



**Universidad Autónoma de Querétaro**

Facultad de Ciencias Naturales



**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEASAS DEL MÚSCULO DE PEZ LEÓN**  
(*Pterois sp.*)

**Tesis Individual**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Licenciado en Biología

**Presenta**

Sara Elisa Vega Hernández

**Dirigido por**

Dra. Arisaí del Carmen Hernández Sámano

Santiago de Querétaro, Qro. Septiembre 2022



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales  
de Información



IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE  
PROTEASAS DEL MÚSCULO DE PEZ LEÓN (*Pterois*  
sp.)

**por**

Sara Elisa Vega Hernández

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons  
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0  
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

**Clave RI:** CNLIN-227527



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales



## IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEASAS DEL MÚSCULO DE PEZ LEÓN (*Pterois sp.*)

Tesis Individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Licenciado en **Biología**

**Presenta:**

Sara Elisa Vega Hernández

**Dirigido por:**

Dra. Arisaí del Carmen Hernández Sámano

Dr. Arisaí del Carmen Hernández Sámano  
Presidente

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Manuel Benigno Aguilar Ramírez  
Secretario

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez  
Vocal

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Fausto Arellano Carbajal  
Vocal

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Juan Pablo Ramírez Herrejón  
Vocal

\_\_\_\_\_  
Firma

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
**Septiembre de 2022**  
México

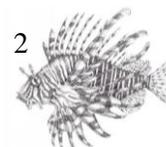
**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE  
PROTEASAS DEL MÚSCULO DE PEZ LEÓN  
(*Pterois sp.*)**



## Resumen

El pez león *Pterois* sp. es un predador de talla mediana en los arrecifes de Coral del Indo Pacífico que pertenece a la familia Scorpaenidae. Dentro de dicha familia se encuentran varios de los peces más venenosos y vistosos por su patrón de coloración y modificación en las aletas. Son organismos que utilizan veneno como mecanismo de defensa (contenido principalmente en las aletas dorsales). El veneno del pez león es uno de los venenos más efectivos y tóxicos que se han descrito en peces. Se considera una especie invasora debido a su introducción y al impacto en la estructura de la comunidad y biodiversidad de peces nativos de los ecosistemas coralinos del Caribe, reduciendo el reclutamiento, densidad, la biomasa y la diversidad genética, causando, además, grandes afectaciones económicas. Desde el primer registro de dicha especie en Florida en 1992 se ha expandido rápidamente a lo largo del Caribe y se proyecta invadirá el Pacífico Oriental a través del Canal de Panamá. Por lo tanto, el objetivo de este estudio es identificar y caracterizar la actividad de las proteasas presentes en el músculo de *Pterois* sp. para su posterior aprovechamiento como herramienta biotecnológica; e indirectamente, complementar las medidas de extracción que se tienen para el control de esta especie. Actualmente, los estudios bioquímicos de *Pterois* sp. se han enfocado únicamente en la caracterización del veneno. Para este trabajo, se emplearon 3 organismos colectados en el Caribe Mexicano a 6 y 10 m de profundidad. Se aisló el músculo de cada organismo y se maceraron con un amortiguador de fosfatos de sodio 20 mM, pH 7, a 4 °C para la obtención de un extracto crudo proteolítico. Posteriormente, se analizó el perfil proteico del extracto crudo por Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa (RP-HPLC), Electroforesis en Geles de Poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Sodio (SDS-PAGE) y Electroforesis en condiciones nativas (Native-PAGE). La actividad proteolítica se determinó a diferentes valores de pH (de 2 a 12) utilizando como sustratos caseína 1% y hemoglobina 1%, y en un rango de temperatura de 4 a 60 °C, con un tiempo de reacción de 15 minutos. La cuantificación de la proteólisis se realizó por espectrofotometría a 280 nm. Además, se realizaron ensayos de actividad proteolítica con inhibidores específicos para metalo y serín proteasas (EDTA y PMSF, respectivamente). Se determinó una mayor actividad proteolítica a pH 6.6 y 7.0, y una temperatura óptima de 25 °C, con actividades específicas de  $169.40 \pm 4.8$  U/mg y  $172.60 \pm 2.07$  U/mg, respetivamente, sin tener una diferencia estadísticamente significativa entre dichos valores de pH. En los ensayos con inhibidores se reportó actividad residual de  $54.2 \pm 1.28$  % con PMSF (pH 6.6, 25 °C), mientras que con EDTA no se observó un efecto significativo, lo que indica la presencia predominante de serín proteasas en el extracto crudo. En el perfil electroforético, se observaron proteínas con pesos moleculares estimados en un rango de 7.1 a 274.0 kDa. Adicionalmente, se fraccionó el extracto crudo por RP-HPLC obteniéndose 7 fracciones; la fracción número 6 fue aislada y presentó actividad específica de  $1557.04 \pm 292.19$  U/mg en las condiciones óptimas determinadas (pH 6.6, 25 °C), con un peso molecular estimado de 18.1 kDa. El factor de purificación fue de  $\sim 9.9$  lo que indica un aceptable grado de purificación de la fracción obtenida. Estas características, pueden delimitar la potencial aplicación biotecnológica del extracto proteolítico, aunque es necesario realizar más estudios para su aprovechamiento.

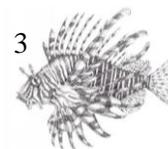
**Palabras clave:** pez león, *Pterois* sp., proteasas, enzimas proteolíticas.



## Abstract

The lionfish *Pterois* sp. is a medium-sized predator in the coral reefs of the Indo-Pacific that belongs to the Scorpaenidae family. Within this family are several of the most venomous and showy fishes due to their coloration pattern and fin modification. They are organisms that use venom as a defense mechanism (contained mainly in the dorsal fins). Lionfish venom is one of the most effective and toxic venoms that have been described in fish. It is considered an invasive species due to the introduction of the species and its impact on the community structure and biodiversity of native fishes in Caribbean coral ecosystems, reducing recruitment, density, biomass and genetic diversity, and consequently causing great economic impacts. Since its first record in Florida in 1992, it has rapidly expanded throughout the Caribbean and is projected to invade the Eastern Pacific through the Panama Canal. Therefore, the objective of this study is to identify and characterize the activity of proteases present in the muscle of *Pterois* sp. for its subsequent use as a biotechnological tool; and indirectly, complement the extraction measures that are in place for the control of this species. Currently, biochemical studies of *Pterois* sp. have focused only on characterization of venom. For this work, three organisms collected in the Mexican Caribbean at 6 and 10 m depth were used. The muscle was isolated and macerated with a sodium phosphate buffer 20 mM, pH 7, at 4 °C for to obtain a proteolytic crude extract. Subsequently, the protein profile of the crude extract was analyzed by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC), by Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) and Electrophoresis under native conditions (Native-PAGE). Proteolytic activity was determined at different pH values (2 to 12), using 1% casein and 1% hemoglobin as substrates, and in a temperature range of 4 to 60 °C, with a reaction time of 15 minutes. Proteolysis quantification was performed spectrophotometrically at 280 nm. Also, proteolytic activity assays were performed with specific inhibitors for metallo and serine proteases (EDTA and PMSF, respectively). A higher proteolytic activity was determined at pH 6.6 and 7.0, and an optimum temperature of 25 °C, with specific activities of  $169.40 \pm 4.8$  U/mg and  $172.60 \pm 2.07$  U/mg, respectively, without having a statistically significant difference between these pH values. In the inhibitor assays with PMSF (pH 6.6, 25 °C) residual activity of  $54.2 \pm 1.28$  % was reported, while none significant effect was observed with EDTA, indicating a predominant presence of serine proteases in the crude extract. Proteins with molecular weights ranging between 7.1 and 274.0 kDa were observed in the electrophoretic profile. Additionally, the crude extract was fractionated by RP-HPLC obtaining 7 fractions; the fraction number 6 was isolated and presented a specific activity of  $1557.04 \pm 292.19$  U/mg under the optimal conditions determined (pH 6.6, 25 °C), with an estimated molecular weight of 18.1 kDa. The purification factor was ~9.9, which indicates an acceptable degree of purification of the obtained fraction. These characteristics can delimit the potential biotechnological application of the proteolytic extract, although it is necessary to carry out more studies for its use.

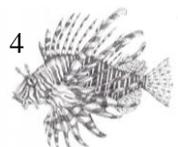
**Keywords:** lionfish, *Pterois* sp., proteases, proteolytic enzymes.



*“...Somos la progenie de la historia, y debemos establecer nuestros propios caminos en el más diverso e interesante de los universos concebibles: un universo indiferente a nuestro sufrimiento y que, por lo tanto, nos ofrece la máxima libertad para prosperar, o para fracasar, de la manera que nosotros mismoselijamos.”*

*“La vida Maravillosa”*

*-Stephen J. Gould*



## **Agradecimientos**

Primeramente, agradezco a las instituciones que me permitieron cursar la licenciatura y concluir el trabajo para la obtención del título, la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ) y el Instituto de Neurobiología, UNAM-Campus Juriquilla. Así como las becas brindadas.

A los sinodales por su tiempo.

De igual modo, agradezco al Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez por permitirme llevar a cabo este trabajo en el laboratorio de Neurofarmacología Marina, y a la Dra. Arisaí del Carmen Hernández Sámano, directora de tesis, por la gestión de la beca, las enseñanzas, la paciencia y apoyo incondicional.

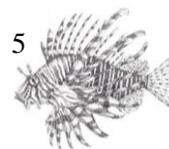
A Antonia, quien colectó a los organismos, y Ximena quienes siempre estuvieron en la disposición de ayudar aun en sus días más ocupados. A Víctor por su trabajo como técnico de laboratorio. A todas las amistades forjadas durante la estancia en el laboratorio.

A Andrés y Fernanda amigos y compañeros, con los que tuve el gusto de trabajar y aprender en el laboratorio.

A los profesores de la licenciatura en biología y de francés por su trabajo y entusiasmo por la enseñanza no solo en la academia sino también como personas. A Mme. Eva y Mme. Tony por su confianza, enseñanzas y amistad.

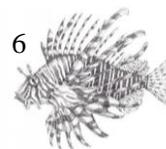
A todos los amigos y compañeros que me brindaron su apoyo de diversas maneras y de quienes he aprendido y sigo aprendiendo.

A mi familia, en especial a mis hermanos Alberto y Paola, y a mis padres José Trinidad y Rosa.



# ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| <b>Resumen</b> .....   | 2  |
| <b>Abstract</b> .....  | 3  |
| <b>Agradecimientos</b> .....   | 5  |
| <b>Índice de Tablas</b> .....  | 7  |
| <b>Índice de Ilustraciones</b> .....   | 7  |
| <b>1. Introducción</b> .....   | 8  |
| <b>2. Antecedentes</b> .....   | 10 |
| <b>2.1. Proteasas</b> .....  | 10 |
| <b>2.1.1. Definición</b> .....   | 10 |
| <b>2.1.2. Clasificación</b> .....  | 10 |
| <b>2.1.3. Importancia biológica</b> .....                                    | 11 |
| <b>2.1.4. Importancia económica</b> .....                                    | 12 |
| <b>2.1.5. Proteasas marinas</b> .....  | 13 |
| <b>2.1.6. Proteasas de peces de la familia Scorpaenidae</b> .....            | 14 |
| <b>2.2. Pez león (<i>Pterois</i> sp.)</b> .....                              | 14 |
| <b>2.2.1. Taxonomía</b> .....  | 14 |
| <b>2.2.2. Anatomía externa y aparato venenoso</b> .....                      | 15 |
| <b>2.2.3. Alimentación</b> .....   | 17 |
| <b>2.2.4. Hábitat y distribución en México</b> .....                         | 18 |
| <b>2.2.5. Reproducción</b> .....   | 18 |
| <b>2.2.6. Importancia ecológica</b> .....                                    | 19 |
| <b>2.2.7. Importancia económica</b> .....                                    | 20 |
| <b>2.2.8. Legislación para control de poblaciones</b> .....                  | 21 |
| <b>2.3 Proteasas del músculo esquelético de organismos marinos</b> .....     | 22 |
| <b>3. Justificación</b> .....  | 31 |
| <b>4. Hipótesis</b> .....  | 31 |
| <b>5. Objetivos</b> .....  | 31 |
| <b>5.1. Objetivo general</b> .....   | 31 |
| <b>5.2. Objetivos específicos</b> .....                                      | 31 |
| <b>6. Metodología</b> .....  | 32 |
| <b>6.1. Obtención de extracto crudo proteolítico</b> .....                   | 32 |
| <b>6.2. Cuantificación de proteína</b> .....                                 | 32 |
| <b>6.3. Caracterización del extracto crudo proteolítico</b> .....            | 32 |
| <b>6.3.1. Determinación de actividad proteolítica</b> .....                  | 32 |
| <b>6.3.2. Efecto del pH sobre la actividad proteolítica</b> .....            | 32 |
| <b>6.3.3. Efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica</b> ..... | 33 |



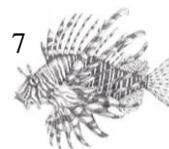
|   |    |
|---|----|
| 6.3.4. Efecto de inhibidores de proteasas sobre la actividad proteolítica .....                 | 33 |
| 6.3.5. Análisis estadístico .....   | 33 |
| 6.4. Análisis electroforético .....   | 33 |
| 6.5. Análisis cromatográfico (RP-HPLC) .....  | 34 |
| 6.6. Actividad proteolítica de una fracción del extracto del músculo de <i>Pterois</i> sp. .... | 34 |
| 7. Resultados .....   | 35 |
| 8. Discusión .....  | 40 |
| 9. Conclusión general .....   | 41 |
| 10. Perspectivas .....  | 42 |
| 11. Productividad académica .....   | 42 |
| Referencias .....   | 43 |
| Anexo .....   | 49 |

