CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

Estudio del potencial bioactivo de las vísceras de abulón utilizando un modelo de digestión gastrointestinal *in vitro*

TESIS

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales

(Orientación en Biotecnología)

Presenta

Xolotl Paloma Ponce González

La Paz, Baja California Sur, Junio del 2015

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10:45 horas del día 28 del Mes de Mayo del 2015, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Estudio del potencial bioactivo de las vísceras de abulón utilizando un modelo de digestión gastrointestinal *in vitro*."

Presentada por el alumno:

Xolotl Paloma Ponce González

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Biotecnología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Dra Norma Yolanda Hernández Saavedra

Dra Maria Antonia Guzman Murillo

Dra Patricia Hernández Cortés

DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO Y FORMACIÓN DE RECURSOS HUMANOS

CONFORMACIÓN DEL COMITÉ

Director de tesis

Dra. Norma Y. Hernández Saavedra CIBNOR, Campus La Paz

Comité Tutorial

Dra. Martha Patricia Hernández Cortes CIBNOR, Campus La Paz

Dra. María Antonia Guzmán Murillo CIBNOR, Campus La Paz

Comité Revisor

Dra. Norma Y. Hernández Saavedra

Dra. Martha Patricia Hernández Cortes

Dra. María Antonia Guzmán Murillo

Jurado de Exámen de Grado

Dra. Norma Y. Hernández Saavedra

Dra. Martha Patricia Hernández Cortes

Dra. María Antonia Guzmán Murillo

Suplente

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes

RESUMEN

Actualmente, las proteínas alimentarias se estudian desde el punto de vista nutricional, funcional y como materia prima para obtener péptidos bioactivos. El abulón (*Haliotis* sp.), es un molusco de gran importancia pesquera en B.C.S., tan solo en el 2011 se produjeron 326 T. En su procesamiento, las vísceras que representan el 15% (peso húmedo) son desechadas, debido a la poca utilidad que se les da, llegando a constituir un problema por contaminación y/o posiblemente perdida de compuestos bioactivos. Por ello, en este trabajo se investigó su uso como materia prima para la obtención de péptidos bioactivos y determinar su potencial, utilizando un modelo de digestión gastrointestinal *in vitro*. Para probar el efecto antimicrobiano en microorganismos patógenos así como el efecto anticancerígeno, se realizaron estudios con hidrolizados proteicos de vísceras de *H. fulgens* y *H. corrugata* y fracciones cromatográficas (obtenidas mediante HPLC, Sephacryl S-100). Se evaluó el nivel de citotoxicidad en células PC3, así como los niveles de expresión de los genes de las gelatinasas *mmp-2* y *mmp-9*. Los estudios fueron acompañados con la estimación de proteína, la determinación de perfiles electroforéticos SDS-PAGE y la optimización y estandarización de la hidrólisis de los homogeneizados de vísceras. Los resultados revelaron que la mayor digestión se encontró con vísceras de *H. corrugata* y *H. fulgens* hidrolizadas con 10 g del complejo enzimático (Wobenzym®) durante 24 h a 37ºC, no habiendo presentado grandes diferencias entre los perfiles cromatográficos. La actividad antimicrobiana se observó con hidrolizados de ambas especies, sin embargo la mayor sensibilidad se observó con hidrolizados de *H. fulgens*. La sensibilidad obtenida con *H. corrugata* se presentó en tres bacterias, dos Gram negativas (*P. mirabilis* y *P. aeruginosa*) con fracciones entre 66.2-116.25 kDa y en una bacteria oportunista Gram positiva (*B. subtilis*) con fracciones entre 6.5-21.5 kDa; además en un hongo (*A. niger*) con fracciones entre 97.4-116.25 kDa. Con hidrolizados procedentes de *H. fulgens*, la sensibilidad se presentó en 6 bacterias (*P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *S. thyphi*, *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtillis*) con fracciones entre 200-31 kDa; y en tres organismos fungi (*A. niger*, *A. alternata* y *A. flavus*) con fracciones de entre 116.25-21.5 kDa. Por otro lado, se encontró que 6 fracciones (400 µg/mL) provenientes de hidrolizados de *H. fulgens* de entre 66.2-31

kDa tuvieron un buen perfil de citotoxicidad, inhibiendo el crecimiento de células PC3 entre un 30.4-53.8%. De estas fracciones, la 33, 38 y 41 (200-300 µg/mL) disminuyeron la expresión de los genes de las gelatinasas *mmp-2* y *mmp-9* en las células estimuladas con o sin PMA; sin embargo la fracción 41 a la concentración de 200 µg/mL fue la que presentó la mayor inhibición. Los hidrolizados proteicos y fracciones peptídicas de vísceras de *H. fulgens* y *H. corrugata*, son una fuente potencial para la obtención de péptidos bioactivos con actividad en contra de microorganismos patógenos, con gran potencial preventivo y terapéutico para enfermedades asociadas a la expresión de los genes *mmp-2* y *mmp-9* (como algunos cánceres). Se sugiere continuar estudiando sus usos, como potencial aditivo alimenticio e ingredientes nutracéuticos entre otros. Este trabajo brinda una alternativa para darle un uso a las vísceras de abulón, uno de los subproductos de su procesamiento, minimizar posibles riesgos por contaminación y pérdida de posibles compuestos bioactivos.

Palabras-clave: hidrolizados proteicos, péptidos bioactivos, *Haliotis*, *H. fulgens*, *H. corrugata*, digestión de vísceras de abulón, gelatinasa-2, gelatinasas, MMP-2, MMP-9, células PC3, péptidos antimicrobianos.

ABSTRACT

Currently, food proteins are studied from a nutritional and functional viewpoint, moreover, as raw material to obtain bioactive peptides. Abalone (*Haliotis* sp.) is a marine gastropod mollusk, which is a commercially important bioresource in the fishery on southern Baja California; only in 2011, a total of 326 T were produced. In the processing of abalone, the intestines representing 15% (wet weight) are discarded due to the limited use causing contamination and/or possible loss of bioactive compounds. Thus, in this study their use as raw material was researched to obtain bioactive peptides and to determine their active potential, using an *in vitro* gastrointestinal model. To investigate their antimicrobial effect against human pathogenic microorganisms and anticancer activity, abalone intestines of *H. fulgens* and *H. corrugata* were digested and then fractionated by HPLC (Sephacryl S-100). Moreover, cytotoxic effects of fractions were evaluated in PC3 cell line; also were evaluated *mmp-2* and *mmp-9* gelatinases gene expression. Furthermore, the amount of protein was estimated in the samples and SDS-PAGE gels were performed as well as hydrolysis optimization and standardization of the abalone intestine. The results showed the best digestion with hydrolysates of both species using 10 g of an enzymatic complex (Wobenzym®) by incubation at 37°C for 24 h; no significant differences were found between SDS-PAGE profiles. Antimicrobial activity was observed with *H. fulgens* and *H. corrugata* fractions's; however, the best sensitivity was observed with *H. fulgens* fractions's. Fractions from *H. corrugata* had antibacterial activity against three bacteria, in two Gram negative (*P. mirabilis and P. aeruginosa*) with fractions from 66.2-116.25 kDa and in one opportunistic Gram positive (*B. subtilis*) bacterium with fractions from 6.5-21.5 kDa; besides one filamentous fungus (*A. niger*) with fractions from 97.4-116.25 kDa. In addition, fractions from 200-31 kDa from *H. fulgens* hydrolysates had activity in six bacteria (*P. mirabilis, P. aeruginosa, S. thyphi, E. coli, S. aureus, B. subtillis*). Moreover, fractions from 116.25-21.5 kDa had effects in three fungal microorganism (*A. niger, A. alternata, and A. flavus*). On the other hand, six fractions (400 µg/mL) from 66.2-31 kDa from *H. fulgens* hydrolyzates had cytotoxicity, inhibiting from 30.4-53.8% of PC3 cellular growth. Three of them, 33, 38, and 41 (200-300 µg/mL) fractions decreased the PMA-

induced and not-induced expression of gelatinases *mmp-2* and *mmp-9* of PC3 cells; however, fraction 41 showed a greater inhibition at a concentration of 200 µg/mL. In conclusion, proteic hydrolysates and peptidic fractions from *H. fulgens* and *H. corrugate* are a potential source of bioactive compound production against human and plant pathogens, and their active components may have preventive and therapeutic potential from diseases associated with MMP-2 and MMP-9 activation (as some cancers); we recommend to continue investigating their potential use as food supplement or nutraceuticals products providing an alternative to use abalone intestines, one of the by-products of its processing and minimize a contamination risk and possible loss of bioactive compounds.

Key words: proteic hydrolysates, bioactive peptides, *Haliotis*, *H. fulgens*, *H. corrugate*, abalone intestine digest, gelatinase-2, gelatinases, MMP-2, MMP-9, PC3 cells, antimicrobial peptides.

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada enteramente a mis padres, porque para mi han sido un símbolo de gran fortaleza y perseverancia ante las adversidades de la vida. Con su ejemplo y un gran amor y respeto a DIOS como gran energía creadora, me permitieron llegar en donde estoy y tener la motivación de continuar estudiando, como un portal para conocer y entendernos a nosotros mismos y todo lo que nos rodea. Mis padres me han enseñado que la vida desde la criatura más mínima e insignificante por pequeña que esta parezca, incluyendo las plantas y los minerales, hasta la criatura más compleja aquí en la tierra, el ser humano, tienen el mismo valor y respespeto. Por lo tanto, el estudio de la ciencia ha despertado en mí esos valores; al igual que presenta un reto, para continuar madurando y evolucionando como ser humano.

Les entrego ésta tesis como símbolo de mi amor, respeto y agradecimiento.

Que el gran Arquitecto del Universo nos permita compartir muchos momentos gratos más aquí en la tierra y si es posible en otras vidas.

Sincera y Fraternalmente
Xolotl Paloma Ponce González

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos al Instituto de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C. (CIBNOR) y al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) como instituciones que hicieron posible la realización de esta tesis titulada "Estudio del potencial bioactivo de vísceras de abulón utilizando un modelo de digestión gastrointestinal *in vitro"*, con número de convenio 484095; por la beca otorgada y por contribuir a mi crecimiento profesional, permitiéndome realizar un posgrado de alta calidad. Así también quiero agradecer a mi directora de tesis la Dra. Norma Yolanda Hernández S., al técnico Arturo Pedro Sierra B. y la Dra Bertha O. Arredondo V. por la beca que se me otorgó (proyecto 913-0), la cual me permitió continuar realizando mis experimentos de tesis y realizar una estancia en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, con el Dr. Moisés Martínez Velázquez al cual deseo también agradecer por todas las facilidades brindadas en la estancia.

Un especial agradecimiento a la Dra. Norma Y. Hernández Saavedra, al técnico Arturo P. Sierra Beltran y la técnico Delia I. Rojas por el gran apoyo que me brindaron a lo largo de la maestría y por sus capacidades para orientarme e instruirme para salir adelante. A mis co-tutores que formaron parte del comité tutorial, la Dra María A. Guzmán Murillo, Dra. Patricia Hernández Cortes, por su orientación y observaciones cada uno en sus especialidades.

A, Diana L. Dorantes Salas, Ángel E. Carrillo García, Nancy Núñez Sandoval, Norma García Lagunas, Diana Martínez Alarcon, Claudia Maytorena Verdugo, Edgar Asdrúbal Trujillo G., Betsaida Bibo Verdugo, y Leandro N. Getino M., y a todo el personal de CIBNOR, por su disposición, y aportaciones otorgadas para la elaboración de este trabajo. A mis compañeros de generación, de otras generaciones y amigos, por todos aquellos buenos momentos que compartimos juntos y que sirvieron para intercambiar ideas, así como el apoyo que me brindaron cuando más se necesitaba.

Finalmente deseo agradecer a toda mi familia María del Refugio González, Ricardo Ponce, Jalil Makei, Gibran Ricardo y Roman Ahumada Mexía por todo el apoyo, paciencia y amor.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN 1

1.1 Péptidos bioactivos 1

1.2 Aprovechamiento de *Haliotis* spp 3

1.3 Descripción general del organismo modelo 6

1.4 Sistema digestivo 7

1.5 Distribución y hábitat 9

2. ANTECEDENTES 10

3. JUSTIFICACIÓN 20

4. HIPÓTESIS 20

5. OBJETIVOS 20

5.1 Objetivo general 20

5.2 Objetivos particulares 20

6. MATERIALES Y MÉTODOS 21

6.1 Organismos 21

6.2 Línea Celular 22

6.3 Sustancias químicas 22

6.4 Obtención del concentrado proteico y digestión enzimática 23

6.5 Determinación cuantitativa de proteína 25

6.6 Electroforésis de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) 25

6.7 Obtención de las fracciones peptídicas mediante cromatografía de alta resolución, en Sephacryl S-100 25

6.8 Actividad Anti-microbiana (péptidos) en placa por el método de difusión radial en agar 26

6.9 Liofilización de fracciones cromatográficas 28

6.10 Cultivo Celular.....28

6.11 Ensayo MTT 29

6.12 Expresión MMP-2 y MMP-9.....30

6.13 Extracción de ARN.....31

6.14 Reacción en Cadena de la Polimerasa digital (ddPCR).....31

Primer *mmp-2* 33

Primer *mmp-9* 33

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....34

7.1 Hidrólisis del concentrado proteico 34

7.2 Fraccionamiento de hidrolizados mediante HPLC en Sephacryl S-100.....38

7.3 Actividad Anti-microbiana (péptidos) en placa (pruebas preliminares) por el método de difusión radial en agar.....41

7.4 Efecto de las fracciones cromatográficas con diferentes pesos moleculares (62.2-31 kDa) sobre la viabilidad de las células PC-3 50

7.5 Efecto de las fracciones cromatográficas con diferentes pesos moleculares sobre la expresión de las gelatinasas *mmp-2* y *mmp-9* en células de la línea PC-3 54

8. CONCLUSIÓNES.....63

9. SUGERENCIAS Y PRESPECTIVAS 66

10. BIBLIOGRAFÍA 69

11. CONSULTA EN LÍNEA:.....75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Distribución de *Haliotis* spp. y sus zonas pesqueras con talla mínima (en mm) en la Península de Baja California 4
Figura 2.- Vista ventral de la anatomía del *Haliotis* 7
Figura 3.- Tracto digestivo de *H. rufescens* Swainson, superficie dorsal 8
Figura 4.-Efecto del tiempo de incubación y la concentración de enzima (Wobenzym®) en la hidrólisis enzimática de un homogeneizado de vísceras de *Haliotis corrugata*.....37
Figura 5.- Concentración de proteína en hidrolizados de vísceras de *H. fulgens* (por triplicado) y su digestión con 10 g de Wobenzym a 37ºC por 24 h.....38
Figura 6.- Cromatografía de alta resolución HPLC, Sephacryl S-100 y perfil electroforético SDS-PAGE de hidrolizados proteicos obtenidos mediante hidrólisis enzimática de vísceras de *H. fulgens*.. 40
Figura 7.- Cromatografía de alta resolución HPLC, Sephacryl S-100 y perfil electroforético SDS-PAGE de hidrolizados proteicos obtenidos mediante hidrólisis enzimática con 10 g de Wobenzym® de vísceras de *H. fulgens* provenientes de organismos distintos (Hf1, Hf2, Hf3)......41
Figura 8.- Determinación de sensibilidad de *B. subtilis* a fracciones cromatográficas obtenidas mediante filtración en gel de (HR-S100) hidrolizados de vísceras de abulón *H. fulgens* obtenidos con 15 g de enzima.. 44
Figura 9.- Determinación de sensibilidad de *E. coli* a fracciones cromatográficas obtenidas mediante filtración en gel de (HR-S100) hidrolizados de vísceras de abulón *H. fulgens* obtenidos con 10 g de enzima.....44
Figura 10.- Determinación de sensibilidad de *P. aeruginosa* a fracciones cromatográficas obtenidas mediante filtración en gel de (HR-S100) hidrolizados de vísceras de abulón *H. fulgens* obtenidos con 10 g de enzima.. 45
Figura 11.- Determinación de sensibilidad de *S. aureus* a fracciones cromatográficas obtenidas mediante filtración en gel de (HR-S100) hidrolizados de vísceras de abulón *H. fulgens* obtenidos con 10 g de enzima.. 45

Figura 12.- Determinación de sensibilidad de *A. niger* a 2 fracciones cromatográficas obtenidas mediante filtración en gel (HR-S100) de hidrolizados de vísceras de abulón *H. corrugata* obtenidos con 10 g de enzima.....46
Figura 13.- Determinación de sensibilidad de *A. niger, A. alternata* y *A. flavus* a fracciones cromatográficas obtenidas mediante filtración en gel (HR-S100) de hidrolizados de vísceras de abulón *H. fulgens* obtenidos con 10 y 15 g de enzima.....47
Figura 14.- Efecto de las fracciones cromatográficas (61.2-31 kDa) con dos concentraciones (200, 400 µg/mL) sobre la viabilidad relativa de las células PC-3.....53
Figura 15.- Expresión absoluta de los genes que codifican a los transcritos para las gelatinasas *mmp-2* y *mmp-9* (copias/µL) en células de la línea PC-3 y su efecto después de ser tratadas con las fracciones cromatográficas 38 y 41 (61.2-31 kDa). 61
Figura 16.- Expresión absoluta de los genes que codifican a los transcritos para las gelatinasas *mmp-2* y *mmp-9* (copias/µL) en células de la línea PC-3 sin estímulo con PMA y su efecto después de ser tratadas con las fracciones cromatográficas 33 y 41 (61.2-31 kDa) a una concentración de proteína de 300 y 200 µg/ mL respectivamente por 1 h.. 62

LISTA DE TABLAS

Tabla I.- Clasificación de péptidos antimicrobianos en la respuesta inmune innata de acuerdo al tamaño, estructura y organización de aminoácidos (Dur y Peschel, 2002; Rivas-Santiago *et al*., 2006). 12

Tabla II.- Especies de bacterias utilizadas para la prueba de actividad antimicrobiana, proporcionadas por el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Baja California Sur (LESP, B.S.C.).....21

Tabla III.- Especies de hongos utilizados para la prueba de actividad antimicrobiana, proporcionados por el Laboratorio de Patogénesis Microbiana (LPM, CIBNOR). 22

Tabla IV.- Contenido enzimático en una gragea de Wobenzym (Romasa de México, S.A. de C.V.).....24

Tabla V.- Muestras de hidrolizados de vísceras de abulón azul y abulón amarillo que se utilizaron para obtener las fracciones peptídicas mediante HPLC en Sephacryl S-100. 26

Tabla VI.- Secuencia de cebadores sintetizados para el ensayo de expresión de la gelatinasa *mmp-2*. 33

Tabla VII.- Secuencia de cebadores sintetizados para el ensayo de expresión de la gelatinasa *mmp-9*. 33

Tabla VIII.- Muestras de hidrolizados de vísceras de abulón azul y abulón amarillo que se utilizaron para obtener las fracciones peptídicas mediante HPLC en Sephacryl S-100. 40

Tabla IX.- Resultados de sensibilidad bacteriana *in vitro* para 5 bacterias Gram negativas (G-) y 2 bacterias Gram positivas (G+). 43

Tabla X.- Resultados de PCR digital de la expresión absoluta de los genes que codifican a los transcritos para las gelatinasas *mmp-2* y *mmp-9* (copias/µL) en células de la línea PC-3 después de ser tratadas con tres fracciones (61.2-31 kDa) a una concentración de proteína de 200 y 300 µg/ mL por 1 h y después estimuladas con forbol-12-meristato acetato 13-acetate (PMA; 10ng/mL) por 36 h. 60

Table XI.- Promedio de los resultados de PCR digital de la expresión absoluta de los genes que codifican a los transcritos para las gelatinasa *mmp-2* y *mmp-9* (copias/µL) en células de la línea PC-3 después de ser tratadas con la fracciones cromatográficas 33 y 41 (61.2-31

kDa) a una concentración de proteína de 300 y 200 µg/ mL por 37 h, sin estimulación con forbol-12-miristato acetato (PMA). 60

LISTA DE ECUACIONES

Equation 1. % Viabilidad = DO Células Tratadas/DO Células Control × **100**.....30

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Péptidos bioactivos

La palabra péptido, proviene del griego "πεπτιδια" que se traduce como digestibles pequeños. Estructuralmente se definen como polímeros pequeños formados por la unión de enlaces peptídicos, con un bajo número de aminoácidos. Una clasificación (la cual no es universal) basada en el número de aminoácidos comprende a: los oligopéptidos formados de 2 a 12 (o hasta 15) aminoácidos, los polipéptidos formados a partir de 50 aminoácidos (aprox.) y por último, a las proteínas formadas por más de 100 aminoácidos (Shahidi y Zhong, 2008).

Las proteínas que ingerimos a través de la dieta, aportan los aminoácidos necesarios para el desarrollo y el mantenimiento de las células y los tejidos de los organismos (Shahidi y Zhong, 2008). Actualmente, las proteínas alimentarias se estudian no solo desde el punto de vista nutricional o funcional, sino como materia prima para la obtención de péptidos, ya que toda fuente de proteínas alimentarias es susceptible de aportar péptidos funcionales (Mulero-Cánovas *et al*., 2011).

Los *péptidos funcionales o bioactivos*, se definen como péptidos derivados de proteínas de la dieta que ejercen un beneficio a nivel fisiológico, independientemente de su función nutricional. Así también se pueden definir como secuencias de aminoácidos inactivos en el interior de la proteína precursora que ejercen determinadas actividades biológicas, tras su liberación mediante hidrólisis química o digestión enzimática (Shahidi y Zhong, 2008; Kim y Wijesekara, 2010; Mulero-Cánovas *et al.*, 2011).

Algunas vías para la obtención de los péptidos bioactivos, están la hidrólisis enzimática en el proceso industrial de los alimentos o como derivados de las proteínas de la dieta mediante digestión gastrointestinal, de manera que al ser liberados, puedan ejercer sus funciones y llegar a tener efectos benéficos a nivel fisiológico en los diferentes sistemas del organismo, como los que se han reportado en el sistema cardiovascular (efecto antihipertensivo, hipocolesterolémico, antioxidante, antitrombótico), nervioso (efectos agonista y antagonista opioide), gastrointestinal (efecto quelante, antimicrobiano) e inmune

(efecto inmunomodulador) por mencionar algunos (Aneiros y Garateix, 2004; Kim y Wijesekara, 2010; Nguyen *et al*., 2012; Shahidi y Zhong, 2008).

Algunas de las características reportadas para los péptidos bioactivos, son que generalmente presentan una longitud de entre 3 a 20 residuos de aminoácidos, aunque en algunas ocasiones pueden exceder esta longitud (Shahidi y Zhong, 2008; Kim y Wijesekara, 2010; Mulero-Cánovas *et al*., 2011). Su actividad biológica se relaciona con su composición y secuencia de aminoácidos; también se ha reportado que presentan actividad multifuncional debido a su estructura, hidrofobicidad, carga y propiedades de unión con otros microelementos (Kim y Wijesekara, 2010). La actividad antioxidante de algunos péptidos se ha relacionado con una alta cantidad de residuos de histidina y aminoácidos hidrofóbicos, la actividad antitrombótica se ha relacionados con un alto contenido de isoleucina, lisina y ácido aspártico y, la actividad hipocolesterolémica con péptidos con bajo contenido de metionina, glicina, lisina, arginina y un alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos (Shahidi y Zhong, 2008; Kim y Wijesekara, 2010; Nguyen *et al.*, 2012).

