

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS EN HEMOCITOS DE ESPECIES
DE MOLUSCOS CHILENOS DE INTERÉS PRODUCTIVO**
(Concholepas concholepas y especies de Lapas del género Fissurellidae)

Tesis para optar al grado académico de Magíster en Bioquímica, área de especialización Bioquímica de Proteínas y Biotecnología, y Memoria para optar al título de Bioquímico por:

FABIÁN ALBERTO SALAZAR LIZAMA

Profesor Patrocinante

Dra. Ana María Kettlun Ph.D.

Director de Tesis

Dra. María Inés Becker Ph.D.

Santiago de Chile, 2010

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la tesis de Magíster presentada por el candidato:

FABIÁN ALBERTO SALAZAR LIZAMA

Ha sido aprobada por la comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, área de especialización Proteínas y Biotecnología y al título de Bioquímico, en el examen de defensa de tesis rendido el día 24 de Marzo del 2010

Director de Tesis:

Dra. María Inés Becker Ph.D.

Comisión Informante de Tesis:

Dra. Ana María Kettlun Ph.D.

Dra. Marta Mancilla Ph.D.

Dra. Mercedes Zaldívar Ph.D.

Agradecimientos

Porque es imposible llegar al final de un camino cuando se va solo, en esta instancia quiero agradecer a todas las personas que colaboraron en que este proyecto llegara a término, y me apoyaron, ya sea desde el ámbito académico, como desde una perspectiva emocional. Primero que todo quiero agradecer a la primera persona que confió y depositó en mí la responsabilidad de llevar a cabo este proyecto, a la Dra. María Inés Becker, por su incondicional respaldo, su disponibilidad, y por compartir sus experiencias y enseñanzas que me servirán desde ahora en adelante tanto para mi desempeño laboral, como para enfrentarme a cualquier situación en la vida diaria.

En segundo lugar, quiero agradecerles a todas las personas pertenecientes a la Fundación Ciencia y Tecnología para el Desarrollo y Biosonda, que me escuchaban incansablemente en los tantos seminarios que se llevaron a cabo, por sus críticas y ayuda en el día a día, por los viajes a Quintay y los locos con mayonesa. Entre ellos, Esteban Nova, Miguel del Campo, Sergio Arancibia, Augusto Manubens, el Dr. Alfredo de loannes y por supuesto a Don José.

También quiero agradecer a todas las Instituciones y personas externas que me ayudaron de diversa forma en sacar adelante este trabajo. A la profesora Viviana Cachicas, a los estudiantes y al personal de la Unidad de Microbiología de Alimentos del Instituto de Salud Pública, a la profesora Loreto Salas por su colaboración con el Speed-Vac, al profesor Alejandro Munizaga por su ayuda en la microscopia, al Dr. Juan Navarro y la Dra. Eliana Canelo del Instituto de Instrumentación Analítica y Desarrollo Tecnológico, al Centro de Acuicultura de la Universidad Nacional Andrés Bello en Quintay y al Transantiago, que me alojó en gran parte del tiempo de la tesis. Agradecer además a mi comisión de evaluación, la Dra. Ana María Kettlun, la Dra. Marta Mancilla de Bioschile y la Dra. Mercedes Zaldívar.

Para terminar quiero agradecer todo el apoyo proveniente de mi familia y amigos, quienes fueron un pilar fundamental, en especial a mi madre Teresa Lizama y a Natalia Mancilla por escucharme, entenderme y alentarme en todo momento.

“Hoy no voy a hablar de conceptos refinados, teoremas sofisticados y demostraciones complicadas. Hoy deseo ofrecerles algo muy modesto: yo mismo. Les ofrezco todo lo que sé, mi manera de pensar y mis sentimientos. Les pediré atención estricta, diligencia de hierro y tesón incansable. Pero olvídenme si no piensan darme lo que es más importante para mí: su confianza, su simpatía y su amor. Les pido, en una palabra, lo más grande que ustedes pueden dar: a sí mismos”.

LUDWIG BOLTZMANN

Esta Tesis fue financiada parcialmente por los siguientes Proyectos: Fundación COPEC-Pontificia Universidad Católica CQ057 y FONDECYT 105-0150.

Los resultados fueron presentados en los siguientes Congresos:

- **Péptidos antibacterianos contra cepas Gram negativas en hemocitos de especies de moluscos chilenos de interés productivo.** F. Salazar, E. Nova, A. Manubens, V. Cachicas, M. I. Becker. XXVI Congreso Nacional de Estudiantes de Bioquímica, 5-8 Agosto 2009, Santiago, Chile. Libro de Resúmenes, página 38.
- **Péptidos antibacterianos contra cepas Gram negativas en hemocitos de especies de moluscos chilenos de interés productivo.** F. Salazar, E. Nova, A. Manubens, V. Cachicas, M. I. Becker. II Feria de Postgrado y Postítulo, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, 11 Agosto 2009, Santiago, Chile.
- **Innate immunity of marine invertebrates: Search of antimicrobials peptides with potential biotechnological applications.** F. Salazar, E. Nova, A. Manubens, V. Cachicas, A. De Ioannes, M. I. Becker. 9th Latin American Congress of Immunology, November 3-7th 2009, Viña del Mar, Chile. Libro de Resúmenes, página 15.
- **Péptidos antibacterianos de moluscos marinos contra bacterias Gram negativas de interés en la industria alimentaria.** F. Salazar, E. Nova, A. Manubens, A. De Ioannes, J. Navarro, V. Cachicas, M. I. Becker. XXI Congreso Chileno de Microbiología, 1-4 Diciembre 2009, Santa Cruz, Chile. Libro de Resúmenes, página 140.

INDICE

1.	ABREVIATURAS	1
2.	RESÚMEN	3
3.	ABSTRACT	4
4.	INTRODUCCIÓN	5
4.1	Sistema inmune innato de invertebrados marinos	6
4.1.1	<u>Inmunidad humoral</u>	6
4.1.2	<u>Inmunidad celular</u>	8
4.2	Péptidos antimicrobianos	10
4.3	Búsqueda de AMPs en moluscos chilenos comestibles	17
4.4	Planteamiento del problema	18
4.5	Hipótesis de trabajo	19
4.6	Objetivos	19
4.6.1	<u>Objetivo general</u>	19
4.6.2	<u>Objetivos específicos</u>	19
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	21
5.1	Materiales	21
5.1.1	<u>Biológicos</u>	21
5.1.1.1	Especies de gastrópodos chilenos	21

5.1.1.2	Cepas bacterianas	21
5.1.2	<u>Reactivos</u>	22
5.1.2.1	Proteínas	22
5.1.2.2	Antibióticos y péptidos	22
5.1.2.3	Reactivos para rompimiento de hemocitos y tratamiento de las fracciones	22
5.1.2.4	Reactivos y medios de cultivo bacteriano	23
5.1.2.5	Reactivos para cuantificación de proteínas	23
5.1.2.6	Reactivos para microscopía de luz y electrónica	23
5.1.2.7	Reactivos para purificación de péptidos	23
5.1.2.8	Reactivos para electroforesis	24
5.1.3	<u>Soluciones</u>	24
5.1.4	<u>Material de vidrio</u>	26
5.1.4.1	Materiales para el sajado de los ejemplares de moluscos	26
5.1.4.2	Materiales para los ensayos antimicrobianos	26
5.1.5	<u>Material plástico y otros</u>	26
5.1.5.1	Material para centrifugación	26
5.1.5.2	Material para filtración	27
5.1.5.3	Material para el almacenaje de hemocitos y fracciones con actividad	27
5.1.5.4	Materiales para los ensayos antimicrobianos	27
5.1.5.5	Materiales para la purificación de los péptidos	27
5.1.5.6	Otros materiales	28

5.1.6	<u>Equipos</u>	28
5.1.6.1	Equipos para la obtención de las fracciones de hemocitos	28
5.1.6.2	Equipos área microscopia	28
5.1.6.3	Equipos área microbiología	29
5.1.6.4	Equipos para la purificación de los péptidos	29
5.1.6.5	Otros equipos	29
5.2	Métodos	30
5.2.1	<u>Proceso de obtención de extractos de hemocitos</u>	30
5.2.1.1	Obtención de ejemplares de Loco y Lapas	30
5.2.1.2	Obtención de hemolinfa y hemocitos	30
5.2.1.3	Tratamientos de la hemolinfa y obtención de extractos de hemocitos	31
5.2.2	<u>Caracterización de los tipos celulares presentes en los hemocitos</u>	32
5.2.2.1	Microscopía electrónica de transmisión	32
5.2.3	<u>Ensayos para determinar actividad antimicrobiana</u>	33
5.2.3.1	Ensayo antimicrobiano en medio sólido en placa de Petri	33
5.2.3.2	Ensayo antimicrobiano en medio líquido en placa de 96 pocillos	34
5.2.4	<u>Cultivo de las cepas bacterianas para los ensayos de actividad antimicrobiana</u>	34
5.2.4.1	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 y <i>Escherichia coli</i> DH5α	35
5.2.4.2	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802 y <i>Vibrio parahaemolyticus</i> RIMD 210633	35

5.2.4.3	<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090 y <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	35
5.2.4.4	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	36
5.2.5	<u>Purificación de los agentes con actividad antimicrobiana mediante cromatografía en fase reversa</u>	36
5.2.5.1	Pre-purificación mediante extracción en fase sólida	36
5.2.5.2	Purificación mediante RP-HPLC	37
5.2.6	<u>Caracterización bioquímica de las fracciones con actividad antimicrobiana</u>	37
5.2.6.1	Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS en tampón Tris-Tricina	37
5.2.7	<u>Cálculo de la Concentración de Proteínas</u>	38
6.	RESULTADOS	39
6.1	Características de los ejemplares de Lapas y Loco	39
6.2	Identificación de la fracción con actividad antimicrobiana	41
6.3	Morfología de los hemocitos	43
6.4	Estimación del tamaño de las moléculas involucradas en la actividad antimicrobiana	46
6.5	Efecto del pH de los extractos de hemocitos sobre la actividad antimicrobiana	49
6.6	Determinación del espectro de actividad antimicrobiana	52
6.7	Purificación de la fracción con actividad antimicrobiana proveniente de hemocitos de Loco mediante extracción en fase sólida	55
6.8	Caracterización de las fracciones de extractos de hemocitos con actividad antimicrobiana por electroforesis en geles de	59

poliacrilamida-SDS

6.9	Purificación de la fracción con actividad antimicrobiana mediante HPLC	62
7.	DISCUSIÓN	70
7.1	Diversidad de tipos celulares presentes en los hemocitos de los moluscos estudiados	73
7.2	Origen de los péptidos antimicrobianos	77
7.3	Espectro de actividad antimicrobiana de los agentes encontrados	79
7.4	Aplicaciones	80
8.	CONCLUSIONES	84
9.	REFERENCIAS	86
10.	ANEXO	91
10.1	Tabla 10. AMPs desarrollados en estudios clínicos	91

INDICE FIGURAS

Figura 1.	Mecanismos que dan cuenta de la generación de AMPs en invertebrados	10
Figura 2.	Tipos de estructuras adoptadas por los AMPs en solución	11
Figura 3.	Mecanismos de acción de los AMPs	13
Figura 4.	Aspecto físico de las cuatro especies de moluscos en estudio	39
Figura 5.	Cantidad de hemolinfa recolectada de cada especie en estudio a lo largo de un año	40
Figura 6.	Actividad antimicrobiana de extractos ácidos de hemocitos de Lapa frutilla lisados con distintos tratamientos frente a <i>E. coli DH5α</i> y <i>S. aureus ATCC 29213</i>	42
Figura 7.	Morfología de hemocitos de moluscos chilenos de la clase <i>Gastropoda</i> (Loco y Lapas) observados mediante microscopía de luz	43
Figura 8.	Morfología de hemocitos de Loco (<i>C. concholepas</i>) mediante microscopía electrónica de transmisión	44
Figura 9.	Actividad antimicrobiana de extractos ácidos de hemocitos de Lapa frutilla lisados con distintos tratamientos y centrifugados en filtros de 10 kDa frente a <i>E. coli DH5α</i> y <i>S. aureus ATCC 29213</i>	46
Figura 10.	Actividad antimicrobiana de un péptido antimicrobiano control (Magainina I) contra <i>E. coli DH5α</i> en distintas condiciones	51
Figura 11.	Actividad antimicrobiana de extractos ácidos de organelos (EAO) de hemocitos frente a <i>V. parahaemolyticus ATCC 17802</i> y <i>E. coli ATCC 25922</i>	52

- Figura 12.** Actividad antimicrobiana de extractos ácidos (EA) de hemocitos de Loco frente a *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 y *E. coli* ATCC 25922 56
- Figura 13.** Actividad antimicrobiana de fracciones purificadas mediante Sep-Pak C-18 y eluídas con porcentajes crecientes de ACN frente a *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 y *E. coli* ATCC 25922 57
- Figura 14.** Gel de poliacrilamida-SDS en tampón Tris-Tricina de las fracciones de extractos de hemocitos purificadas por HPLC y con actividad antimicrobiana 59
- Figura 15.** Curva de calibración de la migración electroforética v/s log (PM) para estimar el PM de la banda visualizada en las fracciones con actividad antimicrobiana 60
- Figura 16.** Efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano de un extracto ácido de hemocitos de Loco frente a *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 determinado en un ensayo en medio líquido 63
- Figura 17.** Cromatograma de un extracto ácido directo de hemocitos de Loco leído a 220 nm en un sistema UPLC 64
- Figura 18.** Cromatograma de un extracto ácido directo de hemocitos de Loco leído a 280 nm en un sistema UPLC 64
- Figura 19.** Cromatograma de un extracto ácido directo de hemocitos de *C. concholepas* leído a 220 nm en un sistema HPLC Alliance 2695 66
- Figura 20.** Actividad AM frente a *E. coli* DH5 α y *E. coli* ATCC 25922 de fracciones purificadas mediante HPLC eluídas con un gradiente lineal de ACN 68
- Figura 21.** Gel de poliacrilamida SDS en tampón Tris-Tricina para la separación de proteínas en un rango entre 1 a 100 kDa 69

INDICE TABLAS

Tabla 1.	AMPs aislados de diversas especies	16
Tabla 2.	Muestras analizadas de las especies de moluscos en estudio	41
Tabla 3.	Actividad antimicrobiana de los extractos de hemocitos de moluscos con los distintos tratamientos de ruptura celular	48
Tabla 4.	Actividad antimicrobiana de los extractos de hemocitos de las distintas especies de moluscos neutralizados en diferentes condiciones	49
Tabla 5.	Actividad antimicrobiana de los extractos de hemocitos de las distintas especies neutralizados en diferentes condiciones frente a un panel de cepas bacterianas	54
Tabla 6.	Concentración de proteínas de las fracciones purificadas mediante Sep-Pak C-18	58
Tabla 7.	Polipéptidos principales de un extracto ácido de hemocitos de <i>C. concholepas</i> analizados en forma analítica mediante un sistema UPLC	65
Tabla 8.	Polipéptidos principales de un extracto ácido de hemocitos de <i>C. concholepas</i> analizados mediante un Sistema HPLC Alliance 2695	67
Tabla 9.	Ejemplos de películas y recubrimientos con AMPs y su aplicación en algunos productos cárnicos	81
Tabla 10.	AMPs desarrollados en estudios clínicos	91

1. ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
AM	Antimicrobiano (a)
AMPs	Péptidos Antimicrobianos
BSA	Suero Albúmina de Bovino
CCH	<i>Concholepas concholepas</i> hemocyanin
EAD	Extracto Ácido Directo
EAO	Extracto Ácido de Organelos
EDTA	Ácido Etilendiaminotetracético
ELISA	Ensayo de Inmuno-absorbente unido a enzima
ERK	Kinasas que regulan las señales extracelulares
Estrep	Estreptomicina
FCH	<i>Fissurella cumingi</i> hemocyanin
FLH	<i>Fissurella latimarginata</i> hemocyanin
FMH	<i>Fissurella maxima</i> hemocyanin
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Presión
IP	Inhibidores de Proteasas
KLH	Keyhole limpet hemocyanin
LPS	Lipopolisacárido
PBS	Tampón Fosfato Salino
Pen	Penicilina
PGN	Peptidoglicano
PM	Peso Molecular
PMSF	Para-metilsulfonil fluoruro
PO	Fenoloxidasas

PSA	Persulfato de amonio
RP	Fase Reversa
SDS	Dodecilsulfato de Sodio
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
Tween	Monolaureato de polioxietileno sorbitano
UPLC	Cromatografía Líquida de Ultra Presión

2. RESUMEN

La respuesta inmune de invertebrados se basa en un conjunto de elementos del sistema inmune innato, donde los péptidos antimicrobianos (AMPs) juegan un importante rol. Los AMPs son moléculas anfifílicas que se almacenan en el interior de los hemocitos o circulan libremente en la hemolinfa. Su efectividad en la defensa innata se basa en su baja especificidad, actuando contra un amplio rango de microorganismos; su pequeño tamaño y baja toxicidad abren potenciales aplicaciones como nuevos antibióticos, con la ventaja de que no hay evidencia de bacterias resistentes a ellos. Considerando la diversidad de moluscos marinos en nuestras costas, la hipótesis de este trabajo ha sido que existen AMPs en la hemolinfa o hemocitos de moluscos chilenos comestibles.

Mediante ensayos en medio sólido, encontramos que extractos de hemocitos de *Concholepas* y especies de Lapas del género *Fissurellidae*, exhiben actividad AM contra *V. parahaemolyticus* y *E. coli*, ambas cepas Gram negativas. A través de análisis mediante microscopía electrónica, caracterizamos los hemocitos y encontramos al menos dos tipos celulares que presentan diferentes tipos de gránulos electrón-densos en su citoplasma, que de acuerdo a lo descrito en la literatura podrían almacenar AMPs. La caracterización y purificación de los extractos de hemocitos mediante métodos electroforéticos mostró un péptido principal de 3,7 kDa, y los estudios cromatográficos indican la presencia de AMPs de naturaleza hidrofóbica. La identificación de estos péptidos está en progreso, y se espera a futuro iniciar su utilización en alguna aplicación biomédica o biotecnológica.

3. ABSTRACT

The immune response of invertebrates relies on elements of the innate immune system, among them, antimicrobials peptides (AMPs) play a relevant role. They are amphiphilic molecules that are accumulated inside the hemocytes or are circulating freely in the hemolymph. Their effectiveness in the innate defence relay in their low specificity, thus acting on a wide range of microorganism; its small size and low toxicity open potential applications as new antibiotics, with the advantage that there are no evidence of building resistant bacteria. Considering the diversity of Chilean mollusc marine species, we hypothesized that there are AMPs in hemolymph or hemocytes of Chilean commercial molluscs.

Using solid agar plate assays, we found that extracts of hemocytes from *Concholepas* and limpets of the *Fissurellidae* genus, exhibit antibacterial activity against *Vibrio parahaemolyticus* and *Escherichia coli* both Gram negative bacteria. Through electron microscopic analysis, we characterized the hemocytes and found at least two cellular types bearing different kind of electron-dense granules, according to literature, these granules may contain AMPs. The characterization and purification of hemocytes extracts through electrophoresis showed the presence of a principal peptide of 3,7 kDa, and chromatographic methods indicate the presence of AMPs with hydrophobic nature. The identification of these peptides is in progress to assess their utilization in some biomedical and biotechnological applications.

4. INTRODUCCIÓN

Los organismos invertebrados representan alrededor del 95% de todos los animales que pueblan el planeta, pese a ello son unos completos desconocidos considerando muchos puntos de vista. Desde una mirada inmunológica, se hace complejo establecer un modelo general de cómo son sus mecanismos de defensa, sin embargo se reconocen características esenciales compartidas por todos ellos. Estos organismos carecen de un sistema inmune adaptativo como el de los vertebrados, caracterizado por la memoria inmunológica que conlleva la exposición a un antígeno, basado en agrupaciones de linfocitos T y B que se activan clonalmente. En su lugar, ellos disponen solamente de mecanismos inmunes innatos de acción inmediata y con mecanismos de reconocimientos de patógenos poco específicos, que incluyen tanto la respuesta celular como humoral, en donde los agentes antimicrobianos de naturaleza peptídica (AMPs) han emergido fuertemente en los últimos 10 años, como uno de sus principales sistema de defensa frente a agresiones microbianas [1].

El sistema inmune innato es la primera línea de defensa inducible contra bacterias, hongos y patógenos virales. Este sistema de defensa es esencial para la supervivencia y perpetuación de todos los organismos multicelulares. Los invertebrados, de acuerdo a esto, han desarrollado estrategias únicas para detectar y responder a antígenos superficiales microbianos, como lipopolisacárido (LPS), peptidoglicano (PGN), ácido lipoteicoico, lipoproteínas y β -glucanos, entre otros. Entre los sistemas de defensa más importantes se encuentran: el sistema de coagulación de la hemolinfa que corresponde a la sangre circulante en estos organismos, la formación de melanina mediado por la cascada de la pro-fenoloxidasa (pro-PO), la activación del complemento mediado por lectinas y la producción de péptidos antimicrobianos (AMPs) por diversos mecanismos que junto a una variedad de lectinas, aglutininas, especies reactivas del oxígeno y sistemas fagocíticos, cooperan con las reacciones inmunes para destruir a los patógenos invasores [2]. Además de estos mecanismos, existen otros más inespecíficos aún, que corresponden a las barreras fisicoquímicas,

cuya función es la de impedir la entrada de potenciales patógenos, como por ejemplo el exoesqueleto en artrópodos, secreciones mucosas en anélidos y moluscos y la concha propiamente tal en moluscos. Todos estos factores contribuyen en su conjunto a su sistema de defensa contra microorganismos invasores, los cuales pueden llegar a ser del orden de 10^6 bacterias/ml y 10^9 virus/ml en el ambiente marino, lo cual sugiere que este sistema inmune innato debe ser lo suficientemente efectivo y robusto [1]. Debido a que el modelo de estudio en este trabajo son invertebrados marinos, se describirán principalmente las características inmunológicas de ellos.

4.1 Sistema inmune innato de invertebrados marinos

4.1.1 Inmunidad humoral

Uno de los principales sistemas de defensa innatos en invertebrados es la melanización de patógenos y tejidos dañados. Tras un daño mecánico o la presencia de algún agente foráneo, tales como parásitos o microorganismos, el resultado es la generación de un depósito de melanina alrededor del tejido dañado o agente introducido, el cual retarda su crecimiento y lo inmoviliza. Sin embargo, quizás más importante que la formación de melanina son los intermediarios de tipo quinona altamente reactivos y tóxicos producidos en la cascada de reacción. La responsable inicial de ello es la enzima fenoloxidasa (PO), expresada en hemocitos, que son las células del sistema inmune de estos invertebrados. Esta enzima es activada por proteólisis limitada y es capaz de catalizar las etapas iniciales de la vía de formación de la melanina. Su activación es cuidadosamente regulada por una serie de eventos, los cuales componen el sistema de la pro-PO, el cual consiste en proteínas que son capaces de unirse a los polisacáridos y otros componentes típicamente asociados a los microorganismos; como LPS, PGN y β -1,3-glucanos; de esta manera, se activa la cascada de serino-proteasas, que conduce finalmente a la formación de melanina. Sin embargo, existen agentes reguladores como inhibidores de proteasas que son

capaces de evitar la formación innecesaria de estos metabolitos. Además, concomitante con la activación de la pro-PO, se pueden producir muchos otros metabolitos del sistema inmune, tales como factores con actividad antimicrobiana, citotóxica, encapsulante y opsonizante [3].

Por otra parte, las hemocianinas, que son enormes proteínas multiméricas que contienen cobre y transportan oxígeno a través de la hemolinfa de moluscos y artrópodos, también tienen roles en la defensa de estos invertebrados, comportándose en algunos casos como PO. Existe estrecha relación entre hemocianina y PO de artrópodos, y entre hemocianina de moluscos y tirosinasa de otros *phylum*, que cataliza la formación de melanina a partir de tirosina por oxidación. Todas estas proteínas están equipadas con un centro de unión de oxígeno estructuralmente similar, además de presentar una estrecha relación en cuanto a secuencia, lo cual fundamenta la evidencia de que es posible inducir tanto en hemocianina de moluscos como de artrópodos una actividad de PO frente a algunos sustratos [3]. En una especie de crustáceo o camarón, *Penaeus japonicus*, se ha inducido *in-vitro* la conversión de hemocianina en una enzima con actividad PO mediante la adición de β -1,3-glucanos y componentes de hemocitos, de lo cual podría desprenderse que dicha hemocianina participa en las reacciones de melanización de microbios [4]. También, en una especie de artrópodo, *Eurypelma californicum*, se ha demostrado que la hemocianina desarrolla actividad PO luego de someterse a proteólisis limitada con tripsina y α -quimiotripsina [5]. Por otra parte, la actividad PO de las hemocianinas de cangrejo herradura *Limulus polyphemus* y *Tachypleus tridentatus* son inducidas en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS) y fosfatidiletanolamida [6,7]. Más específicamente, en *L. polyphemus* no se han encontrado PO similares a la de otros artrópodos, sin embargo componentes de sistema de coagulación y varios factores antimicrobianos derivados de hemocitos como las taquiplesinas, mediante proteólisis, pueden inducir *in-vitro* que la hemocianina exprese una actividad de PO. Esto puede generarse probablemente tras su unión y la inducción de cambios conformacionales en la hemocianina, permitiendo que otros sustratos entren al sitio activo. Además, desde un punto de vista fisiológico, debido a que estas taquiplesinas de naturaleza peptídica son capaces de

unirse a quitina, principal componente estructural del exoesqueleto de artrópodos y de la pared celular de hongos, pueden servir como andamiaje para la unión de la hemocianina. Así facilitaría que su actividad de PO actúe gatillando la cicatrización del exoesqueleto, ya que esta normalmente tiene un rol clave en la formación de nuevo exoesqueleto a través del entrecruzamiento de proteínas. Así, se sugiere que en estas especies el rol de la pro-PO lo tomaría en parte la hemocianina [8,9].

