia, sus efectos secundarios indeseados. (Soletti y col, 2008).

Sin embargo, la actividad inespecífica asociada a la toxina ha sido un factor común en todas las preparaciones obtenidas hasta el momento con actinoporinas. Una posibilidad de superar esta limitación es la producción de inmunotoxinas inactivas con un mecanismo de activación que responda a un estímulo biológico, como las proteasas asociadas a tumores (Tejuca y col, 2009).

### **3.1.2 -Proteasas e Inhibidores de Proteasas:**

Las peptidasas o proteasas son enzimas que rompen los enlaces peptídicos de las proteínas, logrando la degradación a péptidos y aminoácidos, modificando así su estructura y en el caso de las enzimas, su actividad catalítica.

De manera general se describen dos grandes grupos: exo-peptidasas y endo-peptidasas, dependiendo del sitio de acción sobre el sustrato.

Las exo-peptidasas actúan cerca del final de la cadena polipeptídica. Con base en el sitio de acción en el extremo N o C terminal, ellas se clasifican como amino-peptidasas y carboxi-peptidasas respectivamente. Por otro lado, las endo-peptidasas se caracterizan por su acción preferencial en los enlaces internos de las cadenas peptídicas lejos de los extremos N y C terminal y se dividen en cuatro subgrupos con base en el mecanismo catalítico: serin-, aspartil-, cisteín- y metalo- proteasas. (Wilkesman y Schröder, 2007; Wilskeman y Kurz, 2009).

Se encuentran naturalmente en organismos vivos, donde se usan para la digestión molecular y la reducción de proteínas no deseadas lo que las hace moléculas fisiológicamente necesarias para la vida. Han sido obtenidas mayormente de organismos vertebrados, pero unas pocas han sido aisladas de organismos invertebrados marinos (Wilkesman y Schröder, 2007; Alonso del Rivero y col, 2009).

Las Metaloproteasas de Matriz (MMPs) son una familia de endopeptidasas, las cuales degradan los componentes básicos de la matriz extracelular, por lo que juegan un papel importante en una variedad de procesos biológicos y patológicos (Zhang y col, 2009 y Cascales y col, 2010).

La gran diversidad de proteasas y la especificidad de su acción, atrae la atención mundial para el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas y la utilización en procesos industriales como por ejemplo en la elaboración de detergentes, donde éstas constituyen un ingrediente estándar en los productos de limpieza de uso común. En la industria alimentaria las proteasas se usan para varios propósitos, como la elaboración de quesos, preparación de hidrolizados de soya, ablandamiento de carnes, etc. No solo se emplean en las distintas industrias, sino también en investigación son de uso indispensable. Por su acción selectiva sobre enlaces peptídicos son usadas para dilucidar la relación estructura-función de las proteínas, en la síntesis de péptidos, y en la secuenciación de proteínas (Mala y Col. 1998; Cegarra y col, 2000; Zhang y col, 2011).

Sus contrapartes moleculares, los inhibidores de proteasas, han sido hallados en tejidos y órganos, fluidos biológicos humanos, organismos inferiores, plantas y microorganismos. En las anémonas marinas se ha reportado la presencia de inhibidores de proteasas (Delfin y col, 1994). Tienen una alta especificidad de acción y están relacionados a muchos aspectos fisiológicos normales y alterados tales como, regulación de la actividad proteolítica, activación de coenzimas, etc. Dado que, algunos virus, incluyendo al VIH, dependen de las proteasas en sus ciclos reproductivos, los inhibidores de proteasas son focos de atención para el desarrollo de alternativas terapéuticas como métodos

antivirales. De la misma forma ocurre con enfermedades como la malaria. Los inhibidores de las metaloproteasas de matriz (MMPs) han sido identificados como potenciales candidatos terapéuticos para la metástasis, artritis e inflamación crónica. (Delfin y col, 1994; Kennedy y col, 1998; Zhang y col, 2009).

#### **4.- Proteómica como Herramienta en la Investigación**

La proteómica es un área de la biología molecular que se encuentra en crecimiento y es considerada sistemáticamente como el análisis de las proteínas a gran escala. La palabra proteómica ha sido asociada tradicionalmente con la exposición de un gran número de proteínas de una línea celular o un organismo dado sobre geles de poliacrilamida de dos dimensiones. Hoy en día, el término proteómica cubre gran parte del análisis funcional del producto de los genes o “genómica funcional”. Es por esto que la proteómica se podría definir como una serie de métodos y técnicas destinados a estudiar el conjunto de proteínas que se expresan en una célula o tejido bajo unas condiciones dadas, así como el análisis global de una compleja mezcla de proteínas presentes en una muestra tanto animal como vegetal, lo que se conoce como el proteoma.

Difiere en muchos aspectos de otros métodos tradicionales para el aislamiento e identificación de proteínas. La bioquímica de las proteínas involucra el estudio de su estructura y función y más comúnmente analiza la secuencia completa. La proteómica, por el contrario es el estudio de un sistema multiprotéico, en el cual el objetivo principal está relacionado a la interrelación de múltiples y distintas proteínas y sus roles como

parte de un gran sistema. El análisis va dirigido a la mezcla, y la identificación del proteoma no es por el análisis de la secuencia completa sino por el análisis de secuencias parciales con la ayuda de bases de datos de referencia. En otras palabras, el objetivo de la proteómica es caracterizar el comportamiento de un sistema más que el de cada componente en particular.

Es por esto que se puede decir que la proteómica potencialmente provee información cualitativa, cuantitativa y funcional acerca de todas las proteínas presentes en un sistema biológico. La habilidad para identificar un gran número de proteínas y caracterizar su expresión diferencial y modificaciones post-traduccionales, contribuirá significativamente al entendimiento de los procesos patológicos de las enfermedades y el descubrimiento de nuevas drogas como propuestas para el tratamiento de las mismas, entre otras. (Pandey y Mann, 2000; Hunter y col, 2002; Liebler, 2002; Twyman, 2004; Bernal y Suárez, 2007; Faroldi, 2007 y Kraj y Silberring, 2008).

Dado que los venenos de animales son un conjunto heterogéneo de proteínas simples o muy complejas, para dar una pincelada de la utilidad de las aproximaciones proteómicas en el área de la toxinología se puntualizan algunos estudios que emplean estas técnicas con toxinas de otros organismos ampliamente descritos como las serpientes.

En el estudio realizado por Birrell y col (2006), titulado “Diversidad molecular en el veneno de la serpiente marrón australiana, *Pseudonaja textilis*” lograron la identificación proteómica del veneno empleando electroforesis de geles bidimensionales, espectrometría de masas y secuencia peptídica *de novo*. Gracias a sus

hallazgos, dos de las proteínas identificadas, una procoagulante y una inhibidora de plasmina, se encuentran actualmente en desarrollo como agentes terapéuticos humanos.

De igual manera, Guérico y col (2006) en la investigación titulada “Variaciones ontogénicas en el proteoma del veneno de la serpiente de Amazonas *Bothrops atrox*”, lograron observar la expresión diferencial de polipéptidos en los diferentes estadios de desarrollo de la serpiente, sugiriendo la relación de la sintomatología de los accidentes ofídicos en humanos con la composición del veneno, lo que debe ser considerado en la producción del antiveneno.

Otro ejemplo de la utilidad de la aplicación de estas técnicas se ve reflejado en el estudio realizado con serpientes venezolanas, donde por técnicas de proteómica se comparó el proteoma del veneno de *Bothrops colombiensis* con *B. atrox* y *B. asper*, encontrando similitud de un 65-70% entre los proteomas de los venenos de *B. colombiensis* y *B. asper* solamente. Evidenciaron además la limitada capacidad de reconocimiento de los antivenenos de Venezuela y de Costa Rica hacia componentes del veneno de estas serpientes. (Calvete y col, 2009).

Cabe destacar, que dado que la proteómica es una ciencia relativamente reciente, hasta la fecha son pocos los estudios que se han reportado con toxinas marinas empleando dichas herramientas.

Un ejemplo de esto es el trabajo realizado por Piccoli y col (2007), donde se identifican los cambios asociados a la expresión de proteínas al modificar la actividad sináptica en cultivos de neuronas post-tratamiento con la toxina marina tetrodotoxina y la bicuculina, un antagonista específico del GABA. Con este estudio los autores sugieren que extensas alteraciones en la expresión de proteínas neuronales se traduce en un resultado de incremento o disminución de la actividad sináptica.

Por su parte Ronzitti y col (2008), buscaron probar si los análisis proteómicos de los extractos de las glándulas digestivas de mejillones pueden ser empleados para identificar biomarcadores de contaminación debida a toxinas del grupo ácido okadaico. Las muestras de mejillones fueron analizadas por electroforesis de dos dimensiones y otras técnicas, encontrando similitud entre los péptidos obtenidos de las glándulas digestivas de los mejillones con los de las algas *Dinophysis algae*, por lo que concluyeron que el análisis proteómico sí puede ser usado para la detección e identificación de biomarcadores de biotoxinas contaminantes en mariscos.

En el trabajo realizado en el 2009 por Biass y col, compararon el perfil proteómico obtenido del veneno de caracol como usando espectrometría de masas MALDI (Desorción/Ionización mediante Láser Asistida por Matriz) y ESI (Ionización por ElectroSpray), con lo que demostraron la utilidad de utilizar ambas técnicas en conjunto, ya que sólo el 20% del número total de moléculas detectadas en el veneno fueron halladas en ambos métodos.

Otro ejemplo de estudios con toxinas marinas utilizando las herramientas de la proteómica es el trabajo de Sala y col (2009), quienes realizaron la investigación titulada “Análisis proteómico revela múltiples patrones de respuestas en células expuestas a una mezcla de toxinas”. Para ello utilizaron biotoxinas marinas como ácido okadaico (OA) y gambiterol (GB) agregados solos o combinados a un cultivo de línea celular MCF-7; observando que al agregar sólo OA se afectaban 30 proteínas, cuando se agregaba sólo el GB se afectaban 9 proteínas y la combinación del tratamiento con OA y GB afectaban 14 proteínas evidenciando acciones independientes e interacciones como posibles efectos antagónicos y/o sinérgicos.

A través de las técnicas de proteómica, Alonso del Rivero y col (2009), lograron confirmar la presencia de una metalocaxboxipeptidasa en el extracto del anélido marino *Sabellastarte magnifica*. Además lograron determinar que se trata de una proteasa de 33792 Da, que contiene un átomo de Zn por molécula, es activada por  $\text{Ca}^{2+}$  y es drásticamente inhibida por quelantes de metales.

En contraste con los varios estudios de venenos de escorpiones, arañas, serpientes y caracoles cono, no es sino hasta el año 2008, que Junqueira y col., reportan el primer estudio de análisis proteómico del veneno de una anémona marina. En su trabajo reportaron por primera vez la huella peptídica y algunos péptidos nuevos en la fracción neurotóxica FrIII del veneno de la anémona marina *Bunodosoma cangicum*. El análisis proteómico y la huella peptídica de las fracciones de venenos de anémona de mar a través de espectrometría de masas, son herramientas valiosas que permiten predecir rápidamente la aparición de los diferentes grupos de toxinas y facilitar la búsqueda y

caracterización de nuevas moléculas sin la necesidad de una caracterización completa de cada componente.

Muy recientemente, Oliveira y col., (2012) realizaron la interesante propuesta de desarrollar una nomenclatura racional para nombrar toxinas peptídicas y proteínas de anémonas marinas. Dado a los avances en la tecnología de secuenciación de ADN y técnicas de proteómica, el número de secuencias de toxinas peptídicas, proteínas citolíticas formadoras de poros y fosfolipasa A<sub>2</sub> de anémonas marinas, enviadas a bases de datos en los últimos años, ha aumentado rápidamente. Sin embargo, aseguran los autores, la falta de una nomenclatura sistemática ha dado lugar a la asignación de varios nombres a las mismas toxinas, a designación del mismo nombre a toxinas de especies no relacionadas, y a las designaciones ambiguas de los nombres. Por lo tanto, en este trabajo, los autores propusieron una nomenclatura sistemática en la que se adoptó criterios específicos, con base en el orden de descubrimiento y el análisis filogenético, con el fin de evitar nombres redundantes de toxinas de anémonas marinas. En la nueva nomenclatura cada nombre de toxina contiene información de la actividad biológica de la misma, su origen y la relación con las isoformas conocidas.

## **5.- Mochima como fuente de biotoxinas marinas:**

Venezuela se encuentra entre los primeros 10 países con la mayor biodiversidad en el mundo, tanto en el ambiente terrestre como el marino. Posee un Territorio Marítimo de 860.000 Km<sup>2</sup>.

La costa de Venezuela es muy diversa en términos geológicos y topográficos y posee 3.964 Km de los cuales el 68% está frente al Mar Caribe en donde se encuentra Mochima, uno de los Parques Nacionales marinos con mayor área de extensión. (Miloslavich y col, 2003)

### **5.1- Mochima:**

Declarado Parque Nacional en 1973 bajo el decreto N° 1.534, protege 94.935 hectáreas en la región Mochima, entre los estados Anzoátegui y Sucre. Se ubica sobre la franja litoral costera en la región nororiental del país específicamente entre las latitudes 10°9'50'' y 10°26'00'' Norte y las longitudes 64°13'20'' y 64°47'32'' Oeste (Figura 3). Cuenta con 52% de zona marítima, 6% de zona insular y 42% de zona continental.

Está constituido por un grupo de islas que contienen escenarios de bahías, acantilados, golfos, costas de aguas profundas, playas de arena blanca, arrecifes de coral, así como también zonas montañosas de frondosa cobertura vegetal, por lo que representa varios ecosistemas donde se manifiestan un sinnúmero de riquezas naturales.



Figura 3: Parque Nacional Mochima. Tomado de INPARQUES.

### 5.1.1- Bahía de Mochima:

En esta Bahía se presentan las típicas comunidades tropicales marinas en un espacio relativamente pequeño. Los principales hábitats marinos y costeros de la Bahía son los arrecifes coralinos, los pastos marinos y los manglares. Estos hábitats proporcionan suficiente refugio y alimentación para la vida de numerosas especies de organismos marinos, que constituyen fuente potencial de sustancias biológicamente activas, como por ejemplo: esponjas, tunicados, poliquetos, anémonas, entre otros.

En el interior de la Bahía se localizan cuatro pequeños islotes (Ceñidura, Santa Ana, Isla Larga e Isla Redonda). Isla Larga (punto de muestreo en el presente trabajo) es la más grande y se encuentra bordeada de pequeñas franjas de mangles o manglares (Figura 4).

## HABITATS MARINOS EN LA BAHÍA DE MOCHIMA

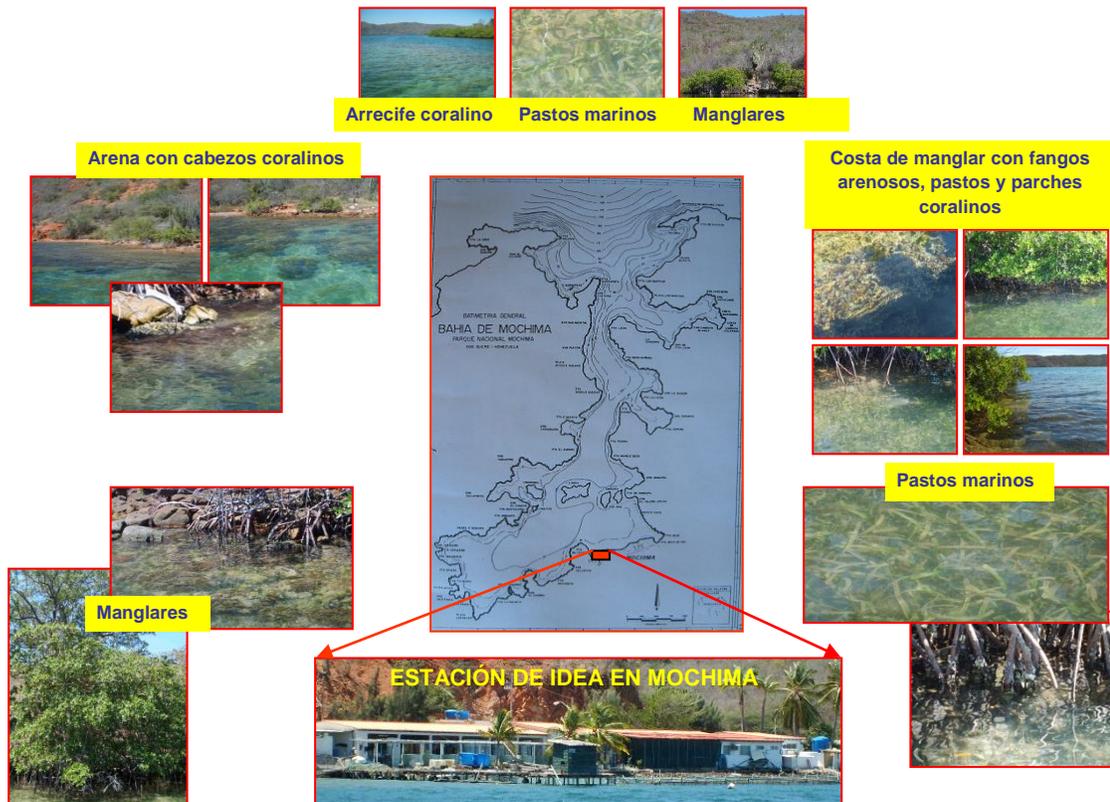


Figura 4: Hábitats marinos en la Bahía de Mochima – Parque Nacional Mochima.

Tomado y modificado de Robaina y col, 1994.

En general, los montículos arrecifales son comunidades altamente estructuradas resultado de la asociación compleja principalmente de especies de corales pétreos. Los corales, gracias a la variabilidad de sus formas (ramificados, tubulares, circulares, aplanados, etc.), ofrecen un sustrato y una serie de habitáculos óptimos para muchas especies de algas e invertebrados marinos como las esponjas, los cangrejos, los moluscos, los gusanos tubícolas (poliquetos), los erizos, las anémonas, los peces invertebrados, en fin una gran lista de especies.

A pesar de que no se ha realizado el levantamiento de inventarios pormenorizados, estudios realizados con otros objetivos en la zona han ayudado de manera indirecta a conocer la flora y fauna predominante, siendo ésta última de interés para el presente trabajo de investigación.

## **5.2- Fauna de Mochima:**

La fauna que habita en la Región Marina del Parque, está dada por numerosos grupos zoológicos, dentro de los que figuran los *Poríferos*, representados por las conocidas y llamativas esponjas, habitantes comunes de todos los fondos marinos y en especial de las formaciones arrecifales; *Cnidarios*, entre los que destacan los vistosos y conocidos corales, anémonas y medusas; *Ctenóforos*, pequeñas y casi transparentes criaturas marinas frecuentemente confundidas con el agua mala; *Platelmintos* o gusanos planos, comensales y parásitos de numerosos organismos marinos; *Moluscos*, que agrupa los conocidos como caracoles, pulpos y calamares, habitantes de todos los fondos marinos del Parque; *Anélidos*, entre los que destacan los gusanos (poliquetos) de la familia Serpulidae; *Artrópodos*, representados por numerosas especies de insectos y los conocidos crustáceos (cangrejos, langostas y camarones); *Equinodermos*, como los erizos, las estrellas y las arañas de mar; *Cordados*, incluyendo principalmente los tunicados y los peces anfibios; entre otros grupos de especies.

### 5.2.1- Cnidarios:

Los registros para el grupo de los cnidarios dentro de la jurisdicción del Parque alcanzan un total de 2 especies pertenecientes a la Clase Hydrozoa (pólipos-medusas), 8 a la Clase Scyphozoa (medusas) y por lo menos 74 especies de la Clase Anthozoa (anémonas y corales) sin embargo, la distribución de estas especies en las aguas del Parque depende de varios factores como la disponibilidad y tipo de sustrato, intensidad lumínica, corrientes, temperatura, salinidad, nivel de marea, material en suspensión y disponibilidad de nutrientes.

