

ARTÍCULO DE REVISIÓN

Inhibidores de serino proteasas de naturaleza proteica aislados de invertebrados marinos

Proteic serine-proteases inhibitor isolated from marine invertebrates

Yamilé González,^{1*} Dayrom Gil,¹ Maday Alonso del Rivero,¹ Isel Pascual,¹ Rossana García,¹ Julieta Delfín,¹ Joaquín Díaz,¹ Mariana S. Araujo,² Aparecida S. Tanaka,² Tirso Pons¹ y María A. Chávez¹

¹ Centro de Estudio de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba.

² Departamento de Bioquímica, Instituto de Farmacología y Biología Molecular, Universidad Federal de São Paulo, Brasil.

* Autor para correspondencia: yamile@fbio.uh.cu

Los inhibidores de proteasas (IP) son las biomoléculas responsables de uno de los mecanismos de regulación de los seres vivos para controlar la actividad proteolítica de sus proteasas dianas. Su presencia en los más diversos tejidos es indicativa del papel importante que desempeñan en procesos vitales, al impedir la proteólisis no deseada o garantizar la proteólisis parcial como un evento fisiológico (Laskowski y Kato, 1980; Laskowski y Qasim, 2000).

Los IP se han convertido en moléculas muy atractivas, no solo para estudios de la interacción proteína-proteína –aplicación más tradicional (Jones y Thorhnton, 1996)–, sino también por sus múltiples aplicaciones biomédicas y biotecnológicas. Como ejemplo se puede citar su empleo en los procesos de purificación y producción de proteínas naturales y recombinantes, que garantizan rendimientos altos e incrementan la estabilidad operacional y de conservación; así como su aplicación en diferentes formulaciones para la protección de la degradación de proteínas por proteasas (Lowe *et al.*, 2001). Sin embargo, el interés actual en el estudio de los IP está principalmente determinado por la demostración del control de la proteólisis como un instrumento farmacológicamente válido, y del éxito en la terapéutica. El tratamiento del sida y de enfermedades inflamatorias, inmunológicas y respiratorias, así como desórdenes cardiovasculares y neurodegenerativos, como la enfermedad de Alzheimer, constituyen ejemplos de la eficiencia y las potencialidades de los IP como productos terapéuticos (Leung *et al.*, 2000; Abbenante y Fairlie, 2005).

Los IP se clasifican, de acuerdo con su secuencia de aminoácidos y estructura tridimensional (3D), en 59 familias y 24 clanes –nomenclatura disponible en la base de datos MEROPS, <<http://merops.sanger.ac.uk>> (Rawlings *et al.*, 2004)–. La mayoría de los inhibidores proteicos conocidos y caracterizados son inhibidores de proteasas serínicas (PS) o serino proteasas, enzimas

RECIBIDO: 9/2009
ACEPTADO: 12/2009

denominadas así por la presencia de un residuo de serina en el sitio reactivo, esencial para la catálisis enzimática. Estos IPS presentan mecanismos de interacción diferentes y se pueden distinguir tres tipos fundamentales: canónicos, no canónicos y serpinas (Bode y Huber, 1992; Krowarsch *et al.*, 2003, 2005).

Las serpinas son componentes del plasma humano y sus mutaciones dan lugar a numerosas enfermedades genéticas, como es el caso de la provocada por la deficiencia de la α_1 -antitripsina (Stein y Carrell, 1995). Son proteínas de alta masa molecular (350-500 aminoácidos) y se han identificado en numerosos organismos, desde los virus hasta los mamíferos (Gettins, 2002). Las serpinas interactúan con la enzima diana mediante un mecanismo similar al de un sustrato, aunque ocurre una interacción irreversible donde el lazo de unión de la serpina adopta diferentes conformaciones al interactuar con la proteasa diana (Silverman *et al.*, 2001), por lo que se produce una deformación del sitio activo de la proteasa (Elliot *et al.*, 1998). Las serpinas (MEROPS: I4) constituyen la familia más abundante de IP, con alrededor de 500 secuencias anotadas en las bases de datos (Rawlings *et al.*, 2004).

Los inhibidores no canónicos generalmente interactúan a través de una región que se une al sitio activo de la proteasa, y forma una estructura secundaria de hoja- β paralela. Estos inhibidores, además, pueden formar interacciones secundarias con sitios diferentes al sitio activo de la proteasa diana, por lo que presentan un área adicional de interacción que contribuye, significativamente, a la fortaleza, velocidad y especificidad del reconocimiento (Otlewski *et al.*, 2005). Este mecanismo se presenta en inhibidores procedentes de insectos hematófagos al inhibir proteasas de la coagulación y la fibrinólisis (trombina y/o Factor Xa) del hospedero, como es el caso de la rodina (fig. 1); este es un inhibidor de tipo Kazal aislado del triatómita *Rhodnius prolixus* (Van de Locht *et al.*, 1995), insecto que transmite al hombre la enfermedad de Chagas. Sin embargo, estos inhibidores pueden ser canónicos frente a otras PS como tripsina (Otlewski *et al.*, 2005).

