

Obtención de una mezcla de proteínas con actividad antitumoral a partir de una bacteria marina

Vivian Almazán, Roberto Núñez, Mario Villaverde y Rita M. Pérez.*

Departamento de Microbiología Aplicada, Centro de Bioproductos Marinos, Loma y 37, Plaza de la Revolución. *Instituto de Oncología y Radiobiología, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 8 de enero de 2004. Aceptado: 15 de diciembre de 2004.

Palabras clave: bacterias marinas, *Micrococcus varians*, antitumoral, purificación, actividad biológica.
Key words: marine bacteria, *Micrococcus varians*, antitumoral, purification, biological activity.

RESUMEN. Las sustancias de origen marino han sido utilizadas por el hombre desde hace millones de años, sin embargo, su aislamiento, caracterización química y farmacológica, así como, el interés clínico por ellas han sido estudiados hace tan solo cinco décadas. Cuba ha incrementado gradualmente las investigaciones relacionadas con la búsqueda de compuestos con actividad antitumoral. En el Departamento de Microbiología Aplicada del Centro de Bioproductos Marinos se aisló una cepa de origen marino con actividad antitumoral con amplias posibilidades para la preservación de la salud humana. El objetivo del presente trabajo fue determinar las condiciones de cultivo de *Micrococcus varians* a nivel de fermentador, separar y purificar la mezcla de compuestos proteicos producidos y evaluar su posible actividad antitumoral frente a diferentes tumores malignos. La purificación de la mezcla de compuestos con actividad antitumoral producida por dicha cepa, se llevó a cabo por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 70 % y diálisis. El criterio de pureza se corroboró por HPLC, cromatografía de intercambio aniónico y electroforesis en gel de poliacrilamida (8 a 25 %). La actividad antitumoral de la mezcla de compuestos arrojó un índice de sobrevivencia de un 77,8 % frente a sarcoma 180 y un 37,3 % frente a sarcoma 37.

ABSTRACT. Substances of marine origin have been used by man for millions of years. However, their isolation, chemical and pharmacological characterization, as well as the clinical interest in them, has been studied for only five decades. Cuba has gradually increased the researches related to the search for compounds with antitumoral activity. A strain of marine origin with antitumoral activity and wide possibilities for human health preservation was isolated at the Applied Microbiological Department of Marine Bioproduct Center. The objective of the present work was to determine the culture conditions of *Micrococcus varians* at fermentator scale to separate and to purify the mixture of compounds produced and to evaluate its possible antitumoral activity against different wicked tumors. The purification of the mixture of compounds with antitumoral activity produced by this strain was carried out by precipitation with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 70 % and dialysis. The purity approach was corroborated by HPLC, anionic exchange chromatography and electrophoresis in polyacrylamide (8-25 %). The antitumoral activity of the mixture of compounds showed a survival index of 77,8 % against sarcoma 180 and a 37,3 % against sarcoma 37.

INTRODUCCION

Los organismos marinos abarcan más de medio millón de especies, las cuales debido al ambiente inusual donde habitan, en comparación con los organismos terrestres, producen sustancias metabólicas

cuyas estructuras químicas no tienen precedentes.¹ En los últimos años, se ha incrementado el número de trabajos sobre productos naturales marinos con actividad biológica, en particular, se ha multiplicado el esfuerzo por detectar sustancias

antitumorales y muchos compuestos con actividad de esta naturaleza se han aislado de algas, esponjas, tunicados, microorganismos marinos, entre otros.^{2,3}

Especial importancia en la investigación sobre moléculas con propiedades antitumorales tienen los microorganismos aislados de zonas contaminadas.⁴ La mayoría de dichas sustancias han sido obtenidas de especies terrestres, sin embargo, por las características del ambiente marino, los microorganismos que en él habitan pueden ser una variante atractiva para la obtención de nuevos bioactivos.⁵

El objetivo del presente trabajo fue determinar las condiciones de cultivo de *Micrococcus varians* a nivel del fermentador, separar y purificar la mezcla de compuestos proteicos producida y evaluar su posible actividad antitumoral frente a tumores malignos.

MATERIALES Y METODOS

Microorganismo empleado

El trabajo se llevó a cabo con la cepa CBM-224, aislada de los sedimentos de la Bahía de La Habana e identificada como *Micrococcus varians*.