Recientemente se ha establecido un nuevo rol de la hemocianina en la inmunidad innata de los invertebrados. Se han caracterizado péptidos derivados de hemocianina de crustáceos que expresan actividad antimicrobiana, como lo son las astacidinas de cangrejos de río (*Pacifastacus leniusculus*) [10] y péptidos antifúngicos de camarón [11]. Además, se ha establecido *in-vitro* un efecto antiviral de la hemocianina en una especie de molusco y artrópodo. En *Penaeus monodon* la hemocianina y sus dos subunidades independientes inhiben el efecto citopático inducido por seis tipos de virus de peces contra la línea celular “*grouper*” (GP) [12]. Además en otra especie del mismo género (*Penaeus vannamei*) se le ha asignado un posible rol en la señalización vía ERK1/2 tras la infección con TSV (virus del síndrome de Taura), ya que se demostró que el C-terminal de la hemocianina es capaz de interactuar con ERK1/2, siendo ambos sobre-expresados tras la infección con TSV [13]. Por otra parte, en *Rapana*, se ha atribuido el efecto antiviral de la hemocianina a sus azúcares, ya que además del efecto de la molécula completa, unidades funcionales glicosiladas y no nativas, son capaces de inhibir el efecto citopático inducido por el virus respiratorio sincisial en células Hep-2 [14,15].

4.1.2 Inmunidad celular

El componente celular en invertebrados marinos esta mediado por los hemocitos, que son similares a macrófagos de vertebrados, son células móviles que fagocitan microbios y secretan sustancias antimicrobianas y citotóxicas solubles dentro de la

hemolinfa, la cual además contiene lectinas, proteína C reactiva, proteínas con enlaces tioester (α_2 -macroglobulina) y hemocianina. Además dichas células secretan sustancias gelatinosas que fijan a los microorganismos formando verdaderos nódulos para facilitar la acción de estos agentes antimicrobianos [1,2]. Para el caso del cangrejo herradura (*Tachypleus tridentatus*) y en general para todos los artrópodos y moluscos, se pueden encontrar dos tipos de poblaciones de hemocitos, una granular que abarca aproximadamente el 99% del total de los hemocitos, y una no-granular que representa al 1% restante. Para la población de hemocitos que presentan gránulos intracelulares, se pueden identificar dos tipos de gránulos; unos de gran tamaño denominados (L) del inglés “*large*”, y otros de tamaño pequeño denominados (S) del inglés “*small*”. Ambos gránulos son fácilmente distinguibles por microscopía electrónica debido a sus diferentes densidades electrónicas. Estas células son altamente sensibles a componentes bacterianos, tales como LPS y β -1,3-glucanos, principales componentes de la membrana externa de bacterias Gram negativas y hongos respectivamente, respondiendo mediante una desgranulación en que liberan su contenido y así actúan como un mecanismo de defensa frente a microorganismos agresores. Entre los componentes liberados de los gránulos se encuentran dos biosensores de la cascada de la coagulación, el factor C y el factor G. Estos zimógenos serino-proteasas son autocatalíticamente activados por componentes de la pared celular de bacterias Gram negativas u hongos. Su activación gatilla la cascada de la coagulación, resultando en la conversión de coagulígeno en un gel de coagulina insoluble. En paralelo con el proceso de la formación del gel de coagulina, varias lectinas y aglutininas han inducido la liberación de los gránulos L, así los microorganismos son inmovilizados en el coágulo y finalmente destruidos por las sustancias liberadas por ambos gránulos [2]. A nivel molecular se ha descrito que el LPS induce la exocitosis de los gránulos vía la activación del factor C en la membrana de los hemocitos, actuando como un receptor, lo cual gatilla la subsecuente activación de una cascada transduccional mediada por proteína G con movilización de Ca^{+2} , induciendo finalmente la desgranulación y la liberación de los agentes antimicrobianos [16].

4.2 Péptidos antimicrobianos

Como se mencionó anteriormente, existen una gran variedad de agentes antimicrobianos ya sea dentro de gránulos en los hemocitos, o circulando libres en la hemolinfa, o también originándose vía proteólisis de la hemocianina (**Figura 1**). Dentro de estos agentes, los péptidos antimicrobianos son el principal componente de defensa del sistema inmune innato en invertebrados marinos. Se definen como moléculas anfifílicas o anfipáticas de menos de 10 kDa de masa, generalmente de naturaleza catiónica por su alto contenido en lisina y arginina, y además con una gran porción hidrofóbica que corresponde a más del 50% de la molécula. Generalmente son sintetizados como pro-péptidos y luego de activarse adoptan estructuras secundarias de α -hélices y sábanas β , entre otras; además pueden corresponder a metabolitos secundarios o incluso estar codificados en el genoma. Algunos de ellos son sintetizados en los hemocitos y se liberan a la circulación sanguínea en respuesta a un estímulo microbiano, inflamación o daño de tejido, otros son constitutivos y circulan libremente en la hemolinfa sin necesidad de un encuentro microbiano para expresarse, por lo cual se pueden encontrar en forma sistémica o localizarse en regiones más susceptibles a infecciones como son los epitelios, las mucosas y la piel [1,17].

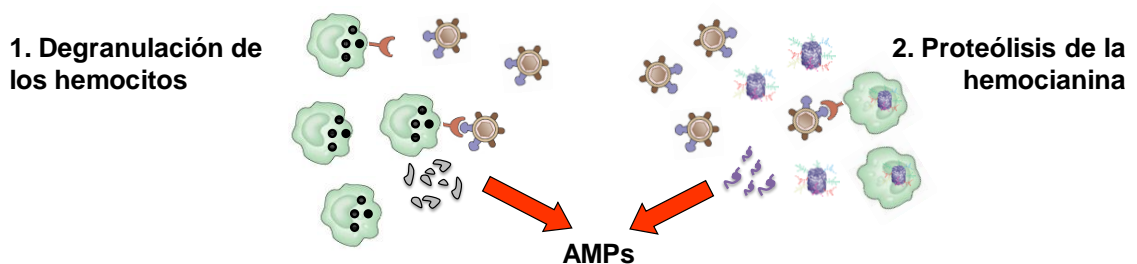


Figura 1. Mecanismos que dan cuenta de la generación de AMPs en invertebrados. Por una parte la desgranulación de los hemocitos tras un encuentro microbiano libera los AMPs que están almacenados en su interior, y por otra parte, la proteólisis de la hemocianina por un mecanismo no descrito aún, que podría involucrar la activación de una proteasa en la hemolinfa, genera fragmentos peptídicos con actividad AM. Adaptado de [2].

El mecanismo de acción de estos péptidos es más bien inespecífico y depende de la estructura tridimensional que adopten, sin embargo generalmente forman un poro en la membrana del microorganismo o destruyen su integridad. Esto es determinado por su naturaleza anfifílica, su carga neta positiva aumentando la interacción con los lípidos aniónicos de la membrana y otros blancos bacterianos. Además de la hidrofobicidad requerida para la inserción en la membrana, así como la conformación, estructura secundaria y flexibilidad que permite la transición del péptido desde su conformación en solución a la conformación que interactúa con la membrana. A la fecha se han aislado cientos de péptidos antimicrobianos de una gran variedad de organismos, vertebrados como invertebrados. Estos péptidos son clasificados de acuerdo a su estructura en sábanas β , α -hélice, asa "loop" y péptidos extendidos; siendo las dos primeras las más comunes. Además existen algunos péptidos que poseen más de un dominio, cualidad que se observa al momento de interactuar con alguna membrana (**Figura 2**).

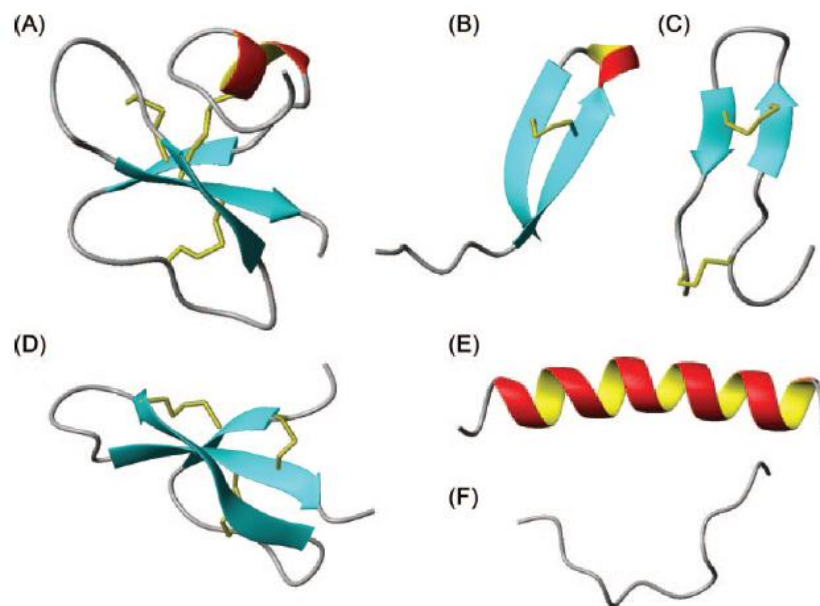


Figura 2. Tipos de estructuras adoptadas por los AMPs en solución. (A) Estructura mixta de la β -defensina II humana. **(B)** "Loop" de la tanatina de una especie de invertebrado. **(C)** Estructura de sábana β de la polifemusina de *Tachypleus tridentatus*. **(D)** Defensina I de riñón de conejo. **(E)** α -hélice de la magainina II de *Xenopus laevis*. **(F)** Estructura extendida de la indolicidina de neutrófilos de bovino. Los puentes disulfuro están indicados en amarillo [17].

Estudios con sistemas de membrana modelo, han dividido a estos péptidos de acuerdo a su mecanismo de acción en dos grupos: destructores de membrana y no destructores de membrana. Particularmente, el mejor estudiado ha sido el mecanismo de acción contra las bacterias. En este caso, la asociación inicial del péptido con la membrana de la bacteria ocurre a través de interacciones electrostáticas entre el péptido catiónico y el LPS aniónico, más específicamente, los grupos fosfato de la membrana externa de bacterias Gram negativas y el ácido lipoteicoico de bacterias Gram positivas, que conduce a una perturbación de ésta. Esta interacción provoca un desplazamiento de los cationes divalentes nativos tales como Mg^{+2} y Ca^{+2} produciendo a una desorganización local adicional. Este fenómeno, facilita la formación de áreas desestabilizadas en la membrana promoviendo la translocación del péptido mediante un mecanismo conocido como "*self-promoted uptake*". En este punto es donde diverge el mecanismo dependiendo si se trata de uno destructor de membrana que lleva a una perturbación de la integridad de la membrana citoplasmática, o de uno no destructor. En este caso, se translocaría al citoplasma teniendo efectos intracelulares tales como inhibir la síntesis de ácidos nucleicos, la síntesis de proteínas o alterar la actividad enzimática de enzimas involucradas en el plegamiento de proteínas y síntesis de la pared celular [17].

Para el caso de los péptidos destructores de membrana cinco modelos mecanísticos se han propuesto: barril, "*barrel stave*", agregados micelares "*micellar aggregate*", carpeta "*carpet*", poro toroidal "*toroidal pore*" y detergente "*detergent*". Cada uno de estos mecanismos indica un diferente intermediario que puede conducir a uno de los tres tipos de eventos: formación de un canal transiente, micelarización o disolución de la membrana, o translocación a través de la membrana (**Figura 3**).

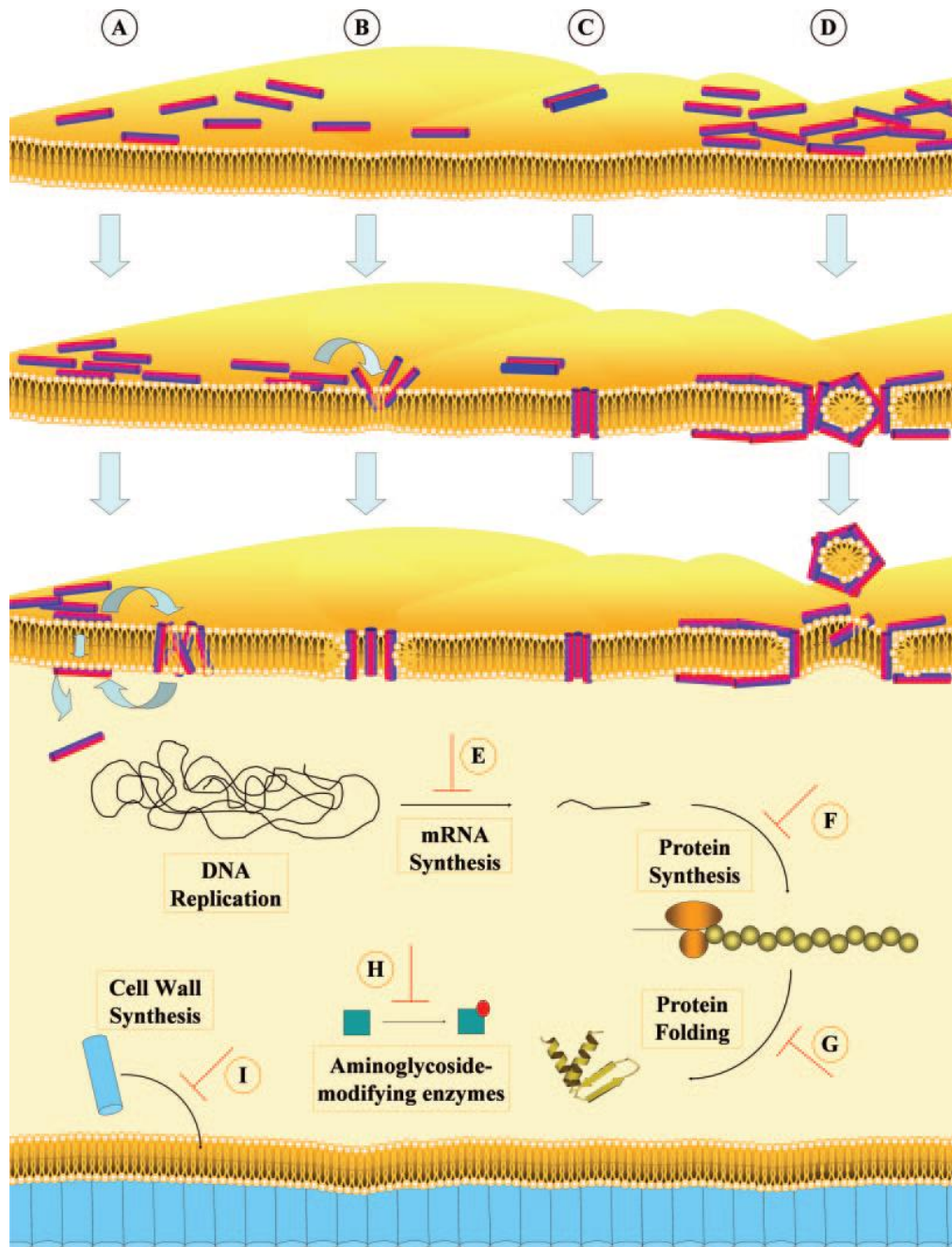


Figura 3. Mecanismos de acción de los AMPs. (A) modelo agregado micelar, (B) modelo poro toroidal, (C) modelo barril, (D) modelo carpeta, (E-I) mecanismo de acción de los péptidos no destructores de membrana [17].

En el modelo de barril, el péptido adquiere una reorientación perpendicular a la membrana, como las tablas en un barril, de manera que la zona hidrofóbica queda expuesta hacia fuera en el medio ambiente lipídico y la zona polar queda hacia dentro en el poro transmembrana formado. El modelo de agregados micelares, sugiere que la orientación azarosa del péptido y su asociación a una membrana micelar o agregado, genera un colapso de esta, dando cuenta del fenómeno de translocación. En el modelo de carpeta, el péptido no se inserta en la membrana pero se alinea paralelamente a la bicapa, permaneciendo en contacto con las cabezas lipídicas cubriendo así el área circulante, generando una desorganización de la estabilidad de la membrana, y causando la formación de grandes cráteres, pérdida de componentes citoplasmáticos, destrucción del potencial de membrana y finalmente, conduciendo a su desintegración. En el modelo de poro toroidal, el cual posee algunas similitudes con el de agregado micelar, los agregados de péptido se insertan en la membrana en una orientación perpendicular formando un poro, la membrana se curva hacia adentro formando un agujero con las cabezas lipídicas hacia el centro del poro y el péptido en línea con este agujero. Finalmente el modelo de detergente dice que a una concentración lo suficientemente elevada, el péptido induce una disolución de la membrana lipídica, causando parches y rompiéndola en pequeñas micelas [17].

Los péptidos antimicrobianos son un componente universal de prácticamente todas las formas de vida, encontrándose presentes en organismos que van desde bacterias, plantas, animales invertebrados y vertebrados; presentando actividad antibacteriana, antifúngica, antiviral e incluso antitumoral. Los péptidos de procariontes fueron uno de los primeros en ser aislados y caracterizados. Las bacteriocinas, como se denominan, contribuyen a la supervivencia de la bacteria productora de ellos, ya que poseen actividad contra otras bacterias que podrían competir por los nutrientes en el mismo medio ambiente. También se han caracterizado dos tipos principales de péptidos antimicrobianos de plantas, las denominadas tioninas y defensinas, las cuales poseen actividad tanto antibacteriana como antifúngica. En el caso de vertebrados, estos péptidos actúan como efectores de su sistema inmune, donde cumplen roles similares en la inmunidad innata, aunque con una actividad limitada bajo condiciones fisiológicas

debido a sus modestas concentraciones y a la presencia de antagonistas endógenos como cationes divalentes y moléculas del hospedero cargadas negativamente que los secuestran. Sin embargo, uno de los efectos alternativos que ejercen estos péptidos es a través de una modulación selectiva de células del sistema inmune como monocitos/macrófagos, leucocitos polimorfonucleares y células epiteliales, alterando su expresión génica e induciendo la producción de citoquinas y quimioquinas que promueven el reclutamiento de células del sistema inmune al sitio de infección conduciendo a su activación y diferenciación. El resultado de esta inmunomodulación selectiva de estos péptidos, es la inducción de respuestas inmunes innatas que conducen a una protección contra la infección, supresión selectiva de respuestas pro-inflamatorias que aseguran una protección contra la sepsis, inducción de la cicatrización de heridas y la subsecuente activación e iniciación de una respuesta inmune adaptativa [17]. Uno de los AMPs más estudiados corresponden a las magaininas aisladas de extracto de piel de *Xenopus laevis*, los cuales están constituidos por 23 residuos aminoacídicos que adoptan una estructura de α -hélice. Se ha sugerido que su mecanismo antimicrobiano involucra la permeabilización selectiva de la membrana bacteriana conduciendo a una destrucción del potencial de membrana [18]. Finalmente para el caso de los invertebrados, uno de los grupos de péptidos antimicrobianos más abundantes descritos son las defensinas, los cuales corresponden a péptidos cíclicos con tres o cuatro puentes disulfuro [17,19]. En la **Tabla 1** se muestra una lista de una serie de péptidos antimicrobianos aislados de diversos orígenes.

Tabla 1. AMPs aislados de diversas especies.

Especie	Péptido	N° residuos aa	Estructura secundaria	Espectro actividad	Ref.
Bacterias					
<i>Lactococcus lactis</i>	Nisina	34	α -hélice	AB	19
Plantas					
	Tioninas	45-54	sábana β	AB - AF	20
	Defensinas	45-54	α -hélice + sábana β antiparalela	AB - AF	20
Invertebrados					
<i>Drosophila melanogaster</i>	Drosomicina	44	α -hélice + sábana β	AF	21
	Defensina	34-43	α -hélice + sábana β antiparalela	AB	21
	Cecropina	20-40	α -hélices	AB	21
<i>Penaeus vannamei</i>	Peneidina	47-63	α -hélice	AB - AF	22
<i>Tachypleus tridentatus</i>	Factor antiLPS	102	α -hélices + sábana β	AB	2
	Taquiplesina	17	sábana β antiparalela + giro β	AB - AV	2
	Defensina gigante	79	α -hélices + sábana β antiparalela	AB - AF	2
<i>Limulus polyphemus</i>	Polifemusina	18	sábana β	AB - AF - AV	17
<i>Mytilus edulis</i>	Defensina	35-43	sábana β	AB - AF	23
	Mitilina	34	α -hélice + sábana β	AB - AV	23
	Mitimicina	33	ND	AF	23
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Miticina	40	ND	AB - AF	23
Vertebrados					
	Indolicidina	13	Conformación extendida	AB	17
	Catelicidinas		Variadas estructuras	AB - AF	17
	Defensinas	29-34	sábana β antiparalela	AB - AF - AV	17

ND: No determinado. AB: Antibacterial. AF: Antifúngico. AV: Antiviral.

El valor de los péptidos antimicrobianos en el sistema inmune innato yace en su capacidad para actuar sin alta especificidad o memoria y su pequeño tamaño, lo cual los hace fácilmente sintetizables. Muchos de ellos presentan especificidad para procariontes con baja toxicidad para eucariontes, característica que favorece su utilización como potencial antibiótico. Además de su amplio espectro de acción

antimicrobiana, baja toxicidad y dificultad para las bacterias de desarrollar resistencia a ellos, ya que hasta la fecha no se han descrito cepas resistentes a alguno de estos péptidos [1,2]. Actualmente, existen decenas de patentes asociadas a péptidos antimicrobianos catiónicos provenientes tanto de organismos superiores como invertebrados, e incluso algunos han completado la Fase III en estudios clínicos para su uso tópico y/o parenteral para una gran cantidad de infecciones principalmente de la piel y mucosas, y en algunos casos sistémicas y oftalmológicas [24,25]. Por otra parte, otra aplicación importante que podrían tener estos péptidos es en la industria alimentaria como aditivos o coadyuvantes para la conservación de alimentos y evitar así su contaminación con distintos microorganismos. En la actualidad existe un producto desarrollado en base a péptidos antimicrobianos de procariontes incluidos en plástico, utilizados así como recubrimientos para preservar carnes con buenos resultados [26]. Por esta razón, la búsqueda y caracterización de nuevos AMPs es de suma importancia, para su utilización en futuras terapias y ensayos antimicrobianos.

4.3 Búsqueda de AMPs en moluscos chilenos comestibles

En nuestro país disponemos de una gran variedad de gastrópodos, se han descrito alrededor de 854 especies distribuidas en 131 familias [27]. Dentro de estas, las especies comestibles son las de mayor importancia a nivel comercial, entre las que se encuentran el molusco comúnmente denominado Loco (*Concholepas concholepas*) y algunas especies de lapas (*Fissurella spp.*). Es por ello que surge la posibilidad que en estas especies, al igual que en las ya mencionadas, existan péptidos con actividad antimicrobiana circulando en su hemolinfa o en el interior de sus hemocitos.

En nuestro laboratorio se trabaja desde hace algunos años con la hemocianina aislada del gastrópodo *Concholepas concholepas* (CCH). Esta proteína fue purificada y caracterizada en Biosonda S.A. [28], demostrando tener, además de aplicaciones como proteína transportadora para producir anticuerpos contra péptidos y haptenos,

propiedades de adyuvante en vacunas e inmunoestimulante no específico en la terapia del cáncer superficial de vejiga en un modelo murino *in vivo* [29]. Por otra parte, estudiando la hemocianina proveniente de tres especies de lapas del género *Fissurellidae* (*F. cumingi*, *F. máxima* y *F. latimarginata*) se ha encontrado que son más inmunogénicas que la hemocianina del Loco y por lo tanto, tienen enormes proyecciones de aplicación para los usos biotecnológicos y biomédicos antes señalados [30]. De esta forma surgió fuertemente la idea de estudiar la hemolinfa y los hemocitos de estas cuatro especies de moluscos como potencial fuente de péptidos antimicrobianos, generados hipotéticamente mediante su ruptura proteolítica de la manera ya descrita.