Los inhibidores canónicos, aislados de numerosas células, tejidos y organismos, se encuentran dentro del grupo de proteínas más utilizadas para



Figura 1. Estructura 3D del complejo de la trombina bovina con la rodina, inhibidor canónico perteneciente a la familia Kazal, aislado del triatómita *Rhodnius prolixus* (PDB: 1TBR) (Van de Locht *et al.*, 1995). El dominio del extremo amino (N-terminal) interactúa con la región del centro activo de la enzima (círculo blanco); mientras que el dominio del extremo carboxilo (C-terminal) interactúa con el exosito de reconocimiento del fibrinógeno. Representación de Richardson: trombina (azul) y rodina (rosado); estructuras secundarias: hojas- β (flechas), hélices- α (cintas) y regiones al azar o lazos (líneas).

estudiar los mecanismos moleculares del reconocimiento proteína-proteína. Actualmente, se reconocen 18 familias que se diferencian entre sí por sus secuencias aminoacídicas, sus estructuras 3D y la localización del sitio unión al sitio reactivo de la proteasa. Los inhibidores canónicos se caracterizan por presentar una región responsable de la inhibición de la proteasa, denominado «lazo de unión», muy similar en todas las estructuras 3D conocidas. Este sitio es convexo, extendido y expuesto al solvente; además, presenta una alta complementariedad con el sitio activo cóncavo de la enzima. En esta región se encuentra el sitio reactivo P1-P1', localizado en la porción más expuesta del lazo de unión a la proteasa (Krowarsch *et al.*, 2003; Otlewski *et al.*, 2005).

Inhibidores procedentes de invertebrados marinos

Los organismos marinos son fuente importante de compuestos con diversas actividades biológicas. Dentro de ellos, los invertebrados constituyen un grupo muy atractivo por su relativa abundancia en aguas tropicales, donde son capturados con cierta facilidad. En estos organismos se ha demostrado la presencia de un amplio espectro de biomoléculas con diversas actividades funcionales, como parte de mecanismos de defensa que presentan frente a los depredadores. Estos compuestos comprenden citolisinas, neurotoxinas, fosfolipasas, bloqueadores de canales de sodio y potasio, inhibidores de acetilcolinesterasa (Tejuca *et al.*, 1996; Álvarez *et al.*, 2003), así como IP de diferentes clases mecánicas.

Los inhibidores de naturaleza peptídica de PS procedentes de invertebrados marinos, aislados y caracterizados hasta el momento, pertenecen a tres familias: Kunitz-BPTI (MEROPS: I2), Kazal (MEROPS: I1) y serpinas (MEROPS: I4). La gran mayoría de estos inhibidores es activa frente a tripsina, quimotripsina pancreáticas, y calicreínas plasmática y tisular. Inhibidores activos frente a elastasas del páncreas (EP) y de los neutrófilos humanos (ENH) solo se han aislado de cnidarios: el inhibidor AXPI-II, perteneciente a la familia Kunitz-BPTI, presente en la anémona *Anthopleura xantogrammica* (Minagawa *et al.*, 1997); los inhibidores de la familia Kazal, presentes en la anémona *Anemonia sulcata* (Tschesche *et al.*, 1987; Hemmi *et al.*, 2005) y en el coral *Melithaea caledonica* (La Barre *et al.*, 1996); y una serpina aislada de la medusa *Cyanea capillata* (Cole *et al.*, 2004). Un resumen de las características estructurales y funcionales de algunos de los inhibidores descritos se encuentra en la tabla 1.

Phyllum Cnidaria

Los celenterados producen una amplia variedad de polipéptidos y proteínas biológicamente activos, por lo que han sido objeto de numerosas revisiones (Anderluh y Macek, 2002; Sokotun *et al.*, 2007). La abundancia de IP en estos organismos marinos ha sido demostrada durante más de treinta años de investigación. Los inhibidores pertenecientes a la familia Kunitz-BPTI se han encontrado con mayor

abundancia (Wunderer *et al.*, 1976; Schweitz *et al.*, 1995; Delfín *et al.*, 1994, 1996), así como un inhibidor de la familia Kazal y una serpina (Tschesche *et al.*, 1987; La Barre *et al.*, 1996; Hemmi *et al.*, 2005).

La presencia de inhibidores de proteasas en invertebrados marinos se detectó por primera vez en la anémona *Anemonia sulcata* por Wunderer *et al.* (1976), quienes encontraron actividad inhibidora frente a la tripsina pancreática durante la purificación de neurotoxinas de ese organismo. Tales moléculas son polipéptidos básicos con una masa molecular entre 5,5 y 7,0 kDa, que actúan frente a PS de la familia S1. De todos los inhibidores aislados, el mayoritario –AsPI-5II– es un inhibidor perteneciente a la familia Kunitz-BPTI, no glicosilado, con una masa molecular de 6,7 kDa y un punto isoeléctrico $\leq 9,0$ (Wunderer *et al.*, 1976).

En 1985 se purificaron dos nuevas toxinas que presentaron actividad inhibidora de proteasa a partir de *A. sulcata*, denominadas caliclutinas y caliseptinas (Schweitz *et al.*, 1995; Perona y Craig, 1995). Las caliclutinas (58-59 residuos de aminoácidos) son estructuralmente homólogas a las dendrotoxinas y a los inhibidores de tipo Kunitz-BPTI, donde en una misma molécula existen dominios para la función bloqueadora de canales de potasio y para la inhibición potente de tripsina.

