



70121
1
24
1991

Universidad Nacional Autónoma de México
FACULTAD DE CIENCIAS

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE ENZIMAS
PROTEOLÍTICAS DE LA ESPONJA MARINA**
Sphaerospongia vesparia

TESIS QUE PRESENTA
ROBERTO ALEJANDRO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS
PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS (Biología)

México

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1991



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

Abreviaturas

Resumen

Introducción:

- El océano como fuente de recursos.
- Generalidades del phylum Porifera.
- Metabolismo en organismos marinos (phylum Porifera).

Objetivos de esta Tesis.

Clasificación de *Sphaerocarpus vagans*.

Area de Colección.

Materiales y Métodos:

- Colección.
- Extracción.
- Purificación:
 - a) Cromatografía de filtración en gel.
 - b) Concentración de la muestra.
 - c) Cromatografía de interacción hidrofóbica.
 - d) Cromatografía de intercambio iónico de alta resolución.
- Determinación de actividad proteolítica.
- Determinación de actividad sobre diferentes sustratos sintéticos.
- Pruebas de inhibición.
- Pruebas de inhibición con sustratos sintéticos (BAEE).
- Cuantificación de proteína.
- Coeficiente de extinción.
- Determinación del peso molecular.
- Enfoque isoelectrico.
- Dicroísmo circular.

Resultados y discusión:

- Purificación de la enzima proteolítica.
- Criterios de pureza.
- Caracterización de la proteasa:
 - a) Determinación del peso molecular.
 - b) Coeficiente de extinción.
 - c) Actividad proteolítica.
 - d) Determinación del punto isoelectrico.

- e) Determinación de la actividad sobre diferentes sustratos sintéticos.
- f) Pruebas de inhibición sobre sustratos protéicos.
- g) Pruebas de inhibición sobre sustratos sintéticos.
- h) Dicroísmo circular.

Conclusiones.

Bibliografía.

ABREVIATURAS

Tris	[Hidroxi metil] amino metano
BAEE	α-N-benzoil-L-arginina etil ester
HLPA	Hipuril-L-fenilalanina
Z-TPNA	N-CBZ-L-Tirosina-p-nitrofenil ester
BAPNA	α-N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida
HEPES	Acido N-2-hidroxi etil piperazina-N'-ácido etano sulfónico
EDTA	Acido etilendiamino tetracético
BCA	Acido biciconínico
SDS	Sodio dodecil sulfato
PMSF	Fluoruro de fenil metil sulfonilo
PMA	Acetato fenil mercurico

RESUMEN

Los estudios realizados sobre esponjas marinas se han enfocado principalmente al aislamiento de productos bioactivos de bajo peso molecular. Salvo algunas excepciones, prácticamente no se han estudiado las proteínas y polipéptidos de estos organismos, cuando estos pueden ser de gran interés en el metabolismo del phylum Porifera.

En el presente trabajo se ha aislado, purificado y caracterizado una proteasa de la esponja marina *Sphaeroceros vesparia*. La enzima purificada tiene un peso molecular de 27,700 daltons y presenta 2 formas moleculares con puntos isoelectricos de 4.15 y 4.22. Presentó actividad sobre sustratos proteicos (cuero-azul y caseína) y sintéticos (BAEE y HPLA). Su acción catalítica es inhibida por 1,10-fenantrolina y EDTA, lo que nos hace suponer que es una enzima dependiente de algún ión metálico.

Por otra parte, a partir de espectros de dichroísmo circular en la zona del UV lejano (190-250 nm) se pudo determinar que la proteasa de esponja contiene cantidades apreciables de hojas β y parece pertenecer a la clase α/β , o bien a la clase β . Asimismo, estos resultados parecen indicar que la enzima de *Sphaeroceros vesparia* no pertenece a la misma familia estructural de otras metaloproteasas como son la carboxipeptidasa A y la termolisina.

SUMMARY

Studies on marine sponges have been focused mainly to the isolation of low molecular weight bioactive products. With few exceptions, proteins and polypeptides have not been studied, even though they are of main importance in the metabolic system of Porifera Phylum.

In this work we have isolated a protease from the marine sponge (*Sphacelospongia vesperis*). The purified enzyme has a molecular weight of 27,700 daltons and presents two molecular forms with isoelectric points of 4.15 and 4.22. It presents activity over proteic substrates (hide powder case and casein) and synthetic substrates (BAEE and HLPA). The catalytic action is inhibited by 1,10-phenanthroline and EDTA, so it seems to be a metalloprotease.

On the other hand, circular dichroism spectra in the far UV region (190-250) were obtained. The results indicate that sponge protease contains appreciable amount of β sheet and seems belong to α/β class or β class. Likewise, this results seem to indicate that *Sphacelospongia vesperis* enzyme does not belong to the same structural family of other metalloproteases like carboxypeptidase A and thermolisin.

INTRODUCCION

A) EL OCEANO COMO FUENTE DE RECURSOS

Desde el punto de vista alimenticio el océano es uno de los recursos de proteína más importantes para el hombre. En los últimos 20 años, el océano ha adquirido mayor relevancia como factor del desarrollo socioeconómico de los países, lo cual se refleja en la prioridad que actualmente se concede a su estudio. Gracias a este avance se han desarrollado refinados y complejos métodos de observación, medición y muestreo que amplían la capacidad de explorar, evaluar y aprovechar el mar. El océano tiene un potencial muy vasto. La exploración y explotación de sus recursos vivos y de los no renovables se incrementan constantemente. Entre los primeros se cuentan la pesca (incluida la acuicultura) y el uso de organismos marinos para la extracción de sustancias con diversas propiedades; entre los segundos se encuentran los minerales, hidrocarburos y los materiales de construcción. El océano es un gran depósito de recursos naturales, y además, de la plataforma submarina se obtiene más del 20% de la producción mundial de petróleo.

Entre los recursos que el océano suministra al hombre existen productos de gran importancia para la industria farmacéutica. Dichos productos tienen origen tanto vegetal como animal. Algunos tipos de algas, esponjas, corales, almejas y peces poseen sustancias que, convenientemente dosificadas, pueden ser utilizadas con fines terapéuticos debido a su contenido vitamínico y mineral. Por otra parte, el hombre mediante el aprovechamiento de muchos de los organismos que habitan el océano, confecciona collares, pulseras, aretes, etc. A su vez, cultiva algunos otros organismos marinos, como las ostras, para producir las preciadas perlas, que remuneran en su beneficio económico y decorativo.

En México, hasta 1958, sólo grupos aislados se ocupaban de investigaciones marinas, en su mayor parte de tipo biológico descriptivo. En los últimos años se percibe un mayor interés por desarrollar trabajos de investigación más ambiciosos, aunque los esfuerzos realizados hasta ahora todavía no proporcionan suficiente información para el apropiado conocimiento y administración de los recursos marinos. En aguas continentales México dispone de una superficie de cuerpos de agua de 1.3 millones de lagos, ríos y presas; en ellos se capturan más de 50 especies distintas. Sin embargo, no todos los cuerpos de agua han sido estudiados, de ahí la problemática para el aprovechamiento adecuado de estos recursos. En 1975 México acrecienta su superficie en 2'892'000 Km² al establecerse en la Constitución Política de los

Estados Unidos Mexicanos las 200 millas náuticas (370.4 Km) como Zona Económica Exclusiva. Con esta medida el país amplía su espacio y la porción marina pasa a ser mayor que la terrestre. Para aprovechar sus mares, México tendrá que conocerlos, lo que requiere de un intenso y sostenido esfuerzo de exploración interdisciplinaria. Nuestro país posee más de 10'000 Km de líneas de costa (en las que existen aproximadamente 1'500 000 Has. de lagunas costeras y esteros). Con esta extensión de litorales México cuenta con una amplia diversidad de organismos acuáticos.

B) GENERALIDADES DEL PHYLUM PORIFERA

Las esponjas fueron conocidas desde tiempos remotos por los pueblos inmediatos al mar Mediterráneo. Se cree que los primeros en descubrir sus utilidades fueron los fenicios y los egipcios, lo que viene reflejado en los escritos que de ellos se conservan y en los que se menciona la extracción de esponjas. Se supone que la competencia para alcanzar una mayor maestría en la zambullida con el fin de recoger más esponjas, condujo a la inclusión del buceo como un renglón más en las olimpiadas de la antigüedad. Platón, el filósofo griego, hablaba de las esponjas y de su uso. Aristóteles, habló incluso, del crecimiento de esos animales que son predominantemente marinos. En la Grecia de entonces, las esponjas eran usadas en el baño, en la limpieza de las cocinas y como forro amortiguador de las armaduras. Además los guerreros las utilizaban para beber durante sus campañas, sustituyendo a las pesadas copas metálicas y de barro.

Las esponjas son los organismos más primitivos de los seres multicelulares, pertenecen al phylum Porifera (porifera, del latín, quiere decir "que posee poros") y representan a los primeros metazoarios (este phylum es relativamente pequeño, comprende aproximadamente 5,800 especies, [Garrone, 1985]). Estos organismos no poseen ni tejidos ni órganos verdaderos, sus células despliegan considerable independencia y además todos son asexuales. Esta combinación de características convenció a Aristóteles y a otros antiguos naturalistas de que las esponjas eran plantas; de hecho, fue hasta 1765 cuando se observaron por primera vez corrientes internas de agua y se reconoció claramente la naturaleza animal de las esponjas. También fueron erróneamente consideradas como Celenterados (otra agrupación zoológica a la pertenecen los corales, los abenicos de mar y las anémonas) hasta que se comprobó que su anatomía era completamente diferente a la de aquéllas.

El nivel de organización de las esponjas, es decir, el lugar que ocupan en el reino animal, definido por su complejidad estructural y funcional, se considera como celular, de modo que sus

funciones vitales, lejos de realizarse mediante pulmones, aparato digestivo, corazón, etc., son realizadas por las células, que pertenecen a variados tipos que se han especializado para realizarlas. A semejanza de otros organismos marinos sedentarios, las esponjas han desarrollado adaptaciones químicas y físicas que les han permitido sobrevivir en el medio marino a través del tiempo (Bakus, 1961).

Excepto algunas especies de agua dulce, la mayoría son de origen marino y han colonizado todos los habitats acuáticos. Se encuentran distribuidas en todos los mares, principalmente en donde se encuentran rocas, conchas, corales, etc.; pero tienen una mayor diversidad y abundancia en los arrecifes coralinos, mostrando una gran variedad de formas, tamaños y colores.

La mayoría de estos organismos prefieren las aguas relativamente superficiales, pero hay algunos grupos, como las esponjas vítreas que viven a grandes profundidades. El tamaño de estos organismos es muy variable, van desde unos cuantos milímetros hasta más de un metro. La forma de crecimiento de las esponjas depende de la naturaleza y la inclinación del sustrato, de la disponibilidad de espacio y de la velocidad y tipo de agua. En consecuencia, una especie determinada puede adoptar diferentes aspectos según las condiciones ambientales del medio en que se encuentre, dando como resultado una cierta confusión taxonómica (Bergquist, *et al.* 1964).

La mayoría de las especies están brillantemente coloreadas, gracias a los gránulos de pigmentos localizados en los amibocitos, que son un tipo de células que están presentes en la superficie de estos organismos. Presentan un esqueleto relativamente complejo, que le sirve como armazón de sostén a las células vivas del organismo. Este esqueleto puede estar formado por espículas calcáreas, silíceas, fibras protéicas de espongina o de una combinación de ellas.

Las clases del phylum Porifera han sido definidas por la naturaleza química de su esqueleto inorgánico. Actualmente estas características son tomadas en cuenta para la determinación o reconocimiento taxonómico de las esponjas.

Calcarea:	Contienen un esqueleto calcáico.
Hexactinellidae (esponjas vítreas)	Presentan un esqueleto de sílice.
Sclerospongiae:	Presenta una gran cantidad de material calcáico o aragonítico en su esqueleto basal y una parte muy pequeña de elementos síliceos.
Demospongiae:	El esqueleto está formado por elementos síliceos o de un material grueso de fibras de espongina (su naturaleza es de colágena) o por una combinación de ambas. También puede presentarse el caso de que elementos de sílice estén embebidos en fibras de espongina.

Reproducción.

Estos organismos se reproducen por mecanismos sexuales, asexuales (gemación) o por procesos que involucran a ciertas estructuras específicas que implican formación y liberación de un agregado de células esenciales, especialmente amibocitos. Con respecto a este último punto Varner, Burguer y Kaufman (1987) mencionan que para la especie *Microciona prolifera* existe un factor de agregación y reconocimiento entre célula-célula y que es dependiente de iones de calcio. Misovic, *et al.* (1982) también reportan la presencia de un factor de agregación que actúa como mediador entre el reconocimiento celular y que es posiblemente una glicoproteína, Henshart, *et al.* (1973).

Existen especies hermafroditas y dióicas, aunque la mayoría son de las primeras, las cuales son capaces de producir óvulos y espermatozoos en diferentes épocas, a partir de los amibocitos. Los espermatozoos abandonan las esponjas gracias a las corrientes de agua y entran en otras validades del mismo mecanismo. Reiswig (1970) ha señalado que cuando una esponja suelta su espermatozoos, induce a las otras a soltarlo. Una vez que el espermatozoos llega a la cámara flagelada, se introduce en un coanocito, o un amibocito (células que actúan como portadoras) para ser transportado hacia el óvulo.

Sistemática de las Esponjas.