Para el estudio de los péptidos bioactivos, en la actualidad se siguen una serie de etapas generales (Shahidi y Zhong, 2008; Kim y Wijesekara, 2010) que son: 1) la obtención del péptido mediante algún método, como extracción con solventes, hidrólisis enzimática o fermentación microbiana de proteínas alimentarias; 2) búsqueda de la actividad biológica mediante ensayos de simulación *in vitro*; 3) separación y caracterización de el o los péptidos responsables de la actividad; y 4) ensayos de actividad *in vivo* en un modelo animal. El estudio de los péptidos bioactivos, así como su búsqueda ha sido de gran interés debido en parte al alcance que puede llegar a tener diversas drogas, como las que existen para el cáncer. Dentro de las principales terapias anticancerígenas que actualmente se utilizan (quimioterapias), se emplean drogas como el cisplatino y el 5-fluorouracilo que son utilizadas para el cáncer de mama avanzado, cáncer de cérvix y leucemia mieloide crónica (Quispe *et al*., 2009); estos compuestos además de ser benéficos, también exhiben diversos efectos adversos a otros órganos por ser altamente citotóxicos, no solamente en las células cancerosas. Lo anterior incentiva a la búsqueda de nuevas fuentes de drogas mucho más seguras y de menor costo para su obtención, que no únicamente tengan una función, sino

que puedan llegar a ser multifuncionales. Respecto a la actividad antimicrobiana, se ha visto que un gran número de cepas están presentando resistencia no nada más a un fármaco sino a diversos fármacos (cepas multi-resistentes).

Es bien conocido, que los recursos marinos han sido una fuente muy importante de obtención de diversas sustancias, en gran parte por ser una fuente dónde la supervivencia de los organismos es más compleja que la de los organismos terrestres, debido a que se enfrentan a condiciones físico-químicas distintas, como la presión atmosférica y condiciones ambientales (temperatura principalmente) afectándoles más directamente, ocasionando cambios más drásticos en su entorno por lo que han tenido que adaptarse (Kim y Wijesekara, 2010; Rivas-Santiago *et al*., 2006).

1.2 Aprovechamiento de *Haliotis* spp.

El abulón (*Haliotis* spp.) es un molusco marino que pertenece a la clase gastrópoda (Cox, 1962). Es de gran importancia en México como recurso económico pesquero en la costa occidental de la península de Baja California, debido a que tiene una demanda en el mercado internacional por el sabor de su carne y el nácar de su concha para la elaboración de artesanías (Carreón-Palau *et al.*, 2003; http://www.inapesca.gob.mx). Según Picos-García, (1998) en nuestro país se distribuyen siete especies de abulón (Fig. 1): amarillo o pink (*Haliotis corrugata*), azul o green (*Haliotis fulgens*), chino o white (*Haliotis sorenseni*), rojo (*Haliotis rufescens*), negro (*Haliotis cracherodii*), pinto (*Haliotis kamtschatkana*) y plano (*Haliotis walallensis*). De estas especies, las más importantes en la pesquería comercial son el abulón amarillo (*H. corrugata*, Gray, 1828) y el abulón azul (*H. fulgens*, Philippi, 1845) como lo reportó Carreón-Palau *et al.* (2003); CONAPESCA (2011) y como se ha visto en algunas empresas productoras de abulón como “Cedmex” y”Coperativa Progreso”. Sin embargo CONAPESCA (2011) históricamente ha registrado una mayor producción de estas especies en Baja California Sur, como lo que se obsrvó para el año 2011, teneindo una producción de 326 toneladas de peso vivo; mientras que en Baja California se reportaron en el mismo año 138 toneladas de peso vivo.

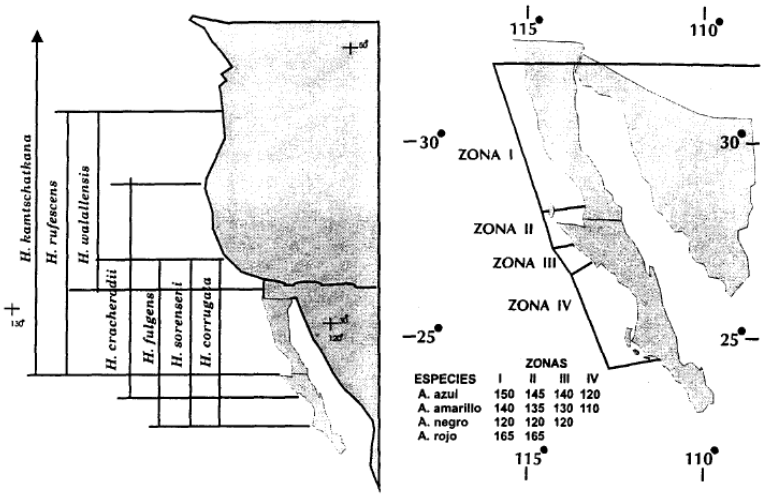

Figura 1.- Distribución de *Haliotis* spp. y sus zonas pesqueras con talla mínima (en mm) en la Península de Baja California (Guzmán-del Proo, 1992).

Considerando que en el 2011 se produjeron 326 toneladas de abulón (peso vivo) en el Estado de Baja California Sur (CONAPESCA, 2011), y que las vísceras representan del 10 al 15% de peso húmedo del organismo sin concha, aproximadamente 48.9 toneladas resultarían del cálculo de subproductos cárnicos de la pesquería. Según Kim y Mendis *et al*. (2006); Viana (2000), los subproductos pesqueros por lo general se les da poca utilidad, teniendo un costo muy bajo, llegando a constituir un problema de contaminación en muchos lugares. En la actualidad, las vísceras de abulón presentan una situación similar, siendo incineradas o enterradas por algunas empresas abuloneras (dato obtenido mediante observación en granjas y por comunicación directa con trabajadores de empresas abuloneras), y en pocos casos son utilizadas como fuente de proteínas junto con otros subproductos pesqueros para la elaboración de dietas artificiales para organismos de cultivo, incluyendo el abulón mismo, en experimentos de laboratorio (Viana, 2000). La contaminación por deshechos pesqueros puede conducir a una problemática sanitaria tanto para México como otros países productores de abulón como Australia, Chile, Perú, Japón, Nueva Zelanda, Sudáfrica y Taiwán (CONAPESCA, 2011); aunado a esto, el desperdicio de restos de tejidos marinos sin darles un uso, puede resultar en una perdida potencial de

compuestos bioactivas que se puedan obtener de su procesamiento, como lo explican Kim y Mendis *et al*. (2006).

En la actualidad, existen pocos estudios en los que se evalúa el potencial bioactivo de las vísceras de *Haliotis* (Nguyen *et al*., 2012; Nguyen *et al*., 2013; Qian *et al*., 2012). Sin embargo, ninguno de ellos se ha realizado utilizando la línea celular PC3, que corresponden a un adenocarcinoma de próstata con metástasis al hueso, (ATTC CRL-1435), además de la evaluación simultánea de la actividad antimicrobiana.

Basado en lo anterior, y en alta disponibilidad de vísceras de *H. corrugata* y *H. fulgens* que se tiene en la península, en este trabajo se pretende brindar una alternativa de uso y manejo de los subproductos cárnicos de la pesquería de abulón para obtener productos o moléculas con valor agregado y potencial uso en biotecnología. De esta forma se podría realizar un aprovechamiento integral del recurso y, al mismo tiempo minimizar el impacto ecológico que pudieran causar las industrias abuloneras al desechar las vísceras, brindando al sector alternativas para mitigar riesgos por contaminación y diseminación de enfermedades, conduciendo todo esto a promover una industria ambientalmente amigable.

Por lo tanto, en este trabajo se investigó el potencial bioactivo de las vísceras del abulón utilizando un modelo de digestión gastrointestinal *in vitro* a partir del procesamiento de las vísceras de abulón azul o amarillo, determinando propiedades tales como actividad anticancerígena en la línea celular PC-3 y actividad antimicrobiana en bacterias y hongos patógenos.

1.3 Descripción general del organismo modelo

El abulón tiene la siguiente clasificación sistemática (Cox, 1962):

Reino:	Animal
Phylum:	Mollusca
Clase:	Gastropoda
Subclase:	Prosobranchia
Orden:	Arqueogastropoda
Suborden:	Zygobranchia
Superfamilia:	Pleurotomariacea
Familia:	Haliotidae
Género:	*Haliotis*

Anatómicamente, el género *Haliotis* está conformado por una concha ovalada convexa; un pie en cuyo derredor están una serie de tentáculos; una cabeza que está localizada al frente del pie, en cuya base esta la boca, donde hay una rádula de tipo ripidoglosa que utiliza para raspar el alimento; un par de branquias localizadas en la cavidad del manto, bajo una serie de poros respiratorios adyacentes a la cavidad branquial; estructuras sensoriales epipodales bien desarrolladas y la masa visceral confinada hacia la última espira de la concha (Fig. 2). El intestino está escondido por debajo del pie; el tracto digestivo entero y las vísceras están anexos al músculo y consisten en boca, esófago, estómago e intestino (Fallu, 1991; Rupert y Barnes, 1996).

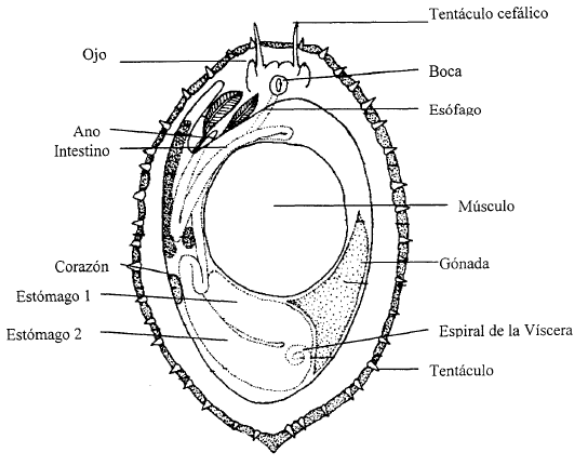

Figura 2.- Vista ventral de la anatomía del *Haliotis* (Fallu, 1991).

1.4 Sistema digestivo

El tracto alimenticio se encuentra sobre el lado izquierdo del cuerpo, entre el músculo y el borde del epipodio. El tracto digestivo entero (y la víscera) están fuera de la gran masa muscular y están sostenidos en su lugar por los músculos ventral y dorsal (Fig. 2). Este tracto consiste sucesivamente, de boca, esófago, el estómago en tres o cuatro partes y el intestino que pasa por el corazón antes de terminar en el ano (Fig. 3). El hepatopáncreas o glándula digestiva es rico en una emulsión de enzimas como catalasas, lipasas, maltasas, proteasas, invertasas, ureasas y amilasas. Cuando el animal ingiere material, este pasa al ducto de la glándula salival abierta y es llevado al esófago por fuertes corrientes ciliares. Del esófago, el material es llevado a un músculo en forma de conducto largo llamado postesófago; siendo en esta cámara donde se empaqueta el alimento con fluidos digestivos. Estudios *in vitro* han mostrado que el epitelio del postesófago es permeable a pequeños materiales orgánicos; por ejemplo glucosa y el aminoácido fenilalanina, fueron encontrados en considerables cantidades en el epitelio de este músculo, pero muy poca proporción es pasada a través del epitelio y transferida a la sangre. Sin embargo el postesófago es una importante región de absorción, y la digestión del alimento continúa a medida que el mismo pasa a través del intestino (Albrecht, 1921; Cox, 1982; Erasmus, 1996; Fleming *et al.*,

1996; Gómez-Pinchettiy y García-Reina, 1993; Knauer *et al.*, 1996; Mc Lean, 1970; Rupert y Barnes, 1996).

Por otra parte, por abajo del postesófago y separado del estómago por un pliegue, se encuentran varios ductos largos de la glándula digestiva y algunos más pequeños que se comunican dorsalmente con el estómago. En el estómago, se encuentra el protoestilo mucoso, el cual está compuesto de alimento y material derivado de la glándula digestiva e intestino. Cerca del estómago se encuentra un segmento intestinal corto con una gran cantidad de hilos entre lomas y surcos, de tal manera que el mayor contenido del intestino es una masa de estos hilos con algunos fragmentos de algas entremezcladas. Del estómago el intestino se extiende anteriormente a la región de la cabeza y posteriormente a la del corazón y luego de nuevo al ano en la cavidad del manto (Rupert y Barnes, 1996).

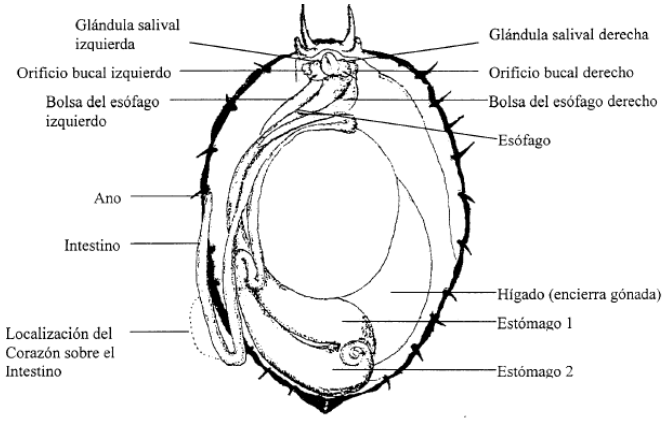

Figura 3.- Tracto digestivo de *H. rufescens*, superficie dorsal (Cox, 1962).

Siendo el abulón un gastrópodo marino, es considerado de hábitos herbívoros porque se alimenta de macroalgas; pero como todo organismo su alimentación y requerimientos varían de acuerdo a su etapa de desarrollo. En la etapa de larva, al ser lecitotrófica, no requiere de alimentación directa, aunque se considera importante la cantidad y tipo de materia orgánica disuelta en el agua, ya que se ha comprobado que existe absorción a nivel tisular de importantes nutrientes como aminoácidos y carbohidratos solubles. En la etapa de

postlarva se ha observado que se alimentan activamente de diatomeas bentónicas. A partir de la etapa juvenil temprano, los organismos ya son activos raspadores (ramoneadores) capaces de alimentarse en grandes cantidades de macroalgas como *Macrocystis pyrifera*. Sin embargo, en cultivo se ha observado que para lograr un óptimo crecimiento, se requieren cantidades de proteína mayores que las contenidas solamente en las macroalgas; esta cantidad de proteínas es esencial en el crecimiento del tejido suave. Por ésta razón, se piensa y se ha visto en cultivos, que los abulones también se alimenta en gran medida de organismos epífitos de las macroalgas en su medio natural. En *H. rufescens* se han identificado treonina, valina, metionina, isoleucina, leucina, fenilalanina, triptófano, lisina, histidina y arginina como aminoácidos esenciales para el desarrollo y mantenimiento de los tejidos (Viana, 2000).

1.5 Distribución y hábitat

Según Cox, (1962), en el mundo hay cerca de cien especies de *Haliotis*, encontrándose localizadas en ambos hemisferios. Un gran número de especies se han observado en el centro y sur del Pacífico, y partes del Océano Indico. El abulón se encuentra a lo largo de la costa oeste de Norteamérica (desde Alaska hasta la costa occidental de la península de Baja California); costa oeste y sur de Asia (Rusia, Korea, Japón, China, Taiwán, Indonesia, Borneo, Malasia, Camboya, Tailandia, India y SriLanka); Islas del Océano Pacífico; Australia; Nueva Zelanda; África (Egipto, Tanzania, Mozambique, Natal, Madagascar, Cabo de la Buena Esperanza, Costa de Oro y las Islas de Madeira y Azores) y Europa (Francia, España, Italia, Yugoslavia y Grecia).

Las especies comercialmente explotadas en México, *H. fulgens* y *H. corrugata* se distribuye desde Islas Coronado, B.C hasta la punta sur de la Isla Santa Margarita en Bahía Magdalena, B.C.S, aunque su pesca se vé acentuanda principalmente en la costa occidental de la Península de Baja California, particularmente en la región comprendida entre Isla de Cedros, B.C. y Bahía Magdalena, B.C.S. (Guzmán-del Proo, 1992; http://www.inapesca.gob.mx). En el medio marino, se distribuyen desde la zona intermareal baja, hasta los 18 m, pero las mayores densidades se presentan entre 1.5 y 8 m de

profundidad. Estos organismos viven adheridos a fondos rocosos, donde la diversidad y abundancia de la flora y fauna asociada a los bancos juega un papel importante en el ciclo de vida, y, en combinación con la variación de factores ambientales, determinan las diferencias entre los patrones de distribución y abundancia del recurso (Hahn, 1989).

2. ANTECEDENTES

Se sabe que los péptidos bioactivos, se encuentran distribuidos de manera natural en los organismos de los diferentes reinos y han ido evolucionando en su estructura y mecanismo de acción en la respuesta inmune entre las diferentes especies debido a la exigencia de su entorno (Aneiros y Garateix, 2004; Kim y Wijesekara, 2010). Alexander Fleming, fue uno de los primeros investigadores en detectar propiedades bioactivas en proteínas como la lisozima (propiedades bactericidas) que encontró en las secreciones respiratorias, de forma que se considera la primera proteína antimicrobiana registrada (Rivas-Santiago *et al*., 2006). Desde entonces la búsqueda por proteínas o péptidos con funciones antimicrobianas, antifúngicas, anticancerígenas u otras propiedades es un tema de investigación para la cura de diversas enfermedades mediante la elaboración de fármacos o suplementos alimenticios. Rivas-Santiago y colaboradores (2006) reportaron que los péptidos antimicrobianos se clasifican en familias de acuerdo con su tamaño, estructura y la organización de los aminoácidos. Todos están genéticamente codificados, es decir, un gen codifica para cada péptido específico independientemente de que estos puedan sufrir modificaciones postranscripcionales. Así también, se ha identificado que la gran mayoría tienen en común dos características sin importar su estructura o tamaño: 1) tienen carga positiva debido a la presencia de un gran número de aminoácidos básicos (en su mayoría lisina y arginina), y 2) aproximadamente el 50% de los aminoácidos que los constituyen son hidrofóbicos. En humanos, los péptidos antimicrobianos (Tabla I) se han divididos en tres principales familias: defensinas, catelicidinas e histaminas. Con base a esta clasificación se han hecho relaciones con otros péptidos antimicrobianos (o bioactivos) encontrados en otros organismos (Dur y Peschel, 2002; Rivas-Santiago *et al*., 2006). Por otro lado en plantas también se han obtenido diversos péptidos antimicrobianos; clasificándose principalmente en tres grupo (tioninas, defensinas y proteínas de

transferencia de lípidos). Estos péptidos los han encontrado en la gran mayoría de plantas y se han caracterizado por poseer un número par de cisteínas (4, 6 u 8), formadas por puentes disulfuro, dándoles gran estabilidad; estos péptidos se han clasificado como “ricos” en cisteínas, pero hay otras clasificaciones dependiendo el mecanismo de acción (por ej. glucanasas) o la similitud a un tipo de proteína (Rivillas-Acedo y Soriano-García, 2006).

Las defensinas de los mamíferos son péptidos catiónicos, ricos en arginina, con pesos moleculares entre 3-4.5 kDa. Contienen seis residuos de cisteínas unidos por puentes disulfuro. El número de aminoácidos que las conforman, varían entre 20 a 45. Las defensinas de humanos muestran gran analogía con las defensinas de otros mamíferos, insectos; con la toxina del escorpión, y con un péptido de una anemona marina (Rivas-Santiago *et al*., 2006). Las catelicidinas e histatinas son un grupo de péptidos antimicrobianos diferentes a las defensinas, inicialmente se descubrieron en bovinos y cerdos por Zannetti, (1992). Actualmente las catelicidinas se denominan PR-39 (en cerdos) y LL-37 (en humanos); son multifuncionales y tienen una clara importancia para la respuesta inmune del hospedero. Existen pocas investigaciones sobre las histatinas y en su gran mayoría, se han enfocado al estudio de su estructura (Rivas-Santiago *et al*., 2006).

Tabla I.- Clasificación de péptidos antimicrobianos en la respuesta inmune innata de acuerdo al tamaño, estructura y organización de aminoácidos (Dur y Peschel, 2002; Rivas-Santiago *et al*., 2006).

PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS				
No	**Familia**			
I	**Defensinas**.-clasificación se basa en la posición de los enlaces disulfuro			
	Tipo	**Composición**	**Ubicación**	**Actividad**
	α	29-35 aminoácidos con 3 puentes disulfuro (posiciones 1-6, 2-4, 3-5).	Neutrófilos (HNP-1 al HNP-4). Células de Paneth del intestino delgado y epitelial del tracto urogenital femenino.	Mecanismo oxígeno-independiente para eliminar bacterias fagocitadas.
	ß	36-42 aminoácidos, 6 residuos de cisteína conectados por 3 puentes disulfuro (posiciones 1-5, 2-4 y 3-6).	Hemofiltrado, tracto urogenital y respiratorio, glándula mamaria, útero, glándula tiroides. HBD-1 al HBD-4.	Actividad microbicida contra hongos y bacterias, actividad quimiotáctica, favorece la cicatrización al estimular la proliferación de células epiteliales.
II	**Tipo**	**Catelicidinas** (PR-39 en cerdos y LL-37 en humanos)		
	PR-39	39 aminoácidos, con 49% de Pro, 24% Arg y 5% otros aminoácidos		Bloqueo de la síntesis de ADN y de proteínas bacterianas sin causar daño aparente. Favorece la cicatrización al estimular la proliferación de células epiteliales.
	LL-37		Constituyente de gránulos de neutrófilos a partir del precursor hCAP-18; secretada por células epiteliales, monocitos, linfocitos T y células cebadas; líquido amniótico y semen.	Quimiotáxis; disminuye los niveles de TNF-α.

Sivasubramanian y colaboradores (2011) realizaron estudios en un gastrópodo marino llamado *Melo melo*, dónde reportaron la obtención de péptidos bioactivos con pesos moleculares entre 14 y 45 kDa, usando músculo, tejido nervioso (cerebro) y riñón para la extracción de péptidos con actividad antibacterial, separados mediante cromatografía en capa fina utilizando metanol como fase móvil. De las bacterias probadas, los halos de máxima inhibición se observaron en cultivos de *Klebsiella pneumoniae,* seguido de

Staphylococcus aureus, Salmonella parathyphi, Proteus mirabilis, Vibrio parahemolyticus y *Salmonella thyphi*; y la máxima actividad antifúngica se presento contra *Trichophyton mentagarophytes,* seguido de *Alternaria alternaria, Penicllium* sp., *Epidermophyton floccossum, Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger*. La inhibición del crecimiento microbiano y el modo de acción de las fracciones fueron atribuídas a diversos factores como las características estructurales de los péptidos aislados, haciendo énfasis (posiblemente) en los compuestos bioactivos aislados, que no necesariamente provienen del modelo de estudio, sino de especímenes que los colonizan, como sucede generalmente con la biota marina.

