



ARTÍCULO ORIGINAL

Identificación de actividad inhibidora de Aminopeptidasa N aislada de riñón porcino, en invertebrados marinos de la plataforma insular de La Habana

Identification of porcine kidney Aminopeptidase N inhibitory activity, in marine invertebrates from Havana coastline

Isel Pascual Alonso, Yarini Manuel Arrebola Sanchez, Gladys Amalia Ruiz,
Mey Ling Reytor González y Aida Hernández-Zanui

Centro de Estudio de Proteínas,
Facultad de Biología, Universidad
de La Habana.

* Autor para correspondencia:

isel@fbio.uh.cu

RESUMEN

La enzima aminopeptidasa neutra de la familia M1 (APN, EC 3.4.11.2) se encuentra ampliamente distribuida en los seres vivos. En mamíferos, esta enzima se encuentra involucrada tanto en procesos fisiológicos como la digestión, la analgesia, la activación/inactivación de péptidos regulatorios y el control de la presión arterial así como en desórdenes de diferentes tipos donde resaltan el cáncer, la hipertensión y desregulación del sistema inmune. Esta enzima es actualmente blanco para la búsqueda de inhibidores específicos con potenciales aplicaciones biomédicas en dichas patologías. En el presente trabajo primeramente se purifica parcialmente la APN a partir de corteza de riñón porcino mediante la combinación de extracción con Triton X-100, cromatografía de intercambio anionico en DEAE-Sephacel y cromatografía de exclusión molecular en Sephadex-G200. Posteriormente, se realizó el cribado de actividad inhibidora de la enzima purificada, en extractos acuosos de invertebrados marinos. Se identificó por primera vez actividad inhibidora de esta enzima, en las especies *Briozoo sp2*, *Eucidaris tribuloides*, *Ophiocoma echinata*, y *Lisoclinum verrilli*, así como se confirmó la inhibición de esta enzima por *Diplosoma listerianum*. En todos los casos, con excepción de la especie *Lisoclinum verrilli*, la inhibición fue lenta. Para todas las especies seleccionadas la inhibición fue altamente dependiente de la dosis empleada con valores de IC_{50} en el intervalo de 0.11-2.39 mg/L. El empleo de diferentes tratamientos de clarificación permitió en todos los casos el incremento de la actividad inhibidora específica. Los resultados indican que estos invertebrados marinos constituyen especies promisorias para el aislamiento de nuevos inhibidores naturales de APN.

Recibido: 2015-11-12

Aceptado: 2016-02-04

Palabras clave: aminopeptidasa neutra, inhibidores, invertebrados marinos

ABSTRACT

*Neutral aminopeptidase from M1 family (APN, EC 3.4.11.2) is an enzyme characterized by a wide distribution in living organisms. In mammals, this enzyme is involved in physiological processes like peptide digestion, analgesia, activation/inactivation of regulatory peptides and blood pressure control. Additionally it is also associated to pathophysiological processes like cancer, hypertension and dysregulation of the immune system. For these reasons this enzyme is a current target for the development of inhibitors with potential biomedical applications. In the present contribution as first step we partially purified Aminopeptidase N from porcine kidney cortex by the combination of extraction with Triton X100, followed by anion exchange chromatography on DEAE-Sephacel and molecular exclusion on Sephadex G-200. The purified enzyme was used in the screening of APN inhibitory activity in aqueous extracts from marine invertebrates. We identified by first time inhibitory activity of this enzyme in the species *Briozoo sp*, *Eucidaris tribuloides*, *Ophiocoma echinata* y *Lisoclinum verrilli* and the inhibition by *Diplosoma listerianum* was also corroborated. In all cases, with the exception of the species *Lisoclinum verrilli*, the inhibition was slow. For all the species tested, the inhibition was also highly dependent of the dose with IC_{50} values in the range 0.11-2.39 mg/L. Different clarification treatments allowed in all cases to the increase in the specific inhibitory activity of each extract. The results indicate that these species of marine invertebrates are new promising sources of APN natural inhibitors.*

Keywords: neutral aminopeptidase, inhibitors, marine invertebrates

INTRODUCCIÓN

Las proteasas están involucradas directa o indirectamente en procesos fisiológicos claves como el crecimiento, la diferenciación celular, la nutrición, la apoptosis, la migración celular, entre otros. Dada su versatilidad y ubicuidad, también se encuentran directamente relacionadas con eventos fisiopatológicos tales como el desarrollo del cáncer, los desórdenes neurodegenerativos, respiratorios y cardiovasculares, así como infecciones parasitarias, virales y fúngicas (Leung *et al.* 2000; Abbenante y Fairlie 2005; Turk 2006; Drag and Salvesen 2010; Deu *et al.* 2012; Rascon and McKerrow 2013). Un ejemplo de esta versatilidad y ubicuidad lo constituye la enzima Aminopeptidasa N, la cual se encuentra altamente conservada en todos los organismos. La enzima Aminopeptidasa N de mamíferos (APN, EC 3.4.11.2), también conocida como CD13, es una metalopeptidasa que pertenece a la familia M1, subclan MA (E) (Rawlings *et al.* 2014). Es una glicoproteína de membrana tipo II. En la mayoría de las especies la enzima nativa existe como un homodímero (Luan y Xu, 2007; Wong *et al.* 2012; Chen *et al.* 2012; Rawlings *et al.* 2014; 2016) con una masa molecular aproximada del monómero de 140 a 150 kDa, aunque se ha informado que en el caso del conejo se presenta como monómero (Feracci y Maroux 1980). En la enzima humana (APNh), cada monómero tiene 967 aminoácidos (Luan y Xu 2007; Mucha *et al.* 2010; Wong *et al.* 2012;) y en la porcina (APNp) tiene 963 aminoácidos (Chen *et al.* 2012). A partir del

alineamiento de las secuencias aminoácidas de ambas proteínas se ha determinado que existe un 80% de identidad de secuencia; tienen propiedades bioquímicas y cinéticas indistinguibles, por lo que con frecuencia la APNp se emplea como modelo en el estudio de la APNh (Tieku y Hooper, 1992; Shim *et al.* 2003; Pascual *et al.* 2004; Mucha *et al.* 2010). En ambas enzimas los aminoácidos están agrupados en siete regiones: una cola intracelular corta, un pequeño segmento o región de transmembrana, un pequeño tallo extracelular y una región extracelular grande (Wong *et al.* 2012; Chen *et al.* 2012). Esta última región está organizada en cuatro secciones, también reconocidas como dominios acorde al plegamiento característico de las metalopeptidasas M1 (Thunnissen *et al.* 2001; Kyrieleis *et al.* 2005; Wong *et al.* 2012; Chen *et al.* 2012; Revisado en Pascual *et al.* 2015).

La APN se encuentra ampliamente distribuida en numerosos tejidos de los mamíferos entre los que destacan el riñón y el borde en cepillo intestinal, donde participa en la digestión y absorción de péptidos. También se localiza en cerebro, donde desempeña un importante papel en la hidrólisis de encefalinas, péptidos que funcionan como ligandos de los receptores involucrados en la regulación del estado de analgesia en el organismo (Poras *et al.* 2014; Bonnard *et al.* 2015). La APN constituye un marcador de superficie de numerosas células del Sistema Inmunológico (CD13), donde posee diversas funciones: degradación de citoquinas y péptidos antigénicos, regulación y

transducción de señales, entre otras. Trastornos que involucran incrementos en la expresión y en la actividad de esta enzima se correlacionan de forma directa con fenómenos de angiogénesis e invasión tumoral (Luan y Xu 2007; Mucha *et al.* 2010; Wickstrom *et al.* 2011). Por este motivo la APN es hoy en día enzima blanco para la búsqueda de inhibidores potentes y selectivos con potenciales aplicaciones biomédicas. Adicionalmente, se le ha descrito como el receptor celular de diferentes tipos de virus, coronavirus y citomegalovirus (Luan y Xu 2007; Mucha *et al.* 2010; Zhang *et al.* 2011).

Los inhibidores de proteasas tradicionalmente se han desarrollado a partir de cribados en fuentes naturales. Se ha demostrado que los inhibidores naturales presentan una mayor diversidad química, inocuidad, elevada potencia y especificidad, así como menor carácter hidrofóbico (Abbenante y Fairlie 2005). Dentro de las fuentes naturales de moléculas bioactivas resaltan los organismos marinos. En especial, los invertebrados se encuentran ampliamente distribuidos en las costas de Cuba y representan una fuente natural importante de polipéptidos bioactivos que incluyen inhibidores de proteasas de diferentes clases mecánicas (Chávez *et al.* 1987; 1988; Delfín *et al.* 1994; 1996; González *et al.* 2004; Pascual *et al.* 2004; 2005; 2007; Gonzalez *et al.* 2007; Alonso del Rivero *et al.* 2012; Covalada *et al.* 2012).