4.4 Planteamiento del problema

Los antecedentes expuestos anteriormente en su conjunto sugieren que: **1)** Existen péptidos antimicrobianos ampliamente distribuidos tanto en organismos invertebrados como vertebrados, los cuales forman parte de sus mecanismos de inmunidad innata; **2)** En el caso de los invertebrados estos péptidos son el sistema de defensa más importante y efectivo que poseen, debido a que no presentan sistema inmune adaptativo, lo cual sugiere que deben ser lo suficientemente potentes como para atacar a un amplio espectro de cepas bacterianas, tanto Gram positivas como Gram negativas; **3)** En el caso de organismos invertebrados marinos, específicamente artrópodos y moluscos, ha aumentado el repertorio de péptidos antimicrobianos descritos y consecuentemente, sus aplicaciones, encontrándose algunos en Fase III de estudios clínicos para su uso como potenciales antibióticos, con las ventajas que esto representa frente a los antibióticos actuales, y finalmente **4)** En Chile disponemos de una enorme variedad de especies de gastrópodos con potenciales péptidos con actividad antimicrobiana.

4.5 Hipótesis de trabajo

Existen péptidos con actividad antimicrobiana en hemolinfa o hemocitos de moluscos chilenos comestibles, incluyendo *Concholepas concholepas* y especies de lapa del género *Fissurellidae*.

4.6 Objetivos

4.6.1 Objetivo general

Demostrar la presencia de al menos un péptido con actividad antimicrobiana proveniente de hemolinfa o hemocitos de moluscos chilenos comestibles, incluyendo *Concholepas concholepas*, especies de lapa del género *Fissurellidae* u otros moluscos de esta naturaleza que surja durante el desarrollo del proyecto.

4.6.2 Objetivos específicos

- a. Establecer y estandarizar las condiciones de laboratorio y metodologías de estudio para pesquisar actividad antimicrobiana en bacterias modelo Gram positivas y Gram negativas.
- b. Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de fracciones de hemolinfa provenientes de Loco y Lapas chilenas.

- c. Evaluar la actividad antimicrobiana in vitro de extractos de hemocitos provenientes de Loco y Lapas chilenas.

- d. Identificar, purificar y secuenciar al menos un péptido con actividad antimicrobiana proveniente de hemolinfa o hemocitos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

5.1.1 Biológicos

5.1.1.1 Especies de gastrópodos chilenos

Los ejemplares de Loco (*Concholepas concholepas*) y Lapas del género *Fissurellidae* (Lapa Negra, *Fissurella latimarginata*; Lapa Reina, *Fissurella maxima* y Lapa Frutilla, *Fissurella cumingi*) fueron adquiridos por Sindicato de Pescadores de Quintay y mantenidos en el Centro de Investigación Marina Quintay (CIMARQ), Facultad de Ecología y Recursos Naturales, Universidad Andrés Bello, Chile.

5.1.1.2 Cepas bacterianas

Staphylococcus aureus ATCC 29213 y *Escherichia coli* DH5 α (Biosonda S.A., Chile). *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802, *Vibrio parahaemolyticus* RIMD 2210633, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 fueron facilitadas por Viviana Cachicas, Jefa de la Sección Microbiología de Alimentos del Departamento de Salud Ambiental, Instituto de Salud Pública, Chile.

5.1.2 Reactivos

5.1.2.1 Proteínas

Albúmina de suero de bovino (BSA) en ampollas para estándar de proteína (2 mg/ml) y hemocianina de *Megathura crenulata* (*Keyhole limpet*, KLH) de Pierce, USA. Hemocianinas de *Concholepas concholepas* (Loco, CCH), *Fissurella latimarginata* (Lapa negra, FLH), *Fissurella maxima* (Lapa reina, FMH) y *Fissurella cumingi* (Lapa frutilla, FCH) de Biosonda S.A., Chile.

5.1.2.2 Antibióticos y péptidos

Penicilina-Estreptomicina de Invitrogen, Holanda. Magainina I de Anaspec, USA. Tetraciclina y Penicilina de Sigma, USA. Péptido control negativo, fue gentilmente donado por la Dra. Marta Mancilla de Bioschile S.A., Chile.

5.1.2.3 Reactivos para rompimiento de hemocitos y tratamiento de las fracciones

EDTA, hidróxido de sodio, carbonato de sodio, ácido clorhídrico, bicarbonato de sodio, cloruro de sodio y citrato de sodio de Merck, Alemania. PMSF, leupeptina, pepstatina, Tween-20, cloruro de calcio y cloruro de magnesio de Sigma, USA. Agua estéril para inyectables de Baxter, USA.

5.1.2.4 Reactivos y medios de cultivo bacteriano

Agar LB y Base Luria Broth de Invitrogen, Holanda. Agar TCBS, Triptona, Agar, Agar Soya Tripticasa, Extracto de Levadura y Caldo Soya Tripticasa de Becton, Dickinson and Company, USA. Agar Baird Parker de Merck, Alemania. Estándar de equivalencia de turbidez McFarland 0,5 de Remel, USA. Acido nalidíxico, acriflavina y cicloheximida de Sigma, USA. Acido pirúvico y fosfato disódico de Sigma Aldrich, Alemania. Fosfato monopotásico de Winkler Ltda, Chile. Cloruro de sodio de Mallinckrodt Baker S.A., México.

5.1.2.5 Reactivos para cuantificación de proteínas

Pierce 660 nm *Protein Assay*, *Coomassie Plus Protein* de Pierce, USA.

5.1.2.6 Reactivos para microscopía de luz y electrónica

Azul de Toluidina de Merck, Alemania. Glutaraldehído y tetraóxido de osmio de Sigma, USA. Cacodilato de sodio de Ted pella Inc., USA. Epon de Polisciences, USA.

5.1.2.7 Reactivos para purificación de péptidos

Acetonitrilo, agua grado HPLC y ácido trifluoroacético de Merck, Alemania.

5.1.2.8 Reactivos para electroforesis

Acrilamida y bisacrilamida de Biorad, USA. Tris de Merck, Alemania. Tricina, TEMED, PSA, glicerol, “Ultra Low Range Molecular Weight Marker” y “Sample Buffer” de Sigma, USA. Brilliant Blue G y SDS de Pierce, USA. Metanol, ácido acético y etanol de TCL, Chile.

5.1.3 Soluciones

Tampón fosfato salino pH 7,2 (PBS): NaCl 0,15 M, fosfato de sodio 0,1 M de Pierce, USA.

Mezcla de inhibidores de proteasas: EDTA 5 mM, PMSF 1 mM, leupeptina y pepstatina 10 µg/ml en PBS.

Tampón de homogenización de hemocitos: Tris-HCl 50 mM pH 8,7 NaCl 50 mM.

Medios de cultivo para *Vibrio parahaemolyticus*: Caldo y agar triptona con sales T1N1 (1% triptona, 1% NaCl) y T1N3 (1% triptona, 3% NaCl) pH 7,2±0,2.

Medio de cultivo para *Listeria monocytogenes*: Caldo BLEB de enriquecimiento tamponado (caldo soya tripticasa pH 7,3±0,2 suplementado con sales); fosfato monopotásico (1,35 g/l), fosfato disódico (9,6 g/l), acriflavina-HCl (10 mg/l), ácido nalidixico (40 mg/l), cicloheximida (50 mg/l) y ácido pirúvico (1,11%^{v/v} desde una

solución acuosa al 10%^{P/v}). Agar STEL (agar soya tripticasa con 0,6% de extracto de levaduras pH 7,3±0,2).

Fase móvil para la purificación de péptidos antimicrobianos por cromatografía en fase reversa: ácido trifluoroacético al 0,05% en agua HPLC.

Solución de elución de péptidos antimicrobianos: acetonitrilo en 0,05% de ácido trifluoroacético.

Solución de acrilamida/bisacrilamida: 48% acrilamida, 1,5% bisacrilamida.

Tampón para preparar geles: Tris 3 M SDS 0,1% pH 8,45.

Tampones de corrida para electroforesis: tampón ánodo: Tris 0,2 M pH 8,9 y tampón cátodo: Tris-Tricina 0,1 M SDS 0,1% pH 8,25.

Solución de tinción de geles: 0,5% de Brilliant Blue G en metanol al 10%.

Solución de fijación de geles: 50% de metanol y 10% de ácido acético.

Solución de desteñido de geles: 7% ácido acético.

5.1.4 Material de vidrio

5.1.4.1 Materiales para el sajado de los ejemplares de moluscos

Probetas de 250 ml, embudos, vaso de precipitados de 1 litro, lana de vidrio y botellas de 1 litro Duran-Shott fueron autoclavados en una olla a presión Presto de Industrias Steele, México a 120°C por 20 minutos.

5.1.4.2 Materiales para los ensayos antimicrobianos

Placas de Petri, tubos de vidrio de 10 ml autoclavados de manera similar a lo anterior.

5.1.5 Material plástico y otros

5.1.5.1 Material para centrifugación

Tubos de plástico de 15 ml y 50 ml, y tubos eppendorf 1,5 ml de Axygen Scientific, USA.

5.1.5.2 Material para filtración

Unidades de filtración de 0,22 μm y filtros de 0,22 μm de Millipore Corporation, USA.

5.1.5.3 Material para el almacenaje de hemocitos y fracciones con actividad

Tubos crioprotectores de Nunc, Dinamarca. Tubos 5 ml de Andes, Chile.

5.1.5.4 Materiales para los ensayos antimicrobianos

Placas de Petri de Greiner Bio-One, Alemania. Placas de ELISA de 96 pocillos de poliestireno de Pierce, USA. Tubos de plástico de 15 ml y 50 ml de Axygen Scientific, USA autoclavados en una olla a presión a 100°C por 20 minutos, balones de gas butano 190 gramos de Importadora Eco S.A., Chile. Navecillas de Sigma Aldrich, Alemania.

5.1.5.5 Materiales para la purificación de los péptidos

Mini-columnas de extracción en fase sólida C18 Sep-Pak® y Columna X-Terra C-18 de 25 cm. (5 μm) de Waters, USA.

5.1.5.6 Otros materiales

Cintas de pH rango 0-6; 6-7,7 y 7-14 de Sigma, Alemania., Puntas de micropipetas de Biologix Research Company, USA., Puntas 10 ml de Labnet International Inc., USA. AluPlast y papel aluminio de Cambiaso Hnos. S.A., Chile. Parafilm de Sigma Aldrich, Alemania. Gilletes de acero de Schick, China. Microscope slides.

5.1.6 Equipos

5.1.6.1 Equipos para la obtención de las fracciones de hemocitos

Campana de flujo laminar (Clean Room Products Inc., USA), Centrífuga refrigerada IEC Centra-7R (International equipment company, USA), Microcentrífuga 5417C (Eppendorf, Alemania), Microcentrífuga Micro Spin 12S (Sorvall Instruments Dupont, USA), Baño de sonicación Bransonic 220 50-60 Hz (Branson Ultrasonic Clean, USA), Automatic Environmental Speed-Vac® with AES 1000 (Savant, USA).

5.1.6.2 Equipos área microscopia

Microscopio Electrónico Philips TECNAI 12 Bio Twin (Philips, Holanda), Microscopio de Contraste de Fase ELWD 0.3 (Nikon, Japón), Cámara de Neubauer (Fisher Scientific, USA).

5.1.6.3 Equipos área microbiología

Gabinete Bioseguridad ESCO Class II BSC (Airstream, Australia), Mechero Bunsen, Soplete portátil Providus, Horno Microondas (Samsung Classic collection M8145), Horno microondas (LG intelowave), Shaking Incubator HZQ-X100A (China), Estufa Memmert (Alemania).

5.1.6.4 Equipos para la purificación de los péptidos

Sistema HPLC Waters compuesto por Alliance 2695 (Bomba cuaternaria y muestreador automático) con desgasificador de membranas, lavador de pistones y horno columna, Detector UV-VIS Waters 2489, Software Empower (Waters, USA), Colector de fracciones (Gilson model 203, Francia), Sistema UPLC Acquity Binary Solvent Manager (Binary Pump), Sample Manager (Autosampler), TUV Detector, Column Heater, Empower 2 Software (Waters, USA). Equipos para electroforesis: Bomba peristáltica Miniplus 2 (Gilson, Francia), Agitador ROT-D (Pi Tecnología, Chile), Fuente de poder 3000P (Thermo Electron Corporation, USA), Cámara de electroforesis vertical (Biorad, USA).

5.1.6.5 Otros equipos

Balanza granataria eléctrica (Sartorius, Alemania), pHmetro Orion 3 start (Thermo Electron Corporation, USA), Agitador magnético termorregulado Nuova II (Thermolyne, USA), Agitador magnético termorregulado Nuova (Thermolyne, USA), Agitador magnético tremorregulado Equilab (Velp Scientifica, Italia), Vortex Type 37600 Mixer (Thermolyne, USA), Balanza (Ohaus Scale Corp, USA), Lector de ELISA 7520 con filtros de absorción a 405 nm, 450 nm, 480 nm, 570 nm y 600 nm (Cambridge

Technology Inc., USA), Micropipetas 20, 100, 200, 1.000, 10.000 μ l (Gilson, Francia), Multicanales 10, 100 μ l (Costar, USA), Transiluminador compuesto por digitalizador de imágenes, monitor y cámara (Vilber Lourmat, Francia), Cámara Digital Cyber-shot 3,2 Megapixels (Sony, Japón), Estanques 30 litros con N₂ líquido a -196°C, Vitrina Refrigerada (Mimet, Chile), Refrigerador (Fensa).

5.2 Métodos

5.2.1. Proceso de obtención de extractos de hemocitos

5.2.1.1 Obtención de ejemplares de Loco y Lapas

Los ejemplares de Loco (*Concholepas concholepas*) y Lapas del género *Fissurellidae* (Lapa Negra, *Fissurella latimarginata*; Lapa Reina, *Fissurella maxima* y Lapa Frutilla, *Fissurella cumingi*) fueron colectados por personal del Sindicato de Pescadores de Quintay (V Región) y se mantuvieron en las piscinas del Centro de Investigación Marina Quintay (CIMARQ), Facultad de Ecología y Recursos Naturales, Universidad Andrés Bello, hasta su traslado en agua de mar previamente esterilizada y refrigerada a Santiago.

5.2.1.2 Obtención de hemolinfa y hemocitos

La obtención de la hemolinfa de cada especie en estudio se realizó bajo campana de flujo laminar mediante cortes en el pie y manto de los animales según el procedimiento habitual utilizado en nuestro laboratorio [28]. Para separar los

hemocitos desde la hemolinfa, esta última se centrifugó a 2.500 rpm a 4°C por 10 minutos y posteriormente se esterilizó pasándola por un filtro de 0,22 µm. El pellet de hemocitos se colectó y se guardó en estanques de N₂ líquido a -196°C. Para realizar el recuento de células en la hemolinfa; se mezcló un volumen de hemolinfa con un volumen equivalente de azul de Tripán, se agitó suavemente y se contó la cantidad de células, en duplicado para cada muestra, en una cámara de Neubauer.

5.2.1.3 Tratamientos de la hemolinfa y obtención de extractos de hemocitos

La hemolinfa estéril se dividió en dos fracciones, a una de ellas se le adicionó una mezcla de inhibidores de proteasas (IP) en PBS (EDTA 5 mM, PMSF 1 mM, leupeptina y pepstatina 10 µg/ml) y a la otra no; posteriormente ambas se guardaron a 4°C.

El pellet de hemocitos se lavó con tampón de homogenización y luego de centrifugar se sometió a diferentes tratamientos de ruptura celular dependiendo de la especie, los cuales fueron establecidos durante el desarrollo del trabajo. En el caso de los hemocitos de Loco y Lapa frutilla las células se lisaron usando ciclos de congelamiento en nitrógeno líquido y descongelamiento a temperatura ambiente del pellet en el tampón de homogenización y en presencia de la mezcla de IP. En el caso de la Lapa reina y la Lapa negra, la lisis de los hemocitos se realizó mediante un shock osmótico con una solución de cloruro de sodio 0,2% con la mezcla de IP. Además, se realizó un shock osmótico con citrato de sodio al 1%, ruptura con un detergente no iónico como es Tween-20 al 1% y sonicación en un baño a 4°C por 10 minutos (Branson Ultrasonic Clean, Branson 220 50-60 Hz) [22].

Los lisados fueron centrifugados, separándose la fracción citosólica de los hemocitos correspondiente al sobrenadante y los organelos al pellet. Este último se sometió a una extracción ácida con ácido acético 2 M y sonicación en un baño durante

10 minutos a 4°C y, posteriormente, luego de centrifugar fue concentrado mediante Speed-Vac (Automatic Environmental Speed-Vac with vapor net. AES 1000, Savant) a 14.000 rpm hasta evaporar completamente el solvente. Finalmente, el concentrado obtenido por Speed-Vac fue reconstituido en agua bidestilada para testear la actividad antimicrobiana (AM). En algunos casos, luego de la extracción ácida, el sobrenadante se neutralizó con hidróxido de sodio 10 M al pH requerido por cada fracción según lo establecido durante el trabajo; adicionalmente se utilizó bicarbonato de sodio 0,5 M y carbonato de sodio 2 M. Finalmente, los extractos ácidos neutralizados o concentrados se esterilizaron mediante filtración usando filtros de 0.22 μm [22]. La determinación de la concentración de proteínas se realizó mediante un reactivo comercial (Pierce 660, USA) o por Bradford (Pierce, USA).

5.2.2 Caracterización de los tipos celulares presentes en los hemocitos

5.2.2.1 Microscopía electrónica de transmisión

Las muestras recién colectadas de pellets de hemocitos de las diferentes especies de moluscos en estudio, fueron fijadas a temperatura ambiente en glutaraldehído al 3% en amortiguador cacodilato de sodio 0,1 M durante 16 horas y pos-fijadas en tetra óxido de osmio tamponado durante 1 hora. Posteriormente, las muestras fueron deshidratadas en soluciones crecientes de acetona e incluidas en Epon [31]. Cortes semifinos de 4 a 5 μm fueron teñidos con azul de Toluidina para observar las preparaciones en un microscopio de luz. Cortes de 400-500 \AA fueron teñidos con una solución de uranilo al 4% en metanol y posteriormente con citrato de plomo [32]. Las preparaciones fueron observadas y fotografiadas a 80 KV en un microscopio Philips TECNAI 12 en el Servicio de Microscopía Electrónica, Pontificia Universidad Católica de Chile.

5.2.3 Ensayos para determinar actividad antimicrobiana

Cada cepa bacteriana se creció según sus requerimientos, como se describe con detalle más adelante. Se realizaron dos tipos de ensayos para determinar la actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas.

5.2.3.1 Ensayo antimicrobiano en medio sólido en placa de Petri

Se creció un inóculo bacteriano durante toda la noche a 37°C. Luego este inóculo se diluyó en agar LB fundido, considerando un factor de dilución de 300. Se adicionaron 10 ml de las bacterias diluidas por placa y se esperó que solidificaran. Alternativamente para preparar algunos céspedes bacterianos se diluyó un inóculo bacteriano en PBS estéril, considerando un factor de dilución de 2, verificando la turbidez con un estándar de equivalencia de turbidez (McFarland 0,5). Luego, se depositaron 3 ml del inóculo diluido en una placa con el respectivo medio solidificado, se eliminó el exceso y se esperó que se secase para realizar el ensayo.

Finalmente se adicionaron 5 o 10 µl de la fracción para analizar la actividad AM con sus controles respectivos y se esperó que se secase lo suficiente para evitar que difundiera demasiado sobre la superficie del agar. Las placas se incubaron toda la noche a 37°C, luego se inspeccionaron visualmente por la presencia de algún halo de inhibición del crecimiento bacteriano y se fotografiaron directamente contra un fondo negro o mediante un transiluminador (Vilber Lourmat, Francia) [18]. Para los ensayos se utilizaron como control positivo diversos antibióticos que mostraban efecto inhibitor del crecimiento sobre cada una de las cepas utilizadas, esto es una mezcla de antibióticos Penicilina 20,8 µg/ml - Estreptomina 33,3 µg/ml y/o Tetraciclina 0,5 mg/ml para las cepas Gram negativas, y Tetraciclina 0,01 mg/ml y/o Penicilina 0,5 mg/ml para las cepas Gram positivas. Además, se utilizó un péptido con reconocido

efecto antimicrobiano como lo es la magainina I a una concentración de 0,4 mg/ml. También se utilizó como control negativo un péptido irrelevante de tamaño molecular similar a la magainina I. Todos los ensayos se realizaron en duplicado.

5.2.3.2 Ensayo antimicrobiano en medio líquido en placa de 96 pocillos

Se creció un inóculo bacteriano durante toda la noche a 37°C. Luego, este inóculo se diluyó en el medio líquido de crecimiento bacteriano, considerando un factor de dilución de 50 a una OD₆₀₀ 0,04. Se adicionó un volumen final de 100 µl por pocillo, considerando uno sin el agente en estudio y otro sin bacterias como blanco del lector, todo en duplicado. Se adicionaron 10 µl del agente en estudio o el control respectivo y se incubó la placa durante toda la noche a 37°C. Finalmente, se registró la absorbancia a distintas longitudes de onda en un lector de placas de ELISA 7520 (Microplate Reader Cambridge Technology Inc.), seleccionándose la que presentaba mayor razón mínimo-máximo. Como control positivo se utilizó una mezcla de antibióticos Penicilina 6,2 mg/ml - Estreptomina 10 mg/ml [22].

5.2.4 Cultivo de las cepas bacterianas para los ensayos de actividad antimicrobiana

Para iniciar los estudios se utilizaron dos cepas bacterianas disponibles en Biosonda S.A., (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* DH5α). Posteriormente, para disponer de un panel representativo de bacterias y especialmente, bacterias de interés en salud pública, se estableció una colaboración con Viviana Cachicas, Jefa de la Sección Microbiología de Alimentos del Departamento de Salud Ambiental, Instituto de Salud Pública, quién facilitó las siguientes especies: *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802, *Vibrio parahaemolyticus* RIMD 2210633, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

5.2.4.1 *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* DH5 α

Los inóculos bacterianos se prepararon en Base Luria Broth LB 20 gr/l (peptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/l y cloruro de sodio 5 g/l) incubando a 37°C por toda la noche a partir de un pre-inóculo. Para preparar los céspedes bacterianos se utilizó agar LB 32 gr/l (1% triptona, 0.5% extracto de levadura, 1.0% cloruro de sodio y 1.5% agar).

5.2.4.2 *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 y *Vibrio parahaemolyticus* RIMD 210633

Los inóculos se prepararon en caldo triptona con sales T1N1 (1% triptona, 1% cloruro de sodio a un pH 7,2 \pm 0,2) incubando a 35°C por toda la noche a partir de un tendido en agar triptona con sales T1N3 (1% triptona, 3% NaCl a un pH 7,2 \pm 0,2) incubado a 35°C y almacenado a temperatura ambiente. Los céspedes bacterianos se prepararon en Agar TCBS (Tiosulfato, Citrato, Bilis, Sacarosa; 5,6% extracto de levadura, 11,2% peptona, 11,2% citrato de sodio, 11,2% tiosulfato de sodio, 9% bilis de buey, 22,4% sacarosa, 1,1% citrato férrico, 11,2% NaCl, 16,8% agar, 0,04% azul de bromotimol y 0,04% azul de timol; a un pH final de 8,6 \pm 0,2).

5.2.4.3 *Listeria innocua* ATCC 33090 y *Listeria monocytogenes* ATCC 7644

Los inóculos se prepararon en un caldo BLEB de enriquecimiento tamponado (caldo soya tripticasa suplementado con sales, 1,35 g/l fosfato monopotásico, 9,6 gr/l fosfato disódico, 10 mg/l acriflavina-HCl, 40 mg/l ácido nalidixico, 50 mg/l cicloheximida, 1,11%^{V/V} ácido pirúvico desde una solución acuosa 10%^{P/V}) incubando a 30°C por toda la noche, a partir de un tendido en agar soya tripticasa (1,5%^{P/V} peptona (tripticasa), 0,5%^{P/V} peptona (fitona), 0,5%^{P/V} cloruro de sodio, 1,5%^{P/V} agar a un pH 7,3 \pm 0,2)

incubado a 35°C y almacenado a temperatura ambiente. Los céspedes bacterianos se prepararon en Agar STEL (Agar Soya Trypticase con 0,6% de extracto de levadura a un pH 7,3±0,2).

5.2.4.4 *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Los inóculos se prepararon en caldo soya tripticase con 10% ^P/_V NaCl y 1% ^P/_V piruvato de sodio a un pH 7,3±0,2, incubando a 35°C por toda la noche, a partir de un tendido en agar soya tripticase (1,5%^P/_V peptona (tripticase), 0,5%^P/_V peptona (fitona), 0,5%^P/_V NaCl, 1,5%^P/_V agar a un pH 7,3±0,2) incubado a 35°C y almacenado a temperatura ambiente. Para el caso de *E. coli* los céspedes bacterianos se prepararon en Agar Soya Trypticase, para el caso de *S. aureus* los céspedes bacterianos se prepararon en Agar Baird Parker (10 g/l triptona, 5 g/l extracto de carne, 1 g/l extracto de levadura, 10 g/l piruvato de sodio, 12 g/l glicina, 5 g/l cloruro de litio hexahidratado, 20 g/l agar, 1%p/v telurito de potasio, 50%v/v emulsión yema de huevo a un pH 7,0±0,2).