Qian y colaboradores (2012) investigaron el efecto antioxidante y antiinflamatorio de hidrolizados de intestino de abulón (AID, por sus siglas en inglés) *Haliotis discus hannai* sobre macrófagos RAW 2647. Los resultados mostraron que AID presentó actividad antioxidante al probarlo en diferentes modelos. Por un lado, inhibió la peroxidación del ácido linoléico (modelo) a un 55.7 % lo que fue similar a 1 mg/mL de α-tocoferol (usado como control positivo). También, al medir la estabilidad de diferentes radicales (atribuído a la deslocalización de un electrón desapareado) mediante la reducción de estos por efecto de ceder un átomo de hidrogeno y consecuentemente la perdida de calor y la absorbancia, mediante un espectrofotómetro de resonancia, se observó que exhibió gran potencia ($p<0.05$) en cuatro tipos de radicales libres: 1,1-difenil-2-picrilhidrazil o DPPH (81.3%), superóxido (75.3%), radicales alquilo (peroxil, 56.7%) e hidroxil (69.5%), que correspondieron a la cantidad de radicales neutralizados por los extractos de abulón. Así también, se encontró un efecto antioxidante al medir la intensidad de fluorescencia emitida en el citosol, por la oxidación (en dos pasos) de la sonda fluorogénica 2’, 7’-diclorodihidrofluorescina diacetato (conocida como DCFH-DA, por sus siglas en inglés) a un reactivo altamente fluorescente 2’, 7’-Diclorodihidrofluorescina (DCF, por sus siglas), la cual es proporcional a los niveles formados de especies reactivas de oxígeno; observando un decremento considerable en la actividad de “scavenging” en la fluorescencia de DCF a manera dosis-tiempo-dependiente. A su vez, se encontró que AID presentó un efecto protector contra daño al ácido desoxirribonucleico producido por radicales hidroxil. En cuanto a la actividad antiinflamatoria, ésta se determinó mediante un tratamiento con el

modelo lipopolisacárido en macrófago para inducir un estímulo inflamatorio, evaluando las citocinas pro-inflamatorias (IL-1ß, TNF-α, IL-6) a nivel proteico y transcripcional y la inhibición de la fosforilación en proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPKs) como ERK, JNK y p38. La acción inhibitoria indicó una atenuación en la expresión del gen iNOS y su producto enzima (óxido nítrico sintasa) y una respuesta inflamatoria, mediada por el bloqueo de la ruta de señalización MAPK en macrófagos murino. El análisis del contenido de aminoácidos en el intestino del abulón, indicó aminoácidos ácidos (ácido glutámico, 35. 59 %), cisteína, tirosina e histidina, que en conjunto constituyeron el 42.52% del total de los residuos de aminoácidos, lo que indica una naturaleza electronegativa de sustancias biológicas presentes en AID. Además, Suetsuna *et al.* (2000) en: Qian *et al.* (2012) reportaron que una proteína que contenga ácido glutámico e histidina en su estructura, es importante por sus efectos antioxidantes y antiinflamatorios.

Recientemente en Corea, Nguyen y colaboradores (2012) reportaron la obtención de péptidos bioactivos de distinto peso molecular (1-100 kDa) a partir de vísceras e intestinos del abulón *Haliotis discus hannai*. Los péptidos obtenidos mediante digestión secuencial con las enzimas: pepsina, tripsina y α-quimotripsina y posteriormente por tamizaje con membranas de distinto peso molecular; encontraron que exhibían propiedades multi-inhibitorias dosis-dependiente sobre la migración celular, motilidad e invasividad de las células cancerígenas HT108, provenientes de un cáncer de mama. Los efectos inhibitorios sobre la migración e invasividad de las células fueron evaluados midiendo la actividad y expresión de las gelatinasas (*mmp*-2 y *mmp*-9), mediante zimografía en gelatina y western blot respectivamente, a su vez evaluaron, uno de los posibles mecanismos por el cual las fracciones afectaban la expresión de éstas; proponiendo como vía, la expresión del activador NF-kB, o más específicamente las proteínas p50 y p65 las cuales forman parte de NF-kB y los promotores de *mmp-2* y *mmp-9*, ambas tienen sitios para NF-kB. Debido a que las gelatinasas pertenecen a la familia de metaloproteinasas han sido consideradas importantes en la degradación de los componentes de la matriz extracelular, tanto en procesos fisiológicos como en una variedad de procesos patológicos como algunos canceres, particularmente en la invasión y metástasis, por esta razón proponen su uso como prueba diagnóstico para el cáncer. En sus resultados, observaron un decremento en la

expresión de éstas gelatinasas (en particular en la gelatinasa-2) con la fracción molecular en el rango de 1-10 kDa a una concentración de 200 µg/mL; aunque la fracción de 10-100 kDa exhibió también efectos inhibitorios a la misma concentración, pero en menor grado. Al analizar la composición de aminoácidos de la fracción de menor peso, encontraron que consistía de péptidos con mayor presencia de aminoácidos ácidos, como ácido glutámico y ácido aspártico. Otros aminoácidos encontrados en elevadas proporciones con respecto al contenido total, fueron prolina, alanina, histidina y lisina. Por lo que los efectos inhibitorios en las gelatinasas MMP-2 y MMP-9, fueron correlacionados en parte con la composición de los aminoácidos de su cadena, ya que como se sabe la secuencia y composición de una proteína se ha asociado con su actividad biológica; además, la glutamina, alanina e histidina han sido previamente reportados (Emara and Cheung, 2006) como aminoácidos importantes en la inhibición de las gelatinasas MMP-2 y MMP-9. Por otra parte, el mecanismo de acción inhibitorio de las fracciones peptídicas, fue atribuido con el factor de transcripción nuclear kappa B (NF-kB), más específicamente al decremento en los niveles de expresión de la proteína p65, la cual como se mencionó al formar parte de uno de los heterodímeros (p50/p65) de las proteínas de la familia NF-kB/Rel (al que pertenece NF-kB) y los promotores de las gelatinasas al tener sitios de unión a éste, se vio afectada su expresión.

Posteriormente Nguyen y colaboradores (2013) reportaron la obtención y caracterización de un péptido bioactivo con secuencia: Ala-Glu-Leu-Pro-Ser-Leu-Pro-Gly (782.4 kDa) usando la misma metodología y modelo biológico para la obtención del péptido. En los diferentes ensayos que realizaron se confirmó que el oligopéptido purificado de abulón, rico en prolina, puede inhibir los niveles en la expresión y actividad de las enzimas MMP-2 y 9 en la línea celular HT1080, vía atenuación de la expresión de las subunidades proteicas p50 y p65 del factor de transcripción nuclear kappa B, de manera dosis-dependiente (10, 50 y 100 µM). Por lo que al tener sitios para NF-kB las regiones promotoras de las gelatinasas *mmp*-2 y 9, en consecuencia se ve afectada la actividad de NF-kB, y éste suprime el crecimiento tumoral, por lo tanto la metástasis en las células HT1080.

Como se mencionó anteriormente en el trabajo de Nguyen en el 2012, las gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) estan siendo utilizadas en diferentes investigaciones como una prueba diagnóstico en diferentes cánceres, debido a que los niveles séricos de éstas son casi indetectables en pacientes sanos, al contrario de pacientes con cáncer.

Las metaloproteinasas de la matriz (MMPs, por sus siglas en inglés) son una familia de endopeptidasas dependientes de zinc (Zn^{2+}), las cuales juegan un rol importante en la remodelación del tejido normal y enfermo que etiológicamente incluye una degradación de todos los componentes de la matriz extracelular (ECM, por su siglas en inglés) o fibrosis. Así mismo, participan en una variedad de procesos biológicos y patológicos, como crecimiento y desarrollo celular, morfogénesis embrionaria, remodelación tisular, angiogénesis e invasión bacteriana, alergias, enfermedades neurodegenerativas, y en algunos cánceres teniendo participación en la invasión tumoral y metástasis cuando hay una alteración entre el balance de las MMPs y su inhibidor TIMP (TIMPs, por sus siglas en inglés) en el tejido. Las metaloproteinasas también participan en una serie de procesos que involucran la regulación de síntesis y secreción de citokinas, factores de crecimiento, receptores de hormonas y moléculas de adhesión celular (Fata-Chillón, 2013; Emara *et al*., 2009; Nguyen *et al*., 2012; Quintero *et al.*, 2013).

Se ha descrito a las metaloproteinasas como una familia de por lo menos 28 endopeptidasas (Egeblad y Werb, 2002), pero Quintero *et al.* (2013) menciona que se han descrito alrededor de 50 enzimas. Pero independientemente del número de MMPs descritas, como familia todas tienen en común la capacidade de degradar la mayoría de los componentes de la membrana extracelular (ECM). En la clasificación, se han dividido en varios subgrupos distintos, de acuerdo a las preferencias del sustrato o dominios estructurales similares, como: las colagenasas (MMP-1, MMP-8, MMP-13) que tienen actividad para degradar las fibras de colágeno, gelatinasas (MMP-2, MMP-9), tienen una alta actividad para degradar las fibras de colágeno desnaturalizado, estromelisinas (MMP-3, MMP-10, MMP-11), degradan muchos sustratos de la matriz extracelular a excepción del colágeno y activan otras MMPs y ciertos factores biológicos, matrisilinas (MMP-7, MMP-26), degradan los componentes de la matriz y también ciertas moléculas de la membrana

celular. Las MMPs actúan a pH óptimo, alrededor de la neutralidad por lo que también son llamadas proteinasas neutras; necesitan la presencia de los metales Ca^{2+} y Mg^{2+} para ser activadas; en este grupo, unas proteinasas son secretadas en el medio ambiente como proenzimas inactivas y son solubles (MMPs); mientras que otras son incorporadas a la membrana celular como enzimas activas, por medio de un dominio transmembranario (C-terminal o raramente N-terminal), teniendo sus sitios catalíticos y de reconocimiento del sustrato fuera de la célula y la porción intracitoplasmática interactúa con las proteínas del citoplasma. Estas últimas son llamadas metaloproteinasas tipo membrana (MT-MMP, por sus siglas en inglés), y de alguna manera también son consideradas como integrinas (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25). En la clasificación de las MMPs se encuentran otras, pero que aun no han sido tan caracterizadas (Quintero *et al.*, 2013; Vu-Hu y Werb, 2000).

La gelatinasa A, MMP-2 y gelatinasa B, MMP-9, históricamente también se han denominado colagenasas tipo IV por su alta afinidad para degradar el colágeno tipo IV (Fata-Chillón, 2013). Debido a su actividad como proteasa para degradar la membrana basal, se les ha relacionado estrechamente con invasión tumoral y metástasis, y han sido detectadas de manera consistente en tejidos malignos, aunque también contribuyen al control de la división celular, confiriendo resistencia a la apoptosis y como activador de angiogénesis mediante un complejo proceso que incluye la liberación del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés). Pueden existir unidas a la membrana extracelular para degradar el colágeno tipo I y V, elastina o laminina, agrecanos y otros proteoglicanos. La MMP-2 (proteína activa, 72 kDa y proenzima, 62 kDa) fue purificada originalmente de un tumor murino con metástasis. Tiene la capacidad de unirse al colágeno tipo I, a través de dominios de fibronectina estabilizándose en contra de una autolisis, además de ayudar a controlar su actividad. Es expresada en casi todos los tejidos humanos, sobre todo en los fiboblastos y en células endoteliales y epiteliales. La expresión de la MMP-2 es dependiente de un inductor de metaloproteinasa de la ECM, factores de crecimiento, citocinas, y hormonas; y la activación esta regulada por inhibidores tisulares de las metalopeptidasas como TIMPs, específicamente TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4. Una condición de niveles bajos de MMP-2, se ha ligado a una prognosis favorable en pacientes

con receptores negativos de hormonas, asociados con una prognosis pobre. Por otro lado, la MMP-9 (gelatinasa B, proteína activa, 82 kDa y pro-enzima 92 kDa) tiene una estructura homologa a la MMP-2, a diferencia de tener un dominio de enlace O-glicosilado más largo. Es producida en macrófagos de humanos y leucocitos polimorfonucleares, células endoteliales y es expresada en osteoclastos del tejido de los huesos, por mencionar algunos. La activación esta regulada por el inhibidor tisular TIMP-1. Se le ha dtectado teniendo una actividad biológica en diversos procesos inflamatorios, cardiovasculares y autoinmunes, autodegenerativas, osteoarticulares, así como en diversas neoplasias (Bolcato-Bellemin *et al.*, 2000; Quintero *et al.*, 2013).

Las técnicas que se han utilizado para la detección de MMPs han sido tales como, ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), técnicas de hibridación inmunohistoquímicas *in situ*, zimografía en gelatina y RT-PCR (Emara *et al.*, 2009; Fata-Chillón, 2013). De todas ellas, la técnica de zimografía en gelatina, ha sido ampliamente utilizada debido a su sencillez, bajo costo y sensibilidad, ya que es posible identificar actividad gelatinolítica de formas activas y latentes de diferentes pesos moleculares, en muestras biológicas usando pequeñas volúmenes (hasta 0.2 µL) y con concentraciones muy bajas (hasta picogramos), observándose bandas claras donde se encuentran las metaloproteasas, sobre un barrido azul marino (Emara *et al.*, 2009, Nguyen *et al*., 2012). Adicionalmente, la PCR en tiempo real (qPCR, por sus siglas en inglés) se ha utilizado básicamente para los mismos fines. Esta técnica ha sido ampliamente aceptada debido a que tiene un amplio rango dinámico, alta sensibilidad y especificidad hacia las secuencias de ADN o ARN de manera cuantitativa; además presenta muy poco o ningún procesamiento posterior a la amplificación. La reacción está caracterizada por el punto en el tiempo de la reacción (o ciclo de PCR), donde la amplificación de la secuencia de interés es primero detectada. Siendo este valor usualmente referido al "ciclo threshold (C_t)", que significa el tiempo en la cual la intensidad de fluorescencia es mayor que la fluorescencia de fondo, permitiendo hacer la detección del gen de interés en un tiempo real. (Wong y Medrano, 2005; Vinueza-Burgos, 2009).

Una variación de la qPCR es la PCR digital (ddPCR), la cual se basa en la cuantificación absoluta de la muestra que lleva el templado y mezcla de reacción, después de ser particionada en 20,000 nano gotas de 1 nL, llevándose así la reaccion de PCR en cada una de las gotas y realizando la cuantificación posterior, a partir del número de gotas positivas que contienen la secuencia de interés con respecto a las gotas negativas que no la tienen. Para lo anterior, se requieren diluciones limitadas (<66 ng); y con la ayuda de la distribución de Poisson a través del software (QuantaSoft™ software) se obtiene un reporte de la concentración en copias por microlitro de una reacción final 1X de PCR. Está técnica es particularmente útil cuando la concentración de templado es muy baja, teniendo la ventaja de que a diferencia de la qPCR en la ddPCR no se requiere comparar con una curva estándar de calibración; aun así, se requieren los mismos cuidados (QX200™ Droplet Digital PCR System y Droplet Digital PCR Application Guide, BIO-RAD).

Diversas líneas celulares de humano se han utilizado como modelos de cáncer debido a la expresión de diversas MMPs así como otras moléculas relacionadas en procesos cancerígenos. La línea celular HT1080 de un fibrosarcoma humano proveniente de mama ha sido usada extensivamente en muchos estudios de proteínas involucradas en la unión de la ECM, invasión y metástasis, así como porque expresan las gelatinasas MMP-2 y MMP-9 (Emara *et al*., 2009; Nguyen *et al*., 2012). De igual manera, la línea celular PC-3 (proveniente de hueso con metástasis de un adenocarcinoma de próstata, grado IV), se ha utilizado porque expresa no solamente las gelatinasas MMP-2 y MMP-9, sino también otras como: la MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-10, MMP-11, MMP-13 y MMP-14, siendo un buen modelo de estudio para fines de esta tesis (Emara *et al*., 2009; www. atcc.org).

3. JUSTIFICACIÓN

Basado en la producción de abulón que se tiene en la península y la alta disponibilidad de vísceras derivadas de la misma, se propone su uso como materia prima para obtener subproductos con valor agregado y potencial uso biotecnológico, de manera que se realice un aprovechamiento integral del recurso, al mismo tiempo que se brindan alternativas de manejo y se mitigan riesgos por contaminación y diseminación de enfermedades; conduciendo lo anterior a promover una industria ambientalmente amigable.

4. HIPÓTESIS

Si a partir de hidrolizados proteicos de vísceras e intestino de *H. discus hannai* es posible obtener péptidos con actividad biológica, entonces al usar vísceras de *H. fulgens* y *H. corrugata* como materia prima se obtendrán péptidos bioactivos con actividad biológica similares.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Investigar el potencial bioactivo de las vísceras del abulón utilizando un modelo de digestión gastrointestinal *in vitro*.

5.2 Objetivos particulares

- Identificar por tamizaje las actividades antimicrobianas y anticancerígenas de hidrolizados de vísceras de *H. fulgens* y *H. corrugata.*
- Realizar fraccionamiento de la actividad antimicrobiana de hidrolizados proteicos mediante tamizaje en cultivos microbianos.
- Realizar fraccionamiento de la actividad anticancerígena de hidrolizados proteicos mediante tamizaje en cultivos celulares en la línea PC-3.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Organismos

En este estudio se utilizaron órganos digestivos de abulón amarillo (*H. corrugata*) y abulón azul (*H. fulgens*) de talla comercial (3 a 5 años) donados por la Sociedad Cooperativas Punta Abreojos, S. C de C.V. asentada en el norte de B.C.S.

Para las pruebas de actividad antimicrobiana se usaron las cepas de bacterias mostradas en la Tabla II proporcionadas por el Laboratorio Estatal de Salud Pública (La Paz, Baja California Sur). Las especies de hongos (Tabla III) fueron proporcionadas por el Laboratorio de Patogénesis Microbiana, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR, La Paz, Baja California Sur).

Tabla II.- Especies de bacterias utilizadas para la prueba de actividad antimicrobiana, proporcionadas por el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Baja California Sur (LESP, B.S.C.).

No	Especie	ATCC	No	Especie	ATCC
1	*Proteus mirabilis*	12953	7	*Enterobacter aerogenes*	
2	*Shigella sonnei*	9290	8	*Salmonella enteritidis*	
3	*Shigella flexneri*	12022	9	*Esquerichia coli*	12228
4	*Pseudomona aeruginosa*	27853	10	*Staphylococcus aureus*	25923
5	*Salmonella thyphimurium*	14028	11	*Bacillus subtilis* (oportunista)	6633
6	*Salmonella thyphi*				

sv: silvestre (aislada por el LESP).

Tabla III.- Especies de hongos utilizados para la prueba de actividad antimicrobiana, proporcionados por el Laboratorio de Patogénesis Microbiana (LPM, CIBNOR).

No	Especie	LPM CIBNOR
1	*Mucor* sp	LPMM
2	*Alternaria alternata*	LPMAa
3	*Aspergillus niger*	LPMAn
4	*Aspergilus flavus*	LPMAf

6.2 Línea Celular

Los análisis de actividad anticancerígena fueron realizados en la línea celular PC-3 que fue adquirida de la colección: American Type Culture Collection (ATCC CRL-1435) por el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ).

6.3 Sustancias químicas

Buffer acido cítrico anhidro (C0759, Sigma), citrato de sodio (S4641, Sigma), Wobenzym (Romasa de México, S.A. de C.V.). Gentamicina 50 mg/mL (G1397, Sigma), kanamicina 5mg/mL (K0254, Sigma) penicilina 10,000 U/mL (P3414, Sigma), streptomicina/penicilina 10, 000 U/mL, mezcla de antibiótico/antimicótico 100X (A-4668, Sigma cell culture), ketoconazol 200 mg (Farmacon), fluconazol 150 mg (Farmacia Similares). Agar técnico (281210, DIFCO), caldo de soya tripticaseina (TSB) (236950, DIFCO), papa dextrosa (PD). Medio Ham F12 modificado por Kaighn (F12K), ácido etilendiaminotetraacético, 0.53 mM (EDTA), penicilina/streptomicina, suero fetal bovino (FBS). Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), forbol-12-miristato acetato (PMA, Sigma Chemical Co.). Dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma).

6.4 Obtención del concentrado proteico y digestión enzimática

Los concentrados proteicos se obtuvieron usando 3 lotes de 150 g de órganos digestivos de abulón amarillo (*H. corrugata*) y 3 lotes de 150 g de abulón azul (*H. fulgens)*. El procesamiento de estos tejidos se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Nguyen *et al*. (2012) con algunas modificaciones.

Para la extracción de proteínas totales, los órganos digestivos se homogeneizaron en una licuadora casera ajustando el pH 5.6 (Carrasco-Jiménez y Paz-Cruz, 2000) mediante el sistema tampón ácido cítrico-citrato de sodio 150 mM (Williams y Chase, 1968), aforando cada lote a un volumen final de 500 mL. De cada concentrado proteico se tomó una alícuota de 1 mL como control de estado inicial, preservándose a 2.7^{o}C hasta su posterior uso. Al resto del concentrado proteico se le adicionó Wobenzym® (Tabla IV), de acuerdo al ensayo a evaluar. Previamente, las grageas de enzima fueron pulverizadas en un molino de café. Una vez adicionada la enzima la mezcla se incubó en baño María (Magni Whirl, Mod. Blue M) a 37°C tomándose las muestras correspondientes de acuerdo al ensayo a evaluar. Posteriormente, las digestiones enzimáticas se centrifugaron a 10,000 *g*, -4°C por 20 minutos (Beckman, Mod. J2-HS) descartándose el pellet y recuperándose la porción soluble de los hidrolizados, dándoles un segundo tratamiento de centrifugación a 100,000 *g*, -4°C por 60 minutos (Beckman, Mod. L7 Ultracentrífuga). Se recuperó la parte soluble, separándose a través de filtros estériles de papel (Whatman 541) de 24.0 cm para retener los lípidos y otros componentes sin hidrolizar. Cada hidrolizado se separó en diferentes alícuotas para su posterior análisis, manteniéndose unos a 2.7^{o}C y otros a -4°C, para su análisis posterior.

Tabla IV.- Contenido enzimático en una gragea de Wobenzym (Romasa de México, S.A. de C.V.)

Wobenzym ®	
Fórmula, cada gragea contiene:	
Pancreatina	100 mg
Bromelina	45 (112,500 UI)
Papaína	60 (12,000 UI)
Lipasa	10 (10,000 UI)
Amilasa	10 (10,000 UI)
Tripsina	24 (60,000 UI)
Quimotripsina	1 (1,000 UI)
Rutina	50 mg
Exipiente cbp	Una gragea en 850 mg

UI: Unidades Internacionales

Los ensayos preliminares consistieron en la obtención de extractos con mayor digestibilidad. La primera variable estudiada fue el "Tiempo de incubación", para lo cual se utilizó una muestra de concentrado proteico de vísceras de *H. corrugata*, donde se mantuvo constante la concentración de enzima de 2 g. La obtención de las muestras de hidrolizados proteicos se tomaron en el proceso de incubación en los tiempos: 1, 2, 3 y 4 horas respectivamente. En un segundo ensayo se monitoreó la variable "Concentración de enzima" (Wobenzym®) adicionada al concentrado proteico de vísceras de *H. corrugata*, manteniéndose constante en esta ocasión el tiempo de incubación en 4 horas. El ensayo consistió en realizar diferentes digestiones enzimáticas, adicionando 0.4, 0.6, 0.8 y 1 g de enzima respectivamente, y tomando muestras en cada ensayo de digestión.

Los resultados obtenidos en los ensayos anteriores, fueron considerados para realizar más ensayos, llevándose a cabo de manera similar que el anterior, pero incrementando las concentraciones de enzima a 10, 12.5, 15 g en ambas especies de abulón (*H. corrugata* y *H. fulgens*), manteniendo constante un tiempo de incubación de 24 horas. Cada resultado fue acompañado de un perfil electroforético discontinuo de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE).