En particular, los informes de inhibidores de APN a partir de organismos marinos son escasos, con solo dos reportes de moléculas con actividad inhibidora de la APNp: psammaplina A aislada a partir de la asociación entre las esponjas *Poecillastra* sp y *Jaspis* sp (Shim *et al.* 2004) y HcPI, aislado a partir del anélido marino *Hermodice carunculata*, actualmente el único inhibidor natural descrito para la enzima también miembro de la familia M1, Piroglutamil aminopetidasa II (Pascual *et al.* 2004). También se ha informado actividad inhibidora de APN porcina para extractos de la ascidia *D. listerianum* (Reytor *et al.* 2011). Sobre la base de estos antecedentes, el presente trabajo se propuso como objetivo identificar y caracterizar preliminarmente actividad inhibidora de APN porcina en extractos acuosos de invertebrados marinos de la plataforma insular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los riñones utilizados como material de partida para la purificación de la enzima APNp se extrajeron de

ejemplares sanos de cerdos de la especie *Sus scrofa ferus* y suministrados por el Instituto Nacional de Investigaciones Porcinas.

Los ejemplares de los diferentes organismos marinos utilizados en el estudio se colectaron con la cooperación del Instituto de Oceanología, en la costa de La Habana, durante diferentes épocas del año en el período 2006-2008. La clasificación se realizó por especialistas de este centro.

Los soportes empleados en la cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-Sephacel) y en la cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G-200), así como los inhibidores o-fenantrolina, bestatina, amastatina, actinonina y puromicina proceden de la firma comercial Sigma-Aldrich Co. MO, USA.

El sustrato sintético cromogénico empleado: Leucina-p-nitroanilida (Leu-pNA) proviene de la firma Bachem, Suecia. El resto de los reactivos utilizados fue de grado analítico.

Purificación parcial de la APNp a partir de corteza de riñón

Para la preparación del extracto crudo de riñón porcino, se diseccionó la corteza del órgano con escalpelo. El material obtenido se pesó y cortó en fragmentos pequeños con el uso de tijeras. Luego se procedió a su homogenización en un homogenizador de cuchillas "Man" (Panamá) (3 x 10s), en agua destilada, en una proporción de 1:2 (masa/volumen). Se procedió a la extracción de las proteínas de membrana mediante tratamiento con Tritón X-100 (0,1%) durante 30 min en agitación en baño de hielo. Posteriormente, el extracto tratado se centrifugó durante 1h a 10 000 g (Beckman J2 21, USA), y se procedió a la purificación de la enzima a partir de la fase soluble. El sobrenadante obtenido se equilibró por diálisis frente al tampón A: Tris-HCl 50 mmol/L, pH 8,0, 0,1 % Tritón X-100, con el empleo de membranas con límite de exclusión de 10 kDa. El procedimiento se realizó a 4°C, durante 8 h, con una relación 1:100 (volumen de muestra: volumen de tampón) y se realizaron dos cambios de tampón durante el proceso. El extracto dializado (500 mg) se aplicó a una columna (1,6 x 12 cm) DEAE-Sephacel previamente equilibrada con el mismo tampón de la muestra. Para ello se diluyó la muestra a la mitad con el tampón de equilibrio. Posteriormente, se lavó la matriz con tres volúmenes de columna (Vc) de tampón A, y se eluyeron las proteínas fijadas al intercambiador en dos etapas, mediante

el incremento de la fuerza iónica del tampón (0,15 mol/L y 1 mol/L de NaCl con el empleo de 3 Vc en cada etapa. La corrida se desarrolló a 29,9 cm/h y se colectaron fracciones de 3 mL. Las fracciones activas fueron unidas, concentradas por ultrafiltración con membrana de límite de exclusión 10kDa y aplicadas a una cromatografía de exclusión molecular, en matriz Sephadex G-200 (90 x 1,5 cm) equilibrada con tampón A, 0,15 mol/L NaCl. La corrida se desarrolló a 7 cm/h y se colectaron fracciones de 3 mL. Con el objetivo de evaluar el grado de pureza de la enzima APN parcialmente purificada se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 8 % en presencia de dodecilsulfato de sodio, según el método descrito por Laemmli *et al.* (1970).

Determinación de la concentración de proteínas

Durante el procedimiento de purificación de la enzima APN porcina la determinación de la concentración de proteínas para la confección de los cromatogramas de cada etapa de purificación, se realizó mediante lecturas de absorbancia a 280 nm, con el uso de un coeficiente de extinción arbitrario igual a la unidad (0,1 %, 1 cm) (Scopes, 1987), en un espectrofotómetro Ultrospec 4000 (Amersham, Biosciences, Alemania). Además, se tomaron alícuotas de las fracciones activas obtenidas en cada paso del protocolo de purificación, cuya concentración proteica se midió a partir de la variante del método de Bradford establecida por Scopes (1987) para placas de 96 pocillos. Se empleó la albumina de suero bovino como control (Bradford, 1976). De forma similar se procedió para la cuantificación de la concentración de proteínas en los extractos crudos de invertebrados marinos y los resultantes de los tratamientos de clarificación ensayados.

Determinación de la actividad enzimática y actividad inhibidora de APNp

Durante el proceso de purificación de la enzima porcina, la Actividad Enzimática (AE) de APN se determinó según lo descrito por Tieku y Hooper (1992), frente al sustrato cromogénico Leucil-p-nitroanilida (Leu-pNA), específico para la enzima. La mezcla de reacción consistió en 10 μ L de sustrato (3,0 mmol/L concentración en el ensayo), 50 μ L de la muestra de enzima ensayada, en un volumen total de 1 mL, completado con tampón Tris-HCl 50 mmol/L, Tritón X-100, 0,1%, pH 8,0. El seguimiento de la formación del producto de la hidrólisis enzimática (pNA, ξ 8,9 (μ mol/L)⁻¹) se realizó mediante el monitoreo de la absorbancia a 405 nm,

cada 15 s por 5 min en un espectrofotómetro cinético Ultrospec-4000 (Pharmacia Biotech, Suecia), mediante el empleo del programa Reaction Kinetic, suministrado por el fabricante. Los ensayos se realizaron a 37°C.

Durante los ensayos de inhibición se empleó la misma mezcla de reacción, pero en presencia de una concentración de sustrato en el ensayo de 0,3 mmol/L y se añadieron diferentes volúmenes de solución de la muestra cuya Actividad Inhibitoria (AI) se quería evaluar. La AI se determinó por la cuantificación de la disminución de la actividad de la APN en una muestra de la enzima preincubada durante 30 minutos a 37°C, con la fracción de inhibidor. Una unidad de AI se definió como la cantidad de muestra requerida para inhibir una unidad de AE de la APN.

Caracterización parcial de la enzima APN porcina purificada

La relación existente entre la velocidad inicial (v_0) y la concentración de la enzima presente en la muestra se evaluó para la enzima APN purificada de corteza de riñón porcino, proveniente de la cromatografía de exclusión molecular. Para ello se tomaron volúmenes crecientes (X) de la muestra (2-100 μ L) y se adicionaron a 990-X μ L del tampón de actividad Tris-HCl 50 mmol/L, pH 8,0, 0,1 % de Tritón X-100. El estudio del efecto del pH sobre la velocidad se realizó con el empleo de los siguientes tampones de actividad: acetato de sodio 50 mmol/L (pH 3,5-5,0), fosfato de sodio 50 mmol/L (pH 6,0-8,0), Tris-HCl 50 mmol/L (pH 7,0-9,0) y Glicina 50 mmol/L (pH 9,0-12,0). Se realizaron cuatro réplicas experimentales para cada valor de pH en estudio. Posteriormente, se determinó el valor de K_M de la APNp frente a concentraciones del sustrato Leu-pNA variables (0,06-7,5 mmol/L) (n=6). El valor de K_M se determinó a partir del ajuste de los datos experimentales (v_0 vs. $[S_0]$) a la ecuación $v_0 = V_{max}[S_0]/(K_M + [S_0])$ con el empleo del programa Origin 7.0. Por último se estudió el efecto de inhibidores específicos de la familia M1 (Bestatina, Amastatina, Actinonina y Puromicina, 10 μ mol/L de concentración final) y de la o'fenantrolina, inhibidor general de metalopeptidasas, a la concentración de 1 mmol/L, en condiciones similares al ensayo de actividad inhibidora descrito y con el empleo de 0,3 mmol/L de sustrato en el ensayo y tiempos de preincubación de 30 min.

Cribado de actividad inhibidora de la enzima APNp en extractos acuosos de organismos marinos

a) Preparación de los extractos crudos

Los ejemplares colectados en las costas de La Habana se transportaron en hielo al laboratorio, secados sobre papel de filtro, cortados en pequeños pedazos con tijeras y homogeneizados en agua destilada (2 mL/g) a 4°C en un homogeneizador de cuchillas Man (3 x 10 s). Los homogenizados se centrifugaron a 10 000 x g durante 30 min a 4°C (Beckman J2 21, California, USA). El sobrenadante se filtró sobre lana de vidrio (extracto crudo) y se liofilizó para su conservación a -20 °C hasta su empleo en el cribado de AI sobre la APNp.

b) Caracterización preliminar de la actividad inhibidora detectada en el cribado.