A partir de *Stichodactyla helianthus*, Delfín *et al.* (1994, 1996) purificaron un inhibidor denominado ShPI-1, de amplio espectro de acción. El inhibidor, de 6,1 kDa ($pI = 8,4$) con un dominio de tipo Kunitz-BPTI, es capaz de inhibir PS, además de proteasas de tipo cisteíno y de tipo aspártico. El valor de K_i frente a tripsina se encuentra en el orden de 1×10^{-10} mol/L. Su estructura 3D fue resuelta por resonancia magnética nuclear (RMN) (Antuch *et al.*, 1993) y presentó características estructurales similares a las de otros miembros de la familia procedentes de vertebrados (fig. 2). El plegamiento del ShPI-1 explica la acción frente a PS, pero no frente a proteasas de tipo cisteíno y aspártico, puesto que es un inhibidor con una especificidad inusual dentro de la familia Kunitz-BPTI. Recientemente, este mismo grupo ha clonado y expresado el ShPI-1 recombinante en la levadura *Pichia pastoris* para estudios de relación

Tabla 1. Principales características estructurales y funcionales de los inhibidores proteicos de proteasas serínicas aislados de invertebrados marinos.

PHYLLUM	ESPECIE	INHIBIDOR	FAMILIA	CARACTERÍSTICAS MOLECULARES Y FUNCIONALES	REFERENCIA
Cnidaria	<i>Anemonia sulcata</i>	AsPI-5II	Kunitz-BPTI	Sesenta y dos residuos de aminoácidos, 6,7 kDa. Es un inhibidor potente de tripsina con un valor de K_i de 3×10^{-10} mol/L.	Wunderer <i>et al.</i> , 1976
		AEI	Kazal	Masa molecular de 5,0 kDa. Estructura 3D resuelta mediante RMN (PDB: 1Y1B). Presentó actividad inhibitora frente a elastasa pancreática y de neutrófilos ($K_i \sim 10^{-10}$ mol/L y 10^{-7} mol/L, respectivamente).	Kolkenbrock y Tschesche, 1987; Hemmi <i>et al.</i> , 2005
	<i>Anthopleura aff. xantogrammica</i>	AXPI-I y AXPI-II	Kunitz-BPTI	Proteínas básicas de 58 residuos de aminoácidos; inhibidores de tripsina; sin embargo, el AXPI-II es capaz, además, de inhibir quimotripsina y elastasa.	Minagawa <i>et al.</i> , 1997
	<i>Stichodactyla helianthus</i>	ShPI-1	Kunitz-BPTI	ShPI-1 es una proteína de 6,1 kDa ($pI = 8,4$). Estructura 3D determinada por RMN (PDB:1SHP). ShPI-1, de amplio espectro de acción, ya que es capaz de inhibir proteasas serínicas (K_i frente a tripsina 1×10^{-10} mol/L); además, proteasas de tipo cisteino y de tipo aspártico.	Delfin <i>et al.</i> , 1994, 1996; Antuch <i>et al.</i> , 1993
	<i>Cyanea capillata</i>	Jellipina	Serpina	Secuencia deducida a partir del cDNA proteína recombinante; es un inhibidor de quimotripsina, catepsina G y elastasa.	Cole <i>et al.</i> , 2004
Arthropoda (Crustacea)	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	Inhibidor de quimo-tripsina	Kazal	Proteína de masa molecular de 22,7 kDa. Inhibidor activo frente a quimotripsina y subtilisina; pero no inhibe tripsina, elastasa o trombina.	Johansson <i>et al.</i> , 1994
	<i>Litopenaeus vannamei</i>		Kazal	Identificado un gen que codifica cuatro dominios de tipo Kazal. Inhibidor hipotético.	Jiménez-Vega y Vargas-Albores, 2005
	<i>Penaeus monodon</i>	SPIPM2	Kazal	Identificados cuatro genes que codifican de cuatro y cinco dominios de tipo Kazal. SPIPM2 recombinante presentó actividad inhibitora de subtilisina A y elastasa.	Jarasrasmee <i>et al.</i> , 2005; Somprasong <i>et al.</i> , 2006
	<i>Tachypleus tridentatus</i>	Inhibidor	Kunitz-BPTI	Proteína de 61 residuos de aminoácidos. Inhibe tripsina, quimotripsina, elastasa, plasmina y calicreína plasmática. No inhibe la enzima de la coagulación de <i>T. tridentatus</i> y otros factores de la coagulación humana.	Nakamura <i>et al.</i> , 1987
		LICI	Serpina	Glicoproteína de 40,0 kDa. Inhibe la actividad de una serino proteasa sensible a un lipopolisacárido de <i>Limulus</i> y factor C de la coagulación del mismo crustáceo. LICI inhibe trombina humana, calicreína tisular, plasmina, tripsina, activador del plasminógeno tisular, uroquinasa humana, quimotripsina elastasa y papaína.	Miura <i>et al.</i> , 1994
Mollusca	<i>Cenchritis muricatus</i>	CmPI-II	Kazal	Inhibidor no glicosilado de 5480 Da. Inhibe ENH (K_i 2,6 nM), tripsina (K_i 1,1 nM), SUBTA (K_i 30,8 nM) y EP (K_i 145,0 nM).	Gonzalez <i>et al.</i> , 2007
	<i>Argopecten irradians</i>	AISPI	Kazal	Identificado un gen que codifica 6 dominios Kazal en tándem. Inhibidor hipotético.	Zhuo <i>et al.</i> , 2006

estructura-función de proteasas-inhibidores, así como su aplicación en procesos biotecnológicos (Gil *et al.*, 2011). También se han identificado otros inhibidores de PS a partir de esta misma anémona (Huerta *et al.*, 1998).

