

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE Y HEMOLÍTICA DE LAS ESPONJAS MARINAS *Niphates erecta* (Duchassaing y Michelotti, 1864) Y *Callyspongia vaginalis* (Lamarck, 1814)

EVALUATION OF HEMAGGLUTINATING AND HEMOLYTIC ACTIVITY OF THE MARINE SPONGES *Niphates erecta* (Duchassaing y Michelotti, 1864) AND *Callyspongia vaginalis* (Lamarck, 1814)

LILIAN LÓPEZ¹, MILAGROS FARIÑAS¹, MARÍA ELENA AMARÓ²

¹Universidad de Oriente, Núcleo Sucre, Departamento de Bioanálisis, Escuela de Ciencias. ²Departamento de Biología, Instituto Oceanográfico de Venezuela.

RESUMEN

Se evaluó la actividad hemaglutinante y hemolítica de las esponjas *Niphates erecta* y *Callyspongia vaginalis* (Porifera, Demospongiae), sobre eritrocitos humanos del sistema ABO(H). Los ejemplares fueron recolectados manualmente en la punta "El Toro", Parque Nacional Mochima, estado Sucre y sometidos a procesos de limpieza y liofilización. Del producto liofilizado de cada especie se preparó un extracto acuoso, al cual le fueron precipitadas, concentradas, separadas por exclusión molecular las proteínas activas y evaluada su pureza por la técnica electroforética (SDS-PAGE). Para la detección de aglutininas y hemolisinas se prepararon suspensiones sanguíneas al 5% de muestras de sangre humana de los tipos A, B y O, evidenciándose dichas actividades por la formación de grumos o las transformaciones físicas de viscosidad y color de cada una de las muestras, respectivamente. A los extractos acuosos se les determinó la presencia de compuestos de las familias químicas saponinas y polifenoles, arrojando resultados positivos solo para saponinas. Tanto la actividad hemaglutinante como la hemolítica fueron exhibidas por el extracto acuoso y el precipitado de proteínas de ambas esponjas, manteniéndose esta última actividad en el fraccionamiento de las mismas. Las proteínas líticas purificadas, arrojaron masas molares aproximadas de 45 kDa para *N. erecta* y de menos de 14,3 kDa para *C. vaginalis*. Estos resultados permiten inferir que la actividad hemaglutinante puede deberse a la presencia de proteínas aglutinantes y que la actividad hemolítica podría atribuirse tanto a las saponinas encontradas en los extractos acuosos, como a las proteínas líticas purificadas del precipitado de proteínas.

PALABRAS CLAVE: Demospongiae, hemolisinas, Porifera, proteínas aglutinantes, saponinas.

ABSTRACT

The hemagglutinating and hemolytic activity of the marine sponges *Niphates erecta* and *Callyspongia vaginalis* were evaluated on human erythrocytes of ABO(H) system. Specimens were collected manually in Punta "El Toro" Mochima National Park, Sucre State and subjected to cleaning and lyophilization processes. From the lyophilized product of each species an aqueous extract was prepared and the proteins were precipitated, concentrated and separated by molecular exclusion and their purity was assessed by the electrophoretic technique (SDS-PAGE). To detect agglutinins and hemolysins, 5% suspensions of human blood samples of the types A, B and O were prepared, demonstrating these activities by the formation of lumps or physical changes viscosity and color of each sample, respectively. The presence of chemical compounds saponins and polyphenols were determined in the aqueous extracts, yielding positive results only for saponins. Both the hemagglutinating and hemolytic activity were exhibited by the aqueous extracts and the precipitated proteins from both sponges, maintaining the latter activity even after the protein fractioning. The purified lytic proteins yielded an approximate molar mass of 45 kDa for *N. erecta* and less than 14,3 kDa for *C. vaginalis*. These results suggest that the hemagglutinating activity could be due to the presence of binding proteins, and that the hemolytic activity could be attributed both to the saponins found in the aqueous extracts and to the lytic proteins purified from protein precipitate.

KEY WORDS: Binding proteins, Demospongiae, hemolysins, Porifera, saponins.

INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas marinos constituyen un recurso continuo de entidades químicas con actividades biológicas. En los últimos cincuenta años, se han venido estudiando los productos naturales de origen marino, debido no solo a la enorme diversidad biológica presente en el mar, sino que además, los invertebrados marinos han mostrado ser

una fuente de compuestos con estructuras novedosas que han conducido a la obtención de nuevos fármacos, algunos de los cuales están patentados y disponibles en el mercado farmacéutico (Valderrama 2009). Ejemplos de este señalamiento, lo representa Prialt® (ziconotida) un potente analgésico aislado del caracol *Conus magus* y Yondelis® (trabectedina, o ET-743) agente con potente acción antitumoral, aislado del tunicado *Ecteinascidia turbinata*.

Asimismo, existen otros productos que ya se encuentran en fase de ensayos clínicos como alpidin y Kahalalide F, aplicables en el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica y en el cáncer de pulmón, respectivamente (Abad *et al.* 2008).

Un número relativamente pequeño de plantas marinas, animales y microbios han producido más de 15.000 productos naturales, en especial los de cuerpo blando y/o sésiles, como las esponjas (Ebada *et al.* 2010). Las esponjas no pueden perseguir a las presas, carecen de órganos sensoriales especiales y son incapaces de huir. Sin embargo, no son organismos insensibles ni están indefensos para actuar, ya que, a pesar de su aparente simplicidad han desarrollado múltiples estrategias evolutivas importantes para hacerse de su espacio vital y defenderlo, así como protegerse contra los depredadores. La estrategia más sobresaliente es la de segregar sustancias químicas repulsivas que impiden acercarse posibles depredadores, ser infestadas por otros organismos o ganarles el espacio. Muchas de estas sustancias han sido purificadas, caracterizadas y evaluadas sus actividades biológicas, a partir de las cuales se han obtenido productos con aplicación farmacológica, industrial, entre otras aplicaciones (Alves de Campos 2007).

Por ejemplo, de la esponja marina *Aplysina lacunosa* se aisló una proteína tipo lectina, capaz de aglutinar glóbulos rojos humanos del sistema ABO(H) (Kazanjian y Fariñas 2006), de *Niphates erecta* se aisló la niphatevirina, potente inhibidor de los efectos citopáticos del HIV-1 y de la infección de las células linfoblásticas humanas CEM-SS, el aciclovir (Ara A), un potente antiviral para tratar herpes y encefalitis y, la citarabina (Ara C), empleada para combatir la leucemia y algunos tipos de linfomas, fueron aislados de la esponja *Cryptothya cripta* (Pujol Martínez 2008, Laport *et al.* 2009).

Venezuela es un país tropical que posee 4006 km de extensión de costas, de las cuales aproximadamente el 80% se encuentran aún inexploradas, estimándose que de los miles de organismos que allí habitan, menos del 1% han sido explotados en el campo de los productos naturales. En este sentido, las esponjas son organismos de amplia distribución en estas costas, muchas de las cuales aún no han sido objeto de investigación; esto permite suponer la existencia de una fuente de compuestos biológicamente activos, poco comunes, de posible interés en el área de la medicina.

Motivado por lo antes expuesto y la importancia de ampliar los conocimientos sobre sustancias bioactivas de

origen marino, se estimó conveniente evaluar la actividad hemaglutinante y/o hemolítica del extracto acuoso y del precipitado de proteínas de las esponjas marinas *Niphates erecta* y *Callyspongia vaginalis*, sobre los glóbulos rojos humanos de los diferentes grupos sanguíneos del sistema ABO(H), así como, detectar las diferentes familias de compuestos químicos, con perspectivas de su uso futuro para la elaboración de análogos sintéticos con propiedades terapéuticas de origen natural y de reactivos de laboratorio clínico, entre otras aplicaciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción y recolección de las especies de esponjas

Los especímenes de *N. erecta*, caracterizada por ser de color gris claro y oscuro de consistencia compresible, ramas flexibles, superficie rugosa, de apariencia porosa y áspera, presenta numerosos ósculos que miden entre 2 y 6 mm de diámetro, una dermis no especializada y un coanosoma esponjoso, espículas megascleras de tipo oxeas fusiformes y hastadas que pueden ser rectas o algo curvadas y *C. vaginalis*, de color marrón con rosado, de consistencia compresible y fácil de rasgar, posee una superficie conulosa, con pseudósculos ubicados en el ápice de cada tubo entre 2 y 5 cm de diámetro, presenta ósculos pequeños que miden entre 1 a 2 mm de diámetro, un ectosoma no desprendible, y un esqueleto de fibrofascículos, que ascienden hasta la superficie formando los cónulos. Las espículas megascleras son de tipo oxeas hastadas de puntas cónicas (Amaro y Liñero 2006).