### Índice de Tablas

|  |    |
|--|----|
| Tabla 1. Taxonomía del Género <i>Pterois</i> .....                           | 15 |
| Tabla 2. Descripción de la anatomía externa de <i>Pterois</i> sp. NOAA ..... | 16 |
| Tabla 3. Proteasas estudiadas de músculo de peces .....                      | 28 |

### Índice de Ilustraciones

|   |    |
|---|----|
| Ilustración 1. A) <i>Pterois volitans</i> B) <i>Pterois miles</i> . Fotos Naturalista. .... | 15 |
| Ilustración 2. Anatomía externa <i>Pterois</i> sp. NOAA .....                               | 16 |
| Ilustración 3. Mecánica de la picadura del pez león. Imagen Morris 2013 .....               | 17 |



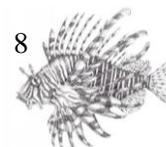
## 1. Introducción

El pez león *Pterois* sp. es un carnívoro de primer orden de talla mediana en los arrecifes de Coral del Indo Pacífico que pertenece a la familia Scorpaenidae. Dentro de dicha familia se encuentran varios de los peces óseos más venenosos y vistosos por su patrón de coloración y aletas modificadas. Son organismos de hábitos sedentarios que utilizan veneno (contenido principalmente en las aletas dorsales) como mecanismo de defensa. Se considera una especie invasora debido a las múltiples introducciones de la especie y su impacto en la estructura de la comunidad y biodiversidad de peces nativos de los ecosistemas coralinos del Caribe, reduciendo el reclutamiento, densidad, biomasa y diversidad genética, lo cual conlleva afectaciones económicas. Las condiciones ideales para su establecimiento se encuentran en zonas con profundidad de 1 a 50 m, temperatura entre los 18-30 °C, pH de 8-8.5 y salinidad de 30 – 40 ppm, siendo estas condiciones bastante amplias, lo que implica la fácil adaptación y establecimiento de la especie en los diversos océanos de clima tropical (González-C. y col., 2011). La longitud promedio de peces colectados en el Caribe es de un valor promedio de  $194 \pm 56$  mm con un peso promedio de  $256 \pm 200$  g (Arredondo-Chávez y col., 2016).

Desde su primer registro en Florida en 1992, ha expandido rápidamente su distribución geográfica a lo largo del Caribe y se proyecta que invadirá el Pacífico Oriental a través del Canal de Panamá (Díaz-Ferguson y Hunter, 2019). Para México se estima que de expandir su área de distribución se dará en zonas de mayor biodiversidad, y se contemplan 198 especies como presas potenciales incluyendo especies endémicas, lo cual impactará de manera negativa a la actividad pesquera (Reyes-Bonilla y Petatán-Ramírez, 2020). Debido a estas afectaciones en la actividad pesquera de las diversas costas de países donde actualmente se localiza el pez león los gobiernos han buscado reducir las poblaciones, buscando alternativas para su aprovechamiento. En este contexto, se pretende aportar información de las enzimas proteolíticas presentes en el músculo del pez león para su posterior uso en procesos biotecnológicos. El interés por el estudio de proteasas en músculo de organismos marinos ha surgido principalmente en el aprovechamiento de desechos de la industria pesquera, dejando de lado peces venenosos (Gokulalakshmi y col., 2018). Los estudios bioquímicos de los peces venenosos se han enfocado principalmente en caracterizar el veneno, es por ello que la mayoría de los estudios reportados sobre enzimas proteolíticas del pez león son del veneno. El veneno del pez león es uno de los más potentes y tóxicos de los venenos que se han descrito en peces (Ziegman y Alewood, 2015). Se han reportado enzimas proteolíticas, comúnmente llamadas proteasas, del veneno de pez león de aproximadamente 45 y 60 kDa con actividad óptima en un rango de pH de 7 a 9 (Manso y col., 2015).

Las enzimas son proteínas globulares, las cuales catalizan reacciones químicas en la célula. A diferencia de los catalizadores inorgánicos, las enzimas tienen una alta especificidad, tanto para el sustrato como para la reacción que catalizan. Por consiguiente, la clasificación se basa en el tipo de reacciones químicas que catalizan. De acuerdo con la clasificación recomendada por la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica (1961), las proteasas pertenecen a la clase de las hidrolasas, ya que catalizan reacciones de hidrólisis de los enlaces peptídicos (Mazur y Harrow, 1973). Por otra parte, las enzimas se han consolidado en el mercado, transformándose en un importante sector económico por su versatilidad y propiedades catalíticas (Del Moral y col., 2015).

Las proteasas son unas de las enzimas más utilizadas en la industria, abarcando hasta el 60% de las enzimas utilizadas en diversos procesos industriales como la producción de alimentos,



detergentes, textiles y también en la industria farmacéutica como biomarcadores para la especificidad de medicamentos (Hernández-Sámano y col., 2015; López-Otín y Bond, 2008). Dentro de la industria alimenticia, se han utilizado para mejorar las propiedades sensoriales de los alimentos y en la producción de alimentos funcionales, favoreciendo la digestibilidad y solubilidad de los mismos (Del Moral y col., 2015; Fernandes, 2014). Particularmente, en esta industria del conjunto de enzimas utilizadas (lipasas, lactasas, celulasas, proteasas, etc.) el mayor volumen corresponde a carbohidrasas y proteasas (Guerrero y Rosmini, 2018). Aunque la industria alimenticia es la que mayormente emplea proteasas, en la obtención de hidrolizados, estas también se pueden utilizar en el tratamiento de aguas residuales, lodos y desechos orgánicos. Es por esto que se requieren de estudios previos para determinar su posible aplicación.

Las enzimas marinas pueden ser proteínas únicas o similares a las encontradas en organismos terrestres, pero con propiedades diferentes. Varían en cuanto a peso molecular, composición de aminoácidos, pH y temperatura óptima de actividad, estabilidad, características de inhibición y propiedades cinéticas. Estas diferencias están dadas por las adaptaciones de los organismos al medio marino. La mayoría de estas enzimas se han obtenido de desechos de especies de importancia pesquera de peces y mariscos, pero también se han estudiado en algunas especies no convencionales como corales y anémonas con el propósito de conocer su fisiología (Sánchez y García, 2018). Las proteínas estructurales son ejemplo de las variaciones entre proteínas relacionadas a las características adaptativas de los organismos. Se conoce que, generalmente las proteínas estructurales de peces de aguas tropicales tienden a ser fácilmente desnaturalizadas durante la refrigeración en comparación a proteínas similares de los peces de aguas frías, debido a un acondicionamiento *in vivo* de las proteasas de aguas frías a las bajas temperaturas. Durante el almacenamiento en refrigeración las bajas temperaturas no son suficientes para inhibir las reacciones de deterioro atribuidas a las proteasas. En cambio, en las de aguas tropicales, acondicionados a mayores temperaturas *in vivo*, la refrigeración inhibe con mayor eficacia las reacciones de deterioro (Guerrero y Rosmini, 2018).

Particularmente, el músculo del pez contiene proporciones variables de tres tejidos principales: músculo blanco (lento), músculo oscuro (rápido) y tejido conectivo, debido a las funciones que llevan a cabo. El contenido de pigmentos en el músculo (mioglobina y citocromos) varía ampliamente entre especies dependiendo de los requerimientos de oxígeno y energía. La composición del tejido muscular varía con la edad, género, especie y estado de nutrición, aunque las proteínas constituyen la fracción más importante. Las proteínas sarcoplásmicas representan el 16 a 22 % del total de proteínas de tejido muscular, el grupo de proteínas contráctiles es 75 % del total de proteínas, y las proteínas del tejido conectivo son el 3 % (Foegeding y col., 2018).

Considerando lo anteriormente mencionado, el estudio de enzimas proteolíticas de especies marinas como el pez león, que además es una especie invasora, podría tener relevancia en varios aspectos como alternativa potencial para el uso de proteasas en procesos industriales, el aprovechamiento de los desperdicios de la industria pesquera, y/o el apoyo en proyectos de control de especies invasoras.

## 2. Antecedentes

### 2.1. Proteasas

#### 2.1.1. Definición

Las enzimas son proteínas globulares que catalizan reacciones químicas en la célula.

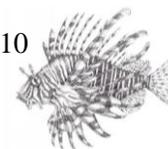
Las hidrolasas son enzimas que utilizan moléculas de agua como reactivo para la ruptura de enlaces químicos, catalizando reacciones hidrolíticas (Hernández-Sámano y col., 2017). Las enzimas proteolíticas, proteasas, proteinasas, péptido hidrolasas o peptidasas son enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos, rompiendo las moléculas proteicas de cadena larga en partes más pequeñas (Homaei y col., 2016). Las principales variables que determinan el resultado de las reacciones enzimáticas son la temperatura, el pH, la formación del complejo enzima – sustrato, la especificidad, y el tiempo de reacción (Benítez y col., 2008).

#### 2.1.2. Clasificación

Inicialmente las proteasas se clasificaron por su modo de acción catalítica como endoproteasas y exoproteasas. Las endoproteasas hidrolizan enlaces peptídicos dentro de la cadena de proteína, mientras que las exoproteasas eliminan aminoácidos terminales de las proteínas o péptidos (Benítez y col., 2008). También acorde con la hidrólisis dirigida al enlace terminal amino ( $\text{NH}_2$ ) o carboxilo ( $\text{COOH}$ ) del sustrato, se clasifican en aminopeptidasas y carboxipeptidasas, respectivamente (López-Otín y Bond, 2008). Actualmente, se emplea el sistema de clasificación de la Comisión de Enzimas (E.C.) de la Unión Internacional de Bioquímica (IUB), el cual se basa en el mecanismo del sitio catalítico de las proteasas, el cual difiere conforme a los aminoácidos y otros ligandos que intervienen en la formación del complejo enzima-sustrato, promoviendo la catálisis. Por lo anterior se divide a las enzimas proteolíticas en 4 grupos: serín, cisteín, aspartil y metaloproteasas, según intervengan los aminoácidos serina, cisteína, ácido aspártico o algún ion metálico respectivamente (Sriket, 2014). Esta clasificación de proteasas es jerárquica basada en los conceptos de tipo catalítico, clan, familia y peptidasa (Homaei y col., 2016). Las proteasas de las diferentes clases se pueden agrupar en familias según la comparación de las secuencias de aminoácidos y las familias pueden agruparse en clanes basado en similitudes en su estructura tridimensional. Siendo las metalo y serínproteasas, las clases más abundantes seguidas de las cisteín proteasas (López-Otín y Bond, 2008).

Las proteasas, también se pueden clasificar en base a su sensibilidad al pH en proteasas alcalinas, ácidas y neutras (Sriket, 2014).

Además de estas clasificaciones, Barrett y col. (2001) idearon un esquema de clasificación basado en similitudes estadísticamente significativas en la secuencia y estructura de todas las enzimas proteolíticas conocidas y denominaron esta base de datos como MEROPS. El sistema de clasificación divide a las proteasas en clanes formados por el conjunto de familias en las que todas las peptidasas han evolucionado a partir de un único ancestro y las familias incluyen peptidasas que presentan homología en su secuencia aminoacídica (Cera, 2009). El sistema MEROPS incluye familias de peptidasas de seis tipos catalíticos: aspárticas, cisteínicas, glutámicas, metalopeptidasas, séricas y treonínicas, además de una familia transitoria donde se incluyen peptidasas de mecanismo catalítico aún desconocido (Morcelle y col., 2009).



### **a. Serín proteasas**

Las serina proteasas, o serín proteasas, son enzimas alostéricas que presentan serina en su sitio activo. Muchas de ellas requieren del procesamiento proteolítico de un zimógeno precursor inactivo. Esta plasticidad sin duda dicta muchos aspectos de la función, regulación e incluso de la especificidad al sustrato (Cera, 2009). Usualmente las serín proteasas, son endoproteasas como la tripsina, quimotripsina y la elastasa. Sin embargo, se han descrito varias familias de exoproteasas (Cera, 2009). Generalmente son activas a pH neutro y alcalino, con un rango óptimo de pH 7-11. Su rango de peso molecular está entre los 18 – 35 kDa (Sriket, 2014). El grupo de las serín proteasas es el más abundante y funcionalmente diverso. Están ampliamente distribuidas en la naturaleza y se encuentran en todos los reinos de la vida celular, así como en muchos genomas virales (Cera, 2009).

### **b. Aspartil proteasas**

Las aspartil proteasas son un grupo de endoproteasas caracterizadas por su alta actividad y estabilidad a pH ácido. Se les denomina como aspartil o carboxil proteasas debido a que su sitio catalítico está compuesto de un grupo carboxilo de dos residuos de ácido aspártico (Khaled y col., 2011). La mayoría pertenece a la familia de las pepsinas. Estas enzimas son activadas predominantemente en un rango ácido de pH 2-4 y son específicamente inhibidas por la pepstatina A (Sriket, 2014). Estas enzimas son producidas como zimógenos en diversos órganos y tejidos.

### **c. Cisteín proteasas**

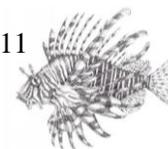
Las tiol o cisteín proteasas son un grupo de endoproteasas con residuos de histidina y cisteína en sus centros activos (Sánchez y García, 2018). En su mayoría, son activas en presencia de agentes reductores, como el cianuro de hidrógeno o la cisteína. Tienen un pH óptimo neutro, aunque algunas de ellas son más activas a pH ácido. El ejemplo más conocido de una cisteín proteasa es la papaína (enzima del fruto llamado papaya) (Vigueras-Morales y col.).

### **d. Metaloproteasas**

En tanto a las metaloproteasas la actividad es promovida por un catión metálico, siendo el zinc el más frecuente y siendo inhibidas por agentes quelantes como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y algunas veces por el proceso de diálisis. En algunos casos el zinc es reemplazado con otro metal como, cobalto, manganeso o níquel (Carmeli y col., 2004). Son responsables de la degradación de colágeno en fluidos extracelulares (Sriket, 2014).

