

PURIFICACIÓN Y EVALUACIÓN HEMOLÍTICA DE FRACCIONES DE BAJO PESO MOLECULAR DE LA ANÉMONA *Stichodactyla helianthus*

Sánchez Velázquez J.⁽¹⁾ ; Santos Ortega Y.⁽²⁾ ; Falcón Alcántara A.⁽²⁾ ; Aguilar Ramírez M.B.⁽²⁾ ; y Heimer de la Cotera E.P.⁽²⁾

⁽¹⁾Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro; ⁽²⁾Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México

RESUMEN

Las anémonas son pólipos solitarios que constituyen un gran recurso farmacológico por contener en el veneno, que ellas elaboran, citolisinas, neurotoxinas, fosfolipasas, inhibidores de proteasas y bloqueadores de canales de sodio y potasio. Específicamente las citolisinas obtenidas de anémonas han sido utilizadas como herramientas para estudiar los mecanismos de la formación del poro en la membrana citoplasmática. Una de las anémonas que ha sido estudiada por la presencia de proteínas que forman poro en la membrana es *Stichodactyla helianthus*, de la cual, se han caracterizado compuestos de alto peso molecular como la esticolisina I y II. Dentro de nuestro grupo de trabajo se han encontrado fracciones de bajo peso molecular con actividad hemolítica, que nos ha motivado a proponernos como objetivo la purificación de una citolisina de bajo peso molecular a partir del extracto acuoso de la anémona *S. helianthus*, la cual es abundante en costas veracruzanas y su colecta es relativamente fácil. A partir del extracto acuoso del cuerpo total del organismo se realizó la primera etapa de purificación por tamizaje molecular en Sephadex G-50; la fracción III que presentó actividad fue sometida a una segunda etapa de purificación por Intercambio Catiónico; la fracción 5 obtenida de esta etapa fue sometida a cromatografía líquida de alta resolución (RP-HPLC). El seguimiento de la actividad biológica durante cada etapa de purificación se realizó mediante pruebas de hemólisis en eritrocitos de ratas Wistar. Las fracciones 2, 3 y 6 provenientes de RP-HPLC mostraron actividad hemolítica por arriba del 50%, lo cual sugiere la presencia de compuestos capaces de formar poros en las membranas citoplasmáticas de eritrocitos.

INTRODUCCIÓN

Las anémonas son animales sedentarios pertenecientes al Phylum Cnidaria y una de las características distintivas y propias del grupo es la presencia de una célula denominada cnidocito. En el interior de esta célula se encuentra el nematocisto, que consiste en un filamento tubular, por donde inyecta el veneno ante una estimulación física o química provocada por sus presas o depredadores (Turk y Kem, 2009). En el veneno de las anémonas es bien conocido que existen neurotoxinas, fosfolipasas, bloqueadores de canales de sodio y potasio, inhibidores de proteasas y toxinas formadoras de poro (Martins *et al.*, 2009 y Álvarez *et al.*, 2009).

Las proteínas que forman poros en las membranas celulares han sido identificadas en varios tipos de organismos, desde bacterias, hongos, plantas y animales, sin embargo estas últimas han sido poco estudiadas (Álvarez *et al.*, 2009). No obstante a la fecha se han aislado y descrito 32 toxinas formadoras de poro a partir de anémonas y se han clasificado en base a su peso molecular en: grupo I, de 5-8 kDa, con actividad antihistamínica; grupo II, de ~20 kDa, formadoras de poro inhibidas por esfingomiélin; grupo III, de 30-40 kDa, citolisinas con o sin actividad de fosfolipasa A₂; y el grupo IV, de 80 kDa, representada por citolisinas (Aneiros y Garateix, 2004). Han sido utilizadas como herramienta para estudiar el daño que ellas provocan a la membrana y la naturaleza de la formación del poro; esto es debido a los efectos hemolíticos en células sanguíneas, agregación de plaquetas y lisis, y a los efectos

citotóxicos y citostáticos sobre fibroblastos que ellas inducen al unirse a la membrana citoplasmática (Anderluh y Macek 2002).