Primeramente, se determinó el tiempo necesario para establecer el equilibrio del sistema, para lo cual se incubó (n=4) la APNp con cada extracto marino a diferentes tiempos (1-60 min) y se determinó la actividad residual después de la adición del sustrato (0.3 mmol/L). Para los extractos promisorios se obtuvieron los comportamientos dosis-respuesta correspondientes a la evaluación de diferentes volúmenes (2-100 µL). Los valores de IC₅₀ se obtuvieron mediante el ajuste de los valores experimentales, de actividad residual de la APN a concentraciones crecientes de cada extracto, a la ecuación correspondiente incluida en el programa GRAFIT 6.0. La enzima se preincubó a 37°C en presencia de cada extracto durante el tiempo determinado para el establecimiento del equilibrio enzima-inhibidor en cada caso.

Clarificación de los extractos

a) Tratamiento con ácido tricloroacético

Teniendo en cuenta la estabilidad que presentan en medio ácido varios de los inhibidores de proteasas aislados de celenterados marinos (Wunderer *et al.* 1976), los extractos se sometieron a una clarificación con ácido tricloroacético (TCA). Para este propósito, 200 mg del extracto liofilizado se resuspendieron en 5 mL de agua destilada para su tratamiento con TCA hasta el 2,5 % de concentración en la mezcla final, en baño de hielo y agitación durante 30 min. Posteriormente, los extractos tratados se centrifugaron en condiciones similares a las empleadas en la preparación del extracto. Al sobrenadante se le ajustó el pH con NaOH 1 mol/L (Delfín *et al.* 1994) hasta un valor

de 8.0 y se dializó frente a agua destilada (1:100), con el uso de membranas con límite de exclusión de 500 Da, seguido de un segundo proceso de diálisis frente a tampón A, en ausencia de Tritón X-100, durante toda la noche.

b) Tratamiento térmico.

Como estrategia alternativa de clarificación, los extractos crudos se calentaron a 60°C durante 30 min. Una vez concluidos los tratamientos, los extractos se colocaron en baño de hielo hasta alcanzar temperatura ambiente (27°C) y se centrifugaron en condiciones similares a las empleadas en la preparación del extracto. El sobrenadante obtenido se dializó toda la noche a 4°C en condiciones similares a las descritas en el acápite anterior.

Procesamiento de los datos

En la caracterización cinética de la enzima APN porcina purificada los valores experimentales se ajustaron a una línea recta. Para las comparaciones de medias (del comportamiento de la actividad enzimática en función del pH del tampón de ensayo, del efecto de los inhibidores de metaloproteasas sobre la actividad de APN porcina, y del efecto del tiempo de preincubación en la inhibición de APN porcina) se realizaron pruebas de Tukey con un nivel de significación de $p < 0,05$. En la determinación del valor del parámetro

Tabla 1. Resumen de los parámetros del proceso de purificación de la enzima APN porcina.

Table 1. Summary of the porcine APN purification parameters.

Pasos de la purificación	At (U)	AEsp (U/mg)	R (%)	GP (veces)
Extracto crudo de riñón porcino	4.4890	0.0090	100	1
Cromatografía de intercambio aniónico	4.3668	0.0674	97.28	7.51
Cromatografía de exclusión molecular	3.0942	0.2865	68.93	31.91

At: actividad enzimática total; U: una unidad de actividad enzimática (AE); AEsp: actividad enzimática específica; GP: grado de purificación respecto a la etapa inicial calculado como AEsp de la etapa (n) dividida por la AEsp de la etapa inicial; R: rendimiento respecto a la etapa inicial calculado como At de la etapa (n) dividida por la At de la primera etapa de purificación expresado en por ciento.

At: total enzymatic activity; U: unit of enzymatic activity (AE); AEsp: specific enzymatic activity; GP: purification grade regarding the initial step as AEsp in the step (n) divided by AEsp of the initial step; R: yield regarding the initial step as At of the step (n) divided by At of the initial step expressed in percentage.

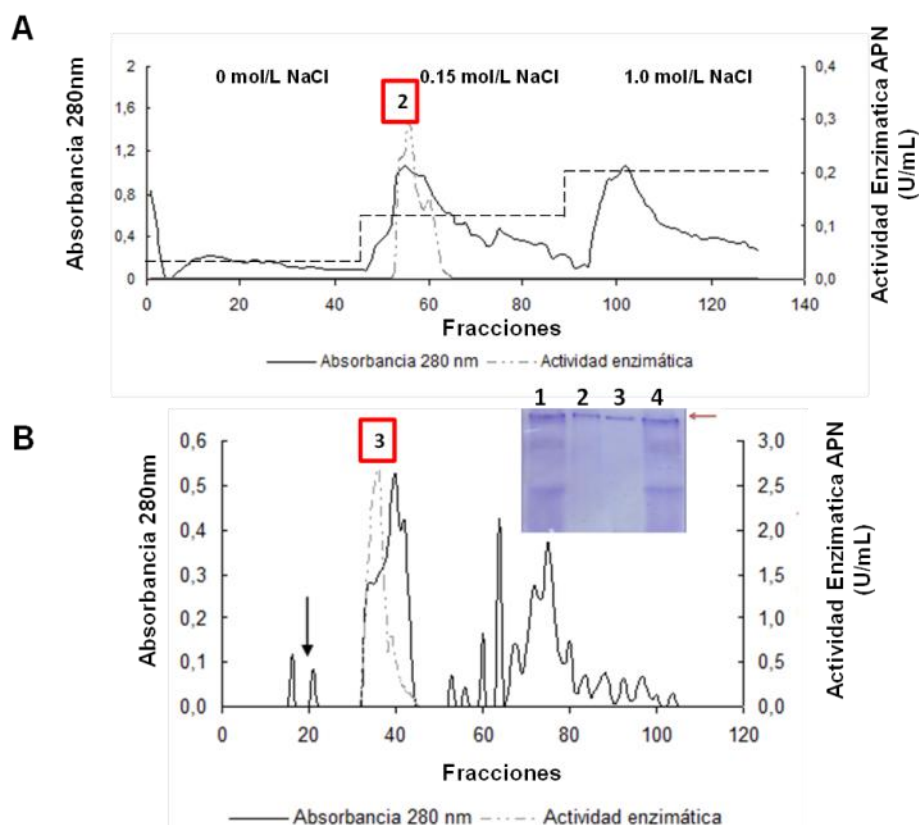


Figura 1. Purificación parcial de la APN a partir de corteza de riñón porcino. **A.** Perfil cromatográfico de intercambio aniónico en DEAE-Sephacel. **B.** Perfil cromatográfico de exclusión molecular en Sephadex G-200. Se señala en el gráfico con una flecha negra la fracción correspondiente a la elución del volumen muerto de la columna. Se muestra un inserto con los resultados del SDS-PAGE al 8%: carril 1, extracto crudo; carril 2, pico de la cromatografía en DEAE-Sephacel; carril 3, pico de exclusión molecular en Sephadex G-200.

Figure 1. Partial purification of APN from porcine kidney cortex. **A.** Chromatographic profile of anion Exchange chromatography on DEAE-Sephacel. **B.** Chromatographic profile of molecular exclusion chromatography on Sephadex G-200. The black arrow indicates the void volume of the column. Insert show the results of the SDS-PAGE gel at 8%: 1, crude extract; 2, peak with APN activity from DEAE-Sephacel chromatography; 3, peak with APN activity from Sephadex G-200 chromatography.

K_M de la enzima en presencia del sustrato Leu-pNA ($n = 4$) se realizó el ajuste de los valores experimentales a la hipérbola rectangular de Michaelis-Menten con el empleo del programa Origin 7.0. En la determinación de los valores de IC_{50} se realizó el ajuste de los datos a la ecuación pre-definida en el programa GRAFIT 6.0

RESULTADOS

Purificación parcial de la APN porcina

El extracto crudo de corteza de riñón porcino se caracterizó por presentar una AE de APN de $0,4489 \pm 0,0579$ U/mL y una AEsp de $0,0090 \pm 0,0005$ U/mg. (Tabla 1).

Como primer paso del proceso de purificación se realizó una cromatografía de intercambio aniónico

con DEAE-Sephacel (Fig. 1A). El perfil se caracterizó por un pico inicial conformado por todos los componentes que no se fijaron a la matriz en las condiciones utilizadas, donde, no se detectó AE de la APN. La elución de la columna se realizó por pasos y las fracciones que presentaron AE de tipo APN se correspondieron con el pico obtenido durante la elución con 0.15 mol/L de NaCl.

Las fracciones activas se caracterizaron por una AE de $0,2426 \pm 0,0783$ U/mL, y una AEsp de $0,0674 \pm 0,0219$ U/mg. Como resultado de esta etapa, se obtuvo un grado de purificación de la enzima de 7,51 y un rendimiento del 97,28 % respecto de la etapa inicial (Tabla 1).