6.5 Determinación cuantitativa de proteína

A los hidrolizados proteicos y fracciones cromatográficas se les determinó el contenido de proteína por los métodos Bradford *et al.* (1976) y Lowry *et al*. (1951) usando un espectrofotómetro SmartSpec ™ 3000 (BIORAD), y un lector de microplaca (BIORAD, Benchmark).

6.6 Electroforésis de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)

Una vez determinado el contenido de proteínas, las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE Mini Protean II (Bio-Rad, 2000 Cat. 165-2941) por el método de Laemmli *et al*. (1970) en geles de poliacrilamida discontinuos al 10% y 15% (según el caso) desarrollando las electroforésis a un voltaje constante de 100 V durante 3 h a 2.7°C. Los pesos moleculares se estimaron utilizando un marcador de peso molecular de amplio rango (Bio-Rad, 2000, Cat. Num. 161-0317).

6.7 Obtención de las fracciones peptídicas mediante cromatografía de alta resolución, en Sephacryl S-100

Las muestras se fraccionaron por cromatografía de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) en un cromatógrafo BioLogic LP FILTR HR100 (Bio Rad) usando una columna de filtración (1 cm x 31 cm) que se empacó a 1 mL/min con Sephacryl S-100 a un volumen de 24 mL. Los ensayos consistieron en inyectar 2 mL de muestras de hidrolizados de vísceras de abulón azul (*H. fulgens*) y abulón amarillo (*H. corrugata*) (Tabla V) en una solución tampón de ácido cítrico-citrato de sodio 150 mM (pH 5.6) con un flujo de 0.8 mL/min. Después de la aplicación de la muestra (12-48 µg/mL), se recogieron 53 fracciones de 2.4 mL cada una, colectándose un total de 122.5 mL. El perfil de elución se monitoreó a 280 nm; cada fracción fue separada en tres alícuotas bajo condiciones estériles, preservándose las muestras de uso inmediato en refrigeración a 2.7°C y las otras a -4°C.

Tabla V.- Muestras de hidrolizados de vísceras de abulón azul y abulón amarillo que se utilizaron para obtener las fracciones peptídicas mediante HPLC en Sephacryl S-100.

No	Especie	Wobenzym (g)	Tiempo de incubación (h)
1	*H. corrugata*	0.4	4
2	*H. corrugata*	10	24
3	*H. fulgens*		
4	*H. fulgens*		
5	*H. fulgens*	12.5	
6	*H. fulgens*	15	
7	*H. fulgens1*	10	
8	*H. fulgens2*		
9	*H. fulgens3*		

6.8 Actividad Anti-microbiana (péptidos) en placa por el método de difusión radial en agar

La actividad antimicrobiana de los hidrolizados proteicos y fracciones cromatográficas se realizó mediante el método de difusión radial en agar, siguiendo la metodología propuesta por Valgas *et al*. (2007); Fothergill, (2012); Petrikkou *et al*. (2001) y Malbrán (2001) con algunas modificaciones, y siguiendo las recomendaciones del National Committee on Clinical Laboratory Standards, NCCLS, M7-A7, (2006). La actividad antimicrobiana de los hidrolizados proteicos y fracciones cromatográficas se realizó mediante el método de difusión radial en agar, siguiendo la metodología propuesta por (Tabla II); y a 4 hongos filamentosos patógenos (Tabla III).

La preparación de los inóculos bacterianos se realizó a partir del cultivo de las cepas bacterianas, seleccionando colonias aisladas de cajas con agar (TSA), incubadas por 18 h. Las bacterias fueron resuspendidas en 10 mL de medio TSB en matraces Erlen-Meyer de 50 mL, incubándolas por 17.5 horas con agitación constante a 150 rpm a 37°C (New

Brunswick Scientific Co.). Posteriormente, los cultivos se leyeron en el espectrofotómetro (SmartSpec ™ 3000 BioRad) a una densidad óptica de 600 nm (OD_{600}) en celdas de cuarzo de 1 mL.

A partir de los valores obtenidos se calculó el volumen del inóculo necesario para obtener una concentración final de 1 x 10^8 cel/mL. Para la estandarización del inóculo fúngico, los hongos se reactivaron en 10 mL de medio PD a una temperatura de 37°C por 3 a 5 días, hasta el estadío de esporulación de cada hongo. Los hongos se sembraron en placas con PDA mediante difusión radial con asa de vidrio, a 37°C hasta su esporulación. A partir de los cultivos maduros se hizo un exhaustivo raspado de las esporas con asa estéril las cuales se transfirieron a tubos con 5 mL de agua destilada estéril. Inmediatamente después las suspensiones de esporas se agitaron 15 s en vórtex, y se transfirieron a una jeringa conectada a un filtro con diámetro de poro de 11 µm (Whatman grado 1) y de 20-25 µm (Whatman grado 541) para obtener un inóculo mayormente compuesto por esporas, reteniendo las hifas en el filtro. Las suspensiones filtradas fueron recuperada en tubos, para posteriormente ajustar el inóculo entre 0.4-5.0 x 10^4 esporas/mL. El ajuste se hizo de manera independiente para cada especie de hongo, mediante conteo en placa Neubauer bajo el microscopio óptico.

Las pruebas de sensibilidad se realizaron tomando 100 µL de cada inóculo estandarizado y esparciéndolos con varilla de vidrio sobre cajas Petri bajo condiciones estériles. Las placas recién inoculadas se dejaron secar por 10 min en la campana y posteriormente se colocaron discos de papel filtro, (Whatman, 1/4’’) de forma equidistante, impregnados con 20 µL del los hidrolizados proteicos o las fracciones cromatográficas, indicadas en la Tabla VI, sección 7.2 (HPLC, HR-S100). Las placas se incubaron a 37°C (incubadora microbiológica VWR, Scientific), y el crecimiento bacteriano o, en su caso, el diámetro del halo de inhibición se verificó a las 72 horas de incubación en bacterias y a las 24-48 horas para los hongos.

La información derivada de los diferentes ensayos preliminares se analizó de manera cualitativa como lo establece la NCCLS para poder continuar realizando más pruebas,

como se indica en los siguientes puntos, pero se reportaron como tablas solo los mejores resultados donde se observó sensibilidad de la siguiente manera:

- Si el microorganismo fue sensible al tratamiento (S)
- Si el efecto fue nulo o muy reducido-resistente (R)

Los tratamientos se compararon con los controles positivos: gentamicina, 0.1 mg/mL, kanamicina, 0.1 mg/mL, penicilina, 20 U/mL y streptomicina/penicilina, 20 U/mL para el caso de las bacterias y anfotericina (0.4, 4, 25, 33, 50, 100 mg/mL), ketoconazol (0.4, 4, 25, 33, 50, 100 mg/mL) y fluconazol (3 y 15 mg/mL) para el caso de hongos. El control negativo fue buffer acido cítrico-citrato de sodio 150 mM (pH 5.6).

6.9 Liofilización de fracciones cromatográficas

Se liofilizaron (VIRTIS, Mod. *Manual*) las fracciones cromatográficas indicadas con el número 9 en la Tabla VI (sección 7.2) a -56°C y -80 miliTors, tomando alícuotas de 1.5 mL para la prueba de actividad antiacancerígena. Las muestras se mantuvieron selladas a -4°C hasta su posterior uso.

6.10 Cultivo Celular

Para el cultivo celular se utilizó la línea celular PC-3 obtenida de cáncer de próstata (CRL-1435) y se sigió la metodología propuesta por Nguyen *et al*. (2012) y Van-Ta *et al*. (2006), considerando todas las medidas de bioseguridad pertinentes. Las células se cultivaron en monocapa a partir de criobiales mantenidos en nitrógeno líquido, en cajas de cultivo de 75 cm^2, suplementadas con medio F12K, conteniendo 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% de penicilina/streptomicina, incubadas a 37°C con 5% de humedad y CO_2 atmosférico, hasta alcanzar una densidad de $8x10^6$ células por caja. Se realizaron recambios de medio de cultivo dos veces por semana en condiciones de esterilidad.

6.11 Ensayo MTT

Se determinó el efecto citotóxico de 14 facciones cromatográficas (HPLC, HR-S100) obtenidas de la digestión de vísceras de abulón azul (*H. fulgens*) con péptidos en un rango de peso molecular entre 62.2-31 kDa (Tabla VI, sección 7.2) utilizando cultivos de células PC3, en cajas de cultivo de 96 pozos. El ensayo se llevó a cabo utilizando bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) propuesto por Van-Ta *et al*. (2006) y Nguyen *et al*. (2012) con ligeras modificaciones. Cabe destacar que debido a las limitantes del material biológico de abulón amarillo (*H. corrugata*), no se pudieron llevar a cabo los experimentos que corresponden a la actividad anticancerígena con estas muestras, por lo que solo se utilizaron las vísceras de abulón azul.

El cultivo de PC3 se estandarizó a una densidad de 1 x 10^4 células por pozo de la siguiente manera. Una vez obtenido el crecimiento celular en la cajas de cultivo de 75 cm^2 se desechó el medio F12K agregando en su lugar 5 mL de tripsina al 0.25% e incubando a 37°C durante 5 minutos. Posteriormente se agregaron 5 mL de medio de cultivo, se recogieron las células en suspensión y se centrifugaron a 1500 rpm por 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y el pellet celular se resuspendió en 1 mL de medio, tomándose una alícuota para contar en cámara Neubauer. El resto del pellet se uso para ajustar el inóculo a $1x10^3$ células por pozo y proceder al ensayo MTT. Una vez que el inóculo se colocó en cada pozo, las placas se incubaron 24 horas a 37°C para esperar su adherencia a la placa. Después de la incubación, se retiro el medio de cada pozo y se agregaron 100 µL de los tratamientos a diferentes concentraciones (10, 50, 100, 200 y 400 µg/mL), incubando las placas por 24 horas más a 37°C. Inmediatamente después de la incubación con los tratamientos, se agregaron 20 µL de MTT (5 mg/mL) y se incubaron las placas por otras 4 horas para posteriormente desechar el medio de cada pozo y dejar secar la placa por 24 horas a temperatura ambiente (placas tapadas). Finalmente, se adicionaron 100 µL de DMSO para disolver los cristales de la sal formazán formados en las células al metabolizar el MTT mediante la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa (SDH), y la absorbancia se determinó a 595 nm usando un lector de microplaca (BIORAD, Bechnmark) para determinar el Porcentaje de viabilidad celular (Ecuación 1) del grupo de células tratadas

(cantidad de MTT convertidos en cristales de formazán), y se comparó con el control negativo (células sin tratamientos). La información está expresada como la media ± la desviación estándar de 3 experimentos independientes.

Ecuación 1. $$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{DO Células Tratadas}}{\text{DO Células Control}} \times 100$$

Donde:

DO Células Tratadas = promedio de las absorbancias a 595 nm de las células que fueron tratadas con las diferentes fracciones cromatográficas (10-400 µg/mL) por 24 h, y

DO Células Control = promedio de las absorbancias a 595 nm de las células que se utilizaron como control negativo (células sin tratamientos, solo cultivadas con medio F12K suplementado con FBS.

6.12 Expresión MMP-2 y MMP-9

La expresión de las gelatinasas *mmp-2* y *mmp-9* fue determinada mediante la metodología propuesta por Van-Ta *et al*. (2006) y Nguyen *et al*. (2012). Para este análisis las células fueron cultivadas como se indica en la sección 6.10. El inóculo se ajustó a $2x10^5$ células/pozo en placas de 48 pozos con medio F12K libre de suero FBS. Después de 24 horas de incubación a 37°C, 5% de humedad y CO_2 atmosférico se retiró el medio de cultivo y las células se trataron por 1 hora con diferentes fracciones cromatográficas provenientes de *H. fulgens* (HPLC, HR-S100, Tabla VIII, sección 7.2) con rango de peso molecular entre 62.2- 31 kDa y concentración de proteínas de 300 µg/mL (por triplicado), seguido de la incubación con PMA (10 ng/mL) por 36 horas.

De manera paralela, se llevó a cabo un ensayo bajo las mismas condiciones que el anterior, pero la adición del PMA se sustituyo por medio F12K libre de suero FBS. El medio de todas las muestras se recuperó a las 36 horas de incubación y se almacenaron a -80°C hasta su posterior uso. Después de retirar el medio, las células fueron lisadas directamente en la placa con un sistema tampón llamado RLT (RNeasy Mini Kit,

QIAGEN) para la extracción de ARN, de esta forma las muestras se transfirieron a tubos estériles y se almacenaron a -80°C hasta la extracción de ARN total.

6.13 Extracción de ARN

El ARN de las células PC3 se extrajo con el RNeasy Mini Kit (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN resultante fue resuspendido en agua libre de ARNasas y almacenado a -80°C hasta su uso posterior.

El ARN fue cuantificado determinando la absorbancia de las muestras a 260/280 nm ($Abs_{260/280}$) en un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). La integridad de las preparaciones de ARN se determinó mediante electroforésis en geles de agarosa-TBE 1 X (con agua DEPC) al 1% (agarosa 0.56 g/synergel 0.012 g) preteñidos con bromuro de etidio (30 min, 80 V a temperatura ambiente) y para determinar contaminación con ADN se realizó un PCR directo usando el ARN como templado, visualizando la ausencia o presencia de productos de amplificación en geles de agarosa, como se mencionó anteriormente. Los geles fueron analizados bajo luz ultravioleta en un fotodocumentador Bio-RAD Chemi Doc ™ MP (Imaging System) y analizados con el programa Image Lab 2000.

6.14 Reacción en Cadena de la Polimerasa digital (ddPCR)

Para determinar los niveles de expresión de los genes *mmp-2* y *mmp-9* en las muestras de ARN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (ddPCR), primeramente se llevó a cabo la síntesis de ADN complementario (ADNc) mediante transcripción reversa (RT-PCR) utilizando el protocolo de Promega, ImProm-II™ Reverse Transcription System, siguiendo las instrucciones del fabricante. Una alícuota de 9 µL de ARN experimental (que correspondió a 8 ng de ARN total) fue mezclada con 0.5 µg de cada uno de los oligonucleótidos (1 µg/µL, sentido-F y antisentido-R) para obtener un volumen final de mezcla de reacción de 20 µL; la mezcla de ARN templado/oligonucleótidos fue desnaturalizada térmicamente a 70°C por 5 minutos y enfriada en hielo 5 minutos, y en seguida se adicionaron 10 µL de la mezcla de reacción (4 µL del tampón de reacción 5 X ImProm-II, 2.4 µL de $MgCl_2$ 25 mM, 1 µL de mezcla de dNTP 0.5 mM, 0.5 µL de

inhibidor de ribonucleasa Recombinant RNasin, 1 µL de la enzima ImProm-II™ Reverse Transcriptase RT). La reacción fue llevada a cabo bajo las siguientes condiciones: alineamiento a 25°C por 5 minutos, extensión a 50°C por 1 hora e inactivación de la enzima RT a 70°C por 15 minutos, para continuar con la amplificación de PCR; el ADNc sintetizado fue cuantificado midiendo la $Abs_{260/280}$.

La reacción ddPCR fue llevada a cabo siguiendo la guía de trabajo de PCR digital (QX200™ Droplet Digital PCR System y Droplet Digital PCR Application Guide, BIO-RAD), realizando un ensayo de gradiente de concentración como paso previo a la reacción de PCR, utilizando una mezcla de todas las muestras a analizar ajustadas a 100 ng/µL, y seleccionando 1 ng/µL como la concentración a la cual se expresaban mejor las gelatinasas *mmp-2* y *mmp-9*. La reacción ddPCR fue llevada a cabo en un volumen final de 20 µL conteniendo 5 ng/5 µL de ADNc, 1 µL de cada uno de los cebadores (F-R de MMP-2 o MMP-9, 100 nM), 10 µL de la mezcla de reacción, y 3 µL de agua estéril miliQ. Para la amplificación de las gelatinasas, se usaron los cebadores sintetizados por Macrogen: MMP-2 y MMP-9 (forwar y reverse), mostrados en la Tabla VI y VII (http://www.macrogen.com). La PCR fue llevada a cabo de acuerdo a los siguientes pasos en el termociclador: activación de la enzima a 95°C por 5 minutos (1 ciclo), desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineamiento/extensión a 60°C (40 ciclos), estabilización de la señal a 4°C por 5 minutos (1 ciclo), 90°C por 5 minutos (1 ciclo) y mantenimiento (opcional) 4°C infinito. Utilizando una velocidad de rampa de ~ 2°C por segundo.

Tabla VI.- Secuencia de cebadores sintetizados para el ensayo de expresión de la gelatinasa *mmp-2.*

Primer MMP-2						
	Secuencia	Posición de inicio	Posición final	Tm	pb	%GC
Forward	5'-ACATCAAGGGCATTCAGGAG-3'	1587	1606	60.1	20	50
Reverse	5'-GATCTGAGCGATGCCATCAA-3'	1720	1701	62.3	20	50
Producto	133 pb					

Tabla VII.- Secuencia de cebadores sintetizados para el ensayo de expresión de la gelatinasa *mmp-9.*

Primer MMP-9						
	Secuencia	Posición de inicio	Posición final	Tm	pb	%GC
Forward	5'- TTTGACAGCGACAAGAAGTGG-3'	1154	1174	61.4	21	46.7
Reverse	5'- CGGCACTGAGGAATGATCTAA-3'	1264	1284	60.22	21	47.62
Producto	133 pb					

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Hidrólisis del concentrado proteico

Para la obtención de los péptidos a partir de vísceras de abulón azul y amarillo, primeramente se llevaron a cabo ensayos para obtener hidrolizados proteicos, pasando por dos tratamientos de centrifugación a 10,000 *g*, -4°C por 20 min y a 100,000 *g*, -4°C por 60 minutos para la obtención de péptidos solubles mayormente clarificados. Las variables que se evaluaron, fueron el tiempo de incubación (dejando fija la concentración de enzima), tomando muestras a las cero, 2, 3 y 4 horas de incubación a 37°C (Fig. 4a y b), y por otra parte se evaluó la concentración de enzima (Wobenzym® como complejo enzimático) dejando fijo un tiempo de incubación de 4 horas y adicionando 0.4, 0.6, 0.8 y 1 g/mL (Fig. 4c y d).

Los resultados obtenidos para esta primera etapa, fueron para ambas variables una relación inversamente proporcional entre la concentración de proteína cuantificada (Bradford, 1976) y la variable estudiada, observándose que a medida que va aumentando la concentración de enzima/tiempo de incubación, la concentración de proteína en cada muestra tomada va disminuyendo respecto al eje de las "x". La relación inversa que se obtuvo en los gráficos (Fig. 5): tiempo de incubación y concentración de enzima, se debió a la cinética enzimática de la reacción, la actividad catalítica y la especificidad de las enzimas que componen Wobenzym® (Tabla IV, sección 6.4), para generar cortes mediante la hidrólisis de los enlaces peptídicos (Whitaker, 1994) en la cual están involucradas enzimas del tipo péptido hidrolasas como pancreatina, quimotripsina, tripsina, papaína y bromelina. Pero al no observar una asíntota sobre el eje de las variables y al no observar bandas bien definidas en los geles de poliacrilamida, lo cual indicaba todavía un complejo proteico con pesos moleculares altos en los hidrolizados, se continuaron realizando más ensayos aumentando la concentración de enzima, utilizando 10, 12.5 y 15 g y manteniendo fijo el tiempo de incubación a 24 horas. La mayor digestión en este último ensayo se encontró utilizando 12.5 g y 15 g de Wobenzym®, obteniéndose una concentración de proteína de 16 y 18 mg/mL respectivamente; pero al no observar diferencias significativas entre el

contenido de proteínas entre las tres digestiones enzimáticas, ni en el perfil electroforético (Fig. 6b), se utilizó el hidrolizado obtenido con 10 g de enzima para su fraccionamiento mediante HPLC. Lo anterior coincide con lo reportado por Bojórquez-Balam y colaboradores (2013), donde mediante el uso de una mezcla de enzimas con diferente o igual actividad catalítica obtuvo preparaciones proteicas con un alto grado de hidrólisis para la posterior obtención de fracciones peptídicas mediante cromatografía de filtración en gel. Las bandas de diversos pesos moleculares observadas en el perfil electroforético, pueden ser el resultado de la acción catalítica de las enzimas antes mencionadas.

La pancreatina es una enzima que se obtiene del páncreas del cerdo (por lo general) y está compuesta de diversas serin-proteasas con actividad de endopeptidasa como la tripsina, quimotripsina y elastasa, así como colagenasa y carboxipeptidasas A y B, aunque no todas las enzimas se encuentran en todas las especies (Hill *et al.*, (2006); www.biozym.de). La pancreatina permite hidrolizar uniones entre aminoácidos que se encuentran en el interior de una cadena polipeptídica (Bojórquez-Balam *et al*. 2013; www.biozym.de). Según el trabajo de Bojórquez-Balam, y en Hill y colaboradores (2006), la hidrólisis con pancreatina resulta en una mezcla de pequeños oligopéptidos (60-70%) y aminoácidos libres (30-40%), los cuales en un proceso digestivo estaría pasando a una hidrólisis ulterior por otras endo y exo-peptidasas a aminoácidos libres, dipéptidos y tripéptidos, para completar la digestión proteica en el interior de células del epitelio del intestino medio. Muchas serin-proteasas muestran preferencia por la hidrólisis de enlaces peptídicos adyacentes a una clase particular de aminoácidos. Por ejemplo, la tripsina rompe preferentemente los enlaces peptídicos situados a continuación de aminoácidos básicos tales como arginina o lisina; mientras que la quimotripsina hidroliza los enlaces peptídicos que se encuentran a continuación de aminoácidos hidrofóbicos de gran tamaño, tales como triptófano, fenilalanina o leucina. La elastasa por otro lado, rompe enlaces peptídicos situados a continuación de aminoácidos hidrofóbicos pequeños, tales como alanina. Pero, cabe destacar que la especificidad por un cierto tipo de aminoácidos indica únicamente una preferencia relativa; ya que por ejemplo, la tripsina puede también hidrolizar enlaces peptídicos situados a continuación de aminoácidos hidrofóbicos, aunque la velocidad de hidrólisis es mucho menor que la que presenta para los aminoácidos básicos. Así la

especificidad para hidrolizar el enlace peptídico de un tipo particular de aminoácido no es absoluta. Por otro lado, la bromelina y la papaína se clasifican dentro de las peptidasas cisteínicas y presentan gran analogía en el mecanismo catalítico con las peptidadasas serínicas, en razón de que en ambos grupos la enzima y el sustrato forman un complejo covalente debido a que el nucleófilo es parte de un aminoácido. El dador de protones, en todas las peptidasas cisteínicas identificadas, es un residuo de histidina y el tiol-nucleofílico, es el grupo sulfidrilo de un residuo de cisteína. La papaína, hidroliza enlaces peptídicos C-terminales de L-arginina, lisina, glicina y citrulina, así como los enlaces próximos a fenilalanina (Barrett *et al*., 2012; Devlin, 2004; Ferreira-Villa Real, 2010; Hill *et al*., 2006; Ruiz-Ruiz *et al*., 2013; Wang *et al*., 2011; Whitaker, 1994).

