

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"
FACULTAD DE BIOLOGÍA

Optimización de la solución de extracción de moléculas antibacterianas de *Cenchritis muricatus* (Gastropoda: Littorinidae)

Annia Alba Menéndez,¹ Carlos López Abarrategui,² Antonio A. Vázquez Perera,³ Anselmo J. Otero González⁴

RESUMEN

Introducción: los moluscos marinos constituyen un reservorio natural de moléculas con potencialidades terapéuticas para el tratamiento de enfermedades infecciosas en momentos en que se han descrito numerosas cepas resistentes a los antibióticos convencionales. **Objetivo:** comparar 3 soluciones: ácido acético 30 %, metanol 50 % y salina-ácida (NaCl 0,6 mol/L, HCl 1 %) atendiendo a sus capacidades extractivas de moléculas con actividad antibacteriana del molusco marino *Cenchritis muricatus*. **Método:** para el procesamiento del material biológico se utilizaron las 3 soluciones de extracción y se analizaron los extractos obtenidos de acuerdo con la concentración de proteínas totales y la inhibición del crecimiento bacteriano de cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, mediante un bioensayo turbidimétrico en microplacas de 96 pocillos en medio Luria-Bertani. **Resultados:** se obtuvo mayor concentración de proteínas totales (7,8 µg/mL) con el extracto total de *C. muricatus* obtenido con la solución salina-ácida. Además con 200 µg/mL de proteínas totales del extracto se obtuvo inhibición significativa ($p < 0,001$) del crecimiento de *S. aureus* (12,64 %) y *E. coli* (12,1 %) respecto al control positivo de inhibición del crecimiento por cloranfenicol. **Conclusiones:** de acuerdo con los resultados de la comparación entre las soluciones, la solución salina-ácida resultó ser la más eficiente en la extracción de moléculas antibacterianas, probablemente péptidos antimicrobianos de *C. muricatus*.

Palabras clave: *Cenchritis muricatus*, moléculas antimicrobianas, soluciones de extracción.

INTRODUCCIÓN

Los antibióticos clásicos, desde su descubrimiento, han sido los medicamentos más utilizados en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. A pesar de su amplio uso terapéutico, estos fármacos presentan algunos inconvenientes entre los que se destaca la resistencia que desarrollan los patógenos a sus efectos, incluso a los llamados antibióticos de última generación.¹ Este problema se agrava con el uso extensivo e intensivo de estos medicamentos, el incremento de individuos inmunocomprometidos y de la tasa de envejecimiento

en la población, así como el aumento de los viajes y las estancias transcontinentales, entre otros factores.² La situación actual es crítica, porque existen cepas resistentes a los antibióticos clásicos responsables de las infecciones microbianas más importantes. Además, solo han sido incorporados a la terapia 3 nuevas clases de antibióticos en los últimos 40 años.³ Es por ello que la tendencia actual es la búsqueda y el desarrollo de estrategias terapéuticas alternativas.

Esta tendencia ha sido muy encaminada hacia la búsqueda de moléculas naturales antimicrobianas a partir de invertebrados. Estos animales carecen

¹ Licenciada en Bioquímica. Laboratorio de Anticuerpos Monoclonales, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). La Habana, Cuba.

² Licenciado en Bioquímica. Centro de Estudio de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana. La Habana, Cuba.

³ Licenciado en Biología. Máster en Ciencias. Laboratorio de Malacología, IPK. La Habana, Cuba.

⁴ Licenciado en Microbiología. Doctor en Ciencias. Centro de Estudio de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana. La Habana, Cuba.

de inmunidad adquirida, por lo que su sistema de defensa innato se basa en los mecanismos celulares de los hemocitos y en una gran variedad de moléculas antimicrobianas estereoespecíficas.⁴ Dentro de este gran grupo de organismos, los moluscos son el segundo grupo más numeroso del reino animal y se encuentran prácticamente en todo tipo de ecosistemas; su mayor diversidad la alcanzan en los ecosistemas marinos.⁵ Estos organismos constituyen un reservorio natural de moléculas con potencialidades terapéuticas.