Los especímenes fueron recolectados en la Punta "El Toro" situada aproximadamente a 64°27' longitud N y 10°19' longitud O, Parque Nacional Mochima, estado Sucre a través del buceo libre y autónomo, hasta profundidades de 6 metros. Una vez recolectadas las muestras fueron lavadas con agua de mar filtrada para eliminar adherencias o partículas extrañas y colocadas en bolsas plásticas, para luego ser transportadas en cavas con hielo seco hasta el Laboratorio de Bioactivos Marinos del Instituto Oceanográfico de Venezuela de la Universidad de Oriente, donde fueron liofilizadas e identificadas taxonómicamente, hasta la categoría de especie, utilizando las claves específicas descritas en el sistema porifera (Hooper y Soest 2002).

Preparación del extracto acuoso, precipitación y concentración de proteínas

El extracto acuoso, la precipitación y la concentración de proteínas se realizó siguiendo la metodología descrita

por Bollag y Edelstein (1992). Para ello, 1,0 g del liofilizado fue homogeneizado con 10 mL de buffer fosfato salino a pH 7,4. En el material soluble obtenido (sobrenadante), se precipitaron las proteínas por sobresaturación al 85% con sulfato de amonio y concentradas por diálisis, utilizando bolsas de celulosa, cuya porosidad excluía moléculas menores a 12 kDa.

Separación de proteínas por cromatografía de exclusión molecular (CEM)

Para separar las proteínas según su masa molar, se aplicó el método descrito por Hughes (1976), utilizando una columna empacada con Biogel P₁₀₀ poliacrilamida y calibrada con patrones de masa molecular conocida, la cual estaba conectada a un colector de fracciones Spectra modelo Chrom CF-1. El cromatograma fue construido utilizando las absorbancias a 280 nm de cada una de las fracciones obtenidas y, aquellas fracciones constitutivas de los picos, fueron sometidas a pruebas de hemaglutinación y hemólisis. Las fracciones que resultaron activas, fueron reunidas en un solo *pool*, para posteriormente ser dializadas y liofilizadas.

Electroforesis

Para evaluar la pureza del material purificado y estimar su masa molar, se procedió a correr electroforéticamente en geles SDS-PAGE el extracto acuoso, el precipitado de proteínas y el pool de fracciones activas, siguiendo la técnica descrita por Laemmli (1970). Una vez culminada la corrida se procedió a la coloración del gel siguiendo el método de Ausubel *et al.* (1999), utilizando una solución de nitrato de plata al 19,4% para teñir las bandas.

Actividad hemaglutinante y hemolítica

La determinación de la actividad hemaglutinante y hemolítica se determinó siguiendo la metodología descrita por Rogers y Fisch (1991). Para ello, se prepararon suspensiones al 5% de muestras de sangre humana clasificadas como grupos sanguíneos A, B y O, las cuales se hicieron reaccionar con los extractos acuosos, los precipitados de proteínas y, con las fracciones obtenidas en la cromatografía de exclusión molecular. Estas reacciones se dejaron incubar por 30 minutos, centrifugadas a 3.500 rpm por 15 segundos y leídas en lámparas magnificadoras, anotándose los resultados utilizando la simbología normalmente aplicada (cruces) cuando se produjo la aglutinación: 4+ botón único con sobrenadante limpio, 3+ botón con pequeños grumos y sobrenadante limpio, 2+ pequeños grumos y sobrenadante limpio y, 1+ pequeños

grumos con sobrenadante turbio y, la hemólisis, se determinó visualmente basándose en las transformaciones físicas de viscosidad y color.

Ambas actividades fueron tituladas siguiendo la metodología descrita por Gómez y Aragón (1986). Para ello, fueron realizadas diluciones seriadas al doble de la muestra en estudio (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 y 1/128), a las cuales posteriormente se les probó la actividad hemaglutinante y hemolítica. La última dilución en exhibir la actividad biológica, fue considerada el título de la prueba.