## **2.1.3. Importancia biológica**

En las primeras etapas de la evolución de las proteínas, junto a los primeros organismos las proteasas, seguramente, surgieron como simples enzimas destructivas necesarias para el catabolismo de proteínas y la generación de amino ácidos (López-Otín y Bond, 2008). El estudio de las proteasas se ha ido ampliando dando a conocer otras funciones biológicas, de modo que las peptidasas no son meros dispositivos catalíticos trabajando en solitario en busca



del sustrato para hidrolizar. Las proteasas regulan el destino, localización y actividad de muchas proteínas, actúan como moduladores en las interacciones entre proteínas, crean nuevas moléculas bioactivas, y contribuyen a la comunicación celular, generando, transduciendo y amplificando señales moleculares. En consecuencia, de estas diversas acciones, las proteasas influyen en la replicación y transcripción, proliferación celular y diferenciación, autofagia, morfogénesis de tejido y remodelación, angiogénesis, reparación de tejido, entre otros roles esenciales en el comportamiento celular y sobrevivencia y muerte de todos los organismos (López-Otín y Bond, 2008). Dado que catalizan reacciones esencialmente irreversibles, existen diversos mecanismos de regulación. Algunos de los mecanismos de la regulación *in vivo*: regulación de expresión de genes, activación de zimógenos, bloqueo por inhibidores endógenos, compartimentos específicos como lisosomas, mitocondrias, y modificaciones postraduccionales. Además de estos mecanismos reguladores, la proteólisis también puede ser modulada por cambios epigenéticos en las regiones promotores de genes de proteasas, control de la estabilidad, traducción y degradación de ARN. Así mismo, la actividad natatoria, el estado nutricional y el estrés afectan la activación o inhibición de los sistemas proteolíticos (Cera, 2009; Vélez y col., 2017a).

Particularmente en el músculo, el cual representa un alto porcentaje del peso corporal, los sistemas proteolíticos ejercen un rol importante controlando el recambio proteico, reciclamiento de aminoácidos o sus usos para producción de energía, así como otras funciones como en la regulación del crecimiento de músculo en vertebrados que requiere de un equilibrio entre proteínas sintetizadas y su degradación (Vélez y col., 2017b). Específicamente en el músculo de peces, se ha reportado el sistema ubiquitina-proteosoma, las calpainas, las catepsinas y las caspasas como las principales proteasas presentes en músculo esquelético.

En mamíferos son calpainas citoplasmáticas y catepsinas lisosomales las más relevantes en el recambio proteico del músculo degradando la troponina T, la troponina I, la tropomiocina, la tubulina y la miosina, siendo capaces de desintegrar el disco Z y la línea M en el sarcómero *in vitro* y de liberar  $\alpha$ -actina de miofibrillas aisladas (Kolodziejaska y Sikorski, 1996).

Muchos de los procesos biológicos clave recaen en las serín proteasas, al que pertenece la quimotripsina. Algunos de ellos son la coagulación de la sangre y la respuesta inmune, que involucra cascadas de activación secuencial zimógena (Cera, 2009). Aunque, las tripsinas son las enzimas con la expresión genética más predominante, produciendo las enzimas responsables de la digestión, la coagulación, el desarrollo, la fertilización, la apoptosis y la inmunidad (Cera, 2009). Además, se sabe que el recambio de proteína tienen una gran relevancia durante los periodos de mayor crecimiento (alevines vs. juveniles vs. adultos) (Vélez y col., 2017b) y la regulación positiva o negativa de las actividades de las proteasas puede alterar significativamente el crecimiento muscular y la acumulación de proteínas (Lysenko y col., 2017; Valenzuela y col., 2017) por ello el sistema proteolítico es considerado necesario para el completo entendimiento del desarrollo y crecimiento en peces (Vélez y col., 2017b).

#### **2.1.4. Importancia económica**

La historia del uso de las proteasas se remonta al menos hasta finales del siglo XVIII (Homaei y col., 2016), actualmente están entre las enzimas más estudiadas (Ktari y col., 2012). Cerca del 75% de las enzimas industriales son enzimas hidrolíticas, abarcando cerca del 60% del

total de ventas de enzimas en el planeta (Espósito y col., 2009). Estas enzimas tienen múltiples aplicaciones en investigación básica, en procesos industriales como reactivos bioquímicos o manufacturación de productos resultando en la producción de detergentes, alimentos, textiles, procesamiento del cuero, medicamentos, recubrimiento de plata y tratamiento de desperdicios (Homaei y col., 2016).

Dentro de la industria destaca la producción de hidrolizados de proteínas para la elaboración de salsas, extracción de pigmentos, elaboración de alimentos para dietas enterales e incluso en el tratamiento de aguas residuales (Sánchez y García, 2018; Ktari y col., 2012). En la industria farmacéutica son utilizadas como biomarcadores o para dar especificidad a los medicamentos (Hernández-Sámano y col., 2015; López-Otín y Bond, 2008).

Sin embargo, también existen afectaciones económicas por causa de las enzimas proteolíticas endógenas, como lo es la degradación de proteínas de colágeno por actividad colagenolítica, que es un problema crucial en la industria pesquera y la acuicultura (Sriket, 2014). En atención a este problema se han llevado a cabo diversos estudios caracterizando las proteasas involucradas en el ablandamiento de la carne de pescado, mismas que determinan la calidad de la carne, así como de sus inhibidores (Vélez y col., 2017a).

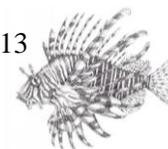
### **2.1.5. Proteasas marinas**

El ambiente marino proporciona una diversidad de hábitats únicos exponiendo a los organismos a diversas condiciones físicas del medio. Esto ha resultado en diversas formas de adaptación, comprendiendo aproximadamente más de la mitad de la biodiversidad total del planeta, y generando una gran y variada gama de moléculas bioactivas, como las proteasas (Cheung y col., 2015). Estas adaptaciones les dan características únicas como la halotolerancia, termotolerancia, adaptabilidad a bajas temperaturas y tolerancia a cambios de presión, lo que ha resultado en un mayor interés en los recursos marinos para la obtención de enzimas con aplicaciones biotecnológicas (Fernandes, 2014; Sánchez y García, 2018)

En común con todas las enzimas, factores externos como la temperatura, pH y el tipo de sustrato son importantes para la actividad, la eficiencia de la catálisis, la estabilidad y el funcionamiento apropiado de las proteasas (Homaei y col., 2016). Muchas enzimas de origen marino ya se han reportado en organismos terrestres, pero se ha observado variación entre ambos tipos en cuanto a la composición de aminoácidos, peso molecular, pH y temperatura óptimos de actividad, estabilidad, características de inhibición y propiedades cinéticas (Haard y Simpson, 2019).

En las últimas décadas, las enzimas marinas han sido sugeridas en muchas aplicaciones industriales como en productos farmacéuticos, suplementos nutricionales, pruebas moleculares, cosméticos, aditivos alimentarios, productos químicos finos y agroquímicos. La capacidad de mantener una enzima activa a bajas temperatura y la resistencia a la contaminación bacteriana ha hecho que las enzimas digestivas de organismos marinos puedan ser útiles en el procesamiento de alimentos (Homaei y col., 2016).

Gran número de enzimas se han aislado a partir de desechos de la industria pesquera de especies convencionales como atún, cazón, carpa, salmón, pulpo, calamar, pepino de mar y almejas, entre otras. Las enzimas proteolíticas más importantes de las vísceras del pescado e invertebrados acuáticos son las aspartil proteasas como la pepsina y las serín proteasas como la tripsina, quimotripsina, colagenasa y elastasa. También se han caracterizado proteasas en especies no convencionales como corales, anémonas e hidras, con el fin de conocer la fisiología y comportamiento de estos organismos (Sánchez y García, 2018).



La tripsina ha sido aislada y caracterizada de muchas especies de peces y mariscos como la carpa (*Cyprinus carpio*) y verdadera sardina (*Sardinops melanostictus*), entre otras especies (Ktari y col., 2012).

Las metaloproteasas se han reportado en tejido muscular de algunos animales marinos (Benítez y col., 2008; Sánchez y García, 2018). Las proteinasas aspárticas de vertebrados se han clasificado como catepsina D, catepsina E, pepsina, quimosina y renina.

### **2.1.6. Proteasas de peces de la familia Scorpaenidae**

La familia Scorpaenidae alberga a varias de las especies de peces óseos más venenosos; por tal motivo la investigación se ha centrado en el estudio de los venenos de dichas especies y es precisamente en el veneno donde se han caracterizado casi todas las proteasas.

El veneno del pez león causa un dolor muy intenso e incapacidad temporal en la víctima; indirectamente, podría causar el ahogamiento de la persona si entra en choque o en estado de pánico (Morris y Whitfield, 2009). Su naturaleza proteica lo hace termolábil a 50-60 °C. Su naturaleza neurotóxica, está relacionada con la presencia de colinesterasa y una o más neurotoxinas en el complejo proteico (Cohen y Olek, 1989).

La primera toxina aislada del veneno de *Scorpaena plumeri* fue Sp-GP, una proteasa de 72 kDa con actividad gelatinolítica. El valor óptimo de pH para su actividad se encontró en un rango de 7-8 (Campos y col., 2016). Sri Balasubashini y col. (2008) describieron una proteasa gelatinolítica con un peso molecular de 45 kDa en el veneno de *Pterois volitans* y un péptido preapoptótico de 7.6 kDa, y también detectaron presencia de metaloproteasas. De igual manera se reportaron proteasas gelatinolíticas de 45 y 60 kDa que muestran actividad en un rango de pH 3-10, mostrando mayor actividad a pH de 7-9 (Manso y col., 2015). Asimismo, Pérez B. (2018) reportó proteasas gelatinolíticas en el veneno de *P. volitans* aunque de pesos moleculares distintos de 250 a 75 kDa y de 26 kDa.

Por otra parte, Bracho y Haard (1995) identificaron dos metaloproteasas en el músculo del pez piedra del pacífico (*Sebastes* sp.), siendo este el único reporte de proteasas descritas en músculo de un pez de la familia Scorpaenidae, de 47 y 48 kDa. La actividad enzimática fue mayor a pH 7-8. Dichas proteasas eran activadas por calcio, acetato 4-mercúrico y por calentamiento e inhibidas por queladores de calcio. Reportaron mayor actividad proteolítica con colágeno y gelatina como sustratos y un incremento significativo de la actividad a temperaturas de 25 a 40 °C.

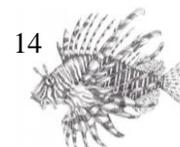
## **2.2. Pez león (*Pterois* sp.)**

### **2.2.1. Taxonomía**

El pez león es uno de los peces más vistosos o llamativos de los arrecifes coralinos del Indo-Pacífico que pertenece a la Familia de Scorpaenidae, subfamilia Pteroinae.

Los peces de la familia Scorpaenidae adquieren una mayor importancia entre los peces marinos ya que son responsables de lesiones graves y ocasionalmente muertes humanas en todo el planeta. Esta familia tiene la distinción de contener más especies venenosas que cualquier otra familia de peces óseos (Santhanam, 2019).

Como se muestra en la Tabla 1, el orden de los Scorpaeniformes, pertenecientes a la subfamilia *Pteroinae* comprende 27 especies en 5 géneros: *Pterois* (12 especies),



*Dendrochirus* (6 especies), *Ebosia* (4 especies), *Brachypterois* (3 especies) y *Parapterois* (2 especies) (Díaz-Ferguson y Hunter, 2019).

De las dos especies invasoras *P. volitans* y *P. miles* (Ilustración 1), la más común en el Caribe (> 90%) es *P. volitans*, mientras que *P. miles* se restringió a la costa de Florida. Estas especies son muy próximas y parecidas taxonómicamente por lo que a veces se utilizan como sinónimos (Díaz-Ferguson y Hunter, 2019; Bouchon y Bouchon-Navaro, 2010). Las especies *P. volitans* y *P. miles* se diferencian en el número de radios en las aletas dorsales (11 y 10) y anales (7 y 6), aunque este carácter es poco confiable por lo que se emplean técnicas moleculares para la determinación de cada especie (González-C. y col., 2011; Wilcox y col., 2017).

Estas similitudes y diferencias entre ambas especies son significativas ya que puede haber variaciones en las proteínas que se encuentren en diferentes especies, por ello para normalizar factores intraespecíficos la especie A y B deben tener la misma edad, medida y sexo, fase de desove, historial de desove, composición de dieta, consumo de alimento, temperatura del hábitat y profundidad, calidad del agua, etc. (Haard y Simpson, 2000). Como sucede con estas dos especies, llegando a ser sinónimos.

Tabla 1. Taxonomía del Género *Pterois*.

|                        |
|------------------------|
| Reino: Animalia        |
| Filo: Chordata         |
| Subfilo: Vertebrata    |
| Clase: Actiniopterygii |
| Orden: Scorpaeniformes |
| Familia: Scorpaenidae  |
| Subfamilia: Pteroinae  |
| Género: <i>Pterois</i> |



Ilustración 1. A) *Pterois volitans* B) *Pterois miles*. Ambas fotografías de Naturalista.

### 2.2.2. Anatomía externa y aparato venenoso

Se ha reportado que la talla máxima observada para un *Pterois* en su rango nativo (Océano Pacífico) es de 30 cm, mientras que el registro de talla máxima en el Mar Caribe es de 49 cm de longitud total (Aguilar-Perera y Carrillo, 2014).