#### 5.2.1.1- Anémonas de la Bahía de Mochima

En el Parque se han registrado 3 especies (Figura 5), entre las que destaca *Condylactis gigantea* (especie de interés en el presente trabajo), abundante en las praderas de hierbas marinas y arrecifes coralinos, y en menor proporción *Lebrunia danae* y *Bartholomea annulata*.



**Figura 5: Fotos referenciales de Anémonas del Parque Nacional Mochima.** a) *Condylactis gigantea*, b) *Lebrunia danae* y c) *Bartholomea annulata*. Tomado y modificado de Costa de Venezuela.

✓ *Condylactis gigantea*:

Clasificación Taxonómica:

Reino: Animal

Filo: Cnidaria

Clase: Antozoos

Subclase: Hexacorales

Orden: Actiniaria

Familia: Actiniidae

Género: *Condylactis*

Especie: *C.gigantea*

La anémona *Condylactis gigantea* conserva las características propias de las anémonas descritas anteriormente (punto 3), y como características particulares de la especie se puede describir un disco plano en el extremo basal color anaranjado, un cuerpo de aproximadamente 10 cm de diámetro conformado por tentáculos de color amarillo-pardo parecido al dorado siendo las puntas característicamente de color fucsia, lo que la hace distinguible y fácilmente identificable entre las otras especies, ya que la anémona *Lebrunia danae* a pesar de poseer el cuerpo y los tentáculos similares, estos últimos son completamente del mismo tono dorado incluyendo las puntas, mientras que los tentáculos de la *Bartholomea annulata* suelen ser traslúcidos con halos blancuzcos que le dan una apariencia rizada o de espiral como se puede apreciar en la Figura 5.

En 1968, Shapiro realiza los primeros reportes acerca de la purificación de una toxina de los tentáculos de la anémona *Condylactis gigantea* de las Bermudas. En sus estudios observó una alta actividad paralítica en crustáceos (cangrejo de río) entre las primeras 2 horas post-administración, seguida de la muerte a las 48 horas. Sin embargo, observó dicha actividad sobre el nervio del cangrejo de río pero no sobre la membrana del músculo. Sus resultados le permitieron concluir que el extracto de *C.gigantea* contiene un componente proteico básico, neurotóxico de Peso Molecular entre 10 y 15 kDa. Estos resultados fueron confirmados por Narahashi y col en 1969.

Posteriormente Yost y O'Brien (1978), a diferencia de los resultados obtenidos por Shapiro (1968) y Narahashi (1969), aislaron y purificaron dos componentes tóxicos de la anémona *C.gigantea* de la Costa de Florida. El peso molecular de ambos componentes fue de 4500 Da y el punto isoeléctrico de cada una fue 4,8 y 5,8. Reportan además que los efectos tóxicos fueron irreversibles y altamente específicos para crustáceos pero no para moluscos y mamíferos.

Hallazgos importantes fueron reportados por Bernheimer y col en 1982, quienes aislaron y caracterizaron de la anémona *C.gigantea* una toxina citolítica termolábil, de PM ~19 kDa y pI 8,9. Además reportaron que carece de metionina pero contiene relativamente abundante glicina, serina, triptófano y medianamente cisteína. Demostraron que la actividad hemolítica es inhibida por esfingomiélin, datos que coinciden con las características de las actinoporinas.

Ständker y col, (2006), aislaron de la anémona *C.gigantea* de la Habana - Cuba, una toxina peptídica de 5043 Da y pI 5,05; la cual prolongó la duración del potencial de acción cardíaco en cobayos y la fuerza contráctil fue 100 veces mayor a la producida por la toxina de *Anemonia sulcata*.

Por otro lado, Falcón y col, (2009), demostraron que la anémona *C.gigantea* de la Costa de México presentó una elevada actividad hemolítica tanto con el extracto crudo como para una de las fracciones purificadas.

Más recientemente, en el 2010, Romero y col., aislaron y caracterizaron una fosfolipasa A<sub>2</sub> (CgPLA<sub>2</sub>) del extracto de anémona de *C.gigantea* de la Costa de la Habana-Cuba, la cual mostró un pI de 8,6 y pesos moleculares de 14500 y 29000 Da para el monómero y el dímero, respectivamente. Su acción es dependiente de Ca<sup>2+</sup> y no posee actividad hemolítica.

En Venezuela, existe sólo un reporte de estudios realizados con la anémona *C.gigantea*, específicamente de la Bahía de Morrocoy. Sin embargo, el objetivo de esa investigación fue uno distinto al de interés en el presente estudio, ya que el estudio consistió en evaluar la respuesta osmótica a corto plazo de células y tejidos de la anémona (Herrera y col, 1989).

A pesar de las condiciones desfavorables que al parecer existen en algunas zonas, los valores de diversidad de especies que se han registrado en la Bahía de Mochima son más altos que los obtenidos en otras localidades del país, lo que significa que, por lo menos esta porción del Parque, posee mayor diversidad por unidad de área que otros parques nacionales marinos del país, convirtiéndola en una zona de preferencia para la recolección y estudio de diversos organismos invertebrados marinos dentro de un ecosistema ampliamente nutrido, rico y variado en cuanto a diversidad biológica se trata. (Delgado, 1998; Robaina, 1994; Hickman, 2000; INPARQUES)

En vista de lo anteriormente planteado, conociendo la gran diversidad biológica y considerando que hasta la fecha no se han realizado estudios con las anémonas de la zona, o al menos no con el objetivo de conocer y caracterizar su proteoma, en el presente estudio se tomó como punto de muestreo, la Bahía de Mochima, específicamente en el sector Isla larga, con la finalidad de realizar estudios proteómicos del extracto de la anémona *Condylactis gigantea*.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Realizar estudios proteómicos del extracto total obtenido de la anémona *Condylactis gigantea* procedente de la Bahía de Mochima, Edo. Sucre – Venezuela.

### **Objetivos Específicos**

- 1.- Identificar y recolectar las anémonas *Condylactis gigantea*, en la Bahía de Mochima, Estado Sucre – Venezuela.
- 2.- Preparar los extractos a partir de las anémonas *Condylactis gigantea* recolectadas.
- 3.- Verificar y cuantificar la concentración de proteínas presentes en el extracto total de la anémona *Condylactis gigantea* procedente de la Bahía de Mochima, Estado Sucre – Venezuela.
- 4.- Caracterizar la actividad proteolítica del extracto total de la anémona *Condylactis gigantea* procedente de la Bahía de Mochima, Estado Sucre – Venezuela.
- 5.- Determinar la actividad hemolítica del extracto total de la anémona *Condylactis gigantea* procedente de la Bahía de Mochima, Estado Sucre – Venezuela.

6.- Determinar la actividad de la enzima Fosfolipasa A<sub>2</sub> del extracto total de la anémona *Condylactis gigantea* procedente de la Bahía de Mochima, Estado Sucre – Venezuela.

7.- Obtener y caracterizar el perfil proteico del extracto total de la anémona *Condylactis gigantea* procedente de la Bahía de Mochima, Estado Sucre – Venezuela.

## MARCO METODOLÓGICO

### **1.- Identificación y Recolección de las anémonas *Condylactis gigantea***

Los organismos en estudio (anémonas *Condylactis gigantea*) fueron recolectados en la Bahía de Mochima, Estado Sucre, específicamente en el sector Isla Larga e Isla Caracas del Este, con la ayuda de un biólogo marino de la Estación Experimental - IDEA de Mochima, para su identificación *in situ* y recolección, considerando la conservación y explotación racional de la biodiversidad marina.

Para el procedimiento nos trasladamos en una lancha con motor fuera de borda partiendo desde la Estación Experimental hacia los puntos señalados. Se realizaron varias inmersiones en las que los ejemplares fueron extraídos de su hábitat cuidadosamente con la ayuda de redes y demás implementos necesarios para conservar su integridad y se colocaron directamente en cavas de anime con agua de mar hasta su traslado a la Estación, en donde fueron depositados en tanques especialmente elaborados para mantener las condiciones adecuadas de salinidad, temperatura y oxigenación similares a las de su hábitat original. Allí permanecieron toda la noche.

Para el traslado al laboratorio (IDEA) en Hoyo de la Puerta, Baruta-Edo. Miranda, los ejemplares se conservaron en bolsas de cierre hermético conteniendo agua de mar, dentro de recipientes térmicos (cavas de anime) con hielo.

Una vez separados y debidamente rotulados e identificados, los ejemplares fueron congelados a  $-70^{\circ}\text{C}$  para su conservación y almacenamiento hasta su procesamiento.

## **2.- Extracción de Proteínas**

Con la finalidad de preservar las posibles actividades proteolíticas de las anémonas, se mantuvo la cadena de frío con hielo al momento de sacarlas del congelador (-70°C) y seguidamente fueron pulverizadas mecánicamente en nitrógeno líquido. El material obtenido fue conservado nuevamente a -70°C en alícuotas.

La extracción de proteínas se realizó con tampón RIPA (radioimmunoprecipitation assay buffer), el cual está compuesto por Tris HCl 50mM pH 8,0; NaCl 150mM; NP-40 1%; SDS 0,1%;  $\beta$ -mercaptoetanol 5mM (Harlow y Lane, 1988).

Este tampón permite la extracción de proteínas a partir tanto de citoplasma como de membrana y núcleo y además es altamente compatible con muchas aplicaciones por presentar compatibilidad con inhibidores de proteasas y fosfatasas.

Del macerado obtenido se tomó una cantidad correspondiente a 50  $\mu$ L (75 mg aprox.) y fue resuspendido en 20  $\mu$ L de PBS (phosphate buffer saline) y 100  $\mu$ L de tampón RIPA más coctel de inhibidores de proteasas (Protease Inhibitor Mix, Amersham,Bioscience) a una concentración final 1X. Todo este procedimiento se realizó en hielo. El homogenato se incubó por 30 min en hielo con agitación en vórtex cada 10 min. Posteriormente fue centrifugado a 12.000 rpm durante 10 min a 4°C. Se conservó el sobrenadante separado en alícuotas a -70°C.

### **3.- Cuantificación de proteínas en el extracto total de la anémona *C.gigantea* (Mochima)**

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

Se realizó el procedimiento por triplicado, agregando 4  $\mu$ L de la muestra (extracto) más 196  $\mu$ L del reactivo de Bradford y luego de 5 min de incubación a temperatura ambiente se leyó la absorbancia a la longitud de onda de 595 nm en el equipo iMark<sup>TM</sup> Microplate Reader (BIO-RAD). Utilizando una curva de calibración estándar de Albúmina Sérica Bovina (BSA), se calculó la concentración de proteínas en el extracto.

#### 4.- Verificación de las proteínas del extracto total de la anémona *C.gigantea* (Mochima)

El estado de las proteínas fue verificado mediante electroforesis unidimensionales en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) al 5% para el gel de apilamiento y en gradiente de 10 a 20% para el gel de separación, de la siguiente manera:

**Tabla I: Componentes de los geles unidimensionales de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

<b>Tipo de gel</b>	<b>Concentración de Poliacrilamida</b>	<b>Componentes</b>
<b>De apilamiento</b>	5 %	H <sub>2</sub> O milliQ Mezcla acrilamida/bis-acrilamida 30% Tampón Tris (pH 6,8) 1,0M SDS 10% Persulfato de amonio 10% TEMED
<b>De separación</b>	10 % y 20 %	H <sub>2</sub> O milliQ Mezcla acrilamida/bis-acrilamida 30% Tampón Tris (pH 8,8) 1,5M SDS 10% Persulfato de amonio 10% TEMED

Las muestras fueron preparadas en tampón de carga sin  $\beta$ -mercaptoetanol (Tris-HCl 50mM pH6,8; SDS 2%); Glicerol 8,3%); trazas de azul de bromofenol) y sin llevar a ebullición previo a la corrida (condiciones no reductoras).

La corrida electroforética se llevó a cabo a temperatura ambiente, a 80 Voltios para el gel de apilamiento y 110-180 Voltios para el gel de separación hasta que el frente de corrida llegue al final del gel.

Las bandas se evidenciaron mediante la tinción con azul brillante de Coomassie® R-250 y la posterior decoloración con ácido acético al 10%.

El marcador de Peso Molecular empleado fue BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen).

## **5.- Identificación y Caracterización de la Actividad Proteolítica del extracto total de la anémona *Condylactis gigantea* (Mochima)**

### **5.1- Zimogramas de Gelatina**

La zimografía es una técnica electroforética basada en la separación de proteínas en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) los cuales tienen un sustrato copolimerizado entre la matriz de poliacrilamida del gel. Luego de la electroforesis en condiciones desnaturalizantes, pero no reductoras, las proteínas son renaturalizadas e incubadas en un tampón apropiado para la actividad proteolítica. La visualización de dicha actividad aparece como bandas claras sobre un fondo azul oscuro en el gel luego de la tinción con Coomassie. (Troeborg y Nagase, 2003; Wilkesman y Kurz, 2009; Hawkes y col., 2010)

Para esto se siguió el protocolo descrito por Mazzoni y col., 2007, con algunas modificaciones. Se realizaron geles de poliacrilamida (Laemmli, 1970) al 5% para el gel de apilamiento y en gradiente de 10 a 20% para el gel de separación en condiciones disociantes (SDS-PAGE) / no reductoras (tampón de carga sin  $\beta$ -mercaptoetanol y sin calentar la muestra antes de la corrida).

En este caso la polimerización de la poliacrilamida se realizó en presencia de gelatina soluble (Sigma®) a una concentración final de 1mg/mL. Para el caso específico de las proteasas, la gelatina es uno de los sustratos más frecuentemente usados. (Leber y Balkwill, 1997)

La corrida electroforética se llevó a cabo dentro de una cava de anime con hielo a 80 Voltios para el gel de apilamiento y 100 Voltios constantes para el gel de separación hasta cuando el frente de corrida llegara al final del mismo. Una vez finalizada, los geles fueron lavados con H<sub>2</sub>O milliQ y posteriormente con Tritón X-100 al 2,5% a temperatura ambiente por 1 hora para la remoción de SDS del gel. Luego se lavaron una vez más con H<sub>2</sub>O milliQ y fueron incubados con una solución activadora compuesta de Tris HCl 50mM pH 7,0; CaCl<sub>2</sub> 5mM; NaCl 0,2M y ZnCl<sub>2</sub> 0,1μM durante 15 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo, se descartó la solución activadora y se lavó con H<sub>2</sub>O milliQ. Finalmente los geles fueron teñidos con Azul Brillante de Coomassie® R-250 y decolorados con mezcla ácido acético 10% - metanol 30%, hasta observarse las bandas claras sobre el fondo oscuro correspondientes a proteínas con actividad proteolítica.

El marcador de Peso Molecular empleado en este caso fue BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder.

## **5.2- Efecto de la Temperatura sobre la actividad proteolítica del extracto total de la anémona *Condylactis gigantea* observada en Zimogramas de Gelatina**

Se siguió el protocolo para zimogramas anteriormente detallado. Una vez realizada la corrida electroforética, se incubó el gel con la solución activadora (Tris HCl 50mM pH 7,4; CaCl<sub>2</sub> 5mM; NaCl 0,2M y ZnCl<sub>2</sub> 0,1μM) igualmente durante 15 horas pero en este caso variando la **temperatura** de incubación. Para esto se ensayó la incubación desde los 10°C aumentando en 5°C hasta llegar a 80°C.

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

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

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

Luego de caracterizados la temperatura y pH óptimos para la actividad enzimática observada, se procedió a incubar los geles con la solución activadora de la siguiente forma: Tris HCl 50 mM sin iones; Tris HCl 50 mM sólo con CaCl<sub>2</sub> 5mM; Tris HCl 50 mM sólo con NaCl 0,2M; Tris HCl 50 mM sólo con ZnCl<sub>2</sub> 0,1μM y Tris HCl 50 mM en combinación CaCl<sub>2</sub> 5mM y NaCl 0,2M. El tiempo de incubación no fue modificado (15 horas).

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

Para evidenciar este efecto, se empleó la técnica de zimograma descrita en el punto 5.1. La incubación de los geles se realizó durante 15 horas a la temperatura y pH óptimos obtenidos en la caracterización. Al volumen final de solución activadora (Tris HCl 50mM; CaCl<sub>2</sub> 5mM; NaCl 0,2M y ZnCl<sub>2</sub> 0,1μM) empleado en la incubación, se añadió por separado los inhibidores de proteasas. Se ensayaron inhibidores de metalo-proteasas a una concentración final de 10mM para EDTA (ácido etilendiamino-tetraacético) y 20mM para EGTA (ácido etilenglicol-tetraacético) e inhibidor de serinproteasas PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) a 3 mM. Luego del período de incubación (15 horas), los geles fueron lavados con H<sub>2</sub>O milliQ y posteriormente teñidos con azul brillante de Coomassie® R-250 y se observó si en presencia de cada inhibidor dejaba de evidenciarse o no alguna de las bandas que presentaba actividad proteolítica.

## **6.- Determinación de la Actividad Hemolítica del extracto total de la anémona *Condylactis gigantea* (Mochima)**

Para determinar la actividad hemolítica del extracto de la anémona *Condylactis gigantea*, se siguió el protocolo descrito por Hu y col., 2011, con pequeñas modificaciones.

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

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

El porcentaje de hemólisis fue calculado empleado la siguiente fórmula:

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

La actividad hemolítica del extracto de las anémonas *C. gigantea* fue expresada en función de la Concentración Hemolítica 50 (CH<sub>50</sub>), que no es más que la concentración de proteínas del extracto total que produce la hemólisis del 50% de los eritrocitos. La CH<sub>50</sub> se determinó por la construcción de curvas dosis-respuesta con los datos obtenidos del porcentaje de hemólisis producido por las diferentes concentraciones de proteína ensayadas.

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

## **7.- Determinación de la actividad de la enzima Fosfolipasa A<sub>2</sub> del extracto total de la anémona *Condylactis gigantea* (Mochima)**

Para determinar la actividad de la Fosfolipasa A<sub>2</sub>, se utilizó el método fluorimétrico *EnzChek Phospholipase A<sub>2</sub> Assay kit* (Invitrogen), el cual permite la monitorización de la actividad de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) a través de la detección de cambios en la intensidad de emisión a 515/575 nm con excitación a ~460 nm. El sustrato de PLA<sub>2</sub> EnzChek®, es selectivo sólo para la isoforma A<sub>2</sub>. En el ensayo se utilizó una solución patrón de PLA<sub>2</sub>, con la que se realizaron diluciones seriadas de la enzima desde 0 hasta 10 U/mL para la construcción de la curva estándar. La determinación se llevó a cabo en placas oscuras de 96 pozos, sirviendo 50 µL del extracto total de la anémona *C.gigantea* y de sus diluciones (1/100 y 1/200), todos por triplicado. Seguidamente se prepararon 30 µL del reactivo llamado “mezcla de lípidos” (10 µL de Dioleoilfosfatidilcolina 10 mM; 10 µL de Dioleoilfosfatidilglicerol 10 mM y 10 µL sustrato de PLA<sub>2</sub> 1mM) de esta mezcla se tomaron 15 µL y se le adicionaron a 1,5 mL de buffer de corrida, se mantuvo mezclando por 1 minuto y de allí se tomaron 50 µL para servirlos en cada pozo de la placas donde estaban las muestras, la curva patrón y los controles (positivos y negativos). El control positivo se preparó con 3 µL del sustrato de PLA<sub>2</sub> en 150 µL de buffer de corrida, y el control negativo fue buffer de corrida únicamente. La reacción fue incubada por 10 minutos a temperatura ambiente protegida de la luz, luego se realizó la lectura en un espectrofotómetro (Biotech, modelo Synergy HT) a un rango de excitación de 450/490nm y emisión de fluorescencia de 515/575 nm.