Familias químicas

Para detectar la presencia de saponinas y polifenoles, se aplicó la metodología descrita por Marcano y Hasegawa (2002), la cual evidencia la presencia de saponinas, cuando al agitar vigorosamente la muestra en estudio en agua destilada, se forma una espuma en forma de panal, persistente al menos por 15 minutos. Este grupo de metabolitos secundarios, también se ponen en evidencia por medio de la hemólisis producida por la muestra sobre placas servidas con agar sangre. Los compuestos fenólicos, se detectan por la producción de una coloración parda, cuando el extracto reacciona con una solución de cloruro de hierro (III) al 1%.

RESULTADOS

Actividad hemaglutinante y hemolítica

El extracto acuoso y el precipitado de proteínas de *Niphates erecta* y *Callyspongia vaginalis* exhibieron aglutinación y lisis sobre los eritrocitos humanos de los diferentes grupos sanguíneos A, B y O. Tanto la hemaglutinación como la hemólisis se manifestaron para los diferentes grupos sanguíneos humanos con igual intensidad, lo que hace que sean inespecíficos para los eritrocitos ensayados (Tabla 1).

Tabla 1. Actividad hemaglutinante y hemolítica del extracto acuoso y del precipitado de proteínas de *Niphates erecta* y *Callyspongia vaginalis* sobre los eritrocitos humanos del sistema ABO (H).

ESPECIES	MUESTRA	GRUPOS SANGUÍNEOS				AHL
		AHA (A+)	AHA (B+)	AHA (AB+)	AHA (O+)	
<i>N. erecta</i>	E. acuoso	3+	3+	3+	3+	hemólisis
<i>N. erecta</i>	P. proteínas	4+	4+	4+	4+	hemólisis
<i>C. vaginalis</i>	E. acuoso	2+	2+	2+	2+	hemólisis
<i>C. vaginalis</i>	P. proteínas	3+	3+	3+	3+	hemólisis

AHA: actividad hemaglutinante; AHL: Actividad hemolítica; E.: extracto; P.: precipitado

Titulación de la hemaglutinación y hemólisis del extracto acuoso y precipitado de proteínas de las especies estudiadas

Al ser titulada la acción hemaglutinante de *N. erecta* sobre los grupos sanguíneos del sistema ABO probados, ésta se exhibió hasta una dilución de 1/32 para el extracto acuoso y 1/8 para el precipitado de proteínas; sin embargo, la actividad hemolítica se mantuvo hasta la dilución 1/64 para el extracto acuoso y 1/8 para el precipitado de proteínas (Tabla 2).

Tabla 2. Titulación de hemaglutinación y hemólisis del extracto acuoso y del precipitado de proteínas de *Niphates erecta*, sobre los eritrocitos humanos de los grupos sanguíneos A, B y O.

Dilución	Extracto Acuoso			Precipitado de Proteínas		
	Hemaglutinación			Hemólisis		
	A	B	O	A	B	O
1	3+	3+	3+	+	+	+
1/2	1+	1+	1+	+	+	+
1/4	2+	2+	2+	+	+	+
1/8	2+	2+	2+	+	+	+
1/16	3+	3+	3+	+	+	+
1/32	2+	2+	2+	+	+	+
1/64	(-)	(-)	(-)	+	+	+
1/128	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Possible presencia de la actividad (+); Ausencia de actividad (-)

La titulación de la actividad hemaglutinante del extracto acuoso de *C. vaginalis* se evidenció hasta una dilución de 1/16 y mantuvo la actividad lítica hasta la dilución 1/32. La actividad hemaglutinante y hemolítica del precipitado de proteínas se evidenció hasta una dilución de 1/16 (Tabla 3).

Tabla 3. Titulación de hemaglutinación y hemólisis del extracto acuoso y del precipitado de proteínas de *Callyspongia vaginalis*, sobre los eritrocitos humanos de los grupos sanguíneos A, B y O.