Diferentes moléculas proteicas como las dolabelinas con potentes efectos antimicrobianos y antineoplásicos, se han obtenido del molusco gastrópodo *Dolabela auricularia*,^{6,7} así como la dolastatina 15⁸ que ha sido probada en ensayos clínicos en pacientes con cáncer en diferentes formulaciones.⁹ A partir de estos organismos se han aislado varios péptidos antimicrobianos (AMPs), fundamentalmente a partir de bivalvos marinos.¹⁰⁻¹² Estas moléculas presentan un amplio espectro de acción, pueden ser antibacterianos, antiparasitarios, antifúngicos y antivirales.¹³ Además, constituyen una excelente alternativa terapéutica porque presentan una elevada afinidad por los patógenos y en general tienen potente actividad antimicrobiana *in vitro* contra cepas multirresistentes a los antibióticos convencionales.¹⁴ Recientemente se ha detectado actividad anticancerígena en AMPs aislados de organismos superiores.¹⁵ Estas moléculas pueden actuar como moduladores de la respuesta innata, adyuvantes efectivos o alarminas, reguladores de la respuesta adaptativa y promotores de la reparación de heridas.^{16,17} Se especula e investiga hoy día si los péptidos antimicrobianos de invertebrados marinos pueden tener acción inmunomoduladora en vertebrados superiores.¹⁸

No existen informes anteriores de péptidos antimicrobianos aislados a partir de *Cenchritis muricatus*. González y otros,¹⁹ partiendo de este molusco, aislaron y caracterizaron inhibidores de la enzima elastasa de neutrófilos humanos (CmPI-I-III), y para uno de ellos, CmPI-II se realizó la secuenciación completa y la subsecuente modelación 3D.²⁰

Debido a la enorme importancia que tiene desarrollar nuevos agentes antimicrobianos, el

objetivo de este trabajo es realizar una comparación entre 3 soluciones: ácido acético 30 %, metanol 50 % y NaCl 0,6 mol/L, HCl 1 % (salina-ácida), sobre la base de un estudio preliminar acerca de las capacidades extractivas de moléculas del molusco marino *C. muricatus* con actividad antibacteriana, para dos representantes típicos dentro de la clasificación basada en la tinción de Gram, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

MÉTODOS

Se realizaron colectas manuales del molusco marino *C. muricatus* en el litoral rocoso de Playa Jibacoa en la provincia Mayabeque, Cuba. Los animales se trasladaron vivos al laboratorio hasta su procesamiento.

Con el propósito de optimizar la extracción de moléculas antibacterianas a partir de extractos de proteínas totales de *C. muricatus*, se compararon 3 soluciones de composición simple y diferentes propiedades químicas que han sido descritas anteriormente en la obtención de péptidos antimicrobianos:^{11,21,22} ácido acético (HAc) 30 %; metanol (MeOH) 50 % en agua y HCl 1 %, NaCl 0,6 mol/L (salina-ácida). Las soluciones se añadieron en proporción 1:1,5; p/v y se homogeneizó con una mezcladora doméstica. Posteriormente se centrifugó a 15 000 g durante 30 min a 4 °C y se colectó el sobrenadante. Los extractos totales obtenidos se desalaron en matriz Sephadex G-10 (Farmacia-Amersham, GE, Health Care, EE. UU.) empaquetada en una columna tipo PD-10 (Farmacia-Amersham, GE, Health Care, EE. UU.) con tampón Tris-HCl 10 mmol/L pH 8. La solución desalada se concentró en un secador centrífugo de vacío a 8 000 rpm a 4 °C hasta reducir 2 veces su volumen (Eppendorf, Concentrator 5301). Se evaluó la concentración proteica de las muestras mediante el método de Bradford²³ utilizando una curva patrón de albúmina de suero bovina. Posteriormente se analizaron los extractos mediante el bioensayo de actividad antimicrobiana.

Para evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos se utilizaron cepas de *S. aureus* ATCC 29213 y *E. coli* ATCC 35218 a partir de cultivos

en medio de Luria Bertani (LB) crecidos en agitación durante 12 h a 37 °C. Se utilizaron microplacas de 96 pocillos y se añadieron 100 µL/pozo de los extractos de proteínas totales a 400 µg/mL y 100 µL/pozo del inóculo de las suspensiones bacterianas previamente ajustadas a una densidad óptica de 0,02 a 600 nm en un espectrofotómetro (Genesis 10 uv, Thermo Electron Co) para un volumen final de 200 µL/pozo. Los ensayos se realizaron a una concentración final de 200 µg/mL de proteínas totales y 0,01 del inóculo bacteriano. Las placas se incubaron durante 5 h a 37 °C en agitación en zaranda orbital a 120 rpm y pasado ese tiempo se evaluó el crecimiento bacteriano por turbidimetría a 600 nm. Los controles negativos fueron 100 µL/pozo del inóculo inicial de las suspensiones bacterianas y 100 µL de tampón Tris-HCl 10 mmol/L pH 8. En los pozos utilizados como controles positivos se añadió la misma mezcla anterior y 1 µL del antibiótico cloranfenicol (Sigma, EE. UU.) para una concentración de 40 µg/mL. Cada muestra se analizó por triplicado.