Cabe destacar que al someter los hidrolizados a una segunda centrifugación (100 000 *g*) y haberlos filtrado (papel Whatman grado 541), se mejoró ligeramente el proceso de purificación al poder separar una mayor cantidad de material no soluble de baja densidad, sin embargo, estas diferencias no fueron visibles en los perfiles electroforéticos de las muestras separadas en geles de electroforésis SDS-PAGE (Fig. 4b). De acuerdo con Protein Purification Handbook, (Amersham Pharmacia Biotech, 1999) las clarificaciones de muestras proteicas mediante centrifugación permiten la obtención de extractos proteicos de mayor pureza, considerándose pasos previos muy importantes si el paso siguiente que se desea realizar es una cromatografía. En este trabajo fue particularmente útil para el aislamiento de los péptidos con posible actividad antimicrobiana o antiproliferativa. Así también, de acuerdo con Ruiz-Ruiz *et al.* (2012) en: Bojórquez-Balam *et al*. (2013), lo anterior resultó conveniente porque cualquier componente no proteico como lípidos, fibra, hidratos de carbono y otros componentes menores como sustancias minerales, afectan la calidad final del concentrado proteico si se desea probar actividad biológica.

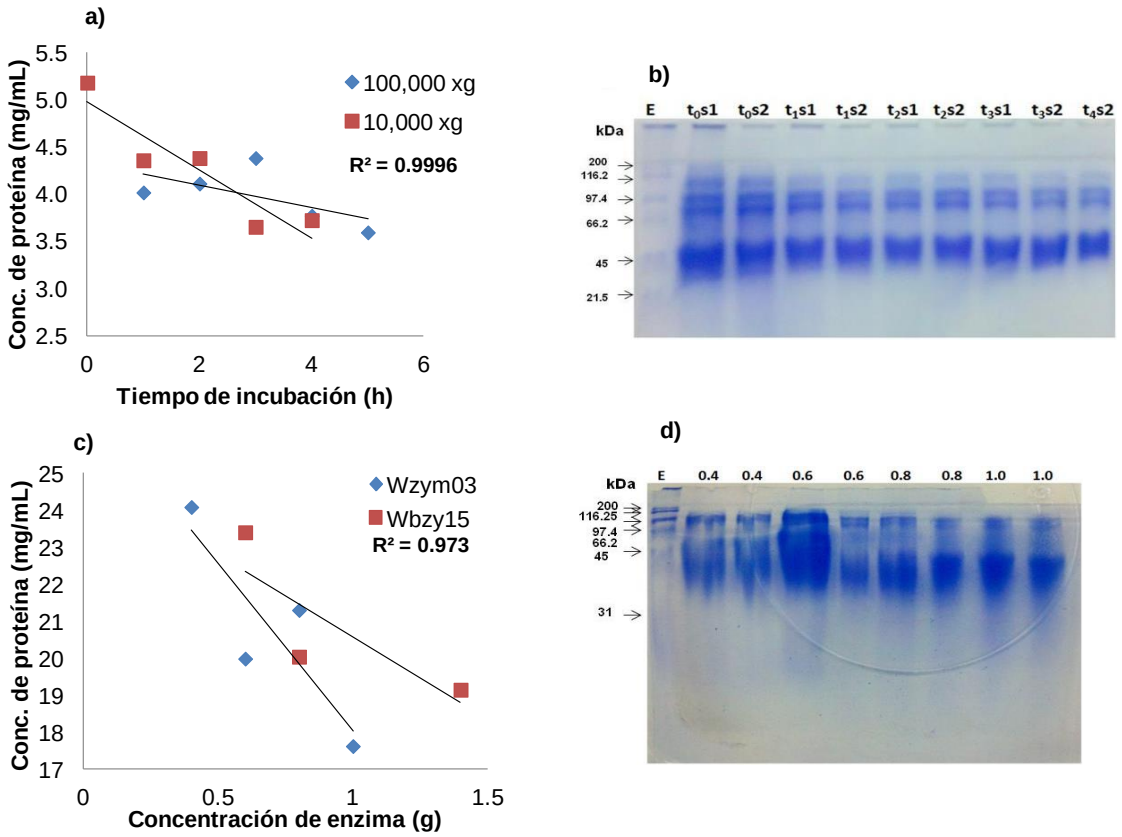

Figura 4.-Efecto del tiempo de incubación y la concentración de enzima (Wobenzym®) en la hidrólisis enzimática de un homogeneizado de vísceras de *Haliotis corrugata*. Panel a) Relación entre la concentración de proteína y el tiempo de incubación (0, 1, 2, 3, 4 h) en hidrolizados de vísceras, incubadas con 2 g de Wobenzym. Serie roja, efecto de la concentración de proteína con un paso de centrifugación a 10,000 *g*; serie azul, efecto de la concentración de proteína con dos pasos de centrifugación a 100,000 *g*. Panel b) Perfil electroforético SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 10% de muestras graficadas en (a). Panel c) Relación entre la concentración de proteína (Bradford *el al.*, 1976) y la concentración de enzima (0.4, 0.6, 0.8 y 1 g) incubadas por 4 h a 37°C. Panel d) Perfil electroforético SDS-PAGE al 10%, de las muestras representadas en (c). En los paneles b y d: línea E, marcador de peso molecular de amplio rango (BioRad) y línea t_0S1 y t_0S2, control: Concentrado proteico de vísceras sin enzima adicional tomada al tiempo 0 h.

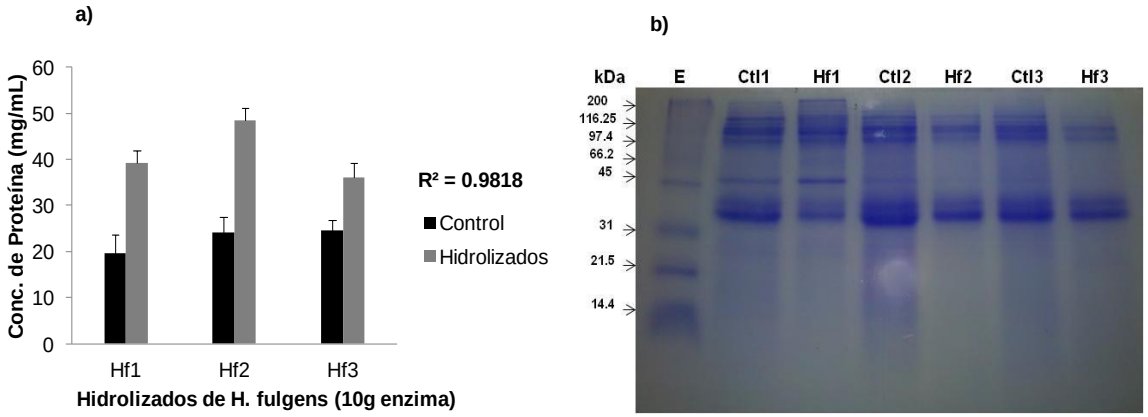

Figura 5.- Concentración de proteína (Lowry *et al*., 1951) en hidrolizados de vísceras de *H. fulgens* (por triplicado) y su digestión con 10 g de Wobenzym a 37ºC por 24 h. Panel a) Concentración de proteína en hidrolizados de vísceras de *H. fulgens* de tres muestras de organismos diferentes (Hf1, Hf2, Hf3). Serie negra, control: Concentrado proteico de vísceras sin enzima adicional (0). Serie gris, hidrolizados de 3 organismos diferentes con 10 g de enzima. Panel b) Perfil electroforético SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 10% de los hidrolizados de vísceras de las muestras anteriores. Bandas de proteínas entre 31-116.25 kDa. Línea E: Marcador de peso molecular de amplio rango. Línea Ctl 1-3: Controles y línea Hf1-Hf3: Muestras de hidrolizados.

7.2 Fraccionamiento de hidrolizados mediante HPLC en Sephacryl S-100

Para la obtención de las fracciones peptídicas, se inyectaron una serie de muestras de hidrolizados de abulón (Tabla V, sección 6.7) en un cromatógrafo de alta resolución (HPLC) usando una columna de filtración con Sephacryl S-100. Después de la inyección de las muestras y el análisis del perfil cromatográfico no se observaron grandes diferencias entre los perfiles cromatográficos de los hidrolizados proteicos obtenidos de vísceras de abulón amarillo y de abulón azul, al realizar el ensayo de las digestiones con 10 g de enzima, y por otro lado tampoco se observaron diferencias entre los perfiles obtenidos de *H. fulgens* con tres concentraciones distintas de enzima (10, 12.5 o 15 g de enzima). Sin embargo, al seleccionar 10 g de enzima para los ensayos que se realizaron por triplicado (Hf1, Hf2 y Hf3), el perfil cromatográfico que se obtuvo varió ligeramente con respecto a

los anteriores. En el perfil cromatográfico obtenido con las tres concentraciones distintas se observa que solo presentan ligeras variaciones, observando en todos 3 grandes picos indicando que hay 3 grupos de péptidos que se diferencian por su peso molecular (Fig. 6a). El pico con el menor volumen de retención que sale primero (de izq. a derecha) indica que hay una mezcla de péptidos con alto peso molecular, comprendidos entre 116.25-66.2 kDa, el segundo pico (mezcla de péptidos de intermedio peso molecular) consiste de péptidos con peso entre 45-21.5 kDa, y finalmente, el tercer pico corresponde a péptidos de bajo peso molecular, encontrándose estos en un intervalo de 21.5-6.5 kDa (Fig. 6b). Con respecto al perfil cromatográfico obtenido por triplicado, se observa que solo se presentaron 2 grandes picos, y un ligero tercer pico al final de la elución, y de igual manera se diferencian por su peso molecular (Fig. 7a y b). En este caso el primer pico que se observa, indica que hay una mezcla de péptidos de mayor peso molecular, comprendidos entre 200-97.4 kDa, y el segundo pico una mezcla de péptidos de menor peso molecular, los cuales se encuentran entre 66.2-31 kDa e incluyen a los péptidos que se pudieran encontrar en el tercer pico. Con las fracciones obtenidas se realizaron las pruebas de sensibilidad microbiana utilizando los microorgamisnos indicados en las Tablas II y III (sección 6.1); así como pruebas de citotoxicidad y de cuantificación de la expresión de transcritos de los genes que codifican las gelatinasas *mmp-2* y *mmp-9* en la línea celular PC3. En términos generales, se observó una mayor sensibilidad (S) microbiana con las fracciones de peso molecular intermedio (fracciones 30-40) y bajo (fracciones 43-48), y en el caso de los ensayos realizados con la línea celular PC3, los mejores resultados se obtuvieron con las fracciones (28-41) de péptidos de menor peso molecular.

Tabla VIII.- Muestras de hidrolizados de vísceras de abulón azul y abulón amarillo que se utilizaron para obtener las fracciones peptídicas mediante HPLC en Sephacryl S-100.

No	Especie	Wobenzym (g)	Tiempo de incubación (h)	Proteína (mg/mL)
1	*H. corrugata*	0.4	4	25
2	*H. corrugata*	10	24	14
3	*H. fulgens*			12
4	*H. fulgens*			19
5	*H. fulgens*	12.5		16
6	*H. fulgens*	15		18
7	*H. fulgens*1	10		39
8	*H. fulgens*2			48
9	*H. fulgens*3			36

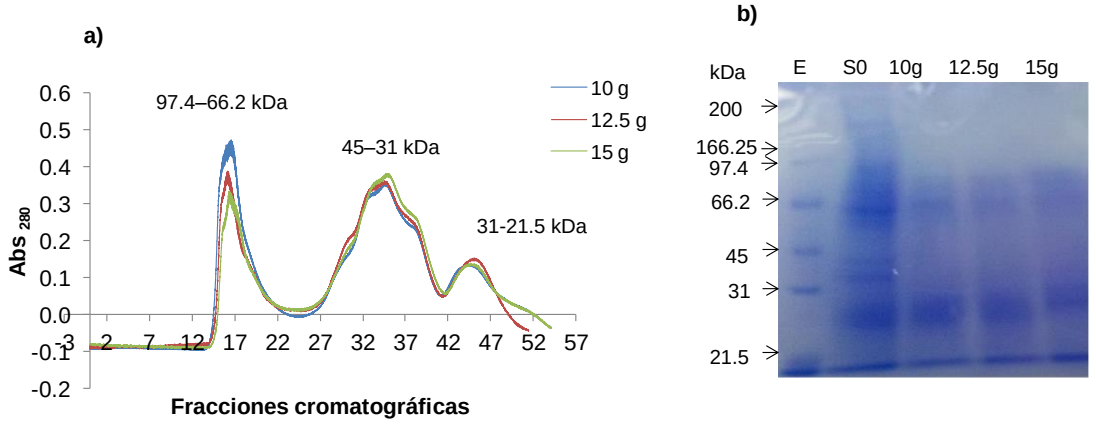

Figura 6.- Cromatografía de alta resolución HPLC, Sephacryl S-100 y perfil electroforético SDS-PAGE de hidrolizados proteicos obtenidos mediante hidrólisis enzimática de vísceras de *H. fulgens*. Panel a) perfil cromatográfico obtenido de la inyección de 2 mL de hidrolizados (36 mg totales de proteínas). Series: azul con 10 g de enzima; roja, con 12.5 g de enzima; verde, con 15 g de enzima. Se colectaron fracciones de 2.4 ml = 122.5 ml totales. Panel b), perfil electroforético SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 15% de las muestras inyectadas. Línea E, marcador de peso molecular de amplio rango; S_0, control: Concentrado proteico de vísceras sin enzima adicional. 10 g, 12.5 g y 15 g corresponden a los 3 picos (péptidos entre 97.4 - 21.5 kDa) generados con la cantidad de enzima indicada.

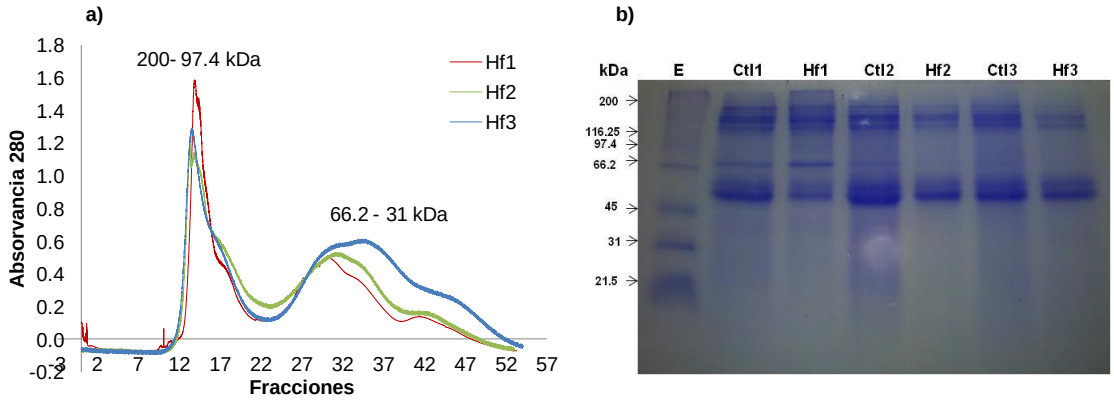

Figura 7.- Cromatografía de alta resolución HPLC, Sephacryl S-100 y perfil electroforético SDS-PAGE de hidrolizados proteicos obtenidos mediante hidrólisis enzimática con 10 g de Wobenzym® de vísceras de *H. fulgens* provenientes de organismos distintos (Hf1, Hf2, Hf3). Panel a): perfil cromatográfico obtenido de la inyección de 2 mL de hidrolizados. Serie roja, con 19 mg/mL de proteína, verde proteína con 16 mg/mL de proteína y azul con 18 mg/mL de proteína. Se colectaron fracciones de 2.4 ml = 122.5 ml totales. Panel b), perfil electroforético SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 10% de las muestras inyectadas. Línea E, marcador de peso molecular de amplio rango; Clt1-Clt3, control: Concentrado proteico de vísceras sin enzima adicional. Hf1-Hf3 corresponden a los 2 picos (péptidos entre 200 - 31 kDa) generados con la cantidad de enzima indicada.

7.3 Actividad Anti-microbiana (péptidos) en placa (pruebas preliminares) por el método de difusión radial en agar

Para evaluar la actividad antimicrobiana de los hidrolizados proteicos (digeridos con diferentes concentraciones de Wobenzym) y fracciones cromatográficas, provenientes de vísceras de abulón (*H. corrugata* y *H. fulgens*), mediante el método de difusión radial en agar, se realizaron varios ensayos de sensibilidad con las fracciones (Tabla VIII, sección 7.2), contrastando el efecto contra sustancias control (droga).

Los resultados obtenidos fueron los siguientes: De las 11 bacterias probadas (Tabla II, sección 6.1), solo 10 mostraron algún nivel de sensibilidad (inhibición de su crecimiento) hacia los controles y tratamientos-fracciones cromatográficas (Tablas IX). La única bacteria

que presentó resistencia a todos los controles positivos indicados en la sección 6.3, fue *S. enteritidis* (Gram negativa), por lo que se eliminó de las pruebas para mantener un control de bioseguridad. De todos los antibióticos probados (controles positivos: kanamicina 0.1 mg/mL, penicilina 20 U/mL y streptomicina/penicilina 20 U/mL), la gentamicina (0.1 mg/mL) fue la que mostró un mayor efecto sobre el crecimiento (diámetro de los halos de inhibición) en la mayoría de las bacterias probadas, por lo que se eligió como control positivo para los demás ensayos. Así también, después de realizar los primeros ensayos de actividad antimicrobiana y al observar que los halos de inhibición del crecimiento eran muy pequeños, se procedió a examinar todas las placas de los siguientes experimentos con un microscopio estereoscópico acoplado a una cámara digital, lo que permitió el análisis de las imágenes con el programa "Motic Image Plus" (Motic China Group Co. LTD).

Con respecto a los resultados provenientes de hidrolizados de *H. corrugata* (10g de enzima), se observó que algunas fracciones tuvieron actividad únicamente sobre tres especies de bacterias: *P. mirabilis* y *P. aeruginosa* (fracciones en un rango de peso 66.2-116.25 kDa), y la bacteria oportunista *B. subtilis* (fracciones en un rango de peso 6.5-21.5 kDa) que resultó ser ligeramente más sensible.

En el caso de las fracciones provenientes de hidrolizados de *H. fulgens* (10g de enzima), los halos de inhibición del crecimiento fueron mucho más visibles que en el caso anterior (Fig. 9-11), observándose sensibilidad para todos los ensayos realizados en un total de 7 especies de bacterias: *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *E. aerogenes* y *E. coli*, *S. thyphi*, *B. subtillis*, *S. aureus* (fracciones en un rango de peso entre 21.5-116.25 kDa). Por otro lado, con las fracciones provenientes de hidrolizados de *H. fulgens* (15 g de enzima), no se observaron diferencias al contrastar los resultados con los obtenidos con 10 g de enzima (Fig. 8).

Tabla IX.- Resultados de sensibilidad bacteriana *in vitro* para 5 bacterias Gram negativas (G-) y 2 bacterias Gram positivas (G+).

Hidrólisis de vísceras (g)	Sensibilidad Bacteriana	Peso molecular (kDa)
***H. corrugata* (10)**	- *P. mirabilis* - *P. aeruginosa*	116.25-66.2
	+ *B. subtilis*	21.5-6.5
***H. flulgens* (10)**	- P. *mirabilis* - *P. aruginosa* - *E. aerogenes* - *E. coli*	116.25- 6.5
***H. flulgens* (10/15)**	- *P. mirabilis* - *P. aruginosa* - *S. thyphi*	45-31
	+ *B.subtilis* + *S. aureus*	97.4-21.5
***H. flulgens* 1(10)**	- *S. thypi*	66.2-31
	- *E. coli*	200-116.25
	+ *B. subtilis*	200-31
***H. flulgens* 2(10)**	- *P. aeruginosa*	
	- *S. thypi*	66.2-31
	+ *B. subtilis*	200-31
	+ *S. aureus*	
***H. flulgens* 3(10)**	- *P. aeruginosa*	
	- *S. thypi*	66.2-31
	- *E. coli*	200-116.25
	+ *B. subtilis*	200-31
	+ *S. aureus*	

Control positivo: Gentamicina (0.1 mg/mL). Control negativo: Acido cítrico-citrato de sodio 150 mM (pH 5.6). Tratamientos: Fracciones cromatográficas HR-S100, de hidrolizados de vísceras de *H. corrugata y H. fulgens* digeridos con 10, 12.5 y 15 g de enzima por 24 horas a 37°C. Concentración de proteína en los hidrolizados: 12-48 mg/mL.

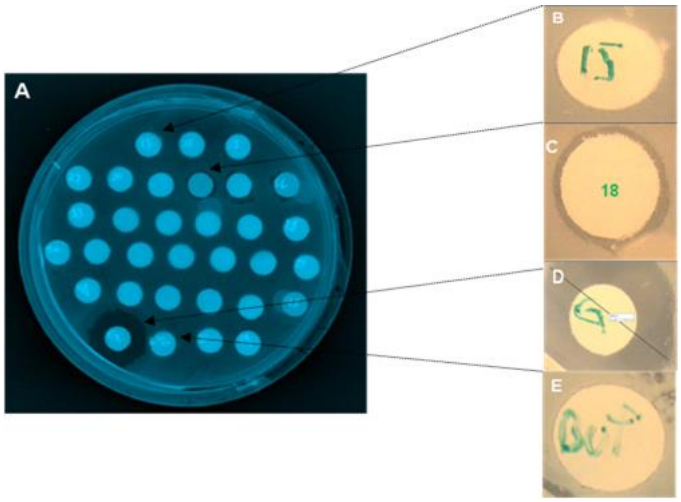

Figura 8.- Determinación de sensibilidad de *B. subtilis* a fracciones cromatográficas obtenidas mediante filtración en gel de (HR-S100) hidrolizados de vísceras de abulón *H. fulgens* obtenidos con 15 g de enzima. Paneles: A, 30 discos con fracciones cromatográficas de hidrolizados de vísceras de *H. fulgens*. Control positivo: gentamicina (0.1 mg/mL). Control negativo: Ac. cítrico-citrato de sodio 150 mM (pH 5.6). Detalles de halos de inhibición del crecimiento: fracción 15, panel B y fracción 18 (97.4-66.2 kDa), panel C; control positivo, panel D, control negativo de no inhibición, panel E.

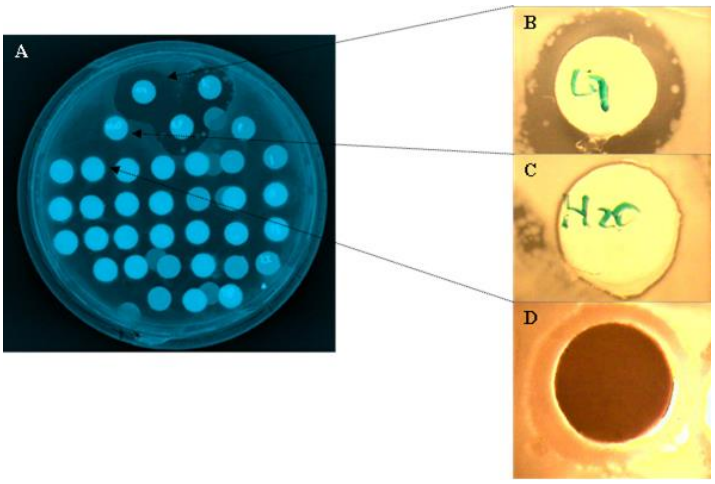

Figura 9.- Determinación de sensibilidad de *E. coli* a fracciones cromatográficas obtenidas mediante filtración en gel de (HR-S100) hidrolizados de vísceras de abulón *H. fulgens* obtenidos con 10 g de enzima. Panel: A, 30 discos con fracciones cromatográficas de hidrolizados de vísceras de *H. fulgens*. Control positivo: kanamicina (0.1 mg/mL), gentamicina (0.1 mg/mL), penicilina (20 U/mL) y streptomicina/penicilina (20 U/mL). Control negativo: agua destilada estéril. Detalles de halos de inhibición del crecimiento: control positivo (gentamicina), panel B; control negativo de no inhibición, panel C y fracción 6 (200- 116.25 kDa), panel D.