Una de las especies que está bien caracterizada y es muy abundante en las costas de Veracruz es *Stichodactyla helianthus*. Esta anémona ha sido ampliamente estudiada y a partir de ella se han aislado y descrito las citolisinas **StI** y **StII**, con pesos moleculares que oscilan entre los 19-20 kDa. No obstante, por parte de nuestro grupo de trabajo se han encontrado fracciones de bajo peso molecular (~1.5-15 kDa) con actividad hemolítica, lo cual nos ha motivado a estudiar si a partir de dichas fracciones de bajo peso molecular es posible aislar una toxina formadora de poro.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

A partir del cuerpo completo de 10 anémonas se obtuvo el extracto acuoso y posteriormente se liofilizó. Se realizó el tamizaje molecular en Sephadex G-50 y se trabajó con la fracción III que correspondió a la de menor peso molecular. La fracción III fue sometida a Intercambio catiónico y posteriormente a RP-HPLC en una columna de C18. Durante cada etapa de purificación se realizó la evaluación biológica mediante ensayos hemolíticos con eritrocitos de rata Wistar, con el método modificado de Rottini 1995 y se determinó proteínas totales mediante el método de Bradford.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se obtuvo el perfil característico de las anémonas durante la primera etapa de purificación, el cual consta de tres fracciones, donde en la primera eluyen compuestos de alto peso molecular y en la segunda y tercera compuestos de mediano y bajo peso molecular (Fig.1).

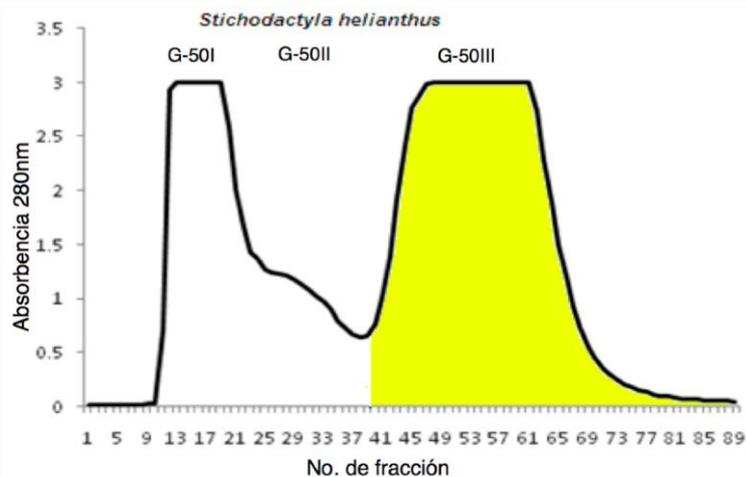


Figura 1. Perfil de elución en Sephadex G-50 de 1 g de extracto acuoso del cuerpo total de *S. helianthus*. Absorbancia a 280 nm. Columna 1.7 x 105 cm. Solución de elución: acetato de amonio 0.1 mol x L⁻¹. Volumen de muestra: 5 mL. Velocidad de flujo 0.3 mL x min⁻¹.

La fracción III fue sometida a una segunda etapa de purificación en una columna de intercambio catiónico. La figura 2 muestra el perfil resultante, el cual está formado por 5 fracciones. La separación permite afirmar que las fracciones que eluyen son las menos catiónicas por presentar una menor densidad de cargas positivas, seguidas de las fracciones con mayor densidad de cargas positivas.