5.2.5 Purificación de los agentes con actividad antimicrobiana mediante cromatografía en fase reversa

5.2.5.1 Pre-purificación mediante extracción en fase sólida

Como pre-tratamiento de purificación, se utilizaron mini-columnas de extracción en fase sólida C18 Sep-Pak (Waters, USA). Brevemente, las columnas fueron hidratadas con volúmenes de acetonitrilo (ACN) al 100%, agua HPLC y fase móvil. Posteriormente los distintos extractos ácidos de hemocitos, obtenidos según se menciona en 5.2.1.3, fueron pasados a través de los Sep-Pak C18, equilibradas en

agua acidificada, y eluidos con soluciones con porcentajes crecientes de ACN (20, 40, 60, 80, 100%) en agua acidificada. Las fracciones eluidas a distintas concentraciones de solvente, se concentraron mediante Speed-Vac, en donde se les eliminó todo el solvente y se reconstituyeron en la mitad del volumen inicial en agua bidestilada para proceder a medir la actividad AM, utilizando el ensayo antes descrito [22].

5.2.5.2 Purificación mediante RP-HPLC

Extractos ácidos directos de hemocitos fueron sometidos a purificaciones mediante HPLC en Fase Reversa en una columna X-Terra C-18 de 25 cm. (5 μ m) equilibrada en agua acidificada. La elución se realizó con un gradiente lineal de 0% a 100% de ACN en agua acidificada por 30 minutos a un flujo de 1 ml/min. Las fracciones eluidas se colectaron y se concentraron mediante Speed-Vac, en donde se les eliminó todo el solvente y se reconstituyeron en la mitad del volumen inicial con agua bidestilada para proceder a medir la actividad AM, utilizando el ensayo antes descrito [22]. Los análisis se llevaron a cabo a temperatura ambiente en un Sistema UPLC Acquity Ultra Performance Waters y un Sistema HPLC Alliance 2695 Separations Module Waters. Las lecturas fueron realizadas por un detector UV-VIS Waters 2489 a 220nm.

5.2.6 Caracterización bioquímica de las fracciones con actividad antimicrobiana

5.2.6.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS en tampón Tris-Tricina

Se realizaron geles en gradiente de densidad con glicerol, en un rango de acrilamida/bisacrilamida entre 10% y 20%, con un gel concentrador al 4% de acrilamida/bisacrilamida, ambos en un tampón Tris 3 M SDS 0,1% pH 8,45. En algunos experimentos se cargó una muestra de la fracción con actividad AM

directamente y en otros, se cargaron aproximadamente 2 μg de proteína en cada carril. La corrida se realizó con dos tampones independientes, un tampón de ánodo (Tris 0,2 M pH 8,9) y un tampón de cátodo (Tris-Tricina 0,1 M SDS 0,1% pH 8,25) a 20 mA por 30 minutos y 8 mA por dos horas aproximadamente. Como estándares se utilizaron “Ultra Low Range Molecular Weight Marker” (Sigma). Luego de la corrida, el gel se tiñó por 10 minutos en una solución al 0,5% de “Brilliant Blue G” en ácido acético al 10%, se fijó por 40 minutos en una solución que contiene 50% de metanol y 10% de ácido acético y finalmente se destiñó por aproximadamente 2 horas en una solución al 7% de ácido acético [33].

5.2.7 Cálculo de la Concentración de Proteínas

Se utilizó el método de Bradford basado en la unión del colorante Azul de Coomassie G-250 a las proteínas en medio ácido [34]. En este trabajo debido a la baja concentración de proteínas de los extractos de hemocitos, se utilizó la modalidad de micropocillos. Primero, se prepararon los estándares de BSA desde 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en dilución seriada y en triplicado en una placa de micropocillos a un volumen final de 150 μL , dejando un pozo para el blanco, y posteriormente se prepararon las diluciones de las muestras a analizar en duplicado, a un volumen final de 150 μL . Se adicionaron 150 μL de reactivo de Coomassie G-250 sobre las muestras y se incubó la placa por 2 minutos a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia de cada pocillo, corrigiendo por el blanco, en un lector de placas de ELISA 7520 (Microplate Reader Cambridge Technology Inc.) a 600nm.

6. RESULTADOS

6.1 Características de los ejemplares de Lapas y Loco

Para desarrollar este estudio, se dispuso de la hemolinfa de las cuatro especies de moluscos chilenos comestibles que se muestran en la **Figura 4**. Además, se presentan los resultados de un análisis que muestra la evolución de la cantidad de hemolinfa recolectada por ejemplar en todos los muestreos tomados a lo largo del año (**Figura 5**).

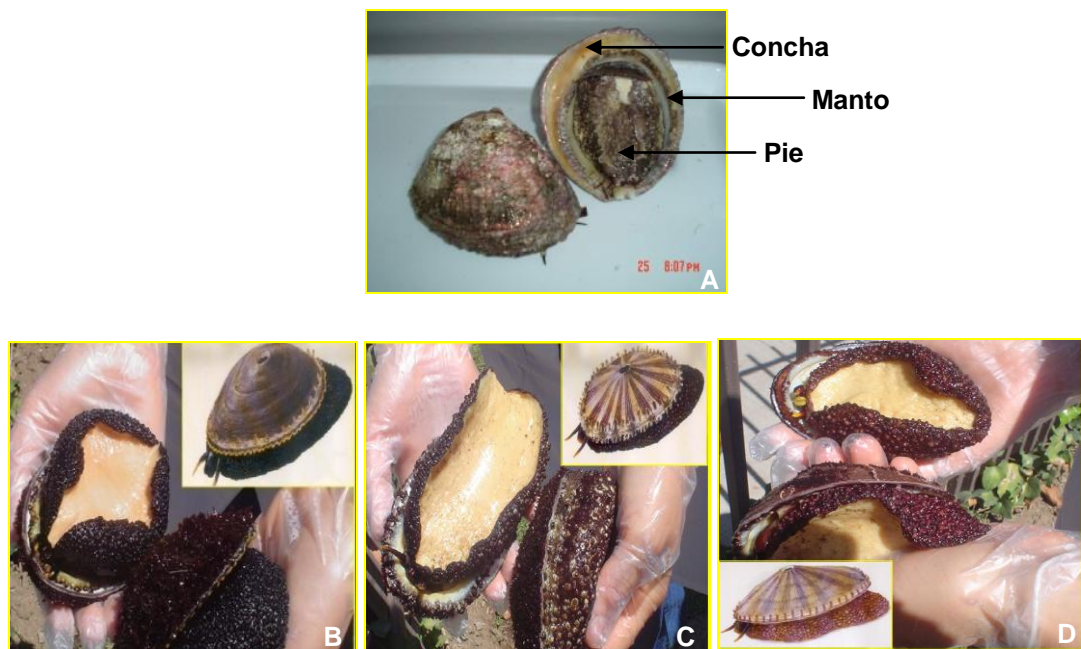


Figura 4. Aspecto físico de las cuatro especies de moluscos en estudio. A. *Concholepas concholepas* (Loco). Se señala la zona del pie y manto, desde donde se le extrae la hemolinfa. **B.** *Fissurella latimarginata* (Lapa negra). **C.** *Fissurella cumingi* (Lapa frutilla). **D.** *Fissurella maxima* (Lapa reina). **B, C y D** corresponden a fotografías tomadas de Espinoza [30]

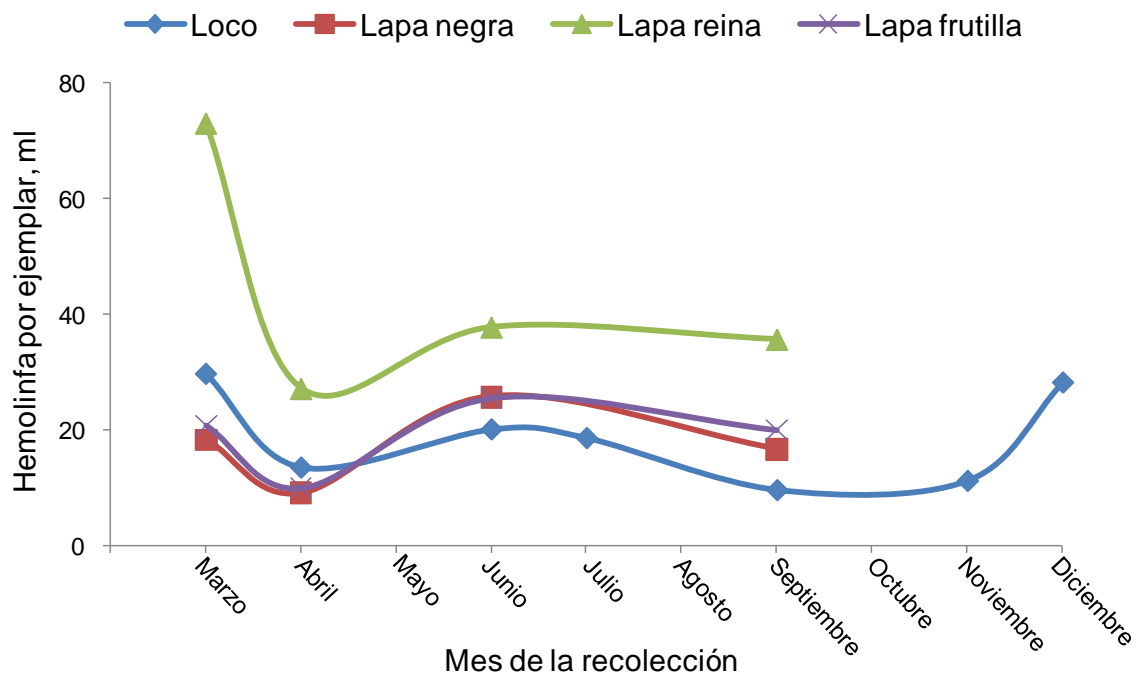


Figura 5. Cantidad de hemolinfa recolectada de cada especie en estudio a lo largo de un año. En la ordenada se graficó la hemolinfa por ejemplar, lo cual se calculó dividiendo el volumen del *pool* de hemolinfa recolectado por la cantidad de ejemplares utilizados. En el caso de las Lapas solo se realizaron cuatro recolecciones en los meses de Marzo, Abril, Junio y Septiembre. Para el caso del Loco se realizaron seis recolecciones correspondientes a los meses de Marzo, Abril, Junio, Julio, Septiembre, Noviembre y Diciembre.

Lo primero que se destaca del gráfico, es la mayor cantidad de hemolinfa obtenida por la Lapa reina en todas las recolecciones, lo cual se correlaciona con su mayor tamaño en comparación con las otras especies. Interesantemente, en todas las especies se observa el mismo patrón de comportamiento, esto es que en los meses más cálidos, de Diciembre a Marzo, se logran obtener mayores volúmenes de hemolinfa, en comparación con el resto de los meses del año.

6.2 Identificación de la fracción con actividad antimicrobiana

Para realizar los ensayos de actividad AM se probaron tanto las muestras de hemolinfa como las de hemocitos y sus respectivos controles, además de las hemocianinas purificadas de cada una de las especies de Lapas y Loco (**Tabla 2**). En la primera evaluación, todas las muestras de hemolinfa y las hemocianinas fueron negativas como así mismo, las fracciones citosólicas de los extractos de hemocitos tratados con los distintos procedimientos de ruptura celular de todas las especies en estudio, excepto las fracciones que contenían lisados de organelos de hemocitos, cuyos resultados para la Lapa frutilla se presentan en la **Figura 6**, donde se observaron halos de inhibición del crecimiento bacteriano frente a las cepas de *E. coli* *DH5α* (Gram negativa) y *S. aureus* *ATCC 29213* (Gram positiva).

Tabla 2. Muestras analizadas de las especies de moluscos en estudio.

Muestra	Tratamiento	Efecto AM
Hemocianina	Proteína purificada, CCH	-
	CCH con calcio y magnesio	-
	Proteína purificada, KLH	-
	Proteína purificada, FLH	-
	Proteína purificada, FCH	-
	Proteína purificada, FMH	-
Hemolinfa	Con IP y Sin IP	-
	Con IP, calcio y magnesio	-
	Extracción ácida con IP y sin IP	-
	<i>C. concholepas</i> sin CCH	-
Hemocitos, fracción citosólica	Congelamiento/descongelamiento con IP y sin IP	-
	Shock osmótico (Cloruro de sodio 0,2%) con IP y sin IP	-
	Detergente no-iónico (Tween-20 1%) con IP y sin IP	-
	Shock osmótico (Citrato de sodio 1%) con IP y sin IP	-
	Sonicación con IP y sin IP	-
Hemocitos, fracción organelos	Extracción ácida de organelos y neutralización	+

En el caso de la Lapa frutilla, las fracciones con mayor actividad AM, reflejado en el mayor tamaño del halo de inhibición (cuadrante 5), correspondieron a hemocitos tratados mediante extracción ácida, luego de sucesivos ciclos de congelamiento y descongelamiento en N₂ líquido en presencia de inhibidores de proteasas (IP). El control positivo en este caso, fue una mezcla de antibióticos para bacterias Gram positivas y Gram negativas (Penicilina/Estreptomomicina), cuyo halo de inhibición se muestra en el cuadrante 1, a diferencia del tampón de homogenización de los hemocitos que no tuvo efecto (cuadrante 3). Un resultado inesperado se observó con la mezcla de IP, ya que logró inhibir el crecimiento de *S. aureus* ATCC 29213, fenómeno que atribuimos a la presencia de EDTA en dicha mezcla (cuadrante 2).

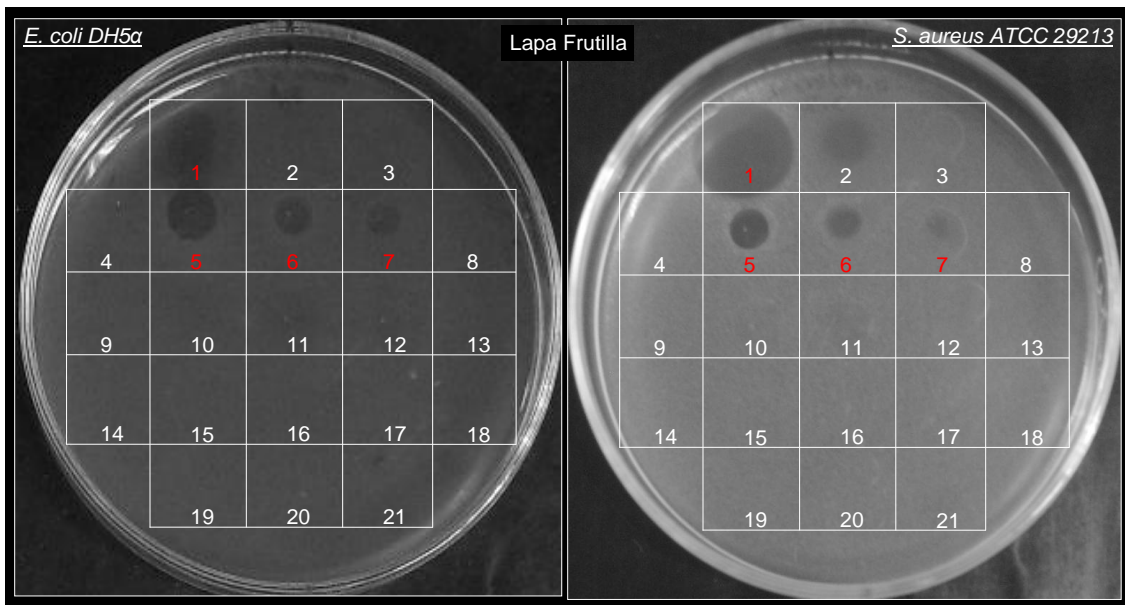


Figura 6. Actividad antimicrobiana de extractos ácidos de hemocitos de Lapa frutilla lisados con distintos tratamientos frente a *E. coli* DH5α y *S. aureus* ATCC 29213. Cada cuadrante corresponde a una muestra independiente. **1)** Mezcla Antibióticos. **2)** Mezcla de inhibidores de proteasas **3)** Tampón de homogenización. **5)** Congelamiento/descongelamiento con IP. **6)** Congelamiento/ descongelamiento sin IP, **7)** Shock osmótico con IP. **10)** Shock osmótico sin IP. **11)** Sonicación con IP y **12)** Sonicación sin IP. La figura muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes en duplicado.

6.3 Morfología de los hemocitos

Para conocer las características morfológicas de los hemocitos utilizados en este trabajo, se realizaron observaciones al microscopio de luz cuyos resultados se muestran en la **Figura 7**. Los cortes semifinos de los pellets de hemocitos teñidos con Azul de Toluidina mostraron la presencia de numerosas células con abundantes gránulos de secreción en su citoplasma, característica que fue corroborada posteriormente mediante las observaciones al microscopio electrónico.

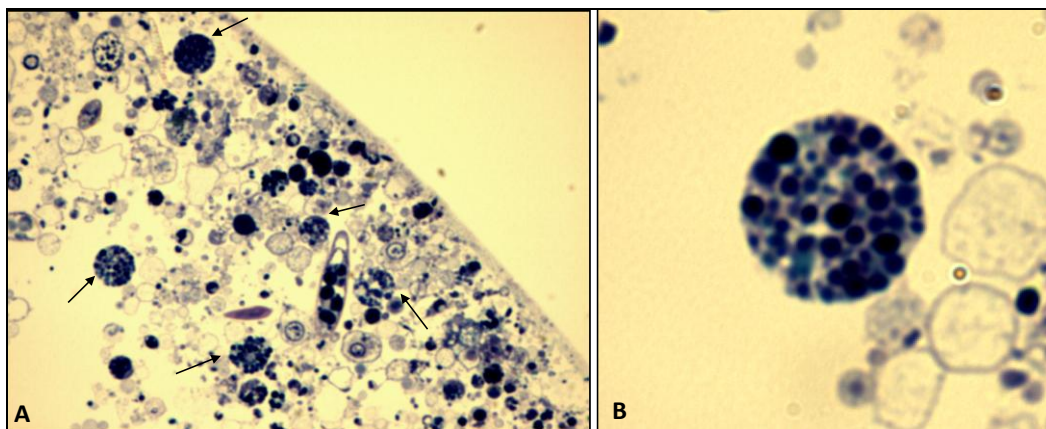


Figura 7. Morfología de hemocitos de moluscos chilenos de la clase *Gastropoda* (Loco y Lapas) observados mediante microscopía de luz. A. Fotografía a bajo aumento, que muestra diversos tipos celulares, señalados por las flechas, destacándose que la mayoría presentan gránulos en su citoplasma como se observa con mayor aumento en **B**.

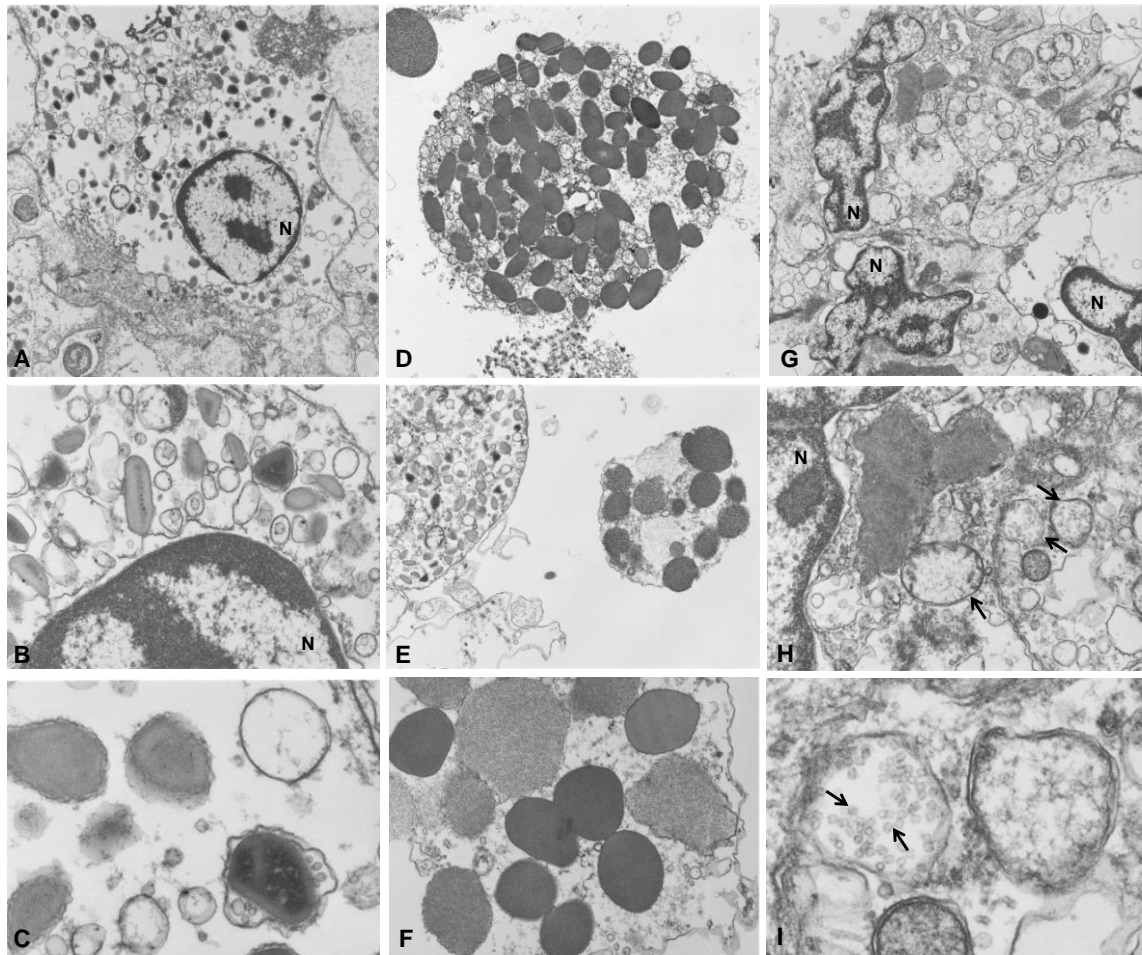


Figura 8. Morfología de hemocitos de Loco (*C. concholepas*) mediante microscopía electrónica de transmisión. Núcleo (N). Se logró visualizar al menos tres tipos celulares. **A-B-C.** Se muestran células de tipo-fagocíticas que presentan gránulos electrón-densos de distinta morfología; además se destaca su núcleo esférico. **D-E-F.** Se observa otro tipo celular cargado de gránulos electrón-densos, homogéneos y de mayor tamaño relativo que los anteriores. **G-H-I.** Se muestra un tercer tipo celular que tiene el núcleo polimórfico y escasos gránulos en su citoplasma, pero que a diferencia de los otros dos tipos celulares tiene enormes vacuolas cargadas con hemocianina (flechas).

Se lograron identificar al menos tres tipos de hemocitos con marcadas diferencias morfológicas, como se muestra en la **Figura 8**. Los más abundantes fueron hemocitos que presentaban un núcleo excéntrico y que en el citoplasma presentaban al menos dos tipos de gránulos electrón-densos rodeados de membrana, uno de los cuales mostraba material de aspecto cristalino en su interior (Figura 8A, 8B y 8C), a diferencia de otro tipo de hemocitos, de menor frecuencia en la preparación y que

mostraban una gran cantidad de gránulos electrón-densos y de mucho mayor tamaño (Figura 8D, 8E y 8F). Finalmente, también se encontró células que presentaban escasos gránulos electrón-densos y numerosas vesículas conteniendo en su interior hemocianina (Figura 8G, 8H y 8I). Por el enorme tamaño de esta proteína (en torno a 325 Å de diámetro y 392 Å de altura) y su peculiar forma de cilindro hueco, se pudo identificar inequívocamente sin necesidad de técnicas inmunocitoquímicas.

Además se efectuó un recuento de células para estimar el número de hemocitos circulantes por volumen de hemolinfa, obteniéndose en el caso del Loco, un valor estimado de 5×10^4 células/ml de hemolinfa.

6.4 Estimación del tamaño de las moléculas involucradas en la actividad antimicrobiana

Para determinar si la molécula bioactiva presente en los extractos de hemocitos de Lapa frutilla era menor a 10 kDa, cada uno de los extractos positivos se centrifugó en filtros de 10 kDa, sin secarlos, y se volvió a ensayar la actividad AM tanto de la fracción retenida por el filtro, enriquecida en moléculas de alrededor o mayor a 10 kDa, así como la fracción filtrada, compuesta exclusivamente por moléculas de alrededor o menor a 10 kDa. Los resultados se muestran en la **Figura 9**.