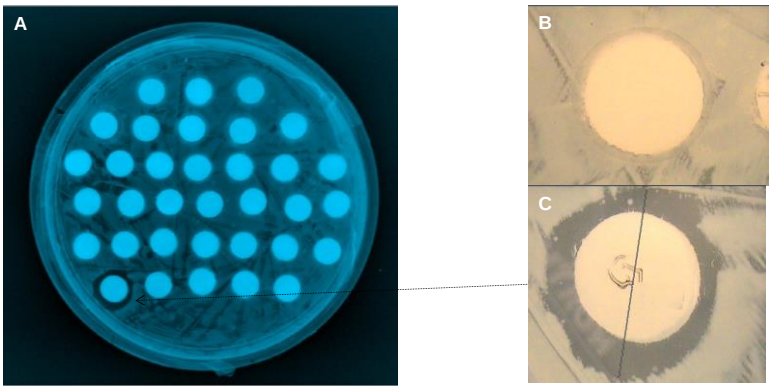

Figura 10.- Determinación de sensibilidad de *P. aeruginosa* a fracciones cromatográficas obtenidas mediante filtración en gel de (HR-S100) hidrolizados de vísceras de abulón *H. fulgens* obtenidos con 10 g de enzima. Panel: A, 32 discos con fracciones cromatográficas de hidrolizados de vísceras de *H. fulgens*. Control positivo: gentamicina (0.1 mg/mL). Control negativo: Ac. cítrico-citrato de sodio 150 mM (pH 5.6). Detalles de halos de inhibición del crecimiento: fracción 34 (45-31 kDa), panel B; control positivo (gentamicina) panel C.

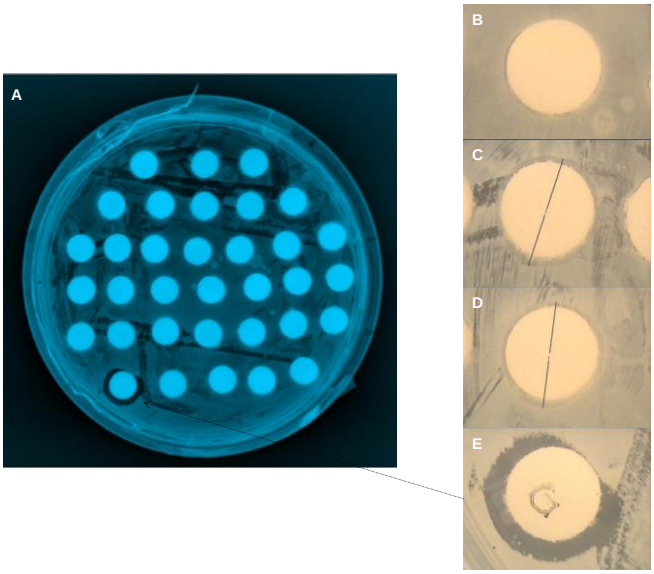

Figura 11.- Determinación de sensibilidad de *S. aureus* a fracciones cromatográficas obtenidas mediante filtración en gel de (HR-S100) hidrolizados de vísceras de abulón *H. fulgens* obtenidos con 10 g de enzima. Panel: A, 32 discos con fracciones cromatográficas de hidrolizados de vísceras de *H. fulgens*. Control positivo: gentamicina (0.1 mg/mL). Control negativo: Ac. cítrico-citrato de sodio 150 mM (pH 5.6). Detalles de halos de inhibición del crecimiento: fracción 29, panel B, 31, panel C y 38, panel D (45-31 kDa); control positivo (gentamicina) panel E.

En relación a la actividad atifúngica, las fracciones cromatográficas utilizadas fueron las provenientes de hidrolizados de *H. corrugata* (10g de enzima) y *H. fulgens* (10 y 15g de enzima).

Al utilizar las fracciones de *H. corrugata*, solo se presentó inhibición del crecimiento para *A. niger* en 2 fracciones (97.4-116.25 kDa) observándose como halos de inhibición irregulares (Fig. 12).

Al utilizar las fracciones de *H. fulgens* se presentó inhibición del crecimiento para *A. niger*, *A. alternata* y *A. flavus* presentándose en esta ocasión en un mayor número de fracciones (31-66.2 kDa) que con las fracciones provenientes de *H. corrugata* y observándose como la inhibición del cuerpo fructífero (Fig.13A-D). *Mucor* sp., no mostro sensibilidad a ninguna de las fracciones probadas.

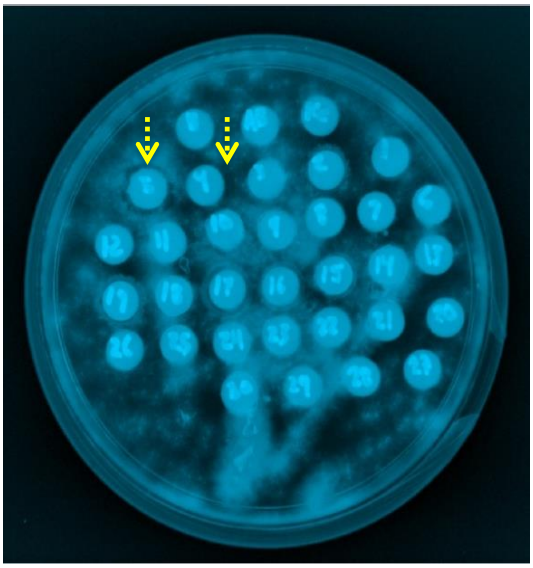

Figura 12.- Determinación de sensibilidad de *A. niger* a 2 fracciones cromatográficas obtenidas mediante filtración en gel (HR-S100) de hidrolizados de vísceras de abulón *H. corrugata* obtenidos con 10 g de enzima. Placa con 30 fracciones. Las flechas amarillas indican el halo de inhibición del crecimiento de *A. niger* con las fracciones 4 y 5 (97.4-116.25 kDa).

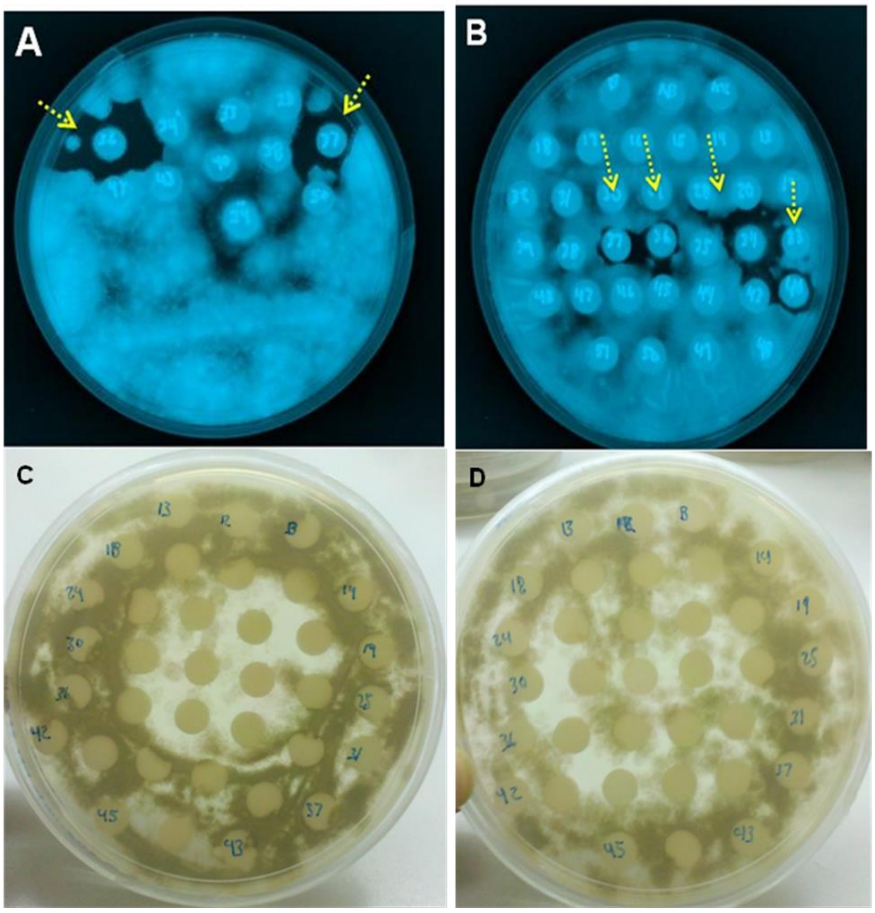

Figura 13.- Determinación de sensibilidad de *A. niger*, *A. alternata* y *A. flavus* a fracciones cromatográficas obtenidas mediante filtración en gel (HR-S100) de hidrolizados de vísceras de abulón *H. fulgens* obtenidos con 10 y 15 g de enzima. Panel A: Placa con 11 fracciones de hidrolizados de vísceras de *H. fulgens* (10 g de enzima) y detalles de halos de inhibición del crecimiento en *A. niger* con las fracciones 34, 36 y 37 (31-45 kDa) indicados con las flechas amarillas. Panel B: Placa con 30 fracciones de hidrolizados de vísceras de *H. fulgens* (15 g de enzima) y detalles de halos de inhibición del crecimiento en *A. niger* con las fracciones 33, 34, 37, 36 y 40 (31-45 kDa). Panel C y D: Placa con 35 fracciones de hidrolizados de vísceras de *H. fulgens* (10 g de enzima) y detalles de inhibición del cuerpo fructífero en *A. alternata* con fracciones en rango de 31- 66.2 kDa e inhibición del cuerpo fructífero en *A. flavus* con fracciones en rango de 31-66.2 kDa.

Con los agentes antifúngicos indicados en la sección 6.3, no se observó inhibición del crecimiento a ninguna de las diluciones probadas (1:2, 1:4, 1:6, 1:8, 1:10 y 1:100). Por lo tanto, y como se trata de aislamientos de cultivares de cítricos y otras plantas de interés comercial infectadas, se sugiere continuar probando otros antimicóticos tales como voriconazol, griseofulvina, caspofungina y/o itraconazol.

La disminución del crecimiento bacteriano y fúngico, posiblemente se debió a la presencia de péptidos con actividad antibacteriana y antifúngica generados en la hidrólisis enzimática. De acuerdo con Rivas-Santiago y colaboradores (2006), los péptidos antimicrobianos son moléculas efectoras clave en la inmunidad innata y son generados por células epiteliales y leucocitos, como es el caso de los macrófagos y neutrófilos. Actualmente, mediante el análisis en la traducción de secuencias, usando programas computacionales se han identificado muchos péptidos antimicrobianos y péptidos con otras actividades bilógicas, distribuidos entre los distintos reinos, logrando tener acceso a ellos por medio de bases de datos diseñadas para estos objetivos, como la base de datos BIOPEP, donde están registradas actualmente 3211 estructuras de péptidos bioactivos; teniendo (putativamente) un papel fundamental en la lisis directa de microorganismos; también se han descrito propiedades quimiotácticas, permitiendo participar en la modulación del sistema inmune.

En los trabajos de algunos autores como Kim y colaboradores (1999); Lahl y Braun, (1994) en: Kim y Wijesekara (2010) mencionan que los péptidos antimicrobianos están codificados dentro de secuencias precursoras en proteínas nativas, pero que también podrían generarse mediante hidrólisis enzimática *in vitro* como fue el propósito de este trabajo. Con base a lo anterior, se considera que las fracciones obtenidas por cromatografía HPLC (HR-S100) han sido una buena alternativa para obtener muestras con actividad antimicrobiana, lo que facilitaría el aislamiento de los péptidos en una segunda etapa de purificación.

De acuerdo con algunos autores (Bojórquez-Balam *et al.*, 2013); Kim y Wijesekara, 2010); Kim y Mendis, 2006); Rivas-Santiago *et al.*, 2006); Rivillas-Acedo y Soriano-García, 2006); Shahidi y Zhong, 2008) el efecto antimicrobiano de un hidrolizado o de una

fracción peptídica se debe a las características de los péptidos presentes, tales como la longitud de la cadena aminoacídica (2-200 residuos de aminoácidos), la composición, secuencia, estructura secundaria, hidrofobicidad (usualmente anfipáticos) y carga neta (en su mayoría presentan carga positiva). Sin embargo, hay quienes argumentan que (Boman *et al.*, 1995; Ganz *et al.*, 1985, en Rivas-Santiago *et al.*, 2006) hay dos características comunes en la mayoría de los péptidos antimicrobianos, sin importar su estructura o su tamaño: 1) tienen carga positiva debido a la presencia de un gran número de aminoácidos básicos (en su mayoría lisina y arginina), y 2) aproximadamente el 50% de los aminoácidos que los constituyen son hidrofóbicos (gran presencia de prolina).

Por otro lado, en la inhibición del crecimiento bacteriano es importante considerar también, la composición de la membrana celular del microorganismo, ya que al no ser igual para las bacterias Gram positivas (como *B. subtilis*) y Gram negativas (como *S. flexneri*), la interacción del péptido con la membrana u otros componentes celulares se da de manera distinta (Denisson *et al.*, 2005, en: Bojórquez-Balam *et al.*, 2013 y Shahidi y Zhong, 2008). Por ejemplo, la actividad antibacterial de las bacteriocinas (péptidos o proteínas sintetizados por los ribosomas de bacterias ácido lácticas) tienen un efecto letal sobre las células Gram positivas, desestabilizándolas, incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática a través de la formación transitoria de complejos de poros o canales iónicos, que causan una reducción o disipación de protones y el flujo para la salida de pequeñas moléculas como aminoácidos y ATP. Los péptidos cargados positivamente atraviesan la pared de lipopolisacáridos de bacterias Gram negativas o, en su caso, la pared ácida de polisacáridos de bacterias Gram positivas, desplazando por competencia los cationes divalentes que recorren y neutralizan los polisacáridos. Cuando el péptido se encuentra en bajas concentraciones, deja una disrupción fuera de la pared celular, mientras que a altas concentraciones la bacteria es lisada y desintegrada parcialmente (Shahidi y Zhong, 2008). Se han reportado otros mecanismos de acción en bacteriocinas, al igual que en otros tipos de péptidos antimicrobianos, por medio de interacciones con componentes intracelulares aniónicos, como el ADN y ARN, inhibiendo la síntesis de proteínas y la división celular. Otros péptidos están involucrados en la activación de la autólisis de

moléculas específicas en microorganismos (Shahidi y Zhong, 2008); supresión del crecimiento celular (Sivasubramanian *et al.*, 2011).

Los resultados de resistencia bacteriana obtenidos en las tres pruebas se puede deber a diversos factores, que se deben tener presentes antes de continuar realizando más pruebas de sensibilidad. De acuerdo con Bojórquez-Balam y colaboradores (2013) a menor grado de hidrólisis suele obtenerse mayor actividad antimicrobiana, ya que se generan péptidos de "mayor peso molecular"; no obstante los hidrolizados y las fracciones cromatográficas que obtuvieron mayores a 10 kDa (>10 kDa) no les generaron una inhibición del crecimiento bacteriano sobre *S. aureus* y *S. flexneri*, argumentando que podría haber otros componentes sin hidrolizar y carbohidratos que actuarían como fuente de alimento para los microorganismos. Lo anterior pudo haber sido uno de los factores por los cuales no se obtuvieron resultados de inhibición bacteriana y fúngica así como la concentración a la que se encuentra el péptido en las fracciones cromatográficas. Aunque cabe destacar que en el primer ensayo de sensibilidad bacteriana la concentración de enzima utilizada de 0.4-1.0 g para la digestión del concentrado protéico y el corto tiempo de reacción (4 h) quizá no fueron suficientes como para que se obtuvieran péptidos con actividad biológica, siendo que al realizar una electroforésis SDS-PAGE con las muestras, se obtuvieron proteínas en un rango de peso molecular entre 31 y 116.25 kDa (Fig. 4, panel d).

Bojórquez-Balam y colaboradores (2013) consideran que la mejor alternativa para obtener péptidos antimicrobianos (PAMs) son las fracciones menores a 10 kDa (<10 kDa). De igual manera, Rivillas-Acedo y Soriano-García (2006) mencionan que los PAMs aislados de plantas generalmente presentan un peso molecular menor a 10 kDa (con alrededor de 100 residuos de aminoácidos).

7.4 Efecto de las fracciones cromatográficas con diferentes pesos moleculares (62.2-31 kDa) sobre la viabilidad de las células PC-3

Para determinar el efecto citotóxico de las fracciones sobre cultivos de células PC3, el ensayo MTT fue llevado a cabo incubando las células a diferentes concentraciones (10, 50, 100, 200, 400 µg/mL) de las facciones de *H. fulgens* durante 24 horas en presencia de un

control negativo (sin tratamientos). Se probaron 14 fracciones cromatográficas (Tabla VIII, Fig. 5a y b, sección 7.2) que contenían péptidos dentro de un intervalo de pesos moleculares entre 61.2-31 kDa. De las fracciones ensayadas las que presentaron actividad citotóxica fueron 9 (fracciones 33-41, Fig.14) inhibiendo el crecimiento celular al menos al 50% a concentraciones entre 200 y 400 µg/mL, como resultado de su comparación con los valores de viabilidad relativa (% de viabilidad) de los cultivos control sobre la base IC_{50}; el resto de las fracciones estuvieron por arriba de este valor en diferentes magnitudes y en algunos casos no se observó actividad citotóxica teniendo un efecto similar al control (sin tratamiento). Los menores porcentajes de viabilidad se obtuvieron entre el 54-30% para las fracciones 33, 34, 38-41 a la concentración de 400 µg/mL. Cabe destacar que con ninguna fracción ensayada se observó un efecto destructivo, por lo menos a las concentraciones probadas, ya que no se obtuvieron valores negativos (indicativo de una droga altamente tóxica) como lo reporta Quispe (2009), en donde al probar los extractos de semilla *Annona cherimola* sobre diversas líneas celulares cancerígenas (Carcinoma epidermoide de cérvix, ME-180, adenocarcinoma de mama, MCF-7, leucemia mieloide crónica, K-262) obtuvo citotoxicidad con la mayor concentración probada (125 µg/mL), no solo inhibiendo el crecimiento celular, sino destruyendo las células inoculadas, indicando que obtuvo valores de porcentajes de crecimiento negativo, inclusive por encima de los valores obtenidos para los agentes quimioterapéuticos actuales usados (5-fluorouracilo y cisplatino). Mientras que con las menores concentraciones probadas (por debajo de 30 µg/mL) obtuvo una respuesta similar al control (células cancerígenas sin tratamiento), como se presentó en nuestro caso.

Rivas-Santiago y colaboradores (2006) mencionan que las defensinas (péptidos antimicrobianos encontrados en diversos mamíferos) muestran una gran homología con las defensinas tanto de otros mamíferos como de insectos, al igual que con algunas toxinas del escorpión y de una anemona marina. En estudios *in vivo* encontraron actividad antimicrobiana a concentraciones de 1-10 µg/mL (en promedio), sin embargo, a concentraciones mayores (15-30 µg/mL) los mismos péptidos exhibían actividad citotóxica. Además, se ha visto que las catelicidinas (péptidos antimicrobianos formados de 37 y 39 aminoácidos) pueden tener un efecto citotóxico promoviendo la formación de poros en la membrana celular (provocando lisis) o actuar directamente sobre el ADN o proteínas

bacterianas, atravesando la membrana celular sin causarle daño aparente (o efecto citotóxico) como la catelicidina PR-39 de cerdos, que tiene actividad a través del bloqueo de la síntesis de ADN al unirse a los grupos fosfato por uniones electrostáticas, y después insertarse en la cadena de nucleótidos (siendo más fuerte en la unión de los nucleótidos adenina-timina y citocina-guanina) inhibiendo la replicación, ocasionando así la muerte celular. Lo anterior permite sugerir, por una parte, que tanto la concentración del péptido como el tiempo de exposición son factores relevantes en la actividad de los péptidos sobre el modelo de estudio; aunque también puede presentarse un efecto de no citotoxicidad en las células, y tener actividad biológica, como lo fue reportado por algunos autores recientemente (Nguyen *et al*., 2012; Nguyen *et al*., 2013; Qian *et al*., 2013), en el que probaron fracciones peptídicas con diferentes pesos moleculares (> 100 kDa, 10-100 kDa y 1-10 kDa) y con diferentes concentraciones (10-1000 µg/mL), encontrando que aunque no presentaron ningún efecto citotóxico aparente las fracciones (por lo menos a la máxima concentración probada de 100 µM), a nivel molecular sí se presentó, estando involucradas la inhibición de las gelatinasas MMP-2 y MMP-9 entre otros factores. Así también, en el estudio de Van-Ta y colaboradores (2006) reportaron un efecto similar, al probar diferentes fracciones moleculares de quitooligosacarido (COS-I, COS-II y COS-III) sobre la expresión y actividad de MMP-9 en células de la línea HT1080, siendo las fracciones no citotóxicas sobre las células, pero si ocasionando un efecto inhibitorio en la expresión del gen y de la proteína de la gelatinasa-9. Los resultados anteriores permiten sugerir a las fracciones cromatográficas de mayor peso molecular probadas en este trabajo, las cuales no exhibieron un efecto citotóxico a las concentraciones probadas, como potenciales para continuar realizando más pruebas sobre un posible efecto en las metaloproteinasas. Así también podría atribuírseles, como posibles causas de no citotoxicidad, las características del péptido o, incluso el tiempo de exposición (24 h); y por el contrario, también puede ser una explicación para las fracciones de menor peso molecular en las que se observó un efecto citotóxico, siendo en este caso atribuído, en mayor parte a los péptidos involucrados en las fracciones, los que junto con la concentración permitieron un efecto citotóxico en las células PC3.

Cabe destacar, que una baja concentración del péptido (puro) puede conducir a la posibilidad de una administración tópica o sistémica en pacientes con lesiones en la piel (como heridas) para promover la cicatrización, al mismo tiempo de evitar una infección; como es el caso de las ß-defensinas y la LL-37 (Rivas-Santiago *et al*., 2006) donde describen que al ser aplicadas vía tópica inducen a una mejor cicatrización, debido a que estimulan la proliferación de células epiteliales, además de su efecto antimicrobiano. Este hecho le puede dar una ventaja en un futuro sobre otros antibióticos a los péptidos; además de que se puede buscar un tratamiento sinérgico (junto con otros antibióticos) para potenciar el efecto.