El procesamiento estadístico se realizó mediante el programa Statistica versión 6.0 (2001). En todas las variables se comprobó normalidad mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene. Para evaluar la significación estadística de las diferencias entre los grupos de datos, se utilizó un análisis de varianzas de clasificación simple de comparación de medias independientes (ANOVA). Se realizó una prueba Tukey *a posteriori* cuando los resultados del ANOVA fueron significativos. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para $p < 0,001$.

El porcentaje de inhibición (PI), que representa la disminución del crecimiento microbiano por efecto de la adición de cada muestra, se determinó según la ecuación:

$$PI = 1 - \frac{DO \text{ muestra} - DO \text{ control positivo}}{DO \text{ control negativo} - DO \text{ control positivo}} \times 100$$

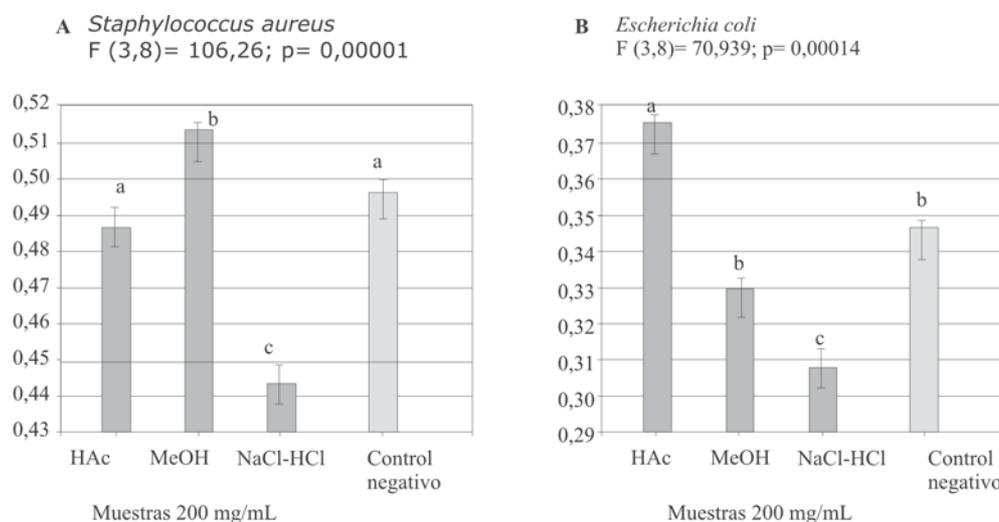
RESULTADOS

Para determinar la capacidad extractiva de las soluciones en estudio se determinó la concentración proteica de cada uno de los extractos. La concentración proteica total del extracto obtenido con la solución salina-ácida es mayor que la concentración de los extractos obtenidos con las soluciones HAc 30 % y MeOH 50 % bajo las mismas condiciones de extracción (tabla). Nótese además, que los mayores valores de inhibición del crecimiento de ambas bacterias corresponden al extracto total obtenido con la solución salina-ácida.

En la figura se muestran los resultados de la comparación de las medias del crecimiento de *E. coli* y *S. aureus*, con los extractos totales obtenidos a partir de las diferentes soluciones evaluadas en el bioensayo de actividad antimicrobiana. Solo el extracto total de *C. muricatus* obtenido con la solución salina-ácida es capaz de inhibir significativamente ($p < 0,001$) el crecimiento tanto de *E. coli* como de *S. aureus*. Además, los extractos totales obtenidos con HAc 30 % y MeOH 50 % no mostraron inhibición significativa del crecimiento de ninguna de las 2 bacterias evaluadas y, sin embargo, potencian en cada caso el crecimiento de *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente.