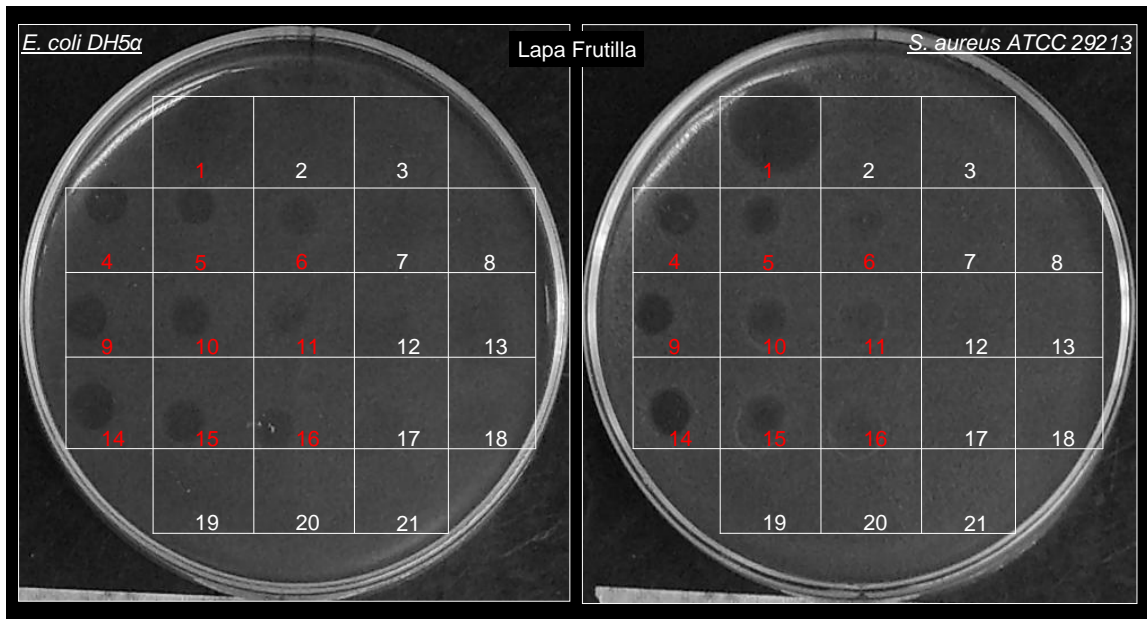


Figura 9. Actividad antimicrobiana de extractos ácidos de hemocitos de Lapa frutilla lisados con distintos tratamientos y centrifugados en filtros de 10 kDa frente a *E. coli* DH5 α y *S. aureus* ATCC 29213. 1) Mezcla antibióticos. 2) Acido acético 2 M neutralizado a pH 8. 3) Acido acético 2 M neutralizado a pH 12. 4) Congelamiento/descongelamiento con IP, 5) Congelamiento/ descongelamiento sin IP, 6) Shock osmótico con IP. 7) Shock osmótico sin IP. 8) Sonicación con IP. 9-13) Corresponden a las fracciones de igual tratamiento retenidas en el filtro. 14-18) Corresponden a las fracciones de igual tratamiento filtradas. La figura muestra un resultado representativo de un ensayo realizado en duplicado.

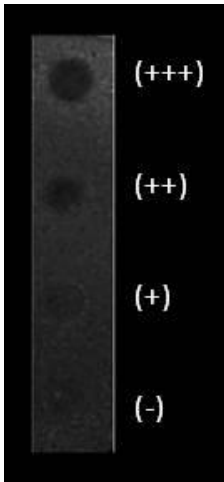
De los resultados anteriormente señalados, se concluyó que la(s) molécula(s) con actividad AM tendrían un tamaño en torno o menor a 10 kDa, porque la actividad se mantuvo en la fracción filtrada, sin descartar el hecho que existan moléculas de mayor tamaño con actividad, porque la fracción retenida también fue capaz de inhibir el crecimiento bacteriano. A continuación se realizó el mismo tratamiento con los extractos de hemocitos de las otras especies de moluscos en estudio.

Para el caso del Loco se encontraron cuatro fracciones con actividad AM y correspondieron a los siguientes tratamientos de extracción: congelamiento/descongelamiento con IP, detergente no iónico (Tween-20 al 1%) con IP y shock osmótico (citrato de sodio al 1%) con y sin IP. Todas estas fracciones mostraron un halo de inhibición de intensidad similar, por lo cual al momento de seleccionar un procedimiento para continuar con la estandarización se utilizaron otros criterios, eligiéndose finalmente el tratamiento congelamiento/descongelamiento, similar al caso de Lapa frutilla. Se descartó el uso de detergentes no iónicos (Tween-20 al 1%) por los inconvenientes que podría presentar en el proceso de purificación de la molécula bioactiva. El tratamiento de shock osmótico (citrato de sodio al 1%) también se descartó debido a la baja concentración de proteínas obtenidas en ambos casos, con y sin IP. Adicionalmente, se utilizaron otros tratamientos de ruptura celular como sonicación y shock osmótico con cloruro de sodio al 0,2%, pero no lograron ser efectivos. El ensayo con los extractos de Loco además mostró que, tanto la fracción filtrada como la retenida por el filtro de 10 kDa luego de la centrifugación, mantienen la actividad AM, lo que indicaría la presencia de al menos una molécula bioactiva de alrededor o menor a 10 kDa, sin descartarse la presencia de moléculas bioactivas de mayor tamaño. Por otra parte, solo los extractos de hemocitos de Lapa reina y de Lapa negra obtenidos mediante shock osmótico (cloruro de sodio 0,2%) con IP fueron efectivos, encontrándose también que tanto la fracción retenida como la filtrada mostraron actividad AM.

Es importante destacar que para el caso de los extractos ácidos de hemocitos de Loco, Lapa reina y Lapa negra, a diferencia de los de Lapa frutilla, la o las molécula (s) bioactiva (s) tuvieron efecto inhibitorio sólo contra *E. coli DH5α* y no contra *S. aureus ATCC 29213*, lo que da cuenta de una especificidad de la moléculas sobre bacterias Gram negativas y un espectro más reducido que el anterior, como se resume en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Actividad antimicrobiana de los extractos de hemocitos de moluscos con los distintos tratamientos de ruptura celular.

Cepa Bacteriana	Especie	Tratamiento ruptura celular			
		Cong/descong		NaCl 0,2%	
		Con IP	Sin IP	Con IP	Sin IP
<i>E. coli DH5α</i>	Loco	++	-	-	-
	Lapa reina	-	-	++	-
	Lapa negra	-	-	+	-
	Lapa frutilla	+++	++	+	-
<i>S. aureus ATCC 29213</i>	Loco	-	-	-	-
	Lapa reina	-	-	-	-
	Lapa negra	-	-	-	-
	Lapa frutilla	+++	++	+	-



En los análisis se realizó un control positivo con una mezcla de antibióticos. Cada estudio se realizó en duplicado en al menos dos experimentos independientes. A la derecha se muestra un esquema de la asignación arbitraria con cruces, entre una y tres, de la intensidad del halo de inhibición del crecimiento bacteriano.

6.5 Efecto del pH de los extractos de hemocitos sobre la actividad antimicrobiana

Para determinar el efecto del pH sobre la actividad AM encontrada en los diferentes extractos de hemocitos y, para determinar el pH óptimo de su actividad, los lisados fueron neutralizados con hidróxido de sodio 10 M (0,9 M final), bicarbonato de sodio 0,5 M (0,4 M final) y carbonato de sodio 2 M (0,7 M final). Los resultados de la actividad AM en estas condiciones se resumen en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Actividad antimicrobiana de los extractos de hemocitos de las distintas especies de moluscos neutralizados en diferentes condiciones.

Cepa Bacteriana	Especie	Condición neutralización	
		pH 7	pH 12
<i>E. coli DH5α</i>	Loco	+++	+++*
	Lapa reina	-	+++
	Lapa negra	-	-
	Lapa frutilla	-	-
	Lapa frutilla	-	-

En los análisis se realizó un control positivo con una mezcla de antibióticos. Cada estudio se realizó en duplicado en al menos dos experimentos independientes. A la derecha se muestra un esquema de la asignación arbitraria con cruces, entre una y tres, de la intensidad del halo de inhibición del crecimiento bacteriano. (*): Inestable en esas condiciones de pH.

Se encontró que en el caso del Loco los extractos ácidos de organelos neutralizados con hidróxido de sodio, ya sea a pH 7 o 12, mostraron inhibición del crecimiento de *E. coli DH5α*. En cambio, en la Lapa reina solo el extracto ácido neutralizado con hidróxido de sodio 10 M a pH 12 registró inhibición del crecimiento contra la misma cepa, además de la misma fracción a pH 11 tratada con Tris 1M. Con Lapa frutilla y Lapa negra no se obtuvieron resultados reproducibles. Además se debe mencionar que los extractos de hemocitos de Loco neutralizados con carbonato de sodio 2 M también presentaron actividad AM. Sin embargo, en estas condiciones dicha

actividad se perdió luego de almacenar la fracción a 4°C, similar al efecto observado en la fracción neutralizada con hidróxido de sodio 10 M a pH 12. De esto se puede deducir que el agente AM en esas condiciones es inestable, pudiendo degradarse, perder su estructura y en consecuencia su actividad.

El hecho que se haya encontrado actividad AM en los extractos ácidos de organelos neutralizados a distinto pH, para el caso de Loco a pH 7 y para el caso de Lapa reina pH 12, da cuenta de la diversa naturaleza y estabilidad de los agentes antimicrobianos encontrados en las distintas especies de moluscos. Por esta razón, se decidió seleccionar solo la fracción de una especie con mayor espectro de actividad para establecer las condiciones de purificación de dichos agentes. En conclusión, a partir de esta segunda extracción se consiguió establecer parcialmente las condiciones óptimas de pH para tener actividad AM en algunas de las fracciones.

Se debe destacar que como control positivo de los ensayos de actividad AM, además de la mezcla de antibióticos, se incorporó un AMP activo tanto contra cepas Gram positivas como Gram negativas. El péptido seleccionado se denomina **Magainina I**, el cual fue aislado de un extracto de piel de *Xenopus laevis* y tiene 23 aminoácidos (GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS) y un $PM_{TEÓRICO}$ de 2,4 kDa. [18]. La efectividad de Magainina I en nuestro sistema de estudio se determinó en distintas condiciones (agua bidestilada y tampones de neutralización de los lisados de hemocitos) utilizando diluciones seriadas para estimar la concentración óptima a utilizar en los ensayos posteriores. Los resultados se presentan en la **Figura 10** y muestran que su actividad óptima se encuentra cuando este péptido está diluido en agua a una concentración de 400 µg/ml. En estas condiciones presenta el halo de inhibición del crecimiento bacteriano de mayor intensidad (cuadrante 1). Con ambos tampones de neutralización los resultados fueron prácticamente negativos.

En forma adicional a este péptido, como control negativo se utilizó un péptido no relacionado de peso molecular similar al de la Magainina ($PM_{TEÓRICO}$ de 2,3 kDa) y compuesto de 20 aminoácidos (DKTKKQAVGSPRKIQKETRK) el cual no presentó actividad AM contra ninguna de las cepas testeadas.

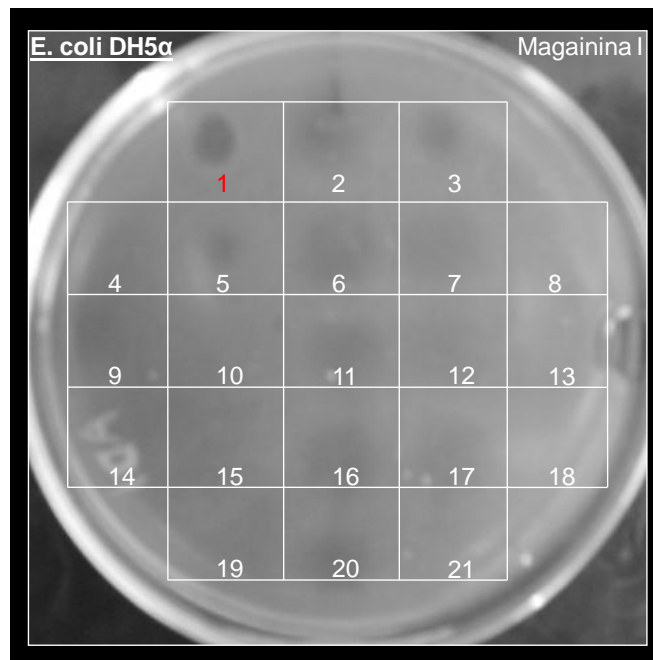


Figura 10. Actividad antimicrobiana de un péptido antimicrobiano control (Magainina I) contra *E. coli* DH5α en distintas condiciones. En la columna 1 (1-5-10-15-19) se observa la actividad del péptido a 400 µg/ml en agua, en dilución seriada hacia abajo. De manera similar, la columna 2 (2-6-11-16-20) muestra la actividad del péptido a 400µg/ml en ácido acético 2 M y neutralizado con hidróxido de sodio (0,9 M final) a pH 7. Así mismo, la columna 3 (3-7-12-17-21) muestra la actividad del péptido a 400µg/ml en ácido acético 2 M y llevado a pH 12 con hidróxido de sodio (0,9 M final).El ensayo se realizó en duplicado en dos experimentos independientes.

6.6 Determinación del espectro de actividad antimicrobiana

Se determinó la actividad AM de las fracciones de hemocitos de los diversos moluscos con un grupo de cepas bacterianas (*Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802, *Vibrio parahaemolyticus* RIMD 2210633, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538). Los resultados del ensayo de actividad AM en *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 y *Escherichia coli* ATCC 25922 presentan en la **Figura 11**.

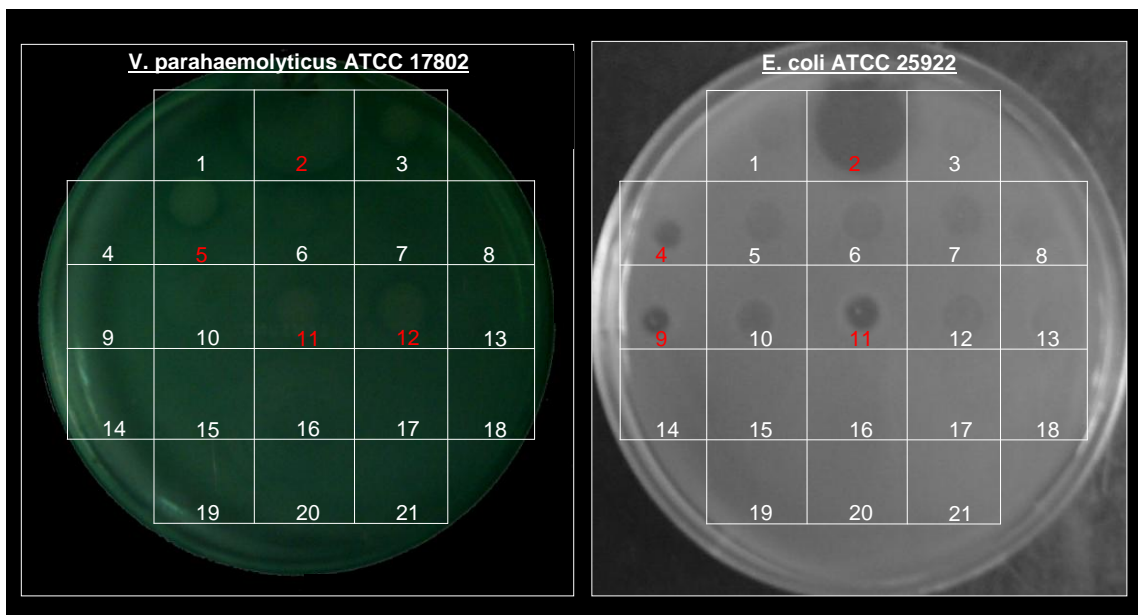


Figura 11. Actividad antimicrobiana de extractos ácidos de organelos (EAO) de hemocitos frente a *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 y *E. coli* ATCC 25922. La primera placa corresponde a: **1)** ácido acético 2 M neutralizado pH 12. **2)** Tetraciclina (0,5 mg/ml). **3)** ácido acético 2 M neutralizado pH 7. **5)** EAO de Lapa reina a pH 12. **11)** EAO Lapa negra a pH 12. **12)** EAO loco a pH 12. La segunda placa corresponde a: **1)** ácido acético 2 M neutralizado a pH 7. **2)** Tetraciclina (0,5 mg/ml) **3)** ácido acético 2 M neutralizado pH 12. **4)** EAO loco a pH 7. **5-6)** EAO Lapa reina a pH 7. **7-8)** EAO Lapa negra a pH 7. **9-11,13)** Corresponden a las mismas muestras pero neutralizadas a pH 12. **12)** EAO Lapa frutilla a pH 7.

Contra *V. parahaemolyticus* se observa que los extractos ácidos de organelos de Lapa reina (cuadrante 5), Lapa negra (cuadrante 11) y Loco (cuadrante 12) neutralizados con hidróxido de sodio a pH 12 presentan actividad AM. Debido a que el control a pH 7 registraba halo de inhibición, no se ensayó las muestras neutralizadas a ese pH. En los cuadrantes numerados entre el 15-17 y 19-21 se probaron muestras de una nueva extracción en iguales condiciones, excepto que como se dispuso de más ejemplares, los tratamientos de ruptura de los hemocitos se realizaron en un mayor volumen de tampón de extracción que el habitual. Estas fracciones, como se observa en la placa, no presentan halo de inhibición, lo cual se atribuyó al exceso de dilución del principio activo. Para solucionar este problema en los ensayos posteriores se decidió secar las muestras mediante Speed-Vac y luego reconstituirlas con agua bidestilada, como se describe posteriormente. El efecto AM de las diferentes fracciones de hemocitos de Locos y Lapas se resume en la **Tabla 5**. Para el caso de *E. coli* ATCC 25922 se observa que hay efecto inhibitorio de dos fracciones distintas, correspondientes a los extractos ácidos de hemocitos de Loco (a pH 7 y a pH 12) y Lapa reina, (a pH 12), efecto que se había observado previamente contra *E. coli* DH5 α .

Por otra parte, para el caso de *Listeria innocua* ATCC 30090, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 y *S. aureus* ATCC 6538, no se observaron halos de inhibición, destacándose el hecho que estas cepas son Gram positivas y las que son susceptibles corresponden a cepas Gram negativas, dando cuenta de la especificidad y el espectro de actividad de los agentes antimicrobianos encontrados en este trabajo.

Para normalizar las concentraciones de proteínas de los diferentes extractos, se sometieron a un proceso de secado mediante Speed-Vac. Se observó que luego de este tratamiento y de reconstituir las muestras con agua bidestilada, se recuperó la actividad AM en algunas de las fracciones que presentaban dicha actividad contra cepas Gram negativas, por lo tanto, se concluyó que este tratamiento no afecta el principio activo causante de la actividad AM.

Tabla 5. Actividad antimicrobiana de los extractos de hemocitos de las distintas especies neutralizados en diferentes condiciones frente a un panel de cepas bacterianas.

Cepa Bacteriana	Extracto ácido de organelos de hemocitos							
	Loco		Lapa reina		Lapa negra		Lapa frutilla	
	7	12	7	12	7	12	7	12
Gram negativas								
<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802	ND	+++	ND	+++	ND	+++	ND	ND
<i>V. parahaemolyticus</i> RIMD 2210633	ND	+++	ND	+++	ND	+++	ND	ND
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+++	+++	-	+++	-	-	-	ND
Gram positivas								
<i>L. innocua</i> ATCC 33090	-	-	-	-	-	-	-	ND
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	-	-	-	-	-	-	-	ND
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	-	-	-	-	-	-	-	ND

(+++)

(++)

(+)

(-)

En los análisis se realizó un control positivo con Tetraciclina o Penicilina. Cada análisis se realizó en duplicado en al menos dos experimentos independientes. A la derecha se muestra un esquema de la asignación arbitraria de la inhibición del crecimiento bacteriano. ND: no determinado.

Para el caso de *V. parahaemolyticus* se ensayó el efecto AM contra una cepa ATCC 17802 (inocua) y una RIMD 2210633 (patógena), encontrándose actividad AM contra ambas en extractos ácidos de Loco, Lapa reina y Lapa negra, demostrándose así que este tratamiento no afecta la actividad AM y en consecuencia el agente AM presente en la fracción. Por otra parte, para el caso de *E. coli* ATCC 25922 las fracciones con actividad AM correspondieron a los diferentes extractos ácidos de organelos de Loco y de Lapa reina obtenidos durante extracciones previas. Se observó el mismo resultado del caso anterior, a diferencia que una de las fracciones correspondiente a un extracto de Lapa negra que había presentado actividad AM contra *V. parahaemolyticus*, no registró halo de inhibición contra esta cepa. Una posible explicación es que la concentración efectiva para que el agente ejerza su efecto AM sobre *E. coli* ATCC 25922 debe ser mayor que contra *V. parahaemolyticus*, o simplemente, que esta última cepa es más susceptible que la anterior.

6.7 Purificación de la fracción con actividad antimicrobiana proveniente de hemocitos de Loco mediante extracción en fase sólida

Debido a que las fracciones extraídas de hemocitos de Loco mostraron actividad AM sistemáticamente, denotando la reproducibilidad del procedimiento de extracción, se seleccionó esta especie para avanzar en los objetivos de este trabajo y de esta forma establecer los procedimientos de purificación mediante cromatografía en fase reversa. Por otra parte, como una manera de simplificar la metodología de extracción de las fracciones de organelos con actividad AM, se realizaron cuatro distintos tratamientos a los hemocitos de Loco: 1) Tratamiento completo descrito previamente, 2) Ruptura celular y extracción ácida, 3) Extracción ácida directa (EAD) con mezcla de IP y 4) Extracción ácida directa (EAD) sin IP. Todos los extractos se secaron mediante Speed-Vac y se reconstituyeron en agua bidestilada para testear su actividad AM, y posteriormente, someter a purificación las que registraron halos de inhibición, resultados que se muestran a continuación.

En la **Figura 12** se muestra que solo tres tratamientos presentan actividad AM contra ambas cepas, los cuales corresponden al tratamiento completo, esto es, lavados celulares, ciclos de congelamiento-descongelamiento y extracción ácida de organelos, además de la extracción ácida directa con y sin mezcla de IP. Cabe destacar que uno de los tratamientos no presentó dicha actividad, el correspondiente a la ruptura celular y la extracción ácida, lo cual se puede atribuir a la heterogeneidad de los pellets de hemocitos con que se trabajó. Lo importante de este ensayo es que se mantuvo la actividad AM en la extracción ácida directa (EAD), lo cual simplificó enormemente la metodología de extracción en adelante y por lo mismo, la reproducibilidad de los resultados. Por esta razón, se decidió que este sería el tratamiento a utilizar para obtención de la fracción con actividad AM para someter a purificación.

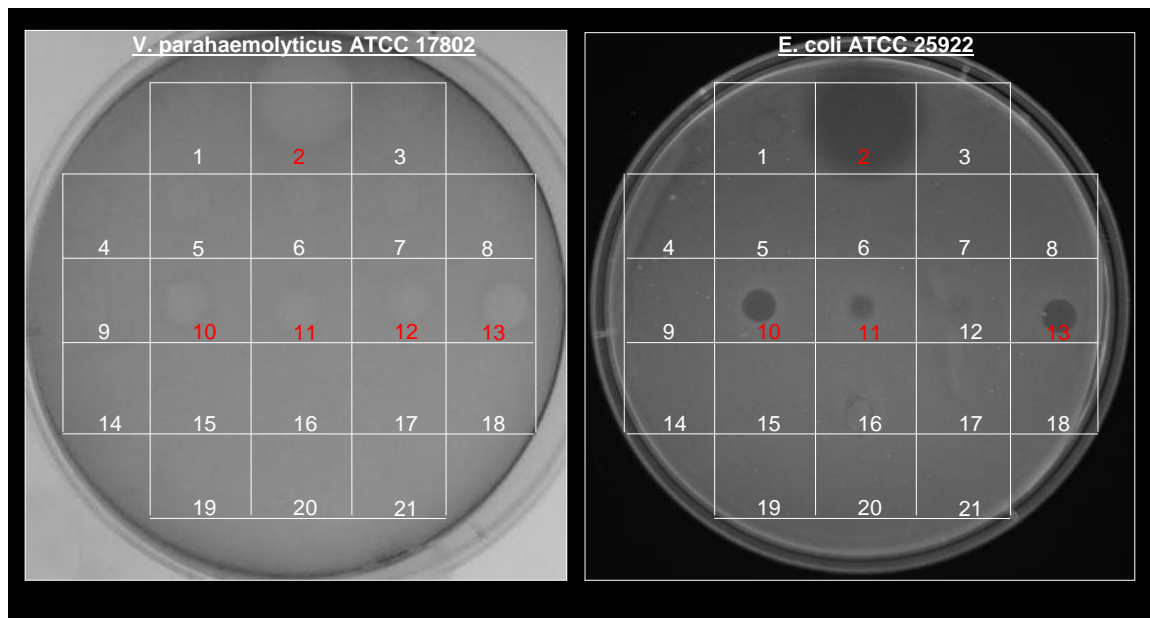


Figura 12. Actividad antimicrobiana de extractos ácidos (EA) de hemocitos de Loco frente a *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 y *E. coli* ATCC 25922. 1) PBS. 2) Tetraciclina (0,5 mg/ml). 3) Agua bidestilada. 4) Acido acético 2 M concentrado por Speed-Vac y reconstituido en PBS. 5) EAD sin IP reconstituido en PBS. 6) EAD con IP reconstituido en PBS. 7) EA desde ruptura celular directa con IP reconstituido en PBS. 8) EA desde tratamiento completo reconstituido en PBS. 9-13) Corresponden a las mismas muestras reconstituidas en agua bidestilada. Ensayo realizado en duplicado.