## **8.- Determinación y Caracterización del perfil proteico del extracto total de la anémona *Condylactis gigantea* (Mochima) mediante Electroforesis Bidimensionales**

Para este punto las muestras utilizadas fueron obtenidas mediante la extracción de proteínas detallada en el punto 2, utilizando el tampón RIPA (radioimmunoprecipitation assay buffer) pero en este caso sin SDS (Tris HCl 50mM pH 8,0; NaCl 150mM; NP-40 1%;  $\beta$ -mercaptoetanol 5mM), ya que este detergente iónico forma con las proteínas complejos cargados negativamente, de modo que sin SDS, se garantiza que las proteínas que tienen masas moleculares similares migren de forma diferente debido a diferencias en la proporción carga/masa.

### **8.1.- Rehidratación de las tiras**

Las muestras fueron resuspendidas con el tampón de rehidratación DeStreak™ Amersham (urea y detergentes no iónicos) al cual se le agregó previamente los anfolitos específicos para el pH de la tira utilizada (pH 3 -10 Lineal). Las tiras de 13 cm de longitud se colocaron en un soporte con canales de la misma longitud conteniendo un volumen final de 300  $\mu$ L de tampón de rehidratación evitando la formación de burbujas. Se incubó por 14 a 18 horas a temperatura ambiente.

## 8.2.- Primera Dimensión o Isoelectroenfoque (IEF)

Luego de haber hidratado las tiras, se procedió a realizar el isoelectroenfoque, con la finalidad de separar a las proteínas según su punto isoeléctrico, es decir, el punto en el que la carga neta de la proteína es cero.

Esto se realizó en el equipo Amersham Ettan IPGphor 3 (General Electric Healthcare) de la siguiente forma:

Se colocaron las tiras con el gel hacia arriba en los soportes acanalados de cerámica que contienen aceite mineral y se hicieron coincidir los polos (+) y (-) de las tiras con los del canal. En los extremos de cada tira se colocaron mechas de papel humedecidas con agua destilada y en cada polo se colocaron los electrodos. Se utilizó el programa de enfoque que recomienda la casa comercial Amersham para cada tipo de tira, en este caso 13cm, pH 3-10 L (Tabla II). Luego de finalizado el procedimiento, las tiras se conservaron a -70°C hasta realizar la segunda dimensión.

**Tabla II: Protocolo de enfoque isoeléctrico empleado.**

<b>Tipo de tiras</b>	<b>Tamaño</b>	<b>Protocolo de variación de voltaje en pasos</b>
Tiras de intervalo de pH 3-10 Lineal	13 cm	Incremento gradual hasta 500 V x 1 hr Incremento gradual hasta 1000 V x 1hr Incremento gradual hasta 8000 V x 2 hr 30 min Mantener 8000 V x 10 - 30 min

### **8.3.- Equilibración de las tiras**

Antes de realizar la segunda dimensión se equilibraron las tiras provenientes del Isoelectroenfoque con la finalidad de romper los puentes disulfuro y asegurarse que las proteínas se encuentren en estado reducido. Para ello se realizó un primer lavado de 15 min a temperatura ambiente con el buffer de equilibrio (urea 6M; Tris-HCl 1,5M pH 8,8; glicerol 30%; SDS 2% y trazas de azul de bromofenol) con ditioneitol (DTT) al 1% (agente reductor), en agitación constante y luego de transcurrido este tiempo se descartó el buffer y se realizó un segundo lavado con el buffer de equilibrio con iodoacetamida al 4% (garantiza que la reacción realizada por el DTT sea irreversible) durante 15 min, de igual manera en agitación constante a temperatura ambiente.

### **8.4.- Segunda Dimensión o SDS-PAGE**

Luego de separadas las proteínas según su punto isoeléctrico en la primera dimensión, el SDS-PAGE (electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) permite separar polipéptidos según su Peso Molecular (PM) y no por su carga, ya que el SDS (detergente iónico) aporta cargas negativas quedando todas las proteínas cargadas negativamente por igual.

Se prepararon geles de poliacrilamida al 12% de 12 x 24cm (Laemmli, 1970). La tira enfocada se colocó horizontalmente sobre el gel. En un papel de filtro se agregó 1  $\mu$ L del marcador de peso molecular BenchMark™ (Invitrogen) en la parte inferior del papel

y se colocó en uno de los extremos de la tira. Luego se aseguró la tira y el papel con una solución tibia, sin solidificar de agarosa al 0,4% con trazas de azul de bromofenol. Luego de solidificada la agarosa se corrió el gel en tampón de corrida (Tris-HCl 25mM; glicina 198mM y SDS 0,1%), a 200 Voltios durante 45min o justo antes que el frente de corrida llegara al final del gel. Finalmente, los geles fueron teñidos para observar la corrida de las proteínas.

### **8.5.- Tinción de Plata**

La tinción con plata es hasta 100 veces más sensible que el azul brillante de Coomassie, lo que la convierte en una técnica extremadamente útil para detección de proteínas en pequeñas cantidades y para la tinción de geles bidimensionales (Morrissey, 1981).

En el presente estudio se utilizó el estuche PlusOne™ Silver Staining (Amersham) siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

El proceso de tinción y revelado se realizó en 5 fases:

*8.5.1.- Fijación:* Se realizó una incubación con la solución de fijación (Etanol 40%, ácido acético glacial 10%) durante 30 min.

*8.5.2.- Sensibilización:* Se incubaron los geles por 30 min en la solución de sensibilización (Etanol 3%, glutaraldehído 125 mM, tiosulfato de sodio 200 mM, acetato

de sodio 0,82 mM). Posteriormente se realizaron 3 lavados con agua destilada por 5 min cada uno.

8.5.3.- *Reacción con Plata:* Los geles se incubaron por 20 min con la solución de reacción (Nitrato de plata 250 mM, formaldehído 4,8 mM) y posteriormente se realizaron 2 lavados con agua destilada de 1 min cada uno para retirar el exceso de plata.

8.5.4.- *Revelado:* Se sumergieron en la solución de revelado (Carbonato de sodio 0,23 mM, formaldehído 7,5 mM) hasta observar claramente las manchas en los geles.

8.5.5.- *Detención del revelado:* En el momento en el que se evidenciaron las manchas en los geles, se agregó la solución “stopping” o solución de detención (EDTA-Na·2H<sub>2</sub>O 0,039 mM) para finalizar la reacción.

Se digitalizaron los geles con el equipo ChemiDoc XRS Imagen System (Bio-Rad), en el formato TIFF que es compatible el software Phoretix<sup>TM</sup>-2D y luego fueron almacenados en bolsas plásticas cerradas conteniendo solución “stopping” a 4°C.

## **8.6- Caracterización del perfil proteico del extracto total de la anémona *Condylactis gigantea* (Mochima) mediante el análisis de los geles bidimensionales**

Las imágenes de los geles en formato TIFF se analizaron con el software Phoretix™-2D de la casa comercial Amersham, siguiendo las especificaciones del programa.

En general, se realizó el análisis de la siguiente manera:

*8.6.1.- Detección de las manchas o “spots”:* Se seleccionó manualmente el área de cada mancha que haya sido de interés contenidos en el gel.

*8.6.2.- Eliminación del fondo o “background” de los geles:* se realizó seleccionando manualmente los espacios del gel donde no habían manchas de interés lo que generó un valor promedio que fue restado automáticamente a la intensidad del fondo de cada mancha del mismo gel.

*8.6.3.- Selección e incorporación de los marcadores de Punto Isoeléctrico (PI) y Peso Molecular (PM):* Se le asignó a cada gel el marcador de PM y PI, luego se ubicó en el gel cada banda que correspondiera a una de las masas del marcador, de la misma manera esto se realizó con el Punto Isoeléctrico. Se especificó las características de la tira (13cm, 3 a 10 L).

*8.6.4.- Análisis Final:* El programa generó una matriz con los datos de Punto Isoeléctrico (PI) y Peso Molecular (PM) para cada mancha, y esto se relaciona con las proteínas de interés.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### **1.- Identificación y Recolección de las anémonas *Condylactis gigantea***

Las anémonas estudiadas en el presente trabajo fueron recolectadas en la Bahía de Mochima, Estado Sucre (Venezuela), como se describió previamente en la metodología. Se realizaron las inmersiones en horas del día entre 9 am y 1 pm aprox. El punto de muestreo fue Isla Larga, La temperatura del agua era de aproximadamente 24°C en toda el área (sin corriente marina).



**Figura 6: Foto Satelital de la Bahía de Mochima. Se señala en la imagen Isla Larga.**  
Tomada de Google Maps

Como se describió en el marco teórico, en la fauna de Mochima se han registrado 3 especies de anémonas, siendo la más abundante *Condylactis gigantea*, y en menor cantidad *Lebrunia danae* y *Bartholomea annulata* (Robaina, 1994). Para la identificación *in situ* de la especie de interés *Condylactis gigantea* se contó con la ayuda de un biólogo marino de la Estación Experimental IDEA-Mochima, basándose en las características morfológicas de la especie, descritas en el marco teórico (punto 5.2.1.1) que la hacen fácilmente diferenciable e identificable, los tentáculos con las puntas característicamente de color fucsia (Figura 7).



**Figura 7: Foto de la anémona *Condylactis gigantea* en el lugar de muestreo, Bahía de Mochima.**  
(Fuente propia).

Se recolectaron en total 12 ejemplares de la anémona *Condylactis gigantea*. Durante la recolección, se colocaron dentro de cavas de anime que contenían agua de mar (Figuras 8 a y b). Una vez finalizado el muestreo fueron depositadas en los tanques de la Estación Experimental IDEA – Mochima, los cuales están diseñados especialmente para recibir en la parte inferior la entrada directa del agua de mar y así proveer a los organismos las condiciones adecuadas de temperatura, oxigenación y salinidad similares a su hábitat original (Figuras 9 a y b). Allí permanecieron toda la noche. Al día siguiente, las anémonas no mostraron rasgos de deterioro, fueron retiradas de los tanques y conservadas en bolsas con cierre hermético conteniendo agua de mar dentro de cavas de anime con hielo. De esta manera fueron transportadas al Laboratorio de Genómica y Proteómica del Centro de Biotecnología de la Fundación IDEA, en donde al llegar fueron separadas, identificadas y congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  para su conservación. No mostraron signos de descomposición El peso seco de una anémona completa fue de 30 a 35g aprox.

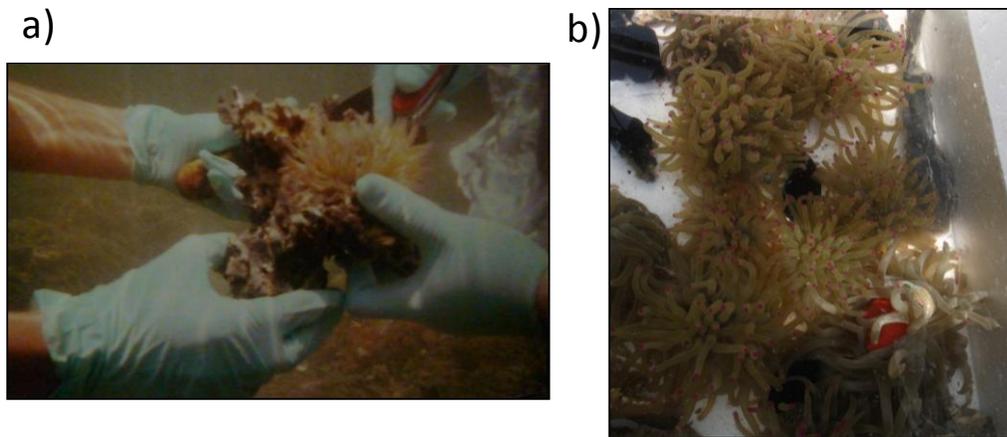


Figura 8: a) Proceso de recolección de las anémonas *C.gigantea*, b) Almacenamiento en cavas de anise durante el muestreo. Isla Larga - Bahía de Mochima.

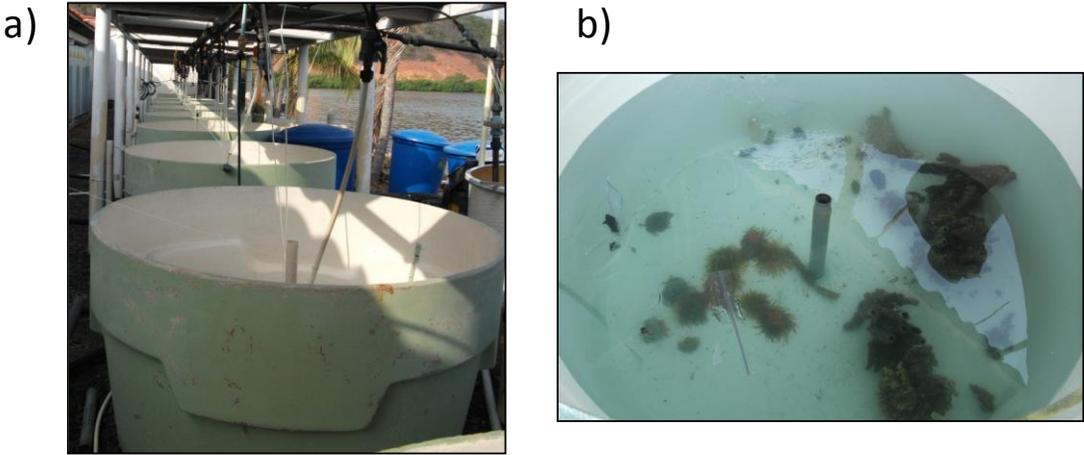


Figura 9: a) y b) Tanques de almacenamiento. Estación experimental IDEA - Bahía de Mochima.

## **2.- Cuantificación de las proteínas presentes en el extracto total de la anémona *Condylactis gigantea* (Mochima)**

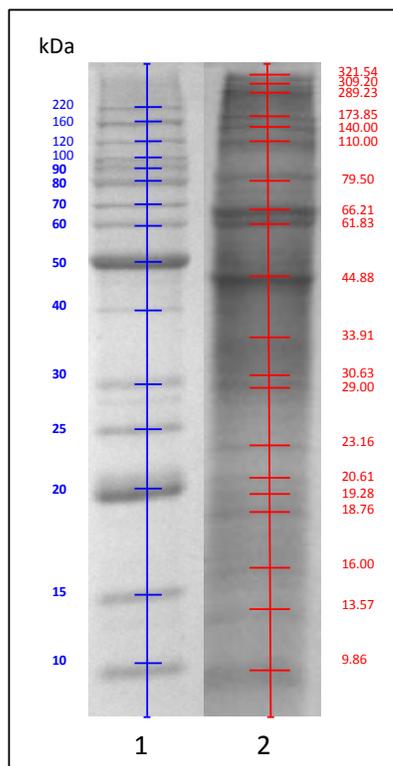
Las anémonas fueron trituradas y reprocesadas como se describió en la sección de Materiales y Métodos para la extracción de proteínas.

La concentración de proteínas presentes en el extracto total de la anémona *Condylactis gigantea* fue de  $8,69 \pm 0,57 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  (n=8) por el método de Bradford 1976.

## **3.- Perfil electroforético del extracto total de la anémona *Condylactis gigantea* (Mochima)**

Para obtener el perfil electroforético del extracto de anémonas *C. gigantea*, se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones disociantes/no reductoras, como se detalló en el marco metodológico.

En la Figura 10, se puede observar que el extracto total de la anémona de *C.gigantea* presenta un perfil electroforético de aproximadamente 20 bandas con un amplio rango de pesos moleculares que van desde aprox 9,86 kDa hasta bandas superiores a los 220 kDa, de las cuales sólo 2 de estas bandas son de bajo peso molecular (9,86 y 13,57 kDa) y las restantes 18 son de peso molecular medio-alto (16,00 – 18,76 – 19,28 – 20,61 – 23,16 – 29,0 – 30,63 – 33,91 – 44,88 – 61,83 – 66,21 – 79,50 – 110,00 – 140,00 – 173,85 –y presumiblemente 289,23 – 309,20 y 321,54 kDa) según la clasificación de Ownby y Colberg (1990).



**Figura 10: Perfil Electroforético del extracto total de la anémona *C. gigantea* (Bahía de Mochima).** SDS-PAGE al 10-20%, condiciones no reductoras, teñido con azul brillante de Coomassie. (1): Marcador de Peso Molecular BenchMark™. (2): Extracto proteico de anémonas *C. gigantea* (15,8µg). Cálculos de los Pesos Moleculares obtenidos por el programa Quantity One®.

Estos resultados son similares a los reportados en la literatura en cuanto al amplio rango de compuestos proteicos presentes en el veneno de las anémonas marinas, el cual puede variar desde 3.000 hasta 300.000 Da (Béress, 1982; Oliveira y col, 2006).

Tomando como referencia los datos reportados en la literatura sobre los pesos moleculares de proteínas aisladas y purificadas de la anémona *C.gigantea* de otras regiones costeras, así como en general las toxinas (polipéptidos y péptidos) caracterizadas provenientes de otras especies de anémonas, se toman como principales

proteínas de interés dentro del perfil electroforético aquí presentado, las de pesos moleculares cercanos a los 20 kDa, las cuales podrían guardar relación con las toxinas citolíticas del tipo actinoporinas caracterizadas en otras anémonas, responsables de la actividad hemolítica; así como las bandas con un peso molecular de aproximadamente 29 kDa y 30 kDa que pueden estar posiblemente relacionadas a fosfolipasa A<sub>2</sub> y citolisinas de este rango de peso molecular respectivamente, como ha sido descrito en la literatura (Anderluh y Maček, 2002; Álvarez y col, 2003; Tejuca y col, 2009; Romero y col, 2010 y Anderluh y col, 2011). Además de estas proteínas señaladas, también son de interés las de pesos moleculares de aprox 23 kDa y 66 kDa presentes en el extracto en estudio, ya que en el presente trabajo se logró caracterizar las actividades proteolíticas, como será presentado y discutido más adelante.

#### **4.- Identificación y Caracterización de la Actividad Proteolítica del extracto total de la anémona *Condylactis gigantea* (Mochima)**

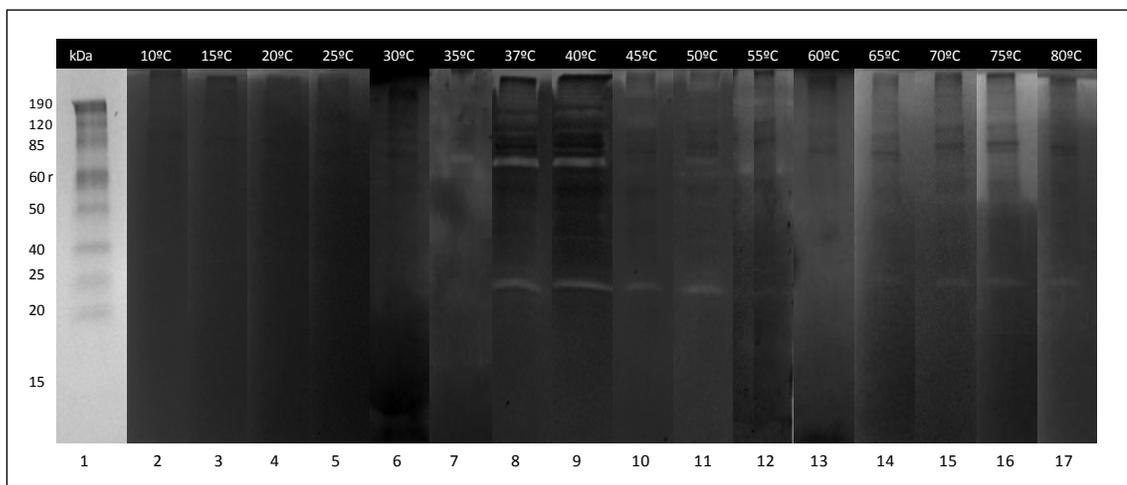
Las proteasas constituyen un atractivo potencial desde el punto de vista industrial y farmacológico como blanco terapéutico, para disfunciones en la expresión de las proteasas y su actividad relacionada en varias condiciones patológicas, como por ejemplo enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, enfermedades artríticas, infección y cáncer (Wilkesman y Kurz, 2009), de allí la importancia de estudiar la actividad proteolítica en una fuente natural tan rica en toxinas como es el caso del extracto de anémonas, particularmente *Condylactis gigantea* en este estudio, de modo tal, que luego de identificadas y caracterizadas, puedan ser consideradas como candidatas para la síntesis química o sobreexpresión de proteínas para ser potencialmente empleadas en las áreas de interés.