Medios de cultivo

La cepa CBM-224 se conserva en plano inclinado cubierto de aceite mineral estéril, cuyo medio tiene incorporado agar (Tabla 1).

Determinaciones analíticas

Todas las determinaciones se realizaron con el caldo libre de células (12 000g, durante 10 min).

Densidad óptica. Se determinó a una longitud de onda de 670 nm en un Spekol 11. Como blanco de referencia fue utilizada el agua destilada.

Azúcares reductores. Se determinó el consumo de glucosa por el método del ácido 3,5-dinitrosalisílico.⁶

Proteínas solubles. Para la determinación de la concentración de proteínas se empleó el método de Bradford. Se utilizó como proteína patrón una disolución de albúmina de suero bovino (BSA).⁷

Tratamiento estadístico de los resultados

Para el análisis de los resultados se utilizó el análisis de clasificación simple⁸ y el método de Duncan.⁹

PARTE EXPERIMENTAL

Condiciones de cultivo

Inóculo

Para la inoculación del medio de cultivo, se partió de una cuña con 24 h de crecimiento a la que se adicionaron asépticamente 5 mL de una disolución de NaCl $9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Con la suspensión de células obtenida se inocularon 300 mL de medio de cultivo estéril y se incubaron en zarranda orbital (INFORS) durante 24 h.

Fermentación en biorreactor de 3 L

La fermentación se llevó a cabo en un fermentador de 3 L (INFORS) durante 60 h a 29°C , dos vvm y $600 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$. Se tomaron muestras cada 2 h y se determinó la densidad óptica, los azúcares reductores y las proteínas solubles.

Purificación de la mezcla de compuestos proteicos

El caldo final de la fermentación se centrifugó a $7\,000\text{g}$ durante 30 min

a 4°C en una centrifuga refrigerada BECKMAN J2-HS y el caldo libre de células se precipitó con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 70 %. El precipitado obtenido de la centrifugación, disuelto en agua se dializó previo a la purificación, contra agua destilada durante 24 h, con cambios periódicos cada 6 h y posteriormente, contra disolución estabilizadora de equilibrio empleada en la corrida cromatográfica, tris-HCl $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.

La separación de los compuestos activos se llevó a cabo mediante cromatografía en columna de baja presión ($15 \text{ cm} \times 3 \text{ cm}$), utilizando el intercambiador aniónico DEAE-celulosa, como soporte cromatográfico. La fijación de la muestra se realizó con la disolución estabilizadora de equilibrio hasta obtener una absorbancia a 280 nm de 0,09 en las condiciones de pH y fuerza iónica establecidas. Se eluyó con un gradiente salino lineal de Tris-HCl $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ con NaCl desde 0 hasta $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Se colectaron fracciones de 3 mL, para un volumen total de 400 mL, con un flujo de $36 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$. A todas las fracciones se les determinó la densidad óptica a 280 nm.

Una alícuota de la muestra se aplicó a un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase inversa, con una columna de TSK ODS-120T ($7,8 \text{ mm} \times 300 \text{ mm}$). Se utilizó como fase móvil: acetonitrilo-TFA (0,1 %) con un flujo de $500 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, siguiendo un método simple durante 20 min.

Se empleó el método electroforético en geles de poliacrilamida (8 a 25 %) con tinción de plata en un equipo Fast System (Pharmacia) para comprobar la pureza del extracto obtenido por cromatografía de intercambio iónico.

Evaluación de la posible actividad antitumoral de la mezcla de compuestos proteicos

El producto dializado se concentró con polietilenglicol 6000, se centrifugó a $7\,000\text{g}$ durante 30 min y se conservó a 4°C . El precipitado obtenido se liofilizó y a partir de este extracto semipuro, se prepararon diferentes dosis en disolución salina y se administraron intraperitonealmente en animales de experimentación NMRI con tumores transplantables de ratón sarcoma 180 y 37 ($2 \cdot 10^6$ células/animal; vía subcutánea). Las dosis empleadas fueron de 45 y $22,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ para los animales inoculados con sarcoma 180 y de $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ para los inoculados con el sarcoma 37. Los animales del control negativo fueron tratados con una dosis de 0,2 mL de disolución salina fisiológica.

La evaluación del posible efecto antitumoral se realizó empleando el índice de aumento de la sobrevivencia.