A continuación, se realizó el pre-tratamiento de purificación mediante extracción en fase sólida en mini-columnas Sep-Pak C-18 y se verificó la actividad AM, tanto del frente como de las fracciones eluídas, evaporando el solvente mediante Speed-Vac y reconstituyendo la fracción colectada en la mitad del volumen con agua bidestilada. El resultado se muestra en la **Figura 13**. Se observa que la fracción eluída al 40% de ACN muestra actividad AM contra *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 y *E. coli* ATCC 25922 en cambio la fracción eluída al 60% de ACN es positiva solo con *V. parahaemolyticus*.

Posteriormente, se estimó la concentración de proteínas de cada una de las fracciones, cuyo resultado se muestra en la **Tabla 6**. Se observa que las fracciones con actividad AM muestran una alta concentración de proteínas en relación a las que

no presentan actividad. Además, hay que destacar que el frente eluido con la fase móvil muestra también una alta concentración de proteínas, sin embargo no presenta actividad AM, demostrando que esta metodología fue efectiva para aislar solo las moléculas que presentaron dicha actividad, las cuales debieran ser de naturaleza fuertemente hidrofóbica debido a los altos porcentajes de ACN que requieren para su elución.

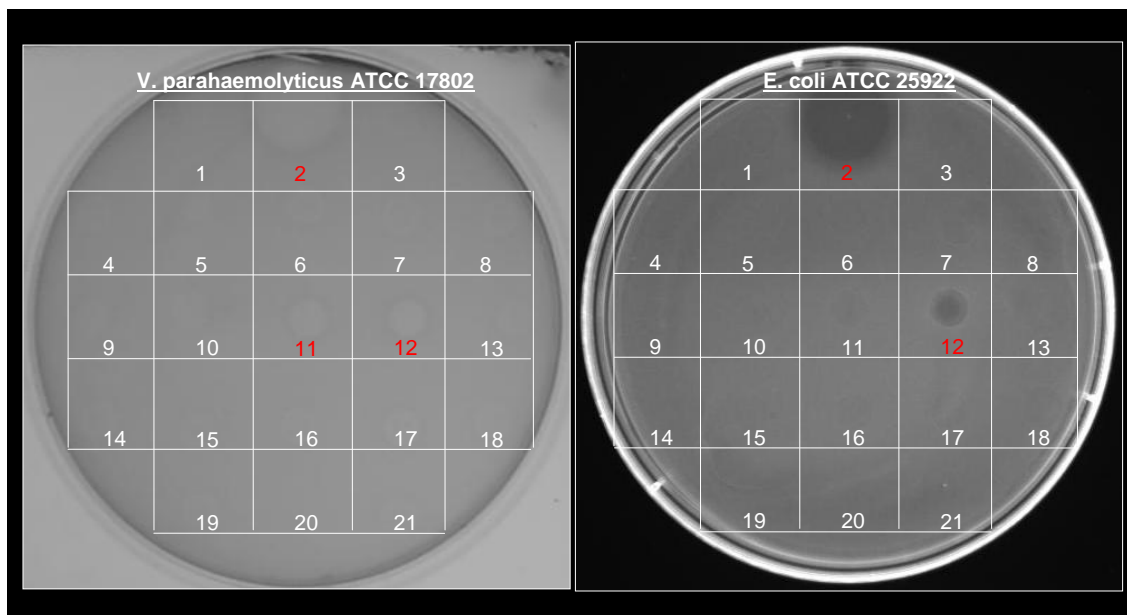


Figura 13. Actividad antimicrobiana de fracciones purificadas mediante Sep-Pak C-18 y eluidas con porcentajes crecientes de ACN frente a *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 y *E. coli* ATCC 25922. **1)** Frente secado por Speed-Vac y reconstituido en agua bidestilada. **2)** Tetraciclina (0,5 mg/ml). **4)** 100% ACN (Speed-Vac). **5)** 80% ACN en agua acidificada (Speed-Vac). **6)** 60% ACN en agua acidificada (Speed-Vac). **7)** 40% ACN en agua acidificada (Speed-Vac). **8)** 20% ACN en agua acidificada (Speed-Vac). **9-13)** Eluidos del Sep-Pak C-18 con los mismos porcentajes de ACN, secados por Speed-Vac y reconstituidos en agua bidestilada. **14-18)** Eluidos del Sep-Pak C-18 con los mismos porcentajes de ACN, secados por burbujeo con N₂ con 40°C y reconstituidos en agua bidestilada. Ensayo realizado en duplicado en tres experimentos independientes.

Experimentos similares posteriores de purificación de otros dos pellets de hemocitos de Loco, mostraron resultados similares, destacándose que en uno de ellos además se encontró actividad AM en un rango más amplio de ACN (40%, 60% y

80%). Finalmente, se generó un pool con las fracciones con actividad AM para ser utilizado en la etapa siguiente de purificación mediante RP-HPLC.

El hecho de que la (s) molécula (s) con AM eluyera (n) a un 40%, 60% e incluso un 80% de ACN da cuenta de su naturaleza fuertemente hidrofóbica y sugiere que podrían ser estructuras proteicas, debido a que dicha propiedad es otorgada por la presencia de aminoácidos hidrofóbicos. Para corroborarlo, las fracciones con actividad AM se analizaron mediante geles de poliacrilamida-SDS en tampón Tris-Tricina los cuales permiten visualizar moléculas de bajo PM, de entre 1 a 10 kDa.

Tabla 6. Concentración de proteínas de las fracciones purificadas mediante Sep-Pak C-18.

Muestra	µg/ml	Vol. [ml]	Proteína total [µg]
Extracto ácido directo sin IP	341	1,5	511,5
Eluidos por Sep-Pak C-18 *			
0% ACN	21,0	7,5	157,5
20% ACN	ND	3,0	ND
40% ACN	58,3	3,0	174,9
60% ACN	0,5	3,0	1,5
80% ACN	ND	3,0	ND
100% ACN	ND	3,0	ND
			333,9

La curva de calibración se realizó en triplicado, usando como estándar con BSA en agua acidificada. Cada muestra se midió en duplicado. ND: no detectado.* Se cargaron 341 µg de proteína

6.8 Caracterización de las fracciones de extractos de hemocitos con actividad AM por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS

Se analizaron las fracciones con actividad AM purificadas por fase reversa mediante geles de poliacrilamida-SDS en tampón Tris-Tricina, diseñados para resolver péptidos de bajo PM. En el gel que se muestra en la **Figura 14**, se observa que los carriles 1, 2 y 3, correspondientes a fracciones con actividad ya sea de extractos ácidos directos de hemocitos o fracciones purificadas mediante Sep-Pak C-18, presentan una banda entre aproximadamente 2 y 6 kDa, que podría corresponder a la molécula que posee el efecto AM de dichas fracciones. Se debe mencionar que la intensidad de las bandas no es comparable entre los carriles debido a que no se ajustó la concentración de proteínas de cada muestra.

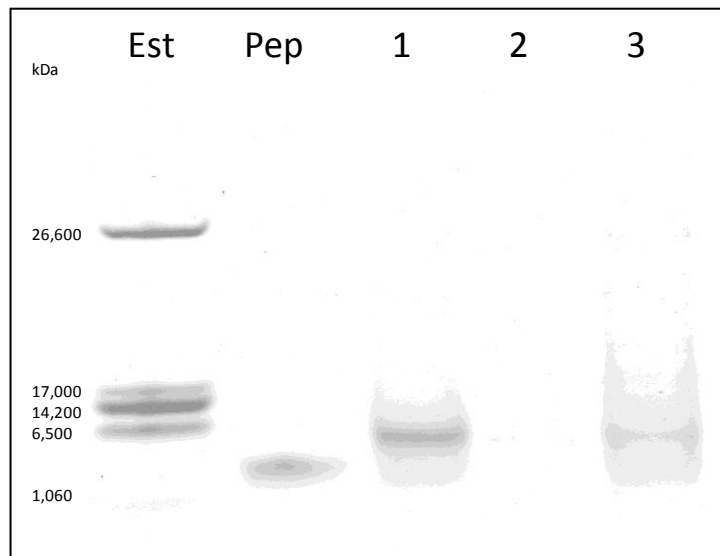


Figura 14: Gel de poliacrilamida-SDS en tampón Tris-Tricina de las fracciones de extractos de hemocitos purificadas por HPLC y con actividad antimicrobiana. Se observa un gel en gradiente de acrilamida (10-20%) y glicerol. **Est:** estándares de peso molecular (PM). **Pep:** péptido control negativo de 2,3 kDa. **1)** EAD de hemocitos de Loco con actividad AM. **2)** Pool de las distintas fracciones purificadas por Sep-Pak C-18 con actividad AM. **3)** Fracción purificada por Sep-Pak C-18 y eluída a 40% de ACN con actividad AM.

Por otra parte, como una manera de mejorar la visualización y resolución de las bandas de bajo peso molecular, se probaron métodos alternativos de tinción de los geles mediante fijación con 5% de glutaraldehído, tinción con plata y tinción con ácido fosfórico [35-36] pero no se obtuvo mejores resultados que el observado por tinción convencional con Azul de Coomassie.

Para estimar el peso molecular (PM) de las proteínas visualizadas en cada una de las fracciones con actividad AM, se calculó el coeficiente de migración electroforética (Rf) de cada una de las bandas y se realizó la curva de calibración de PMs, para extrapolar el PM de la banda de interés obteniéndose un valor estimado de 3,7 kDa (Figura 15).

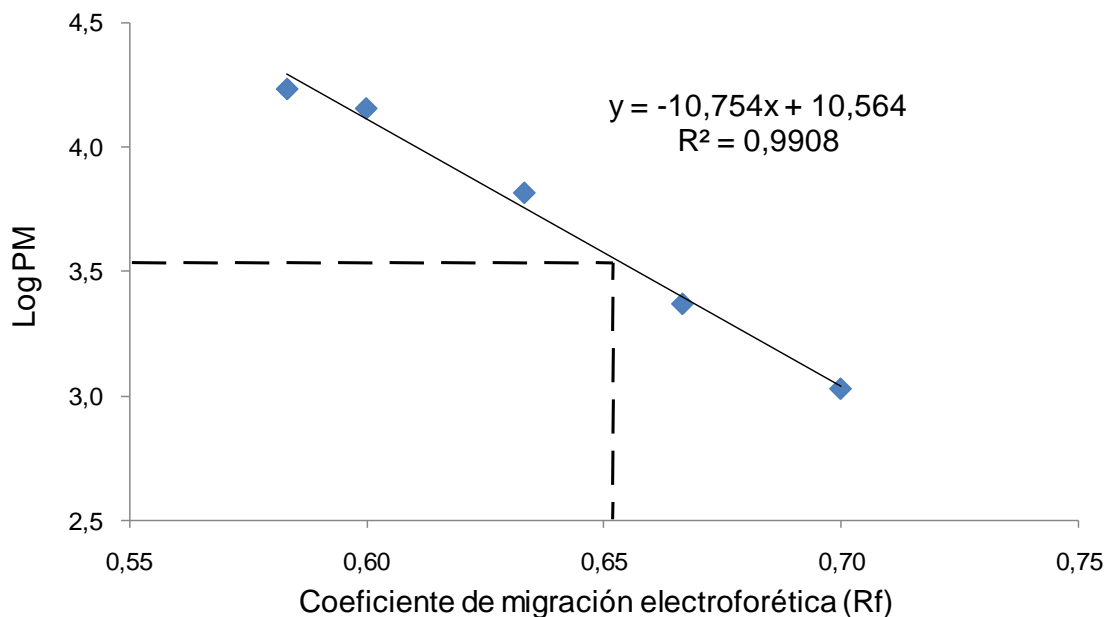


Figura 15. Curva de calibración de la migración electroforética v/s log (PM) para estimar el PM de la banda visualizada en las fracciones con actividad antimicrobiana. El PM estimado fue de 3,7 kDa.

Luego de este resultado, se puede deducir que dicha banda correspondería a la molécula bioactiva con actividad AM de las fracciones respectivas. Para comprobarlo, estas fracciones se purificaron mediante RP-HPLC y los eluidos con actividad AM se re-analizaron mediante electroforesis en donde se esperaba visualizar la misma banda responsable de la actividad AM.

6.9 Purificación de la fracción con actividad antimicrobiana mediante HPLC

Finalmente, se llevo a cabo la purificación del/los péptidos antimicrobianos mediante HPLC, utilizando el mismo principio descrito para los Sep-Pak C-18, mediante cromatografía de fase reversa (RP-HPLC), etapa que contó con la colaboración del Dr. Juan Navarro del Instituto de Instrumentación Analítica y Desarrollo Tecnológico (IADET) Ltda. Se realizó el procedimiento completo a partir de un nuevo pellet de hemocitos de Loco, se efectuó la extracción ácida, se secó la fracción mediante Speed-Vac y luego se reconstituyó en agua bidestilada para testear su actividad AM esta vez en diluciones seriadas en medio líquido; los resultados se presentan en la **Figura 16**.

En este ensayo, para el caso del control positivo de la mezcla de antibióticos, se observa claramente un efecto dosis-respuesta de la inhibición del crecimiento bacteriano, comportamiento que no se observa con el extracto ácido de hemocitos, que logró inhibir el crecimiento solo en la primera dilución, resultado que atribuimos al exceso de dilución del principio activo. Como se esperaba, el control negativo no presentó inhibición del crecimiento bacteriano.

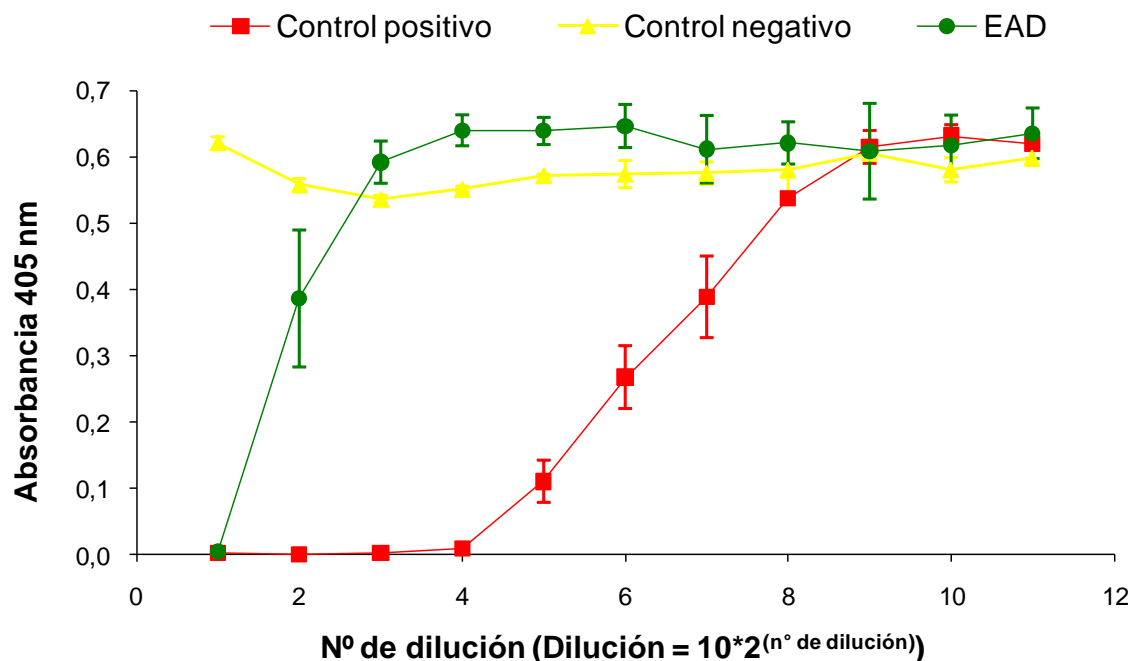


Figura 16. Efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano de un extracto ácido de hemocitos de Loco frente a *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 determinado en un ensayo en medio líquido. En el gráfico se muestra la absorbancia a 405 nm v/s la dilución, que corresponde a las veces que se diluyó el agente (dilución = $10 \times 2^{(n^\circ \text{ de dilución})}$). Como control positivo se utilizó una mezcla de antibióticos Penicilina– Estreptomina. Como control negativo se utilizó ácido acético 2 M sometido al mismo tratamiento de concentración mediante Speed-Vac que el EA. Cada dilución se realizó en duplicado, a partir de una dilución de 10 para el EA.

Luego de corroborar que el extracto ácido presentaba actividad antimicrobiana, se sometió a purificación mediante RP-HPLC. En un comienzo se realizaron estudios analíticos del extracto ácido, inyectándose solo 20 µl de muestra en la columna X-Terra C-18 y con un seguimiento cromatográfico a 220 nm (**Figura 17**) y 280 nm (**Figura 18**). Este último para estudiar la presencia de aminoácidos aromáticos en la estructura del péptido, ya que si bien la lectura a 220 nm da cuenta de la presencia del enlace peptídico, cualquier molécula orgánica es capaz de absorber a esa longitud de onda, por lo que el cromatograma aparecerá con mucho más ruido y más señales, a diferencia del cromatograma a 280 nm, en donde se espera un resultado con menos interferencias.

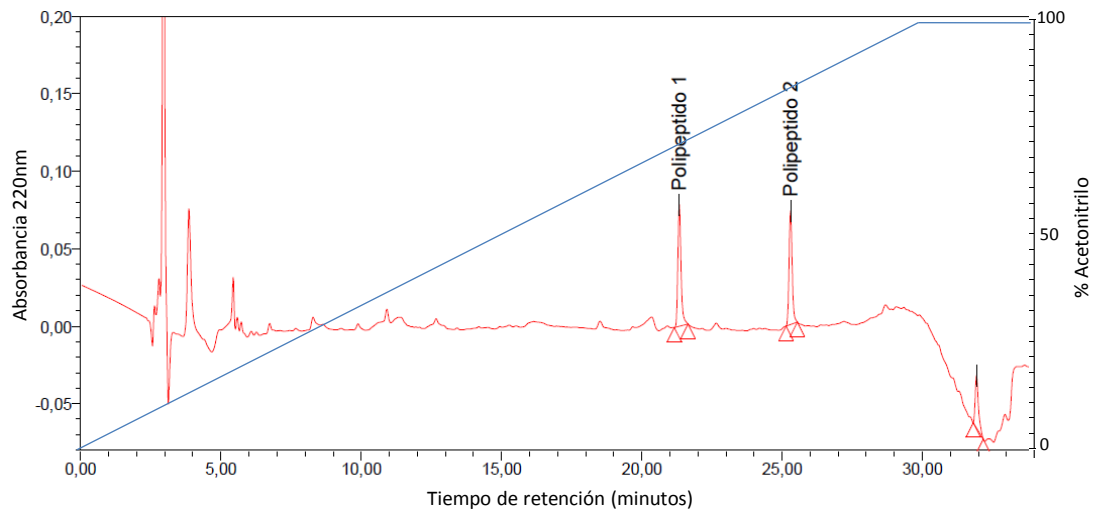


Figura 17. Cromatograma de un extracto ácido directo de hemocitos de Loco leído a 220 nm en un sistema UPLC. En rojo se muestra la absorbancia a 220 nm y en azul el gradiente de ACN que va de 0% a 100% en una corrida de 30 minutos de duración con un flujo de 1 ml/min.

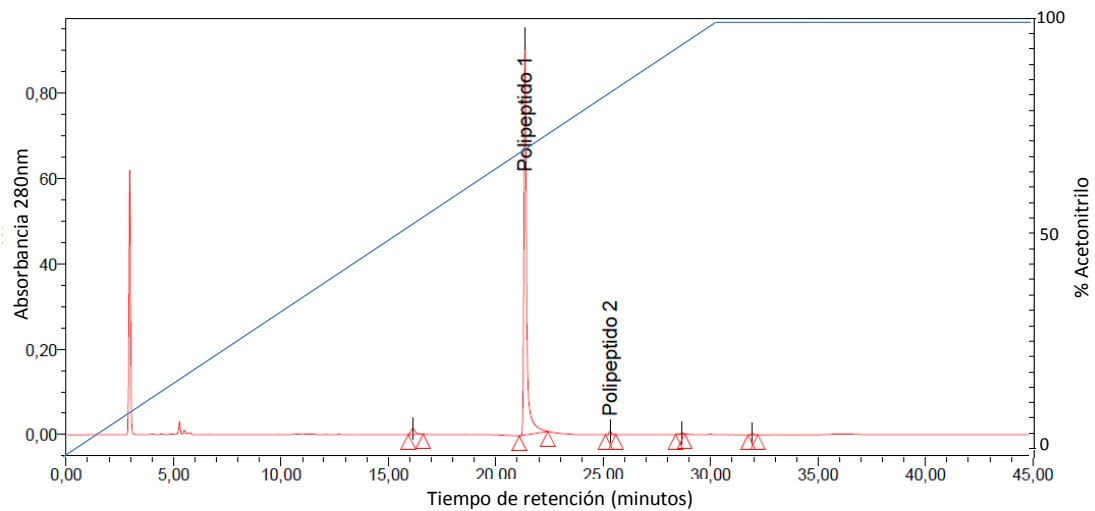


Figura 18. Cromatograma de un extracto ácido directo de hemocitos de Loco leído a 280 nm en un sistema UPLC. En rojo se muestra la absorbancia a 280 nm y en azul el gradiente de ACN que va de 0% a 100% en 30 minutos con un flujo de 1 ml/min.

Según lo visualizado en ambos cromatogramas, se observa la presencia de algunos picos bien definidos entre 20 y 26 minutos que eluyen a altos porcentajes de ACN y que podrían corresponder a la (s) molécula (s) con actividad antimicrobiana, resultados

que muestran que estas moléculas son muy hidrofóbicas y que sugieren fuertemente que tienen naturaleza peptídica. Particularmente, en el cromatograma leído a 220 nm, se observan dos picos principales alrededor de 21 y 25 minutos, que tienen similar intensidad y área. Además, se observa una tercera señal alrededor de 32 minutos, lo cual también puede corresponder a la molécula con actividad, sin embargo, esta señal es de menor intensidad y área que las anteriores, además aparece después del 100% de ACN, por lo que correspondería a una molécula que interacciona fuertemente con la fase estacionaria siendo más hidrofóbica que las anteriores. Por otra parte, en el cromatograma leído a 280 nm aparecen alrededor de cinco señales que corresponden a moléculas que tienen anillos aromáticos en su estructura. Lo interesante es que aparecen representados los tres picos visualizados a 220 nm, ya que los tiempos de retención son coincidentes en ambos cromatogramas, destacando el hecho que la primera señal eluída alrededor de los 21 minutos presenta una intensidad y área considerablemente mayores al resto, dando cuenta que presenta una gran proporción de estructuras aromáticas, que podría corresponder a un polipéptido. Estos resultados se pueden apreciar mejor en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Polipéptidos principales de un extracto ácido de hemocitos de *C. concholepas* analizados en forma analítica mediante un sistema UPLC.

Lectura	Nombre	TR	Área	% ACN
220 nm.	Polipéptido 1	21,3	613427	71,1
	Polipéptido 2	25,3	569081	84,3
	Polipéptido 3	31,9	273906	100,0
280 nm.	Polipéptido 4	16,1	196384	53,8
	Polipéptido 1	21,4	8194671	71,2
	Polipéptido 2	25,3	64405	84,4
	Polipéptido 5	28,7	23999	95,6
	Polipéptido 3	31,9	32801	100,0

Se destacan los picos correspondientes en el cromatograma en la lectura a 220 y 280 nm. TR: Tiempo de retención.

A continuación, se procedió a realizar un análisis preparativo en un sistema HPLC Alliance 2695 (Waters), que permite la inyección de volúmenes mayores en la columna. En este caso se inyectaron 100 µl del extracto ácido, se recolectaron las fracciones y el cromatograma se analizó a 220 nm (**Figura 19**). En esta oportunidad, como se inyectó cinco veces más muestra se esperaba obtener las mismas señales observadas previamente más intensificadas y además, la aparición de nuevas señales de menor intensidad. El análisis se realizó en las mismas condiciones que el caso anterior, sin modificar el gradiente ni la columna.