Dilución	Extracto Acuoso			Precipitado de Proteínas		
	Hemaglutinación			Hemólisis		
	A	B	O	A	B	O
1	3+	3+	3+	+	+	+
1/2	3+	3+	3+	+	+	+
1/4	2+	2+	2+	+	+	+
1/8	2+	2+	2+	+	+	+
1/16	1+	1+	1+	+	+	+
1/32	(-)	(-)	(-)	+	+	+
1/64	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
1/128	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Possible presencia de actividad (+); Ausencia de actividad (-)

Separación de proteínas de acuerdo a la masa molar y electroforesis

Los cromatogramas obtenidos una vez realizada la separación de las proteínas de acuerdo a la masa molar, revelaron la presencia de un pico único para *C. vaginalis* (Figura 1A), cuyas fracciones constitutivas resultaron

activas y de 2 picos para *N. erecta*, (Figura 1B), de los cuales el primero resultó activo.

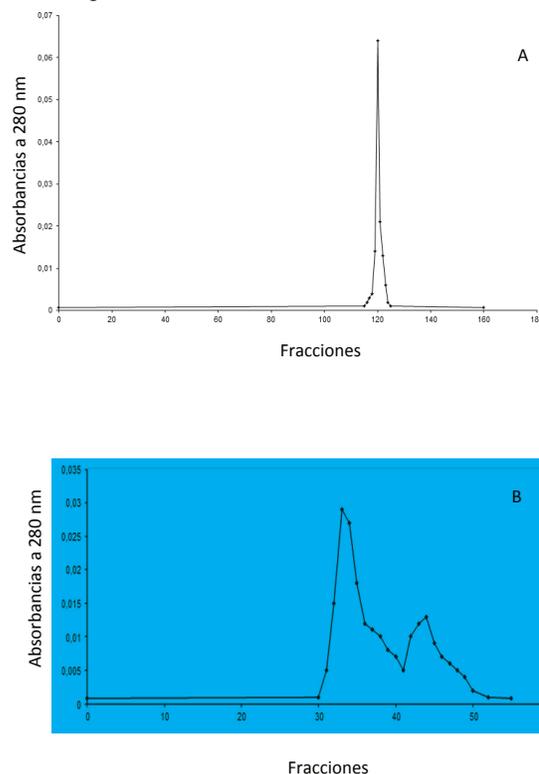


Figura 1. Cromatograma del fraccionamiento por CEM de proteínas de *Niphates erecta* (A) y de *Callyspongia vaginalis* (B).

Al estimar, por electroforesis, la masa molar de las proteínas activas de las esponjas en estudio, se obtuvo para *N. erecta*, una banda, cuya corrida coincide con la masa molar de la ovoalbúmina (45 kDa) y, para *C. vaginalis*, no se obtuvieron bandas visibles en la corrida, lo cual podría indicar que la proteína activa tenga una masa molar inferior a 14,3 kDa, correspondiente a la masa molecular de la lisozima, último marcador utilizado (Figura 2).

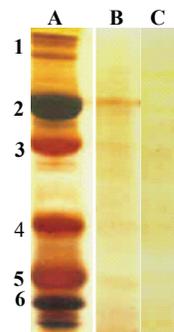


Figura 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE, del pool de fracciones contenidas de las proteínas hemolíticas de *N. erecta* (B) y *C. vaginalis* (C). (A) Marcador de proteínas (1) albúmina bovina 66 kDa, (2) ovoalbúmina 45 kDa, (3) pepsina 34,7 kDa, (4) tripsinógeno 24 kDa, (5) β-lactoglobulina 18,4 kDa, (6) lisozima 14,3 kDa.

Familias químicas

Los extractos acuosos evaluados arrojaron resultados positivos para saponinas, evidenciándose su presencia, tanto por la formación de una espuma persistente, en forma de panal, como por la hemólisis en placas de agar-sangre, exhibiendo halos de 12 mm y 18 mm (Tabla 4), mientras que, la presencia de polifenoles no fue evidenciada en ninguna de las muestras.

Tabla 4. Familias químicas detectadas en el extracto acuoso de *Niphates erecta* y *Callyspongia vaginalis*.