RESULTADOS Y DISCUSION

Fermentación en biorreactor de 3 L de *Micrococcus varians* cepa CBM-224

Se obtuvo el perfil de fermentación de *Micrococcus varians* cepa CBM-224 en un fermentador de 2,5 L de volumen efectivo (Fig. 1) en el que se pudo observar el comportamiento de las proteínas solubles, los azúcares reductores y el crecimiento, expresado como densidad óptica.

Los valores de densidad óptica y las concentraciones de proteína, describen las diferentes fases de crecimiento de la cepa CBM-224 productora de la mezcla de compuestos proteicos. Desde las 7 hasta las 14 h, se aprecia un crecimiento exponencial con una $\mu = (0,1148 \pm 0,021) \text{ h}^{-1}$; a las 12 h, se observa un máximo en la concentración de proteína ($36 \pm 2,1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$). A partir de las 19 h, se alcanza la fase estacionaria en la que se obtiene la mayor concentración de proteína ($48 \pm 3,3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de todo el proceso).

El consumo de glucosa ocurre de forma rápida hasta mediados de la fase estacionaria (Fig. 1), momento en que se alcanza la máxima producción de proteína extracelular y se mantiene prácticamente constante hasta el final de la fermentación, momento a partir del cual disminuye tanto la concentración de glucosa, como de proteína y la densidad óptica.

Si se tiene en cuenta la relación existente entre el consumo de sus-

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo empleados.

Medio de conservación	Cantidad	Medio de fermentación	Cantidad
Peptona	5 g	Glucosa	10 g
Extracto de carne	3 g	Extracto de carne	5 g
Extracto de levadura	5 g	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,5 g
Agua destilada	250 mL	KH_2PO_4	0,5 g
Agua de mar	750 mL	MgSO_4	0,5 g
		NaCl	1 g
		K_2HPO_4	1 g
		KCl	0,5 g
		Extracto de levadura	1 g
		Agua destilada	1 000 mL

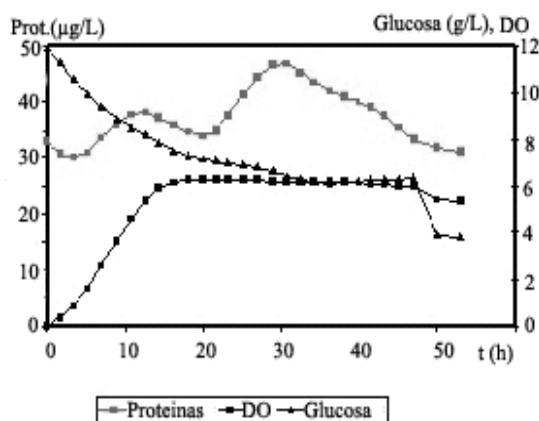


Fig. 1. Perfil de fermentación de *Micrococcus varians* cepa CBM-224, en un fermentador de 3 L con 2,5 L de volumen efectivo.

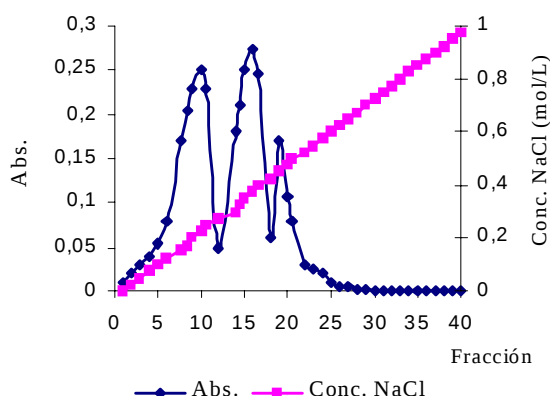


Fig. 2. Perfil cromatográfico de separación en DEAE-celulosa. Dimensiones de la columna: 3 cmX15 cm. Elución: gradiente salino lineal con 400 mL de disolución estabilizadora Tris-HCl 0,1 mol · L⁻¹ a pH 7 con NaCl de 0 a 1 mol · L⁻¹. Fracciones: 3 mL. Muestra aplicada: 7 mg de proteína. Flujo: 36 mL · h⁻¹.