Con la finalidad de evaluar la actividad proteolítica del extracto de la anémona *C.gigantea*, se empleó el ensayo de zimogramas de gelatina como se describió en el marco metodológico. Esto ameritó la estandarización del método para la caracterización de la actividad enzimática en función de la temperatura y pH óptimos, efecto de los iones y de los inhibidores de proteasas.

#### **4.1- Efecto de la Temperatura sobre la actividad proteolítica del extracto total de la anémona *C.gigantea*, observada en Zimogramas de Gelatina**

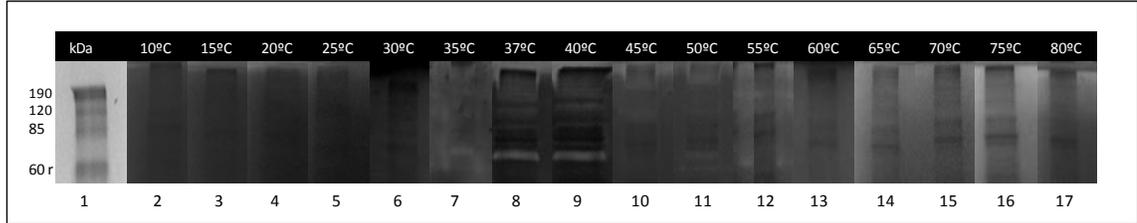
Para determinar la temperatura óptima del ensayo de actividad enzimática del extracto se realizaron estudios en zimogramas de gelatina, posterior a la corrida electroforética y sus respectivos lavados mencionados en el protocolo, se procedió a incubar los geles en una solución activadora (Tris HCl 50mM; CaCl<sub>2</sub> 5mM; NaCl 0,2M y ZnCl<sub>2</sub> 1μM) pH 7,5; durante 15 horas a diferentes temperaturas, en un rango comprendido desde 10°C hasta 80°C.

La Figura 11, muestra un zimograma teñido con azul brillante de Coomassie usado para analizar la actividad gelatinolítica del extracto. Las regiones de degradación de gelatina se evidencian como bandas claras en contraste a un fondo azul oscuro de gelatina teñida. Allí se puede apreciar que en la incubación a temperaturas desde 10°C hasta 35°C (carriles 2 al 7), el extracto no mostró actividad proteolítica en ningún peso molecular. En la incubación a 37°C y 40°C (carriles 8 y 9) se observan varias bandas de distintos pesos moleculares (altos y mediano peso molecular) con actividad enzimática.

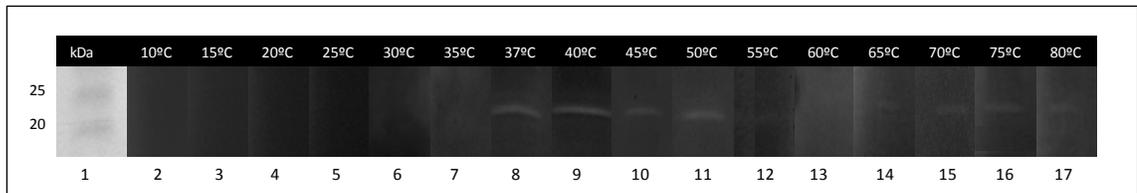


**Figura 11: Efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica del extracto total de la anémona *C.gigantea* (Mochima).** Zimograma de gelatina (1mg/mL) en gradiente al 10-20%, condiciones disociantes/no reductoras, teñido con azul brillante de Coomassie. (1): Marcador de Peso Molecular preteñido BenchMark™. (2-17): Extracto proteico de anémonas *C. gigantea* (15,8µg) con incubación a las temperaturas señaladas.

El conjunto de bandas que presentan actividad proteolítica en el gel, a los fines del análisis en este trabajo, fueron agrupadas de la siguiente manera: a) un bloque de proteínas de alto peso molecular desde la primera banda evidenciada en el perfil electroforético (Figura 10) hasta 60 kDa aproximadamente (Figura 12a), resaltando dentro de este grupo una banda que presenta mayor intensidad de aprox 66 kDa (tomando como referencia los pesos moleculares de las bandas evidenciadas en el perfil electroforético); y b) una banda de mediano peso molecular con actividad muy marcada ubicada entre 25 y 20 kDa (Figura 12b) correspondiente a la banda de aprox 23 kDa observada en el perfil electroforético (Figura 10). No se observaron bandas de bajo peso molecular con actividad proteolítica.



**Figura 12a: Efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica del bloque de proteínas de Alto Peso Molecular.** Zimograma de gelatina (1mg/mL) en gradiente al 10-20%, condiciones disociantes/no reductoras, teñido con azul brillante de Coomassie. (1): Marcador de Peso Molecular preteñido BenchMark™. (2-17): Extracto proteico de anémonas *C. gigantea* (15,8µg) con incubación a las temperaturas señaladas.



**Figura 12b : Efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica de la proteína de Mediano Peso Molecular.** Zimograma de gelatina (1mg/mL) en gradiente al 10-20%, condiciones disociantes/no reductoras, teñido con azul brillante de Coomassie. (1): Marcador de Peso Molecular preteñido BenchMark™. (2-17): Extracto proteico de anémonas *C. gigantea* (15,8µg) con incubación a las temperaturas señaladas.

Sólo en las incubaciones a 37°C y 40°C se observan bandas con actividad proteolítica de alto peso molecular (Figuras 12a). Sin embargo, como se puede apreciar en la Figura 12b, la banda de aprox 23 kDa presenta actividad enzimática desde la incubación a 37°C, con a mayor intensidad a 40°C y en las siguientes temperaturas se observa una disminución en la intensidad hasta los 80°C.

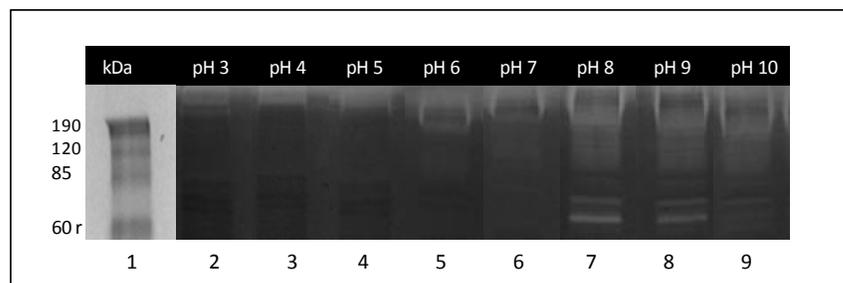
Dado que, la incubación a 40°C es la temperatura a la que se observa mayor intensidad en las bandas que presentaron actividad enzimática, tanto en las del grupo de alto peso molecular como en la de mediano, se tomó para los efectos de este estudio, 40°C como la temperatura óptima de actividad proteolítica del extracto de anémonas *C.gigantea* venezolana en este ensayo.

Los datos reportados para la proteasa marina aislada del *Flavobacterium* YS-80, la clasifican como una enzima psicrófila, con una temperatura de acción óptima de 30°C, a diferencia de las características aquí halladas para las proteasas tanto de alto como mediano peso molecular con una temperatura óptima de 40°C. Sin embargo como se describió para la proteasa de aprox 23 kDa, presenta actividad, aunque de forma disminuída, a temperaturas mayores inclusive hasta los 80°C, por lo que podría ser considerada como una proteasa termófila. (Zhang y col, 2011).

#### 4.2- Efecto del pH sobre la actividad proteolítica del extracto total de la anémona *C.gigantea*, observada en Zimogramas de Gelatina

Una vez caracterizada la temperatura óptima de acción, se utilizó el mismo protocolo, realizando las incubaciones con la solución activadora (Tris HCl 50mM; CaCl<sub>2</sub> 5mM; NaCl 0,2M y ZnCl<sub>2</sub> 1μM) durante 15 horas, a 40°C, en un rango de pH de 3 a 10, con la finalidad de obtener el pH óptimo de actividad proteolítica del extracto en el presente ensayo.

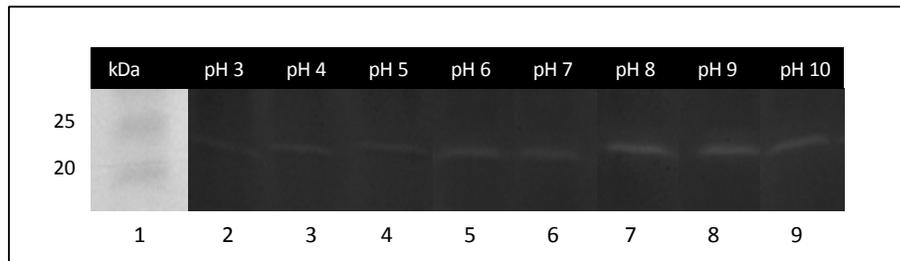
Esto puede ser observado en la Figura 13a, en la que se evidencia que las proteínas del grupo de alto peso molecular presentan actividad gelatinolítica favorecida al realizar la incubación a pH alcalino (8,0 – 9,0 y 10,0), observada con mayor intensidad a pH 8.



**Figura 13a: Efecto del pH sobre la actividad proteolítica de las proteínas de Alto Peso Molecular.** Zimograma de gelatina (1mg/mL) en gradiente al 10-20%, condiciones disociantes/no reductoras, teñido con azul brillante de Coomassie. (1): Marcador de Peso Molecular preteñido BenchMark™. (2-9): Extracto proteico de anémonas *C. gigantea* (15,8μg) con incubación a los pH señalados.

Sin embargo, claramente se observa en la Figura 13b, que la banda de aproximadamente 23 kDa (entre 25 y 20 kDa), presenta actividad enzimática en todo el rango de pH empleados (desde pH 3 hasta pH 10 ambos inclusive).

Al igual que el bloque de proteínas de alto peso molecular, la actividad gelatinolítica de esta banda se favorece a pH alcalino, evidenciándose con mayor intensidad a pH 8.



**Figura 13b: Efecto del pH sobre la actividad proteolítica de la proteína de Mediano Peso Molecular.** Zimograma de gelatina (1mg/mL) en gradiente al 10-20%, condiciones disociantes/no reductoras, teñido con azul brillante de Coomassie. (1): Marcador de Peso Molecular preteñido BenchMark™. (2-9): Extracto proteico de anémonas *C. gigantea* (15,8µg) con incubación a los pH señalados.

En función de los resultados obtenidos en los puntos 4.1 y 4.2, se tomó como condiciones estándar para el análisis de la actividad proteolítica del extracto en estudio, la incubación del zimograma de gelatina en la solución activadora (Tris HCl 50mM; CaCl<sub>2</sub> 5mM; NaCl 0,2M y ZnCl<sub>2</sub> 1µM) por 15 horas/ **pH 8,0 / 40°C**.

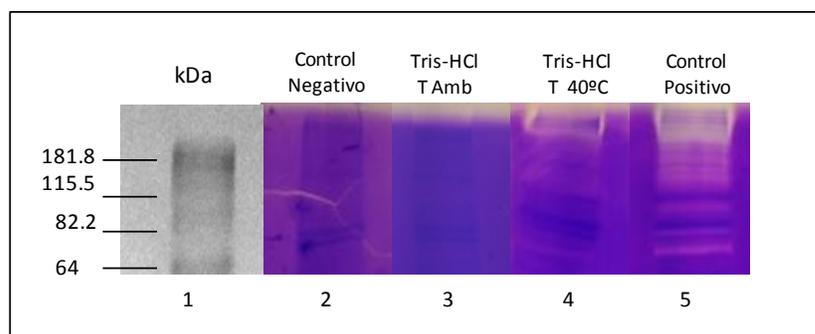
Estos resultados son similares a los reportados en la literatura para proteasas marinas extraídas del *Flavobacterium* YS-80, las cuales fueron caracterizadas con un pH preferible de acción alcalino (pH 8-11) (Zhang y col, 2011).

### **4.3- Efecto de los Iones sobre la actividad proteolítica del extracto total de la anémona *C.gigantea*, observada en Zimogramas de Gelatina**

Para evidenciar si la presencia de iones ejerce o no un papel importante en la actividad proteolítica del extracto en estudio, se realizó en primer lugar una comparación entre a) un control negativo (gel teñido luego de la corrida electroforética sin ser sometido a incubación); b) una incubación realizada sólo con Tris HCl- 50 mM (sin iones) pH 8,0 a temperatura ambiente y c) con Tris HCl- 50 mM (sin iones) pH 8,0 a 40°C; y por último d) un control positivo que consta de una incubación con la solución activadora con todos los iones (Tris HCl 50mM; CaCl<sub>2</sub> 5mM; NaCl 0,2M y ZnCl<sub>2</sub> 1µM) a pH 8,0 y a 40°C.

Los resultados pueden ser observados en las Figuras 14a y 14b, en las que se evidencia que las proteínas del bloque de alto peso molecular (Figura 14a) no presentan ninguna actividad enzimática sin incubación (control negativo) y tampoco al realizar la incubación sin iones a temperatura ambiente (carriles 2 y 3 respectivamente). Sin embargo, cuando el gel es incubado sin iones a 40°C (carril 4), se pueden observar unas pocas bandas con una ligera actividad gelatinolítica, lo que demuestra que son dependientes de la temperatura.

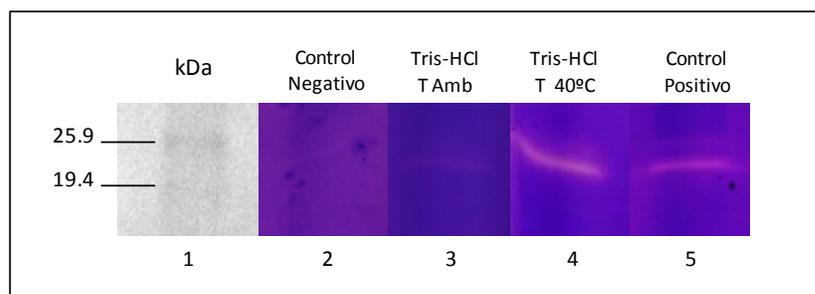
Al realizar la incubación con la solución activadora con todos los iones a pH 8,0 y 40°C (carril 5), aumenta tanto en número de bandas como en intensidad la actividad proteolítica.



**Figura 14a: Comparación de la actividad proteolítica de las proteínas de Alto Peso Molecular en presencia y ausencia de iones.** Zimograma de gelatina (1mg/mL) en gradiente al 10-20%, condiciones disociantes/no reductoras, teñido con azul brillante de Coomassie. (1): Marcador de Peso Molecular preteñido BenchMark™. (2): Control Negativo: Sin incubación; (3): Incubación en Tris-HCl 50mM pH8,0/Temp Ambiente; (4) Incubación en Tris-HCl 50mM pH8,0/40°C; (5) Control Positivo: Incubación con solución Activadora pH 8,0/40°C. En todos los caso se empleó extracto proteico de anémonas *C. gigantea* (15,8µg).

Esto demuestra que la presencia de iones favorece la actividad enzimática de algunas proteínas de alto peso molecular del extracto en estudio, lo que lleva a pensar en la posible presencia de metalo-proteasas capaces de ser activadas por los iones propios del extracto, y que al enriquecer la incubación con cierta concentración de iones como el  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  muestran una mayor intensidad en la actividad proteolítica.

En el caso de la proteína de aprox 23 kDa, se puede observar en la Figura 14b, que no presenta actividad enzimática sin incubación (carril 2), y al ser incubada en Tris-HCl 50mM /pH 8,0/ sin iones / temperatura ambiente, presenta una ligera actividad (carril 3), por lo que demuestra ser dependiente del pH, pero no de iones. Esta actividad se favorece al ser incubada en Tris-HCl 50mM /pH 8,0/ sin iones a 40°C (carril 4) con una intensidad similar a la del control positivo (carril 5). Con esto se demuestra que esta proteína de Mediano Peso Molecular presenta una actividad proteolítica no dependiente de iones.

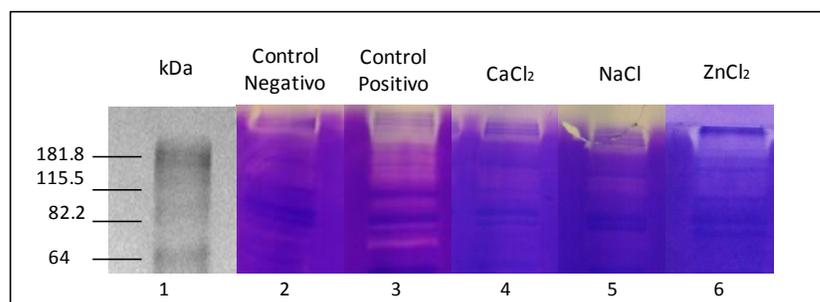


**Figura 14b: Comparación de la actividad proteolítica de la proteína de Mediano Peso Molecular en presencia y ausencia de iones.** Zimograma de gelatina (1mg/mL) en gradiente al 10-20%, condiciones disociantes/no reductoras, teñido con azul brillante de Coomassie. (1): Marcador de Peso Molecular preteñido BenchMark™. (2): Control Negativo: Sin incubación; (3): Incubación en Tris-HCl 50mM pH 8,0/Temperatura Ambiente; (4) Incubación en Tris-HCl 50mM pH 8,0/40°C; (5) Control Positivo: Incubación con solución Activadora pH 8,0/40°C. En todos los caso se empleó extracto proteico de anémonas *C. gigantea* (15,8µg).

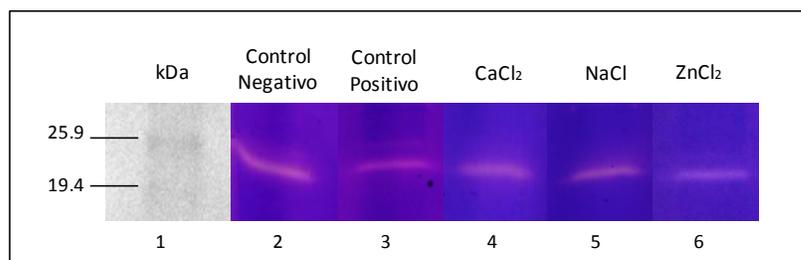
Posteriormente, para conocer el efecto de cada uno de los iones sobre la actividad proteolítica, se realizaron las incubaciones con cada ión por separado, y de esta manera conocer si la enzima presenta mayor afinidad por alguno de ellos en particular para su activación.

En las Figuras 15a y 15b, se puede observar la actividad proteolítica de las proteínas de Alto y Mediano Peso Molecular respectivamente, en función de la incubación con los iones por separado. Para esto se incluyó un control negativo (gel incubado con Tris HCl-50 mM/ pH 8,0/ 40°C/ 15 horas) y un control positivo (gel incubado con solución activadora Tris HCl-50mM; CaCl<sub>2</sub> 5mM; NaCl 0,2M y ZnCl<sub>2</sub> 1μM todos los iones juntos/ pH 8,0/ 40°C/ 15 horas). La incubación con cada ión por separado se realizó con la misma concentración a la que se encuentran en la solución activadora y bajo las mismas condiciones de pH, temperatura y tiempo.