Extracto acuoso	Pruebas químicas	Reacción	Observación
<i>N. erecta</i>	Saponinas	Positivo (+)	Formación de espuma y halo de hemólisis de 12 mm.
	Polifenoles	Negativo (-)	
<i>C. vaginalis</i>	Saponinas	Positivo (+)	Formación de espuma y halo de hemólisis de 18 mm.
	Polifenoles	Negativo (-)	

Posible presencia (+); Ausencia (-)

DISCUSIÓN

El extracto acuoso y el precipitado de proteínas de las esponjas en estudio, exhibieron efecto hemaglutinante con una dilución de 1/32 y 1/8, respectivamente para *N. erecta* (Tabla 2) y una dilución respectiva de 1/16 para *C. vaginalis* (Tabla 3). Este resultado pudiera ser atribuido a la presencia de factores aglutinantes, los cuales han sido purificados de invertebrados marinos y, reconocidos en la actualidad, como lectinas, las cuales son proteínas o glicoproteínas de origen no inmune capaces de unirse a fracciones de carbohidratos presentes en la superficie celular de glóbulos rojos, linfocitos, linfoblastos, bacterias, hongos, implicando una reacción cruzada y, a la vez, una precipitación, evidenciándose como una aglutinación (Vasta 2010).

La hemaglutinación exhibida por las muestras evaluadas, fue provocada en todos los grupos sanguíneos humanos del sistema ABO probados (Tabla 1); lo cual permite inferir, que de ser una aglutinina tipo lectina el compuesto responsable de la actividad hemaglutinante, ésta podría estar reconociendo algún carbohidrato de membrana común en los tres grupos sanguíneos. Las lectinas tienen especificidad por un determinado carbohidrato presente en la membrana de los eritrocitos, uniéndose reversiblemente y sin alterar la estructura covalente de los ligandos glicosídicos reconocidos (Vasta 2010).

En este sentido, Lewis *et al.* (2008) explican que el gen H es la unidad fundamental de la herencia y codifica la enzima fucosil transferasa, la cual transfiere una fucosa

en el azúcar terminal del compuesto precursor para formar la sustancia H. La sustancia H es un componente común en la membrana de los eritrocitos, que conforma los determinantes antigénicos del sistema ABO(H) y la misma, está constituida por cinco azúcares glucosa, galactosa, N-acetil-glucosamina, galactosa y fucosa. Además, en la membrana de los eritrocitos humanos se encuentran otras sustancias como las glicoforinas, entre ellas, la glicoforina A, la cual contiene residuos de ácido siálico, lo que le confiere cargas negativas al exterior de la membrana, impidiendo la aglutinación *in vivo* de los eritrocitos. A esta glicoforina se le han detectado receptores para virus, parásitos, lectinas y hemaglutininas (Macarulla 2008).

Estos señalamientos permiten inferir que de ser una lectina el compuesto responsable de la actividad hemaglutinante observada en los extractos acuosos y los precipitados de proteínas de *N. erecta* y *C. vaginalis*, podrían estar reconociendo a cualquiera de los azúcares que conforman a la sustancia H o al ácido siálico presente en la glicoforina A.

Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con los reportados por otros autores quienes han obtenido actividad hemaglutinante a partir de esponjas marinas, atribuyendo esta acción a proteínas aglutinantes tipo lectinas. Bonay y Fresno (2000) reportan que de 8 familias de esponjas marinas colectadas en el Parque Nacional Los Roques, 10 exhibieron actividad aglutinante sobre las células rojas probadas, entre ellas *Niphates erecta*, la cual provocó la aglutinación de los glóbulos rojos.

Otros factores capaces de provocar la aglutinación de los eritrocitos son los polifenoles. Rogers y Loveles (1991) señalan que se ha observado aglutinación ocasionada por polifenoles, los cuales están considerados como compuestos pseudoaglutinantes, ya que no provocan hemaglutinación sino una aglomeración, por acercamiento de las células sanguíneas. Cabe resaltar, que los extractos acuosos de las especies en estudio no exhibieron la presencia de polifenoles (Tabla 4), lo cual permite descartar la posibilidad que la actividad hemaglutinante exhibida por los extractos acuosos evaluados, sea producto de la presencia compuestos fenólicos.