Como segunda y última etapa del proceso de purificación parcial se realizó una cromatografía de exclusión molecular en una columna de Sephadex G-200. En la figura 1B se representa el perfil obtenido. La AE de la APN se detectó en un pico que se caracteriza por una elevada absorbancia a 280 nm y que eluye con un tiempo de retención mayor que el correspondiente al volumen muerto de la columna, lo que indica el reparto de la enzima en la matriz seleccionada y una masa molecular menor de 300 kDa, en correspondencia con lo descrito para la APN de mamíferos (Barret *et al.* 2003). Las fracciones con actividad enzimática se caracterizaron por una AE ($0,1146 \pm 0,0080$ U/mL), y una AEsp ($0,2865 \pm 0,0219$ U/mg). Como resultado de esta etapa, se obtuvo un grado de purificación de

31,93 veces, respecto al extracto de partida y rendimientos del 68,93 %. El resultado de la electroforesis SDS-PAGE realizada al 8% indica la obtención de una fracción enriquecida en un componente de alta masa molecular correspondiente a un peso alrededor de los 120 kDa aproximadamente según el porcentaje de gel empleado (no se contaban con patrones de masa molecular, el objetivo es solo mostrar el alto grado de pureza que caracteriza al pico que presenta actividad de APN, el cual contiene un componente mayoritario de alta masa molecular que se corresponde con los informado para el monómero de la APNp). No se detectó actividad tipo APN en las fracciones correspondientes al volumen muerto, así como tampoco en las demás fracciones de la cromatografía de exclusión

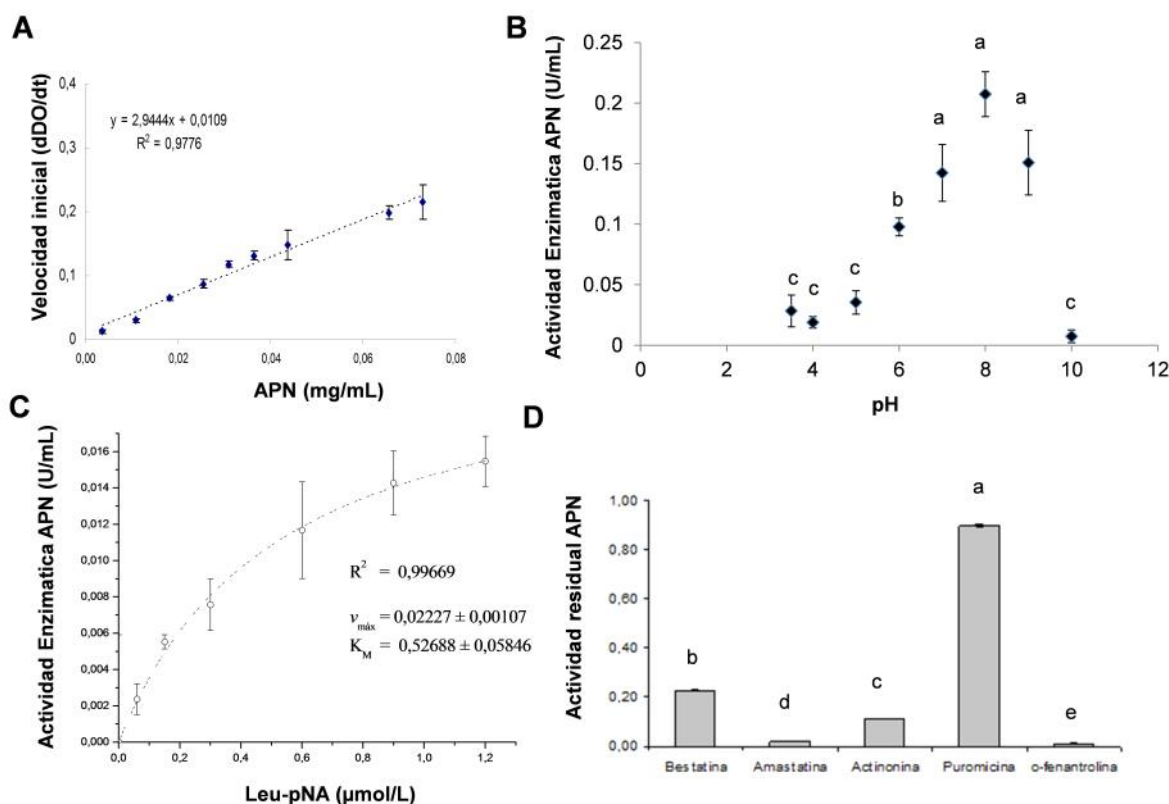


Figura 2. Caracterización cinética de la enzima APN porcina purificada. A. Comportamiento de v_o en función de la concentración de enzima. B. Comportamiento de la actividad enzimática en función del pH del tampón de ensayo. C. Determinación del valor del parámetro K_M de la enzima en presencia del sustrato Leu-pNA. D. Efecto de varios inhibidores de metaloproteasas sobre la actividad de APN porcina. Letras distintas indican diferencias significativas entre los grupos de tratamiento para $p < 0,05$.

Figure 2. Kinetic characterization of the porcine APN purified enzyme. A. linear relation between v_o vs protein concentration of the enzyme preparation. B. Effect of pH on APN activity. C. K_M value determination in presence of the substrate Leu-pNA. D. Effect on porcine APN activity of various metalloproteasases inhibitors. Different letters indicate significance difference among treatment groups for $p < 0.05$.

molecular, lo que sugiere que no hay presencia de otra entidad que pudiera hidrolizar el sustrato específico para la APN empleado en el presente trabajo.

Caracterización bioquímica parcial de la APN de riñón porcino

Una vez obtenida la enzima parcialmente purificada se procedió a realizar su caracterización funcional parcial.

a) Efecto de la [Eo], pH y [So] sobre la actividad enzimática de la APN porcina purificada

La actividad enzimática en función de la concentración de enzima en el ensayo (Fig. 2A) mostró un comportamiento lineal para los valores de concentración de enzima ensayados ($R^2 = 0,978$). A partir de este gráfico se seleccionó la concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$ de enzima para realizar el resto de los experimentos. El estudio del efecto del pH sobre la actividad de la enzima (Fig. 2B) a 37°C, mostró que la mayor actividad de la enzima se encuentra entre los pH 7,0 y 8,0. La enzima purificada fue menos activa a valores de pH ligeramente ácidos y básicos, menores que 6,0 y mayores que 9,0, respectivamente mientras que a valores de pH menores que 4,0 perdió prácticamente toda la actividad. Los ensayos cinéticos realizados a diferentes [So] permitieron determinar el valor de K_M de $0,50 \pm 0,05$ mmol/L de Leu-pNA (Fig. 2C).

b) Efecto de diferentes inhibidores de metalopeptidasas sobre la actividad de APN porcina

En los experimentos de inhibición se empleó una [So]=0,6 K_M , con el objetivo de minimizar los efectos de competitividad dados por elevadas concentracio-

nes de sustrato que pudieran afectar la detección de actividad inhibidora en las muestras. La APN porcina purificada resultó fuertemente inhibida por todas las moléculas utilizadas (Fig. 2D), con el siguiente orden de fortaleza puromicina < bestatina < actinonina < amastatina < o-fenantrolina.

Este estudio inicial permitió corroborar que la preparación tiene características bioquímicas similares a las informadas en la literatura para la APN de mamíferos, así como establecer las condiciones del ensayo de actividad para la realización del cribado de AI sobre APN en extractos acuosos de invertebrados marinos.

Cribado de actividad inhibidora de APN porcina en extractos acuosos de organismos marinos.

La tabla 2 muestra los resultados obtenidos en el cribado de AI de APN en extractos acuosos de invertebrados marinos pertenecientes a los Phylla Echinodermata, Chordata, Annelida y Briozoa. Se observa AI en todos los extractos evaluados a excepción de *Lebrunia danae* y *Hermodice carunculata*, cuyos extractos presentaron valores de AE superiores a los del ensayo control de AE de la APNp. El sustrato Leu-pNA también resultó hidrolizado cuando el ensayo se realizó solamente en presencia del extracto y tampón de actividad, indicando la posible presencia de una actividad tipo aminopeptidasa neutra en estas especies, las cuales serán caracterizadas en futuros trabajos.

a) Caracterización inicial de la actividad inhibidora de los extractos más promisorios

Los extractos de las especies: *Briozoo sp 2*, *Diplosoma listerianum*, *Lisoclinum verrilli*, *Eucidaris tribuloides* y

Tabla 2. Resultados del cribado de actividad inhibidora de APN porcina en organismos marinos.

Table 2. Results of the screening of porcine APN inhibitory activity in marine organisms.

Especies	Phyllum	[Proteína] (mg/mL)	Actividad inhibidora (U/mL)	Actividad inhibidora específica (U/mg)
<i>Ascidia nigra</i>	Chordata	2.75	2.3060	0.8363
<i>Lisoclinum verrilli</i>	Chordata	10.7	7.8770	0.7361
<i>Ascidia sidneyensis</i>	Chordata	4.9	3.1760	0.6481
<i>Microcosmus guanus</i>	Chordata	13.3	7.1368	0.5366
<i>Esteinacidia turbinata</i>	Chordata	6.8	3.6340	0.5344
<i>Diplosoma listerianum</i>	Chordata	18.5	8.1300	0.4394
<i>Poticlenum constellatum</i>	Chordata	10.8	3.2230	0.2984
<i>Eucidaris tribuloides</i>	Echinodermata	19.5	6.2526	0.3206
<i>Ophiocoma echinata</i>	Echinodermata	94.7	8.2337	0.0874
<i>Lebrunia danae</i>	Echinodermata	86.6	-	-
<i>Briozoo sp 1</i>	Briozoa	94.1	5.7240	0.0560
<i>Briozoo sp2</i>	Briozoa	6.0	6.7600	1.1266
<i>Hermodice carunculata</i>	Annelida	76.5	-	-

Ophiocoma echinata se seleccionaron como los más promisorios en cuanto a la actividad inhibidora específica de APN porcina así como una inhibición dependiente de la dosis, por lo que se procedió a su posterior clarificación. Los extractos de las especies *Phallusia nigra*, *Ascidia sidneyense*, *Microcosmus guanus*, *Esteinacidia turbinata* y *Poticlenum constellatum* no mostraron inhibición a concentraciones crecientes, indicando que el resultado inicial pudiera tratarse de algún componente del extracto que interfirió con la correcta determinación de la actividad de la enzima.