Inhibidores pertenecientes a la familia Kazal también han sido aislados de celenterados, como es el caso del inhibidor de elastasa (AEI) presente en la anémona *A. sulcata*. Este, con una masa

molecular de 5,0 kDa, presenta actividad inhibitora frente a la EP y la ENH, respectivamente (Kolkenbrock y Tschesche, 1987). Es un inhibidor con un dominio funcional de tipo Kazal, a diferencia de los inhibidores pertenecientes a la familia Kunitz-BPTI inicialmente descritos en esta especie. El AEI es el primer inhibidor no clásico de la familia Kazal, descrito debido a la diferencia en la posición de las cisteínas I y V en la secuencia

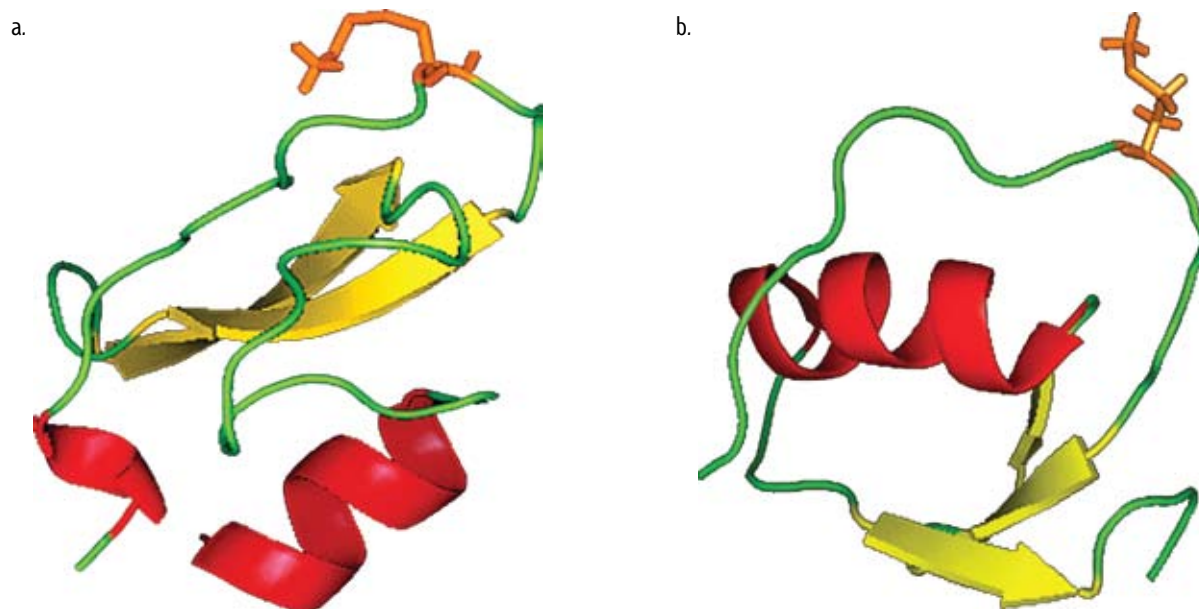


Figura 2. Estructura 3D de inhibidores de invertebrados marinos: a) ShPI-1, inhibidor de la familia Kunitz-BPTI aislado de la anémona marina *Stichodactyla helianthus* (PDB: 1SHP) (Antuch *et al.*, 1993); se representa la cadena lateral del residuo de arginina (naranja), sitio reactivo (P1) localizado en el lazo canónico del inhibidor; b) AEI, inhibidor de elastasa de tipo Kazal de la anémona marina *Anemonia sulcata* (PDB: 1Y1B) (Hemmi *et al.*, 2005). Se representa la cadena lateral del residuo de metionina (naranja), el sitio P1 localizado en el lazo canónico. Representación de Richardson: estructuras secundarias: hojas β (flechas amarillas), hélices α (cintas rojas), regiones al azar o lazos (líneas verdes).

aminoacídica, con respecto al inhibidor típico y clásico de la familia (Tschesche *et al.*, 1987). La presencia de inhibidores tipo Kunitz (como Kazal) en cnidarios demuestra que los genes que codifican estas proteínas son muy antiguos, ya que la existencia de estos organismos se remonta a más de 450 millones de años. La estructura 3D del AEI sintético fue resuelta mediante RMN (fig. 2b) y es la primera estructura resuelta de un inhibidor de la familia Kazal aislado de un invertebrado marino (Hemmi *et al.*, 2005).

Solamente ha sido identificada una serpina en cnidarios a partir de la secuencia deducida del ADNc de la medusa *Cyanea capillata* (Cole *et al.*, 2004), y ello sugiere que las serpinas evolucionaron hace más de 1 000 millones de años. La jellipina recombinante demostró que es un inhibidor de proteasas humanas como quimotripsina, con una k_{ass} de $6 \times 10^{-3} \text{ mol}^{-1}/\text{Ls}^{-1}$, además de catepsina G y elastasa.