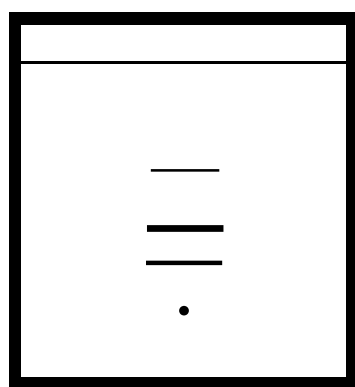


Diagrama de la foto original



Foto de la electroforesis

Fig. 3. PhastGel. Gradiente 8 a 25 % PAA. Tinción con plata. Phast System.

trato, el crecimiento y la producción, se puede clasificar esta fermentación como parcialmente asociada al crecimiento según la clasificación de Gaden.¹⁰

Por otra parte, se puede apreciar que los máximos correspondientes a la producción de proteínas están desfasados en el tiempo. Esto pudie-

ra estar dado por cambios estructurales que ocurren en las proteínas con actividad antitumoral, debido al metabolismo del microorganismo, lo cual puede relacionarse con el uso de estas proteínas para realizar sus funciones fisiológicas, por agotamiento de la fuente de nitrógeno orgánico.

Esta fermentación en la que aparentemente ocurre la acumulación de un intermediario en las primeras 12 h y luego da lugar a otro compuesto de igual naturaleza, puede asumirse como una reacción consecutiva según la clasificación de Deindoerfer,¹¹ en la que ocurre una bioconversión de una molécula de proteína en otra.

El perfil correspondiente a la concentración de proteínas excretadas al medio, presenta tres máximos, probablemente debidos a la secreción de tres proteínas con características diferentes y degradadas secuencialmente, de forma que en cada máximo predomina una especie molecular. Las electroforesis y separaciones en HPLC realizadas a la fracción pura, confirmaron esta suposición.

Purificación de las proteínas presentes en el caldo de fermentación

Se diseñó un esquema de purificación de las proteínas presentes en el caldo de fermentación de la bacteria marina *Micrococcus varians* CBM-224, mediante la utilización de una precipitación salina con (NH₄)₂SO₄ 70 %, diálisis y cromatografía de intercambio iónico (CII) en DEAE-celulosa. Por último, se utilizaron como criterios de pureza, la separación por HPLC en fase reversa y la electroforesis en gel de poliacrilamida.

Se observaron tres máximos de absorción a 280 nm, lo que indicó la presencia de tres compuestos proteicos que mantenían su actividad biológica (Fig. 2).

La electroforesis en geles de poliacrilamida mostró tres bandas de proteína (Fig. 3), lo que corroboró la pureza de los compuestos proteicos purificados por columna de intercambio iónico.

En la columna de HPLC, se aplicó una muestra correspondiente al extracto precipitado y concentrado del caldo de fermentación de la cepa en estudio y se corroboró la presencia en el medio de tres componentes proteicos, presumiblemente responsables en conjunto de la función biológica del extracto. Se apreciaron tres picos respectivos que absorben a 280 nm, donde es marcada la absorción de las proteínas (Fig. 4).

A partir de los resultados de la purificación se pudo demostrar que la actividad biológica se debe a tres compuestos de carácter proteico que de forma combinada tienen un efecto antitumoral cuyas estructuras deben variar en pequeña propor-

ción y ser consecuencia de una bio-transformación durante el proceso fermentativo de la cepa (Fig. 1).

Es necesario señalar que existen pocas referencias sobre glicoproteínas con este tipo de actividad, característica mucho más frecuente en sustancias de bajo peso molecular y algunos tipos de polisacáridos.¹²⁻¹⁴

Ensayos de actividad biológica

Los extractos procesados en el Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología se probaron en tumores sólidos y blandos (Tabla 2).

Se apreció que a dosis de 40 mg · kg⁻¹ de peso del animal sobre sarcoma 37, el índice de sobrevida es bajo, sin embargo, frente a sarcoma 180 con una dosis similar, similar se observa un aumento significativo de la supervivencia de los animales tratados (77,8 %) con respecto al control negativo. Al reducirse a la mitad la dosis del producto frente a sarcoma 180, se alcanza una sobrevida superior en 7,4 % con respecto a sarcoma 37.

El incremento de la supervivencia frente a sarcoma 180, podría atribuirse a que esta mezcla de proteínas actúa sobre el sistema inmune activando los mecanismos de defensa del propio organismo, a través del ataque de las células tumorales, lo que a su vez, produce una prolongación del período de vida de los animales.