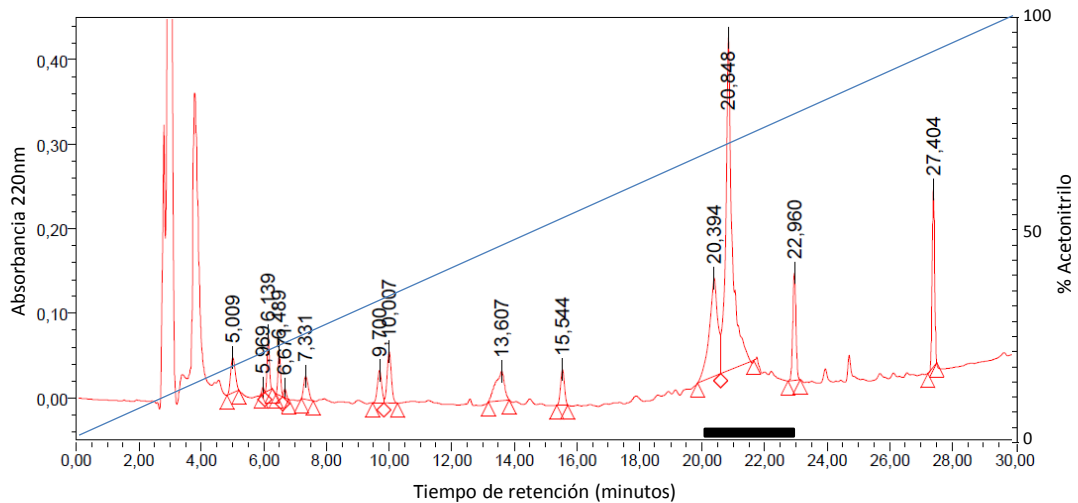


Figura 19. Cromatograma de un extracto ácido directo de hemocitos de *C. concholepas* leído a 220 nm en un sistema HPLC Alliance 2695. En rojo se muestra la absorbancia, en azul el gradiente de ACN que va de 0% a 100% en 30 minutos y en negro la zona que presenta actividad AM.

De acuerdo a lo que se esperaba, se logran observar mucho más señales que en ambos cromatogramas observados previamente. Sin embargo, el patrón de señales no reproduce los resultados anteriores, puesto que no se lograron detectar directamente las señales observadas anteriormente, ya que no hay coincidencia en los tiempos de retención. Una explicación posible, es que el tiempo para equilibrar la columna fue mucho menor, generando un desplazamiento de las señales visualizadas antes a 21 y

25 minutos, y ahora a 23 minutos y 27 minutos (**Tabla 8**). Además, se puede observar la aparición de dos picos solapados alrededor de los 20 minutos que corresponden a señales que no habían sido visualizadas en los cromatogramas obtenidos por UPLC. Lo más interesante que tras recolectar las fracciones, secarlas mediante Speed-Vac y analizar su actividad antimicrobiana se encontró que tres fracciones, correspondiente a las eluidas a 21, 22 y 23 minutos, son las que presentaron dicha actividad, las cuales corresponden a tres picos observados a 20,4 minutos, 20,8 minutos y 23 minutos (**Figura 20**).

Tabla 8. Polipéptidos principales de un extracto ácido de hemocitos de *C. concholepas* analizados mediante un Sistema HPLC Alliance 2695.

Nombre	RT	Área	% ACN
Señal 1	5,0	420479	16,7
Señal 2	6,0	31410	19,9
Señal 3	6,1	332054	20,5
Señal 4	6,5	279028	21,6
Señal 5	6,7	62052	22,2
Señal 6	7,3	275423	24,4
Señal 7	9,7	354285	32,3
Señal 8	10,0	574225	33,4
Señal 9	13,6	692848	45,4
Señal 10	15,5	360807	51,8
Señal 11	20,4	2180222	68,0
Señal 12	20,8	5657548	69,5
Señal 13	23,0	887960	76,5
Señal 14	27,4	1132778	91,3

Se destacan los picos correspondientes en el cromatograma en la lectura a 220. TR: Tiempo de retención.

Con esto se comprobó, primero, que en estas fracciones existe más de una molécula que presenta actividad antimicrobiana, ya que tres de los picos observados en el cromatograma presentan actividad; segundo, que la señal observada previamente a 21 minutos y que presentaba una intensa absorbancia a 280 nm tiene

actividad antimicrobiana, por lo cual dicha molécula eluída en esas condiciones presenta agrupaciones aromáticas en su estructura. Finalmente, resta por establecer si las señales aparecidas alrededor de los 20 minutos en el último cromatograma, que no se habían visualizado previamente, corresponden a péptidos antimicrobianos, y si se originaron luego de la extracción ácida de los hemocitos, tras el almacenamiento a 4°C de dicha fracción.

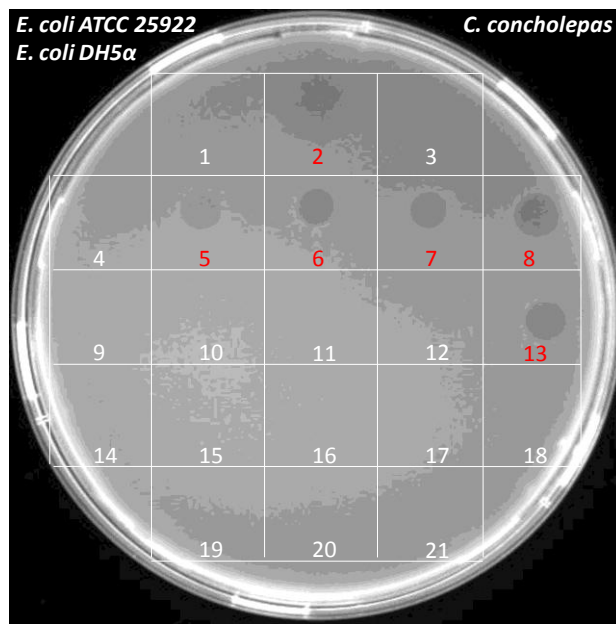


Figura 20. Actividad AM frente a *E. coli* DH5 α y *E. coli* ATCC 25922 de fracciones purificadas mediante HPLC eluídas con un gradiente lineal de ACN. 1) Agua bidestilada. 2) Mezcla antibióticos. 4) ácido acético 2 M sometido al mismo tratamiento que el EA de hemocitos. 5) Fracción 23 eluída por HPLC secada por Speed-Vac y reconstituida en agua bidestilada. 6) Fracción 22. 7) Fracción 21. 8) EA de hemocitos de Loco secado por Speed-Vac y reconstituido en agua bidestilada. 10) Fracción 26. 11) Fracción 25. 12) Fracción 24. 13) EA. 15) Fracción 29. 16) Fracción 28. 17) Fracción 27.

Luego las fracciones fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS en tampón Tris-Tricina, comparándose las bandas obtenidas en la purificación mediante Sep-Pak C-18 con las fracciones obtenidas mediante HPLC (**Figura 21**). Se observa que en el caso de las fracciones obtenidas mediante purificación por Sep-Pak C-18 que presentan actividad AM, en todas coincide la misma

banda visualizada previamente, alrededor de 3,7 kDa, que podría corresponder a la molécula con actividad (indicada con una flecha). Además en esas fracciones se observa una segunda banda de mayor peso molecular pero que coincide en las fracciones que no presentaron actividad AM, descartándose dicha banda como causante del efecto antimicrobiano. Por otra parte, en las fracciones obtenidas mediante HPLC se observa que en dos de ellas, la fracción 22 y 23, se encuentra la banda de 3,7 kDa, apoyando el hecho que podría corresponder a la molécula o péptido con actividad AM (indicada con una flecha). Llama la atención que en una de dichas fracciones no se logre visualizar esa banda, lo que se explica por la dilución de la preparación, no obstante esta muestra presentó inhibición del crecimiento bacteriano.

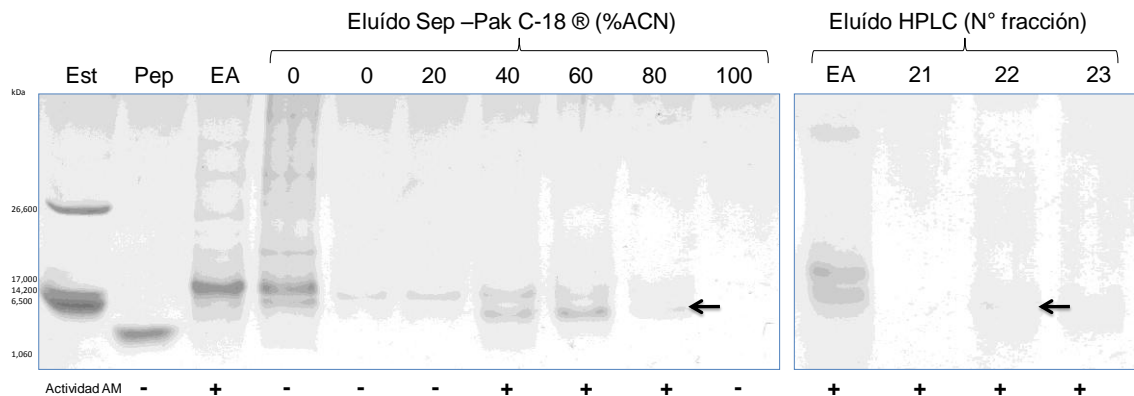


Figura 21: Gel de poliacrilamida SDS en tampón Tris-Tricina para la separación de proteínas en un rango entre 1 a 100 kDa. Se observa un gel en gradiente de acrilamida del 10-20% y de glicerol de fracciones obtenidas tras la purificación de un extracto ácido mediante Sep-Pak C-18® y HPLC. EA corresponde a un extracto ácido de hemocitos de Loco (*C. concholepas*) con actividad AM. En el primer gel (izquierda) se observan las fracciones eluídas a 0%, 20%, 40%, 60%, 80% y 100% de ACN tras una purificación mediante Sep-Pak C-18®. En el segundo gel (derecha) se observan las fracciones 21, 22 y 23 eluídas por HPLC y que presentan actividad AM. (+) con efecto AM. (-) sin efecto AM.

7. DISCUSION

Los péptidos antimicrobianos son moléculas anfífilas de menos de 10 kDa de masa que forman parte de la inmunidad innata de organismos vertebrados como invertebrados, pero es en estos últimos en donde cobran mayor importancia. Se han descrito cientos de AMPs de diversa naturaleza, los que presentan actividad antibacteriana, antifúngica, antiviral e incluso antitumoral. Su importancia se basa principalmente en su mecanismo de acción inespecífico, lo cual dificulta a las bacterias desarrollar resistencia a ellos, a diferencia de los antibióticos convencionales. Además, debido a su pequeño tamaño son fácilmente sintetizables [1,17]. El interés por caracterizar nuevos tipos de AMPs se basa primero que todo, en entender un poco más de la biología e inmunología de este tipo de organismos y los mecanismos que posee para contener cualquier tipo de infección. Pero sin duda la mayor motivación para su estudio es desde un punto de vista biotecnológico, debido a las potenciales aplicaciones que puedan tener, ya sea en la industria alimentaria para evitar la proliferación de microorganismos que contaminan alimentos y en biomedicina para contrarrestar infecciones tóxicas u oculares, las cuales serán discutidas más adelante. Debido al auge en la caracterización de AMPs de diversos organismos invertebrados, además de variantes sintéticas, y la enorme variedad de moluscos que se encuentran en nuestras costas, surgió la idea de estudiar la presencia de estos agentes en alguna especie de molusco chileno. En nuestro laboratorio desde hace algunos años se trabaja con la hemocianina de gastrópodos [28], proteína encargada del transporte de oxígeno en estos organismos y aislada del Loco (*Concholepas concholepas*) y tres especies de Lapas del género *Fissurellidae*, por lo cual se estudió la presencia de AMPs en dichas especies de invertebrados.

En este trabajo se estableció una metodología reproducible para el aislamiento y purificación parcial de agentes AM desde hemocitos de gastrópodos. Primero, se determinó la presencia de estos agentes en fracciones subcelulares de hemocitos, luego, se ensayó diferentes tratamientos de ruptura celular, seguido de extracción

ácida y neutralización. Sin embargo, en fracciones citosólicas provenientes de estos tratamientos de ruptura no se encontró actividad. De lo cual podemos deducir que, estos agentes están presentes en los gránulos electrón-densos encontrados en su citoplasma los cuales fueron evidenciados mediante microscopia electrónica.

Debido a lo extenso del proceso de extracción de los agentes, los problemas con el pH de las muestras y a la reproducibilidad de los resultados, se buscó una manera de simplificar esta metodología, logrando extraer los agentes luego de un tratamiento ácido directo del pellet de hemocitos, posterior secado mediante Speed-Vac y reconstitución en agua bidestilada, metodología que demostró ser altamente reproducible en el caso de los hemocitos de Loco, de manera similar a lo descrito en literatura para una especie de artrópodo (*Penaeus vannamei*) [22]. Por esta razón, se seleccionó el Loco para los estudios posteriores de purificación y caracterización de estos AMPs. En el caso de *P. vannamei*, la metodología de aislamiento es similar, ya que se prepararon tres diferentes extractos ácidos. Adicionalmente a la fracción de hemolinfa libre de células se sumaron dos más, una fracción citosólica de hemocitos y una fracción rica en organelos de los mismos, y a diferencia de nuestros resultados, en este caso dos registraron actividad AM, siendo la fracción citosólica la única negativa. Luego a partir de esto se seleccionó una fracción, la cual se sometió a las etapas de purificación mediante HPLC aislándose tres péptidos con actividad antibacteriana, bacteriostática y antifúngica denominados panaeidinas [22].

Por otra parte, en este trabajo se consiguió por primera vez demostrar la presencia de moléculas de alrededor o menor a 10 kDa con actividad AM en hemocitos de moluscos chilenos de la clase *Gastropoda*. Más específicamente en *Concholepas concholepas* se logró purificar estas moléculas, mediante cromatografía en fase reversa, dando cuenta de acuerdo a sus perfiles de elución, de su naturaleza fuertemente hidrofóbica. Además, estas fracciones se caracterizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, en donde se visualizaron bandas de bajo tamaño molecular, una alrededor de 3,7 kDa, que podría corresponder a un péptido

antimicrobiano. Para demostrarlo, se tiene contemplado secuenciar dicha banda, ya sea mediante elución directa del gel o mediante transferencia a una membrana de PVDF y además, utilizar espectrometría de masas para obtener su peso molecular. Con estos antecedentes, se espera sintetizar el péptido y así finalmente testear su actividad antimicrobiana en condiciones puras, metodología que se ha aplicado ampliamente en la búsqueda de AMPs en diversas especies de vertebrados [18] e invertebrados [22].

Como metodología previa de purificación, se utilizaron mini-columnas de extracción en fase sólida, Sep-Pak C-18, las cuales demostraron ser bastante efectivas para aislar y concentrar dichas moléculas, como se pudo visualizar en el análisis electroforético. En el extracto ácido previo a la purificación, además, se observa un amplio bandeo sobre la banda de interés que puede dar cuenta de posible degradación, o incluso presencia de glicoproteínas, debido a que esto es característico de este tipo de proteínas. Luego, en la fracción eluída a 40%, 60% y 80% de ACN, se observa enriquecida la banda de interés, lo que da cuenta que la columna además de purificar la molécula, la está concentrando. Sin embargo, luego se analizaron mediante HPLC dichas fracciones y no se obtuvieron señales importantes, por lo que los resultados obtenidos mediante HPLC corresponden a análisis de extractos ácidos y no eluídos por Sep-Pak C-18.

Mediante la purificación de estos péptidos por HPLC, se lograron visualizar picos entre los 20 y 23 minutos con actividad antimicrobiana, en una corrida de 30 minutos usando un gradiente de 0% a 100% de acetonitrilo en agua acidificada. Estas señales se correlacionaron con la banda obtenida mediante electroforesis alrededor de los 3,7 kDa, sin embargo, resta por demostrar si la banda observada en el gel es la que da cuenta de la actividad en las fracciones eluídas por HPLC. Lo destacable es que se ha logrado purificar parcialmente la molécula con actividad AM, además de correlacionar la actividad AM de las fracciones purificadas con señales específicas en los

cromatogramas, que corresponden a moléculas de naturaleza peptídica, ya que además de visualizarse a 220 nm, también son capaces de absorber a 280 nm.

Como es evidente, aún falta por completar el proceso de purificación mediante HPLC, pudiendo implementarse además de fase reversa, una cromatografía de intercambio catiónico para aprovechar así la presencia de aminoácidos de esa naturaleza en su estructura, y/o una cromatografía de exclusión molecular debido a su pequeño tamaño. Este trabajo se encuentra en progreso y se espera en el corto plazo tener la secuencia de las moléculas encontradas en este estudio.

7.1 Diversidad de tipos celulares presentes en los hemocitos de los moluscos estudiados

Considerando la diversidad de tipos celulares que se logró visualizar en las distintas preparaciones de hemocitos de Loco, por primera vez estudiadas, se puede establecer una cierta analogía con uno de los modelos más ampliamente utilizados en invertebrados como es la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*). En esta especie, también se han descrito tres tipos diferentes de hemocitos circulantes en su hemolinfa. Por una parte, se encuentran los plasmátocitos que son los más abundantes y componen cerca del 90% de las células circulantes y corresponden a células de tipo-macrófago encargadas de la captación de bacterias infecciosas. Los lamelocitos con forma aplanada, están a cargo de la captación y encapsulación de grandes conglomerados celulares y, finalmente, se encuentran las células cristalinas que están a cargo de proporcionar las enzimas requeridas para las reacciones de melanización [21]. De esta manera y por analogía, pensamos que las células con gránulos electrón-densos abundantes y heterogéneos en su citoplasma, encontradas en la hemolinfa del Loco, pueden ser las encargadas de la fagocitosis de bacterias. Estas células serían capaces de responder a patrones moleculares de patógenos induciendo su desgranulación y la liberación de su contenido, entre los que se

encuentran los péptidos antimicrobianos. Por otra parte, hipotetizamos que las células con gránulos más homogéneos y de mayor tamaño a los anteriores, serían las encargadas de suministrar las enzimas necesarias para las cascadas de la coagulación y melanización, además de agentes antimicrobianos. Finalmente, las células con escasos gránulos serían las encargadas de encapsular grandes moléculas y restos celulares, característica asociada a la presencia de enormes vacuolas cargadas de hemocianina. Es indudable, que estas suposiciones requieren un estudio acucioso, aislando idealmente cada tipo celular y cultivándolos en presencia de bacterias *in vitro* para de esta forma, por ejemplo, determinar si el/los agentes encontrados son constitutivos o son inducidos por algún componente bacteriano.

En un trabajo reciente se identificaron las células inmunes presentes en la hemolinfa de una especie de camarón (*Penaeus indicus*) y se analizó su interacción *in-vitro* con tres especies de *Vibrio*. Los hemocitos se dividieron en tres grupos de acuerdo a su morfología: agranulocitos, granulocitos semidensos y granulocitos densos y se estudiaron parámetros como coagulación, encapsulación, fagocitosis, formación de nódulos, opsonización y síntesis de anión superóxido [37]. Por otra parte, existe una serie de estudios *in-vivo*, en donde se somete a un desafío bacteriano a la especie de molusco en estudio y se observa cómo varía la expresión de sus AMPs ya sea en su hemolinfa o en el interior de sus hemocitos. Por ejemplo, en un molusco bivalvo (*Mytilus edulis*), se han aislado tres clases de péptidos antimicrobianos desde hemolinfa control, y luego de ser expuestos a un desafío microbiano tras la administración *in-vivo* de una cantidad determinada de una suspensión bacteriana [23]. Por otra parte, en *Carcinus maenas*, una especie de cangrejo, se analizó por RT-PCR las fluctuaciones en la concentración de un AMP, luego de someterlo a distintos estímulos. Se encontró que tras un desafío *in-vivo* con una bacteria Gram positiva, no hay variaciones significativas en la expresión del AMP hasta 24 horas post-inyección, observándose una pequeña disminución en su expresión luego de 84 horas. Es interesante destacar que, tras variaciones en la temperatura a 5°C y a 20°C, se observó un aumento en su expresión en comparación con los controles a 15°C, lo cual indicaría que la expresión de AMPs es dependiente de la temperatura [38].

Finalmente, en un cangrejo de agua dulce (*Pacifastacus leniusculus*), se determinó también mediante RT-PCR que la expresión del AMP crustina-1 aumenta en hemocitos, hepatopáncreas y tejido hematopoyético, luego de un desafío con una bacteria Gram negativa, ya sea patogénica (*Aeromonas hydrophila*) o no patogénica (*E. coli* y *Acinetobacter ssp*) [39], apoyando la teoría de que estos péptidos son inducidos, aunque según nuestros resultados, los agentes encontrados en el caso del Loco serían constitutivos, ya que fueron aislados sin la necesidad de someter a los moluscos a ningún tipo de desafío.

Por otra parte, en los ensayos *in-vitro*, en donde se enfrentan directamente los hemocitos con los microorganismos, los análisis básicamente se han centrado en estudiar la capacidad fagocítica de los hemocitos y las moléculas involucradas en el proceso de reconocimiento de los patógenos. En este sentido, como se mencionó previamente, uno de los modelos más estudiados en invertebrados es la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), en donde se ha caracterizado a profundidad este proceso [21].

En el caso de otro invertebrado, una especie de cangrejo (*Tachypleus tridentatus*) se encuentran al menos dos tipos de poblaciones de hemocitos, una granular que abarca aproximadamente el 99% del total de la población de células circulantes y una no-granular, que representa al resto. Para la población de hemocitos que presentan gránulos intracelulares, se pueden identificar dos tipos de gránulos, los cuales son fácilmente distinguibles mediante microscopía electrónica. Unos de gran tamaño denominados (L) del inglés “*large*”, los cuales contienen más de 25 proteínas entre las que se encuentran factores de la coagulación, inhibidores de proteasas, lectinas y proteínas antimicrobianas. Los otros son de tamaño pequeño denominados (S) del inglés “*small*”, los cuales contienen al menos 6 proteínas además de péptidos antimicrobianos, entre los que se encuentran las taquiplesinas de 17-18 residuos de aminoácidos con más de 10 mg por ejemplar, las taquistatinas de 41-44 residuos, las taquicitinas de 73 residuos y las defensinas gigantes de 79 residuos activos contra

bacterias y hongos [2]. Estas observaciones estarían relacionadas con la heterogeneidad de gránulos electrón-densos encontrados en el citoplasma de estas células, los cuales almacenarían en su interior una gran diversidad de proteínas, péptidos y moléculas de diversa naturaleza.

En relación a la cantidad de hemocitos por ml de hemolinfa encontrados en el Loco, se puede comparar con lo reportado en la literatura para el caso del cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*), el cual posee 100 veces más células en su hemolinfa (5×10^6 células/ml) [40]. Pensamos que debido a esto, la concentración de proteínas de los extractos ácidos de hemocitos que presentan actividad era baja (inferiores a 0,1 mg/ml), razón por la cual fue necesario concentrar para evitar los problemas de dilución del principio activo. Desconocemos si esto puede estar asociado con la evolución de la cantidad de hemolinfa por ejemplar a lo largo del año, lo cual podría tener directa incidencia sobre la cantidad de células por ml de hemolinfa que también puede variar significativamente a lo largo del año, lo que requeriría un estudio más acabado. En una especie de bivalvo (*Crassostrea virginica*), se demostró que la actividad bactericida de sus hemocitos fue mayor en verano que en invierno [41]. Sin embargo, en una especie de gastrópodo (*Planorbarius corneus*) se observó una disminución en las células fagocíticas presentes en su hemolinfa luego de una inyección bacteriana, lo cual al parecer está regulado por factores humorales presentes en la hemolinfa [42]. Todo este conjunto de variables, tiene efecto directo sobre la naturaleza y cantidad de agentes AM encontrados en los hemocitos, los cuales pueden ir cambiando su repertorio a lo largo del año. Esto se puede deber a las fluctuaciones en la proliferación de los microorganismos patógenos en el ambiente marino, los que tienden a ser mayores en los meses de verano donde las temperaturas son altas, y luego caen en los meses de invierno donde las temperaturas descienden algunos grados. En general, las especies de *Vibrio* son frecuentemente detectables en verano, y en los meses de invierno son menos comunes, sin embargo en aguas tropicales y subtropicales las fluctuaciones en su población son menores. Por ejemplo, en las costas del sureste de Estados Unidos, el promedio de *Vibrio* es 34,6% del total de la población durante el verano. Por otra parte, en aguas

subtropicales de la costa de Hong Kong la población va desde 10^1 a 10^3 células/ml lo cual equivale del 0,4 al 40% de la población total en el verano. Todos estos datos reflejan que la abundancia de *Vibrio* está dada por las temperaturas del agua. Así en un estudio con *V. parahaemolyticus*, una temperatura entre 14°C y 19°C se encontró que era la crítica para detectar células cultivables en el agua durante finales de primavera e inicios de verano. Además en otro estudio, mediante PCR se determinó que las especies de *Vibrio* que se encuentran son distintas cuando las temperaturas del agua cambian, así cuando la temperatura es mayor a 20°C la especie predominante es *V. parahaemolyticus*, y cuando desciende por debajo de los 20°C abundan *V. splendidus* y *V. lentus*, lo cual puede reflejarse en una variación en el tipo de péptidos encontrados a lo largo del año [43].