En la familia Scorpaenidae, existen tres tipos de dispositivos venenosos específicos para los géneros *Escorpeno*, *Synances* y *Pterois* (Halstead, 1978). El dispositivo venenoso del género *Pterois* se distribuye en las aletas dorsales, anales y pélvicas (Ilustración 2, Tabla 2)

(Bouchon y Bouchon-Navaro, 2010). En la Ilustración 3 se muestra el mecanismo de la liberación del veneno de las espinas venenosas, así como la ubicación anatómica.

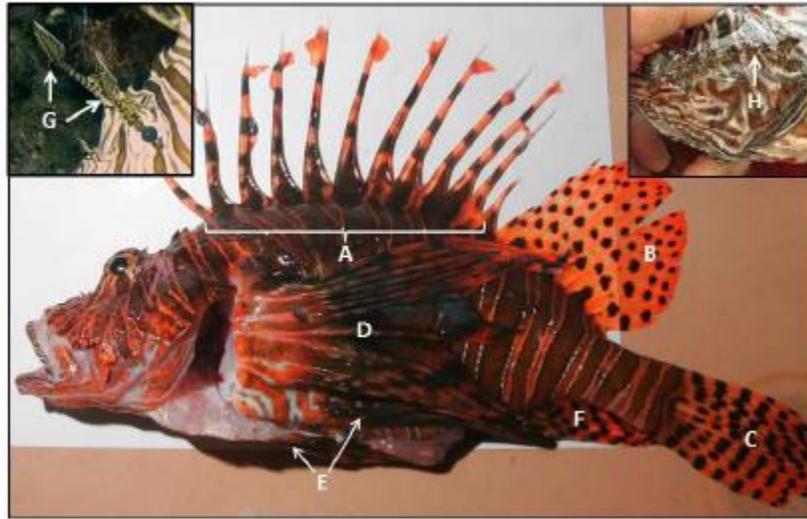


Ilustración 2. Anatomía externa *Pterois* sp. Fotografía obtenida de archivo de NOAA.

Tabla 2. Descripción de la anatomía externa de *Pterois* sp. Obtenido de la NOAA.

| Código | Descripción               | Venoso | Notas  |
|--------|---------------------------|--------|--|
| A      | Espinas dorsales          | SÍ     | 13 espinas, todas son venenosas  |
| B      | Aleta dorsal blanda       | No     | La aleta dorsal secundaria; no es venosa   |
| C      | Aleta caudal              | No     | No venosa  |
| D      | Aleta pectoral            | No     | No venosa  |
| E      | Aleta pélvica             | Sí     | La primera espina de cada aleta pélvica es venenosa  |
| F      | Aleta anal                | Sí     | Las primeras tres espinas de la aleta anal son venosas   |
| G      | Tentáculos supra-oculares | No     | Se perdieron en el organismo   |
| H      | Espinas operculares       | No     | Los individuos más grandes pueden tener protuberancias óseas prominentes en el opérculo y la cabeza; recuadro derecho, también denominado "cheek mail" |

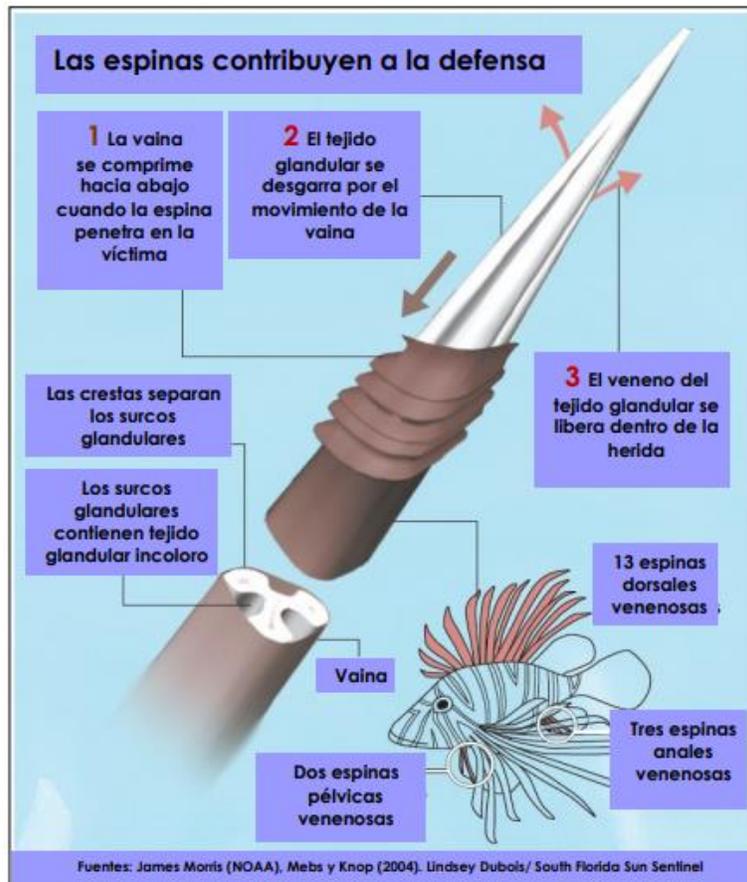


Ilustración 3. Mecánica de la picadura del pez león. Imagen Morris, 2013.

### 2.2.3. Alimentación

Los peces del género *Pterois* son considerados carnívoros de primer orden, generalistas de los que se ha documentado consumen más de 50 especies de peces, crustáceos y camarones dentro del rango invasivo. Cualquier pez de tamaño igual o inferior a 15 cm es una presa potencial para el pez león. El pescado representa el 85% de su dieta complementada por invertebrados. Su consumo diario se ha estimado en 0.05 g de presa por gramo de *Pterois*. Por lo tanto, en las áreas de muy alta densidad de *Pterois*, como en las Bahamas, se estima depreda un aproximado de 800 kg de presas por hectárea por año (Bouchon y Bouchon-Navaro, 2010). Normalmente dentro de su área de distribución nativa son depredadores nocturnos, mientras que en el rango invasivo también es activo durante el día (Díaz-Ferguson y Hunter, 2019). Son sedentarios por lo que emboscan a su presa. Tienen dientes pequeños los cuales no intervienen en la retención de la presa y utilizan sus grandes aletas pectorales para acorralar a sus presas.

Una vez que se instalan en un sitio, tienen un comportamiento territorial agresivo y cazan dentro de esa área que no excede de unas pocas decenas de metros. Aunque, entre congéneres pueden compartir su territorio y ayudarse para derribar a la presa (Bouchon y Bouchon-Navaro, 2010).

#### 2.2.4. Hábitat y distribución en México

Los Scorpaeniformes se caracterizan por vivir en o cerca del fondo (bentónico o bentopelágico) que se encuentra comúnmente en aguas tropicales y templadas. Entre los factores físicos, la temperatura parece ser el principal factor limitante para un reclutamiento exitoso (temperaturas menores a 10 °C) aunque prefieren aguas cálidas (mayores a los 15 °C), lo que les posibilita la expansión de su distribución en una región geográfica muy grande que incluye aguas templadas, subtropicales y tropicales (Kimball y col., 2004; Carrasco, 2004).

No se ha identificado alguna preferencia de hábitat, al menos para *P. volitans*, y la especie se puede encontrar en pastos marinos, manglares, sustratos de fondo rocoso y corales, lugares donde se pueden proteger del oleaje y las corrientes debido a que su morfología no les permite nadar activamente.

El rango de distribución nativo de *P. miles* abarca el Océano Índico y se extiende desde África del sur hasta el Mar Rojo y el Golfo Pérsico y para el este hasta Sumatra. *P. volitans* es una especie ampliamente distribuida en el Océano Pacífico: de Indonesia hasta Japón del norte y en el Pacífico central y el Pacífico del sur. Indonesia constituye la región donde se superponen la distribución de ambas especies.

Hamner y col. (2007), mostraron que de las especies invasoras del océano Atlántico el 93% de los individuos capturados pertenecen a *P. volitans* y solamente el 7% a *P. miles*. Por el momento *P. miles* está confinado a la costa este de Estados Unidos y *P. volitans* se extiende por el Mar Caribe.

En la región del Indo-Pacífico, su distribución batimétrica se extiende hasta los 175 m. En el Atlántico tropical, los juveniles se han observado cerca de la superficie, entre las raíces de los mangles, y a 150 m de profundidad. Reportes en el Caribe delimitan su rango desde la superficie hasta los 50 – 60 m de profundidad (Molina, 2009; Santhanam, 2019). En Yucatán, han sido reportados en arrecifes coralinos principalmente, aunque han sido vistos cerca de muelles y raíces de mangle (Aguilar-Perera y Tuz-Sulub, 2010).

Se ha propuesto que la expansión podría continuar en tres regiones, (1) el Atlántico noroccidental, (2) el Atlántico suroccidental, (3) en la región del Indo-Pacífico. El aumento de la temperatura de la superficie del agua debido al cambio climático también podría facilitar esta expansión por el Canal de Panamá y el Pacífico oriental (Díaz-Ferguson y Hunter, 2019; Pinsky y col., 2020). En el estudio de Reyes-Bonilla y Petatán-Ramírez (2020), se contempla la expansión del territorio del pez león en el Golfo de California.

#### 2.2.5. Reproducción

Las características ecológicas y de conductas de *P. miles* y *P. volitans* son idénticas por lo que se pueden abordar de la misma manera. Sus características reproductivas permiten explicar, en parte, su éxito en la invasión del Atlántico y particularmente del Caribe. Poseen sexos separados y la reproducción se efectúa en pareja. La proporción de sexos es de 1:1. Los machos alcanzan su tamaño de madurez sexual hasta una longitud aproximada de 9 cm y las hembras 18 cm. La mayoría de las especies de *Pterois* son iteroparas y cada hembra puede producir hasta 30,000 huevos en cada periodo de desove (Bouchon y Bouchon-Navaro, 2010; Díaz-Ferguson y Hunter, 2019).

Se desconoce si hay una variación estacional reproductiva en su región de origen, pero el periodo de reproducción se mantiene todo el año. El periodo reproductivo se da en el

atardecer o durante la noche. Una hembra pone, durante 4 días dos masas de huevos envueltos en mucus, posteriormente, son fertilizadas por un macho y flotan a la superficie durante dos días hasta que el mucus se degrada y los embriones son liberados. Las hembras de *P. volitans* llegan a desovar, en promedio, 2 millones de huevos al año (Díaz-Ferguson y Hunter, 2019). El desarrollo larvario se estima dura de 25 a 40 días durante los cuales la larva es plantónica. Seguido de este periodo, la larva nada al fondo y se convierte en un juvenil de 1.0 a 1.2 cm (Fishelson, 1975).

Se ha reportado que durante el desove ocurre el mayor cambio de actividad enzimática, siendo el único factor estacional notable responsable de tal cambio. Por lo cual también es importante considerar las características reproductivas del organismo (Haard y Simpson 2000).

### 2.2.6. Importancia ecológica

*P. volitans* y *P. miles* son las dos especies involucradas en la invasión del pez león en el Atlántico. Se teoriza que la invasión inició con seis especímenes de *Pterois* sp. que escaparon de un acuario dañado por el huracán Andrew en el 1992, en el sur de Florida; pero no fue hasta 2006 que se reportaron poblaciones bien establecidas. En enero de 2009 se reportó por primera vez en México, a lo largo de Cozumel a donde llegó por medio de la corriente del Caribe (Aguilar-Perera y Carrillo, 2015). En diciembre del mismo año se dan los primeros avistamientos de dos individuos en el Golfo de México, en la Península de Yucatán (Bouchon y Bouchon-Navaro, 2010).

Las especies invasoras son una amenaza ampliamente reconocida y creciente para la biodiversidad global. Las especies invasoras compiten con los organismos nativos por espacio y recursos, y pueden alterar procesos ecológicos (Aguilar-Perera y Carrillo, 2014). Docenas de especies de peces se han convertido en invasoras en todo el mundo como resultado de la actividad humana, y muchas otras se convirtieron en invasoras con más de 6000 introducciones de especies no nativas (Gozlan, 2008). La probabilidad de que una especie introducida se convierta en una invasiva depende de su ecología y rasgos, como su nicho de origen, tasa de crecimiento, capacidad reproductiva o tolerancia al disturbio, los cuales están delimitados por características fisiológicas (Stell y col., 2019).

Como se mencionó anteriormente, las ecologías de las dos especies de *Pterois* involucradas en la invasión del Atlántico son idénticas tanto en su comportamiento como en su papel ecológico. Ambas especies ha experimentado múltiples introducciones, son depredadores generalistas, tienen un alto rendimiento reproductivo, rápido crecimiento, y un comportamiento pasivo, que ha contribuido al éxito de la invasión. Además de estas características, el pez león parece ser resistente a cambios de salinidad, pH y a enfermedades infecciosas (Díaz-Ferguson y Hunter, 2019), a excepción de un reporte de úlceras en la piel de individuos del norte del Golfo de México (Harris y col., 2020).

Estos peces consumen grandes cantidades de alimento de más de 50 especies nativas de peces e invertebrados, algunas de las cuales son ecológica y económicamente importantes. En el Caribe y el Atlántico occidental, la propagación del pez león ha creado una gran preocupación por la salud de los arrecifes de coral que ya están amenazados por otras tensiones. Por ejemplo, los estudios en las Bahamas han demostrado que el pez león puede reducir el reclutamiento de peces de arrecife nativos hasta en un 79%, siendo la depredación el mecanismo probable (Arredondo-Chávez y col., 2016). Malpica-Cruz y col. (2019) estimaron que un pez león adulto podía consumir 8.9% de su masa corporal por día basándose

en las observaciones en Las Bahamas lo que era más del doble de su requerimiento energético diario. También, se ha demostrado experimentalmente que un solo pez león redujo la abundancia promedio de peces por arrecife en un 93.7%, un efecto negativo 2.6 veces más fuerte que el de un pez mero nativo (Díaz-Ferguson y Hunter, 2019). Esta exagerada asimilación de energía le permite al pez león crecer y reproducirse mucho más rápido que los depredadores nativos, alcanzando la madures sexual en menos de un año y desove frecuentemente, como cada 4 días (Stell y col., 2019).