La clasificación de las esponjas está basada en un gran número de características sujetas a diferentes grados de variación de tipo genético y ambiental. Los caracteres esqueléticos son uno de los aspectos más importantes. Los tipos y tamaños de las espículas y las fibras y su disposición en el seno de la esponja, son la base principal, pero no exclusiva, en la sistemática de este grupo. Sin embargo, algunos tipos de espículas típicas de una especie pueden estar ausentes en ejemplares pertenecientes a la misma; la talla de las espículas puede variar entre ejemplares de una misma especie bajo la influencia de la temperatura y otros factores. Se ha visto que los ejemplares de una especie presentan espículas mayores si han sido colectados en zonas donde las temperaturas son más frías. Las fibras pueden variar también en el grosor y amplitud de sus mallas, y la cantidad de espongina que envuelve a las espículas puede ser lo mismo abundante que escasa en individuos de una misma especie.

La forma de las esponjas es un carácter importante en la clasificación si se considera con prudencia, pues es también muy variable; hay que analizarlo en relación con las condiciones del medio. Este puede ser un rasgo o característica muy útil en la taxonomía, si para cada especie se pueden delimitar las variaciones de que es susceptible bajo diferentes condiciones ambientales.

El color es también un medio muy útil para reconocer las especies, aunque está sujeto a cambios con la iluminación, cantidad de algas simbiotas, estado de salud de la esponja e, incluso, a variaciones de tipo genético que pueden existir dentro de una misma especie. Al igual que con la forma, es necesario precisar cuales son los colores posibles para cada especie. Algo similar ocurre con la consistencia, que se ve influida por el régimen de movimientos del agua y posiblemente por algunas cualidades químicas de ésta.

Uso de las Esponjas.

Las esponjas útiles al hombre pertenecen a la clase Sclerospongiae, es decir las que carecen de espículas y en las que el esqueleto está formado por una trama de espongina, sustancia elástica a la que se debe su carácter típico de elasticidad. Dado el extraordinario polimorfismo de las esponjas y desde el punto de vista de su utilización, casi no importa la especie a que pertenezcan, sino a las llamadas "cualidades comerciales", las que a su vez dependen de la edad, el procedimiento de pesca empleado y el tratamiento a que son sometidas antes de su empleo. Todos esos factores pueden influir en las propiedades que una esponja útil debe reunir, y que son: suavidad, una gran elasticidad, y una gran capacidad de absorción y retención de líquidos en su interior. Sin embargo, la aparición de las esponjas sintéticas en los

mercados ha producido un notable descenso en la demanda de las esponjas naturales.

Relaciones Simbióticas en Esponjas.

Debido a su morfología y a su modo de alimentación, algunas esponjas proporcionan un habitat temporal o permanente, ya sea dentro de su cuerpo o sobre su superficie. Se ha observado que varias esponjas presentan asociaciones con diversos microorganismos, principalmente con algas unicelulares y bacterias, (Sara, *et al.* 1973). Asimismo, hemos encontrado en la esponja *Sphaciospongia vesperia* pequeños crustáceos que fueron identificados como *Synalpheus brooksi*.

C) METABOLISMO EN ORGANISMOS MARINOS (PHYLUM PORIFERA)

Nutrición.

Las esponjas son organismos sedentarios, filtrantes no selectivos que capturan y retienen partículas alimenticias que son atrapadas en las cámaras. Estas partículas pueden ser bacterias, algas unicelulares y detritus microscópicos. Recientemente se ha descubierto que las células que cubren la superficie de las esponjas y a los canales, son capaces de atrapar y englobar (fagocitar) las algas unicelulares y el detritus de mayor tamaño, mediante la emisión de prolongaciones o pseudópodos, de forma similar a como lo hacen los protozoarios conocidos como amebas. Se conoce desde hace poco tiempo que las esponjas son capaces de absorber directamente las sustancias alimenticias disueltas en el agua.

A la fecha no existe información confiable sobre la nutrición de estos organismos. No poseen un órgano definido para realizar esta función, sino células especializadas.

Toxicidad en Esponjas.

La toxicidad en las esponjas marinas varía con la latitud. Los resultados de una investigación indican que en el Hemisferio Norte, la toxicidad en las esponjas se incrementa cuando la latitud desciende y que la mayoría de las esponjas tóxicas están expuestas a la interacción con los peces, (Green, 1977).

Kashman, *et al.* (1980) aisló varias toxinas de la esponja del mar rojo *Laurencia magna*

que habita entre 6-30 metros de profundidad y que raramente es comida o dañada por peces. Cuando se exprimía la esponja en un acuario, el jugo rojizo causaba el envenenamiento y la muerte de los peces entre los 4-6 minutos. La toxina causa excitación, seguida por hemorragias, pérdida del equilibrio y después de unos pocos minutos, la muerte. De esta esponja se han aislado las latrinculinas A, B y C. La latrinculina B ha sido sujeta a análisis cristalográfico de rayos X, comprobándose que es una toxina macrólida, capaz de diagregar la organización microfilamentosa en cultivos de células. La acción biológica de éstos compuestos ha sido investigada por su posible aplicación en el control de tumores, (Spector, *et al.* 1983).

Algunos metabolitos de esponjas han mostrado ser tóxicos a otras formas de vida marina. De la esponja *Spongia idia* se aislaron varios sesterterpenos que son tóxicos a la estrella de mar *Pisaster giganteus*, además estas sustancias inmovilizan a larvas de moluscos *Haliothis rufescens*, (Walker, 1980). También se ha extraído a la halitoxina de 3 especies diferentes de *Haliclona* sp (Schmitz, *et al.* 1978). La purealina es un metabolito secundario aislado de una esponja de Okinawa *Psammaphysilla purea*, (Nakamura, 1985), la cual modula las reacciones enzimáticas de ATP-ases.

Actividad Antimicrobiana.

La mayoría de los estudios recientes sobre esponjas se pueden agrupar en el área de productos naturales, estudiándose su química, su acción biológica y farmacológica. En pruebas realizadas con los extractos de algunas esponjas se ha demostrado la presencia de sustancias que pueden ser útiles como agentes antimicrobianos y fúngicos, los cuales incluyen, diferentes tipos de estructuras químicas (Rinehart, *et al.* 1981). Se piensa que estas sustancias antimicrobianas le sirven a las esponjas para inactivar a sus presas microbianas que son ingeridas como alimento. Burkholder, (1973) y Green, (1977) las consideran como un mecanismo defensivo, al inhibir el crecimiento bacteriano que pudiera causar algún daño en el interior de la esponja. Sin embargo, las esponjas no han proporcionado aún sustancias que puedan funcionar como antibióticos. También se han detectado otros tipos de actividades farmacológicas como antiviral, antitumoral, citotóxica, etc., (Baslow, 1969).

Actividad Antiepileptica.

Las esponjas poseen mecanismos de resistencia contra el asentamiento epibéntico. Aunque no se conoce con precisión cómo funciona este mecanismo, se ha sugerido que los metabolitos secundarios que liberan estos organismos al medio son los causantes directos de que puedan mantener su superficie externa parcial o totalmente libre de invertebrados marinos.

Otras Sustancias Encontradas en el phylum Porifera.

Otras sustancias bioactivas se han aislado de las esponjas del género *Aplysina*, estos compuestos muestran actividad antimicrobiana, citotóxica y antineoplásica (Minsale, 1976). Aproximadamente diez especies de *Aplysina* han sido motivo de estudio desde hace más de 20 años y de ellas se han obtenido ácidos grasos, diversos esteroides, sustancias nitrogenadas, carotenoides, algunos aminoácidos y una serie de compuestos halogenados que no se habían descrito en la literatura, (Faulkner, 1984). En la actualidad las expectativas siguen siendo interesantes debido a que se han determinado un buen número de sustancias nuevas que potencialmente pueden funcionar como fármacos. El estudio de estas sustancias que se encuentran en los organismos marinos ha contribuido al desarrollo de nuevas áreas de investigación.

Otros productos que se han encontrado en el phylum Porifera son unos nucleósidos poco comunes que contienen β-D-arabinosa: la esponjouridina y la esponjotimidina, aislados de una esponja de Jamaica *Tethya crypta*, (Bergmann y Feeney, 1950). El papel metabólico de estos nucleósidos es desconocido y se han encontrado aminoácidos no esenciales como el ácido β-amino isobutírico y el ácido piperólico. También se han detectado diferentes esteroides, como el colestero, poriferasterol, neospongosterol y clionosterol; algunos de ellos en muy altas concentraciones en la porción lipídica. El β-sitosterol (L) fue el primero de una serie de esteroides aislados de esponjas del género *Aplysina*, (Sharma *et al.* 1970). En cuanto a ácidos grasos, las esponjas son únicas en el reino animal por presentar la mayor diversidad de ácidos grasos con niveles generalmente altos de ácidos de cadena larga (24-30 átomos de carbono) y con una alta insaturación. La influencia geográfica y estacional sobre la composición de ácidos grasos puede ser utilizada como una herramienta quimiotaxonomica para clasificar a diversas especies con problemas taxonómicos, (Lawson, 1984).

Por otra parte, se han aislado terpenoides lineales con anillos furánicos en un extremo, como la furoesponjina con actividad antimicrobiana y sesterterpenoides como la escalanina. Asimismo se han encontrado zocromos como la uranidina aislado de *Verongia aerophoba* el

cual es un colorante amarillo azufroso que cambia a negro con el aire (aerófilo), (Cimino, *et al.* 1984). Recientemente se han encontrado proteínas en esponjas que tienen actividad hemaglutinante contra varios tipos de eritrocitos animales. A partir de *Dysidea herbacea* se ha aislado una hemaglutinina específica para D-galactosa (Kamiya, 1985) y en la esponja *Phyllospongia foliascens* se encontraron hemaglutininas no específicas contra eritrocitos humanos.

Con respecto a la bioquímica de las esponjas lo que se ha encontrado es muy poco. Se han aislado glucógeno y algunos azúcares como la glucosa y trehalosa. La presencia de algunas enzimas de la glicolisis como la enolasa, ha sido puesta en evidencia indirectamente por la inhibición de la respiración por fluoruro y la del ciclo de Krebs por inhibición con malonato. Estos estudios se hicieron en la esponja marina *Halicondria panicea* (Agrell, 1952), sin embargo, las enzimas no fueron aisladas ni caracterizadas. El efecto inhibitorio del malonato da la evidencia de la existencia de la enzima succínico deshidrogenasa como una parte integrante en la cadena oxidativa e indirectamente en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Tampoco se ha podido demostrar la presencia de citocromos, aunque la inhibición de la respiración con cianuro, supone la presencia de citocromo oxidasa.

Lo expuesto hasta aquí pone de manifiesto que la información existente en la literatura acerca del metabolismo, así como de las enzimas involucradas en diferentes aspectos como nutrición, respiración, etc., del phylum Porifera, aún es muy escasa, por lo que este campo resulta atractivo para su investigación.

Finalmente, el interés del presente trabajo es aislar, purificar y caracterizar algunas enzimas hidrolíticas de la esponja marina *Sphaerospongia vesparia*, por medio de técnicas bioquímicas modernas. Estas investigaciones aportarían información muy valiosa, con respecto a la nutrición de estos organismos, aumentando así el conocimiento de estos invertebrados.

OBJETIVOS DE ESTA TESIS

Los estudios realizados sobre esponjas marinas se han enfocado principalmente al aislamiento de productos bioactivos de bajo peso molecular, representando una gran variedad de estructuras químicas y propiedades farmacológicas. Salvo algunas excepciones, prácticamente no se han estudiado proteínas y polipéptidos de estos organismos, cuando éstos pueden ser de gran importancia en la actividad metabólica.

Dada la escasa información sobre la existencia y función que desempeñan las enzimas en organismos tan primitivos como las esponjas, este trabajo se enfoca al aislamiento, purificación y caracterización de una enzima proteolítica de la esponja marina *Sphaerospongia vesperia*, teniendo como objetivos principales los siguientes puntos:

- a) Establecer una estrategia de purificación
- b) Caracterizar a la proteasa, en cuanto a peso molecular, coeficiente de extinción, punto isoelectrico, pruebas de actividad proteolítica y pruebas de inhibición
- c) Determinar tentativamente el patrón de plegamiento de la macromolécula por dicroismo circular.

Clasificación de *Sphaciospongia vesparia*

Phylum	Porifera
Clase	Demospongiae
Subclase	Tetractinomorpha
Orden	Hadromerida
Familia	Spirastrellidae
Género	<i>Sphaciospongia</i>
<u><i>Sphaciospongia vesparia</i></u>	Laubenfels, 1932. Randall y Hartmann, 1968.



En la Fig. 1 se observa un ejemplar de la esponja *Sphaciospongia vesparia*.

AREA DE COLECTA.

El área de colecta se encuentra en la costa caribeña de la Península de Yucatán y se caracteriza por una formación arrecifal del tipo barrera, en donde se localiza Puerto Morelos, entre las coordenadas $20^{\circ} 42'$ y $20^{\circ} 52'$ de latitud N y $86^{\circ} 51'$ de longitud O. Fig 2.

La región presenta un clima cálido-subhúmedo con precipitación pluvial máxima en el verano (García, 1964). Esta región se encuentra bajo la influencia de vientos dominantes en sentido E-O desviados ocasionalmente al SE-NO por la presencia del continente (Secretaría de Marina, 1974).

La temperatura superficial media anual del agua varía entre 25.6° en enero y 29°C en agosto, con promedio anual de 27.5°C . La dirección de la corriente superficial marina va de sur a norte (Secretaría de Marina, 1974). No existe aportación de agua dulce del continente por ríos, sino por la presencia de cenotes. Las mareas son mixtas y de poca amplitud.