El extracto acuoso y el precipitado de proteínas de *N. erecta* y *C. vaginalis* también provocaron la hemólisis de todos los grupos sanguíneos ensayados (Tabla 1). En los extractos acuosos de ambas esponjas, se reveló la presencia de saponinas (Tabla 4) y se evidenció actividad

lítica hasta una dilución de 1/64 y 1/32, respectivamente (Tabla 2 y 3). Del precipitado de proteínas se lograron obtener fracciones contentivas de proteínas líticas, cuyas masas molares aproximadas variaron entre 45 kDa para *N. erecta* y menor a 14,3 kDa para *C. vaginalis* (Figura 2), provocando hemólisis hasta una dilución de 1/32 y 1/16, respectivamente (Tabla 2 y 3).

En los invertebrados marinos incluyendo las esponjas, la actividad lítica, depende de la presencia de saponinas consideradas por Tizard (2009) como compuestos tóxicos y/o a las hemolisinas, proteínas capaces de actuar como mecanismo de defensa (Antón y Salazar 2009). Este señalamiento permite inferir, que la actividad hemolítica producida por los extractos acuosos de *N. erecta* y *C. vaginalis*, los cuales exhibieron los mayores títulos de hemólisis, se deba tanto a la presencia de saponinas como de hemolisinas, lo que indicaría una sinergia entre estos dos componentes, mientras que, la actividad hemolítica exhibida por los precipitados de proteínas, cuyos títulos de lisis fueron más bajos, se deba a la presencia de hemolisinas solamente.

Resultados similares a los obtenidos en este estudio fueron observados por Mebs *et al.* (1985), quienes reportaron actividad hemolítica de *Callyspongia* sp. Asimismo, Mebs *et al.* (1997) purificaron parcialmente dos hemolisinas de dos especies del género *Callyspongia*, cuyas masas molares fueron de 15 kDa y 20 kDa. O'Keefe *et al.* (1997), reportaron que el extracto acuoso de *Niphates digital* exhibió acción tóxica sobre los eritrocitos, aunque el agente responsable no fue caracterizado.

Antón y Salazar (2009), involucran a las hemolisinas, a las lectinas, a los patrones de moléculas asociadas al patógeno (PMAP), a los péptidos antimicrobianos (PAM) y a las lisozimas, como los principales componentes en los mecanismos de defensa que desarrollan los invertebrados marinos, lo cual permite suponer que la presencia del factor aglutinante en los extractos acuosos de *N. erecta* y *C. vaginalis*, así como las hemolisinas purificadas de los precipitados de proteínas, deben cumplir un rol de defensa en este primitivo grupo de invertebrados marinos.

CONCLUSIÓN

Las esponjas marinas *Niphates erecta* y *Callyspongia vaginalis* poseen compuestos aglutinantes capaces de provocar la aglutinación de eritrocitos humanos del sistema ABO(H) y, compuestos líticos como saponinas y hemolisinas, capaces de interrumpir la integridad de la membrana eritrocitaria.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente por haber financiado parcialmente esta investigación a través del proyecto N° CI-2-030601-1272/06. A Mairín Lemus por facilitar la infraestructura y la metodología aplicada para la separación de proteínas y determinación de su masa molar.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ABAD M., BEDOYA L., BERMEJO P. 2008. Natural marine antiviral products. *Studies in Natural Products Chemistry*, 35: 101-134.
- ALVES DE CAMPOS M. 2007. Riqueza de espécies de poríferos (Porifera: Demospongiae) colectados Pelo Programa Antártico Brasileiro-PROANTAR (1983-1991). Tesis de Mestre em Biología animal. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 296 pp.
- ANTÓN Y., SALAZAR R. 2009. El sistema inmune de los invertebrados. *Rev. Electrón. Vet.* 10(9).
- AMARO M., LIÑERO I. 2006. Esponjas más comunes en ambientes someros (Porifera: Demospongiae) de la Bahía de Mochima, estado Sucre, Venezuela. *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela*, 45(2): 109-125.
- AUSUBEL F., BRENT R., KINGSTON R., MOORE D., SCIDMAN J. 1999. *Short Protocols in Molecular Biology*. John Wiley y Sons, Inc., Madrid, España. 1099 pp.
- BOLLAG D., EDELSTEIN S. 1992. *Protein methods*. Wiley-Liss. New York. United States. 230 pp.
- BONAY P., FRESNO M. 2000. Lectins from Tropical Sponge. *J. Biol. Chem.* 275(38): 29283- 29289.
- EBADA S., LIN W., PROKSCH P. 2010. Bioactive Sesterterpenes and Triterpenes from Marine Sponges: Occurrence and Pharmacological Significance. *Mar Drugs*. 8(2): 313-346.
- GÓMEZ M., ARAGÓN F. 1986. Purification and Some Properties of Hemagglutinating Protein Mutina from Bushmaster *Lachesis muta* Snake Venom. *Biol. Trop.* 34(1): 49-53.
- HOOPER J., SOEST R.W. 2002. *Systema Porifera: a guide*