Todos los extractos seleccionados, excepto el de *Lisoclinum verrilli*, mostraron una inhibición lenta, en el orden de los minutos (Fig. 3 A, B, C, D). En cambio, para este último se alcanza el equilibrio con 1min de tiempo de preincubación (mínimo tiempo que se pudo evaluar en las condiciones de ensayo disponibles, resultado no mostrado). Para todos los extractos la inhibición se mantiene estable al menos durante 1 hora, (tiempo máximo evaluado). Para cada extracto se seleccionó el tiempo de preincubación necesario para alcanzar el equilibrio enzima-inhibidor en el sistema; con este valor se procedió a realizar el estudio del efecto de diferentes dosis de extracto sobre la AE de APNp. Con el extracto de *Eucidaris tribuloides* se alcanza el equilibrio en 5 min de incubación ($F = 1654,7$ para $p < 0,05$), mientras que con el extracto *Ophiocoma echinata* se necesita un tiempo superior a los 60 min ($F = 4731,9$ para $p < 0,05$). Para el resto de los extractos se pudo determinar que el tiempo de preincubación necesario para el establecimiento del complejo enzima-inhibidor se encuentra alrededor de los 30 min: *Briozoo sp2* ($F = 5867,6$ para $p < 0,05$), *Diplosoma listerianum* ($F = 663,87$ para $p < 0,05$).

Por su parte, la inhibición de la actividad de APN resultó dependiente de la dosis de extracto añadido pa-

Tabla 3. Resumen de la caracterización inicial de la actividad inhibidora de APN porcina de los extractos crudos positivos.

Table 3. Summary of the preliminary characterization of the porcine APN inhibitory activity detected in crude extracts of positive species.

Especie	IC ₅₀ (mg/mL)	Tiempo de preincubación (min)
<i>Diplosoma listerianum</i>	0,11±0,26	30
<i>Lisoclinum verrilli</i>	0,11±0,06	1
<i>Briozoo sp2</i>	0,29±0,05	30
<i>Eucidaris tribuloides</i>	1,35±0,19	5
<i>Ophiocoma echinata</i>	2,39±1,09	60

ra las especies seleccionadas (Fig. 3 A1, B1, C1, D1). Los valores de IC₅₀ obtenidos, se encuentran en el intervalo 0,11-2,39 mg/mL (Tabla 3) y reflejaron la mayor eficiencia en las condiciones evaluadas para los extractos de las dos ascidias (*Diplosoma listerianum* y *Lisoclinum verrilli*) y el extracto de *Briozoo sp2*.

Tratamientos de clarificación de los extractos

Los tratamientos de clarificación empleados se realizaron con vistas a eliminar contaminantes proteicos, principalmente proteasas, que son elementos indeseables en la purificación de inhibidores. En la tabla 4 puede observarse que para los extractos de *Briozoo sp2*, *Ophiocoma echinata* y *Eucidaris tribuloides*, el tratamiento con TCA no permitió la recuperación de AI lo que indica inestabilidad en estas condiciones, de los componentes responsables de la inhibición de la APNp en estos extractos. El tratamiento térmico fue efectivo en términos de recuperación de la actividad inhibidora así como incrementos de la Alesp en los casos de *Briozoo sp2* (1,5 veces) y *Ophiocoma echinata* (6,4 veces). Sin embargo, en el caso de *Eucidaris*

Tabla 4. Resultados de los procesos de clarificación de los extractos crudos con actividad inhibidora de APN porcina. ND: significa que no se detecta actividad inhibidora después del tratamiento de clarificación correspondiente.

Table 4. Results of the clarification procedures of the crude extracts characterized by inhibitory activity of porcine APN. ND: no detection of inhibitory activity after the correspondent clarification treatment.

Especie	Crudo		TCA 2.5%		Calor	
	AI (U/mL)	Alesp (U/mg)	AI (U/mL)	Alesp (U/mg)	AI (U/mL)	Alesp (U/mg)
<i>Briozoo sp 2</i>	6,760	1,127	ND	ND	6,980	1,746
<i>Diplosoma listerianum</i>	8,130	0,434	5,611	1,341	8,609	1,735
<i>Lisoclinum verrilli</i>	7,877	0,729	2,586	1,654	7,740	0,739
<i>Ophiocoma echinata</i>	8,234	0,203	ND	ND	8,199	1,302
<i>Eucidaris tribuloides</i>	6,253	0,367	ND	ND	4,471	0,486

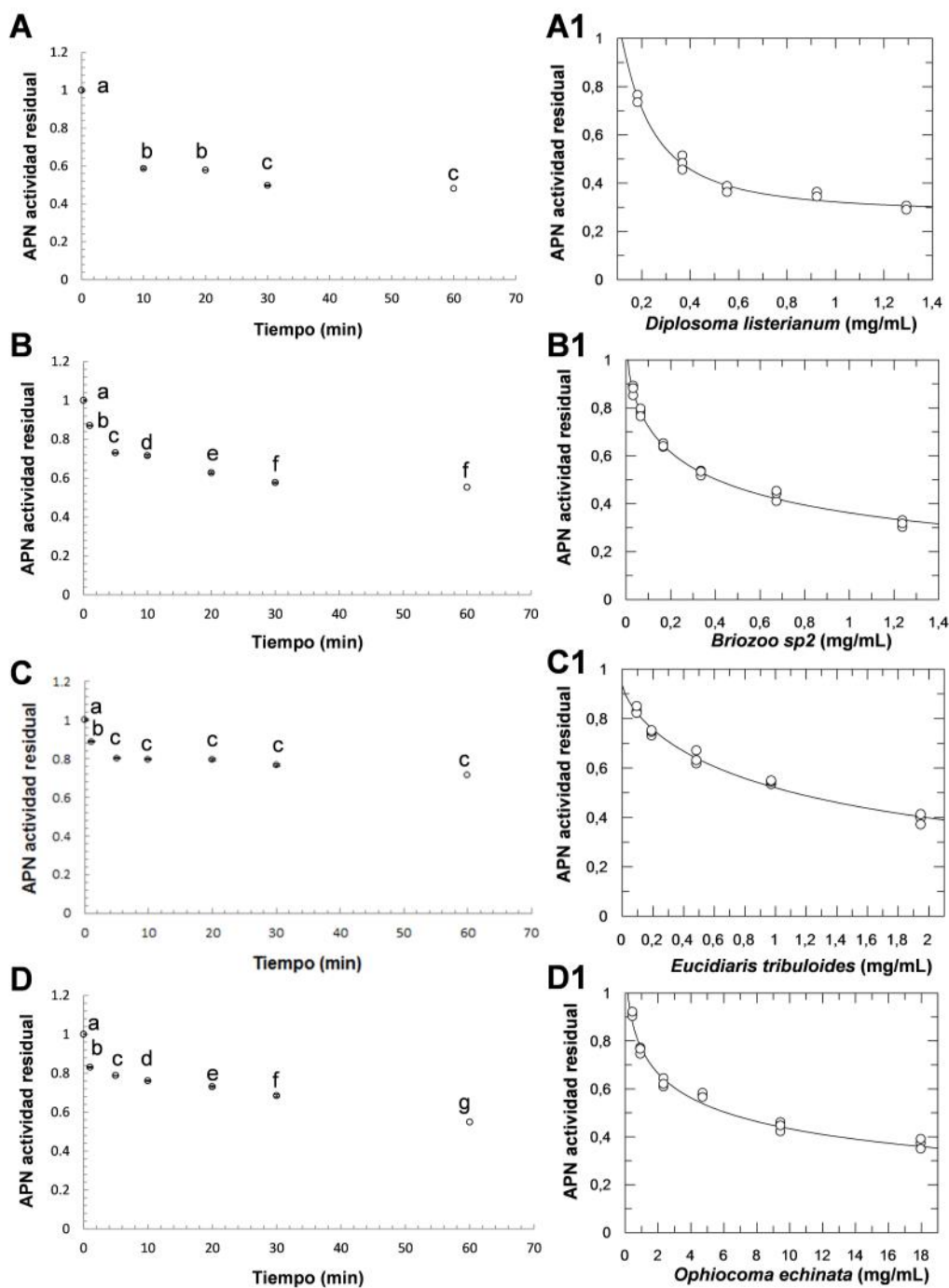


Figura 3. Caracterización inicial de los extractos seleccionados en términos del efecto del tiempo de preincubación (A,B,C,D) y efecto de la dosis (A1,B1,C1,D1) de cada extracto crudo seleccionado sobre la actividad residual de APN porcina. A. *Diplosoma listerianum*; B. *Briozoo sp 2*; C. *Eucidaris tribuloides*; D. *Ophiocoma echinata*. Letras distintas indican diferencias significativas entre los grupos de tratamiento para $p < 0,05$.