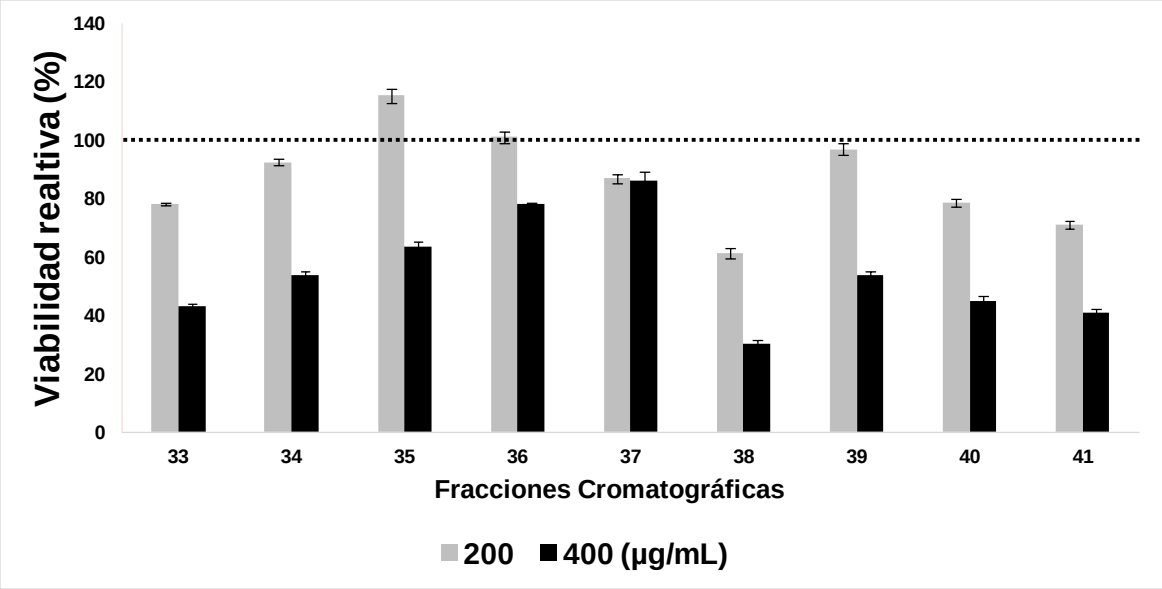

Figura 14.- Efecto de las fracciones cromatográficas (61.2-31 kDa) con dos concentraciones (200, 400 µg/mL) sobre la viabilidad relativa de las células PC-3. La viabilidad de las células fue determinada por el ensayo MTT después de 24 h de incubación. Control (línea punteada) células sin tratamientos: Expresado como el 100% de viabilidad. La información de la gráfica esta expresada como la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes.

7.5 Efecto de las fracciones cromatográficas con diferentes pesos moleculares sobre la expresión de las gelatinasas *mmp-2* y *mmp-9* en células de la línea PC-3

La línea celular PC-3 son células que han sido aisladas de un cáncer de próstata en progresión con metástasis al hueso, y fue utilizada en este ensayo para probar el efecto de fracciones cromatográfica (66.2-31 kDa) con concentraciones de proteína de 200 µg/mL y 300 µg/mL, sobre los niveles en la expresión de las gelatinasas *mmp-2* y *mmp*-9. Las fracciones fueron obtenidas mediante cromatografía HPLC (HR-S100), de una muestra proveniente de la hidrólisis enzimática (con 10 g de Wobenzym®) de vísceras de abulón azul (*Halliotis fulgens*). Los resultados obtenidos mediante PCR digital se muestras en copias por microlitro en la Tabla X y Figura 15. Los valores fueron presentados como la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes, y una $p = 0.05$ para indicar significancia estadística en aquellos valores que la alcanzaron (indicado en los gráficos con un asterisco).

Las células PC-3 fueron cultivadas en medio F12K como se indica en la sección 6.10, y luego transferidas a placas de 48 pozos a una concentración de $2x10^6$ células con medio libre de suero FBS, debido a su alto contenido de factores promotores de crecimiento celular. 24 horas después de la incubación se trataron las células con las fracciones correspondientes por 1 hora, y luego con PMA (10 ng/mL), incubando la placa por 36 horas adicionales.

Los resultados obtenidos en la expresión de las gelatinasas *mmp-2* y *mmp-9* después del tratamiento con la fracción 33, 38 y 41, fueron para ambas MMPs menores a los niveles obtenidos para los controles (negativo y positivo), observándose más altos los niveles en la expresión de transcritos para la gelatinasa *mmp-2* que de la *mmp-9*, tanto en las células PC3 designadas como control positivo (*mmp-2*, 74.2 copias/µL; *mmp-9*, 4.3 copias/µL), control negativo (*mmp-2*, 116 copias/µL; *mmp-9*, 4.5 copias/µL), como en las células que fueron tratadas con la fracción 33 (*mmp-2*, no se obtuvieron valores; *mmp-9*, 3.1 copias/µL), 38 (*mmp-2*, 12.7 copias/µL; *mmp-9*, 3.7 copias/µL) y fracción 41 (*mmp-2*, 12.2 copias/µL; *mmp-9*, 1.1 copias/µL). Sin embargo, las diferencias estadísticamente significativas solo se

presentaron para los valores obtenidos de *mmp-9* con la fracción 41 (t-student; $p = 0.010$ con respecto al control positivo, y $p = 0.0005$ al control negativo), más no para la *mmp-2*. Adicionalmente, esta fracción fue la que presentó los menores resultados de inhibición de las gelatinasas, con respecto a las demás fracciones. Los valores correspondientes para ambas gelatinasas al tratar las células con las fracciones 33 y 38, aunque se observaron diferencias con respecto a los controles, no alcanzaron la significancia estadística debido a que no cumplieron con las bondades de ajuste que propone la prueba t-student (dos muestras independientes), específicamente el supuesto que indica "si las varianzas poblacionales pueden ser o no asumidas iguales".

El siguiente ensayo que se llevó a cabo en paralelo al anterior, donde se varió únicamente el estímulo con PMA. Los valores se compararon con el control negativo; esperando evaluar por un lado el efecto de la fracción sobre las gelatinasas sin adicionar PMA, y por otro lado comparar los valores obtenidos (esperando que fueran menores) con los resultados de expresión de las gelatinasas debido al tratamiento con las fracciones y el estímulo con PMA como inductor tumoral. Los resultados que se obtuvieron (Tabla XI, Fig. 16) fueron, que al tratar las células con la fracción 33 y 41 a una concentración de 300 µg/mL y 200 µg/mL, respectivamente, se observó una inhibición en la expresión para ambas gelatinasas con respecto al control negativo (*mmp-9*, 4.5 copias/µL; *mmp-2*, 116 copias/µL), obteniéndose en general significativamente menos copias del trascrito para la *mmp-9*, que para la *mmp-2*, como sucedió en el ensayo anterior. Sin embargo, también en esta ocasión, la significancia estadística (t-test; $p = 0.05$) solo se presento para la gelatinasa-9 de ambas fracciones. Con la fracción 33 a la concentración de 300 µg/mL se obtuvieron 11.2 copias/µL correspondientes a la gelatinasa-2, habiendo presentado un decremento del 90.3%; para la gelatinasa-9 se obtuvieron 1.3 copias/µL (t-test; $p = 0.007$), observándose un decremento del 71.1%. Con la fracción 41 a la concentración de 200 µg/mL se obtuvieron 9.6 copias/µL correspondientes a la gelatinasa-2, y una inhibición del 91.7%. Para la gelatinasa-9, se obtuvieron 0.7 copias/µL, representando un decremento del 84.4%. Al comparar los valores de la fracción 41 con los correspondientes que recibieron el estímulo con PMA, se observó que quizas debido al inductor, se obtuvieron los ligeros incrementos para ambas gelatinasas; siendo 1.7 unidades y 0.2 unidades respectivamente.

Con respecto al tratamiento con la fracción 33, solo se lograron hacer las comparaciones con los valores obtenidos para la gelatinasa-9, observándose un incremento de 1.8 unidades. Los valores correspondientes a la expresionde la gelatinasa-2 no se obtuvieron por el equipo de PCR digital.

Los resultados obtenidos en este trabajo, con respecto al nivel de expresión de las gelatinasas (valor de expresión para *mm-2* mayor que para la *mmp-9*), pueden ser explicados mediante el estudio de Singh y colaboradores (2004), en el que evaluaron el efecto de dos proteínas de la superficie de membrana de manera individual (CXCL12 y CXCR4) y conjunta (CXCL12-CXCR4), en la modulación de la migración e invasión en líneas celulares de cáncer de próstata (PC3 y LNCaP), comparado con células epiteliales de próstata sana (PrEC), y su relación con la expresión de diversas metaloproteinasas (entre ellas las gelatinasas 2 y 9), ya que sugirió que CXCL12 y CXCR4 estaban involucradas en desencadenar la expresión de las MMPs y su mecanismo de acción en la progresión de células cancerígenas. Singh reportó que las gelatinasas 2 y 9 fueron igualmente expresadas por las células epiteliales de próstata sana y las dos líneas celulares tumorales, sin haber recibido ningún tratamiento con las proteínas CXCL12 y CXCR4. Sin embargo, un tratamiento con CXCL12, resultó en un significante incremento del mRNA de *mmp-2* y expresión de la proteína activa por las células PC3 y LNCaP, pero no en las células PrEC. Mientras que las líneas celulares de cáncer de próstata sin tratamiento expresaron niveles sgnificantes incrementados del mRNA de *mmp-9* y proteína activa de lo que lo expresaron las ceulas PrEC. En cambio el tratamiento con CXCL12 combinado con CXCR4 (CXCL12-CXCR4) resultó en una mayor expresión de *mmp-9* por las células PC3 que por las células LNCaP y PrEC. Sugiriendo que los resultados indicaban que la *mmp-2* y *mmp-9* son diferentemente expresadas en las diferentes líneas celulares que usó. Así mismo, el efecto de la interacción de CXCL12-CXCR4 sugiere que inducen niveles altos de mRNA y proteína activa de *mmp-2* por las células PC3 y LNCaP; e induce también niveles altos del mRNA de *mmp-9* y su proteína por las células PC3.

CXCL12-CXCR4 son proteínas que se encuentran presentes en la superficie de membrana de células cancerígenas, indicando un cáncer en progresión en etapa metastática;

y la expresión de CXCR4 se ha sugerido que podría estar correlacionado con una enfermedad severa. Debido a lo anterior, es que también se han relacionados con la progresión y adhesión de las células de cáncer de próstata al hueso y a los diferentes tejidos (Teicher y Fricker, 2010); sin embargo, Sinhg demostró en un ensayo de migración y adhesión *in vitro* que en la línea celular PC3 y LNCaP (células de adenocarcinoma de próstata, andrógeno sensibles, derivadas de la afección ganglionar supraclavicular izquierda) CXCR4 usa a CXCL12 como mecanismo dependiente de éste para promover la migración celular e invasión, así como la adhesión de las células malignas a las células endoteliales, observando que las células tumorales migraban en mayor número en un gradiente quimiotáctico con CXCL12 que sin éste, a diferencia de las células normales PrEC. Bajo ésta inducción fue que observó el incremento en la expresión de *mmp-2* y *mmp-9*, así como otras metaloproteinasas en diferentes magnitudes (Colagenasas MMP-1 y MMP-13; gelatinasas A y B MMP-2 y MMP-9 respectivamente; estromelisina-2 MMP-10; MMP-3; estromelisina-3 MMP-11; y MTI-MPP MMP-14).

Por otro lado, el PMA, forbol 12-meristato 13-acetato es un promotor tumoral (también llamado TPA), que actúa a través de la activación de la proteína quinasa C, siendo necesaria para controlar la inducción de la enzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (en su forma reducida) o más comúnmente llamada NADPH oxidasa en el sistema enzimático de membranas de los granulocitos y macrófagos, dando lugar a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), imitando así los diacilgliceroles derivados del glicerol, en el que dos grupos oxidrilo (-OH) han reaccionado con ácidos grasos para formar ésteres. Se ha reportado que el efecto promotor tumoral, requiere la producción de ROS, ya que es dependiente del estado oxidante de las células. PMA ha sido utilizado como promotor tumoral en diversas investigaciones biomédicas, utilizando modelos celulares carcinogénicos, provocando diversos efectos a nivel de crecimiento y diferenciación en diferentes niveles; así como el aumento en la expresión de diversas metaloproteinasas (incluyendo la *mmp-2* y *mmp-9*). Partiendo de este hecho fue que se utilizó como control positivo para evaluar junto con el control negativo un cambio en la expresión de las gelatinasas *mmp-2* y *mmp-9*, ya que las MMPs como se ha explicado antes, han sido ampliamente estudiadas por el papel que juegan en la metástasis tumoral (Crespi *et al.*,

1986; Boticario-Boticario y Cascales-Angosto, 2009; C.S.-Kong *et al.*, 2008; Nguyen *et al.*, 2012; Nguyen *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2004; https://www.sigmaaldrich.com).

Como conclusiones preliminares para este apartado, se resalta por una parte que hay consistencia en los resultados obtenidos para ambos ensayos con respecto al nivel de expresión de las gelatinasas. Así también, de las fracciones moleculares probadas en ambos ensayos, la fracción 41 a la concentración de 200 µg/mL, fue la que mostró mayor inhibición de ambas gelatinasas; por lo que se puede considerar como la fracción de menor peso molecular probada que mostró el mayor efecto inhibitorio debido a que perteneció al último pico del perfil cromatográfico (Fig 7, sección 7.2). Siendo esta información coherente con lo ya reportado por diversos autores como Nguyen y colaboradores (2013), para las fracciones moleculares de menor peso molecular y su relación con la actividad biológica, donde obtuvieron inhibición de las gelatinasas 2 y 9 en la línea celular HT1080 (proveniente de un cáncer de mama) con la fracción peptídica de menor peso molecular probada (>10 kDa) a la máxima concentración.

En el trabajo de Nguyen y colaboradores (2012) el efecto de la inhibición de las gelatinasas fue relacionado con las características del péptido de la fracción, como la composición de los aminoácidos de la cadena peptídica, consistiendo de mayor presencia de aminoácidos ácidos como: ácido glutámico y ácido aspártico, y otros como: prolina, alanina, histidina y lisina. Así mismo, glutamina, alanina e histidina, previamente han sido reportados por Emara y Cheung (2006) en: Nguyen *et al.* (2012) como importantes en la inhibición de las gelatinasas 2 y 9. El peso molecular del péptido también fue un factor determinante en la actividad, demóstrandolo al no tener inhibición con la fracción de mayor peso molecular (>100), y aunque con la fracción de 10-100 kDa obtuvo inhibición, fue mucho más notable con la de menor peso molecular (1-10 kDa). Por otra parte, Nguyen y colaboradores (2013) sugieren que uno de los mecanismos por el cual las fracciones llevan a cabo sus efectos inhibitorios en las MMPs, fue a través del factor de transcripción nuclear kappa B (NF-kB), debido a que observaron un decremento en los niveles de expresión de la proteína p65 (al medirla mediante western blot), la cual forma parte de uno de los heterodímeros denominado como p50/p65, pertenecientes a las proteínas de la familia NF-

kB/Rel (al que pertenece NF-kB), y debido a que las gelatinasas 2 y 9 presentan regiones promotoras con sitios para NF-kB, en consecuencia se podría ver afectada la actividad de NF-kB y suprimir el crecimiento tumoral y por tanto, la metástasis en la línea celular cancerígena HT1080.

En el trabajo de Singh, reportaron que el mecanismo para que se desencadene la metástasis del cáncer de próstata, es decir, el mecanismo que direcciona la migración de las células malignas hacia los diferentes órganos, aun no ha sido completamente comprendido tanto a nivel celular como molecular, estando implicados diversos factores en el proceso. Es por esta razón que no nada más la búsqueda de una nueva sustancia (droga) con actividad anticancerígena, sino investigar el mecanismo de acción y contemplar otras moléculas de relevancia (Garg *et al*., 2010) como las quimiocinas (direccionan la migración de células tumorales), caspasa-3 (marcador apoptótico) y Ki67 (marcador para la proliferación celular); además de los factores sociales y de estrés a los cuales está sometido el individuo, resultaría en un estudio más completo y es un amplio campo de investigación.

Los resultados obtenidos aquí comparados con los de Singh y Nguyen, podrían ser una justificación, para continuar realizando más pruebas (en un futuro) sobre las fracciones de menor peso molecular que no se utilizaron para esta prueba.

Tabla X.- Resultados de PCR digital de la expresión absoluta de los genes que codifican a los transcritos para las gelatinasas *mmp-2* y *mmp-9* (copias/µL) en células de la línea PC-3 después de ser tratadas con tres fracciones (61.2-31 kDa) a una concentración de proteína de 200 y 300 µg/ mL por 1 h y después estimuladas con forbol-12-meristato acetato 13-acetate (PMA; 10ng/mL) por 36 h.

PC-3 estimuladas con PMA		
Muestras	**Concentración (copias/µL)**	
	mmp-2	***mmp-9***
Ctl -	116.0	4.5*
Ctl +	74.2	4.3*
33(300)	-	3.1
38(200)	12.7	3.7
41(200)	11.3	0.9*

Tabla XI.- Promedio de los resultados de PCR digital de la expresión absoluta de los genes que codifican a los transcritos para las gelatinasa *mmp-2* y *mmp-9* (copias/µL) en células de la línea PC-3 después de ser tratadas con la fracciones cromatográficas 33 y 41 (61.2-31 kDa) a una concentración de proteína de 300 y 200 µg/ mL por 37 h, sin estimulación con forbol-12-miristato acetato (PMA).

PC-3 sin PMA		
Muestras	**Concentración (copias/µL)**	
	MMP-2	**MMP-9**
Ctl -	116	4.5*
33(300)	11.2	1.3*
41(200)	9.6	0.7*

Notación: Control negativo (C-), células PC-3 sin tratamiento adicional. Control positivo (C+), células PC-3 estimuladas con PMA. Valores representados como la media ± la desviación estándar de 3 experimentos independientes y un $P<0.05$ para indicar significancia estadística. Los asteriscos indican los valores que alcanzaron significancia estadística.

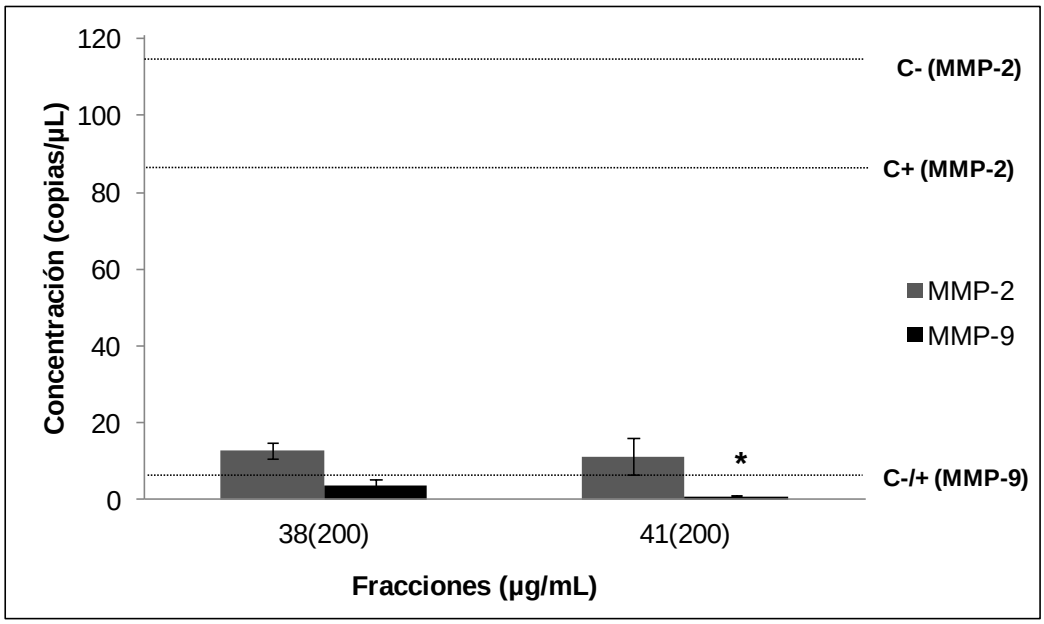

Figura 15.- Expresión absoluta de los genes que codifican a los transcritos para las gelatinasas *mmp-2* y *mmp-9* (copias/µL) en células de la línea PC3 y su efecto después de ser tratadas con las fracciones cromatográficas 38 y 41 (61.2-31 kDa) a una concentración de proteína de 200 µg/ mL por 1 h y después estimulada con forbol-12-miristato acetato (PMA; 10 ng/mL) por 36 h. Fracciones proveniente de hidrolizados de vísceras de abulón (*H. fulgens*) con 10g de enzima. Serie gris, gelatinasa *mmp-2* y serie negra, gelatinasa *mmp-9*. Control negativo (C-), células PC3 sin tratamiento adicional, indicado con línea punteada. Control positivo (C+), células PC3 estimuladas con PMA, indicado con línea punteada. Valores de gráfica, representados como la media ± la desviación estándar de 3 experimentos independientes y un $P<0.05$ para indicar significancia estadística. Los asteriscos representan los valores que alcanzaron la significancia.

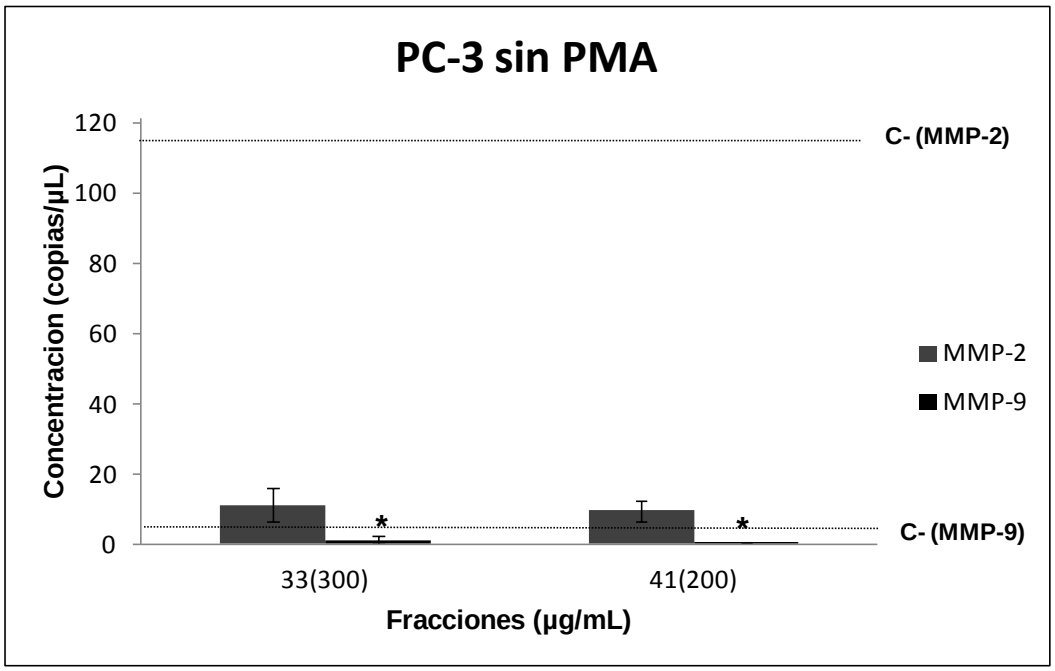

Figura 16.- Expresión absoluta de los genes que codifican a los transcritos para las gelatinasas *mmp-2* y *mmp-9* (copias/µL) en células de la línea PC-3 sin estímulo con PMA y su efecto después de ser tratadas con las fracciones cromatográficas 33 y 41 (61.2-31 kDa) a una concentración de proteína de 300 y 200 µg/ mL respectivamente, por 1 h. Fracciones proveniente de hidrolizados de vísceras de abulón (*H. fulgens*) con 10g de enzima. Serie gris, gelatinasa *mmp-2* y serie negra, gelatinasa *mmp-9*. Control negativo (C-), células PC-3 sin tratamiento adicional, indicado con línea punteada. Valores de gráfica, representados como la media ± la desviación estándar de 3 experimentos independientes y un $P<0.05$ para indicar significancia estadística. Los asteriscos representan los valores que alcanzaron la significancia.