Otros dos inhibidores de tipo Kunitz-BPTI (AXPI-I y AXPI-II) se aislaron de la anémona *Anthopleura aff. xantogrammica* (Minagawa *et al.*, 1996) (tabla 1), con diferencias en su especificidad frente a las PS

ensayadas. También, a partir de un extracto de la gorgonia tropical *Melithea cf. stormii*, La Barre *et al.* (1996) aislaron y purificaron una proteína de 21 kDa con actividad inhibidora de EP. La secuencia del extremo amino de la proteína revela la presencia de, al menos, un dominio tipo Kazal no clásico. A su vez, la presencia de inhibidores de PS con masas moleculares cercanas a 6,0 kDa fue detectada en las anémonas *Radianthus macrodactylus* (Zykova *et al.*, 1985; Monastyrnaya *et al.*, 2002), *Rhodactis rhodostoma* y *Radianthus koseirensis* (Mebs *et al.*, 1983).

Diferentes hipótesis se han sugerido sobre el posible papel de los inhibidores de proteasas en estos cnidarios. Generalmente, las proteasas ensayadas pertenecen a vertebrados, organismos muy lejanos evolutivamente, por lo que no deben ser las proteasas dianas en su medio natural. El papel preponderante se ha atribuido a la regulación de la proteólisis intracelular, ya que se han identificado SP de la familia S1 en la medusa *Aurelia aurita* (Rojas y Doolittle, 2002). Por otra parte, también a los inhibidores se les atribuye un papel de control de la proteólisis de proteasas exógenas

provenientes de animales predadores, agentes infecciosos y/o simbióticos. Además, la similitud de los inhibidores de la familia Kunitz-BPTI con toxinas bloqueadoras de canales de potasio presentes en los cnidarios permite plantear que estos inhibidores podrían contribuir, al menos parcialmente, a la parálisis de animales predadores como cangrejos y peces (Minagawa *et al.*, 1997).

Phyllum Arthropoda: Crustacea

A partir de bibliotecas de ADNc de numerosos crustáceos se han deducido secuencias aminoácidas que presentan varios dominios Kazal en tándem, como en la langosta *Pacifastacus leniusculus* (Johansson *et al.*, 1994), y en los camarones *Litopenaeus vannamei* (Jiménez-Vega y Vargas-Albores, 2005) y *Penaeus monodon* (Jarasrassamee *et al.*, 2005). El ADNc aislado de células sanguíneas de la langosta *P. leniusculus* codifica un péptido señal y una proteína de 209 aminoácidos, compuesta de cuatro dominios Kazal no clásicos. La proteína es capaz de inhibir quimotripsina y subtilisina A de *Bacillus licheniformis* (SUBTA); pero no tripsina, elastasa o trombina (Johansson *et al.*, 1994). En el camarón *P. monodon* se identificaron cuatro genes que codifican proteínas con dominios en tándem de tipo Kazal, denominados SPIPm1, SPIPm2, SPIPm3 y SPIPm4. SPIPm2 se clonó y expresó en la bacteria *Escherichia coli* y el inhibidor compuesto de cinco dominios es capaz de inhibir EP y SUBTA (K_i $5,2 \times 10^{-10}$ y $3,2 \times 10^{-9}$ mol/L, respectivamente), pero inhibe débilmente tripsina y no inhibe quimotripsina (Jarasrassamee *et al.*, 2005; Somprasong *et al.*, 2006).

La presencia únicamente en las células sanguíneas de estos inhibidores de tipo Kazal en los crustáceos ha postulado su función en la defensa, principalmente, frente a microorganismos, debido a la inhibición de la SUBTA (Johansson *et al.*, 1994; Jarasrassamee *et al.*, 2005). Las subtilisinas son PS de la familia S8 que provienen, generalmente, de microorganismos patógenos, y que están implicadas en la invasión del microorganismo al hospedero.

Por otra parte, a partir del cangrejo *Tachypleus tridentatus* se han aislado dos inhibidores de proteasas pertenecientes a familias diferentes, de Kunitz-BPTI y de las serpinas (Nakamura *et al.*, 1987; Miura *et al.*, 1994). Los inhibidores presentan especificidades diferentes frente a PS (tabla 1).

Phyllum Mollusca

La actividad inhibidora de PS ha sido detectada en diferentes moluscos marinos; sin embargo, de manera general, su naturaleza química no se ha identificado. Se detectó una proteína con características similares a la α_2 -macroglobulina del pulpo *Octopus vulgaris* (Thorgersen *et al.*, 1992). Otro inhibidor de naturaleza proteica ha sido aislado del hepatopáncreas del calamar *Todarodes pacificus* (Kishimura *et al.*, 2001), que se comporta de manera estable en medio ácido y al calor, y es activo frente a proteasas semejantes a tripsina presentes en la estrella de mar *Asterias amurensis* y el saurio *Cololabis saira* (Kishimura *et al.*, 2001). También la presencia de un inhibidor activo frente a calicreína plasmática fue descrita en extractos crudos de la liebre marina *Aplysia dactylomela* (González *et al.*, 2004).

La presencia de inhibidores de PS en el extracto acuoso del molusco intermareal *Cenchritis muricatus* fue descrita por González *et al.* (2007a, 2007b). El inhibidor mayoritario, CmPI-II, polipéptido no glicosilado de 5 480 Da, es una proteína de simple cadena perteneciente a la familia de inhibidores Kazal no clásicos, capaz de inhibir fuertemente no solo tripsina, sino también ENH con valores de K_i en la región nanomolar, así como EP y SUBTA, con valores de K_i mayores. Esta amplia especificidad es inusual en inhibidores Kazal de invertebrados terrestres y vertebrados. Este es el primer inhibidor de proteasas cuya secuencia aminoácida ha sido determinada en un molusco marino.