Pese a que, en el Caribe, se ha encontrado *Pterois* en el estómago de algunos peces grandes como meros (*Mycteroperca tigris* y *Epinephelus striatus*) y jureles (*Seriola* sp.), la sobreexplotación comercial de dichos depredadores lo suficientemente grandes, limitará este factor regulador en muchas regiones del Caribe (Bouchon y Bouchon-Navaro, 2010; Maljković y col., 2008).

La amplia tolerancia térmica que presenta el pez león,  $\approx 25^{\circ}\text{C}$ , ha permitido que invada un amplio rango latitudinal, así como arrecifes mesofóticos fríos de hasta 100 m de profundidad. Se han realizado estudios en los que se observa una preferencia de temperatura para el aumento de la tasa alimentaria del pez león. Barker y col. (2018) encontraron una temperatura preferencial de  $28.7^{\circ}\text{C}$  en el pez león invasor de Florida. Similar al óptimo de  $29.8^{\circ}\text{C}$  para la ingesta voluntaria de alimentos encontrado por Stell y col. (2019).

El estudio realizado por Stell y col. (2019) sugiere que la tasa metabólica está asociada al incremento de la temperatura del mar y por lo tanto incrementa la tasa de alimentación del pez león. Sus resultados mostraron que el pez león digiere de manera más eficiente y rápida a  $32^{\circ}\text{C}$  que a  $26^{\circ}\text{C}$  y observaron un aumento de 42% de la comida consumida. Esto, aunado a que el pez león consume grandes cantidades de comida y sobrevive al menos tres meses sin alimentarse, logrando regular su intestino, los vuelve una especie robusta con muchas ventajas adaptativas para expandir su distribución y verse beneficiado del calentamiento de la temperatura del mar.

### **2.2.7. Importancia económica**

Millones de personas en el planeta dependen del medio marino, por su valor nutricional, recreativo y económico. Mayormente en regiones tropicales, la economía depende en gran medida de la pesca para la subsistencia de la industria de exportación local y para el turismo (Gerwick y Moore, 2012). Aunque los efectos adversos de las invasiones son más evidentes en los ecosistemas terrestres, la situación en los ecosistemas marinos no es la excepción. En el medio marino, las invasiones han incrementado exponencialmente en los últimos 200 años y pueden ser enormemente costosas en términos económicos, ecológicos y de manejo (Aguilar-Perera y Carrillo, 2014). Disminución en la pesca y el turismo son parte de las problemáticas que conlleva la invasión del pez león, por ejemplo en los estados de Florida, y California norte y sur, en donde se estima que el valor de la pesca de especies nativas es de 29.6 millones de dólares, fueron afectados por la proliferación del pez león, por lo que existen programas permanentes de captura de esta especie (Johnston y col., 2015).

También su presencia puede constituir una molestia en actividades acuáticas, propias del turismo. Representan una amenaza para los bañistas, apneístas y buceadores, aun cuando se les advierte del peligro. También supone un peligro para pescadores, que corren un riesgo significativo al manipular al pez cuando es capturado.

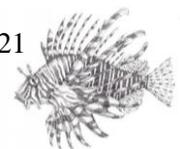


Para Yucatán, no existen reportes que indiquen que el pez león se alimente de organismos de importancia comercial (meros, pulpo, langosta, etc.). Tampoco existe algún reporte de que peces nativos (meros) lo consuman. Por tanto, no se conoce el impacto económico (Aguilar-Perera y Carrillo, 2015). De acuerdo con los modelos y mapas de distribución potencial del Pacífico oriental tropical propuestos por Reyes-Bonilla y Petatán-Ramírez (2020) la llegada de *Pterois* sp. podría afectar a casi 200 especies de peces de las cuales varias son endémicas e incluyen algunas de importancia comercial. Una de las zonas con mayor potencial para ser colonizado por el pez león es el Golfo de California, por sus condiciones oceanográficas es una zona de importancia pesquera y de alta biodiversidad. De acuerdo al atlas “Food and Agricultural Overview”(Agricultura, 2019) del Gobierno Federal de México las principales especies de la maricultura son ostras (*Crassostrea gigas*, *C. virginica*, *C. iridescens*, *C. rhizophorae*, *C. corteziensis*), atún (*Katsawonus pelamis*, *Thunnus alalunga*, *T. albacares*, *T. obesos*), camarón (*Farfantepenaeus californiensis*, *Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris*), langosta (*Palinurus elephas*), tilapia (*Oreochromis auerus*), pulpo (*Octopus maya*, *O. vulgaris*) y sardina (*Sardinops caeruleus*) de las cuales la mayoría se obtiene de la costa del Pacífico, contribuyendo en 87.9% de la producción pesquera del volumen total mientras que el Golfo de México y el Caribe contribuyen un 12%. Contemplando un escenario en cual el pez león expanda su territorio a las costas del Pacífico resulta un problema significativo para la economía del país. Aun así, se puede aprovechar y constituir un recurso comercial ya que su carne tiene alto valor nutricional, es blanca y es considerada un excelente alimento, además de ser un atractivo para los turistas (Bouchon y Bouchon-Navaro, 2010; Harris y col., 2019). Sin embargo, actualmente los peces Scorpaeniformes tienen poca importancia comercial en el Atlántico centro-occidental (Santhanam, 2019). Particularmente, el pez león ha sido de gran importancia como especie ornamental (Lyons y col., 2019). Debido a sus vibrantes coloraciones (en tonos de rojo, naranja, amarillo, tostado, marrón, gris y blanco) y con marcas y comportamientos complejos, numerosas personas los mantienen en tanques. Además, son peces extremadamente resistentes a enfermedades y se adaptan muy bien a la vida en los acuarios (Charlotte y col., 2016). Cabe mencionar que en México ha surgido la compra-venta de ejemplares ya introducidos y capturados en el Caribe mexicano. De acuerdo a lo reportado por Aguilar-Perera y Carrillo (2014) el precio del pez está en un rango de 300 a 800 pesos mexicanos, según el tamaño y origen, siendo los más caros, los ejemplares provenientes de Estados Unidos que los capturados en el estado de Quintana Roo, México.

Por otra parte, se han realizado estudios con el veneno de pez león y se ha demostrado que contiene sustancias bioactivas, péptidos y proteasas que podrían ser útiles en el desarrollo de nuevos medicamentos. En general, la investigación sobre el veneno y la generación de un fármaco es lenta, pero es un campo que se está explorando activamente (Santhanam, 2019).

### **2.2.8. Legislación para control de poblaciones**

En 2010, México fue sede del primer taller para la atención del pez león, donde participaron países y organizaciones tales como: Belice, Bahamas, Colombia, Cuba, República Dominicana, EE.UU., Jamaica, Antillas Francesas, México, Puerto Rico, San Maarten, Turks, Caicos, Islas Vírgenes EE.UU., Venezuela, Bermudas, Bonaire, las Islas Caimán y el Centro Internacional para Agricultura y Biociencias (ICRI, 2010). En esta reunión se dio a conocer la situación del pez león en cada país, así como las estrategias, desafíos y necesidades que han implementado o han surgido para el control de éste (Villaseñor-Reyes, 2018).



En la zona del Golfo de México, en el Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano se ha optado por reclutar voluntarios para la extracción de pez león, a los que previamente se les da una capacitación acerca de las características y problemática que la especie representa para el ecosistema (Villaseñor-Reyes, 2018). En Cozumel y en Puerto Morelos (Quintana Roo) se comercializa como filetes y se exporta a Estados Unidos (Negrete-Soto y col., 2012). En Yucatán, no se utiliza la carne, pero existen iniciativas para fomentar su consumo (Aguilar-Perera y Carrillo, 2015).

Como principal mecanismo de control de la población de peces león en el Caribe se ha utilizado la pesca individual y el consumo. Adicionalmente, se promueve la venta de los pescados a particulares y restaurantes (Bouchon y Bouchon-Navaro, 2010). Otras medidas han sido la organización de eventos, llamados “rodeos” o “derbis” para eliminar grandes cantidades de población a la vez (Díaz-Ferguson y Hunter, 2019).

Otro mercado es la elaboración de artesanías utilizando las aletas para elaborar aretes y collares, la piel para productos comestibles (frituras), productos alimenticios como embutidos, preparado de harinas de pez león para alimento de otras especies en acuicultura y/o el aprovechamiento biomédico de la especie, para lograr un aprovechamiento integral, incentivando y fomentando la participación de las cooperativas pesqueras y las comunidades locales y regionales (Morris, 2013; Baracaldo, 2019).

Atendiendo al reclutamiento acelerado se sugieren técnicas de genética como el “troyano Y”, para una disminución o pérdida de la población (Anton y col., 2019). También se ha considerado la tecnología de impulso genético CRISPR y métodos de interferencia de ARN (ARNi) para inhibir la expresión de genes de relevancia para la supervivencia. Las estrategias deben tener como objetivo la eliminación rápida de adultos y nuevos reclutas que provienen de áreas conectadas, para prevenir su dispersión. Para el manejo y control se sugiere identificar áreas de reclutamiento para un monitoreo continuo (Díaz-Ferguson y Hunter, 2019).

### **2.3. Proteasas del músculo esquelético de organismos marinos**

El estudio de proteasas de músculo esquelético de peces se ha realizado principalmente en especies de importancia comercial en la industria pesquera como: salmón (*Oncorhynchus* spp.), caballa (*Scomber* spp.), carpa (*Cyprinus* spp.), tilapia (*Oreochromis* spp.), lenguado (*Solea* spp.), corvina (*Totoaba* sp., *Argyrosomus* sp., *Sciaena* sp.) y merluza (*Merluccius* spp.), entre otras. Estos estudios están enfocados en el papel que tienen las proteasas en el ablandamiento de la carne de pescado, lo que afecta la calidad de la misma, implicando pérdidas económicas y el desecho de la pesca. También se han realizado estudios sobre los factores, como el estrés y las enfermedades parasitarias, que impactan en la regulación de proteasas, y por consiguiente en el músculo, en la acuicultura.

Entre las enzimas lisosomales purificadas y caracterizadas del músculo de peces y mariscos están las catepsinas B, C, H, L y S. Las catepsinas pertenecen a varias clases de proteasas: cisteín, aspartil y serín proteasas.

En especies como el salmón (*Salmo salar*) se ha descrito el papel de las proteasas endógenas del músculo (calpaínas, catepsina B, catepsina D y enzimas tipo quimotripsina) en el aumento de la masa muscular en diferentes estadios e incluso durante su migración (Lysenko y col., 2017). Además, se considera que en el músculo de salmón el incremento en niveles de catepsinas juega un rol importante en cambios fisiológicos que ocurren durante la maduración sexual a lo largo de la migración (Sriket, 2014).

Hultman y Rustad (2004) mencionan a la catepsina L como la responsable de la autólisis del músculo del lenguado de flecha (*Solea spp.*) a altas temperaturas. También se ha reportado la presencia de la catepsina L y proteínas tipo catepsina L en músculo de caballa (*Scomber spp.*). La catepsina L también degrada cadenas  $\alpha$  del colágeno tipo I del músculo de carpa y péptidos de anclaje (Sriket y col., 2010). La catepsina D también se ha reportado en músculo de carpa y tilapia (Homaei y col., 2016).

Otra de las proteasas más reportadas son las calpaínas, que tienen un papel clave en la degradación del músculo en peces, ya que la mayoría de las proteínas, sarcoplásmicas y miofibrilares han sido reportadas como sustrato de las calpaínas. Se estima que son responsables del 30-40 % de la hidrólisis total de proteína y 40% del sistema lisosomal, mientras que la degradación dependiente del proteosoma es del 4% (Lysenko y col., 2017). De las serín proteasas se han reportado principalmente: tripsina, enzimas tipo tripsina, tipo quimotripsina y colagenasa. De estornino y platija verde oliva (*Scomber japonicus*, *Paralichthys olivaceus*, respectivamente) se han identificado colagenasas.

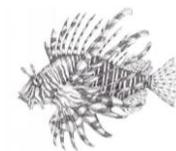
La enzima tipo tripsina llamada proteasa I fue detectada en el músculo de corvina blanca (*Argyrosomus regius*) (Folco y col., 1989). Degrada la miosina aislada e interrumpe la integridad contráctil y elementos del citoesqueleto de miofibrillas in vitro, y también hidroliza varios péptidos. En el músculo esquelético de merluza (*Merluccius spp.*) fue detectada una proteasa tipo tripsina.

Como se mencionó anteriormente, Bracho y Haard (1995) identificaron dos metaloproteasas del músculo esquelético de pez piedra del Pacífico, especie del mismo orden que el pez león (Scorpaeniformes), de 47 y 48 kDa. La actividad enzimática fue mayor a pH 7-8. Las cuales son activadas por calcio, acetato 4-mercúrico y por calentamiento e inhibidas por queladores de calcio. Y mostraron un incremento en su actividad al ir aumentando la temperatura de 25 a 40°C.

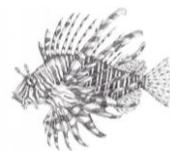
En la tabla 3 se resumen características particulares de las proteasas de músculo esquelético reportadas en peces marinos.