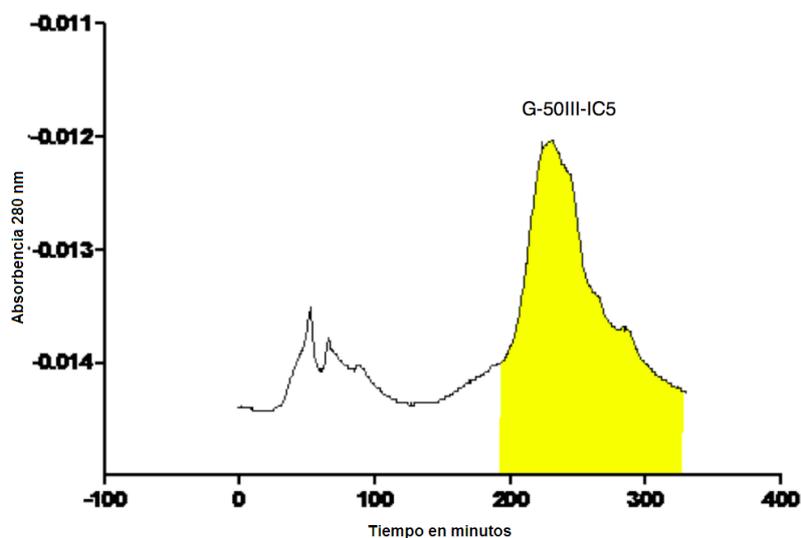


Figura 2. El perfil de elución de intercambio catiónico es el resultado después de someter a la fracción G-50III a un lavado de dos volúmenes de columna con una solución de elución de $0.01 \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$, a un flujo de $1 \text{ mL} \times \text{min}^{-1}$. Columna $1.7 \times 14 \text{ cm}$ CM-Cellulose. Concentración de la fracción G-50III $485 \text{ } \mu\text{g}$ en 1 mL . Absorbancia 280 nm . Gradiente de elución de 0.01 a $1 \text{ mol} \times \text{L}^{-1} \text{ NH}_4^+ \text{ CH}_3\text{COO}^-$. Volumen de muestra: 1 mL . Flujo: $1 \text{ mL} \times 1.3^{-1} \text{ min}$.

Posteriormente, la fracción 5 proveniente del intercambio catiónico que mostró actividad en los ensayos de hemólisis, fue pasada por una cromatografía de alta resolución de C18 (RP-HPLC) a una concentración de $59.4 \text{ } \mu\text{g}$ en 9 mL . El perfil que se obtuvo por RP-HPLC muestra seis fracciones bien definidas a las cuales se les determinó la actividad hemolítica en células sanguíneas de rata (Fig. 3).

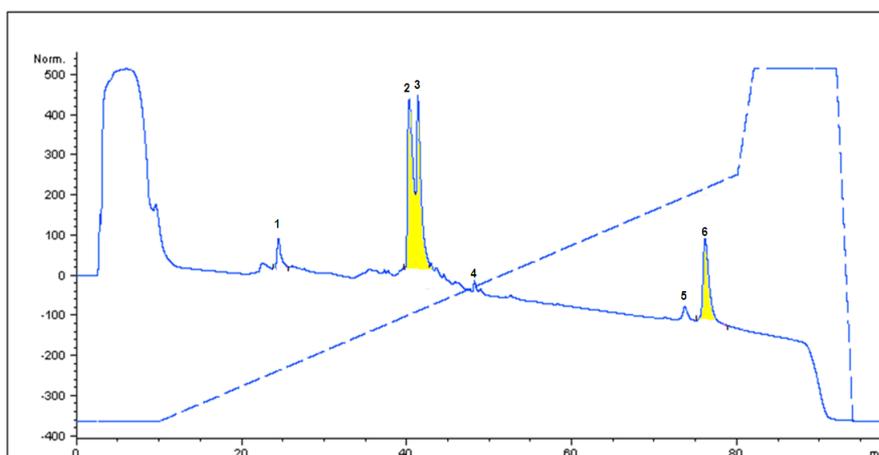


Figura 3. Perfil de elución de RP-HPLC Hypersil H5ODS C18 de $29.7 \text{ } \mu\text{g}$ de la fracción G-50III-IC5 S. *helianthus*. Absorbancia 226 nm . Columna $4.6 \times 250 \text{ mm}$. Soluciones de elución: Solución A, ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1% en agua desionizada; Solución B, acetonitrilo al 100% con 0.1% de TFA. Volumen de muestra 4.5 mL . Flujo: $1 \text{ mL} \times \text{min}^{-1}$, Gradiente 10 minutos de isocrático con (A) y de $0-70\%$ de (B) en 70 min .