Se ha identificado un gen que codifica una proteína de seis dominios Kazal en el ostión *Argopecten irradians* (Zhuo *et al.*, 2006). El gen es transcrito únicamente después que el músculo del animal ha sufrido daño o por el desafío de una bacteria, lo que sugiere un papel del hipotético inhibidor en la cicatrización de las heridas y en la defensa del ostión contra los microorganismos.

Conclusiones

Los invertebrados marinos son una fuente natural importante de inhibidores de proteasas proteicas, especialmente de PS, entre los que se destacan las *phylla* Cnidaria, Arthropoda y Mollusca. Los inhibidores canónicos pertenecientes a la familia

Kunitz-BPTI y Kazal son los más abundantes, y se han encontrado en los tres *phylla*. En los cnidarios se han detectado con mayor abundancia los inhibidores de tipo Kunitz-BPTI; en los crustáceos, los inhibidores de tipo Kazal; aunque también en ambos *phylla* se han encontrado las serpinas. En los moluscos marinos únicamente han sido identificados inhibidores de tipo Kazal. A pesar de que estas moléculas se identificaron por primera vez hace casi cincuenta años, poco se conoce sobre el papel fisiológico dentro de estos organismos. Todos estos hechos indican que los invertebrados marinos presentan inhibidores de proteasas con características peculiares y con potencialidades para el desarrollo de nuevas sustancias con múltiples aplicaciones, especialmente en la biomedicina y la biotecnología.

LITERATURA CITADA

- ABBENANTE, G. y D.P. FAIRLIE (2005): «Protease inhibitors in the clinic», *Medical Chemistry*, vol. 1, pp. 71-104.
- ÁLVAREZ, C.; A. GARATEIX, M. TEJUCA, A. ANEIROs et al. (2003): «Overview of marine toxin research in Cuba», *Comments in Toxicology*, vol. 9, pp. 117-137.
- ANDERLUH, G y P. MACEK (2002): «Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria)», *Toxicon*, vol. 40, pp. 111-124.
- ANTUCH, W. ; K.D. BERNDT, M.A. CHÁVEZ, J. DELFÍN et al. (1993): «The NMR solution structure of a Kunitz-type proteinase inhibitor from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*», *European Journal of Biochemistry*, vol. 212, pp. 675-684.
- BODE, W. y R. HUBER (1992): «Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases», *European Journal of Biochemistry*, vol. 204, pp. 433-451.
- COLE, E.B.; D. MILLER, D. ROMETO, R.M. GREENBERG et al. (2004): «Identification and activity of a lower eukaryotic serine proteinase inhibitor (serpin) from *Cyanea capillata* analysis of a jellyfish serpin, jellypin», *Biochemistry*, vol. 43, pp. 11750-11759.
- DELFÍN, J.; Y. GONZÁLEZ, J. DÍAZ y M. CHÁVEZ (1994): «Proteinase inhibitor from *Stichodactyla helianthus* purification, characterization and immobilization», *Archives Medical Research*, vol. 25, pp. 199-204.
- DELFÍN, J.; V. MORERA, Y. GONZÁLEZ, J. DÍAZ et al. (1996): «Purification, characterization and immobilization of proteinase inhibitors from *Stichodactyla helianthus*», *Toxicon*, vol. 34, pp. 1367-1376.
- ELLIOTT P.R.; J.P. ABRAHAMs y D.A. LOMAS (1998): «Wild-type alpha 1-antitrypsin is in the canonical inhibitory conformation», *Journal of Molecular Biology*, vol. 275, pp. 419-425.
- GETTINS, P.G. (2002): «Serpins: structure, mechanism, and function», *Chemistry Review*, vol. 102, pp. 4751-4804.
- GIL, D. et al. (2011): «Recombinant expression of ShPI-1A, a non-specific BPTI-Kunitz-type inhibitor, and its protection effect on proteolytic degradation of recombinant human miniprotein expressed in *Pichia pastoris*», *FEMS Yeast Research*, vol. 11, pp. 575-586.
- GONZÁLEZ, Y. ; M.S. ARAUJO, M.L.V. OLIVA, C.A.M SAMPAIO et al. (2004): «Purification and preliminary characterization of a plasma kallikrein inhibitor isolated from sea hares *Aplysia dactylomela* Rang, 1828», *Toxicon*, vol. 43, pp. 219-223.
- GONZÁLEZ, Y. et al. (2007): «Characterization and comparative 3D modelling of CmPI-II, a novel "nonclassical" Kazal-type inhibitor from the marine snail *Cenchritis muricatus* (Mollusca)», *Biological Chemistry*, vol. 388, pp. 1183-1194.
- GONZÁLEZ, Y. ; T. PONS, J. GIL, V. BESADA et al. (2007): «Purification and preliminary characterization of human neutrophil elastase inhibitors isolated from the marine snail *Cenchritis muricatus* (Mollusca)», *Compounds of Biochemical Physiology A*, vol. 146, pp. 506-513.
- HEMMI, H. ; T. YOSHIDA, T. KUMAZAKI, N. NEMOTO et al. (2002): «Solution structure of ascidian trypsin inhibitor determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy», *Biochemistry*, vol. 41, pp. 10657-10664.
- HEMMI, H.; T. KUMAZAKI, K. YOSHIKAWA-KUMAGAYE, Y. NISHIUCHI et al. (2005): «Structural and functional study of an anemone elastase inhibitor, a "nonclassical" Kazal-type inhibitor from *Anemonia sulcata*», *Biochemistry*, vol. 44, pp. 9626-9636.
- HUERTA, F. et al. (1998): «Characterization and 3D model of a new proteinase inhibitor isolated from *Stichodactyla helianthus*», *Biotechnología Aplicada*, vol. 15, pp. 108-110.
- JARASASSAMEE, B.; P. SUPUNGUL, S. PANYIM, S. KLINBUNGA et al. (2005): «Recombinant expression and characterization of five-domain Kazal-type