La capacidad de esta bacteria de producir compuestos proteicos con actividad antitumoral, debe estar dada por su hábitat, debido a que la Bahía de La Habana es un ecosistema muy contaminado con diferentes compuestos tóxicos, fundamental-

Tabla 2. Índice de sobrevida en animales de experimentación, inoculados con tumores malignos y tratados con la mezcla de compuestos proteicos en diferentes dosis.

Tumor	Dosis del producto (mg/kg de peso)	Aumento de la sobrevida (%)
Sarcoma 180	22,5	44,7
	45,0	77,8
Sarcoma 37	40,0	37,3

mente con hidrocarburos, los cuales son cancerígenos. Parece ser que como vía de adaptación para su supervivencia, este microorganismo como defensa, excreta al medio estas proteínas que tienen carácter antitumoral, lo que trae consigo la preservación de la especie.

CONCLUSIONES

Se logró obtener, separar y purificar satisfactoriamente un producto formado por tres compuestos proteicos a partir de la cepa *Micrococcus varians* CBM-224 que resulta efectivo frente al tumor sólido sarcoma 180.

BIBLIOGRAFIA

1. Kitagawa O. Antitumor natural products isolated from marine organisms. **J. of Bacteriol.**, **16**, 1-8, 1989.
2. Schmitz J., Yasumoto T. The 1990 USA-Japan seminar on Biorganic Marine Chemistry. Meeting report. **J. Nat. Prod. Lloidyia**, **54**, 1469-1490, 1991.
3. Baneric R. Biotechnical potencial of natural products, **Bioelectrochem-Bioenerg.**, **27**, 105-113, 1992.
4. Austin F. Novel pharmaceutical compounds from marine bacteria, **J. Appl. Bacteriol.**, **67**, 461-470, 1989.
5. Scopes R. Protein Purification. Principles and practice, Ed. Ch.R. Canton. Springer-Verlag. N. York. 277, 1982.

6. Miller G.L. **Analytical Chem.**, 1959.
7. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of Protein-Dye Binding, **Analytical Biochemistry**, **72**, 248-254, 1976.
8. Lerch G. La experimentación en las ciencias biológicas y agrícolas. Editorial Científico Técnica, La Habana, Capítulo 16. Análisis de Varianza. Clasificación triple, 251-277, 1977.
9. Duncan, D.R. Multiple range multiple FTest, **Biometrics**, **11**, 1-42, 1965.
10. Wang D.I., Cooney C.L., Demain A.L., Dunnill P., Humphrey A.E., Lilly M.D. Fermentation and enzyme technology, New York, John Wiley, 280-400, 1979.
11. Aiba S., Humphrey A. and Millis N. **Biochemical Engineering**, Academic Press, N. York, 1973.
12. Okami Y. Marine microorganisms as a source of bioactive agents, **Biotechnology**, **12**, 67-78, 1986.
13. Govin M., et al. New cycloartanol sulfates from the alga *Tydemania expeditionis*: inhibitors of the protein tyrosine kinase 60^{v-src}, **Journal of Natural Products**, **57**, 74-78, 1994.
14. Faulkner D.J. Marine natural products, **Nat. Prod.**, **3**, 1-33, 1986.

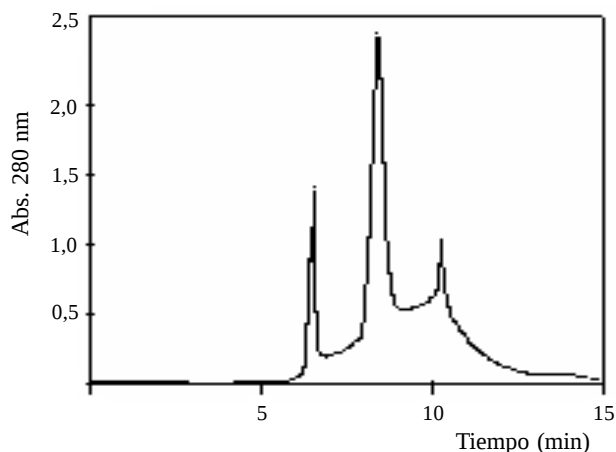


Fig. 4. Separación de las proteínas presentes en el extracto crudo de la cepa *Micrococcus varians* CBM-224. Volumen de muestra aplicada: 20 µL. Flujo: 1 000 µL/min. Detección a 280 nm. Columna: TSK gel ODS-120T. Sistema de disolvente: acetonitrilo-TFA (0,1 %). Temperatura ambiente.