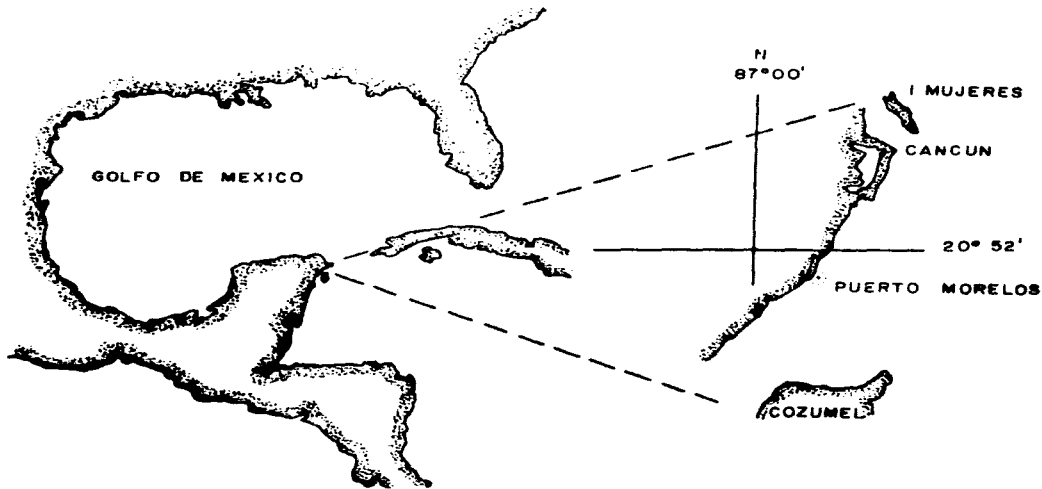


Fig. 2 Area de estudio. Puerto Morelos, Quintana Roo

MATERIALES Y METODOS

COLECTA

Las esponjas de *Sphaciospongia vesparis* se recolectaron en la localidad de Puerto Morelos, Edo. de Quintana Roo. El método empleado fue el de buceo, ya que éstas se encuentran entre los 3-10 metros de profundidad. Posteriormente se transportaron en hielo al laboratorio y se congelaron a -20°C hasta su uso.

EXTRACCIÓN

La esponja húmeda se pesó (en peso seco corresponde al 18%) y se cortó en pedazos pequeños, los que se lavaron perfectamente con agua corriente y después con agua destilada; esto es para eliminar a los organismos simbioses que pudieran estar presentes en la misma. Posteriormente se llevó a cabo una molienda en un homogenizador UltraTurrax durante 10 min en un regulador Tris-HCl 0.05 M, 0.3 M de NaCl, pH de 7.0 y una temperatura de 4°C . Una vez que fue obtenido el homogenizado se filtró a través de una gasa estéril, y este extracto se centrifugó a 31000 Xg durante 50 minutos a una temperatura de 4°C , para eliminar los residuos sólidos.

PURIFICACIÓN

Con el extracto centrifugado se llevó a cabo una precipitación fraccionada utilizando sulfato de amonio. Primero se llevó de 0-50% de saturación y posteriormente 50-80% y se almacenó a 9°C durante 15 horas. Los precipitados fueron separados por centrifugación a 31000 Xg durante 45 min, después se disolvieron y dializaron en agua destilada para eliminar el sulfato de amonio. Para esto se utilizaron membranas de diálisis (Spectrapor con retención de peso molecular 6000-8000 daltones) las cuales se colocaron en un aparato de diálisis continua (Arreguín, 1968). Dicho aparato permite el movimiento de la bolsa de diálisis y del contenido. A ambas soluciones se les probó actividad proteolítica y amilolítica, encontrando que el

precipitado obtenido al llevar a 50% de saturación presentaba actividad proteolítica.

a) Cromatografía de Filtración en Gel.

El extracto dializado, con actividad proteolítica fue sometido a cromatografía de filtración en gel. Esta se llevó a cabo a temperatura ambiente, en un sistema LKB que consiste de: un colector Ultrarac II, una bomba peristáltica Varioperpex, un monitor de absorbancia con filtro para 280 nm modelo Uvicord S y un registrador. Este método de separación de moléculas de acuerdo a su tamaño y forma se logra por el uso de un tamiz molecular (soportes inertes). En esta técnica la separación de proteínas se basa en sus diferencias de peso molecular; aquellas moléculas capaces de penetrar en los espacios de la fase estacionaria se mueven más lentamente a través de la columna, en cambio las moléculas de mayor tamaño no entran en ella por lo que se mueven más rápidamente en la cama cromatográfica. La elución de los componentes es en orden decreciente en peso molecular. Comercialmente existen geles con diferentes límites de exclusión; en nuestro caso utilizamos una columna de Ultrogel AcA-54 (5% Acrilamida y 4% de Agarosa) con dimensiones de 72.5 X 5 cm. Este gel permite separaciones de moléculas con pesos moleculares entre 5000-75000 daltones. La muestra se eluyó con un regulador Tris-HCl 0.05 M, 0.3 M NaCl, pH 7.0. La velocidad de flujo se ajustó a 30 ml/hr., registrándose la absorbancia a 280 nm. y colectándose fracciones de 10.5 ml. La fracción conteniendo a la proteasa de esponja fue recirculada en la misma columna en las mismas condiciones.

b) Concentración de la Muestra.

La fracción recirculada conteniendo la actividad proteolítica fue concentrada por liofilización. Para esto, el material se colocó en un matraz redondo de vidrio, ocupando el 10% de su capacidad, congelándolo en una mezcla de acetona y hielo seco y distribuyéndolo por rotación en la mayor superficie de la bola para que la capa congelada fuera delgada y homogénea. Posteriormente se colocó en el Liofilizador (EF4, Modulyo Freeze Dryer, Edwards) conectado a una bomba de vacío.

c) Cromatografía de Interacción Hidrofóbica.

En esta técnica la muestra se aplica a la columna (tiene una matriz hidrofóbica que puede

tener en su cadena lateral grupos octilo o fenilo) bajo condiciones que favorezcan los enlaces hidrofóbicos; ésto se logra utilizando un eluyente con una fuerza iónica muy alta, que en este caso es el sulfato de amonio. Posteriormente las proteínas se eluyen de la columna mediante un gradiente descendiente de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

En este caso, la fracción con actividad proteolítica fué concentrada y dializada contra el regulador con el cual se equilibró la columna, se aplicó a la columna de cromatografía de interacción hidrofóbica Octil-Sheparose CL-4B (43 X 1.6 cm.) equilibrada con regulador de Tris-HCl 0.05 M, pH 7.0, 0.3 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La velocidad de flujo fue de 7.5 ml/hr. y se colectaron fracciones de 2.5 ml. La elución se llevó a cabo aplicando un gradiente de sulfato de amonio (0.3→0.0 M).

d) Cromatografía de Intercambio Iónico de Alta Resolución.

La cromatografía líquida de alta resolución presenta una serie de ventajas con respecto a la cromatografía tradicional, como son: su versatilidad, rapidez, reproducibilidad, estabilidad y sensibilidad. En el caso de la cromatografía de intercambio iónico las proteínas se unen a los intercambiadores iónicos como resultado de las interacciones electrostáticas entre éstas y la matriz. La retención se incrementa en proporción a la densidad de carga, tanto de la matriz intercambiadora como de la proteína. La matriz intercambiadora consta de grupos cargados que se hallan covalentemente unidos a ella, los cuales están asociados a iones móviles que pueden ser intercambiados reversiblemente con otros iones de la misma carga sin que se altere la matriz. Las proteínas, debido a la presencia de grupos carboxílicos y aminos, presentan la propiedad de comportarse como ácidos o como bases (aniones o cationes). Esta propiedad depende de su punto isoeléctrico y por lo tanto del pH del medio, que aumenta o disminuye, según el caso, la disociación de sus grupos característicos. Si se encuentran adecuadamente cargadas pueden ser unidas a la matriz con diferente fuerza dependiendo de la magnitud de su carga neta. La elución de las proteínas retenidas se logra mediante el aumento en la fuerza iónica del eluyente. Cada componente de la muestra se separa con diferente tiempo y velocidad ya que poseen distinta afinidad por el intercambiador.

En este trabajo se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC-LKB) y una columna TSK-DEAE-SPW (7.5 X 0.75 cm), equilibrada con regulador de fosfatos 0.05 M, pH 5.95. Para la elución de la muestra se usó un gradiente de NaCl de 0 a 1.0 M (0.03 M/min) en el mismo regulador. La velocidad de flujo se ajustó 0.7 ml/min., detectándose las fracciones en un detector espectral 190-370 nm.

Determinación de Actividad Proteolítica.

Desde la época de Büchner sabemos que la actividad de las enzimas pueden medirse en ausencia de elementos celulares vivos. Si en algunos casos esto no se ha logrado, se debe atribuir a causas derivadas de los métodos empleados en su extracción o algunas veces a la poca estabilidad de ciertas enzimas cuando se les separa del medio celular. En el presente trabajo se utilizaron dos métodos para medir la actividad proteolítica que son:

- a) El método de Rinderknecht, *et al.* (1968) en el cual a 1 mg de cuero-azure (Hide Powder Azure) en 1.9 ml regulador de Tris-HCL 0.05 M, pH 7.0, se adicionan 100 μ l. de la solución conteniendo la proteasa. La mezcla se incuba a 37°C durante 90 minutos, se filtra y se determina absorbancia a 600 nm, utilizando como testigo la misma solución de Hide Powder Azure pero a la cual se le agregan 100 μ l. de H₂O destilada en lugar de la muestra. Este es un método muy sensible para la determinación colorimétrica de la actividad proteolítica y está basado en el uso de un sustrato insoluble que proviene del polvo de cuero (Hide Powder Azure-SIGMA), al cual se ha unido covalentemente al azul brillante de Remazol. La actividad es proporcional a la liberación del colorante. Para encontrar el pH óptimo de la proteasa sobre este sustrato, se llevaron a cabo determinaciones de actividad en función del pH, a 37°C, durante 60 min. El pH óptimo de ésta enzima fué de 7.0 (figura 3A).
- b) El método de Kunitz (1947) modificado por Sgarbieri (1963). En este caso a 1.9 ml. de una solución de caseína al 1%, en regulador de fosfatos 0.05 M a pH 7.0, se adicionan 100 μ l de la muestra y se incuba a 37°C durante 90 minutos. Inmediatamente se agregan 3 ml. de ácido tricloroacético al 5% para suspender la reacción, se centrifuga y se determina absorbancia del sobrenadante a 280 nm. Como testigo se utiliza la misma solución de caseína a la cual se le agrega la muestra después del ácido tricloroacético. La absorbancia es proporcional a los aminoácidos aromáticos liberados y representa una medida

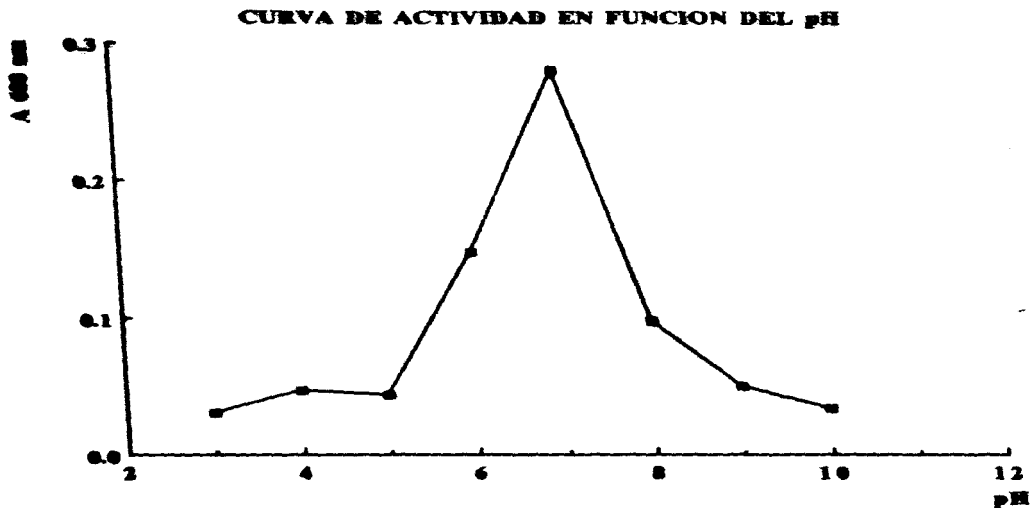


Figura 3a.
Curva de actividad sobre cuero-azare (37 °C, 60 min) en función del pH.
Se utilizó la fracción con actividad que salió de la columna hidrofóbica (octil-sepharose).

de la actividad enzimática. Una unidad de actividad se define como el incremento de una unidad de absorción, en un minuto a 35°C y pH 7.0. Debido a la precipitación de la caseína a pH ácidos, se utilizó cuero-azure para construir la curva de actividad vs pH.

Determinación de Actividad sobre diferentes Sustratos Sintéticos.

Se probó la actividad de la proteasa de *Sphaciospongia vesparia* sobre varios sustratos sintéticos: α -N benzoil-L arginina etil éster (BAEE), Hipuril-L-fenilalanina (HLPA), N-CBZ-L-tirosina p-nitrofenil éster y α -N-benzoil-DL-arginina p-nitroanilida (BAPNA). Las determinaciones cinéticas se llevaron a cabo utilizando un espectrofotómetro Varian modelo CARY 1/3 de doble canal, equipado con chaquetas térmicas para las celdas.

En los experimentos con BAEE, se utilizó el método reportado por Whitaker y Bender (1965). En este caso tanto la celda testigo como la celda de reacción contenían 800 μ l. de regulador de N-2-hidroxietyl piperazina-N'-ácido etano sulfónico (HEPES) 0.1 M, pH 7.5 y 170 μ l de BAEE 0.6 mM en el mismo regulador. Ambas celdas fueron incubadas a 34°C durante 10 minutos. Para iniciar la reacción se adicionaron 30 μ l de enzima a la celda de reacción y 30 μ l de H₂O destilada al testigo, se mezclaron y se registró el aumento en la absorbancia a 253 nm durante 10 minutos. El ΔE para BA-BAEE (benzoil arginina-benzoil arginina etil éster) es de 1071 M⁻¹ cm⁻¹.