**Tabla 3. Estudios de proteasas del músculo de peces marinos.**

| Enzima             | Especie                                 | pH y °C      | Peso (kDa)                  | Particularidades  | Referencia                    |
|--------------------|---|--------------|-----------------------------|---|-------------------------------|
| <b>Catepsina L</b> | Lenguado de flecha ( <i>Solea</i> spp.) |              | 30                          | Autólisis del músculo. Degrada cadenas $\alpha$ del colágeno tipo I del músculo y telopéptidos de anclaje | Kolodziejska y Sikorski, 1996 |
| <b>Catepsina L</b> | Caballa ( <i>Scomber</i> spp.)          |              | 55                          |   | Kolodziejska y Sikorski, 1996 |
| <b>Catepsina B</b> |   | pH 6         |                             |   | Homaei y col., 2016           |
| <b>Catepsina B</b> | Salmón ( <i>Salmo salar</i> )           | pH 5, 37°C   |                             |   | Lysenko y col., 2017          |
| <b>Catepsina D</b> | Carpa y Tilapia                         | pH 3-6, 5°C  |                             |   | Homaei y col., 2016           |
| <b>Catepsina D</b> | Salmón ( <i>Salmo salar</i> )           | pH 3.6, 37°C |                             |   | Lysenko y col., 2017          |
| <b>Calpaína</b>    | Tilapia ( <i>Tilapia</i> spp.)          |              | 110 (2 subunidades 80 y 28) |   | Kolodziejska y Sikorski, 1996 |



|  |  |  |         |   |                               |
|--|--|--|---------|---|-------------------------------|
| <b>Calpaína</b>                                    | Salmón ( <i>Salmo salar</i> )                      | pH 7.5, 28°C   |         |   | Lysenko y col., 2017          |
| <b>CalpaínaII</b>                                  | Tilapia ( <i>Tilapia nilitica, Tilapia aurea</i> ) | pH 7.5, 25°C   |         | Se somete gradualmente a autólisis en presencia de Ca <sup>2+</sup>   | Wang y Jiang, 1991            |
| <b>Colagenasa</b>                                  | Estornino ( <i>Scomber japonicus</i> )             | pH 7.5-5.5   |         |   | Park y col., 2002             |
| <b>Endopeptidasa tipo tripsina y quimotripsina</b> | Carpa ( <i>Cyprinus spp.</i> )                     | pH 6.6-10, 65°C, con sustrato sintético y SDS; pH 8 con caseína  |         |   | Kinoshita y col., 1990        |
| <b>Proteasa tipo quimotripsina</b>                 | Salmón ( <i>Salmo salar</i> )                      | pH 7.5, 37°C   |         |   | Lysenko y col., 2017          |
| <b>Proteasa I tipo tripsina</b>                    | Corvina blanca ( <i>Argyrosomus regius</i> )       | Extracto crudo: pH 8.5, 60°C.<br>Enzima purificada: pH 8.5, 37°C | 269     | Degrada miosina aislada e interrumpe la integridad contráctil y elementos del citoesqueleto de miofibrillas <i>in vitro</i> | Folco y col., 1989            |
| <b>Proteasa tipo tripsina</b>                      | Merluza ( <i>Merluccius spp.</i> )                 | Extracto crudo: pH 9, 40°C. Enzima purificada: pH 8.5, 50°C      | 123     |   | Kolodziejska y Sikorski, 1996 |
| <b>Metaloproteasas</b>                             | Pez piedra del Pacífico ( <i>Seabasted sp.</i> )   | pH 7-8, 25-40°C<br>aumenta su actividad al calentar gradualmente | 47 y 48 | Activadas por Ca <sup>2+</sup> , acetato mercúrico y por calentamiento e inhibidas por quelantes de Ca <sup>2+</sup>        | Bracho y Haard, 1995          |



### 3. Justificación

Las proteasas marinas tienen características particulares derivadas de las adaptaciones de los organismos marinos al medio. Por esta razón poseen múltiples aplicaciones en procesos industriales de áreas como producción de alimentos, la farmacéutica y en procesos de biorremediación, entre otros. Sin embargo, son necesarios estudios de caracterización y purificación preliminares para determinar la posible obtención y aplicación biotecnológica de una proteasa. Por otra parte, el pez león es una especie invasora la cual se requiere erradicar del Mar Caribe. Por lo tanto, este trabajo proporcionará información básica de las proteasas del músculo de pez león, *Pterois sp.*, para su posible aplicación biotecnológica e indirectamente incentivar el aprovechamiento de dicha especie invasora.

### 4. Hipótesis

El extracto crudo proteolítico del músculo de pez león (*Pterois sp.*) tiene diferentes tipos de proteasas, las cuales en su mayoría tienen actividad óptima a pH neutro y alcalino de manera similar a lo reportado para proteasas del músculo de otras especies de peces marinos.

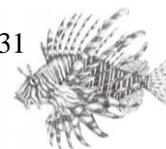
### 5. Objetivos

#### 5.1. Objetivo general

Obtener, identificar y caracterizar parcialmente las proteasas del músculo de pez león (*Pterois sp.*) extraído del Caribe Mexicano.

#### 5.2. Objetivos específicos

- a) Obtener el extracto crudo proteolítico a partir del músculo esquelético del pez león *Pterois sp.*
- b) Analizar el perfil electroforético (SDS-PAGE) y el cromatográfico (HPLC-RP) del extracto crudo proteolítico.
- c) Fraccionar el extracto crudo proteolítico por HPLC-RP y aislar la fracción proteica mayoritaria.
- d) Determinar el efecto de pH y temperatura sobre la actividad proteolítica del extracto crudo proteolítico.
- e) Determinar el efecto de inhibidores de serin y metalo proteasas sobre la actividad proteolítica del extracto crudo proteolítico.
- f) Determinar la actividad proteolítica de la fracción proteica mayoritaria del extracto crudo.



## 6. Metodología

### 6.1. Obtención de extracto crudo proteolítico

Se colectaron peces león *Pterois sp.* en el Caribe Mexicano (Puerto Morelos, Quintana Roo, México) a 6 y 10 m de profundidad. Se obtuvo el extracto crudo proteolítico a partir del músculo de 3 organismos, con un peso promedio de 63.71 g/pez. Se realizó una homogeneización del músculo, aproximadamente 25 g, con amortiguador de fosfatos 20 mM, pH 7 (~50.0 mL), en una relación 1:2, músculo: amortiguador. El homogeneizado se centrifugó a 3,000 g, durante 30 min a 4 °C (Beckman GPR Refrigerated Centrifuge 349702). El sobrenadante se centrifugó nuevamente a 12,000 g por 15 min (SORVALL *pico*). El sobrenadante obtenido, se almacenó a -22 °C hasta su análisis.

### 6.2. Cuantificación de proteína

Para determinar la concentración de proteína del extracto crudo proteolítico del músculo de *Pterois sp.*, se empleó el método de ácido bicinconínico (BCA) utilizando el kit Pierce TM Rapid Gold BCA (Thermo Scientific) y una curva estándar de proteína con albumina sérica bovina (BSA) como estándar (Anexo, Figura 1).

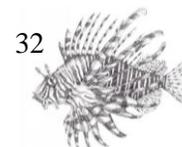
### 6.3. Caracterización del extracto crudo proteolítico

#### 6.3.1. Determinación de actividad proteolítica

La actividad de las proteasas ácidas se determinó por hidrólisis de hemoglobina al 1% (p/v) en solución ácida de ácido bórico 0.025 M, ácido fosfórico 0.025 M y ácido acético 0.25M, al valor de pH definido, mientras que la actividad de las proteasas alcalinas y neutras se determinó por hidrólisis de caseína al 1% (p/v) en amortiguador de fosfatos 20 mM al pH correspondiente. Se utilizó 300 µL de extracto crudo proteolítico y 104 µL de sustrato (caseína o hemoglobina) para la mezcla de reacción; la mezcla se incubó por 15 min a 25 °C. Previamente, el sustrato (caseína o hemoglobina) fue pre-incubado durante 10 minutos a la misma temperatura de reacción. La reacción se detuvo con 404 µL de ácido tricloroacético (TCA) al 25% (p/v), y las muestras se centrifugaron a 10,000 g por 10 min. Posteriormente, se determinó la absorbancia, a 280 nm, del sobrenadante obtenido, el cual contiene los péptidos generados por la hidrólisis del sustrato. Los resultados se reportaron como actividad específica ( $U/mg_{\text{proteína}}$ ) donde una unidad de actividad proteolítica (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria para cambiar la absorbancia 0.001/min a 280 nm en las condiciones experimentales definidas (Hernández-Sámano y col., 2015).

#### 6.3.2. Efecto del pH sobre la actividad proteolítica

Se determinó la actividad proteolítica del extracto crudo a pH de 2 a 12, como se describió anteriormente, para obtener el pH donde ocurre la máxima actividad proteolítica a 25 °C. Se utilizó hemoglobina para valores de pH de 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0, y caseína para pH de 6.0, 6.6, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0, 12.0. La actividad proteolítica se reportó como actividad específica ( $U/mg_{\text{proteína}}$ ).



### 6.3.3. Efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica

Se determinó la actividad proteolítica del extracto crudo a diferente temperatura, 4, 10, 20, 25, 30, 37, 60, 80, 90 °C, como se describe anteriormente, utilizando como sustrato caseína a pH 6.6. La actividad proteolítica se reportó como actividad específica (U/mg proteína).

### 6.3.4. Efecto de inhibidores de proteasas sobre la actividad proteolítica

Se emplearon los inhibidores específicos de proteasas: fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 5mM para serín proteasas y ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) 10mM para metalo proteasas. El efecto inhibitorio se determinó incubando el extracto crudo proteolítico con el inhibidor correspondiente en una relación 1:1 (v/v) durante 1 h a temperatura ambiente (25 °C). Posteriormente, se midió la actividad proteolítica en las condiciones de pH y temperatura de actividad óptima (pH 6.6, 25 °C) como se describe anteriormente. La actividad se reportó como actividad residual (%). Posteriormente se determinó el porcentaje de inhibición. Para ello se emplearon las siguientes ecuaciones.

$$\% \text{ actividad residual} = \left( \frac{\text{actividad específica del control} - \text{actividad específica con inhibidor}}{\text{actividad específica del control}} \right) * 100$$

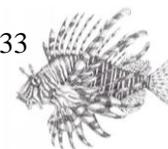
$$\% \text{ de inhibición} = 100 - \text{actividad residual}$$

### 6.3.5. Análisis estadístico

Los resultados se analizaron por ANOVA y comparación múltiple de medias por la prueba de Tukey, empleando el programa SPSS para Windows (Versión 23.0). Todos los análisis se llevaron a cabo por triplicado; en las figuras se reportan los valores medios. Las diferencias se aceptaron estadísticamente a  $p < 0.05$ .

## 6.4. Análisis electroforético

El perfil electroforético del extracto crudo proteolítico del músculo de *Pterois* sp. fue determinado por Electroforesis en Geles de Poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Sodio (SDS-PAGE) por la técnica de Laemmli (1970) y por Electroforesis en condiciones no desnaturizantes (Native-PAGE). Para la SDS-PAGE, las proteínas del extracto crudo se desnaturizaron parcialmente mediante la adición de  $\beta$ -mercaptoetanol y calentamiento a 100 °C por 5 min. Se aplicaron 5  $\mu$ g de la muestra para ambas técnicas de electroforesis y se utilizó un marcador de pesos moleculares “Precision Plus Protein Dual Color” de Bio-Rad (Richmond, CA, EU; rango de 250 a 10 kDa, adicionando insulina-b de 3.5 kDa). Para SDS-PAGE, las condiciones de operación fueron las siguientes: 48 V, 20 mA, 40 W; para Native-PAGE, se utilizaron las siguientes condiciones; 50 V, 20 mA, 40 W. Todos los geles se tiñeron con azul de Coomassie R-250 al 0.1% (p/v) en solución 40% (v/v) metanol y 10% (v/v) ácido acético. Se destiñeron con solución 40% (v/v) metanol y 10% (v/v) ácido acético en agua. Las imágenes de los geles fueron adquiridas con un fotodocumentador Gel Doc y analizadas con el programa Image Lab ambos de Bio-Rad (Richmond, CA, EU).



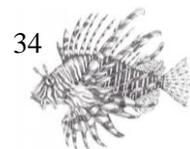
## 6.5. Análisis cromatográfico (RP-HPLC)

El extracto crudo proteolítico del músculo de *Pterois* sp. fue analizado por Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa (RP-HPLC) en un cromatógrafo Agilent 1100 (Santa Clara, CA, USA), usando una columna analítica C18 Vydac (218TP54, 5 µm, 4.6 mm i.d. x 250 mm). Se realizó una separación isocrática con solución A, solución acuosa con 0.1% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA) por 10 min, seguido de un gradiente lineal de 0 a 100% de solución B, solución 90% (v/v) acetonitrilo (ACN) en agua, con 0.085% (v/v) de TFA, por 100 min (1% B/min), con un flujo de 1 mL/min. Las fracciones se detectaron a una absorbancia de 220 nm.

## 6.6. Actividad proteolítica de una fracción del extracto del músculo de *Pterois* sp.

El extracto crudo proteolítico del músculo de *Pterois* sp. fue fraccionado por RP-HPLC como se indica en la sección anterior. Se colectaron las fracciones proteicas, se secaron en un concentrador al vacío SpeedVac Thermo Fisher SCIENTIFIC, y se almacenaron a -20 °C. Posteriormente se llevó a cabo el ensayo de actividad proteolítica de la fracción de mayor proporción. El ensayo de actividad proteolítica se realizó de acuerdo a lo descrito en la sección 6.3.1 de “Determinación de actividad proteolítica”, utilizando las condiciones óptimas, pH de 6.6 y una temperatura de 25 °C. A partir de los resultados de actividad específica se estimó el factor de purificación el cual se obtiene con la siguiente formula:

$$\text{Factor de purificación} = \frac{\text{Actividad específica U/mg de la fracción purificada}}{\text{Actividad específica U/mg del extracto crudo}}$$



## 7. Resultados

Se utilizaron peces león extraídos del Caribe Mexicano (Figura 1). Los 3 organismos empleados tuvieron un peso promedio de 61.71 g, menor al peso promedio registrado en varias poblaciones de pez león ( $256 \pm 200$  g) (Arredondo-Chávez y col., 2016). Se obtuvo alrededor de 25 g de músculo esquelético para la obtención del extracto crudo proteolítico (volumen total  $\approx 44$  mL). Dicho extracto, tuvo una concentración de proteína de 2.09 mg/mL. Por lo tanto, la cantidad obtenida de proteína total fue de  $\approx 92.04$  mg.