- to the classification of sponges. Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York, 1810 pp.
- HUGHES R. 1976. Membrana Glycoproteins. Butter Worths. London. 357 pp.
- KAZANJIAN A., FARIÑAS M. 2006. Actividades biológicas del extracto acuoso de la esponja *Aplysina lacunosa* (Porifera: Aplysinidae). Rev. Biol. Trop. 54(3): 189-200.
- LAEMMLI U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Natural. 227: 680-685.
- LAPORT M., SANTOS O., MURICY G. 2009. Marine Sponges: Potential Sources of New Antimicrobial Drugs. Current Pharma. Biotech. 10: 86-105.
- LEWIS S., BAIN B., BATES I. 2008. Dacie y Lewis hematología práctica. 10ª Edición. ELSEVIER Churchill Livingstone, España, 603 pp.
- MACARULLA J. 2008. Bioquímica 6ª Edición. Editorial REVERTÉ S.A., Barcelona, España. 980 pp.
- MARCANO D., HASEGAWA M. 2002. Fitoquímica Orgánica. Universidad Central de Venezuela. Caracas. 451 pp.
- MEBS D., BENESCH S., KÖNIG B., YAMAKAWA Y., OMMORI T. 1997. A protease from the marine sponge *Callyspongia schulzi*. Biochem. Mol. Biol. Int. 42: 789-797.
- MEBS D., WEILER I., HEINKE H. 1985. Bioactive proteins from marine sponges: screening of sponge extracts for hemagglutinating, hemolytic, cytotoxic and lethal properties and isolation and characterization of hemagglutinins. Toxicon. 23(6): 955 – 962.
- O'KEEFE B., BEUTLER J., CARDELLINA J., GULAKOWSKI R., KREPPS B., MC MAHON J., SOWDER R., HENDERSON L., PANNELL L., POMPONI S., BOYD M. 1997. Isolation and characterization of niphatevirin, a human immunodeficiency virus inhibitory glycoprotein from the marine sponges *Niphates erecta*. Eur. J. Biochem. 245(1): 47-53.
- PUJOL MARTÍNEZ E. 2008. Esponjas Lejanas Antepasados. Editado por Boletín Informativo de la Coordinación de la Investigación Científica mexicana. VIII(92), 3pp. (Revisado en <http://ola.icmyl.unam.mx/Ecobentos/elfaro92.pdf> el 26/12/2008).
- ROGERS D., FISH B. 1991. Marine algal. En: Lectin Reviews. Kilpatrick, D. C.; Van Driessche E. y Bag-Hansen T. C. (eds). Sigma Chemical Company St. Louis Missouri USA. Págs. 129-142.
- ROGERS D., LOVELES W. 1991. Electron microscopy of human erythrocytes agglutinated by lectin from *Codium fragile* ssp. *Tormentosoides* and pseudohaemagglutinin from *Ascophyllum nodosum*. J. Applied Phycol. 3: 83-86.
- TIZARD I. 2009. Introducción a la inmunología veterinaria 8ª edición. ELSEVIER Saunders, Barcelona, España. 478 pp.
- VALDERRAMA A. 2009. Evaluación de la oferta natural y potencial de producción de (+)-discodermolido y/o análogos de la esponja marina del Caribe colombiano *Discodermia dissoluta*. Trabajo de Maestría. Universidad Nacional de Colombia. 105 pp.
- VASTA G. 2010. Aspectos bioquímicos, estructurales y funcionales de las galectinas en la inmunidad. Mensaje Bioquímico, XXXIV: 17-30.