- serine proteinase inhibitor of Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*)», *Marine Biotechnology*, vol. 7, pp. 46-52.
- JIMÉNEZ-VEGA, F. y F. VARGAS-ALBORES (2005): «A four-Kazal domain protein in *Litopenaeus vannamei* hemocytes», *Developmental and Comparative Immunology*, vol. 29, pp. 385-391.
- JOHANSSON, M.W.; P. KEYSER y K. SÖDERHÄLL (1994): «Purification and cDNA cloning of a four-domain Kazal proteinase inhibitor from crayfish blood cells», *European Journal of Biochemistry*, vol. 223, pp. 389-394.
- JONES, S. y J.M. THORNTON (1996): «Principles of protein-protein interactions derived from structural studies», *Procedures of National Academy of Science*, vol. 93, pp. 13-20.
- KISHIMURA, H.; H. SAEKI y K. HAYASHI (2001): «Isolation and characteristics of trypsin inhibitor from the hepatopancreas of a squid (*Todarodes pacificus*)», *Compounds of Biochemical Physiology B*, vol. 130, pp. 117-123.
- KOLKENBROCK, H. y H. TSCHESCHE (1987): «A new inhibitor of elastase from the sea anemone (*Anemonia sulcata*)», *Biological Chemistry Hoppe Zeyler*, vol. 368, pp. 93-99.
- KROWARSCH, D.; T. CIERPICKI, F. JELEN y J. OTLEWSKI (2003): «Canonical protein inhibitors of serine proteases», *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 60, pp. 2427-2444.
- KROWARSCH, D.; M. ZAKRZEWSKA, A.O. SMALAS y J. OTLEWSKI (2005): «Structure-function relationships in serine protease-bovine pancreatic trypsin inhibitor interaction», *Protein Peptide Letters*, vol. 12, pp. 32-36.
- KUMAZAKI, T.; N. HOSHIBA, H. YOKOSAWA y S-I. ISHII (1990): «Primary structure of ascidian trypsin inhibitors in the hemolymph of a solitary ascidian *Halocynthia roretzi*», *Journal of Biochemistry*, vol. 107, pp. 409-413.
- LA BARRE, S.; A. LONGEON, M. BARTHELEMY, M. GUYOT et al. (1996): «Characterization of a novel elastase inhibitor from a fan coral», *C. R. Academic Science Paris*, vol. 319, pp. 365-370.
- LASKOWSKI, M.JR. e I. KATO (1980): «Protein inhibitors of proteinases», *Annual Review of Biochemistry*, vol. 49, pp. 593-626.
- LASKOWSKI, M.JR. y M.A. QASIM (2000): «What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes?», *Biochemistry and Biophysics Acta*, vol. 1477, pp. 324-337.
- LEUNG, D.; G. ABBENANTE y D.P. FAIRLIE (2000): «Protease inhibitors, current status and future prospects», *Journal of Medical Chemistry*, vol. 43, pp. 305-341.
- LOWE, C.R.; A.R. LOWE y G. GUPTA (2001): «New developments in affinity chromatography with potential application in the production of biopharmaceuticals», *Journal of Biochemistry and Biophysics Methods*, vol. 49, pp. 561-574.
- MEBS, D.; M. LIEBRICH, A. REUL y Y. SAMEJIMA (1983): «Hemolysins and proteinase inhibitors from sea anemones of the gulf of Aquaba», *Toxicon*, vol. 21, pp. 257-264.
- MINAGAWA, S.; M. ISHIDA, K. SHIMAKURA, Y. NAGASHIMA et al. (1997): «Isolation and amino acid sequences of two Kunitz-type protease inhibitors from the sea anemone *Anthopleura aff. Xanthogrammica*», *Compounds of Biochemical Physiology*, vol. 118B, pp. 381-386.
- MIURA, Y.; S. KAWABATA y S.J. IWANAGA (1994): «A *Limulus* intracellular coagulation inhibitor with characteristics of the serpin superfamily. Purification, characterization, and cDNA cloning», *Biology and Chemistry*, vol. 269, pp. 542-547.
- MONASTYRNAYA, M.M.; T.A. ZKOVA, O.V. APALIKOVA, T.V. SHWETS et al. (2002): «Biologically active polypeptides from the tropical sea anemone *Radianthus macrodactylus*», *Toxicon*, vol. 40, pp. 1197-1217.
- NAKAMURA, T.; T. HIRAI, F. TOKUNAGA, S. KAWABATA et al. (1987): «Purification and amino acid sequence of Kunitz-type protease inhibitor found in the hemocytes of horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*)», *Biochemistry (Tokyo)*, vol. 101, pp. 1297-1306.
- ØDUM, L.; J.R. BUNDGAARD y A.H. JOHNSEN (1999): «A Kazal-type trypsin inhibitor from the protochordate *Ciona intestinalis*», *European Journal of Biochemistry*, vol. 259, pp. 872-876.
- OTLEWSKI, J.; F. JELEN, M. ZAKRZEWSKA y A. OLEKSY (2005): «The many faces of protease-protein inhibitor interaction», *EMBO Journal*, vol. 24, pp. 1303-1310.
- PERONA, J.J. y C.S. CRAIK (1995): «Structural basis of substrate specificity in the serine proteases», *Protein Science*, vol. 4, pp. 337-360.
- RAWLINGS, N.D.; D.P. TOLLE y A.J. BARRET (2004): «Evolutionary families of peptidase inhibitors», *Biochemistry Journal*, vol. 378, pp. 705-716.