La Figura 15a, muestra la actividad proteolítica de las proteínas de alto peso molecular, la cual se evidencia de manera muy similar en las incubaciones con cada ión por separado (carriles 4, 5 y 6), y éstas a su vez se observan con menor intensidad que las bandas presentes en la incubación con todos los iones juntos (control positivo – carril 3). Esto sugiere por una parte, que las enzimas proteolíticas presentes en este grupo de proteínas, no tienen una afinidad evidente en particular hacia alguno de los iones ensayados; y además que la combinación de los 3 iones en la incubación de los geles favorece la actividad proteolítica del extracto en estudio.



**Figura 15a: Efecto de los iones sobre la actividad proteolítica de las proteínas de Alto Peso Molecular.** Zimograma de gelatina (1mg/mL) en gradiente al 10-20%, condiciones disociantes/no reductoras, teñido con azul brillante de Coomassie. (1): Marcador de Peso Molecular preteñido BenchMark™. (2): Control Negativo: Incubación en Tris-HCl 50mM pH8,0/40°C; (3): Control Positivo: Incubación con solución activadora todos los iones pH 8,0/40°C; (4): Incubación en Tris-HCl 50mM + CaCl<sub>2</sub> 5mM pH 8,0/40°C; (5): Incubación en Tris-HCl 50mM + NaCl 0,2M pH 8,0/40°C; (6): Incubación en Tris-HCl 50mM + ZnCl<sub>2</sub> 1μM pH 8,0/40°C. En todos los caso se empleó extracto proteico de anémonas *C. gigantea* (15,8μg).



**Figura 15b: Efecto de los iones sobre la actividad proteolítica de la proteína de Mediano Peso Molecular.** Zimograma de gelatina (1mg/mL) en gradiente al 10-20%, condiciones disociantes/no reductoras, teñido con azul brillante de Coomassie. (1): Marcador de Peso Molecular preteñido BenchMark™. (2): Control Negativo: Incubación en Tris-HCl 50mM pH8,0/40°C; (3): Control Positivo: Incubación con solución Activadora todos los iones pH 8,0/40°C; (4): Incubación en Tris-HCl 50mM + CaCl<sub>2</sub> 5mM pH 8,0/40°C; (5): Incubación en Tris-HCl 50mM + NaCl 0,2M pH 8,0/40°C; (6): ) Incubación en Tris-HCl 50mM + ZnCl<sub>2</sub> 1μM pH 8,0/40°C. En todos los caso se empleó extracto proteico de anémonas *C. gigantea* (15,8μg).

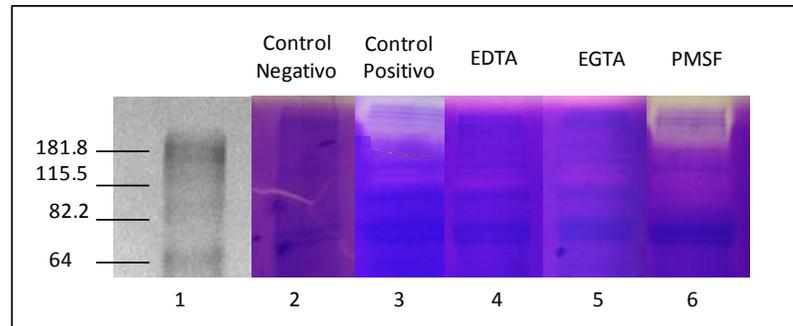
Por su parte, la proteína de mediano peso molecular (Figura 15b), muestra fuerte actividad enzimática con igual intensidad tanto para el control negativo (carril 2), como para el control positivo (carril 3) y para cada uno de los iones empleados en las incubaciones (carriles 4, 5 y 6), lo que confirma que su actividad proteolítica es independiente de los iones, tal y como se demostró en la Figura 14b, por lo que se puede inferir que esta enzima no se trata de una metalo-proteasa, lo que se confirma más adelante con los resultados obtenidos en los ensayos con inhibidores de proteasas.

#### **4.4- Efecto de los Inhibidores de Proteasas sobre la actividad proteolítica del extracto total de la anémona *C.gigantea*, observada en Zimogramas de Gelatina**

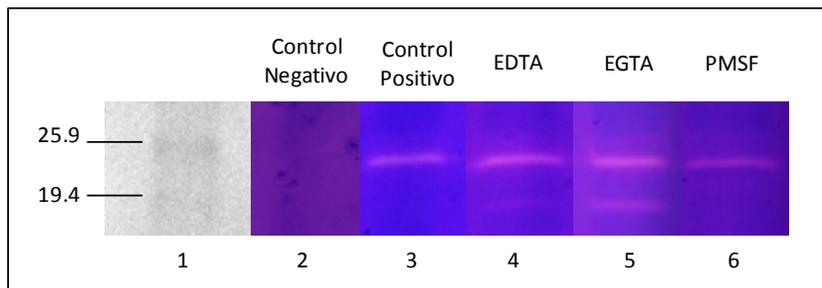
El extracto de la anémona *C.gigantea* presentó una actividad proteolítica importante en zimogramas de gelatina, tal y como fue evidenciado en los resultados anteriores. Con la finalidad de determinar a qué tipo de proteasas podían ser atribuidas dichas actividades, se implementó el uso de inhibidores específicos, como el EDTA y EGTA para las metalo-proteasas y el PMSF para serin-proteasas.

Se siguió el protocolo descrito en el marco metodológico y se incluyó un control negativo (gel teñido posterior a la corrida y previo a la incubación) y un control positivo (incubado en ausencia de inhibidores).

A través del uso de los inhibidores específicos de proteasas, se pudo determinar que dentro del grupo de las proteínas de alto peso molecular, las que muestran actividad proteolítica en el control positivo (Figura 16a, carril 3), son del tipo metalo-proteasas, ya que su actividad se vio inhibida en presencia de los quelantes de iones EDTA y EGTA (carril 4 y 5 respectivamente). En la Figura 16a- carril 6, se puede observar que el inhibidor PMSF no ejerció efecto inhibitorio sobre la actividad de las proteasas, por lo cual se descarta que sean del tipo serin-proteasas.



**Figuraa 16a: Efecto de los inhibidores de proteasas sobre la actividad proteolítica de las proteínas de Alto Peso Molecular.** Zimograma de gelatina (1mg/mL) en gradiente al 10-20%, condiciones disociantes/no reductoras, teñido con azul brillante de Coomassie. (1): Marcador de Peso Molecular preteñido BenchMark™. (2): Control Negativo: sin incubación; (3): Control Positivo: Incubación en Tris-HCl 50mM pH 8,0/40°C sin inhibidores; (4): Incubación en Tris-HCl 50mM pH 8,0/40°C + EDTA 10mM; (5): Incubación en Tris-HCl 50mM pH 8,0/40°C + EGTA 20mM; (6): Incubación en Tris-HCl 50mM pH 8,0/40°C + PMSF 3mM. En todos los caso se empleó extracto proteico de anémonas *C. gigantea* (15,8µg).



**Figura 16b: Efecto de los inhibidores de proteasas sobre la actividad proteolítica de la proteína de Mediano Peso Molecular.** Zimograma de gelatina (1mg/mL) en gradiente al 10-20%, condiciones disociantes/no reductoras, teñido con azul brillante de Coomassie. (1): Marcador de Peso Molecular preteñido BenchMark™. (2): Control Negativo: sin incubación; (3): Control Positivo: Incubación en Tris-HCl 50mM pH 8,0/40°C sin inhibidores; (4): Incubación en Tris-HCl 50mM pH 8,0/40°C + EDTA 10mM; (5): Incubación en Tris-HCl 50mM pH 8,0/40°C + EGTA 20mM; (6): Incubación en Tris-HCl 50mM pH 8,0/40°C + PMSF 3mM. En todos los caso se empleó extracto proteico de anémonas *C. gigantea* (15,8µg).

Como se puede observar en la Figura 16b, ninguno de los inhibidores empleados ejerció su efecto sobre la actividad de la proteasa de mediano peso molecular. Con esto se descarta que esta proteína gelatinolítica de aprox 23 kDa sea del tipo metalo o serin-proteasa.

Es importante señalar que al incubar en presencia tanto de EDTA como de EGTA, se mantiene la actividad proteolítica, y además se visualiza una nueva banda de menor peso molecular y con una actividad menos intensa (Figura 16b). Esto puede ser debido a que las proteasas son normalmente sintetizadas como una proenzima inactiva (zimógeno) y de acuerdo a sus requerimientos sufren un cambio bioquímico en su estructura por proteólisis limitada, convirtiéndola en una enzima activa (Wilkesman y Kurz, 2009). En este caso la activación de la enzima fue promovida por la quelación de los iones presentes en el extracto, que probablemente mantenían bloqueado el sitio activo de la misma.

En el presente trabajo se estudió la actividad proteolítica del extracto de la anémona *Condylactis gigantea* (Mochima) en zimogramas de gelatina, para la cual no se encontraron reportados antecedentes de este tipo de análisis, siendo entonces los resultados aquí obtenidos un gran aporte sobre la caracterización de las actividades proteolíticas del extracto de dicha anémona.

Se logró evidenciar la presencia de proteasas gelatinolíticas en el grupo de proteínas de alto peso molecular (superiores a 220 kDa a 60 kDa aprox), las cuales se identificaron como enzimas proteolíticas del tipo metalo-proteasas ya que demostraron presentar una actividad dependiente de iones e inhibida por quelantes tanto EDTA como EGTA y además se descartó las del tipo serin-proteasa en este grupo. En el caso de la banda con

actividad proteolítica de mediano peso molecular (23 kDa aprox.), se descartó que se tratara de una enzima del tipo metalo o serin-proteasa ya que no fue inhibida su actividad al incubar con EDTA, EGTA ni PMSF respectivamente.

Por otro lado, conociendo que las asparto-proteasas presentan una actividad óptima a pH ácidos (1,5 a 5) (Wilkesman y Kurz, 2009), se podría descartar también una enzima de este tipo, ya que como se demostró anteriormente (punto 4.2), esta proteasa presenta una actividad óptima a pH 8,0. Con base en esto, se podría inferir que se tratara de una enzima del tipo cisteín-proteasa, sin embargo, para confirmar estos resultados es necesario utilizar un inhibidor específico para este tipo de enzimas.

En un estudio realizado por Alonso del Rivero y col, (2009), a través del ensayo enzimático y uso de inhibidores específicos, hallaron una metalocarboxipeptidasa en el extracto del anélido marino *Sabellastarte magnifica* y no así en los extractos de otras 25 especies marinas pertenecientes a diferentes Filos, entre ellos la anémona *C.gigantea* (Costa de la Habana – Cuba), la cual no presentó dicha actividad.

Sin embargo, como se demostró anteriormente, en el presente trabajo, por medio del empleo de zimogramas de gelatina, se evidenció la presencia de metaloproteasas de alto peso molecular en el extracto en estudio.

La búsqueda y el aislamiento de productos naturales marinos, ha ido ganando poco a poco más atención debido a su amplio potencial como moléculas bioactivas.

Hasta el presente más de 20000 nuevos compuestos han sido aislados de organismos marinos, de los cuales un número considerable de estos derivados de origen natural

como las proteasas y sus inhibidores son desarrollados como potenciales candidatos para aplicaciones farmacéuticas (Zhang y col, 2009).

Las metaloproteasas de matriz (MMPs) por su parte, regulan la síntesis y secreción de citoquinas, factores de crecimiento, receptores de hormonas y moléculas de adhesión celular. Ellas también contribuyen al crecimiento y desarrollo, morfogénesis, remodelación tisular, angiogénesis, artritis, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, esclerosis múltiple, alergias, así como cáncer y una serie de procesos fisiológicos y patológicos. Por lo tanto, el desarrollo de los inhibidores de metaloproteasas de matriz (MMPIs) para el tratamiento de importantes enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas e inflamatorias, incluyendo cáncer, genera una amplia expectativa en las distintas áreas de la investigación (Zhang y col, 2009; Cascales y col, 2010).

Aún cuando la cantidad de inhibidores de metaloproteasas de matriz (MMPIs) de origen marino es mucho menor a los derivados de origen terrestre, algunos de ellos han presentado una muy alta selectividad en su blanco de inhibición. Un ejemplo de esto son los estudios con extracto de cartílago de tiburón, muy populares recientemente, debido al potencial uso de sus MMPIs, los cuales fueron clonados y caracterizados con un efecto anti-angiogénico y anti-metastásico (Cho y col, 2002).

De igual forma, a partir de extractos de la esponja *Algelas nakamurai*, han sido aislados inhibidores de metaloproteasas de matriz no sólo del tipo MMP-2, sino también MMPs-

1, -8, -9, -12 y -13, con un mecanismo único de inhibición para MMP-2 que no involucra la quelación de  $Zn^{2+}$  (Fujita y col, 2003).

Los fármacos derivados de productos naturales tienen un gran impacto sobre el ámbito de descubrimientos de drogas antitumorales en la actualidad. Sin embargo, el ambiente marino ha sido menos explorado para la producción de compuestos antitumorales seguros y novedosos hasta los momentos.

Los hallazgos obtenidos en este trabajo, proveen una valiosa información y aporte al conocimiento de estos organismos, ya que se logró caracterizar la actividad proteolítica del extracto de la anémona *C.gigantea* del Caribe venezolano, evidenciando la presencia de enzimas gelatinolíticas del tipo metaloproteasas, las cuales podrían ser consideradas como objetivo de estudios para futuras investigaciones, con la finalidad de obtener a partir de ellas, sus contrapartes moleculares, los inhibidores, y caracterizar sus posibles propiedades anticancerígenas y antiinflamatorias, como las propuestos en la literatura (Simmons y col, 2005; Zhang y col, 2009; Bhatnagar y col, 2010; Cascales y col, 2010) y así sintetizar nuevos compuestos bioactivos de origen marino con propiedades terapéuticas y otras áreas de interés.

## **5.- Determinación de la Actividad Hemolítica del extracto total de la anémona *Condylactis gigantea* (Mochima)**

Las actinoporinas de las anémonas marinas son polipéptidos solubles en agua de aproximadamente 20 kDa, las cuales exhiben una propiedad particular de insertarse y acomodarse espontáneamente dentro de las membranas. Ha sido ampliamente reportado que estas toxinas podrían formar poros en membranas celulares, lipídicas y artificiales, más eficientemente cuando la membrana contiene esfingomieline (Bernheimer y Avigad, 1976; Álvarez y col., 2003; Martínez y col., 2007; Álvarez y col., 2009; Ravindran y col., 2010; Hu y col., 2011).

La membrana del eritrocito es un complejo bifosfolipídico proteínico compuesto de 49% de proteínas, 43% de lípidos y 8% de carbohidratos. Los 4 tipos principales de fosfolípidos en la membrana eritrocitaria son fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, esfingomieline y fosfatidilserina (McKenzie, 1998).

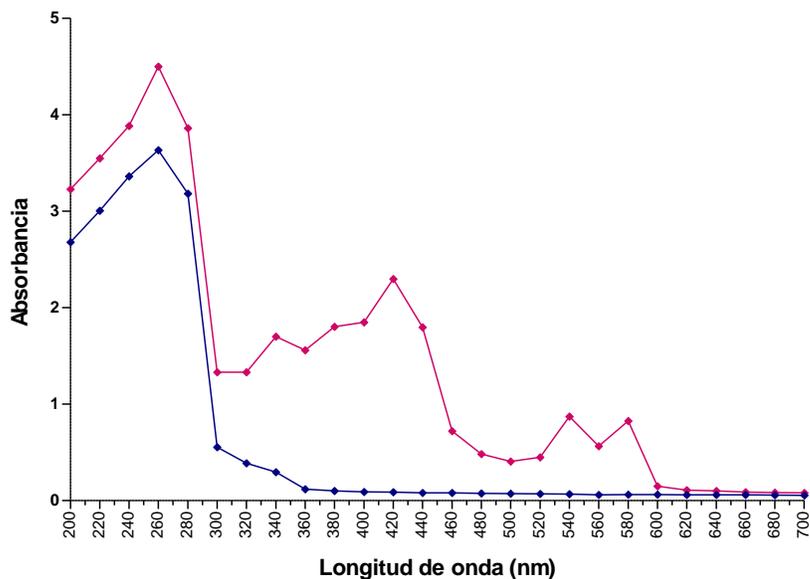
Dado que una membrana normal e intacta es indispensable para la función y supervivencia normales del eritrocito, la formación de poros en su superficie puede causar la salida de su contenido, como el potasio (Álvarez y col., 2003) o incrementar la permeabilidad de la membrana provocando el hinchamiento de la célula, llevando en ambos casos a la muerte de la misma. En este caso la lisis puede ser evidenciada a través de la liberación de la hemoglobina.

En tal sentido, en el presente estudio la actividad hemolítica del extracto de anémonas *C. gigantea* fue evaluada y determinada como se indicó en el marco metodológico y es

expresada en función de la Concentración Hemolítica 50 (CH<sub>50</sub>) definida como la concentración de proteínas del extracto que produce la lisis del 50% de los eritrocitos.

Con la finalidad de seleccionar la longitud de onda adecuada a utilizar en el ensayo de actividad hemolítica, se realizó primero un barrido de longitudes de onda desde 200 hasta 700 nm del extracto en estudio y de la hemoglobina, para determinar las longitudes de onda en las cuales no existe solapamiento en las absorbancias.

Los resultados obtenidos se muestran gráficamente en la Figura 17, en la que se puede observar sólo un pico de máxima absorción a 260 nm (240-280nm) para el caso del extracto, mientras que la hemoglobina presenta los picos de absorbancia característicos a 260 nm, 420 nm, 540 nm y 580 nm.



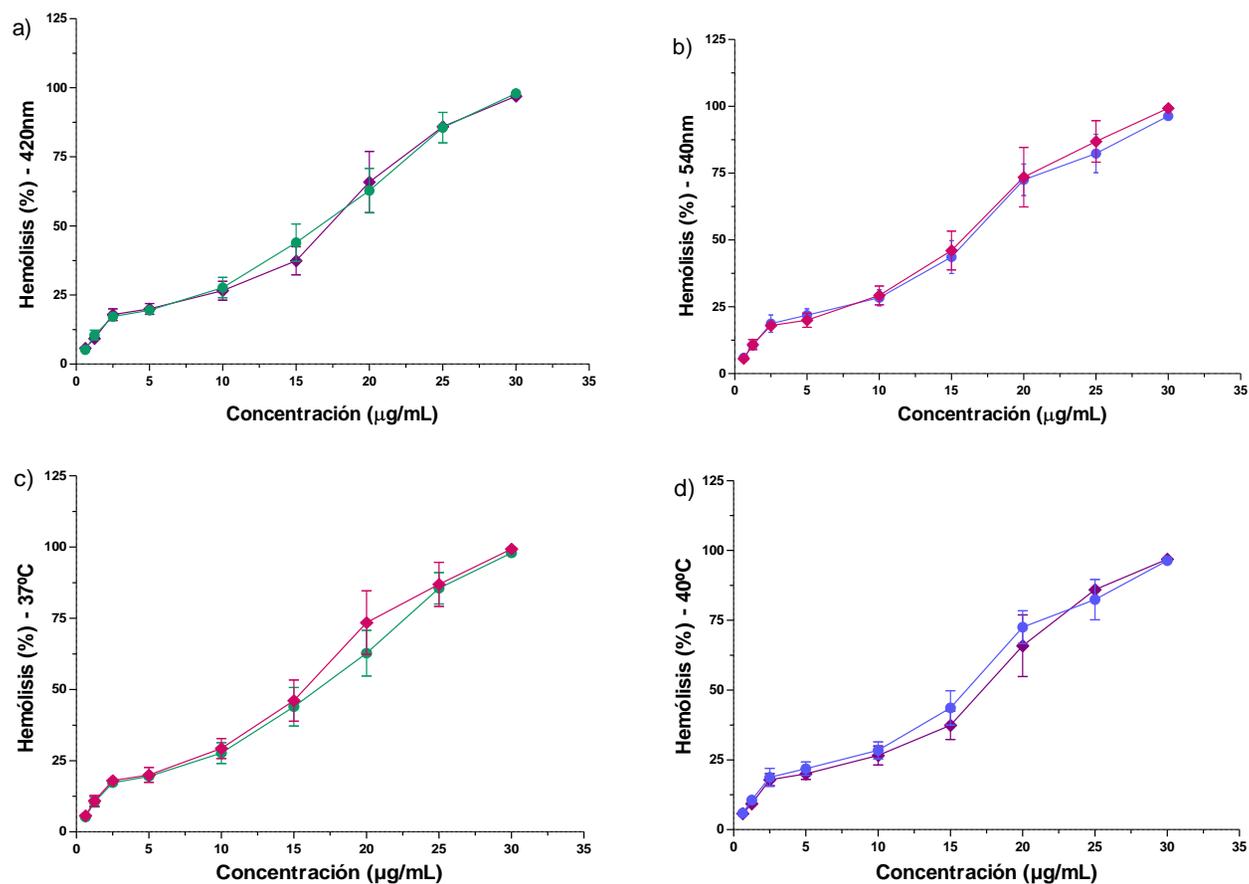
**Figura 17: Espectro de absorción del extracto total de la anémona *C.gigantea* y de la hemoglobina.** Extracto puro de las anémonas *C.gigantea* (♦). Hemoglobina(♦): suspensión de glóbulos rojos humanos frescos al 0,5% + Tritón X-100 1%. Barrido de longitudes de onda de 200 a 700nm.