Figure 3. Initial characterization of the selected extracts with inhibitory activity of APN in terms of the effect of preincubation time (A,B,C,D) and the dose (A1,B1,C1,D1) on porcine APN residual activity. A. *Diplosoma listerianum*; B. *Briozoo sp 2*; C. *Eucidaris tribuloides*; D. *Ophiocoma echinata*. Different letters indicate significance difference among treatment groups for $p < 0.05$.

tribuloides, aun cuando se observa un incremento en la Alesp (1,3 veces) indicativa de la eliminación de contaminantes, la disminución de la AI (en 1,4 veces) durante el tratamiento indica la susceptibilidad de los componentes responsables de la inhibición de APN en estas condiciones. En caso de los extractos de las dos especies de ascidias (*Diplosoma listerianum* y *Lisoclinum verrilli*), el tratamiento con calor fue exitoso pues la AI se mantuvo indicativo de que los componentes responsables de la actividad inhibidora de APN fueron estables en estas condiciones así como un incremento en la Alesp de 4 veces en el caso de *Diplosoma listerianum*, que evidencia la eliminación de contaminantes y un enriquecimiento del extracto tratado en la actividad de interés. En el caso del tratamiento con TCA para ambas especies, si bien la actividad inhibidora específica incrementó respecto al extracto crudo, hubo disminución de la actividad inhibidora lo que sugiere que los componentes responsables de la inhibición de APN son susceptibles a las condiciones que se generan en este tratamiento.

DISCUSIÓN

La APN de mamíferos se encuentra ampliamente distribuida en numerosos tejidos con funciones fisiológicas relevantes así como implicación de su actividad en diferentes patologías humanas, por lo que actualmente despierta el interés de la comunidad internacional como blanco para el desarrollo de inhibidores como nuevos agentes terapéuticos (Mucha *et al.* 2010; Zhang *et al.* 2011).

Los invertebrados marinos han demostrado ser una fuente importante de moléculas bioactivas tales como toxinas (Alvarez *et al.* 2009; Valle *et al.* 2015), peptidasas (Alonso del Rivero *et al.* 2009) así como inhibidores de proteasas de diferentes clases mecanísticas, incluyendo a los de tipo metalo. Estos inhibidores en general se caracterizan por una gran diversidad de estructuras químicas, alta potencia y especificidades diversas (Delfin *et al.* 1996; Fusetani *et al.* 1999; Pascual *et al.* 2004, Shim *et al.* 2004; González *et al.* 2007; Chao *et al.* 2012; Alonso del Rivero *et al.* 2012; Covalada *et al.* 2012). Adicionalmente, basado en que muchos de los invertebrados como las esponjas, los briozoos, los tunicados entre otros, carecen de estructuras morfológicas de defensa, los inhibidores de proteasas en muchos casos son parte de los mecanismos de defensa contra los depredadores, infecciones y la competencia (Revisado en Hussain *et al.* 2012).

Con vistas a realizar el cribado de inhibidores naturales específicos y eficientes de APN, primeramente es necesario disponer de una cantidad suficiente de la enzima blanco para realizar los ensayos de AI. En este sentido, el riñón porcino es una fuente rica en esta enzima que puede ser utilizada para su aislamiento y purificación. La APN de humanos y la de cerdo muestran un 80% de identidad secuencial y comparten propiedades bioquímicas y cinéticas indistinguibles, por lo que esta última es frecuentemente empleada como modelo en el estudio de la enzima humana (Mucha *et al.* 2010).

En este trabajo se diseñó un protocolo de purificación de acuerdo a la estrategia general de eficiencia, rapidez y economía, recomendada para moléculas con aplicaciones prácticas potenciales (Karlsson *et al.* 1998). El protocolo involucró las etapas: extracción, captura y purificación intermedia. El empleo del Tritón-X para la solubilización de esta compleja proteína de membrana permitió recuperar el 100% de la actividad de la enzima detectada inicialmente en el homogenado de corteza de riñón (resultados no mostrados). El empleo de esta cromatografía permitió de modo sencillo, rápido y reproducible, incrementar en 7 veces la pureza de la muestra con solo un 3% de pérdida en rendimiento. La segunda y última etapa de purificación, exclusión molecular en matriz de Sephadex G-200, permitió obtener una preparación altamente enriquecida de la enzima para su empleo en el tamizaje de AI de APN en extractos de invertebrados marinos. Esta etapa confirmó que la enzima presenta un elevado peso molecular (aunque menor que 300 kDa), ya que se reparte perfectamente en la columna, lo que concuerda con lo previamente informado por varios autores para la enzima porcina y de otros mamíferos (Maroux *et al.* 1973; Sidorowitz *et al.* 1980; Chen *et al.* 2012; Wong *et al.* 2012). La estrategia utilizada para la purificación de APN a partir de corteza de riñón porcino es sencilla, de bajo costo y brinda rendimientos de actividad enzimática de alrededor del 70%, lo que resulta elevado para una proteína de alto peso molecular, las cuales suelen obtenerse con rendimientos inferiores al 50 % debido a su inestabilidad. Las dos cromatografías empleadas, se han utilizado en otros protocolos de purificación de APN a partir de diversas fuentes (Rawlings *et al.* 2014), y la obtención de una banda reforzada de alto peso molecular y prácticamente ningún contaminante en la fracción de exclusión molecular (visualizado en el gel

resultado de la electroforesis SDS-PAGE al 8% realizada como control del proceso de purificación) sugieren la obtención de una fracción que si bien es parcialmente purificada, se encuentra enriquecida en la actividad de interés.

La caracterización cinética de la APNp purificada corroboró que su comportamiento bioquímico se corresponde con el informado en la literatura (Rawlings *et al.* 2016) y aseguró que la enzima parcialmente purificada puede ser utilizada en el cribado de AI de APN en extractos de invertebrados marinos. Estos estudios revelaron que en las condiciones evaluadas, a los valores pH 7,0-8,0 se obtuvo la mayor actividad. Estos resultados coinciden con lo informado para la APN de mamíferos (Barret *et al.* 2003; Chen *et al.* 2012; Wong *et al.* 2012; Rawlings *et al.* 2014). Por otro lado el estudio del efecto del sustrato sobre la velocidad inicial permitió obtener el valor de K_M frente Leu-pNA (0,5 mmol/L), que resultó un orden menor al informado para la enzima de membranas de placenta humana (1,1 mmol/L) (Kurauchi *et al.* 1986) y para la enzima de riñón de rata (1,7 mmol/L) (Tokioka-Terao *et al.* 1984). Esta diferencia pudiera deberse a diferencias estructurales entre las enzimas de estas especies. También puede deberse a diferencias en el protocolo de purificación empleado. El proceso de extracción de la enzima que realizan Kurauchi *et al.* (1986), además de la solubilización con Tritón X-100, incluye una digestión con tripsina, que pudiera afectar a la proteína de interés. En los ensayos de inhibición de la APN porcina, se observó un elevado bloqueo de la actividad frente a o-fenantrolina, inhibidor general de metaloproteasas. Con respecto a los ensayos realizados frente al resto de los inhibidores específicos de la familia M1, en la literatura se ha informado el siguiente orden decreciente: amastatina bestatina actinonina puromicina, donde el efecto de puromicina es muy débil (Barret *et al.* 2003; Rawlings *et al.* 2014). Nuestros resultados coinciden con lo informado para amastatina y puromicina, mientras que para bestatina y actinonina se obtuvo un orden inverso, lo cual podría deberse a que el orden que se haya informado se refiere en general a aminopeptidasas neutras y no existen informes de evaluación de estos inhibidores frente a la APN de riñón porcino, que podría mostrar alguna variación en su forma de interacción con el inhibidor.

Una vez obtenida una fracción purificada de la enzima con una elevada actividad específica y caracterizada

parcialmente, se procedió a realizar un cribado de AI en extractos acuosos de invertebrados marinos que habitan en la costa de La Habana, lo que posibilita una solubilidad y estabilidad adecuadas de los componentes inhibitorios detectados en condiciones fisiológicas (Leung *et al.* 2000). Esto confiere ventajas para un potencial empleo como agentes terapéuticos en el tratamiento de las diferentes patologías que involucran a la APN. La caracterización inicial de los extractos positivos demostró propiedades funcionales promisorias de manera general para todos los casos, debido a que la AI se mantuvo prácticamente constante al menos durante una hora, lo que nos indica una elevada estabilidad del complejo enzima-inhibidor formado. La inhibición manifestada por la mayoría de los extractos fue lenta, pues se requiere de un tiempo apreciable de preincubación (en el orden de los minutos) para alcanzar el equilibrio del sistema enzima-inhibidor, en contraposición con los inhibidores rápidos, que solo requieren de milisegundos (Copeland, 2000).

Para los casos escogidos, la inhibición fue altamente dependiente de la dosis de extracto crudo empleada en el ensayo, lo que permitió realizar el cálculo de los valores de IC_{50} para cada uno de ellos. Sobre la base de los resultados obtenidos, podemos organizar los extractos en el siguiente orden decreciente de eficiencia de inhibición: *Diplosoma listerianum* > *Lisoclinum verrilli* > *Briozoo sp2* > *Eucidaris tribuloides* > *Ophiocoma echinata*.