7.2 Origen de los péptidos antimicrobianos

De acuerdo a los ensayos realizados en un comienzo, solo se encontró actividad AM en las fracciones subcelulares de organelos de hemocitos, no así en sus fracciones citosólicas. Sin embargo, a pesar de no haber encontrado actividad AM en las distintas fracciones de hemolinfa de todas las especies testeadas, con los distintos tratamientos, no descartamos la posibilidad que en dicho fluido existan AMPs. Debido a que, al ensayar un péptido control con reconocida actividad AM como la magainina I, al ser diluido en hemolinfa, tampoco fue capaz de inhibir el crecimiento bacteriano, por lo que especulamos que en la hemolinfa podrían encontrarse moléculas que inhiben la acción de los AMPs. Especulamos que luego de una agresión microbiana existiría alguna señal que libere a los péptidos de su inhibidor putativo y de esta forma, permitiría su activación para ejercer su efecto libremente. Otra posibilidad es que la actividad de estos agentes sea inhibida a altas concentraciones de sal, como las que se encuentran en la hemolinfa, debido al hábitat en que viven estos organismos invertebrados. En el caso del cangrejo azul (*Callinectes sapidus*) su hemolinfa posee una osmolaridad de entre 800-1000 mOsmol/l [44], comparado con la osmolaridad de la sangre o el suero en mamíferos que es de 300 mOsmol/l. De esta manera, se

generaría una competencia de cargas que podría desplazar la interacción del AMP con la membrana de la bacteria [45]. Por otra parte, las fracciones obtenidas a partir de los extractos ácidos de hemocitos, además de reconstituirse en agua, una fracción de ellas fue reconstituida en PBS, condición en la cual no se detectó actividad AM, apoyando el hecho de que estos agentes puedan ser sensibles a altas concentraciones de sal, razón por la cual no se encontró actividad AM.

Cabe la posibilidad, que además de provenir de los gránulos electrón-densos encontrados en los hemocitos, estos agentes AM puedan provenir de la acción de una proteasa sobre una proteína abundante en la hemolinfa de Loco y Lapas como es la hemocianina. Esta enzima podría estar dentro de las vacuolas encontradas en los hemocitos, como se ha descrito en literatura para otras especies de invertebrados. Como se mencionó en la introducción, las hemocianinas son enormes proteínas multiméricas que contienen cobre y transportan oxígeno a través de la hemolinfa de algunos moluscos y artrópodos, hacia donde son liberadas luego de sintetizarse en diversos órganos dependiendo de la especie, como por ejemplo el hepatopáncreas en el Loco o en la glándula branquial como es el caso de cefalópodos [46]. Recientemente, se ha establecido un nuevo rol de la hemocianina en la inmunidad innata de los invertebrados. Se han caracterizado péptidos derivados de hemocianina de crustáceos que presentan actividad antimicrobiana, como lo son las astacidinas del cangrejo de río (*Pacifastacus leniusculus*) y péptidos antifúngicos en especies de camarón. En el caso de las astacidinas, se generan por proteólisis limitada de la hemocianina, por una cisteína proteasa no identificada, tras la administración de agentes microbianos que activan al sistema pro-fenoloxidasa, como LPS y β -1,3-glucanos [10]. Mientras que los péptidos con actividad antifúngica fueron aislados de la hemolinfa de dos especies de camarón (*Penaeus vannamei* y *Penaeus stylirostris*) en respuesta a un encuentro microbiano, comprobándose luego su homología de secuencia con el C-terminal de la hemocianina y deduciéndose así que eran generados por proteólisis de dicha región de la proteína [11]. A partir de esto, y luego de nuestra visualización de células cargadas con vacuolas de hemocianina, no se puede descartar que las moléculas con actividad AM puedan venir de la ruptura

proteolítica de la hemocianina por alguna proteasa intracelular que genere estos fragmentos luego de alguna agresión microbiana o ruptura de algún tejido. Sin embargo, hay que considerar que se evaluó la actividad AM de hemocianina de las cuatro especies en estudio, sin registrarse efecto AM sobre las diversas bacterias estudiadas. Esto podría deberse a que los fragmentos que presentan la actividad son de pequeño tamaño y generados en forma específica por proteasas intracelulares y no por ruptura espontánea de la proteína, ya que las hemocianinas purificadas ensayadas presentaban precipitados, lo que nos hizo suponer *a priori* que habían fragmentos de bajo PM que inhibirían el crecimiento bacteriano. Además, hay que mencionar que también se han encontrado diversos péptidos provenientes de hemocianina que presentan actividad antiviral e incluso en algunos casos la molécula completa o alguna subunidad, da cuenta de este efecto [12-15]. Por lo tanto, restaría por determinar si los resultados observados en especies del género *Rapana* y *Penaeus* son extrapolables a *Concholepas concholepas*.

7.3 Espectro de actividad antimicrobiana de los agentes encontrados

El hecho que solamente se haya registrado inhibición contra cepas Gram negativas (*V. parahaemolyticus* ATCC 17802, *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* DH5 α), y para el caso de cepas Gram positivas (*S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 6538, *Listeria innocua* ATCC 33090 y *Listeria monocytogenes* ATCC 7644) no se visualizaran halos de inhibición evidentes, denota la especificidad de los agentes encontrados. Esto, además, tiene relación con el mecanismo de acción propuesto en el cangrejo *Tachypleus tridentatus*, en donde se postula que el LPS, presente en bacterias Gram negativas, es el que gatilla la desgranulación de los hemocitos que poseen en su interior AMPs para que ataquen al patógeno invasor [2].

En estudios recientes realizados por Ordóñez J. *et al.*, en *Concholepas concholepas* [47], conducentes a entender la fisiología de este invertebrado y las

interacciones microbianas de las que es parte, se caracterizó parcialmente su flora procarionte intestinal. Mediante análisis del ADNr 16S se encontró en la flora intestinal cultivable asociada al Loco, en especímenes provenientes de Caleta Coloso (Antofagasta, Chile), que el género predominante es *Vibrio sp.* Mediante ésta y posteriores evidencias sobre los microorganismos que habitan en el sistema gastrointestinal de *C. concholepas* será posible generar futuras investigaciones relacionadas con sus interacciones bióticas, que se traduzcan en la sustentabilidad de este recurso. Este hallazgo se puede relacionar con el hecho que en sus hemocitos existan AMPs con actividad sobre *V. parahaemolyticus*, ya que quizás de esta manera mantienen controlada a su flora normal gastrointestinal y así evitan que se alojen bacterias en otras zonas más susceptibles a microorganismos, como es su hemolinfa.

Por otra parte, la cepa de *E. coli* ATCC 25922 utilizada en los ensayos, corresponde a un aislado clínico patógeno, que es capaz de causar infecciones intestinales, urinarias y septicemia, entre otras enfermedades. Actualmente, los antibióticos no son lo suficientemente efectivos para contrarrestar este tipo de infecciones debido a la aparición de variantes multiresistentes, por lo cual estos agentes AM de naturaleza peptídica podría ser efectivos para combatir su proliferación, y así evitar que colonicen otras zonas del organismo distantes al intestino, que es donde se encuentra normalmente como parte de la flora bacteriana.

7.4 Aplicaciones

Los agentes antimicrobianos con actividad sobre *Vibrio parahaemolyticus* encontrados en este trabajo son de suma importancia para el área de producción de moluscos en Chile, ya que este agente se podría utilizar en la fase final de cosecha de moluscos, como choritos (*Mytilus chilensis*), ostras (*Crassostrea gigas*) y ostiones (*Argopecten purpuratus* y *Chlamys patagonica*), los cuales representan cerca del 100% de las ventas de moluscos en Chile [48]. Así se mantendría bajo control y, es

posible que en el largo plazo, se podría eliminar este tipo de patógenos, que aunque no afectan al molusco si infectan humanos. Además, se podrían utilizar para mitigar el efecto de los microorganismos que disminuyen la producción de mariscos filtradores, al aplicarlos desde su etapa larval. Para todo esto se requieren realizar pruebas en terreno, en piscinas, para así evaluar su efectividad *in-vivo* y también pruebas para demostrar su inocuidad en humanos.

El área de alimentos también se puede ver beneficiada con la caracterización de nuevos péptidos con actividad AM, ya que estos agentes se pueden utilizar para controlar la proliferación de microorganismos que infectan alimentos. Existen varios estudios sobre el control del crecimiento de bacterias en alimentos como quesos, jamón, salchichas, productos cárnicos, entre otros; en donde básicamente se han tratado de controlar patógenos Gram positivos como *Listeria monocytogenes* (**Tabla 9**). Actualmente, existe un empaque para productos cárnicos que se comercializa en México, compuesto por AMPs incluidos en plástico, los cuales provienen de bacterias y se denominan bacteriocinas [26]. En este sentido, debido a que en un comienzo se encontraron agentes AM de amplio espectro, contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, en los extractos ácidos de hemocitos de Lapa frutilla, se podría retomar su aislamiento y caracterización una vez estandarizadas las metodologías para los agentes encontrados en *Concholepas concholepas*, suponiendo que ambos agentes puedan tener una naturaleza química similar.

Tabla 9. Ejemplos de películas y recubrimientos con AMPs y su aplicación en algunos productos cárnicos [26].

AMP	Microorganismo	Alimento
Nisina	<i>Listeria monocytogenes</i>	Bologna de pavo
Nisina	<i>Listeria monocytogenes</i>	Salchichas
Nisina	<i>Listeria monocytogenes</i>	Pollo
Pediocina	<i>Listeria innocua</i>	Salchichas de pavo

Finalmente, en el campo de la Biomedicina también existen aplicaciones para estos agentes, en donde las más emergentes son en infecciones tópicas y oculares (**ANEXO: Tabla 10**). Se han empleado AMPs provenientes tanto de vertebrados como invertebrados, encontrándose algunos en Fase III en ensayos clínicos, la cual se realiza luego de establecer una probabilidad razonable de eficacia del medicamento. En este caso el objetivo es obtener información adicional de su eficacia para aplicaciones específicas y una definición más precisa de sus efectos adversos asociados. Básicamente, se han utilizado en infecciones con cepas multiresistentes de bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, además de infecciones fúngicas. En un trabajo reciente, se estudió la seguridad y tolerabilidad de un AMP humano, correspondiente a una región de la lactoferrina (hLFI-II), que posee actividad AM contra *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Acinetobacter baumannii*, además de hongos de la especie *Candida*. Este péptido se probó en voluntarios sanos y pacientes que habían sido sometidos a un trasplante autólogo de células troncales hematopoyéticas, tratamiento que viene acompañado por un cuadro de infecciones oportunistas. Dosis múltiples y simples intravenosas de hasta 5 mg del péptido fueron tolerables en voluntarios sanos; por otra parte 5 mg de una sola dosis fue tolerable en pacientes. El perfil de efectos secundarios fue muy favorable para el agente antimicrobiano, encontrándose solo una elevación en las transaminasas del suero, lo cual podría ser reversible disminuyendo la dosis administrada, sin afectar la actividad del péptido [49].

En el ámbito de las patentes, en USA hay alrededor de 40 patentes asociadas a AMPs, sus secuencias, método de obtención, potenciales aplicaciones, entre otras [50]. Encontrándose péptidos provenientes de vertebrados ya sea de humano, bovino, cerdo, rata y rana; invertebrados como tunicados, moluscos, peces e insectos; bacterias del género *Bacillus*, y una gran variedad de péptidos sintéticos. En cuanto a las aplicaciones además de las ya mencionadas se han patentado para aplicarlos a superficies, en implantes ortopédicos, dispositivos médicos y preparaciones oftalmológicas, entre otras.

Lo que resta por ahora es llegar a obtener la secuencia del péptido, para testear su actividad AM en condiciones puras frente a un espectro de bacterias más amplio, para así asegurar su utilización en alguna de las aplicaciones previamente mencionadas.

8. CONCLUSIONES

- a. Existen agentes con actividad antimicrobiana en extractos subcelulares de hemocitos de Loco y Lapas del género *Fissurellidae*, con especificidad contra cepas de bacterias Gram negativas de interés en salud pública como *V. parahaemolyticus* y *E. coli*.
- b. Los hemocitos de Loco y Lapas del género *Fissurellidae* presentan gránulos electrón-densos en su citoplasma, los cuales son similares a los descritos en la literatura para otros invertebrados y que por lo tanto, podrían almacenar en su interior los agentes antimicrobianos encontrados en este trabajo.
- c. Esta es la primera vez que se comprueba la presencia de agentes antimicrobianos en extractos celulares de las especies en estudio.
- d. Los agentes antimicrobianos encontrados son de tamaños de alrededor de 10 kDa o menores.
- e. Fue posible aislar estos agentes mediante purificación por cromatografía en fase reversa, dando cuenta a grandes rasgos de sus propiedades fisicoquímicas y naturaleza hidrofóbica.
- f. Se logró visualizar mediante geles de poliacrilamida una banda principal de PM en torno a 3,7 kDa en las fracciones con actividad antimicrobiana, sugiriendo fuertemente que podría corresponder a un AMP.
- g. Mediante purificación por HPLC en fase reversa se visualizaron tres señales con actividad antimicrobiana, lo que daría cuenta que en las fracciones subcelulares de hemocitos de Loco se encontraría más de un AMP.

- h. Se estableció una metodología reproducible y confiable para buscar AMPs en hemocitos de moluscos, abriendo así una interesante línea de investigación para encontrar moléculas con potencial aplicación en el control de diferentes microorganismos de interés en salud pública.

9. REFERENCIAS

- [1] Tincu, J.A., and Taylor, S.W. (2004). Antimicrobial peptides from marine invertebrates. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48, 3645-3654.
- [2] Iwanaga, S., and Lee, B.L. (2005). Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *Journal of biochemistry and molecular biology* 38, 128-150.
- [3] Cerenius, L., and Soderhall, K. (2004). The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological reviews* 198, 116-126.
- [4] Adachi, K., Hirata, T., Nishioka, T., and Sakaguchi, M. (2003). Hemocyte components in crustaceans convert hemocyanin into a phenoloxidase-like enzyme. *Comparative biochemistry and physiology* 134, 135-141.
- [5] Decker, H., and Tuczek, F. (2000). Tyrosinase/catecholoxidase activity of hemocyanins: structural basis and molecular mechanism. *Trends in biochemical sciences* 25, 392-397.
- [6] Nellaiappan, K., and Sugumaran, M. (1996). On the presence of prophenoloxidase in the hemolymph of the horseshoe crab, *Limulus*. *Comparative biochemistry and physiology* 113, 163-168.
- [7] Sugumaran, M. (2002). Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* 15, 2-9.
- [8] Nagai, T., Osaki, T., and Kawabata, S. (2001). Functional conversion of hemocyanin to phenoloxidase by horseshoe crab antimicrobial peptides. *The Journal of biological chemistry* 276, 27166-27170.
- [9] Nagai, T., and Kawabata, S. (2000). A link between blood coagulation and prophenol oxidase activation in arthropod host defense. *The Journal of biological chemistry* 275, 29264-29267.
- [10] Lee, S.Y., Lee, B.L., and Soderhall, K. (2003). Processing of an antibacterial peptide from hemocyanin of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *The Journal of biological chemistry* 278, 7927-7933.
- [11] Destoumieux-Garzon, D., Saulnier, D., Garnier, J., Jouffrey, C., Bulet, P., and Bachere, E. (2001). Crustacean immunity. Antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. *The Journal of biological chemistry* 276, 47070-47077.

- [12] Zhang, X., Huang, C., and Qin, Q. (2004). Antiviral properties of hemocyanin isolated from shrimp *Penaeus monodon*. *Antiviral research* 61, 93-99.
- [13] Havanapan, P.O., Kanlaya, R., Bourchookarn, A., Krittanai, C., and Thongboonkerd, V. (2009). C-terminal hemocyanin from hemocytes of *Penaeus vannamei* interacts with ERK1/2 and undergoes serine phosphorylation. *Journal of proteome research* 8, 2476-2483.
- [14] Dolashka-Angelova, P., Lieb, B., Velkova, L., Heilen, N., Sandra, K., Nikolaeva-Glomb, L., Dolashki, A., Galabov, A.S., Van Beeumen, J., Stevanovic, S., *et al.* (2009). Identification of glycosylated sites in *Rapana* hemocyanin by mass spectrometry and gene sequence, and their antiviral effect. *Bioconjugate chemistry* 20, 1315-1322.
- [15] Genova-Kalou, P., Dundarova, D., Idakieva, K., Mohmmmed, A., Dundarov, S., and Argirova, R. (2008). Anti-herpes effect of hemocyanin derived from the mollusk *Rapana thomasiana*. *Zeitschrift fur Naturforschung* 63, 429-434.
- [16] Kurata, S., Ariki, S., and Kawabata, S. (2006). Recognition of pathogens and activation of immune responses in *Drosophila* and horseshoe crab innate immunity. *Immunobiology* 211, 237-249.
- [17] Jenssen, H., Hamill, P., and Hancock, R.E. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews* 19, 491-511.
- [18] Zasloff, M. (1987). Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 5449-5453.
- [19] Van de Ven, F.J., Van den Hooven, H.W., Konings, R.N., and Hilbers, C.W. (1991). NMR studies of lantibiotics. The structure of nisin in aqueous solution. *European journal of biochemistry / FEBS* 202, 1181-1188.
- [20] Garcia-Olmedo, F., Molina, A., Alamillo, J.M., and Rodriguez-Palenzuela, P. (1998). Plant defense peptides. *Biopolymers* 47, 479-491.
- [21] Lemaitre, B., and Hoffmann, J. (2007). The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual review of immunology* 25, 697-743.
- [22] Destoumieux, D., Bulet, P., Loew, D., Van Dorsselaer, A., Rodriguez, J., and Bachere, E. (1997). Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *The Journal of biological chemistry* 272, 28398-28406.
- [23] Mitta, G., Vandenbulcke, F., and Roch, P. (2000). Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS letters* 486, 185-190.

- [24] Andres, E., and Dimarcq, J.L. (2004). Cationic antimicrobial peptides: update of clinical development. *Journal of internal medicine* 255, 519-520.
- [25] Gordon, Y.J., Romanowski, E.G., and McDermott, A.M. (2005). A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. *Current eye research* 30, 505-515.
- [26] Quintero-Salazar, B., and Ponce, E. (2007). Empaques y recubrimientos con actividad antimicrobiana adicionados con bacteriocinas y su aplicación. *Revista Carnilac Industrial*, Oct-Nov.
- [27] Letelier, S., Vega, M. A., Ramos, A. M., and Carreño, E. (2003). Base de datos del Museo Nacional de Historia Natural: Moluscos de Chile. *Revista de Biología Tropical* 51, 33-137.
- [28] De Ioannes, P., Moltedo, B., Oliva, H., Pacheco, R., Faunes, F., De Ioannes, A.E., and Becker, M.I. (2004). Hemocyanin of the molluscan *Concholepas concholepas* exhibits an unusual heterodecameric array of subunits. *The Journal of biological chemistry* 279, 26134-26142.
- [29] Moltedo, B., Faunes, F., Haussmann, D., De Ioannes, P., De Ioannes, A.E., Puente, J., and Becker, M.I. (2006). Immunotherapeutic effect of *Concholepas* hemocyanin in the murine bladder cancer model: evidence for conserved antitumor properties among hemocyanins. *The Journal of urology* 176, 2690-2695.
- [30] Espinoza, C. Caracterización bioquímica e inmunogénica de la hemocianina de tres especies de lapas chilenas de la familia *Fissurellidae*: *Fissurella latimarginata* (Lapa negra), *Fissurella cumingi* (Lapa frutilla) y *Fissurella maxima* (Lapa reina). Tesis (Bioquímica). Santiago, Chile. Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Ciencias Biológicas, 2007. 82 h.
- [31] Luft, J.H. (1961). Improvements in epoxy resin embedding methods. *The Journal of biophysical and biochemical cytology* 9, 409-414.
- [32] Reynolds, E.S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *The Journal of cell biology* 17, 208-212.
- [33] Schagger, H., and von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical biochemistry* 166, 368-379.
- [34] Kruger, N.J. (1994). The Bradford method for protein quantitation. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ) 32, 9-15.
- [35] Neuhoff, V. (2000). Microelectrophoresis and auxiliary micromethods. *Electrophoresis* 21, 3-11.

- [36] Rabilloud, T. (2000). Detecting proteins separated by 2-D gel electrophoresis. *Analytical chemistry* 72, 48A-55A.
- [37] Jayasree, S. (2009). Identification of immune cells interacting with *Vibrio* spp. and its in vitro post-phagocytic killing mechanism of haemocytes in the penaeid shrimp, *Penaeus indicus* H. Milne Edwards. *Journal of Fish Diseases* 32, 359-365.
- [38] Brockton, V., and Smith, V.J. (2008). Crustin expression following bacterial injection and temperature change in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Developmental and comparative immunology* 32, 1027-1033.
- [39] Jiravanichpaisal, P., Lee, S.Y., Kim, Y.A., Andren, T., and Soderhall, I. (2007). Antibacterial peptides in hemocytes and hematopoietic tissue from freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*: characterization and expression pattern. *Developmental and comparative immunology* 31, 441-455.
- [40] Robertson, J. O. (1970). Osmotic and ionic regulation in the horseshoe crab *Limulus Polyphemus* (Linnaeus). *The Biological Bulletin* 138, 157-183.
- [41] Genthner, F.J., Volety, A.K., Oliver, L.M., and Fisher, W.S. (1999). Factors influencing in vitro killing of bacteria by hemocytes of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Applied and environmental microbiology* 65, 3015-3020.
- [42] Ottaviani, E. (1989). Selected decrease of haemocytes of the freshwater snail *Planorbarius corneus* (L.) (*Gastropoda, Pulmonata*) after bacteria injection. *Experientia* 45, 368-369.
- [43] Urakawa, H., and Rivera, I. N. The biology of vibrios. In F. L. Thompson, B. Austin, and J. Swings ed. Washington DC 20036-2904, American Society of Microbiology Press, 2006. p. 175–177.
- [44] Hill, R. W., Wyse, G. A., and Anderson, M. *Fisiología Animal*, Editorial Médica Panamericana, 2006, ISBN: 84-7903-990-6.
- [45] Lehrer, R.I., Lichtenstein, A.K., and Ganz, T. (1993). Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annual review of immunology* 11, 105-128.
- [46] Manubens, A., Hausmann, D., Fuentes, A., Figueroa, J., Huaquin, L., Martínez, J., De Ioannes, A., Venegas, A., De Ioannes, P., and Becker, M. I. (2007). Clonamiento parcial de dos secuencias cDNA de la hemocianina del gastrópodo chileno *Concholepas concholepas* y localización del órgano responsable de su biosíntesis. En: XXX Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile, Chillan, Chile. Libro de Resúmenes, página 36.

[47] Ordóñez, J., Vargas, G., Zadjelovic, V., Lody, M., Riquelme, C., Dorador, C., and Mercado, A. (2009). Caracterización de la microbiota gastrointestinal procarionte asociada a *Concholepas concholepas* mediante análisis del ADNr 16S. En: XXXI Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Microbiología: 1-4 de Diciembre de 2009. Santa Cruz, Chile, Hotel Plaza Santa Cruz. Libro de Resúmenes, página 129.

[48] AMICHILE: Asociación de Mitilicultores de Chile. Venta de Mariscos Enero-Diciembre 2007-2008. Sección de Economía, Instituto de Fomento Pezquero. [en línea] < <http://www.amichile.com/mitilicultura/estadisticas/index.php>> [consulta: 4 enero 2010]

[49] Velden, W.J., van Lersel, T.M., Blijlevens, N.M., and Donnelly, J.P. (2009). Safety and tolerability of the antimicrobial peptide human lactoferrin 1-11 (hLF1-11). *BMC medicine* 7, 44.

[50] United States Patent and Trademark Office. USA USPTO Patent Full-Text and Image Database. [en línea] <http://patft.uspto.gov/netahtml/PTO/search-bool.html> [consulta: 4 enero 2010]

10. ANEXO

10.1 Tabla 10. AMPs desarrollados en estudios clínicos [24].

Componente	Compañía Biotecnológica	Características Estructurales	Especies	Uso	Indicaciones	Fase Estudio Clínico
Pexiganan (MSI-78)	Magainin Pharmaceuticals	α -hélices	Piel de <i>Xenopus</i>	Crema	Impétigo e infecciones ulcerosas en pie diabético	Fase III
Iseganan (IB-367)	Intrabiotics Pharmaceuticals	Contiene puentes S-S	Leucocitos de cerdo	Soluciones Orales	Terapias anticancerígenas y mucosistis oral inducida	Fase III
				Aerosol	Infecciones pulmonares en fibrosis quística y neumonía	Fase I
Péptidos MBI	Micrologix Biotech	α -hélices	NC	Crema	Infecciones sanguíneas	Fase III
					Acné y portadores de <i>S. aureus</i>	Fase I
Variantes de Histatina	Periondotix	α -hélices	Humano	Soluciones Orales	Gingivitis en infecciones bucales	Fase II
					Candidiasis oral e infecciones pulmonares por <i>P. aeruginosa</i>	Fase I
Variantes de Heliomocin	Entomed SA	Contiene puentes S-S	Insecto	Parenteral	Infecciones fúngicas y pacientes inmunocomprometidos	Pre-Clínica
Variantes de Defensinas			Insecto		Infecciones sistémicas con bacterias Gram positivas	Pre-Clínica
Neuprex	Xoma Ltd	α -hélices	Humano	Parenteral	Meningococcaemia pediátrica	Fase III
Mycoprex	Xoma Ltd	α -hélices	Humano	Parenteral	Infecciones fúngicas sistémicas	
hLF1-11	AM-Pharma		Humano	Parenteral	Trasplantes hematopoyéticos e infecciones bacterianas y micosis	Fase II

S-S: puentes disulfuro. NC: No comunicado. hLF: "human lactoferrin"