Tabla. Cuantificación de proteínas totales de *Cenchrus muricatus* y actividad antibacteriana de los extractos obtenidos con las soluciones de extracción ácido acético (HAc) 30 %, metanol (MeOH) 50 % y salina-ácida (NaCl 0,6 mol/L, HCl 1 %) a 200 µg/mL de proteínas totales

Solución de extracción	Concentración de proteínas totales (mg/mL)	Porcentaje de inhibición del crecimiento de <i>Escherichia coli</i> (%)	Porcentaje de inhibición del crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> (%)
HAc 30 %	1,34	No inhibe	2,01
MeOH 50 %	2,67	3,9	No inhibe
Salina-ácida	7,8	12,1	12,64



Resultados ANOVA de clasificación simple. Letras distintas muestran diferencias entre las medias según la prueba de Tukey

Fig. Comparación entre los crecimientos de *Staphylococcus aureus* (A) y *Escherichia coli* (B) con LB + Tris 10 mmol/L pH 8,0 (control negativo del bioensayo) con los extractos totales de *Cenchrithis muricatus* obtenidos con las soluciones de extracción de ácido acético (HAc) 30 %, metanol (MeOH) 50 % y salina-ácida (NaCl 0,6 mol/L, HCl 1 %) a 200 µg/mL de proteínas totales.

DISCUSIÓN

Las características de las diferentes soluciones de extracción para el procesamiento de material biológico se corresponden fundamentalmente con las propiedades físico-químicas de la molécula de interés. De acuerdo con los resultados de la comparación entre las soluciones HAc 30 %, MeOH 50 % y salina-ácida, esta última resultó ser la más eficiente en la extracción de moléculas de naturaleza peptídica. La alta fuerza iónica y el pH ligeramente ácido de esta solución permite una mayor extracción de las proteínas de *C. muricatus* (5 veces más que la solución HAc), lo que aumenta la probabilidad de extraer moléculas de naturaleza proteica con actividad antimicrobiana como los AMPs.

Por otra parte, el extracto total obtenido con la solución salina-ácida mostró los mayores porcentajes de inhibición y fue el único capaz de inhibir significativamente el crecimiento de ambas bacterias. Aunque los PI obtenidos no son muy elevados, constituye un resultado prometedor si se toma en cuenta que la actividad antimicrobiana se analizó en un extracto total con todo el proteoma del molusco, por lo que hay un gran número de proteínas estructurales y funcionales que contribuyen al

valor de concentración medido y que no forman parte de los mecanismos de defensa humores como moléculas antimicrobianas. Este resultado preliminar se refuerza además, con el hecho de que los extractos obtenidos con MeOH 50 % y HAc 30 % no mostraron inhibición alguna y parecen contener moléculas de *C. muricatus* que contribuyen a potenciar el crecimiento de las cepas de *S. aureus* y *E. coli*, respectivamente.

La actividad antibacteriana presente en el extracto obtenido con la solución salina-ácida pudiera estar relacionada con la presencia de AMPs, porque estas moléculas son efectoras humores de la inmunidad innata y están ampliamente distribuidas en la naturaleza desde organismos unicelulares hasta mamíferos, incluidos los humanos. Son en general de pequeño tamaño y catiónicas a pH fisiológico (con carga entre +2 y +9) debido a que presentan alto contenido de residuos de arginina y lisina.^{14,17} Además, en la estructura primaria de la mayoría de los AMPs, alrededor de 50 % de los aminoácidos son residuos hidrofóbicos.²⁴

De acuerdo con estas características, se han empleado para su obtención diferentes soluciones de extracción semipolares (como MeOH en H₂O) para proporcionar un entorno favorable a estas

moléculas solubles que pueden interactuar perfectamente con las membranas lipídicas y soluciones ácidas (como el HAc) por su capacidad para solubilizar moléculas catiónicas,²¹ entre otras. El HAc en particular, ha sido muy empleado para extraer AMPs de los hemocitos y el tejido de las branquias de bivalvos.^{11,12} *Pelegri* y otros utilizaron la solución salina-ácida para obtener AMPs de las hojas de *Psidium guajava* (Guayabo)²² y en correspondencia con los resultados del presente trabajo, esta solución fue más eficiente que las otras en la obtención de un extracto con actividad antibacteriana de *C. muricatus*. El NaCl, al igual que otras sales, a concentraciones no muy altas aumenta la tensión superficial del agua, lo cual provoca un efecto de solubilización de proteínas relativamente hidrofóbicas conocido como *salting-in*.^{25,26} Al parecer, la fuerza iónica de esta solución y su carácter algo ácido contribuyó a la solubilización de moléculas proteicas antimicrobianas relativamente hidrofóbicas y catiónicas de *C. muricatus*, características que se corresponden con los AMPs. Este estudio preliminar sienta las bases para la extracción y posterior purificación de compuestos antimicrobianos de *C. muricatus*, que pudieran ser empleados en la terapia de enfermedades infecciosas.