Con HLPA se utilizó el metodo descrito por Folk y Schirmer (1963), que consiste en colocar en ambas celdas 980 μ l. de sustrato 1.0 mM de HLPA en 0.5 M de NaCl en un regulador Tris-HCl 0.05 M pH 7.0. Se dejaron incubar por 10 minutos a 34°C. Para iniciar la reacción se adicionaron 20 μ l H₂O destilada al testigo y 20 μ l de enzima a la otra celda. Se mezclaron y se midió el aumento en la absorbancia a 254 nm durante 10 minutos.

Con BAPNA el método empleado fue el de Fink, Schieasler, Arnhold y Fritz (1972). En este caso las celdas contenía 645 μ l de regulador Tris-HCl 0.05 M, pH 7.0 y 350 μ l de sustrato 6.0 mM de BAPNA en agua destilada, las cuales se incubaron a 34°C durante 10 minutos. Posteriormente se añadió 50 μ l de agua destilada a la celda testigo y 50 μ l de enzima a la otra celda y se midió el cambio de absorbancia a 405 nm.

Con N- α -CBZ-Lisina p-Nitrofenil éster, el método que se utilizó fue el de Silvestrin (1974). Las celdas contenían 975 μ l de regulador de acetato 10.0 mM, pH 4.6 más 25 μ l de sustrato 15.0 mM que estaba

disuelto en una mezcla acetonitrilo-agua (8:2). Se incubó a 25°C durante 10 minutos y después se adicionó al testigo 25 µl de la mezcla acetonitrilo-agua y en la otra celda 25 µl de enzima, en este caso se midió el aumento en la absorbancia a 340 nm. durante 10 minutos.

Pruebas de Inhibición.

Algunas sustancias añadidas a una solución que contiene una enzima y su sustrato producen una disminución de la acción catalítica de la enzima, que puede llegar a anularse. A estas sustancias se les denomina inhibidores de la acción enzimática.

Se probaron inhibidores específicos para diferentes tipos de proteasas: para las tiólicas se usó el acetato fenil mercurico, para serfínicas el fluoruro de fenil metil sulfonilo y para metaloproteasas el ácido etilendiamino tetracético (EDTA) y 1,10 fenantrolina. La proteasa de la esponja se sometió a estos agentes para tratar de determinar cual de ellos inhibía su actividad sobre cuero-azul como ya se ha descrito.

El método consistió en preparar por separado: acetato fenil mercurico 0.1 mM, 1,10 fenantrolina 0.1 mM; EDTA 10.0 mM; y fluoruro de fenil metil sulfonilo 10.0 mM, en regulador Tris-HCl 0.05 M con 0.3 M de NaCl pH 7.0. Se toman 1.9 ml del regulador con el inhibidor y se añadió 0.1 ml de la proteasa de esponja. El testigo se preparó de la misma manera, pero en lugar de añadirle 0.1 ml de enzima, se le adicionó 0.1 ml del regulador con el inhibidor.

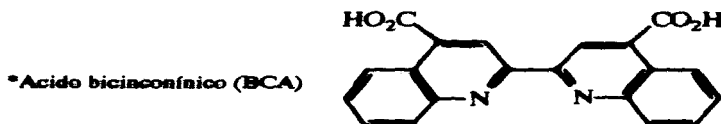
La reacción se llevó a cabo a 37°C durante 3 horas, después de los cuales se midió absorbancia a 600 nm. La actividad se expresa como la diferencia de absorción entre el problema y el testigo.

Pruebas de Inhibición con Sustratos Sintéticos (BAEE).

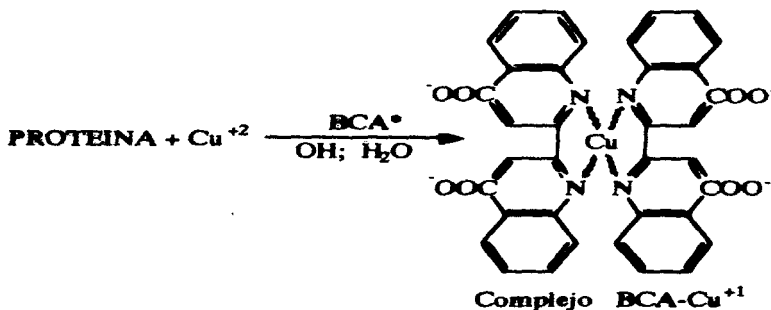
El sustrato que se utilizó fue BAEE y se siguió la misma técnica que se usó para la determinación de actividad de esterasa, con la excepción de que el regulador HEPES contenía los inhibidores 1,10 fenantrolina o EDTA en una concentración de 0.1 mM y 15.0 mM respectivamente. La proteasa de esponja se incubó con el inhibidor respectivo durante 60 minutos. Posteriormente se determinó si había actividad midiendo el aumento de absorción a 253 nm durante 5 minutos.

Cuantificación de Proteína.

Para este fin se utilizó el reactivo BCA* Protein Assay Reagent de acuerdo el método de Smith, *et al.* (1965), el cual se describe a continuación.



Este reactivo es muy sensible para la determinación espectrofotométrica de la concentración de proteína en soluciones acuosas. El método combina la reacción de Biuret (la proteína reacciona con Cu^{2+} en un medio alcalino para producir Cu^{+}). Con las características del BCA



el color púrpura del producto de la reacción es formado por la interacción de dos moléculas de BCA con una del ión cuproso Cu^{+} . Este es soluble en agua y presenta una fuerte absorción a 562 nm.

El reactivo comercial (Pierce) consta de las siguientes soluciones:

Procedimiento: a 2.0 ml de reactivo C se le adicionan 0.1 ml de solución conteniendo 20-1200 μg de proteína, después se incuba a 37°C durante 30 minutos. Finalmente se lee la absorbancia a 562 nm contra un blanco de reactivos.

La cantidad de proteína contenida en la muestra se determina interpolando el dato de absorbancia en una curva tipo elaborada con estándares de albúmina de bovino a diferentes concentraciones (Fig. 3b).

Coefficiente de Extinción.

Este se determinó de la siguiente manera. A una muestra de la proteasa perfectamente dializada contra agua destilada se le determinó el contenido de proteína de acuerdo al método descrito anteriormente. Paralelamente a esto se le midió A_{280} nm. Para calcular el coeficiente de extinción se ocupó la siguiente relación:

$$E^{1\%}_{280} = A_{280} / [c][l]$$

Donde:

$E^{1\%}_{280}$ = coeficiente de extinción a 280 nm

c = concentración de proteína en mg/ml

l = longitud del paso de luz en cm

Determinación del Peso Molecular.

El peso molecular de la proteasa de *Sphaerospongia vesparis* se determinó por electroforesis en microgeles de SDS-poliacrilamida (0.45X43X50 mm) con gradiente de 8-25% a 250 V, 10 mA y 15°C. Se utilizaron patrones con pesos moleculares conocidos desde 14,400 hasta 94,000 daltones (Pharmacia electrophoresis calibration kit). El procedimiento para fijar, teñir y destañar es el descrito por Neuhoff, *et al.* (1985). La absorción y posición de las bandas se leyó en un densitómetro laser LKB 2202 Ultra Scan, con el fin de lograr una apreciación más exacta de los resultados. Para construir una curva de calibración, se trazó el logaritmo de peso molecular contra el logaritmo de la movilidad relativa Fig. 4.

Curva de calibración para la determinación del peso molecular (Lambin, *et al.* 1976). Los patrones utilizados fueron: Fosforilasa b (94,000), Albúmina de bovino (67,000), Ovoalbúmina (43,000), Anhidrasa carbónica (30,000), Inhibidor de tripsina de frijol de soya (20,100) y α -lactalbumina (14,400).

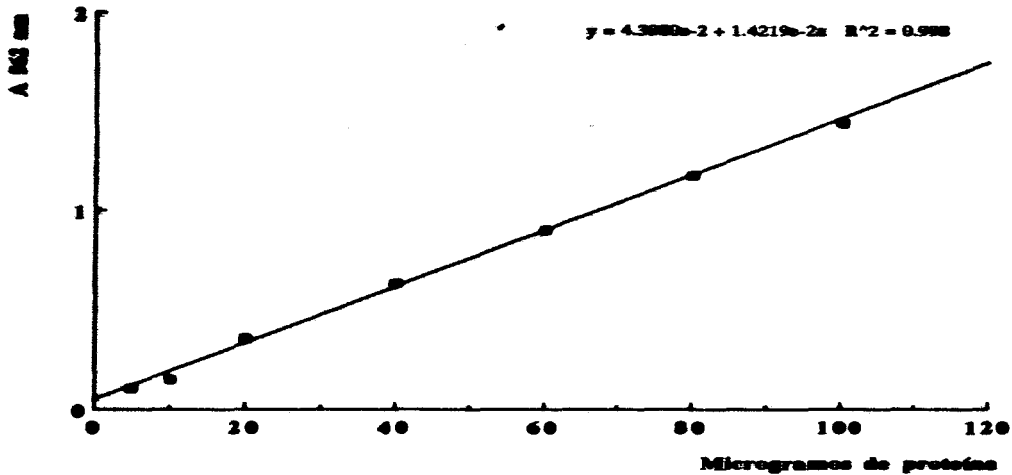


Fig. 3b Curva de calibración para la determinación de la concentración de proteína. (patrón utilizando la albúmina de bovino).

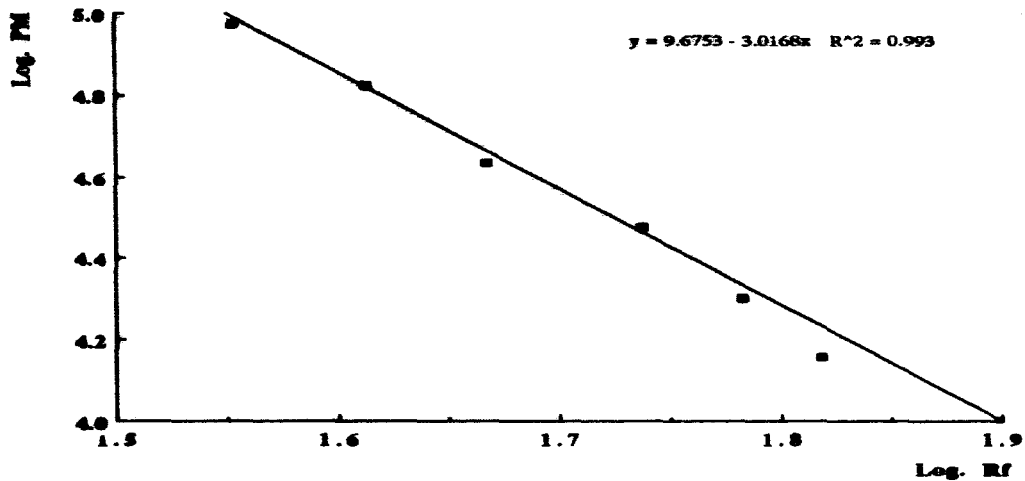


Fig. 4 Curva de calibración para la determinación del peso molecular.

Enfoque Isoeléctrico.

La proteasa se sometió a enfoque isoelectrico en microplacas (0.35X0.43X50 mm) con gradiente de pH de 3-9, en un Phast System de Pharmacia. Se utilizó el kit de calibración de puntos isoelectricos de Pharmacia para obtener la curva patrón, graficando el pH contra la movilidad relativa de las proteínas. Fig. 5.

Los patrones que se utilizaron fueron: Amiloglucosidasa (3.50), Inhibidor de tripsina de frijol de soya (4.55), B-lactoglobulina A (5.20), Anhidrasa carbónica de bovino B (5.85), Anhidrasa carbónica de humano B (6.55), Mioglobina de caballo ácida (6.85), Mioglobina de caballo básica (7.35), Lectina de lenteja ácida (8.15), Lectina de lenteja neutra (8.45), Lectina de lenteja básica (8.65), Tripsinógeno (9.30).

Dicroísmo Circular

Algunos métodos que aportan información estructural global de las proteínas son la dispersión rotatoria óptica (DRO) y el dicroísmo circular (DC). La estructura secundaria de una proteína se puede determinar por dicroísmo circular. El aparato que se utiliza para realizar éstos estudios es un espectropolarímetro, que permite utilizar radiación electromagnética en el intervalo de longitudes de onda de 180 a 700 nm.

Los espectros de dicroísmo circular fueron hechos a 25°C en un espectropolarímetro JASCO J-500A, el cual se calibró con ácido (+)-10-camforsulfónico (Cassim, *et al.* 1969). Los experimentos se realizaron con soluciones de 0.12 a 0.14 mg/ml en una celda de 1 mm para la región del ultravioleta (UV) lejano (183-260 nm). Las muestras usadas para los espectros de dicroísmo circular fueron las que se obtuvieron de las recirculaciones de la cromatografía de alta resolución y las cuales fueron dializadas contra un regulador de fosfatos 0.01 M, pH 7.0.