- ROJAS, A. y R.F. DOOLITTLE (2002): «The occurrence of type S1A serine proteases in sponge and jellyfish», *Journal Molecular Evolution*, vol. 55, pp. 790-794.
- SCHWEITZ, H.; T. BRUNH, E. GUILLEMARE y D. MOINIER (1995): «Kalicludines and kaliseptine. Two different classes of sea anemone toxins for voltagesensitive K⁺ channels», *Journal of Biology and Chemistry*, vol. 270, pp. 25121-25126.
- SILVERMAN, G.A.; P.I. BIRD, R.W. CARRELL, F.C. CHURCH et al. (2001): «The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature», *Journal of Biology and Chemistry*, vol. 276, pp. 33293-33296.
- SOKOTUN, I.N.; A.P. IL'INA, M.M. MONASTYRNAYA, E.V. LEYCHENKO et al. (2007): «Proteinase inhibitors from the tropical sea anemone *Radianthus macrodactylus*: isolation and characteristic», *Biochemistry (Moscow)*, vol. 72, pp. 301-306.
- SOMPRAKONG, N.; V. RIMPHANITCHAYAKIT y A. TASSANAKAJON (2006): «A five-domain Kazal-type serine proteinase inhibitor from black tiger shrimp *Penaeus monodon* and its inhibitory activities», *Developmental Comparative Immunology*, vol. 30, pp. 998-1008.
- STEIN, P.E. y R.W. CARRELL (1995): «What do dysfunctional serpins tell us about molecular mobility and disease?», *Nature Structure Biology*, vol. 2, pp. 96-113.
- STUBBS, M.T.; R. HUBER y W. BODE (1995): «Crystal structures of factor Xa specific inhibitors in complex with trypsin structural grounds for inhibition of factor Xa and selectivity against thrombin», *FEBS Letters*, vol. 375, pp. 103-107.
- TEJUCA, M.; M.D. SERRA, M. FERRARAS, M.E. LANIO et al. (1996): «Mechanism of membrane permeabilisation by sticholysin I, a cytolyisin isolated from the venom of the sea anemone *Stichodactyla helianthus*», *Biochemistry*, vol. 35, pp. 14937-14957.
- THOGERSEN, I.B.; G. SALVESEN, F.H. BRUCATO, S.V. PIZZO et al. (1992): «Purification and characterization of an alpha-macroglobulin proteinase inhibitor from the mollusc *Octopus vulgaris*», *Biochemistry Journal*, vol. 285, pp. 521-527.
- TSCHESCHE, H.; H. KOLKENBROCK y W. BODE (1987): «The covalent structure of the elastase inhibitor from *Anemonia sulcata*-a "non-classical" Kazal-type protein», *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, vol. 368, pp. 1297-1304.
- VAN DE LOCHT, A.; D. LAMBA, M. BAUER, R. HUBER et al. (1995): «Two heads are better than one crystal structure of the insect derived double domain Kazal inhibitor rhodniin in complex with thrombin», *EMBO Journal*, vol. 14, pp. 5149-5157.
- VAN DE LOCHT, A.; M.T. STUBBS, W. BODE, T. FRIEDRICH et al. (1996): «The ornithodorin-thrombin crystal structure, a key to the TAP enigma?», *EMBO Journal*, vol. 15, pp. 6011-6017.
- WUNDERER, G.; L. BÉRESS, W. MACHLEID y H. FRITZ (1976): «Broad specificity inhibitors from sea anemones», *Methods Enzymology*, vol. 45, pp. 881-888.
- YOKOSAWA, H.; R. ODAJIMA y S. ISHII (1985): «Trypsin inhibitor in the hemolymph of a solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. Purification and characterization», *Journal of Biochemistry*, vol. 97, pp. 1621-1630.
- ZHUO, L.; L. SONG, Y. CHANG, W. XU et al. (2006): «Molecular cloning, characterization and expression of a novel serine proteinase inhibitor gene in bay scallops (*Argopecten irradians*, Lamarck 1819)», *Fish Shellfish Immunology*, vol. 20, pp. 320-331.
- ZYKOVA, T.A.; M.M. MONASTYRNAIA, O.V. APALIKOVA y T.V. SHVETS (1998): «Low-molecular cytolyisins and trypsin inhibitors from sea anemone *Radianthus macrodactylus*. Isolation and partial characterization», *Bioorganic Khimie*, vol. 24, pp. 509-516.

●●●