Optimization of extracting solutions of antibacterial molecules from *Cenchritis muricatus* (Gastropoda: Littorinidae)

ABSTRACT

Introduction: marine mollusks are natural reservoirs of molecules with therapeutic potential for the treatment of infectious diseases, at a time when many antibiotic-resistant strains are being described. **Objective:** to compare three solutions: 30 % acetic acid, 50 % methanol and saline-acid (NaCl 0.6 mol/L, 1 % HCl) according to their capacities to extract molecules with antimicrobial activity from the marine mollusk *Cenchritis muricatus*. **Methods:** the three extraction solutions were used to process the biological material, and then, the obtained extracts were analyzed in terms of total protein concentration and the bacterial growth inhibition of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains by means of a turbidimetric bioassay using 96 well microplates in Luria-Bertani (LB) culture medium. **Results:** the highest total protein concentration (7.8 µg/mL) was found in the *C. muricatus* extract from the saline-acid solution. Additionally, 200 µg/mL of total proteins from the extract caused significant growth inhibition ($p < 0.001$) of *S. aureus* (12.64 %) and *E. coli* (12.1 %) compared to the positive control of growth inhibition using chloramphenicol. **Conclusions:** according to these results, the saline-acid solution

proved to be more efficient in extracting molecules with antibacterial activity that are likely to be antimicrobial peptides from *C. muricatus*.

Key words: *Cenchritis muricatus*, antimicrobial molecules, extracting solutions.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lenski RE. Bacterial evolution and the cost of antibiotic resistance. *Internatl Microbiol.* 1998;1:265-70.
2. Keller M, Blench M, Tolentino H, Freifeld CC, Mandl KD, Mawudeku A, et al. Use of unstructured event-based reports for global infectious disease surveillance. *Emer Infect Dis.* 2009;15(5):689-96.
3. Marr AK, Gooderham WJ, Hancock REW. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Curr Opin Pharmacol.* 2006;6(5):468-72.
4. Tincu JA, Taylor SW. Antimicrobial peptides from marine invertebrates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(10):3645-54.
5. Emerson WK, Jacobson MK. *The American Museum of Natural History Guide to Shells.* New York: Alfred A. Knopf, Inc.; 1976.
6. Kisugi J, Kamiya H, Yamazaki M. Purification of dolabellin C an antineoplastic glycoprotein in the body fluid of a sea hare, *Dolabella auricularia*. *Dev Comp Immunol.* 1989;13(1):3-8.
7. Kisugi J, Ohye H, Kamiya H, Yamazaki M. Biopolymers from marine invertebrates. XIII. Characterization of an antibacterial protein, dolabellin A, from the albumen gland of the sea hare, *Dolabella auricularia*. *Chem Pharm Bull.* 1992;40(6):1537-9.
8. Bai R, Friedman SJ, Pettit GR, Hamel E. Dolastatin 15, a potent antimetabolic depsipeptide derived from *Dolabella auricularia*. Interaction with tubulin and effects of cellular microtubules. *Biochem-Pharmacol.* 1992;43(12):2637-45.
9. Marks RS, Graham DL, Sloan JA, Hillman S, Fishkoff S, Krook JE, et al. A Phase II Study of the Dolastatin 15 Analogue LU 103793 in the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *Am J Clin Oncology.* 2003;24(4):336-7.
10. Charlet M, Chernish S, Philippe H, Hetru C, Hoffmann JA, Bulet P. Isolation of several Cys-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. *J Biol Chem.* 1996;271(36):21808-13.
11. Mitta G, Hubert F, Noel T, Roch P. Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from hemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Eur J Biochem.* 1999;265:71-8.
12. Seo JK, Crawford JM, Stone KL, Noga EJ. Purification of a novel arthropod defensin from the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;338:1998-2004.
13. Jenssen H, Hamill P, Hancock REW. Peptides antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(3):491-511.
14. Hancock REW, Sahl HG. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol.* 2006;24(12):1551-8.
15. Tanaka K. P-13-kinase p85 is a target molecule of proline-rich antimicrobial peptide to suppress proliferation of ras-transformed cells. *Cancer Sci.* 2001;92(9):959-67.
16. Oppenheim JJ, Yang D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol.* 2005;17:359-65.
17. Lai Y, Gallo RL. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in innate defense. *Trends Immunol.* 2009;30(3):131-41.