Con base en estos resultados se seleccionaron para el ensayo las longitudes de onda de 420 nm y 540 nm y de esta forma garantizar que la lectura de absorbancia en el ensayo corresponda sólo a la hemoglobina liberada sin interferencias del extracto proteico.

Dichas longitudes de onda son las comúnmente empleadas por varios autores en los ensayos de actividad hemolítica (Tambourgi y col., 2000; Lanio y col., 2001; Hu y col., 2011).

La Figura 18, representa la curva dosis-respuesta de la actividad hemolítica del extracto de anémonas *C.gigantea*, donde se observa a **420 nm** (Figura 18a), que el extracto presenta una **CH<sub>50</sub>= 15,04 µg/mL** en la incubación a **37°C**, es decir, que 15,04 µg de proteínas del extracto lisan el 50% de los eritrocitos en 1 mL de suspensión de GR humanos frescos al 0,5%.

Tomando en consideración resultados anteriormente expuestos sobre la actividad proteolítica (punto 4.1) en los que se demostró que el extracto en estudio presentó una temperatura óptima de acción a 40°C, la actividad hemolítica se evaluó también a dicha temperatura. En este caso al extracto de anémonas *C. gigantea* presentó una **CH<sub>50</sub>= 15,2 µg/mL**, valor con el que no presentó diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,01$ ) entre las CH<sub>50</sub> obtenidas a ambas temperaturas de incubación, lo que demuestra que la actividad hemolítica de la anémona *C.gigantea* no se ve favorecida por la incubación a 40°C a diferencia de los resultados obtenidos en el ensayo de actividad proteolítica.



**Figura 18: Actividad Hemolítica *in vitro* del extracto total de la anémona *C.gigantea*.** Porcentaje (%) de hemólisis producido por la incubación de 1mL de suspensión de GR humanos frescos al 0,5% con varias concentraciones del extracto de anémonas *C.gigantea* por 30 min. **a) Lectura a 420nm:** incubación a 37°C (●) obtuvo una  $HC_{50}$ = 15,04 µg/mL y a 40°C (◆)  $HC_{50}$ = 15,2 µg/mL. **b) Lectura a 540nm:** incubación a 37°C (◆)  $HC_{50}$ = 14,3 µg/mL y a 40°C (●)  $HC_{50}$ = 14,7 µg/mL. **c) Incubación a 37°C:** lectura a 420nm (●) y a 540nm (◆). **d) Incubación a 40°C:** lectura a 420nm (◆) y a 540nm (●). Datos representados como media ± desviación estándar (n=6).

El mismo patrón se observó al realizar las lecturas a **540 nm** (Figura 18b), en donde el extracto en estudio presentó una **CH<sub>50</sub>= 14,3 µg/mL** a **37°C** y con la incubación a **40°C** se obtuvo una **CH<sub>50</sub>= 14,7 µg/mL**. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre las CH<sub>50</sub> a ambas temperaturas ( $p < 0,01$ ).

Las Figuras 18c y 18d representan los porcentajes (%) de hemólisis frente a concentraciones de proteínas del extracto incubadas a 37°C y a 40°C respectivamente, permitiendo hacer la comparación de los resultados obtenidos en función de las longitudes de onda empleadas (420 nm y a 540 nm) en cada temperatura. Dichas gráficas y el análisis estadístico demuestran claramente que el comportamiento de la actividad hemolítica del extracto en estudio es el mismo a ambas longitudes de onda tanto a 37°C como a 40°C ( $p < 0,01$ ).

En tal sentido y con base en los resultados obtenidos, resumidos en la Tabla III, se concluye que la actividad hemolítica del extracto de anémonas *Condylactis gigantea* (Mochima) presenta una **CH<sub>50</sub> ≈ 15 µg/mL** sin diferencias estadísticamente significativas entre las temperaturas de incubación de 37°C y 40°C ( $p < 0,01$ ) así como tampoco en las longitudes de onda empleadas ( $p < 0,01$ ).

De la misma forma se determinó que con una concentración de proteínas de 30 µg/mL del extracto, se obtiene entre el 95 y 100% de hemólisis para ambas temperaturas.

**Tabla III: Concentración Hemolítica 50 (CH<sub>50</sub> µg/mL) del extracto total de la de anémona *Condylactis gigantea* (Mochima), en función de la temperatura de incubación y la longitud de onda empleada.**

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

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

Los resultados aquí expresados, permiten demostrar que el extracto de las anémonas *C.gigantea* (Mochima) posee una evidente actividad hemolítica sobre eritrocitos humanos.

También asociado a una importante actividad hemolítica, numerosas investigaciones han descrito la existencia de toxinas formadoras de poros, denominadas actinoporinas (proteínas de aproximadamente 20 kDa), provenientes de diversas familias de anémona marinas del Orden Actiniaria que presentan actividad hemolítica (Maček, 1992; Tejuca y col., 1996; Lanio y col., 2001; Anderluh y col., 2003; Bellomio y col., 2009; Hu y col., 2010; Anderluh y col., 2011).

Dado que en el perfil electroforético del extracto en estudio (Figura 10) se evidenciaron bandas de pesos moleculares muy cercanas a los 20 kDa (18,76 kDa; 19,28 kDa y 20,61 kDa), aun cuando no fue investigado en detalle el mecanismo de acción responsable de la actividad hemolítica, se podría sugerir que proteínas del extracto total de las anémonas *C. gigantea* podrían estar actuando similarmente a una actinoporina, formando poros en las membranas de los eritrocitos.

Esta hipótesis también puede ser sustentada por los resultados obtenidos por Bernheimer y col. quienes en 1982, aislaron y caracterizaron una toxina citolítica de la anémona *Condylactis gigantea* (proveniente de un acuario en New York), de peso molecular 19 kDa y en condiciones más fuertemente desnaturizantes 16 kDa, con una actividad hemolítica inhibida por esfingomiélin, lo que confirmaría la teoría de la presencia de una actinoporina en esta anémona. La actividad hemolítica de esa toxina fue ensayada con 0,6 mg/mL en glóbulos rojos de diferente origen, mostrando mayor sensibilidad en orden decreciente los de oveja, humanos, perro, conejo y caballo, obteniendo 5000; 1700; 450; 330 y 100 HU/mL respectivamente, siendo una unidad hemolítica (HU) la cantidad de toxina necesaria para la liberación de hemoglobina del 50% de los eritrocitos.

Más recientemente, Falcón y col., (2009) trabajaron también con anémonas *Condylactis gigantea* provenientes de las costas del Mar Caribe Mexicano. En su estudio determinaron que 2 µg de proteínas totales del extracto crudo producían 96% de hemólisis. El extracto crudo mostró cinco bandas mayoritarias dentro de las que se encuentra una de 20 kDa. Dicha banda continuó presente luego del fraccionamiento por exclusión molecular, en la Fracción FII, la cual mostró 100% de actividad hemolítica con 2 µg de proteína.

Como se puede apreciar, al igual que en el presente trabajo, ha sido descrito en estudios previos con anémonas *Condylactis gigantea*, la presencia constante de proteínas de aproximadamente 20 kDa tanto en el extracto crudo como en la fracción que presenta actividad hemolítica, lo que refuerza la teoría de que la actividad hemolítica del extracto de anémonas *C.gigantea* de este estudio este posiblemente

relacionada a la presencia de toxinas hemolíticas del tipo actinoporinas como se planteó previamente.

Al comparar los resultados de la  $CH_{50}$  aquí obtenidos, observamos que es superior a los datos reportados en otros estudios, tanto para extractos crudos como para toxinas purificadas provenientes de otras anémonas. Esto indica que la actividad hemolítica de la anémona en estudio, a pesar de ser importante, no es tan alta como la referida en la literatura. Esto se puede evidenciar a través de la comparación con los resultados obtenidos por otros autores, tal es el caso de Malpezzi y col. (1991) quienes estudiaron la actividad hemolítica del veneno de nematocistos de la anémona de mar *Bunodosoma caissarum* en eritrocitos de peces, sapos, serpientes, ratones y ratas, encontrando una respuesta dosis-dependiente siendo más sensibles los eritrocitos de sapo y más resistente los de rata. La  $CH_{50}$  varió entre 2,9 y 7,6  $\mu\text{g/mL}$  del veneno y el 95% de hemólisis se obtuvo con concentraciones superiores a 33,6  $\mu\text{g/mL}$ . Entre sus hallazgos también demostraron que la actividad hemolítica era inhibida por esfingomiélin. Más tarde, Oliveira y col. (2006) reportaron en su estudio que el extracto crudo de esa misma anémona de la costa norte de São Paulo - Brasil, presentó una actividad hemolítica en eritrocitos humanos ( $CH_{50} = 3,36 \mu\text{g/mL}$ ) 4,5 veces mayor a la del extracto de *C.gigantea* del presente estudio y la Caissarolisina I (Bcs I - hemolisina purificada) de 19,7 kDa mostró una  $CH_{50} = 0,270 \mu\text{g/mL}$ , 2 veces mayor a la actividad de la Eqt II recombinante ( $CH_{50} = 0,554 \mu\text{g/mL}$ ) una citolisina de la anémona *Actinia equina*.

De manera similar, Hu y col. (2011), mostraron que Gigantoxina-4, una nueva actinoporina proveniente de la anémona *Stichodactyla gigantea* del mar del Sur de

China, tiene un peso molecular de 19 kDa aproximadamente y posee una alta actividad hemolítica en eritrocitos humanos. Reportan que la concentración de gigantoxina-4 que lisa el 50% de los eritrocitos fue de 40 ng/mL, similar a las Sticolisina I y II (St I - St II) aisladas y purificadas de la anémona *Stichodactyla helianthus* con  $CH_{50} \approx 30 - 45$  ng/mL. Ambas fracciones tienen un peso molecular de alrededor 20 kDa. (Lanio y col., 2001).

Por otro lado, en lo que respecta a la temperatura de incubación de la actividad hemolítica *in vitro*, Bernheimer y col. en 1982 reportaron que a temperaturas de 25°C, 37°C y 60°C, la toxina de *C.gigantea* mantuvo estable su actividad hemolítica pero fue ampliamente inactivada a 70°C, 80°C y 100°C, resultados que se asemejan a los obtenidos en el presente estudio con el extracto de *C.gigantea*, donde no hubo diferencia en los resultados obtenidos para la actividad hemolítica a 37°C y 40°C. De manera similar, Oliveira y col. (2006) mostraron en su estudio que la Caissarolisina I (Bcs I), hemolisina purificada de la anémona *Bunodosoma caissarum*, mantiene una acción hemolítica similar en el intervalo de 37°C a 55°C de incubación. Sin embargo, este comportamiento difiere del observado por Hu y col. (2011), ya que en su estudio obtuvieron una disminución gradual de la actividad hemolítica de la Gigantoxina-4, luego de 20 min de incubación a 20°C, 40°C, 50°C y 60°C y en el rango de 70°C y 80°C fue perdida casi completamente. También hallaron que no habían diferencias obvias al agregar o no inhibidores de proteasas (10mM PMSF y EDTA), por lo que concluyeron que la pérdida de la actividad hemolítica no es debida a la contaminación con proteasas pero si puede ser debida a la desnaturalización de la proteína a altas temperaturas.

## **6.- Determinación de la actividad de la enzima Fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) del extracto total de la anémona *Condylactis gigantea* (Mochima)**

La fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) representa una familia de enzimas que hidroliza del enlace *sn*- 2 ester de los fosfolípidos, liberando ácidos grasos, principalmente ácido araquidónico y lisofosfolípidos. Es una de las enzimas más interesantes presente en los venenos de animales vertebrados e invertebrados debido a su variable comportamiento biológico, ya que muestra múltiples acciones farmacológicas dependientes del veneno que la contiene y no de su actividad enzimática. De esta manera, participa en la digestión de la presa o induce alguna de las siguientes acciones patológicas: neurotoxicidad, cardiotoxicidad, miotoxicidad, hemólisis, efecto anticoagulante, hemorragia interna y actividad inductora de edema. En las anémonas marinas algunas de las fosfolipasas tipo A<sub>2</sub> son consideradas hemolisinas. (Lazo y col, 1998; Valdés y col, 2002 y Oliveira y col, 2010).

La actividad de la enzima fosfolipasa A<sub>2</sub> del extracto total de la anémona *C.gigantea* fue determinada empleando el método fluorimétrico *EnzChek<sup>®</sup> Phospholipase A<sub>2</sub> Assay Kit* descrito en el marco metodológico. Para el ensayo se utilizó el control positivo provisto por la casa comercial (Invitrogen) y además se incluyó como control adicional el pool de veneno total de la serpiente *Crotalus durissus cumanensis* con actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> caracterizada por Montero (2011), valor que fue reproducible en el presente ensayo.

El empleo de este método permitió evidenciar la presencia de fosfolipasa A<sub>2</sub> en el extracto total de la anémona en estudio, con una actividad de 14,1 U/mL (1,62 U/mg

de proteínas), siendo mucho mayor a la reportada por Lanio y col, (2001) para las Sticolisinas I y II ( $\sim 10^{-3}$  U/mg).

Desde aproximadamente la década de los '70, se ha reportando la presencia de fosfolipasa A<sub>2</sub> en diversas especies de anémonas, algunas de las cuales presentan actividad hemolítica y otras no; así como también algunas toxinas con actividad hemolítica (hemolisinas) podrían tener o no actividad fosfolipasa. (Maček, 1992; Lanio y col, 2001 y Oliveira y col, 2006).

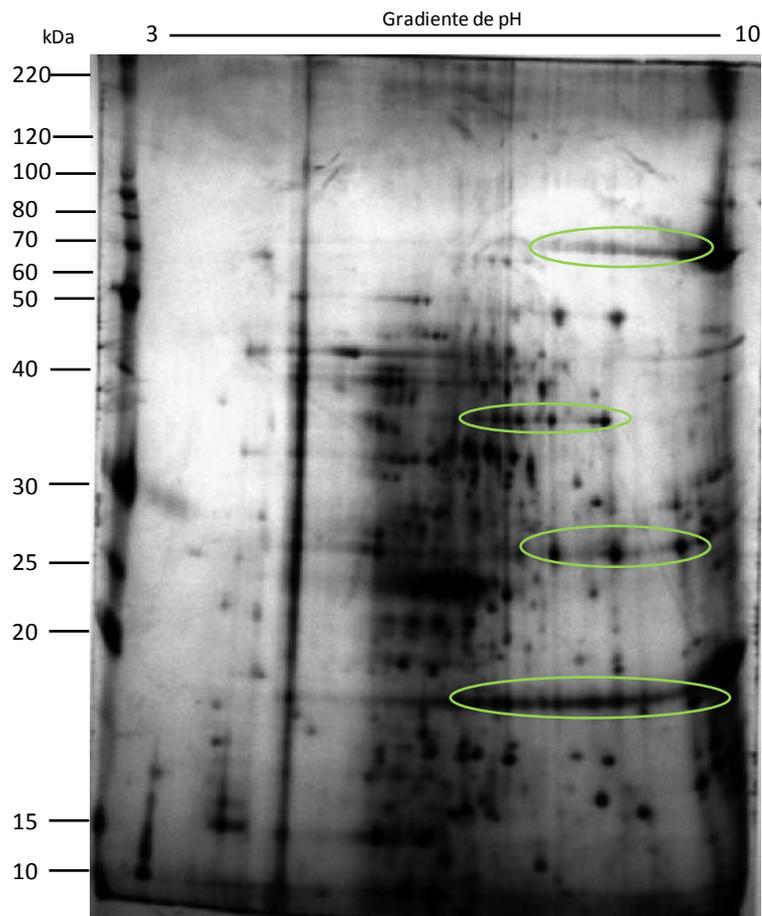
Romero y col, (2010), realizaron el primer aislamiento y caracterización de una fosfolipasa A<sub>2</sub> básica de la anémona *Condylactis gigantea* de la Costa de la Habana-Cuba, la cual tiene un peso molecular de 29 kDa con un punto isoeléctrico de 8,6. Estos datos coinciden con los obtenidos en el presente estudio, ya que en el perfil electroforético unidimensional se observa una banda de 29 kDa (Figura 10), así como en el bidimensional (Figuras 20 y 22, Tabla V) en el que se evidenciaron dos manchas de peso molecular de 29 kDa con puntos isoeléctricos 8,1 y 8,9 respectivamente, pudiendo tratarse de isoformas de una misma proteína, como se detallará más adelante.

El extracto total de la anémona *C.gigantea* del presente estudio, presentó tanto actividad hemolítica (sección 5 de Resultados y Discusión) como fosfolipasa A<sub>2</sub>, por lo que se podría sugerir que tanto proteínas citolíticas tipo actinoporinas como citolisinas enzimáticas (fosfolipasa A<sub>2</sub>) podrían estar interviniendo en la actividad hemolítica, sin embargo, esto se podría confirmar realizando un fraccionamiento del extracto total y posteriormente detectando cuál de las fracciones presenta actividad hemolítica y/o fosfolipasa A<sub>2</sub>.

## **7.- Determinación y Caracterización del proteoma del extracto total de la anémona *Condylactis gigantea* (Mochima)**

El uso de los geles bidimensionales es una valiosa herramienta para la separación de mezclas muy complejas de proteínas ya que permiten obtener un despliegue físico de proteínas basados en dos de sus características fisicoquímicas, combinando 1) la separación por carga eléctrica (focalización isoelectrica, IEF) en la que las proteínas migran en un gradiente inmovilizado de pH hasta alcanzar el sitio donde su carga neta es cero, es decir su punto isoelectrico y 2) la separación por tamaño molecular que se efectúa en un gel de poliacrilamida en presencia de un detergente aniónico, el docecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) y que garantiza un segundo paso de separación basado en la masa. A diferencia de los geles unidimensionales donde se alcanzan a observar unas pocas bandas, al aplicar esta técnica se consigue una muy alta resolución de las proteínas que se revelan como manchas o “spots” y a las que se les puede caracterizar entonces su punto isoelectrico y su masa molecular basándonos en las coordenadas de la separación.