8. CONCLUSIONES

- En la hipótesis planteada al inicio de este trabajo: "Si a partir de hidrolizados proteicos de vísceras e intestino de *H. discus hannai* es posible obtener péptidos con actividad biológica, entonces al usar vísceras de *H. fulgens* y *H. corrugata* como materia prima se obtendrán péptidos bioactivos", no se rechaza, ya que al obtener extractos y fracciones cromatográficas mediante hidrólisis enzimática *in vitro* de vísceras de las dos especies de abulón estudiadas, se obtuvo actividad antimicrobiana, en las bacterias y hongos patógenos seleccionados al inicio de este trabajo; así como actividad anticancerígena, en cultivos celulares con la línea PC3 proveniente de un cáncer de próstata con metástasis al hueso.
- Las variables "tiempo de incubación" y "concentración de enzima", son factores importantes en el proceso de hidrólisis, para la obtención de los péptidos y que deben considerarse para lograr mayor eficiencia durante todo el proceso. En este trabajo se encontró que para la obtención de los péptidos con 10 g de Wobenzym®, e incubando por 24 horas a 37°C, se obtuvo la mayor eficiencia de hidrólisis para ambas especies.
- Las condiciones de hidrólisis (el tiempo de incubación y concentración de enzima), no afectan la actividad biológica de los péptidos obtenidos una vez que ésta se ha llevado a cabo a saturación.
- Existen diferencias entre los perfiles de actividad biológica, observadas al probar los extractos y fracciones cromatográficas obtenidos a partir de vísceras de abulón azul y abulón amarillo (*H. fulgens* y *H. corrugata*); siendo más sobresaliente la observada a partir de fracciones de extractos de *H. fulgens*. Los mejores resultados de inhibición del crecimiento microbiano se encontraron con fracciones cromatográficas provenientes de hidrolizados de *H. fulgens* digeridos con 10 g de enzima por 24 horas a 37°C.
- Aunque hay pequeñas variaciones entre los perfiles de actividad antimicrobiana en los diferentes lotes de hidrolizados realizados a partir de ambas especies de abulón (diámetro del halo de inhibición del crecimiento), los patrones de actividad son

consistentes al considerar el rango de peso molecular y el tipo y número de especies a las cuales afectan (bacterias y hongos).

- En términos generales, el potencial antimicrobiano de las fracciones probadas es menor contra bacterias que el observado contra hongos (mg de proteína/mm del halo de inhibición del crecimiento); pero en términos de la amplitud (o espectro de actividad) de las fracciones como agente antimicrobiano, fue el mismo para ambos grupos de microorganismos, ya que en el espectro de actividad contra bacterias, 10 mostraron sensibilidad de 11 analizadas, y en hongos 3 mostraron sensibilidad de 4 analizadas.
- Los resultados más consistentes de sensibilidad bacteriana se observaron en dos especies de Gram positivas: *B. subtilis* y *S. aureus* y cuatro bacterias Gram negativas *S. thyphi*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* y *E. coli*; con fracciones cromatográficas en un rango de peso molecular entre 31-116.25 kDa.
- El potencial antifúngico de las preparaciones de péptidos obtenidos de abulón azul (y en menor proporción de abulón amarillo), es prometedor, dado que ante ninguno de los antimicóticos comerciales considerados como controles positivos (anfotericina: 0.4, 4, 25, 33, 50, 100 mg/mL), ketoconazol: 0.4, 4, 25, 33, 50, 100 mg/mL y fluconazol: 3 y 15 mg/mL) mostraron efecto ante *A. niger*, *A. flavus* y *A. alternata* y en *Mucor* sp.
- La sensibilidad para hongos, en términos de disminución del cuerpo fructífero se presentó en tres (*A. niger*, *A. alternata*, *A. flavus*) de las cuatro especies analizadas, cuando se trataron con fracciones cromatográficas en un rango de peso molecular entre 62.2-31 y 116.25-21.5 kDa.
- El perfil citotóxico de los extractos de vísceras de abulón azul (*H. fulgens*) es alentador por su citotoxicidad para células tumorales (PC3).
- Las fracciones 33, 34, 38-41 obtenida de los extractos de vísceras de abulón azul, compuesta por un rango de péptidos entre 66.2-31 kDa tienen un buen perfil de citotoxicidad inhibiendo el crecimiento celular entre 30.4-53.8% a una concentración de 400 µg/mL. Además, las fracciones 33, 38 y 41 perteneciente al mismo rango de peso molecular, inducida con PMA y no inducida, tiene un gran

potencial antitumoral y antimetastático debido a que inhibieron la expresión del gen para las gelatinasas *mmp-2* y *mmp-9*; sin embargo la fracción 41 a la concentración de 200 µg/mL, fue la que mostró los mayores efectos inhibitorios.

- En general, independientemente de la especie de abulón, la actividad antimicrobiana (bacterias y hongos) se presentó en la mayoría de los 3 grupos de las fracciones del perfil cromatográfico, a diferencia de la actividad anticancerígena que la mayor actividad se presentó con las fracciones de más bajo peso molecular.
- Los resultados permiten plantear a los hidrolizados proteicos de vísceras de *H. fulgens* y sus componentes activos (fracciones peptídicas) como una fuente potencial para obtener péptidos bioactivos en contra de microorganismos patógenos, y con gran potencial preventivo y terapéutico para enfermedades asociadas a la activación desmedida de las gelatinasas MMP-2 y MMP-9; así como fuente de nuevas sustancias anticancerígenas más un teniendo en cuenta su origen marino.
- Este tipo de trabajos brinda la pauta para continuar realizando investigaciones sobre el potencial bioactivo de las fracciones cromatográficas obtenidas de abulón azul y abulón amarillo, como las fracciones que no fueron analizadas; y continuar con los pasos de purificación hasta llegar a la obtención de la composición proximal de los aminoácidos, así mismo con la caracterización de los péptidos implicados en la actividad biológica.

9. SUGERENCIAS Y PRESPECTIVAS

- Se sugiere continuar con los pasos de purificación de las fracciones moleculares que mostraron actividad biológica, hasta llegar a la identificación de la secuencia y estructura.
- Los componentes activos aislados de hidrolizados proteicos de vísceras de *H. fulgens* y *H. corrugata* tienen potencial para emplearse como aditivos de origen natural en el desarrollo de sistemas alimenticios, presentando la ventaja de que al ser obtenidos bajo condiciones digestivas son mucho más resistentes a efectos fisiológicos como la degradación por enzimas digestivas y pH, y de no desarrollar mecanismo de inmunidad; también pueden emplearse como ingredientes nutracéuticos, o ser sintetizados para el uso de una nueva droga.
- Una vez completadas las pruebas correspondentes a la actividad biológica de los péptidos, se sugiere brindar una alternativa a la industria abulonera para realizar un uso integral del recurso y minimizar riesgos por contaminación.
- Se sugiere preparar los concentrados proteicos realizando una maceración de toda la víscera y no de un segmento de ella; así como llevar a cabo un bioensayo realizando la maceración de un número de vísceras de ambas especies de abulón y de ésta manera evaluar la obtención de un mayor número de fracciones bioactivas, y potencializar el efecto.
- Realizar las pruebas de actividad antimicrobiana ("screening") de los tratamientos (extracto crudo y fracciones cromatográficas) así como controles, mediante difusión de agar en pozo y bioautografía directa como métodos cualitativos (presencia o ausencia) debido a que han sido reportados Valgas *et al*. (2007) como los ideales para ofrecer mayor sensibilidad bacteriana, ya que ambas son técnicas muy sensitivas y de mejor calidad comparadas a las variantes en disco y bioautografía indirecta. Y por otro lado, se sugiere proseguir como ensayo cuantitativo (o semi cuantitativo dependiendo del objetivo) el método de micro dilución en caldo, utilizando placas de cultivo, para determinar la concentración inhibitoria mínima de las fracciones y del extracto puro.

- Se sugiere para evaluar la citotoxicidad de los tratamientos, utilizar un control negativo (células sin tratamiento) para cuantificar las células en un tiempo cero y después del tiempo de incubación establecido con los tratamientos, fijarlas con ácido tricloroacético (TCA) para tener un control del número de células que se mueren por causa natural o debido a la acumulación de metabolitos (cambio en el pH del medio de cultivo) con respecto a las que se ven afectadas por el tratamiento, adicional a las lecturas de absorbancia.
- Se recomienda utilizar en un futuro una línea celular sana proveniente del mismo tejido de la línea celular seleccionada (PrEC) u otra para contrastar la citotoxicidad obtenida con los tratamientos y la obtenida en células normales; ya que Quispe, (2009) reportó haber obtenido citotoxicidad con los extractos de semilla *Annona cherimola* sobre diversas líneas celulares cancerígenas mientras que en la línea celular sana no, siendo esto aún más prometedor en un futuro para la obtención de la sustancia pura en el tratamiento de pacientes sin efectos secundarios.
- Incluir todas las fracciones obtenidas en el cromatograma para los bioensayos, ya que aunque se han reportado péptidos bioactivos menores a 50 kDa (Bojórquez-Balam *et al*., 2013; Kim y Wijesekara, 2010; Mulero-Cánovas *et al.*, 2011; Rivas *et al*., 2006; Shahidi y Zhong, 2008; Sivasubramanian *et al*., 2011), al ser extraídos de una especie la cual no se han reportado trabajos relacionados, se pueden obtener péptidos bioactivos en otro rango molecular, como se presentó en este trabajo (>100-21.5 kDa).
- Evaluar la citotoxicidad, expresión y actividad de las MMPs de las fracciones en otras líneas celulares tumorales; y no descartar las que no den actividad citotóxica en la línea celular, ya que la inhibición de las MMPs se ha reportado como no relacionada con dicha citotoxicidad (Nguyen *et al*., 21012 y Van-Ta *et al*., 2006), de esta manera el trabajo se vuelve más prometedor, ya que las drogas actuales anticancerígenas poseen una alta citotoxicidad frente a todas las células del organismo, ocasionando efectos adversos a los pacientes, imposibilitando más su vida diaria por los efectos secundarios que por el tumor en sí mismo.

- Se sugiere continuar realizando más pruebas como la determinación del efecto quimiotáctico, ya que se ha demostrado que los péptidos antimicrobianos comúnmente exhiben ésta característica, y ello puede considerarse como un posible puente entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa.

10. BIBLIOGRAFÍA

Albrecht, P. G. 1921. Chemical study of severa1 marine mollusks of the Pacific Coast. J. Biol. Chem. 45: 395-405.

Aneiros, A., A. Garateix. 2004. Bioactive peptides from marine sources: pharmacological properties and isolation procedures. Elsevier. 41-53.

Barrett, A. J., N. D. Rawlings, J. F. Woessner. 2012. Handbook of Proteolytic Enzymes. Academic Press. 1: 4094.

Bio-Rad Laboratories. 2000. SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range. Cat. Num. 161-0317.

Bojórquez-Balam, E., J. Ruiz-Ruíz, M. Segura-Campos, D. Betancur-Ancona, L. Chel-Guerrero. 2013. Evaluación de la capacidad antimicrobiana de fracciones peptídicas de hidrolizados proteicos de frijol lima (*Phaseolus lunatus*). En: M. Segura Campos, L. Chel Guerrero y D. Betancur Ancona (eds.), Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias. OmniaScience. 139-154.

Bolcato-Bellemin, A. L, R. Elkaim, A. Abehsera, J. L Fausser, Y. Haikel, H. Tenenbaum. 2000. Expression of mRNAs encoding for alpha and beta integrin subunits, MMPs, and TIMPs in stretched human periodontal ligament and gingival fibroblasts. J Dent. Res. 79: 1712-1716.

Boticario-Boticario, C., Cascales-Angosto, M. 2009. Innovaciones en Cáncer. Editorial UNED. España. 624.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.

Carrasco-Jiménez, M. S., J. A. Paz-Cruz. 2000. Tratado de emergencias médicas. Ediciones ARÁN. II. Madrid. 1468-1470.

Carreón-Palau, L., S. A. Guzmán-del Proo, J. Belmar-Pérez, J. Carrillo-Laguna, R. Herrera-Fregoso. 2003. Microhábitat y biota asociada de juveniles de abulón *Haliotis*

fulgens y *H. corrugata* en Bahortugas, Baja California Sur, Mexico. Ciencias Marinas 29(3): 325-341

Cox, K. U. 1962. California abalones, family *Haliotidae*. Calif. fish and game. Fish. Bull., 118: 1-132.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Methods for dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. Clinical Laboratory Standards Institute document M7-A7 [ISBN]. Seventh edition. 26(2): i-ix, 1-49.

Crespi, M., A., G. C. Maldovan, J. Wittliff, A. Baldi. 1986. Cytotoxic action of forbol esters on cell-lines of human-breast cancer. Medicina-Buenos Aires. 46(5): 527-527.

Devlin, T. M. 2004. Bioquímica: Libro de texto con aplicaciones clínicas. Reverte. Quinta edición. España. 1219.

Dürr, M., A. Peschel. 2002. Chemokines Meet Defensins: the Mewrging Concepts of Chemoattractants and Antimicrobial Peptides in Host Defense. Infect. Immun. 70(12) 6515-6517.

Egeblad, M., Z. Werb. 2002. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nat. Rev. Cancer. 2: 161-174.

Emara, M., P. Y. Cheung, G. Krzysztof, S. Grzegorz, W. Mietek. 2009. Clin. Chem. Lab. Med. 47(8): 993-1000.

Emara, M., P. Y. Cheung. 2006. Inhibition of sulfur compounds and antioxidants on MMP-2 and -9 at the activity level found during neonatal hypoxia-reoxygenation. Eur J. Pharmacol. 544: 168-173.

Fredrich, M., R. B. Illing. 2010. MMP-2 is involved in synaptic remodeling after cochlear lesion. Neuroreport 21: 324-327.

Erasmus, J., P. Cook, V. Coyne. 1997. The role of bacteria in the digestion of seaweed by the abalone *Haliotis midae.* Aquacult. 155: 377-386.

Fallu, R. 1991. Abalone Farming. Fishing News Books. Great Britain. l-195.

Fata-Chillón, F. R. 2013. Gelatinasas (MMP-2, MMP-9) e inhibidor tisular de metaloproteinasas tipo 2 (TIMP-2) como marcadores de diagnostico y pronostico en el cáncer de vejiga. Tesis doctoral. Universidad de Alcalá. Madrid. 205.

Fleming, A. E., R. J. Van-Barneveldy, P. W. Hone. 1996. The development of artificial diets for abalone: A review and future directions. Aquacult. 140: 5-53.

Fothergill, A. W. 2012. Antifungal Susceptibility Testing: Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI) Methods. En: Hall, G. S. Interactions of Yeasts, Moulds, and Antifungal Agents: How to Detec Resistance. Springer. XIV, 170.

Garg, P., D. Sarma, S. Jeppsson, N. R. Patel, A. T. Gewirtz, D. Merlin, S. V. Sitaraman. 2010. MMP-9 Functions as a tumor suppressor in colitis-associated cancer. Cáncer. Res. 15; 70(2): 1-17.

Gómez-Pinchetti, J. L., G. García-Reina. 1993. Enzymes from marine phycophages that degrade cell walls of seaweeds. Mar. Biol. 116: 553-558.

Guzmán-del Proo, S. 1992. A review of the biology of abalone and its fishery in México. En: Shepherd, S. A., M. J. Tegner, S. A Guzmán-del Proo. Abalone of the world: Biology, Fisheries and Culture. (eds.) Proceeding of the 1st. International Symposium on Abalone. Fishing News Book, Oxford, London. 341-360.

Hahn, K. O. 1989. Survey of the commercìally important abalone species in the world. En: Hahn, K. O. (eds.) Handbook of Culture of Abalone and Other Marine Gastropods. Ed. CRC Press, Boca Raton. Florida. 1-13.

Hill, W. R., G. A. Wyse, M. Anderson. 2006. Fisiología animal. Ed. Médica Panamericana. 1038.

Kim, S. K., E. Mendis. 2006. Bioactive compounds from marine processing by products- A review. Elsevier. Food Research International. 39: 383-393.

Kim, S. K., I. Wijesekara. 2010. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. Elsevier. 2: 1-9.

Knauer, J., P. J. Britz, T. Hecht. 1996. Comparative growth performance and digestive enzyme activity of juvenile South African abalone, *Haliotis midae*, feed on diatoms and a practica1 diet. Aquacult. 140: 75-85.

Kong. C. S., Y. A. Kim, M. M. Kim, J. S. Park, J. A. Kim, S. K. Kim, B. J. Lee, T. J. Nam, Y. Seo. 2008. Flavonoid glycosides isolated rom *Salicornia herbácea* inhibit matrix metalloproteinase in HT1080 cells. Elsevier. 22: 1742-1748.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259): 680-685.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem.193: 265.

Mc Lean, N. 1970. Digestion in *Haliotis rufescens* Swainson (Gastropoda: Prosobranchia). J. Exp. Zool. 172: 303-318.

Malbrán, C. G. 2001. Manual de procedimientos para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos en bacterias aisladas de humanos. *Manual de salud*. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI). Buenos Aires, Argentina. 1-69.

Mulero-Cánovas, J., P. Zafrilla-Rentero, A. Martínez-Cachá Martínez, M. Leal-Hernández, J. Alemán-Abellán. 2011. Péptidos bioactivos. Elsevier Doyma. 1-9.

Nguyen, V. T., Z. J. Qian, W. K. Jung. 2012. Abalone Haliotis *discus hannai* intestine digests with different molecule weight inhibit MMP-2 and MMP-9 expression in human fibrosarcoma cells. Fisheries and Aquatic Sciences. 15(2): 137-143.

Nguyen, V. T., Z. J. Qian, B. Ryu, K. N. Kim, D. Kim, Y. M. Kim, Y. J. Jeon, W. S. Park, I. W. Choi, G. H. Kim, J. Y. Je y W. K. Jung. 2013. Matrix metalloproteinases (MMPs) inhibitory effects of an octameric oligopeptide isolated from abalone *H. discus hannai*. Elsevier. Food Chemistry. 141. 503-509.

Petrikkou, E., J. L. Rodríguez-Tudela, M. Cuenca-Estrella, A. Gómez, A. Molleja, E. Mellado. 2001. Inoculum Standardization for Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi Pathogenic for Humans. J. Clin. Microbiol. 39(4): 1345-1347.

Picos-García, C. 1998. Proteasas digestivas de juveniles de abulón azul *Haliotis fulgens* (Philippi, 1845). Tesis de Maestría. CICIMAR. 75.

Qian, Z. J., S. A. Kim, J. S. Lee, H. J. Kim, I. W. Choi, W. K. Jung. 2012. The antioxidant and anti-inflammatory effects of abalone intestine digest, *Haliotis discus hannai* in RAW 264.7 macrophages. Biotechnology and Bioprocess Engineering. 17: 475-484.

Quintero, M., J. Monfort-Faure, R. Mitrovic-Dragoslav. 2009. Osteoartrósis. Biología, fisiopatología clínica y tratamiento. Ed. Médica Panamericana, 440.

Quispe, M., A., D. Callacondo-Riva, J. Rojas-Camayo, D. Zavala-Curzo, M. C. Posso-Rivera, A. J. Vaisberg-Wolach. 2009. Acta. Med. Per 26(3): 156-161.

Rivas-Santiago, B., E. Sada, R. Hernández-Pando, V. Tsutsumi. 2006. Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas. Salud Pública Mex. Vol. 48(1): 62-71.

Rivillas-Acevedo, L., M. Soriano-García. 2006. Antimicrobial peptides from plants as a mechanism of defense. Actual Biol 28(85): 155-169.

Ruiz-Ruiz, J., M. Segura-Campos, D. Betancur-Ancona, L. Chel-Guerrero. 2013. Proteínas y péptidos biológicamente activos con potencial nutracéuticos. En: M. Segura Campos, L. Chel-Guerrero, D. Betancur-Ancona (Eds.), Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias (11-27). OmniaScience. Barcelona.

Rupert, E. E., Barnes, D. R. 1996. Zoología de los Invertebrados. McGRAW-HILL. Edición 6. México. 1114.

Shahidi, F., B. Zhong. 2008. Bioactive peptides. Jour Aoac Int. Vol. 91(4): 914-31.

Singh, S., U. P. Singh, W. E. Grizzle, J. W. Lillard Jr. 2004. CXCL12-CXCR4 interactions modulate prostate cancer cell migration, metalloproteinase expression and invasion. Laboratory Investigation. 84, 1666-1676.

Sivasubramanian, K., Ravichandran S. Samuthirapandian, Kumaresan M. 2011. Preliminary studies for a new antibiotic from the marine mollusk *Melo melo* (Lightfoot, 1786). Elsevier. 310-314.

Teicher, B. A. y S. P. Fricker. 2010. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 Pathway in Cancer. Clin Cancer Res. 16(11): 2927-2931.

Valgas, C., S. Machado-Souza, E. F A. Smânia, A. Jr. Smânia. 2007. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. Brazilian Journal of Microbiology. 38:369-380.

Van-Ta, Q., M. M. Kim, S. K. Kim. 2006. Inhibitory Effect of Chitooligosaccharides on Matrix Metalloproteinase-9 in Human Fibrosarcoma Cells (HT1080). Marine Biotech. Springer. Vol. 8: 593-599.

Viana, M. T. 2000. Nutrición de Abulón. En: Civera-Cerecedo, R., Pérez-Estrada, C. J., Ricque-Marie, D. y Cruz-Suárez, L. E. (Eds.) Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias de IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola IV. La Paz, B. C. S., México. 33-41.

Vinueza-Burgoz, C. 2009. PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información genética celular (Real Time PCR: the new age of cellular genetic information). REDVET. Revista electrónica de Veterinaria. 10(2): 1695-7504.

Vu-Hu, T., Z. Werb. 2000. Matrix metalloproteinases: effects of development and normal physiology. Spring Harbor Laboratory Press. 14: 2123-2133.

Wang, J., L. L. Zhao, G. X. Sun, Y. Liang, F. A. Wu, Z. L. Chen, S. M. Cui. 2011. A comparison of acidic and enzymatic hydrolysis of rutin. African Journal of Biotechnology. Vol. 10(8): 1460-1466.

Wong, M. L. y J. F. Medrano. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. BioTechniques. 39: 75-85.

Whitaker, J. R. 1994. Principle of enzymology for the food sciences. MARCEL DEKKER, INC. New York. 625.

11. CONSULTA EN LÍNEA

www.atcc.org

http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep

www.bio-rad.com

www.biozym.de

CONAPESCA (2011). Anuario Estadístico de Acuacultura y Pesca. http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx

Convenio SEPESCA-CIBNOR. 1995. Desarrollo Científico y Tecnológico del Cultivo del Abulón. CIBNOR, B. C. S. 1-26.

http://www.cedmex.com.mx

http://cooperativaprogreso.com

http://www.inapesca.gob.mx

http://www.macrogen.com

www.sigmaaldrich.com