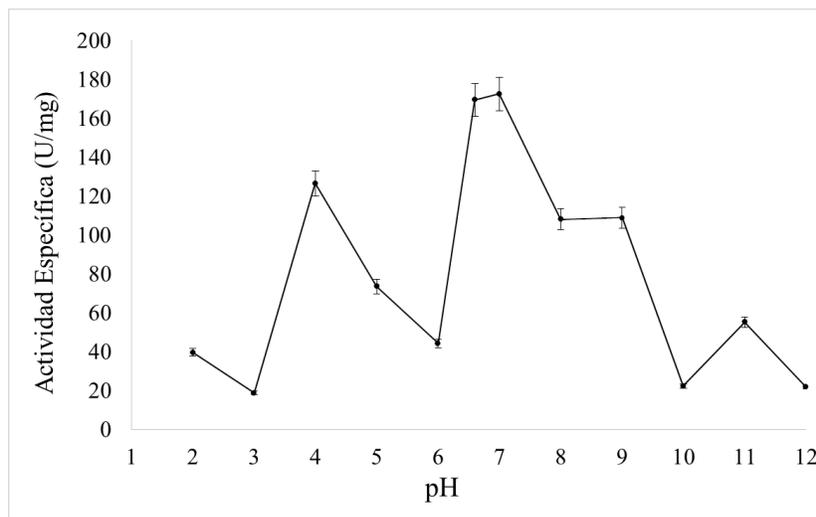


**FIGURA 1.** *Pterois* sp. del Caribe Mexicano sin espinas y preparado para la disección del músculo esquelético.

### 8.1. Caracterización del extracto crudo proteolítico

#### 8.1.1. Efecto de pH sobre la actividad proteolítica

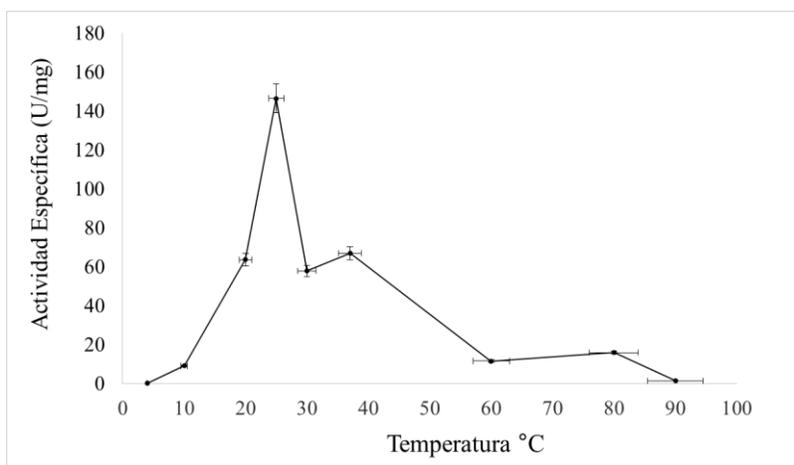
Dentro del rango de pH estudiado (pH 2-12), se determinó que la actividad proteolítica del extracto crudo del músculo de *Pterois* sp. fue significativamente mayor ( $p < 0.001$ ) a pH 6.6 y 7.0, con actividad específica de  $169.40 \pm 4.48$  U/mg y  $172.60 \pm 2.07$  U/mg, respectivamente, a  $25^\circ\text{C}$ . La actividad proteolítica también fue significativa a pH 4.0, 8.0 y 9.0, con actividad específica de  $126.47 \pm 0.78$ ,  $107.95 \pm 7.76$ , y  $108.89 \pm 1.99$  U/mg, respectivamente (Figura 2).



**Figura 2.** Efecto del pH sobre la actividad específica del extracto crudo proteolítico del músculo de *Pterois* sp. ( $25^\circ\text{C}$ ).

### 8.1.2 Efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica

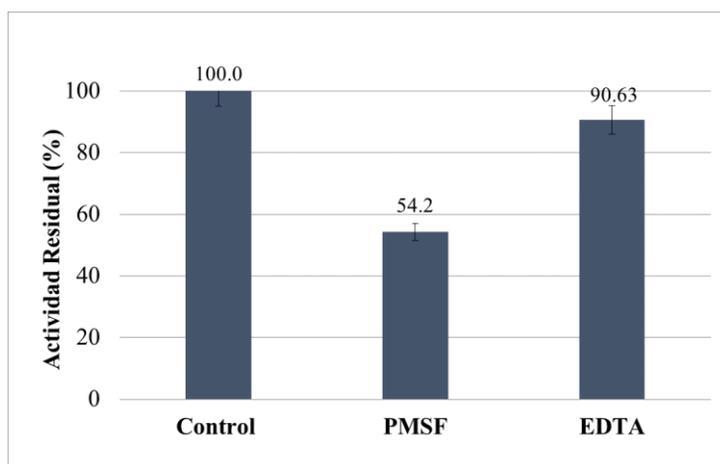
La actividad específica de las proteasas del extracto crudo del músculo de *Pterois* sp. fue significativamente ( $p < 0.001$ ) mayor a 25 °C con  $146.44 \pm 1.91$  U/mg (Figura 3) a pH 6.6, siendo la temperatura óptima de actividad.



**Figura 3.** Efecto de la temperatura sobre la actividad específica del extracto crudo proteolítico de músculo de *Pterois* sp. (pH 6.6).

### 8.1.3. Efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica

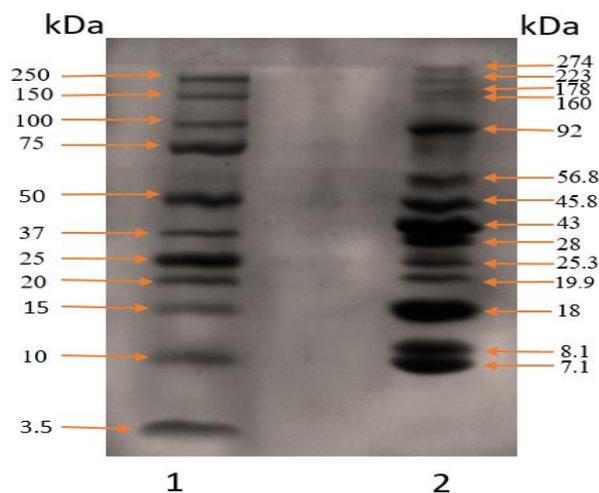
Se estudió el efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica del extracto crudo del músculo de *Pterois* sp. bajo las condiciones óptimas previamente determinadas (caseína a pH 6.6, reacción a 25 °C), obteniéndose una actividad residual de  $54.2 \pm 1.28$  % con el inhibidor de serín proteasas PMSF y  $90.63 \pm 11.27$  % con el inhibidor de metalo proteasas EDTA (Figura 4), lo que sugiere que el extracto crudo proteolítico contiene serín proteasas en mayor proporción.



**Figura 4.** Efecto de inhibidores de serín proteasas (PMSF) y metalo proteasas (EDTA) sobre la actividad proteolítica del extracto crudo del músculo de pez león *Pterois* sp. (caseína a pH 6.6, reacción a 25 °C).

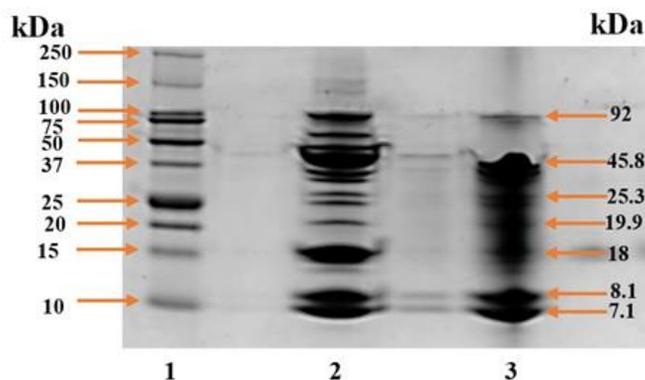
#### 8.1.4. Análisis electroforético

El análisis del perfil proteico del extracto crudo del músculo de *Pterois* sp., obtenido por SDS-PAGE, mostró la presencia de 14 proteínas con pesos moleculares de 7.1 a 274.0 kDa (Figura 5). Específicamente, se observaron las siguientes proteínas con pesos moleculares estimados de: 274.0, 223.0, 178.0, 160.0, 92.0, 56.8, 45.8, 43.0, 28.0, 25.3, 19.9, 18.0, 8.1 y 7.1 kDa.



**Figura 5.** SDS-PAGE del extracto crudo del músculo de pez león *Pterois* sp.1) Marcador molecular; 2) Extracto crudo de pez león. Tinción con azul de Coomassie R-250.

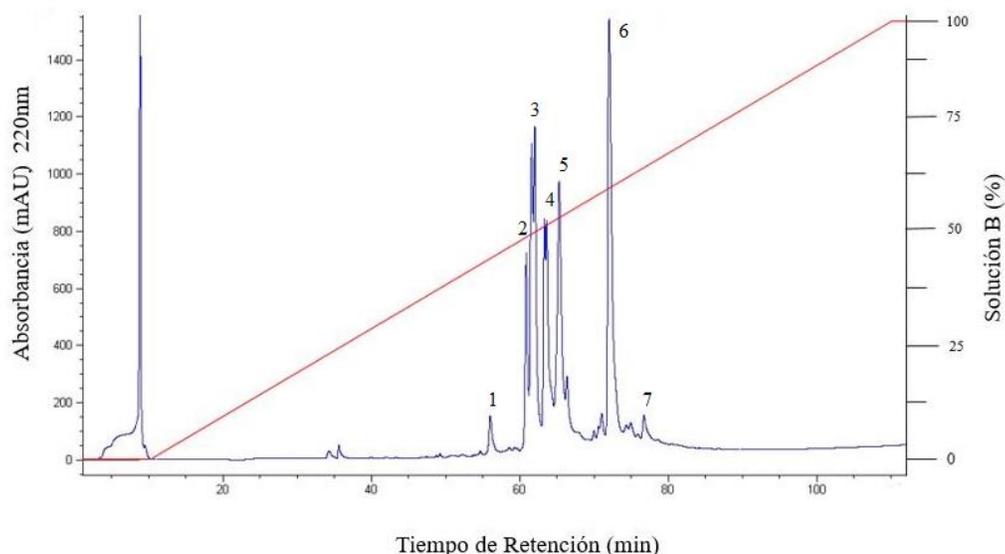
El análisis del perfil proteico del extracto crudo del músculo de *Pterois* sp., obtenido por Native-PAGE, mostró 7 proteínas con pesos moleculares de 7.1 a 92.0 kDa, confirmando la presencia de las proteínas mayoritarias observadas por SDS-PAGE (Figura 6).



**Figura 6.** Perfil electroforético del extracto crudo del músculo de pez león *Pterois* sp.1) Marcador molecular; 2) SDS-PAGE del extracto crudo; 3) Native-PAGE del extracto crudo. Tinción con azul de Coomassie R-250.

### 8.1.5. Análisis cromatográfico (RP-HPLC)

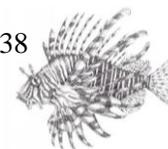
El perfil cromatográfico del extracto crudo proteolítico del músculo de *Pterois* sp. fue obtenido por RP-HPLC. Se identificaron 7 fracciones proteicas en mayor proporción (Tabla 4, Figura 7), con carácter hidrofóbico, debido a que fueron eluidas en un rango de 50.0 a 62.5 % de solución B (solución 90% acetonitrilo con 0.085% TFA). Posteriormente, se aisló la fracción 6 y se sometió a una SDS-PAGE donde se identificó una proteína con un peso molecular estimado de 18 kDa (Figura 8).



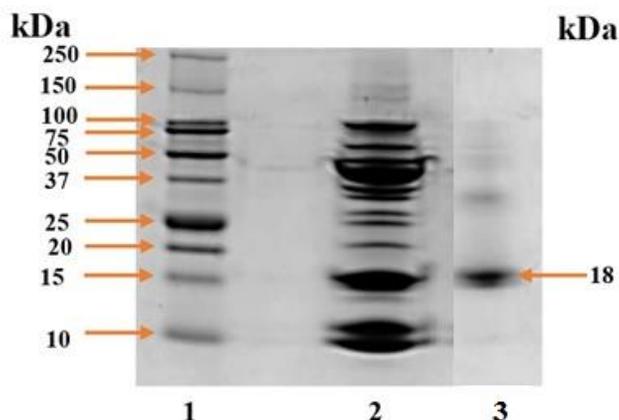
**Figura 7.** Perfil cromatográfico del extracto crudo del músculo de *Pterois* sp. por RP-HPLC. Separación por gradiente lineal de 0 a 100 % de solución B (solución 90% acetonitrilo con 0.085% TFA) en 100 minutos a un flujo de 1mL/min. Fracción número 6, seleccionada para SDS-PAGE y posterior caracterización.