La concentración de la muestra se determinó por absorción de luz, utilizando el coeficiente de extinción ($A^{1\%}_{1\text{cm}}$). La elipticidad por residuo medio, $[\theta]$, se calculó utilizando una masa molecular de 110 g mol⁻¹ por residuo, de acuerdo a la relación:

$$[\theta] = 100 \cdot \theta / C \cdot l \text{ (grados cm}^2 \text{ / decimol).}$$

Donde:

$[\theta]$ =	elipticidad molar por residuo	C =	concentración molar de residuos
θ =	elipticidad	l =	longitud de recorrido óptico, en cm

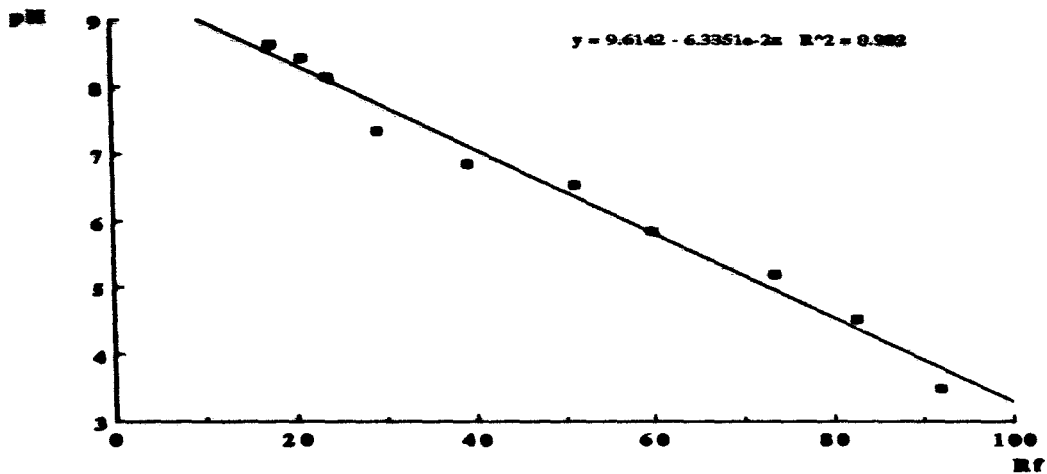


Fig. 5 Curva de calibración para determinar el punto isoeléctrico

RESULTADOS Y DISCUSION.

PURIFICACION DE LA ENZIMA PROTEOLITICA.

El extracto obtenido después de la precipitación con sulfato de amonio, como se describe en la sección anterior, y donde se encontró la actividad proteolítica, se aplicó a una columna de filtración en gel. El perfil de elución se muestra en la figura 6A en donde se observan varios componentes a los que se les probó actividad proteolítica sobre caseína por el método de Kunitz (1947) y sobre caseína-azul por el método de Rinderknecht (1968). La actividad se encontró en el pico (IV); esta fracción fue recirculada en la misma columna obteniéndose un pico único simétrico (Fig. 6B). A partir de esta fracción se continuó la purificación y caracterización.

La fracción anterior, concentrada y dializada, se aplicó a una columna de interacción hidrofóbica Octil-Sepharose CL-4B. En la figura 7 se observa el patrón de elución el cual muestra 2 bandas, la primera que contiene material que no se une y la segunda que es fuertemente retenida en la columna. La actividad se encontró en el segundo pico, lo que sugiere que la superficie de la enzima es bastante hidrofóbica. Esta fracción activa se dializó y concentró para someterla a cromatografía de intercambio aniónico en un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En el patrón de elución (figura 8) se observan 6 picos principales, de los cuales solo el tercero presentó actividad proteolítica, con un volumen de 4.2 ml, conteniendo 0.92 mg en total. La fracción con actividad se recirculó en varias inyecciones de 1.0 ml. El perfil de elución se observa en la figura 9 y muestra nuevamente el pico con un pequeño hombro. Al someter este pico a electroforesis en microplacas de poliacrilamida-SDS, como se describe en Materiales y Métodos, se observaron 3 bandas. Por consiguiente se procedió a realizar una tercera recirculación pero modificando el gradiente de NaCl (0.02 M/min), y colectando fracciones más pequeñas. Finalmente se obtuvo un pico simétrico como se observa en la figura 10, indicando que la proteasa estaba adecuadamente purificada. En la tabla I se resumen los resultados de la purificación.

Criterios de Puresa.

Con el propósito de comprobar la homogeneidad de la fracción del último paso de

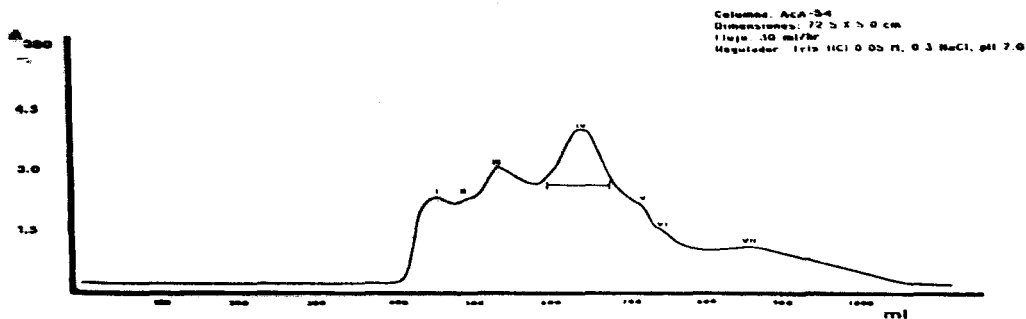


FIG. 6A CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR EN AcA-54.

El extracto dializado con actividad proteolítica se aplicó a la columna de Ultrogel AcA-54. La velocidad de esta cromatografía fue de 30 ml/hr y se colectaron fracciones de 10 ml por tubo. La actividad se encontró en el pico IV.

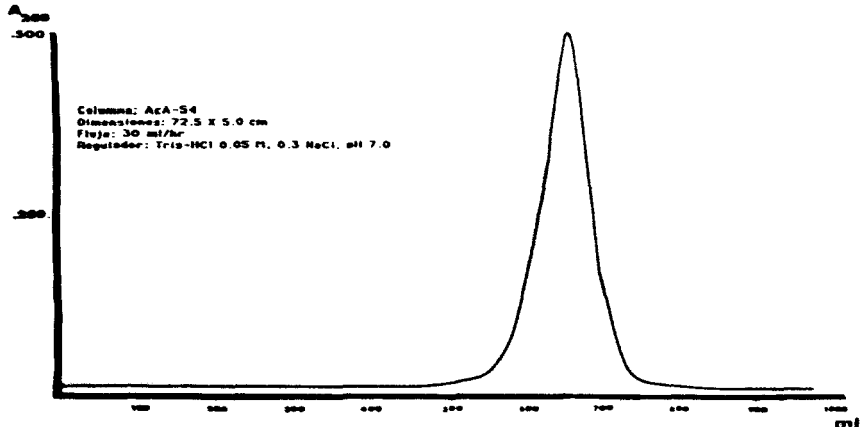


FIG. 6B RECIRCULACIÓN DEL PICO IV EN LAS MISMAS CONDICIONES.

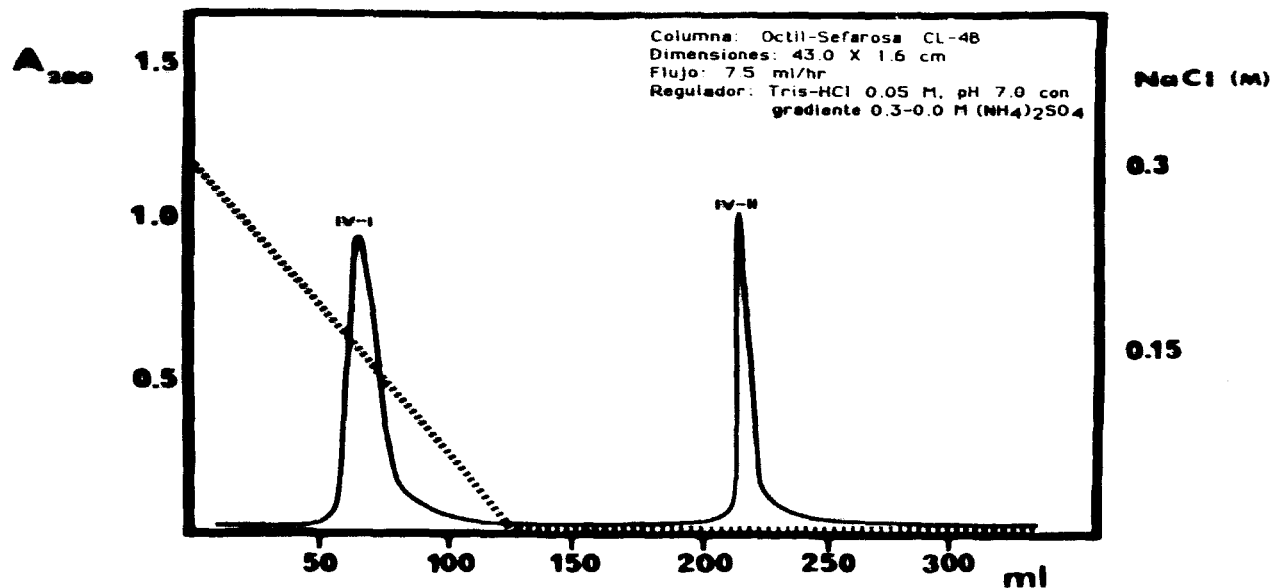


FIG. 7 CROMATOGRFÍA DE INTERACCIÓN HIDRFÓBICA.

El pico IV se aplicó a una columna hidrofóbica de octil-sepharose CL-4B. La velocidad de esta cromatografía fue 7.5 ml/hr y se colectaron fracciones de 2.5 ml por tubo. Se eluyó por medio de un gradiente de sulfato de amonio (0.3-0.0). La actividad de la proteasa se encontró en el pico II, que es fuertemente retenido en la columna. La línea punteada corresponde al gradiente de NaCl.

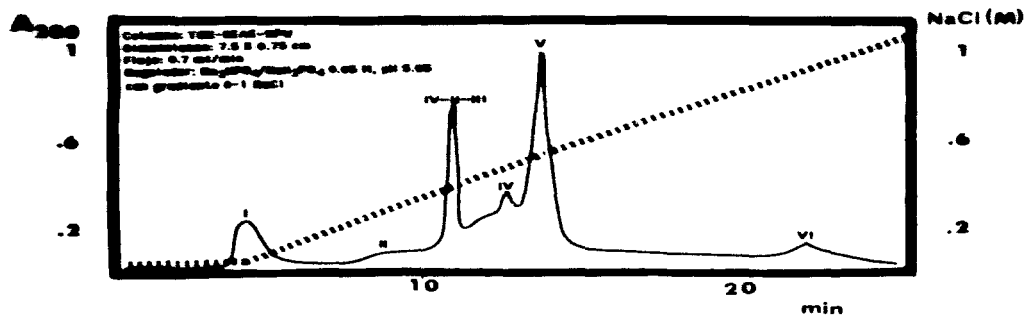


FIG. 8 CROMATOGRFIA DE INTERCAMBIO IÓNICO DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)¹

Se aplicó una muestra de la fracción (IV.II). El perfil de elución muestra 6 picos principales, pero sólo el pico III presentó actividad proteolítica. La muestra se eluyó en un gradiente de NaCl (0.04M/min). La línea punteada representa el gradiente.

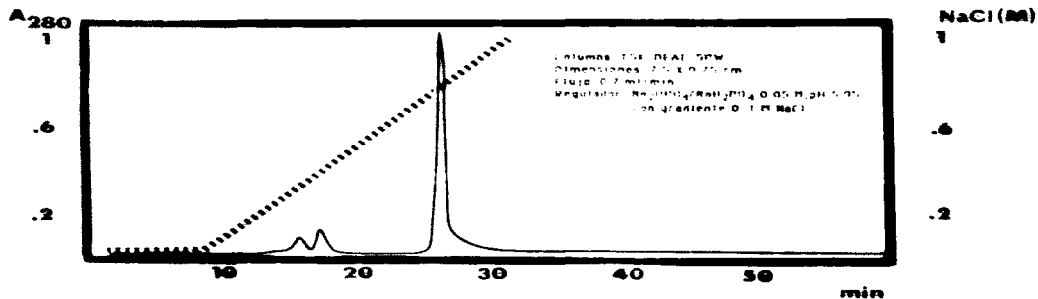


FIG. 9 CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)²

La fracción (IV.II.III) se recirculó en la misma columna, pero modificando el gradiente de NaCl (0.03 M/min). En este perfil se observa la fracción conteniendo la actividad proteolítica. La línea punteada representa el gradiente de NaCl.

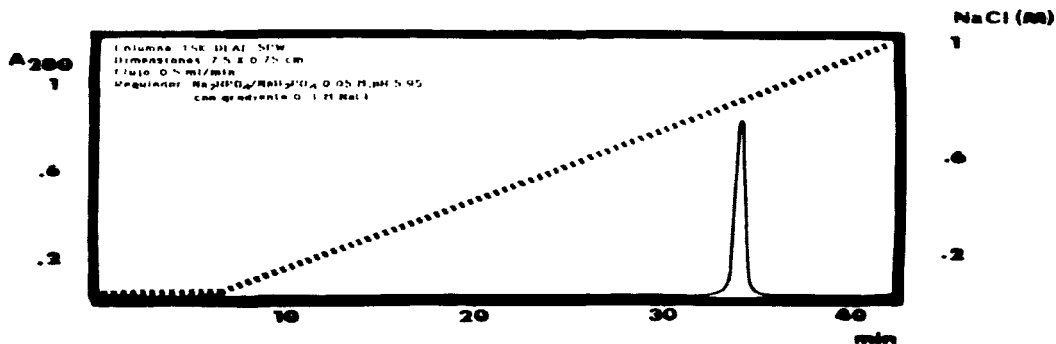


FIG. 10 CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)³

La fracción principal de la segunda recirculación de HPLC se sometió nuevamente a cromatografía de intercambio iónico en las mismas condiciones, pero modificando el gradiente de NaCl (0.02 M/min).