PRUEBAS BIOLÓGICAS

Actividad hemolítica

La determinación de hemólisis en eritrocitos de rata mostró que las fracciones 2, 3 y 6 de *S. helianthus* provenientes de RP-HPLC tuvieron actividad hemolítica con respecto a los valores control de 0 y 100% de hemólisis como se observa en la figura 4.

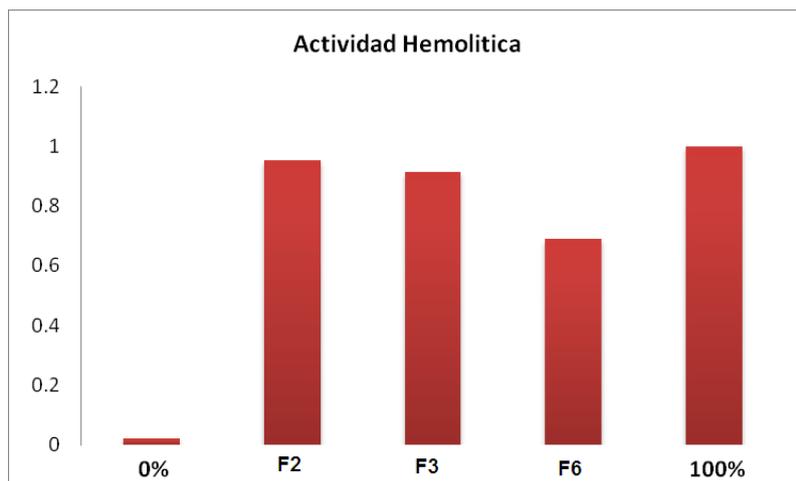


Figura 4. Efecto hemolítico de las fracciones de la anémona *S. helianthus*, sobre eritrocitos de rata. La fracción 2 mostró un 95.1% de hemólisis a una concentración de 4.5 μg en 1 mL, la fracción 3 presenta un 91.4% a una concentración 5.4 μg en 1 mL, y la fracción 6 un 69.1% a una concentración de 2.9 μg en 1 mL.

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en las pruebas de hemólisis sobre eritrocitos de rata, podemos concluir que la purificación a partir de la fracción III de Sephadex G-50, del extracto acuoso de la anémona *S. helianthus*, nos proporcionó fracciones con actividad hemolítica, lo que sugiere la presencia de compuestos de bajo peso molecular capaces de lisar las células. No obstante se debe continuar con el análisis hemolítico en otros modelos y continuar hasta obtener la purificación las fracciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Álvarez C, Mancheño JM, Martínez D, and Tejuca M, “Sticholysins, two pore-forming toxins produced by the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla helianthus*: Their interaction with membranes”, *Toxicon* 300, 1-13, **2009**.

Anderluh G, and Macek P, “Cytolytic peptide and protein toxins from a sea anemones (Anthozoa: Actiniaria)”, *Toxicon* 40, 111-124, **2002**.

Aneiros A, and Garateix A, “Bioactive peptides from marine source: pharmacological properties and isolation procedures” *Journal of Chromatography B* 803, 41-53, **2004**.

Martins R, Alves R, Martins A, Barbosa PS, Evangelista J, Evangelista JJ, Ximenes R, Toyama M, Toyama D, Souza AJ, Orts D, Marangonio S, Menezes D, Fonteles M, and Monteiro H. “Purification and characterization of the biological effects of phospholipase A2 from sea anemone *Bunodosoma caissarum* “ *Toxicon* 300, 1-8, **2009**.

Rottini, Guzman L, Pavorel E, Avian M, and Patriarca “Purification and properties of a cytolytic toxin in venom of the jellyfish *Caribdea marsupialis*” *Toxicon* 33, 315-326, **1995**.

Turk T, and Kem W, “The phylum Cnidaria and investigations of its toxins and venoms until 1990”, *Toxicon* 54, 1031-1037, **2009**.

Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez
Investigador Titular
Laboratorio de Neurofarmacología Marina