El extracto total proveniente de la extracción de la anémona *Condylactis gigantea* es una mezcla compleja de proteínas, y su perfil proteico se puede observar en la Figura 19. El análisis de dicho perfil arroja un total de 393 manchas. La distribución de las proteínas en el gel se presenta en un amplio rango de pH y pesos moleculares, sin embargo, se puede evidenciar que la mayor cantidad de ellas se concentran en el rango de pH entre 5,5 y 7,5 y pesos moleculares comprendidos entre 50 y 15 kDa aproximadamente.

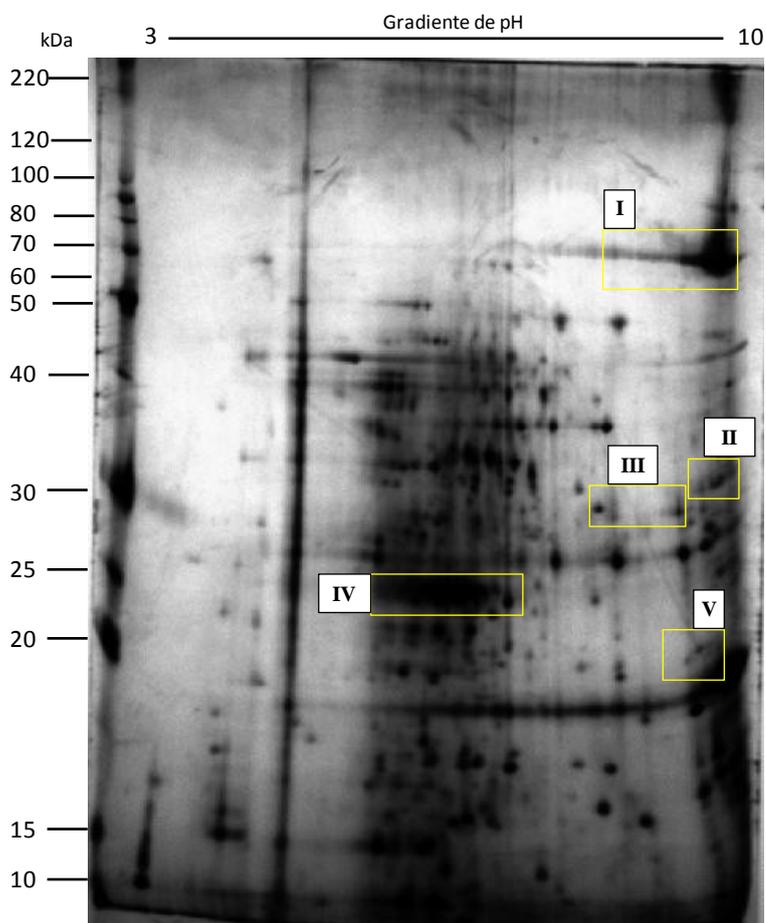


**Figura 19: Gel Bidimensional del proteoma del extracto total de la anémona *Condylactis gigantea* (Mochima).** Isoelectroenfoque en tiras de 13 cm de 3 a 10 L, seguidas de SDS-PAGE al 12%. Se usó el marcador de peso molecular BenchMark de la casa Invitrogen. Áreas demarcadas como posibles isoformas de proteínas.

Se observaron en los geles (áreas demarcadas en la imagen) varios grupos de manchas continuas conservando prácticamente el mismo peso molecular, lo que pudiese estar indicando que se trata de isoformas de proteínas que presentan modificaciones postraduccionales (como por ejemplo fosforilaciones o glicosilaciones) sufriendo cambios en su punto isoeléctrico debido a la adición de esos grupos fosfatos o azúcares según sea el caso.

En la Figura 20, se señalan en el gel 5 regiones en las que se agrupan las manchas o proteínas de interés, que podrían estar relacionadas a las diversas actividades

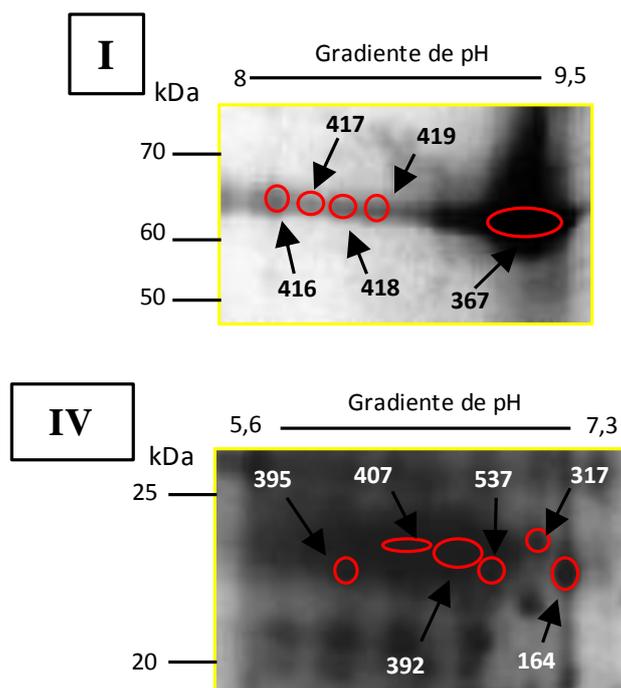
enzimáticas determinadas en este estudio (actividad proteolítica, hemolítica, fosfolipasa A<sub>2</sub>), referenciadas también en la literatura. El orden de las regiones seleccionadas se estableció en función del peso molecular más alto al más bajo.



**Figura 20: Representación de regiones de interés en el gel bidimensional del proteoma del extracto total de la anémona *Condylactis gigantea* (Mochima).** Isoelectroenfoque en tiras de 13 cm de 3 a 10 L, seguidas de SDS-PAGE al 12%. Se usó el marcador de peso molecular BenchMark de la casa Invitrogen.

Las Regiones I y IV (Figura 21) están conformadas por proteínas con pesos moleculares aproximados de 66 kDa para la Región I y 23 kDa para la Región IV (Tabla IV). Estas regiones fueron seleccionadas dentro del proteoma como un conjunto de proteínas de interés en este estudio, ya que sus pesos moleculares son

similares a los de las 2 bandas que se observan con mayor intensidad en la actividad proteolítica en los zimogramas de gelatina (Figura 11, punto 4.1 sección de resultados y discusión). Esto podría indicar que, las proteínas con actividad gelatinolítica del extracto de la anémona *C.gigantea* de pesos moleculares aparentes de 66 y 23 kDa, puede ser una o varias de las manchas señaladas dentro de estas regiones. Bandas de ambos pesos moleculares fueron evidenciadas en el perfil electroforético unidimensional del extracto presentado anteriormente en la Figura 10, por lo que estas proteínas son candidatas para análisis posteriores. Como se mencionó anteriormente, en ambos grupos, la disposición de las manchas podrían estar representando varias isoformas de cada proteína ya que conservan prácticamente el mismo peso molecular variando en su punto isoeléctrico (TablaIV), producto de las posibles modificaciones postrasduccionales. Las 5 manchas que conforman la Región I (416, 417, 418, 419 y 367) y las 6 manchas de la Región IV (395, 407, 392, 537, 317 y 164), serían candidatas para ser extraídas del gel y posteriormente ser analizadas por Espectrometría de Masas tipo MALDI-TOF con la finalidad de obtener sus respectivas huellas peptídicas y de esta manera lograr su identificación a través de la comparación en las bases de datos utilizando el programa MASCOT.



**Figura 21:** Ampliación de las Regiones I y IV señaladas en el gel bidimensional de la Figura 20.

**Tabla IV:** Matriz de datos (pI y PM) correspondientes a las manchas agrupadas en las Regiones I y IV del proteoma del extracto total de la anémona *C.gigantea* (Mochima)

	Nº Mancha	pI	PM (kDa)
<b>Región I</b>	416	8,2	67,2
	417	8,4	67,2
	418	8,5	66,4
	419	8,7	66,0
	367	9,4	64,0
<b>Región IV</b>	395	6,0	22,6
	407	6,3	23,1
	392	6,5	23,0
	537	6,7	22,4
	317	6,9	23,6
	164	7,0	22,4

pI: Punto Isoeléctrico;

PM (kDa): Peso Molecular en kDa

Por otro lado, en función de los resultados obtenidos en los ensayos de actividad hemolítica y fosfolipasa A<sub>2</sub> realizados y descritos anteriormente (puntos 5 y 6 de la sección de resultados y discusión), tal y como fue discutido, se infiere la presencia de proteínas citolíticas del tipo actinoporinas, citolisinas y fosfolipasa A<sub>2</sub> en el extracto de la anémona en estudio. Estos resultados, junto con las características físicoquímicas reportadas en otros estudios para este tipo de proteínas aisladas de diferentes anémonas, sirvieron de referencia para seleccionar tres regiones de interés dentro del proteoma del extracto de *C.gigantea*, identificadas como Región II, III y V en la Figura 20.

En la Figura 22, se observa la ampliación de estas regiones en las que se identifican las manchas correspondientes a las proteínas que confirman cada agrupación.

La Región II (Figura 22), agrupa 3 manchas (432, 129 y 127) las cuales presentan puntos isoeléctricos entre 9,2 y 9,5; y un peso molecular aproximado de 30 kDa (Tabla V). Estas proteínas fueron seleccionadas dentro del grupo de interés debido a que en la literatura se han reportado toxinas de anémonas marinas del tipo citolisinas que son muy básicas, con peso molecular de aprox 30 kDa, las cuales a diferencia de las actinoporinas, tienen alto contenido de cisteína y carecen de actividad fosfolipasa (Maček, 1992 y Anderluh y col, 2011).

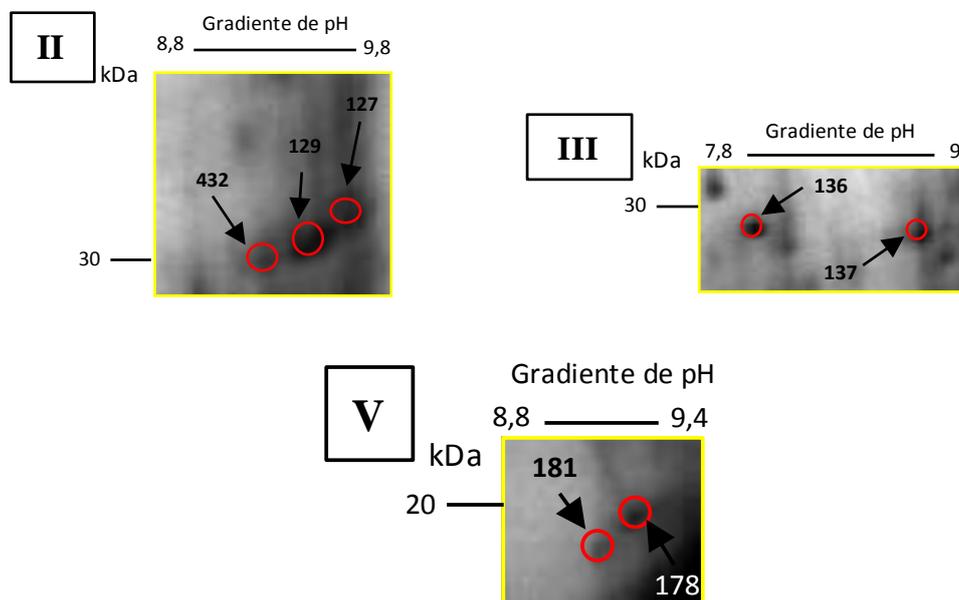


Figura 22: Ampliación de las Regiones II, III y V señaladas en el gel bidimensional de la Figura 20.

Tabla V: Matriz de datos (pI y PM) correspondientes a las manchas agrupadas en las Regiones II, III y V del proteoma del extracto total de la anémona *C.gigantea* (Mochima)

	Nº Mancha	pI	PM (kDa)
<b>Región II</b>	432	9,2	30,0
	129	9,4	30,3
	127	9,5	30,9
<b>Región III</b>	136	8,1	29,1
	137	8,9	29,0
<b>Región V</b>	181	9,0	19,3
	178	9,2	19,9

pI: Punto Isoeléctrico;

PM (kDa): Peso Molecular en kDa

Otras toxinas citolíticas en las anémonas son las actinoporinas, las cuales son las más estudiadas de las toxinas formadoras de poros. Han sido aisladas de diversas anémonas y presentan un peso molecular de aproximadamente 20 kDa y un punto isoeléctrico por encima de 9,0; sin embargo, es evidente que una misma especie pueda producir una variedad de isotoxinas de 20 kDa (Lanio y col, 2001; Anderluh y Maček, 2002; Aneiros y Garateix, 2004; Šuput, 2009 y Anderluh y col, 2011). Proteínas con esas características fisicoquímicas fueron aisladas en el proteoma del extracto en estudio, las cuales son señaladas con los números 181 y 178 en la Región V de la Figura 22, presentando peso molecular muy cercano a los 20 kDa con pI 9,0 y 9,2 respectivamente (Tabla V ). Estos resultados coinciden con los hallazgos de Bernheimer y col, quienes en 1982 aislaron y caracterizaron de la anémona *C.gigantea* una toxina citolítica, de PM ~19 kDa y pI 8,9.

Además de las citolisinas formadoras de poros, las anémonas poseen un mecanismo para la degradación enzimática de la membrana lipídica por la acción de las fosfolipasas citolíticas (Aneiros y Garateix, 2004 y Anderluh y col, 2011).

En el presente trabajo se logró demostrar que el extracto total de la anémona *C.gigantea* venezolana presenta actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> (punto 6 de la sección de resultados y discusión). Esta enzima también fue identificada y aislada del extracto de la anémona *C.gigantea* (Costa de la Habana-Cuba) por Romero y col (2010), quienes reportaron para la misma un peso molecular de 29000 Da y punto isoeléctrico 8,6.

En el perfil electroforético en gel unidimensional del extracto de la anémona en estudio (Figura 10) se puede evidenciar una banda de peso molecular aparente de 29 kDa y a su vez en el gel bidimensional (Figura 22) se observan dos manchas de

aproximadamente 29 kDa demarcadas dentro de la Región III con puntos isoeléctricos pI 8,1 y 8,9 (Tabla V).

Estos hallazgos permiten sugerir que estas proteínas de aproximadamente 29 kDa podrían estar relacionadas con la actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> que presenta el extracto de la anémona en estudio.

Considerando la posible existencia de estas proteínas citolíticas (actinoporinas, citolisinas y fosfolipasa A<sub>2</sub>) en el proteoma del extracto de la anémona *C.gigantea* del presente estudio, se podría considerar como responsable de la actividad hemolítica evidenciada, a una de estas toxinas o la actuación en conjunto de ellas, ya que como ha sido reportado en la literatura, la producción de un tipo de citolisina en una anémona no excluye la coexistencia de otras toxinas y sus respectivos mecanismos de acción (Maček, 1992; Anderluh y Maček, 2002 y Anderluh y col, 2011).

Considerando lo anteriormente descrito, el total de 18 manchas que conforman las Regiones I,II, III, IV y V demarcadas en el gel (Figura 20) serían candidatas a seleccionar para el posterior análisis por espectrometría de masas tipo MALDI-TOF, y de esta forma luego de la identificación de estas proteínas (péptidos o polipéptidos), se podría confirmar los planteamientos aquí descritos y relacionarlas a las actividades enzimáticas presentadas por el extracto total de la anémona *Condylactis gigantea* del Caribe venezolano.

En general, el medio marino se caracteriza por la gran variedad que ofrece de compuestos naturales que abarcan una amplia gama de bioactividad, los cuales pueden ser empleados en diversas áreas de la industria y la medicina, como fármacos potenciales como antihelmínticos, antibacterianos, antifúngicos, antiinflamatorios, antimaláricos, antiprotozoarios y antivirales, y en particular en el ámbito de la quimioterapia del cáncer, tales como los inhibidores de metaloproteasas de matriz, las proteínas citolíticas formadoras de poro en inmunotoxinas selectivamente dirigidas contra las células indeseadas, entre otros.

Algunas expansiones rápidas de la biología molecular, la bioingeniería, la genómica y la proteómica han ayudado al descubrimiento y desarrollo de posibles fármacos provenientes de productos naturales. En tal sentido, el conjunto de resultados obtenidos en el presente estudio, conforman una novedosa información y valioso aporte en el área de la toxicología, particularmente de las toxinas marinas ya que por ser un estudio pionero en el país, constituyen el primer aporte realizado acerca de la caracterización del proteoma del extracto total de la anémona *Condylactis gigantea* del Caribe venezolano (Mochima – Estado Sucre), en el que se demostró la presencia de proteínas de interés con potencial impacto biotecnológico y biomédico.

## CONCLUSIONES

- El presente trabajo representa el primer reporte conocido de la caracterización del extracto total de la anémona *Condylactis gigantea* provenientes de la Bahía de Mochima, Edo. Sucre – Venezuela.
  
- Se estableció como condiciones óptimas del ensayo de actividad proteolítica en zimogramas de gelatina, la incubación con la solución activadora durante 15 horas a pH 8,0 y 40°C.
  
- Es la primera vez que se reporta la presencia de una diversidad de actividades proteolíticas en el extracto de la anémona en estudio.
  
- El extracto total de la anémona en estudio posee actividad hemolítica (CH<sub>50</sub>: 15 µg/mL) sobre eritrocitos humanos, lo que podría indicar la presencia de proteínas citolíticas del tipo hemolisinas, posiblemente relacionadas a las actinoporinas descritas con esta actividad, así como de enzimas citolíticas tipo Fosfolipasas, aisladas de otras especies de anémonas.
  
- Se determinó la presencia de la enzima Fosfolipasa A<sub>2</sub> en el extracto en estudio (14,1 U/mL). Esta enzima podría estar contribuyendo en la actividad hemolítica aquí reportada.

- Se obtuvo por primera vez el perfil proteico del extracto de la anémona *C.gigantea* (Mochima), observando proteínas de posible interés que con base en sus características de pesos moleculares y puntos isoeléctricos, pueden relacionarse con toxinas aisladas y purificadas de otras anémonas para las que se han descrito actividades específicas de interés, con un gran potencial biotecnológico.
- Los resultados obtenidos en este trabajo, proveen una valiosa y novedosa información en el área de la toxinología, fomentando el desarrollo de futuras investigaciones con miras a la obtención y síntesis de sustancias bioactivas potencialmente útiles para la humanidad.

## RECOMENDACIONES

- Para la identificación de las proteasas presentes en el extracto, se sugiere emplear otros inhibidores específicos para asparto y cisteín-proteasa, por ejemplo Pepstatina A y E-64 respectivamente, y más específicamente, Calpastatina ya que es un potente inhibidor de la calpaina, una cisteín-proteasa calcio dependiente.
- Sería interesante investigar la presencia de inhibidores de proteasas en el extracto de la anémona *C.gigantea*, a través del uso de la técnica de zimografía reversa.
- Emplear la zimografía bidimensional y de esta manera observar el perfil proteico que presenta actividad proteolítica para su posterior identificación por espectrometría de masas.
- En el ensayo de actividad hemolítica, se recomienda realizar incubaciones del extracto frente a la esfingomiélin, con la finalidad de observar si esta ejerce un efecto inhibitorio, lo que daría mayor sustento a la hipótesis aquí planteada de tratarse de una hemolisina del tipo Actinoporina la responsable de la hemólisis.
- Fraccionar y purificar el extracto total de la anémona *C.gigantea*, con el fin de determinar de manera específica a cuales fracciones se les atribuye las propiedades encontradas en el extracto total.