Como resultado de los tratamientos iniciales de clarificación de los extractos crudos, se encontró que el tratamiento con calor fue efectivo tanto en términos de rendimiento (mantenimiento o incremento de la AI) como de grado de pureza de la fracción (incrementos de la Alesp) en los extractos de *Diplosoma listerianum*, *Lisoclinum verrilli*, *Briozoo sp2* y *Ophiocoma echinata* por lo que puede ser recomendado para futuros procesos de purificación de las moléculas responsables de la inhibición de APN identificadas en el presente trabajo. En el caso de la especie *Eucidaris tribuloides* pudieran evaluarse tiempos menores o temperaturas inferiores a la empleada en el presente trabajo con el objetivo de lograr obtener una fracción enriquecida en las moléculas de interés con rendimientos adecuados. Adicionalmente, en el caso de ambas especies de ascidias (*Diplosoma listerianum*, *Lisoclinum verrilli*), pudiera valorarse emplear un menor tiempo de tratamiento con TCA, con el objetivo

de obtener mayores rendimientos, o la evaluación de concentraciones menores del mismo o una combinación de ambas, pues este tratamiento si bien tiene un efecto negativo en el rendimiento, permite un incremento importante en la Alesp lo que apunta a un enriquecimiento en los componentes inhibitorios de interés.

La mayoría de los inhibidores de metalopeptidasas aislados de invertebrados marinos informados hasta el momento no son de naturaleza polipeptídica, con excepción de SmCl, aislado de *Sabellastarte magnifica* (Alonso del Rivero *et al.* 2012) y NvCl, aislado de *Nerita versicolor* (Covaleda *et al.* 2012). En general, son compuestos orgánicos de baja masa molecular, que difieren en la naturaleza química de su estructura y presentan varios sustituyentes que pueden actuar como quelantes del átomo de zinc. Por ejemplo, jaspisina, de 252 Da de masa molecular, está formado por el 5,6-dihidroxistiril sulfato de sodio (Ikegami *et al.* 1994; Kato *et al.* 1998). Fujita *et al.* (2002) describieron la estructura del 1-12-hidroxiocetadecanil sulfato de sodio, de 386 Da, y posteriormente caracterizaron el sulfato de calispongíol, un ácido acetilénico de 480 Da (Fujita *et al.* 2003a). Estos tres compuestos tienen como característica común la presencia de un grupo sulfato en su estructura, que se especula sea la base de sus mecanismos de inhibición, al desplazar la molécula de agua que coordina al Zn^{2+} y bloquearlo. También se han descrito inhibidores con bromo en su estructura para proteasas de tipo metalo en organismos marinos; entre ellos está el Pasammaplina A (PsA), inhibidor de APN porcina (Jung *et al.* 1995; Tabudravu *et al.* 2002; Shim *et al.* 2004). Estudios con análogos estructurales de PsA en los que se han sustituido o eliminado los grupos hidroxilos fenólicos de la bromo tirosina, indican que estos grupos son cruciales en el reconocimiento e inhibición de APN por esta entidad molecular (Shim *et al.* 2004). Para la mayoría de los inhibidores de tipo metalo no peptídicos sólo se han realizado determinaciones del valor de IC_{50} , las cuales suelen estar en el orden micromolar (Fujita *et al.* 2003b), por lo que se clasifican como inhibidores clásicos. La excepción la constituye HcPI, cuyo valor de K_i se encuentra en el intervalo nanomolar, lo que le convierte en el primer inhibidor natural no peptídico de una metaloaminopeptidasa (PP1) clasificado como de unión fuerte (Pascual *et al.* 2004). Esta molécula es capaz de inhibir también a APNp pero en el orden micromolar (Pascual *et al.* 2004). Con excepción del trabajo de Reytor *et al.* (2011), no existen otros

informes de actividad inhibidora de APNp en invertebrados marinos. Estos autores realizaron un cribado de actividad inhibidora frente a proteasas de diferentes clases mecanísticas (metalo: carboxipeptidasas A y B, APNp; serino: tripsina y subtilisina; cisteino: papaína; aspártico: pepsina) en extractos crudos y clarificados de cinco especies de ascidias: *Ascidia nigra*, *A. sidneyensis*, *Eteinaascidia turbinata*, *Diplosoma listerianum* y *Policlinum constelatum*. De estas especies, solo *D. listerianum* se caracterizó por presentar actividad inhibidora de APNp en condiciones similares a las descritas en el presente trabajo, con una inhibición dependiente de la dosis tanto en el extracto crudo como en los extractos clarificados por calor y tratamiento con TCA. Los resultados del presente trabajo de no detección de actividad inhibidora de APNp en las especies de ascidias *A. nigra*, *A. sidneyensis*, *E. turbinata* y *P. constelatum*, corroboran también los resultados previos de Reytor *et al.* (2011).

Los resultados del presente trabajo permiten corroborar la presencia de moléculas con actividad inhibidora de APNp en la especie de ascidia *Diplosoma listerianum* (Reytor *et al.* 2011), así como informar por primera vez la presencia de AI de APNp en las especies de *Briozoa sp2*, *Eucidaris tribuloides*, *Ophiocoma echinata* y *Lisoclinum verrilli* lo que convierte a estas cinco especies en fuentes promisorias de moléculas con actividad inhibidora de APN. Las estrategias de clarificación empleadas sientan las pautas para futuros procesos de purificación de las moléculas responsables de la inhibición detectada de esta enzima, las cuales pudieran tener potenciales aplicaciones biomédicas.

AGRADECIMIENTOS:

International Foundation for Sciences/OPCW grant 3276/3 a Isel Pascual Alonso

LITERATURA CITADA

- Abbenante G. y D.P. Fairlie. (2005). Protease Inhibitors in the Clinic. Med. Chem. 1, 71-104.
- Alonso del Rivero M., Trejo S.A., Reytor M.L., Rodríguez de la Vega M., *et al.* (2012). Tri-domain bifunctional inhibitor of metalocarboxypeptidases A and serine proteases isolated from marine annelid *Sabellastarte magnifica*; J. Biol. Chem. 287: 15427-15438.
- Alonso del Rivero M., Trejo S., Rodríguez de la Vega M., González Y., *et al.* (2009). A novel metalocarboxypeptidase like enzyme isolated from the marine annelid *Sabellastarte*