TABLA I

Fración	Volumen (ml)	Actividad (U/ml)	^a Unidades Totales	Proteína (mg/ml)	Pureza (U/mg)	^b Rendimiento (%)	^c Purificación
Extracto obtenido a partir de 500 g. de esponja húmeda. (Peso seco 88.5 g)	540	3.42×10^{-2}	18.5	2.14	0.016	100	1
Precipitación con sulfato de amonio (0-50% de saturación)	75	5.51×10^{-2}	4.1	2.93	0.019	22	1.2
Columna de Ultropel AcA-54	60	4.39×10^{-2}	2.6	0.316	0.14	14	9.0
Columna Hidrofóbica Octil-Sepharose CL-4B	22	10.30×10^{-2}	2.3	0.109	0.94	12.4	59
¹ Columna TSK DEAE-5PW HPLC	4.0	No se determino	No se determino	0.230	No se determino	No se determino	No se determino
³ Columna TSK DEAE-5PW HPLC	1.0	5.22×10^{-1}	0.52	0.208	2.51	2.10	157

¹ primer HPLC

³ tercer HPLC

^a Una unidad es la cantidad de enzima que causa un incremento de 1 (A₂₈₀) en un min. a 37°C.

^b El valor de Unidades Totales (18.5) como el 100%.

^c Obtenido de U/mg (0.016) como 1.

Por cada kilogramo de esponja se obtienen 0.42 mg. (por cada Kg. de esponja seca se obtienen 2.35 mg) de la proteína de interés. El bajo rendimiento que se obtiene al precipitar con sulfato de amonio de 0-50%, posiblemente se debe a que una parte de la proteína no se precipita a esta concentración y por otra, que una cierta cantidad pudiera quedar inactivada por el tratamiento.

purificación, que contenía la actividad, se procedió a someterla a técnicas electroforéticas. En la figura 11 se presenta la fotografía del gel de electroforesis en poliacrilamida en donde se observa una sola banda y en la figura 12 la fotografía del gel de electroforesis en SDS-poliacrilamida donde también se observa una sola banda. Según estos criterios, aparentemente se había logrado separar la pequeña contaminación presente, la cual producía un pico ligeramente asimétrico. A partir de esta fracción se iniciaron los estudios de caracterización.

CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEASA.

Determinación del Peso Molecular.

Al determinar el peso molecular de la proteasa pura, en microgeles de SDS-poliacrilamida con gradiente de 8-25% se obtuvo un valor de 27,700 daltones. Comparando este valor con otras enzimas como la quimotripsina (25,000 daltones), Kallikreina A (27,000 daltones), carboxipeptidasa de Krill (27,000 daltones), trombina B (28,000 daltones) y la termolisina (37,500 daltones), podemos decir que cae dentro del promedio de proteasas de origen vegetal y animal.

Coefficiente de Extinción.

La cantidad de proteína en la fracción final se determinaron por el método de cuantificación de proteínas de BCA. En este caso se utilizaron muestras filtradas por membrana Millipore con un diámetro de poro 0.45 μ . La proteasa tenía una concentración 0.208 mg/ml y una lectura de absorción a 280 nm de 0.300, por lo tanto el valor del coeficiente de extinción fue 1.44 para la proteasa purificada.

Este valor se utilizó en los experimentos subsiguientes para estimar la cantidad de proteína en las muestras.

Actividad Proteolítica.

Una vez purificada la proteasa, se determinó la actividad sobre caseína y caseína-azuro utilizando los métodos de Kunitz (1947), modificado por Sgarbieri (1963) y el de Rindertmecht

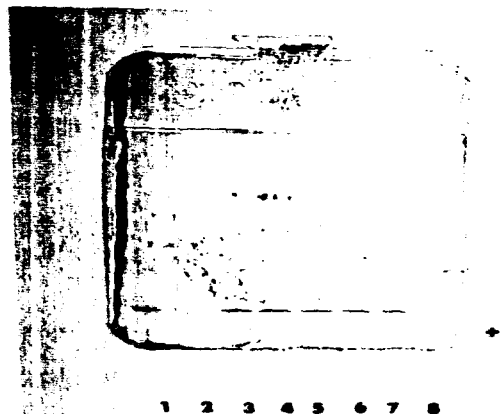


FIG. 11 ELECTROFORESIS EN MICROGELES DE POLIACRILAMIDA DE 12.5% . Los carriles 1,3,4,5,6 y 7 contienen la proteasa pura.

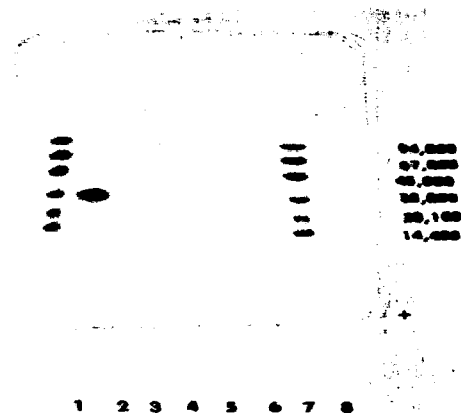


FIG. 12 ELECTROFORESIS EN MICROGELES DE SDS-POLIACRILAMIDA CON GRADIENTE DE 8-25%, PARA DETERMINAR EL PESO MOLECULAR DE LA PROTEINA. Los carriles 1 y 7 son los patrones y el 2,3,4 y 5 es la proteasa pura a diferentes concentraciones.

et al. (1968) respectivamente. La actividad específica se calculó mediante la siguiente relación:

$$\text{Actividad específica} = \frac{A_{280}}{T \text{ min} \times \text{mg proteína}}$$

Los mg. de proteína se calcularon empleando un coeficiente de extinción de 1.44.

En la tabla II se muestran los resultados de la actividad sobre caseína y cuero-azul, que se obtuvieron en las diferentes etapas de la purificación.

Los valores obtenidos de actividad específica en los dos métodos empleados son comparables entre sí, pero confrontando con otras proteasas que han sido reportadas en la literatura como se muestra en la tabla III, se observa que la actividad específica no es muy alta. Esto sugiere que posiblemente la enzima de esponja sea una proteasa del tipo exopeptidasa por la baja actividad que presenta sobre éstos sustratos.

Determinación del Punto Isoeléctrico

Al determinar el punto isoeléctrico de la enzima en microplacas (gradiente de pH 3-9) se observaron dos bandas con puntos isoeléctricos muy cercanos entre sí 4.15 y 4.22 (Fig 13). Esto nos permite suponer que esta enzima está compuesta por dos formas moleculares muy similares, ésta misma situación se ha observado para la carboxipeptidasa de Krill, donde se observaron 2 formas moleculares también, Knut, *et al.* (1965).

Con el advenimiento de nuevas técnicas experimentales se ha logrado demostrar que muchas enzimas que se reportaban como únicas, estaban constituidas realmente por formas moleculares múltiples. Kramer y Whitaker (1969) propusieron las teorías basadas en estudios de origen genético y no genético, para explicar el polimorfismo molecular.

Las diferencias apreciables en las características de las formas moleculares pueden ser el resultado de variaciones de origen genético en la composición de aminoácidos que modifican las propiedades físicoquímicas de la proteasa.

Determinación de la Actividad Sobre Diferentes Sustratos Sintéticos

Se utilizaron 4 sustratos y los resultados se muestran en la tabla IV.

TABLA II

Fracción	Actividad Especifica sobre cuero-azure (U/mg)	Actividad Especifica sobre caseína (U/mg)
Extracto Crudo	0.004	0.016
Precipitado obtenido al llevar a 50 % de saturación con sulfato de amonio y redisolto en agua	0.006	0.019
Columna de Ultragel ACA-54	0.080	0.14
Columna Hidrofóbica Octil Sepharose CL-4B	0.192	0.94
¹ Columna TSK DEAE-5PW HPLC	No se determinó	No se determinó
³ Columna TSK DEAE-5PW HPLC	0.285	2.51

1 primer HPLC

3 tercer HPLC

TABLA III

Enzima	Actividad Proteolítica Especifica sobre caseína U/mg.	REFERENCIA
Hemisfericina	3.03	Garduño <i>et al</i> , 1974 .
Papaína	2.14	Jones <i>et al</i> , 1970
Quimopapaína II	1.27	Solis-Mendiola <i>et al</i> , 1989
Kallikreína	0.650	Kutzbach <i>et al</i> , 1972
Procesa de Esponja	0.251	En este trabajo

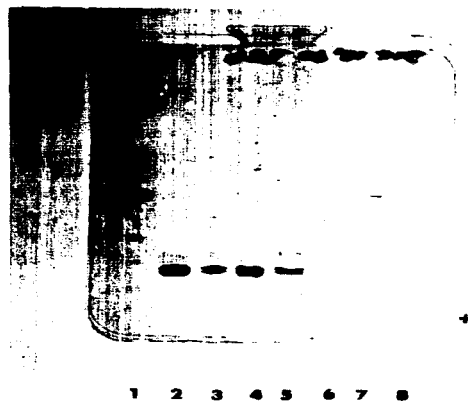


FIG. 13 ENFOQUE ISOELECTRICO EN MICROPLACAS CON GRADIENTE DE pH 3-9.

Los carriles 1 y 7 se observan los patrones y el 2,3,4 y 5 es la proteasa pura obtenida de la tercera recirculación de HPLC.

TABLA IV

Sustrato	Reacción observada
BAEE	+++
HPLA	++
LAPNA	--
N- α -CBZ-Lisina p-nitrofenilester	--

+ prueba positiva

- prueba negativa

La mayor actividad enzimática se observó cuando la proteasa de esponja actuó sobre BAEE, el cual es un éster de un aminoácido básico.

Con el fin de comparar la actividad esterolítica de esta proteasa con otras enzimas similares, se determinó la constante de Michaelis (K_m) utilizando BAEE como sustrato, ya que fué el que dio mejores resultados.

Con concentraciones de sustrato de 0.05 a 1.0 mM se obtuvieron valores de velocidad entre 2.8×10^{-8} y 14.9×10^{-8} M seg^{-1} . No se probaron concentraciones más altas de sustrato por que presentó inhibición por el sustrato. El cálculo de la constante se hizo en forma comparativa empleando tres métodos estadísticos que están basados en formas lineales de la ecuación de Michaelis-Menten. Estos son: Lineweaver-Burk $1/V \propto 1/[S]$, Eadie Hofstee $V \propto V[S]$ y Augustinsson $[S]/V \propto [S]$. Los resultados del cálculo de K_m se muestran en la tabla V y se comparan estos valores con otras proteasas sobre el mismo sustrato.

La diferencia de los valores de K_m de la proteasa de esponja se debe a que en la curva de Lineweaver-Burk no distribuye los "puntos" de las diferentes observaciones apropiadamente, pero puede ayudar a detectar cualquier desviación tal como la inhibición por exceso de sustrato. Por otra parte, consideraciones estadísticas sugieren que se obtienen estimaciones más precisas al usar el método de Augustinsson, ya que en un intervalo determinado de concentración de sustrato, el peso relativo de $1/V$ varía por un factor de 80, mientras que el peso relativo de $[S]/V$ varía por un factor menor de 2, Wilkinson (1961).

Los valores de K_m de la proteasa purificada reflejan que tiene mucha afinidad por el BAEE, sin embargo los valores son más altos en la proteasa de esponja que en la arcaina que se obtiene del ocahuato.

TABLA V

ENZIMA	METODO EMPLEADO	K_m (mM)	V_{max} mM min⁻¹mg⁻¹	REFERENCIA
Proteasa de esponja	Lineweaver-Burk	1.10	1.021 X 10 ⁻⁴	Presente trabajo
Proteasa de esponja	Eadie Hofstee	0.61	6.376 X 10 ⁻⁵	" "
Proteasa de esponja	Augustinsson	0.60	6.273 X 10 ⁻⁵	" "
Aureoína		0.11		Cameron <i>et al.</i> 1971
Carboxipeptidasa C		0.42		Ihle <i>et al.</i> 1972
Catepsina B		1.34	5.666 X 10 ⁻⁶	Saellman, <i>et al.</i> 1969
Acelopina		17.7		Tablero <i>et al.</i> 1990
Papaína		23.0		Jones <i>et al.</i> 1970
Ficina E		27.0		Jones <i>et al.</i> 1970
Ficina B		30.0		Jones <i>et al.</i> 1970

Pruebas de Inhibición de la Actividad Proteolítica.

Los estudios de inhibición pueden dar cierta información acerca de la especificidad de una enzima, de la arquitectura física y química del sitio activo y del mecanismo cinético de la reacción. En este caso, se llevaron a cabo pruebas para tratar de identificar los grupos que participan en el sitio activo de la proteasa en estudio. Los agentes que se utilizaron como inhibidores de la actividad sobre cuero-azul [Rinderknecht, *et al.* (1968)] se presentan en la tabla VI.

Estos resultados muestran que los inhibidores EDTA y 1,10 fenantrolina inhiben por completo la actividad de la proteasa de esponja, lo que nos hace suponer que posiblemente se trate de una proteasa dependiente de algún metal.

Pruebas de Inhibición de la Actividad Esterolítica.

El sustrato que mejores resultados dió en las pruebas de actividad específica fue BABB, por lo que se utilizó en estos experimentos. Los inhibidores usados fueron 1,10 fenantrolina y EDTA, ya que estos inhibieron la actividad proteolítica. Los resultados se observan en la tabla VII.

Los resultados mostraron nuevamente que la actividad esterolítica era inhibida por estos compuestos lo que confirma que se trata de una metaloenzima.

La inhibición de la actividad enzimática causada por EDTA y 1,10 fenantrolina puede ser el resultado de dos procesos:

- a) Por la remoción de un cofactor que esté involucrado en la catalisis enzimática, o bien,
- b) por la separación de un ión metálico esencial para la estabilización estructural de la enzima.