- Continuar el estudio con la identificación de las proteínas consideradas de interés en los resultados obtenidos, por medio del análisis por espectrometría de masas tipo MALDI-TOF.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso-del-Rivero M, Trejo SA, Rodríguez de la Vega M, González Y, Bronsoms S, Canals F, Delfin J, Díaz J, Aviles FX, Chávez MA. A novel metallo-carboxypeptidase-like from the marine annelid *Sabellastarte mignifica* – a step into the invertebrate world of proteases. *FEBS J* 2009; 276: 4875-4890.
- Álvarez C, Casallanovo F, Shida CS, Nogueira LV, Martínez D, Tejuca M, et al. Binding of the sea anemone pore-forming toxins sticholysins I and II interfaces - Modulation of conformation and activity, and lipid – protein interaction. *Chemistry and Physics of Lipids* 2003; 122: 97-105.
- Álvarez C, Mancheño JM, Martínez D, Tejuca M, Pazos F, Lanio ME. Sticholysins, two pore-forming toxins produced by the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla heliantus*: their interaction with membranes. *Toxicon* 2009; 54(8): 1135-1147.
- Anderluh G, Sepčić K, Turk T, Maček P. Cytolytic Proteins from Cnidarians – an Overview. *Acta Chim Slov* 2011; 58: 724-729.
- Anderluh G, Maček P. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actinaria). *Toxicon* 2002; 40: 111-124.

- Anderluh G, Maček P. Actinoporins, Pore-forming Toxins of Sea Anemones (Actiniaria). En: Menestrina G, Dalla Serra M, Lazarovici M, (eds). Pore-forming Peptides and Protein Toxins. London, UK: Taylor and Francis; 2003. p. 132-147.
- Aneiros A, Garateix A. Bioactive peptides from marine sources: pharmacological properties and isolation procedures. *J Chromatogr. B* 2004; (803): 41-53.
- Aquaflash: Cuadernos de Investigación en ecosistemas artificiales. [en línea – fecha de acceso Julio 2012]. Disponible en:  
URL:<http://www.aquaflash.blogspot.com/2009/06/42-anemonas-inseparables-de-los-peces.html>
- Bhatnagar I, Kim SK. Marine antitumor drugs: status, shortfalls and strategies. *Mar Drugs* 2010; 8:2702-2720.
- Bellomio AR, Morante K, Barlic A, Gutiérrez-Aguirre I, Viguera AR, González-Mañas JM. Purification, cloning and characterization of fragaceatoxin C, a novel actinoporin form the sea anemone *Actinia fragacea*. *Toxicon* 2009; 54(6): 869-880.
- Béress L. Biologically active compounds from coelenterates. *Pure & Appl Chem* 1982; 54 (10): 1981-1994.

- Béress R, Béress L, Wunderer G. Purification and characterization of four polypeptides with neurotoxic activity from *Condylactis aurantiaca*. *Z Physiol Chem* 1976; 357: 409-414.
- Bernal J, Suárez F. La Era genómica y proteómica de la medicina. *Universitas médica* 2007; 48 (2): 104-117.
- Bernheimer AW, Avigad LS. Properties of a toxin from the sea anemone *Stoichactis helianthus*, including specific binding to sphingomyelin. *Proc Nat Acad Sci* 1976; 73(2): 476-471.
- Bernheimer AW, Avigad LS, Lai CY. Purification and properties of a toxin from the sea anemone *Condylactis gigantea*. *Arch Biochem Bioph* 1982; 214(2): 840-845.
- Biass D, Dutertre S, Gerbault A, Menou JL, Offord R, Favreau P, Stöcklin R. Comparative proteomics study of the venom of the piscivorous cone snail *Conus consors*. *J Proteomics* 2009; 72 (2): 210-218.
- Birrell GW, Earl S, Masci PP, Jersey J, Wallis TP, Gorman JJ, Lavin MF. Molecular Diversity in venom from the australian brown snake, *Pseudonaja textilis*. *Mol & Cel Proteom* 2006; 5: 379-389.

- Bradford M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
- Calvete JJ, Borges A, Segura A, Flores-Díaz M, Alape-Girón A, Gutiérrez JM, Diez N, De Sousa L, Kiriakos D, Sánchez E, Faks JG, Escolano J, Sanz L. Snake venomics and antivenomics of *Bothrops colombiensis*, a medically important pitviper of the *Bothrops atrox-asper* complex endemic to Venezuela: contributing to its taxonomy and snakebite management. *J Proteom* 2009; 72: 227-240.
- Cascales M, Álvarez-Gómez JA. Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer. *An R Acad Nac Farm* 2010; 76(1): 59-84.
- Castañeda Pasarón O. Toxinas animales: Acciones facilitadoras de la transmisión colinérgica. *Rev Biología* 2000; 14(1):1-15.
- Cegarra J, Gacén J, Cayuela D. Blanqueo de la lana con peróxido de hidrógeno en presencia de proteasas. *Boletín Intexter U.C.P* 2000; 118:41-43.
- Claro R. La biodiversidad marina de Cuba. Estado actual de su conocimiento y conservación. Instituto de Oceanología 2001, [fecha de acceso Febrero 2010]. Disponible en:  
URL: <http://www.cuba.cu/ciencia/citma/ama/oceanologia/default.html>

- Costa de Venezuela: una mirada a nuestra naturaleza. [en línea – fecha de acceso Julio 2012]. Disponible en: URL: <http://www.costadevenezuela.org>
- Cunningham PA, Goetz PE. Pisces guide to venomous and toxic marine life of the World. Houston, USA: Gulf Publishing Company; 1996.
- Cho J, Kim Y. Sharks: a potential source of antiangiogenic factors and tumor treatments. *Mar Biotechnol* 2002; 4:521-525.
- de Oliveira JS, Zaharenko AJ, de Freitas JC, Konno K, de Andrade SA, Portaro FC, et al. Caissarolysin I (Bcs I), a new hemolytic toxin from the Brazilian sea anemone *Bunodosoma caissarum*: Purification and biological characterization. *Biochimica et Biophysica Acta* 2006; 1760: 453-461.
- Delfin J, González Y, Díaz J, Chávez M. Proteinase inhibitor from *Stichodactyla helianthus*: Purification, characterization and immobilization. *Arch Med Res* 1994; 25(2): 199-204.
- Delgado JR. Diccionario del Mar Venezolano. Colección Quirón. Caracas, Venezuela: Editorial CEC, SA; 1998.
- Diez N, Chávez MA, Álvarez C. Identificación de moléculas bioactivas de interés biotecnológico y biomédico procedentes de organismos marinos. (Reporte final), Proyecto Cuba – Venezuela. La Habana, Cuba; 2009.

- Falcón A, Bravo E, Aguilar MB, Heimer EP. Extracción y purificación parcial de citolisinas provenientes de la anémona marina *Condylactis gigantea* (cnidaria, anthozoa). Procedente de la XVI Jornadas Conmemorativas Instituto de Neurobiología - Universidad Nacional Autónoma de México; 2009 Sep 21-25; Juriqilla, México.
- Faroldi GG, Fajardo I. Aproximaciones proteómicas a los sistemas biológicos. 2007, [fecha de acceso Febrero 2010]; Disponible en:  
URL: <http://www.encuentros.uma.es/encuentros105/proteomica.htm>
- Fujita M, Nakao Y, Matsunaga S, Seiki M, Itoh Y, Yamashita J, et al. Ageladine A: an antiangiogenic matrix metalloproteinase inhibitor from the marine sponge *Agelas nakamurai*. *J Am Chem Soc* 2003; 125(51):15700-157001.
- Garateix A. Toxinas Marinas. *Elementos* 1997; 26(4): 41-46.
- Garateix AG, Rodríguez AA. Las anémonas marinas como fuente para la obtención de sustancias biológicamente activas. *Medio Ambiente y Desarrollo* [revista electrónica] 2010 [fecha de acceso: Mayo 2012]; 9: (6 páginas). Disponible en URL: <http://ama.redciencia.cu/articulos/19.09.pdf>
- Garateix A, Salceda E, Aneiros A, Soto E. *Bunodosoma granulifera*: fuente de péptidos con acción sobre canales iónicos. *Avicennia* 2003; 16: 13-21.

- Guérico R, Shevchenko A, Shevchenko A, López-Lozano J, Paba J, Sousa M, Ricart C. Ontogenic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. *Proteome Science* 2006; 4:11.
- Haefner B. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *DDT* 2003; 8 (12): 536-544.
- Harlow E, Lane D. *Antibodies: A Laboratory Manual*. NY: Cold Spring Harbor Press; 1988.
- Hawkes SP, Li H, Taniguchi GT. Zymography and Reverse Zymography for Detecting MMPs and TIMPs. En: Clark IM (ed). *Methods in Molecular Biology: Matrix Metalloproteinase Protocols*. 2ª ed. New York, USA: Humana Press, c/o Springer Science+Business Media, LLC.; 2010. p. 257-269.
- Hernández López MV, Hernández López MM. Bioactivos marinos en Venezuela: una revisión. *Saber, Univ Oriente, Venezuela* 2005; 17(2): 188-194.
- Herrera F, López I, Egea R, Zanders P. Short-Term osmotic responses of cells and tissues of the sea anemone, *Condylactis gigantea*. *Comp Biochem Physiol* 1989; 92A(3):377-384.

- Hickman Jr CP, Roberts LS, Parson A. Principios Integrales de Zoología. 10<sup>a</sup> ed. Madrid: McGraw Hill Interamericana de España, S.A.U.; 2000.
- Hu B, Guo W, Wang LH, Wang JG, Liu XY, Jiao BH. Purification and Characterization of Gigantoxin-4, a New Actinoporin from the Sea Anemone *Stichodactyla Gigantea*. *Int J Biol Sci* 2011; 7: 729-739.
- Hunter TC, Andon NL, Koller A, Yates III JR, Haynes PA. The functional proteomics toolbox: methods and applications. *J Chromatogr. B* 2002; (782): 165-181.
- Instituto Nacional de Parques (INPARQUES). Parque Nacional Mochima. [en línea – fecha de acceso Marzo 2010]  
Disponible en: URL: <http://www.inparques.gob.ve>
- Junqueira A, Alves W, Stolarz J, Richardson M, Carvalho D, Konno K, et al. Proteomics of the neurotoxic fraction from the sea anemone *Bunodosoma cangicum* venom: Novel peptides belonging to new clases of toxins. *Comp Biochem and Physiol* 2008; part D3:219-225.
- Kennedy S, Davis C, Abrams WR, Billings PC, Nagashunmugan T, Friedman H, et al. Submandibular salivary proteases: Lack of a role in anti-HIV activity. *J Dent Res* 1998; 77(7):1515-1519.

- Klassen CD, Watkins III JB. Casarett & Doull Manual de Toxicología. 5ª ed. México D.F.: McGraw Hill Interamericana Editores; 1999.
- Kraj A, Silberring J. Proteomics: Introduction to Methods and Applications. New Jersey, USA: Jhon Wiley & Sons, Inc; 2008.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins Turing the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
- Lanio ME, Morera V, Alvarez C, Tejuca M, Gómez T, Pazos F, et al. Purification and characterization of two hemolysins from *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon* 2001; 39: 187-194.
- Lazo F, Rodríguez E, Yarlequé A. Evaluación comparativa de dos métodos para determinar la actividad de fosfolipasa A en venenos de serpientes. *Rev Peruana Biol* 1998; 5(2): 1-5
- Leber TM, Balkwill FR. Zymography: A single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. *Anal Biochem* 1997; 249: 24-28.
- Liebler DC. Introduction to Proteomics: Tools for the New Biology. New Jersey, USA: Humana Press Inc.;2002.

- Maček P. Polypeptide cytolytic toxins sea anemones (*Actinaria*). *FEMS Microb Immunol* 1992; 105: 121-130.
- Malpezzi EL, Freitas JC. Hemolytic activity of the nematocyst venom from the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. *Braz J Med Biol Res* 1991; 24(12): 1245-1249.
- Martínez D, Otero A, Alvarez C, Pazos F, Tejuca M, Lanio ME, et al. Effect of sphingomyelin and cholesterol on the interaction of StII with lipidic interfaces. *Toxicon* 2007; 49: 68-81.
- Mazzoni A, Manello F, Tay FR, Tonti GAM, Papa S, Mazzotti G et al. Zymographic Analysis and Characterization of MMP-2 and -9 Forms in Human Sound Dentin. *J Dent Res* 2007; 86 (5): 436-440.
- Mala B, Aparna M. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and molecular biology reviews* 1998; 34:597–635.
- McKenzie SB. Hematología Clínica. México, D.F.: Editorial El Manual Moderno; 1998.
- Miloslavich P, Klein E, Yerena E, Martin A. Marine biodiversity in Venezuela; status and perspectives. *Gayana* 2003, 67 (2): 275-301.

- Molinski TF, Dalisay DS, Lievens SL, Saludes JP. Drug development from marine natural products. *Nature Reviews* 2009; 8: 69-85.
- Montero YN. Evaluación y caracterización de anticuerpos policlonales (IgY) en gallinas contra un pool del veneno total de *Crotalus durissus cumanensis* de los Estados Zulia, Lara, Aragua, Carabobo y Miranda. [Tesis Maestría]. Caracas, Universidad Central de Venezuela; 2011.
- Morrissey JH. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Analytical Biochemistry* 1981; 117:307-310.
- Narahashi T, Moore JW, Shapiro BI. Condylactis toxins: Interaction with Nerve Membrane Ionic Conductance. *Science* 1969; 163: 680-681.
- Oliveira JS, Fuentes-Silva D, King GF. Development of a rational nomenclature for naming peptide and protein toxins from sea anemones [abstract]. *Toxicon* 2012; 60(4):539-550.
- Ownby CL, Colberg TR. Comparison of the immunogenicity and antigenic composition of several venoms of snakes in the family Crotalidae. *Toxicon* 1990; 28(2): 189-199.
- Özbek S, Balasubramanian PG, Holstein TW. Cnidocyst structure and the biomechanics of discharge. *Toxicon* 2009; 54:1038-1045.

- Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 2000; 405: 837-846.
- Pentón D, Pérez-Barzaga V, Díaz I, Reytor ML, Campos J, Fando R, et al. Validation of a mutant of the pore-forming toxin sticholysin-I for the construction of proteinase-activated immunotoxins. *Protein Eng Des Sel* 2011; 24(6):485-493.
- Piccoli G, Verpelli C, Tonna N, Romorini S, Alessio M, Nairn AC, Bachi S, Sala C. Proteomic análisis of activity-dependent synaptic plasticity in hippocampal neurons. *J Proteome Res* 2007; 6 (8): 3202-3215.
- Ravindran V, Kannan L, Venkateshvaran K. Biological activity of sea anemone proteins: II. Cytolysis and cell line toxicity. *Indian J Exp Biol* 2010; 48: 1233-1236.
- Robaina G, Jiménez J. Mochima “Tierra de muchas aguas”; en: Caracterización de los Parques Nacionales Venezolanos. Fundación Ecológica Pampero, Proparques; 1994.
- Romero L, Marcussi S, Marchi-Salvador D, Silva F, Fuly A, Stábeli R, et al. Enzymatic and structural characterization of a basic phospholipase A<sub>2</sub> from the sea anemone *Condylactis gigantea*. *Biochimie* 2010; 92:1063-1071.

- Ronzitti G, Milandri A, Scortichini G, Poletti R, Rossini GP. Protein markers of algal toxin contamination in shellfish. *Toxicon* 2008; 52 (6): 705-713.
- Sala GL, Ronzitti G, Sasaki M, Fuwa H, Yasumoto T, Bigiani A, Rossini GP. Proteomic análisis reveals multiple patterns of response in cells exponed to a toxin mixture. *Chem Res Toxicol* 2009; 22 (6): 1077-1085.
- Shapiro BI. A site of action of toxin from the anemone *Condylactis gigantea*. *Comp Biochem Physiol* 1968; 27: 519-531.
- Shapiro BI. Purification of a toxin from tentacles of the anemone *Condylactis gigantea*. *Toxicon* 1968; 5(4): 253-259.
- Shiomi K. Novel peptide toxins recently isolated from sea anemone. *Toxicon* 2009; 54:1112-1118.
- Simmons TL, Andrianasolo E, McPhail K, Flatt P, Gerwick WH. Marine natural products as anticancer drugs. *Mol Cancer Ther* 2005; 4(2):333-342.
- Singh R, Sharma M, Joshi P, Rawat DS. Clinical status of anti-cancer agents derived from marine sources. *Anticancer Agents Med Chem* 2008; 8 (6): 603-617.

- Soletti RC, de Faria GP, Vernal J, Terenzi H, Anderluh G, Borges HL, et al. Potentiation of anticancer-drug cytotoxicity by sea anemone pore-forming proteins in human glioblastoma cells. *Anticancer Drugs* 2008; 19(5):517-525.
- Souto Suárez ML. Estudio de productos antitumorales y toxinas polietéreas de origen marino. [Tesis Doctoral]. Servicio de Publicaciones, Universidad de la Laguna; 1997.
- Ständker L, Béress L, Garateix A, Christ T, Ravens U, Salceda E, et al. A new toxin from the sea anemone *Condylactis gigantea* with effect on sodium channel inactivation. *Toxicon* 2006; 48:211-220.
- Šuput D. *In vivo* effects of cnidarian toxins and venoms. *Toxicon* 2009; 54:1190-1200.
- Tambuorgi DV, Morgan BP, de Andrade RM, Magnoli FC, van den Berg CW. *Loxosceles intermedia* spider envenomation induces activation of an endogenous metalloproteinase, resulting in cleavage of glycophorins from the erythrocyte surface and facilitating complement-mediated lysis. *Blood* 2000; 95(2): 683-691.
- Tejuca M, Anderluh G, Dalla Serra M. Sea anemone cytolytins as toxic components of immunotoxins. *Toxicon* 2009; 54(1206-1214).

- Tejuca M, Pérez-Barzaga V, Pazos F, Alvarez C, Lanio ME. Construction of sea anémone cytolysin-based immunotoxins for selective killing of cáncer cells. *Rev Cub Física* 2009; 26(1): 15-22.
- Tejuca M, Serra MD, Ferreras M, Laino ME, Menestrina G. Mechanism of Membrane Permeabilization by Sticholisin I, a Cytolysin Isolated from the Venom of the Sea Anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biochem* 1996; 35: 14947-14957.
- Troeberg L, Nagase H. Zymography of Metalloproteinases. *Current Protocols in Protein Science* 2003; Supl 33: 21.15.1-21.15.12.
- Turk T, Kem R. The Phylum Cnidaria and investigations of its toxins and venoms until 1990. *Toxicon* 2009; 54: 1031-1037.
- Twyman RM. Principles of Proteomics. New York, USA: Garald Science/BIOS Scientific Publishers; 2004.
- Valdés YC, Días MB, León JL, Merchán F. Origen e importancia de la fosfolipasa A<sub>2</sub> de secreción. *Rev Cubana Farm* 2002; 36(2):121-128.
- Wall ME. Antimutagenic agents from natural products. *J Nat Prod* 1992; 55 (11): 1561-1568.

- Wilkesman J, Kruz L. Protease Analysis by Zymography: A Review on Techniques and Patents. *Recent Patents on Biotechnology* 2009; 3: 175-184.
- Wilkesman J, Schröder H. Analysis of serine proteases from marine sponges by 2-D zymography. *Electrophoresis* 2007; 28:429-436.
- Yost GA, O'brien RD. Isolation of the two components of *Condylactis* toxin. *Arch Biochem Biophys* 1978; 185(2):483-487.
- Zhang C, Kim Se-Kwon. Matrix Metalloproteinase inhibitors (MMPIs) from marine natural products: The current situation and future prospects. *Mar Drugs* 2009; 7:71-84.
- Zhang SC, Sun M, Li T, Wang Q, Hao JH, Han Y, et al. Structure analysis of a new psychrophilic marine protease. *PLoS ONE* 2011; 6(11):1-8.