- magnifica*- a step into the invertebrate world of proteases. The FEBS J. 276: 4875-4890.
- Alvarez C., Mancheno J.M., Martínez D., Tejuca M., *et al.* (2009): Sticholysins, two pore-forming toxins produced by the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla helianthus*: Their interaction with membranes. *Toxicon* 54: 1135-1147.
- Barret A. J., Rawlings N. M. y J. F. Woessner. (2003): Introduction: metallopeptidases and their clans. In: Handbook of proteolytic enzymes. Barret, Rawlings y Woessner (Eds.). Academic Press, London. 334-542.
- Bonnard E., Poras H., Nadal X., Maldonado R., *et al.* (2015): Long-lasting oral analgesic effects of N-protected aminophosphinic dual ENKephalinase inhibitors (DENKIs) in peripherally controlled pain. *Pharmacol Res Perspect* Mar 3 (2) e00116. doi: 10.1002/prp2.116.
- Bradford M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. *Anal. Bioch.* 72: 248-254.
- Chao Y., Fan C., Liang Y., Gao B., *et al.* (2012): A Novel Serpin with Antithrombin-Like Activity in *Branchiostoma japonicum*: Implications for the Presence of a Primitive Coagulation System. *PlosOne*. 7(3) e32392.
- Chappé M. (2006): Dipeptidil peptidasa IV de corteza de riñón porcino: inmovilización covalente, estudio de algunas características funcionales y empleo del derivado inmovilizado en cromatografía de afinidad. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad de La Habana.
- Chávez M., García M. E., Romero L., Gómez T., *et al.* (1987): Two general procedures for isolations and purification of toxins and proteolytic inhibitors from four coelenterates species. *Toxicon* 25: 365.
- Chávez M., Delfín J., Díaz J., Pérez U., (1988): Caracterización de un inhibidor de proteasas obtenido de la anémona *S. helianthus*. *Rev. CENIC* 19: 82.
- Chen L., Ling Y.L., Peng G. y F. Li. (2012): Structural basis for multifunctional roles of mammalian aminopeptidase N. *PNAS*. 44: 17966-17971.
- Coaleda G., Alonso del Rivero M., Chávez M.A., Avilés F.X. *et al.* (2012): Crystal Structure of Novel Metallo-carboxypeptidase Inhibitor from Marine Mollusk *Nerita versicolor* in Complex with Human Carboxypeptidase A4. *J.Biol. Chem.* 287: 9250-9258.
- Delfín J., González Y., Díaz J. y M. Chávez (1994): Proteinase inhibitor from *Stichodactyla helianthus*: purification, characterization and immobilization. *Arch. Med. Res.* 25:199-204.
- Delfín J., Morera V., González Y., Díaz J., *et al.* (1996): Purification, characterization and immobilization of proteinase inhibitors from *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon*. 34: 1367-1376.
- Deu E., Verdoes M., Bogoy M. (2012): New approaches for dissecting protease functions to improve probe development and drug discovery. *Nat Struct Mol Biol.* 19 9-16.
- Drag M., Salvesen G.S. (2010): Emerging principles in protease-based drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 9 690-701.
- Feracci H. y S. Maroux. (1980): Rabbit intestinal aminopeptidase N. Purification and molecular properties. *Biochim. Biophys. Acta* 599: 448-463.
- Fujita M., Nakao Y., Matsunaga S., Nishikawa T. (2002): Sodium 1-(12-hydroxy)octadecanoyl sulfate, an MMP2 inhibitor, isolated from a tunicate of the family Polyclinidae. *J. Nat. Prod.* 65:1936-1938.
- Fujita M., Nakao Y., Matsunaga S., van Soest R.W. *et al.* (2003a): Callysponginol sulfate A, an MT1-MMP inhibitor isolated from the marine sponge *Callyspongia truncata*. *J Nat Prod.* 66:569-571.
- Fujita M., Nakao Y., Matsunaga S., Seiki S., *et al.* (2003b): Ageladine A: An Antiangiogenic Matrix metalloproteinase Inhibitor from the Marine Sponge *Agelas nakamura*. *J. AM. CHEM. SOC.* 125: 15700-15701.
- Fusetani N., Matsunaga S., Matsumoto H. y H. Takebayashi. (1990): *J. Am. Chem. Soc.* 112: 7053-7056.
- González Y., Araujo M.S., Oliva M.L.V., Sampaio C.A.M. (2004): Purification and preliminary characterization of a plasma kallikrein inhibitor isolated from sea hares *Aplysia dactylomela* Rang, 1828. *Toxicon*. 43: 219-223.
- González Y., Tanaka A., Hirata I., Alonso del Rivero M. *et al.* (2007): Purification and partial characterization of human neutrophil elastase inhibitors from the marine snail *Cenchritis muricatus* (Mollusca). *CBP* 146: 506-513.
- Hussain F., Fareed S., Ansari S. y M.Sahid Khan. (2012): Marine natural products: a lead of anticancer. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences* 41: 27-39.
- Ikegami S., Kobayashi H., Myotoishi Y., Ohta S. (1994): Selective inhibition of exoplasmic membrane fusion in echinoderm gametes with jaspisin, a novel antihatching substance isolated from a marine sponge. *J. Biol. Chem.* 269: 23262-23267.
- Jung J. H., Sim C. J. y C.O. Lee. (1995): Cytotoxic compounds from a two-sponge association. *J. Nat. Prod.* 58: 1722-1726.
- Karlsson E., Rydén L. y J. Brewer. (1998): Ion Exchange Chromatography. En: *Protein Purification*. Janson y Rydén (Eds.). 334-542. John Wiley and sons, Inc.; Nueva York.
- Kato K.H., Takemoto K., Kato E., Miyazaki K., *et al.* (1998): Inhibition of sea urchin fertilization by jaspisin, a specific inhibitor of matrix metallo endoproteinase. *Develop. Growth Differ.* 40: 221-230.
- Kurauchi O., Mizutani S., Okano K., Narita O. *et al.* (1986): Purification and characterization of human placental microsomal aminopeptidase: immunological difference between placental microsomal aminopeptidase and pregnancy serum cystyl-aminopeptidase. *Enzyme*. 35:197-205.
- Kyrieleis O. J., Goettig P., Kiefersauer R., Huber R. *et al.* (2005): Crystal structures of the tricom interacting factor F3 from *Thermoplasma acidophilum*, a Zn aminopeptidase in three different conformations. *J. Mol. Biol.* 349:787-800.
- Laemmli U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.

- Leung D., Abbenante G. y D.P. Fairlie. (2000): Protease inhibitors: Current status and future prospects. *J. Med. Chem.* 43: 305-341.
- López A. (2005): Purificación y caracterización parcial de la enzima dipeptidil aminopeptidasa IV/CD 26 a partir de riñón porcino. Cribado de actividad inhibidora en extracto acuoso de organismos marinos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad de La Habana.
- Luan Y. y W. Xu. (2007): The Structure and Main Functions of Aminopeptidase N. *Current Medicinal Chemistry.* 14: 639-647.
- Maroux S., Louvard D. y J. Baratti. (1973): The aminopeptidase from hog intestinal brush border. *Biochim. Biophys. Acta.* 321: 282-295.
- Mucha A., Drag M., Dalton J.P. y P. Kafarski. (2010): Metallo-aminopeptidase inhibitors. *Bioch.* 92: 1509-1529.
- Pascual I., Gil Sh., Cisneros M., Joseph-Bravo P. *et al.* (2004): Purification of a specific inhibitor of pyroglutamyl aminopeptidase II from the marine annelide *Hermodice carunculata*. In vivo effects in rodent brain. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology.* 36: 138-152.
- Pascual I., González Y., Alonso del Rivero M., Ramírez A. *et al.* (2005): Inhibidores de proteasas no proteicos aislados de organismos marinos. *Biología.* Vol XIX.1-2:12-19.
- Pascual I., Gómez H., López A., Chappe M.A. *et al.* (2007): Screening of inhibitors of dipeptidyl peptidase IV activity in aqueous extracts from marine organisms. *Enzyme and Microbial Technology.* 40(3):414-419.
- Pascual I., García G., Sánchez L., Díaz L., *et al.* (2015): Aminopeptidase N from mammals: biochemical characteristics, physiological functions and implication in physiopathological processes in humans. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas.* 4 (1):2-16.
- Poras H., Bonnard E., Dangé E., Fournié-Zaluski M.C. (2014): New Orally Active Dual Enkephalinase Inhibitors (DENKIs) for Central and Peripheral Pain Treatment; *J. Med. Chem.* 57: 5748-5763.
- Rascon A.A., McKerrow J.H. (2013): Synthetic and Natural Protease Inhibitors Provide Insights into Parasite Development, Virulence and Pathogenesis. *Current Medicinal Chemistry.* 20 (25) 3078-3102.
- Rawlings N.D., Waller M., Barrett A.J. y A. Bateman. (2014): MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors; *Nucleic Acids Res* 42 D503-D509
- Rawlings N.D., Barrett A.J., Finn R.D. (2016): Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* 44 D343-D350.
- Reytor M.L., González Y., Pascual I., Hernández A., *et al.* (2011): Screening of protease inhibitory activity in extracts of five Ascidian species from Cuban coasts. *Biotechnología Aplicada.* 28: 77-82.
- Scopes R. (1987): Protein purification: principles and practice. Springer-Verlag Series: 329.
- Shim J.S., Kim J.H., Cho H.Y., Yum Y.N. (2003): Irreversible inhibition of CD13/aminopeptidase N by the antiangiogenic agent curcumin. *Chem. Biol.* 695-704.
- Shim J.S., Lee H.S., Shin J. y H.J. Kwon. (2004): Psammaplin A, a marine natural product, inhibits aminopeptidase N and suppresses angiogenesis in vitro. *Cancer Lett.* 3: 163-169.
- Sidorowitz W. y Jackson G.C. (1980): Multiple molecular forms of human pancreas alanine aminopeptidase. *Clin Chim Acta,* 104: 169-179.
- Tabudravu J. N., Eijssink V. G., Gooday G. W., Jaspars M., *et al.* (2002): Psammaplin A, a chitinase inhibitor isolated from the Fijian marine sponge *Aplysina rhax*. *Bioorg. Med. Chem.* 10: 1123-1128.
- Thunnissen M., Nordlund P. y J.Z. Haeggstrom. (2001): Crystal structure of human leukotriene A4 hydrolase, a bifunctional enzyme in inflammation. *Nat. Struct. Biol.* 8:131.
- Tieku T. y M. Hooper. (1992): Inhibition of aminopeptidases N, A and W: a re-evaluation of the actions of bestatin and inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Biochemical pharmacol.* 44: 1725-1730.
- Tokioka-Terao M., Hiwada K. y T. Kokubu. (1984): Purification and characterization of aminopeptidase N from human plasma. *Enzyme.* 32: 65-75.
- Turk B. (2006): Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov.* 5(9) 785-799.
- Valle A., Alvarado-Mesén J., Lanio M.E., Álvarez C. (2015): The multigene families of actinoporins (part I): Isoforms and genetic structure. *Toxicon.* 103 176-187.
- Wickstrom M., Larsson R., Nygren P. y J. Gullbo. (2011): Aminopeptidase N (CD13) as a target for cancer chemotherapy. *Cancer Sci.* 3 501-508.
- Wong A., Zhou D. y Rini J.M. (2012): The X-ray crystal structure of human Aminopeptidase N reveals a novel dimer and the basis for peptide processing. *J. Biol. Chem.* 44: 36804-36813.
- Wunderer G., Béress L., Machleid W. y H. Fritz. (1976): Broad specificity inhibitors from sea anemones. *Methods in Enzymology* 45: 881-888.
- Zhang X., Fang H., Zhang J., Yuan Y. (2011): Recent advance in aminopeptidase N (APN/CD13) inhibitor research; *Curr Med Chem.* 18(32) 5011-21.

• • •

Editor para correspondencia: Dra. Maday Alonso