Difratismo Circular

En la figura 14 se muestra el espectro de DC de la proteasa de esponja. La región comprendida es entre 183-260 nm (UV lejano), en la que el espectro de DC de una proteína es

TABLA VI

Inhibidores	Reacción observada
CH ₃ CO ₂ HgC ₆ H ₅	--
PMSF	--
EDTA	+++
1,10 Fenantrolina	+++

+ prueba positiva
- prueba negativa

TABLA VII

Proteasa de esponja	% de Actividad	Concentración del inhibidor (mM)
BAEE	100	0.0
BAEE +1,10-fenantrolina	0	0.1
BAEE +EDTA	0	15.0

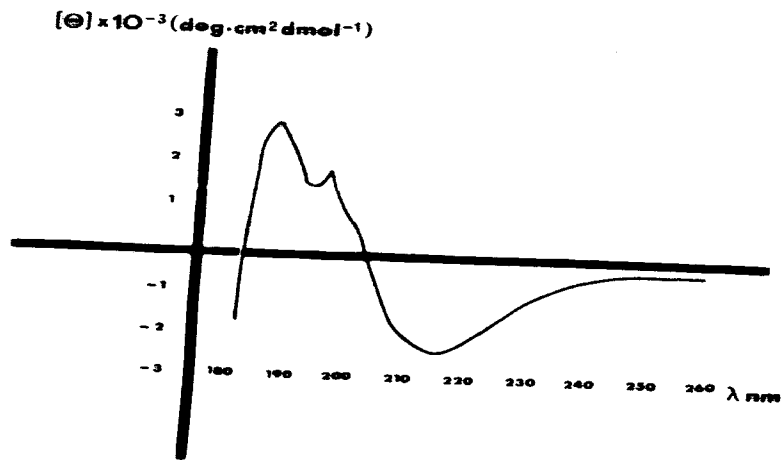


FIG. 14 ESPECTRO DE DICROISMO CIRCULAR DE LA PROTEASA DE ESPONJA EN LA REGION DEL UV-LEJANO (283-260 nm).

debido fundamentalmente a la conformación secundaria de su cadena polipeptídica (Hennessey, *et al.* 1981). Aún más, Manavalan y Johnson (1983) han propuesto que las características de la curva de DC de una proteína permiten establecer, en forma tentativa, el patrón de plegamiento de la macromolécula. Así, una proteína puede ser clasificada estructuralmente, dentro de una de las cuatro grandes clases ó familias: clase α ; clase β ; clase $\alpha+\beta$; y clase α/β , Levitt, *et al.* (1976).

Como puede observarse en la figura 14, en el caso de la proteasa estudiada en este trabajo la magnitud de la señal alcanza un mínimo en 214 nm. Se aprecia también que la elipticidad en los 220-222 nm. es ligeramente mayor (en valor absoluto) que en 210 nm.

De acuerdo con los criterios señalados por Manavalan y Johnson, estas características indican que la proteasa de esponja contiene cantidades apreciables de hojas β , probablemente en un arreglo de cadenas paralelas en su mayoría; esto es, dicha proteína parece pertenecer a la clase α/β , o bien a la clase β .

En la Tabla VIII se presentan los valores de elipticidad en 210 y 222 nm., correspondientes a los espectros de DC de la proteasa de esponja y de dos metaloproteasas (termolisina y carboxipeptidasa A).

TABLA VIII

Metaloproteasa	Posición de la banda en nm	$[\theta]$ deg. cm ² dmol ⁻¹	Referencia
Carboxipeptidasa A	222	-7000	Jirgenson, 1973.
	210	-9000	
Termolisina	222	-9000	Vita <i>et al.</i> 1979.
	210	-3125	
Proteasa de esponja	222	-3047	
	210	-3047	

El valor del cociente $[\theta]_{210} / [\theta]_{222}$ es menor que la unidad en el caso de la proteasa de esponja, mientras que en las dos metaloenzimas dicho cociente es mayor que la unidad. Esta comparación indica que la enzima aislada de *Sphaciospongia vesparia* no pertenece a la misma familia estructural de las otras dos metaloenzimas.

La degradación de proteínas por acción de las enzimas proteolíticas es sumamente importante para el conocimiento del metabolismo celular. Los cambios en calidad y cantidad de proteínas están íntimamente ligados con la diferenciación celular y con el desarrollo del organismo.

Todas las proteasas son intracelulares en alguna etapa de su existencia y algunas otras son sintetizadas para ser transportadas a espacios extracelulares (proteasas secretadas) que ejercen su acción fuera de las células, por ejemplo, las proteasas pancreáticas tripsina y quimotripsina, las del plasma que participan en la coagulación sanguínea, etc. Existen otras proteasas

intracelulares que actúan sobre proteínas internas o que son traídas a la célula por pinocitosis. Es posible que la proteasa aislada de esponja pertenece a este grupo, pues hay que desintegrar las células de esta Porifera para poder extraerla.

Sabemos que las enzimas proteolíticas rompen la unión peptídica de las proteínas y que un gran número de ellas catalizan una reacción diferente aunque relacionada, como lo es la hidrólisis de ésteres (reacción esterolítica). Este es el caso de la proteasa de esponja.

La degradación de proteínas intracelulares en sus componentes básicos como son aminoácidos o péptidos pequeños, es en parte determinada por las características estructurales del complejo proteína-sustrato. Evidencia reciente indica que tanto el residuo del amino terminal y secuencias específicas de aminoácidos juegan un papel importante para determinar la estabilidad de las proteínas propias de la célula; es decir, que no sean tan susceptibles a ser degradadas Bond, *et al.* (1987). Así un sistema proteolítico en algunos casos debe de reconocer y degradar a las proteínas marcadas como vulnerables.

La enzima obtenida de *S. vesparia* creemos que debe de participar en el metabolismo de la digestión del organismo que la contiene por lo siguiente:

La esponja es un organismo heterótrofo filtrante que aprovecha los alimentos que le llegan sin poder hacer una selección de los mismos. También sabemos (pruebas preliminares) que poseen una amilasa para aprovechar los polisacáridos y no sería aventurado pensar en lipasas, etc. Todas ellas en conjunto podrían constituir los sistemas enzimáticos hidrolíticos y digestivos de las esponjas.

La proteasa aislada es la primera enzima obtenida en forma pura de una esponja, la cual para su acción catalítica requiere estar asociada a un metal, por lo tanto es otro miembro del grupo de las metaloproteasas. Se conocen metaloproteasas asociadas a calcio y zinc, tales como la carboxipeptidasa A y B, la aminopeptidasa, etc., todas ellas como exopeptidasas. Otras como la termolisina que actúa sobre sustratos no específicos y la collagenasa de mamífero que requiere para poder actuar de un sustrato muy específico. Las collagenasas son metaloproteinasas que en su mayoría se sintetizan como zimógenos y necesitan de una modificación para activarse; esto es, remover mediante la acción de enzimas proteolíticas un fragmento de la cadena polipeptídica, por ejemplo de la procollagenasa de la piel humana se necesitan remover 81 aminoácidos de la porción del amino terminal, Grant, *et al.* (1987) y un rompimiento adicional de aproximadamente 15 residuos de aminoácidos del carboxilo terminal para convertirla en una enzima activa, He, *et al.* (1989). Se sabe que las collagenasas están involucradas en la síntesis y degradación de diferentes macromoléculas de la matriz extracelular, Selman, *et al.* (1991). La acción de las collagenasas sobre los diferentes tipos de colágena es muy específico, por ejemplo: rompen el enlace peptídico glicina-isoleucina (colágena tipo I y II) y glicina-leucina (colágena tipo III). La esponja presenta espongina la cual es un tipo de colágena que se encuentra como matriz

extracelular para darle cierta rigidez al esqueleto. Pudiera pensarse que la metaloproteasa de esponja podría actuar sobre este tipo de colágena, sin embargo, no hay evidencias de que las colagenasas dependientes de algún metal actúen sobre sustratos sintéticos como el benzoin arginina etil éster.

Por otra parte nuestra proteasa actúa sobre diversos tipos de sustratos proteicos (caseína y cuero-asure), así como sustratos sintéticos (BAEE y HLPA), por lo tanto, la proteasa puede ejercer su acción sobre diferentes sustratos y no sobre sustratos específicos.

Otra metaloproteínasa es la estromelina que es una endopeptidasa neutra la cual es secretada como proenzima y actúa en la remodelación de tejidos normales Murphy, *et al.* (1981). Esta enzima degrada proteoglicanos (proteoglicanasa), colágena denaturalizada o gelatina y caseína; en este último caso requiere ser activada con tripsina (10 mg/ml) o con compuestos organomercuriales para transformarla en su forma ejecutante. Las que degradan proteoglicanos y caseína presentan un peso molecular bajo Cawton, *et al.* (1981), en cambio las que actúan sobre gelatina tienen un peso molecular alto Sapolsky, *et al.* (1981). La actividad de la estromelina es inhibida por 1,10 fenantrolina y EDTA, pero no es inhibida por PMSF. En su forma activa presenta 2 formas moleculares con puntos isoeléctricos de 6.05 y 6.4, con un peso molecular de 41,000 daltones.

Algunas de estas características son similares a las de la proteasa de esponja, sin embargo, esta última no necesita ser activada para que actúe sobre caseína, además las 2 formas moleculares tienen puntos isoeléctricos ácidos (4.15 y 4.22). No es posible excluir o descartar la posibilidad de que esta proteasa tenga una función en la degradación de proteínas estructurales de la matriz extracelular o una relación con los mecanismos de diferenciación celular para diversificar sus funciones metabólicas.

El curso que deben tomar las investigaciones sobre la proteasa en estudio es tratar de determinar que tipo de metal está presente o interactuando en la molécula, para esto se tienen que realizar análisis por espectroscopía de absorción atómica. También se debe intentar el aislamiento de las dos formas moleculares y llevar a cabo estudios conformacionales y estructurales de cada una de ellas con el fin de establecer alguna diferencia. Paralelamente se deben efectuar estudios de composición y secuenciación de aminoácidos para profundizar en aspectos estructurales y comparar con otras metaloproteasas. Asimismo se debe evaluar la capacidad antimicrobiana de esta proteasa con algunas cepas de microorganismos inofensivos y al final sobre patógenos.

Finalmente podemos decir que es clara la necesidad que existe de continuar con estos estudios, puesto que ya tenemos una metodología que puede aplicarse al aislamiento y purificación de otras proteínas y enzimas y profundizar más en el conocimiento de estos organismos.

CONCLUSIONES.

De los resultados descritos anteriormente, podemos concluir lo siguiente:

1. Encontramos actividad proteolítica y amilolítica en un extracto de la esponja *Sphacelospongia vesparia*, enfocándonos únicamente al estudio de la proteasa.
2. Los criterios de pureza, tanto en electroforesis convencional como en electroforesis en SDS, indican que la proteasa es homogénea. Asimismo se determinó un peso molecular de 27,700 mediante electroforesis con SDS.
3. Los resultados del enfoque isoeléctrico nos señalan la presencia de dos bandas con puntos isoeléctricos de 4.15 y 4.22, por lo que podemos decir que la proteasa está constituida por dos formas moleculares. La presencia de dos o más formas moleculares ha sido demostrada para un número muy grande de enzimas.
4. Presentó actividad sobre sustratos proteicos y sobre sustratos sintéticos, principalmente sobre α -N-benzoil-L-arginina etil éster para el cual presenta un valor de Km bajo.
5. Las actividades proteolítica y esterolítica fueron inhibidas por agentes quelantes como lo son la 1,10-fenantrolina y el EDTA, lo que permite suponer que la proteasa sea dependiente de algún ion metálico; esto es, que pertenezca al grupo de las metaloproteasas.
6. Los estudios de dicroísmo circular indican que la proteasa de esponja posiblemente pertenezca al grupo de proteínas de la clase α/β o bien de la clase β .

BIBLIOGRAFIA

- Agrall, I. 1952. Enzymes and cell differentiation in sponges. *Arkiv Zool.* (2) 3: 325.
- Arreguín, B. y Tebeada, J. 1968. Un aparato de diálisis continua. *Bol. Inst. Quim. UNAM*, 20: 95-97.
- Bakus, G.J., 1981. Chemical Defense Mechanisms and Fish Feeding Behavior on The Great Barrier Reef, Australia. *Science* 211: 497-499.
- Barnes, R. 1977. Zoología de los invertebrados. Nueva Editorial Interamericana. 3ª Edición.
- Baslow, M. H., 1969. *Marine pharmacology*. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. pp. 86-99.
- Bayliss, M. E., Wilkes, S. H. and Prescott, J. M. 1980. Aeromonas neutral proteases: specificity toward extended substrates. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 200: 214-219.
- Bergmann, W. and Feeney, R. T. 1950. The isolation of a new thymine pentoside from sponges. *J. Am. Chem. Soc.* 72: 2805.
- Bergquist, P. R., Lawson, M. P., Lavis, A. and Cambie, R. C. 1984. Fatty acid composition and the classification to the Porifera. *Biochemical Systematics and Ecology* 12: 63-84.
- Bergquist, R. P. 1978. Sponges. Hutchinson & Co. (publishers) printed in Great Britain. First published.
- Bond, J.S. and Butler, P. E. 1987. Intracellular proteases. *Ann. Rev. Biochem.* 56: 333-364.
- Burkholder, P. R. 1973. The ecology of marine antibiotics and coral reefs. *Biology and Geology of Coral Reefs*, vol. II, Biology I. Academic Press, Nueva York.
- Cameron, E.C. and Mazelis, M. 1971. A non proteolytic "Trypsin-like" enzyme. *Plant Physiol.* 48: 278-281.
- Casim, J. Y. and Yang, J. T. 1969. A computerized Calibration of the Circular Dichrometer. *Biochemistry* 8: 1947-1951.
- Cawston, T. E. Galloway, W. A., Mercer, E., Murphy, G., and Reynolda, J. J. 1981. Purification of rabbit bone inhibitor of collagenase. *Biochem J.* 198: 159-165.

- Cimino, G.; S. De Rosa; S. De Stefano; A. Spinella y G. Sodano. 1984. The Zoochrome of the Sponge *Verongia aerophoba*: Uranidine. *Tetrahedron Letters* **25** (27): 2925-2928.
- Cruz, M. T., Del Castillo, M. L., and Castañeda-Agulló, M. 1986. Proteinases of mexican plants XIII, time course of protein hidrolisis. *Rev. Latinoamer. Quim.* **16**: 160-162.
- Dawson, R. M., Elliott, D. C., Elliott, W. H., Jones, K. M. 1979. *Data for Biochemical Research*, edited by Oxford University Press, Second Edition.
- Engel, C. P. 1977. *Enzyme Kinetics*. Chapman and Hall Ltd., London. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Faulkner, D. J. 1984. Marine Natural Products: Metabolites of Marine Invertebrates. *Natural Products Report* I. **6**: 551-598.
- Fink, E., Schiessler H., Arnhold, M. and Fritz H. 1972. Hoppe-Seyler's *Z. Physiol. Chem.* **353**: 1633.
- Folk, J. E. and Schirmer E. W. 1963. The Porcine Pancreatic Carboxipeptidase A system. *J. Biol. Chem.* **238**: 3884-3894.
- Fukasawa, S., Aoki, S., Gawasawa, N. and Osumi, M. 1988. Purification an properties of a proteinase from a marine luminous bacterium, *Vibrio splendidus* strain FLE-2. *Agric. Biol. Chem.*, **52** (2): 427-433.
- García, M. E. 1964. *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koepen*. Inst. Geol. Univer. Nat. Autón. México, 44 p.
- Garduño, R., Soriano, M., Chávez, E., Cruz, M. T., Del Castillo, L. M., y Castañeda-Agulló, M. 1974. Proteinases de plantas mexicanas II. Puntos isoeléctricos y caracterización de formas moleculares multiples en enzimas de bromeliaceas. *Rev. Latinoamer. Quim.* **5**: 243-248.
- Gerrone R. and Bairati A. 1985. The Collagen of the Porifera. *Biology of Invertebrate and Lower Vertebrate Collagens*, Nato serie A, 93, Plenum Press, New York.
- Gómez López, P. y Green, G. 1984. Sistemática de las esponjas marinas de Puerto Morelos, Quintana Roo, México. *An. Inst. Cienc. del Mar y Limnol, Univ. Nat. Autón. México*, **11**(1): 65-90.
- Grant, G. A., Eisen, A. Z., Marmer, B. L., Roswit, W. T., and Goldberg, G. I. 1987. The activation of human skin fibroblast procollagenase. Sequence identification of the major conversion products. *J. Biol. Chem.* **262**: 5886.
- Green, G. 1977. Antibiosis in Marine Sponges. *Fao, Fisheries Report* **289**: 199-205.

- Green, G., 1977. Ecology of Toxicity in Marine Sponges. *Mar Biol.* **40**: 207-215.
- Hartley, B. V. 1960. "Proteolytic enzymes". *Annu Rev. Biochem.* **29**: 45.
- He, Ch., Wilhem, S. M., Pentland, A. P., Marmer, B. L., Grant, G. A., Eisen, A. Z. and Goldberg, G. I. 1989. Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**: 2632.
- Henkart, P., Humphreys, S., and Humphreys, T. 1973. Characterization of Sponge Aggregation Factor. A unique Proteoglycan Complex. *Biochemistry* **12**: 3045-3049.
- Hennessey, J. P. and Johnson, W. C. 1981. Information Content in the Circular Dichroism of Proteins. *Biochemistry* **20**: 1085-1094.
- Ihle, J. N. and Dure, L. S. 1972. Purification and properties of carboxipeptidase from germinating cotyledons. *J. Biol. Chem.* **247**: 5034-540.
- Jirgensons, B. 1973. *Optical Activity of Proteins and Other Macromolecules*, Springer-Verlag, second edition, New York, N.Y.
- Jones, K. I. and Glaser, N. A. 1970. Comparative studies on four Sulfhydryl Endopeptidases ("Ficins") of *ficus glabrata* latex. *J. Biol. Chem.*, **245**: 2765-2772.
- Kamiya, H., Muramoto, K., Hoshino, T. and Raj, U. 1985. Isolation and Characterization of Hemagglutinins from the Sponge *Dysidea herbacea*. *Experientia* **41**: 1201-1202.
- Kamiya, H., Muramoto, K., Hoshino, T., Yamazaki, M. and Raj, U. 1986. A Hemagglutinin in the Sponge *Phyllospongia foliascens*: Isolation and Characterization. *Bulletin for the Japanese Society of Scientific Fisheries* **52** (12): 2205.
- Kashman, Y., Groweiss, A. and Shmueli, U. Latrunculin. 1980. A new 2-thiazolidinone macrolide from the marine sponge *Latrunculia magnifica* *Tetrahedron Letters* **21**: 3629-3632.
- Kramer, D. E. and Withaker, J. R. 1969. "Multiple molecular forms of ficin evidence against autolysis as explanation". *Plant physiol.* **44**: 1560-1565.
- Krishnan, S., Vijayalakshmi, M. A., and Geahel, I. 1987. *Semi-preparative-scale isolation of carboxipeptidase isoenzymes from Aspergillus niger by a single metal chelate affinity chromatographic step*. Elsevier Science Publishers B.V., printed in the Netherlands, 339-346.
- Kunitz M. Crystalline Soybean Trypsin inhibitor. 1947. *J. Gen. physiol.* **30**: 291
- Kutzbach, C., and Schmidt-Kastner, G. 1972. Hoppe-Seyler's *Z. Physiol. Chem.* **383**: 1099.
- Lambin, P., Rochu, D. and Fine J. M. 1976. A new method for determination of molecular

- weights of proteins by electrophoresis across a sodium dodecyl sulfate (SDS)-Polyacrylamide Gradient Gel. *Anal. Biochem.* **76**: 567-575.
- Laubenfels, M. W. 1932. The marine and fresh water sponges of California, *Proc. U. S. natl. Mus.* **81**: 1-40.
- Lawson M. P., Bergquist P. R. and Cambie R. C. 1984. Fatty Acid Composition and Classification to the Porifera. *Biochemical Systematics and Ecology.* **12** (4): 375-393.
- Lehninger, A. L. 1982. Bioquímica. Omega. Barcelona, España.
- Levitt, M. and Chothia C. 1976. Structural patterns in globular proteins. *Nature*, **261**: 552-558.
- Manavalan, P. and Johnson, W.C. 1983. Sensitivity of circular dichroism to protein tertiary structure class. *Nature*, **305**: 831-832.
- Mebs, D., Weiler I. and Heinke H. F. 1985. Bioactive proteins from marine sponges: screening of sponge extracts for hemagglutinating, and isolation and characterization of hemagglutinins. *Toxicon* **23**: 955-962.
- Minale, L. 1976. Natural Product Chemistry of the Marine Sponges. *Pure & Appl. Chem.* **48**: 7-23.
- Misevic, G. N., Jumblatt, J. E. and Burger M. M., 1982. Cell binding fragment from sponge proteoglycan-like aggregation factor. *J. Biol. Chem.* **257**: 6931-6936.
- Murphy, g., Cawston, T.E., Galloway, W. A., Barnes, M. J., Bunning, R. A. D., Mercer, E., Reynolds, J. J. & Burgeson, R. E. 1981. Metalloproteinases from rabbit bone culture medium degrade types IV and V collagens, laminin and fibronectin. *Biochem J.* **199**: 807-811.
- Nakamura, H., Wu, H., Kobayashi, J., Nakamura, Y., and Ohizumi Y. 1985. Puralin, a novel enzyme activator from the okinawan marine sponge *Pseudamphysilis pura*. *Tetrahedron Letters* **26**: 4517-4520.
- Neuhoff, V., Stamm, R. and Eibl, H. 1985. Clear background and highly sensitive protein staining with coomassie blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. *Electrophoresis* **6**: 427-448.
- Oanes K. K. and Mohr V. 1986. On the purification and characterization of enopectidases from antarctic krill, *Euphausia superba*. *Comp. Biochem. Physiol.* **83B**, No. 2: 445-458.
- Randall, J. E. y Hertman, W. D. 1968. Sponge feeding fishes of the west indies. *Mar. Biol.* **1**: 216-225.
- Reiswig, H. M. 1970. Porifera: sudden sperm release by tropical Demospongiae. *Science*, **170**: 538-539.

- Rinderknecht, H., Geokas, M. C., Silverman, P. and Haverback, B. J. 1968. A new ultrasensitive method for the determination of proteolytic activity. *Clin. Chim. Acta.* 21: 197-203.
- Rinehart, K. L., Shaw, P. D., Shield, L. S., Gloer, J. B., Harbour, G. C., Koker, M. E. S., Samain, D., Schwartz, R. E., Tymiak, A. A., Weller, D. L., Carter, G. T., Munro, M. H. G., Hughes, R. G., Renis, H. E., Swinenberg, E. B., Stringfellow, D. A., Vavra, J. J., Coatus, J. H., Zurenko, G. E., Kuentzel, S. L., Li, L. H., Bakus, G. J., Brusca, R. C., Craft, L. L., Young, D. N. y Connor, J. L. 1981. Marine natural products as sources of antiviral, antimicrobial and antineoplastic agents. *Pure & Appl. Chem.* 53: 795-817.
- Sapolsky, A. I., Malemud, C. J., Norby, D. P., Moskowitz, R. W., Matsuta., and Howell, D.S. 1981. Neutral Proteinases from articular chondrocytes in culture. 2. Metal-dependent latent neutral proteoglycanase, and inhibitory activity. *Biochim. Biophys. Acta* 658: 138-147.
- Sara, M. y J. Vacelet. 1973. Ecologie des Démosponges. En: *Traité de Zoologie, Anatomie, Systematique, Biology: Spongiaires*, P. P. Grassé (Ed.) pp. 462-576, Masson Paris.
- Schmidt, I. 1970. Phagocytose et pinocytose chez les spongiillidae. *Z. Vergl. Physiol.*, 66: 398-420.
- Schmitz, F. J., 1978. Marine natural products: Halitoxin, a toxic complex of several marine sponges of the genus *Halictoma* . *J. Org. Chem.* 43: 3916-3922.
- Secretaría de Marina. 1974. *Atlas oceanográfico del Golfo de México y mar caribe*. Dir. Gral. de Oceanografía. y Señ. Mar. México: 7-8.
- Segel, H. I., 1976. *Biochemical calculations*, second edition. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Selman, M. L. and Barrico R. 1991. *Interstitial Pulmonary Diseases: Selected Topics*. CRC press. Printed in the United States.
- Sgarbieri, V. C., Grupte, S. M., Kramer, D. E. and Whitaker, J. R. 1964. "Ficus enzymes I. Separation of the proteolytic enzymes of *Ficus carica* and *Ficus glabrata latiosa*". *J. Biol Chem.* 239, 2170-2177.
- Sharma, G. M.; B. Vig y P. R. Burkholder. 1970. Antimicrobial Substances from Sponges. IV. Structure of a Bromine-containing Compound from a Marine Sponge. *J. Org. Chem.* 35 (8): 2823-2826.
- Silverstein, R. M., 1974. The assay fo the bromelains using N -CBZ-L-Lysine p-Nitrophenyl Ester and N-CBZ-L-Glycine p-Nitrophenyl Ester as Substrates. *Anal Biochem.* 62: 478-484.
- Smith, P. K., Krohn, R. L., Hermanson, G. T., Mallie, A. K., Garther, F. H., Provenzano, M. D.,

- Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C. 1985. Measure of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal Biochem.* **150**: 76-85.
- Snellman, O., 1969. Cathepsin B, the Lysosomal Thiol Proteinase of Calf Liver. *Biochem. J.*, **114**: 673. Solis-Mendiola, S., Zubillaga-Luna, R., Rojo-Domínguez, A. and Hernández-Arana, A. 1989. Structural similarity of chymopapain forms as indicated by circular dichroism. *Biochem. J.* **257**: 183-186.
- Spector, I. and Shochet, R. N. 1983. Latrunculins: Novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells. *Science* **219**: 493-495.
- Tablero, M., Arreguín R., Arreguín, B., Soriano, M., Sánchez, R.I., Rodríguez Romero, A. and Hernández-Arana, A. 1990. Purification and Characterization of Multiple forms of Asclepain g from *Asclepias glaucescens* H.B.K., *Plant Science*, 1991, en prensa.
- Varner, J. A., Burger M. M. and Kaufman J. F. 1988. Two cell surface proteins bind the sponge *Microciona prolifera* aggregation factor. *J. B. Chemistry* **263**: 8498-8508.
- Vita, C., Fontana, A., Secman, J.R. and Chaiken M.I. 1979. Conformational and immunochemical analysis of the cyanogen bromide fragments of thermolysin. *American Chemical Society*, **18**: 3023-3031.
- Walker, R. P.; J. E. Thompson y D. J. Faulkner 1980. Sesterterpenes from *Spongia idia*. *J. Org. Chem.* **45** (24): 4976-4979.
- Watson, J. D., 1965. *Molecular Biology of the Gene*. W. A. Benjamin, Inc., New York, New York.
- Whitaker, J. R. and Bender, M. L. 1965. Kinetics of Papain-Catalyzed Hidrolysis of a-N-Benzoyl-l-arginine Ethyl Ester and a-N-Benzoyl-l-argininamide. *Journal of the American Chemical Society.* **87**: 12.
- Wilkinson, G.N. 1961. Statistical estimations in enzyme kinetics. *J. Biochem.* **80**: 324-332.
- Woolly, R. W., 1977. *J. Plymer Sci. Macromolecular Review*, **12**: 181.