**Tabla 4.** Reporte cuantitativo de las fracciones obtenidas del extracto crudo de *Pterois* sp.

| Fracciones | Área (mAU*s) | Proteína (µg) | Proporción % |
|------------|--------------|---------------|--------------|
| 1          | 3858.32      | 5.16          | 1.40         |
| 2          | 9523.27      | 12.73         | 3.47         |
| 3          | 39487.1      | 52.79         | 14.38        |
| 4          | 22559.8      | 30.16         | 8.21         |
| 5          | 25206.1      | 33.70         | 9.18         |
| 6          | 53173.9      | 71.09         | 19.36        |
| 7          | 2534.27      | 3.39          | 0.92         |



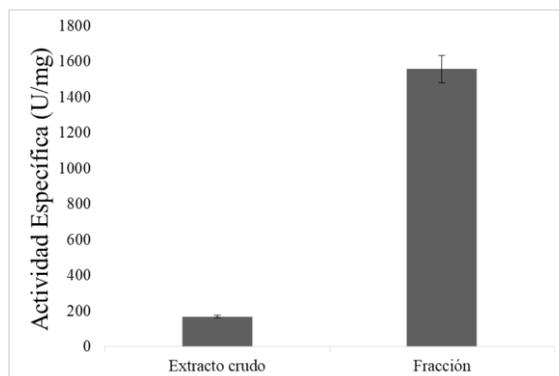
Estimación de la cantidad de proteína en cada fracción del extracto crudo del músculo de *Pterois sp.* y la proporción que representa en relación al área total del cromatograma. Resultados estimados a partir de una curva estándar de insulina b (Anexo, Figura 2).



**Figura 8.** Native-PAGE de la fracción seleccionada del extracto del músculo de pez león *Pterois sp.* por RP- HPLC. 1) Marcador molecular; 2) SDS-PAGE del extracto crudo; 3) Fracción 6 del extracto crudo.

### 8.2 Actividad proteolítica de una fracción del extracto del músculo de *Pterois sp.*

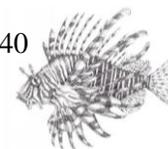
Derivado del perfil cromatográfico del extracto de músculo de *Pterois sp.*, se seleccionó la fracción número 6 debido a su mayor proporción en el extracto (Figura 7) y se realizó nuevamente el ensayo de actividad proteolítica en las condiciones óptimas determinadas (pH 6.6 y 25 °C) para comparar su actividad proteolítica contra la del extracto crudo. La fracción 6 parcialmente purificada presentó una actividad específica de  $1557.04 \pm 292.16$  U/mg a pH 6.6 y 25 °C, mientras que el extracto crudo presentó una actividad específica promedio de  $155.72 \pm 27.53$  U/mg, dando como resultado un factor de purificación de  $\sim 9.9$  lo que indica un aceptable grado de purificación de la fracción obtenida. Por lo tanto, la fracción 6 presenta posiblemente serán proteasas.



**Figura 9.** Comparación de actividad específica (U/mg) de la fracción de mayor proporción (Fracción 6) en el extracto crudo proteolítico de músculo de *Pterois sp.* y la actividad específica del extracto crudo del músculo. Actividad determinada a pH 6.6 y 25 °C.

## 8. Discusión

De acuerdo a los resultados obtenidos, el músculo de *Pterois* sp. contiene diferentes proteínas solubles de entre 7.1 a 274 kDa, de las cuales se identificaron proteasas con mayor actividad proteolítica en un rango de pH entre 6.6 y 7.0. De forma similar, Manso y col. (2015) reportaron para el veneno de *P. volitans* proteasas gelatinolíticas con actividad óptima a pH de 7.0 a 9.0, con pesos moleculares aproximados de 45 y 60 kDa. En el presente estudio, se identificó una proteasa mayoritaria (fracción 6) en el extracto del músculo de aproximadamente de 18 kDa la cual no se presentó en el contenido de enzimas proteolíticas del veneno reportadas por Manso y col. (2015), lo que es de esperarse debido a que el tipo de proteasas varía en cada parte anatómica de acuerdo a la funcionalidad requerida. Además, la fracción parcialmente purificada (fracción 6) presentó actividad proteolítica a pH 6.6, 25 °C, con una actividad proteolítica específica de  $1557.04 \pm 292.16$  U/mg. Lo anterior implica que durante el proceso de purificación mediante la técnica de RP-HPLC, en la cual se emplean solventes que pudieran desnaturalizar las proteasas, no perdió actividad proteolítica, en cambio se obtuvo un factor de purificación de  $\sim 9.9$  lo que indica que la actividad específica aumentó en comparación a la actividad específica del extracto crudo, representando un grado de purificación aceptable de la fracción obtenida. Contrario a lo reportado en los antecedentes de proteasas estudiadas en músculo esquelético de peces marinos la mayoría de las proteasas cuando se purifican disminuye su actividad específica. Por otra parte, Bracho y Haard (1995) reportaron metalo proteasas en el músculo de pez piedra del Pacífico (*Seabasted* sp.) inhibidas significativamente con EDTA y cuya actividad óptima se encuentra a pH 7 - 8 y 25 - 40 °C (incrementando su actividad proteolítica con el aumento de la temperatura), difiriendo con el presente trabajo donde las proteasas del músculo de *Pterois* sp. no fueron significativamente inhibidas con EDTA, presentando una actividad residual de  $90.63 \pm 11.27$  %, lo que indica que no hay una cantidad significativa de metalo proteasas en el extracto de músculo de *Pterois* sp. Wang y Jiang (1991) reportaron para la calpaína II del músculo de tilapia (*Tilapia nilotica* y *Tilapia aurea*) una temperatura óptima de 25 °C y pH óptimo de 7.5, coincidiendo con lo obtenido para el pez león *Pterois* sp. Hay estudios que sugieren que existe una relación entre las condiciones del hábitat con las características de las enzimas; y que la temperatura óptima de las proteasas está estrechamente ligada a la fisiología del organismo (Haard y Simpson, 2000). *P. volitans* tiene una gran tolerancia a los cambios de pH, salinidad, temperatura y presión, parámetros que delimitan la distribución de los organismos; su distribución se ha limitado a aguas cálidas como las del Mediterráneo, el Caribe y el Indo-pacífico, las cuales oscilan en un rango de 16.0 a 32.2 °C (Reyes-Bonilla y Petatán-Ramírez, 2020). Mientras que la tilapia (*T. nilotica* y *T. aurea*) habita principalmente en zonas tropicales con un rango de temperatura en el agua de 22 a 32 °C. Lysenko y col. (2017) reportaron diferentes proteasas en músculo de salmón (*Salmo salar*), Catepsina B y D (cisteín proteasas), con actividades óptimas a pH 5.0 y 3.6, respectivamente, y 37 °C para ambas; calpaína (metalo proteasa) con actividad óptima a pH 7.5 y 28 °C, y una proteasa tipo quimotripsina (serín proteasa) con actividad óptima a pH 7.5 y 37 °C. En el presente trabajo no se realizaron ensayos de inhibición para aspartil y cisteín proteasas para su identificación, por lo que no sería posible comparar los resultados con los reportados para las Catepsinas B y D mencionadas; sin embargo, se identificó actividad significativa a pH ácido (pH 4) y 25 °C, en el extracto crudo del músculo de *Pterois* sp. indicando la presencia de aspartil y/o cisteín proteasas ya que dichas enzimas son activadas en un rango de pH ácido de 2 a 4 (Sriket, 2014).

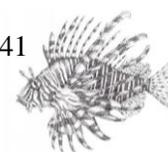


Para el caso de las calpaínas, como se mencionó anteriormente, el extracto crudo del músculo de *Pterois* sp. no presenta una proporción significativa de metalo proteasas. En cuanto a lo reportado para la quimotripsina del músculo de salmón, se sugiere que las serín proteasas (que incluyen a la tripsina, quimotripsina, subtilisina, granzima y otras) identificadas en el músculo de *Pterois* sp. pueden pertenecer a dicho tipo de proteasas; sin embargo, se tendrán que realizar estudios de inhibición específica para los diferentes tipos de serín proteasas, especialmente quimotripsina. Si bien se tiene una mayor cantidad de reportes de proteasas de tipo metalo y cisteín proteasas, hay una mayor proporción de proteasas con actividad óptima a pH neutro y alcalino, y en menor proporción de proteasas activas a pH ácido. Cabe destacar que, hasta la fecha de realización de este trabajo, no hay reportes sobre proteasas del músculo del pez león *Pterois* sp. para realizar comparaciones precisas de actividad específica.

Como se menciona en los objetivos, el trabajo pretende aportar información básica para el aprovechamiento del organismo, incentivando paralelamente su erradicación del Caribe mexicano, y sugiriendo el uso de las proteasas en procesos de biorremediación, ya que, el costo de tratamientos químicos o físicos convencionales para la eliminación de contaminantes suele ser elevado y poco sostenible a largo plazo. En cambio, los tratamientos biotecnológicos requieren menor energía que los tratamientos convencionales, además de ser seguros para el medio ambiente (Rao y col., 2017). Dentro de los agentes biológicos, las enzimas tienen un gran potencial para transformar eficientemente y destoxificar sustancias contaminantes para restaurar ambientes contaminados (Rao y col., 2010).

## 9. Conclusión general

El extracto crudo del músculo de *Pterois* sp. tiene proteasas con mayor actividad a pH de 6.6 a 7.0 y 25 °C, condiciones que son favorables en los procesos biotecnológicos. La fracción aislada del extracto se identificó como una proteasa con peso estimado de 18 kDa con actividad específica de  $1557.04 \pm 292.16$  U/mg a pH 6.6 y 25 °C, siendo una actividad proteolítica ideal para su aplicación en diferentes procesos, además el factor de purificación (~9.9) indicó que no sería necesario agregar etapas de purificación para su obtención. Se identificó la actividad predominante de serín proteasas en el extracto crudo, por consiguiente, se sugirió que la fracción parcialmente purificada posiblemente pertenece a dicha familia de proteasas. Cabe destacar que las proteasas conservaron y aumentaron su actividad proteolítica después del proceso de purificación, por lo que es una enzima con valor biotecnológico ya que no requeriría condiciones de purificación que impliquen un alto gasto energético o de recursos.



## 10. Perspectivas

Como complemento de este estudio se propone llevar a cabo ensayos de inhibición específicos para cisteín y aspartil proteasas con el extracto crudo de *Pterois* sp. Además, la purificación de las fracciones restantes del extracto crudo, los ensayos de actividad proteolítica correspondientes y el análisis electroforético de cada fracción.

Otras pruebas a tener en cuenta son ensayos para conocer la estabilidad de las proteasas como determinación de la actividad residual después de someterse a diferentes condiciones de pH y temperatura, así como su estabilidad a través del tiempo de almacenamiento a 4 °C.

Por otra parte, se propone obtener extractos proteolíticos en diferentes estadios de crecimiento del pez león, ya que, como se ha reportado para el salmón, la proporción de proteasas presentes varía con la edad del organismo, lo cual pudiera ser relevante para la obtención de proteasas de *Pterois* sp.

Finalmente, atendiendo al potencial biotecnológico, se propone realizar un tratamiento enzimático en un proceso de biorremediación tanto con el extracto crudo como con la fracción purificada de mayor concentración, usando como sustrato el agua de un cuerpo de agua eutrofizado o contaminado mayormente por materia orgánica.

## 11. Productividad académica

Algunos de los resultados fueron expuestos en la sesión de carteles, del I Congreso de Investigación en Biotecnología y Ciencias Agroalimentarias UTyP, el cual se llevó a cabo los días 30 y 31 de enero del 2020 en la ciudad de Celaya, Guanajuato, México.

## Referencias

1. Agricultura. 2019. Food & Agricultural Overview. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 1st ed. CDMX, México.
2. Aguilar-Perera, A., Carrillo, F.E. 2014. Revisión sobre la invasión del pez león en el Sureste del Golfo de México. En: Especies Invasoras Acuáticas: Casos de Estudio en Ecosistemas de México. SEMARNAT. México. pp.119-141.
3. Aguilar-Perera, A., Tuz-Sulub, A. 2010. Non-native, invasive red lionfish (*Pterois volitans* [Linnaeus, 1758]: Scorpaenidae), is first recorded in the southern Gulf of Mexico, off the northern Yucatan Peninsula, Mexico. *Aquat Invasions* 5(1):9-12. DOI: 10.3391/ai.2010.5.S1.003
4. Anton, A., Gerald, N.R., Lovelock, C.E., Apostolaki, E.T., Bennett, S., Cebrian, J., Krause-Jensen, D., Marbà, N., Martinetto, P., Pandolfi, J.M., Santana-Garcon, J., Duarte, C.M. 2019. Global ecological impacts of marine exotic species. *Nat Ecol Evol* 3: 787-800. DOI: 10.1038/s41559-019-0851-0
5. Arredondo-Chávez, A.T., Sánchez-Jimenez, J.A., Ávila-Morales, O.G., Torres-Chávez, P., Herrerías-Diego, Y., Medina-Nava, M., Madrigal-Gurdi, X., Campos-Mendoza, A., Domínguez-Domínguez, O., Caballero-Vázquez, J.A. 2016. Statio-temporal variation in the diet composition of red lionfish, *Pterois volitans* (Actinopterygii: Scorpaeniformes: Scorpaenidae), in the Mexican Caribbean: Insights into the ecological effect of the alien invasión. *Acta Ichthyol Piscat* 46 (3):185-200. DOI: 10.3750/AIP2016.46.3.03
6. Baracaldo S., V. 2019. Estructura de la comunidad íctica y aportes al plan de control y manejo del pez león *Pterois volitans* en el proyecto Marina Internacional de Santa Marta. Facultad de Ciencias Naturales e Ingenierías. Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Colombia, Santa Marta.
7. Barrett, A., Rawlings, N., O'Brien, E. 2001. The MEROPS database as protease information system. *Journal of structural biology*. 134:95-102. DOI: 10.1006/jsbi.2000.4332
8. Barker, B.D., Horodysky, A.Z., Kerstetter, D.W. 2018. Hot or not? Comparative behavioral thermoregulation, critical temperature regimes, and thermal tolerances of the invasive lionfish *Pterois sp.* versus native western North Atlantic reef fishes. *Biol Invasions* 20: 45–58. DOI: 10.1007/s10530-017-1511-4
9. Benítez, R., Ibarz, A., Pagan, J. 2008. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 42(2):227-236. ISSN: 0325-2957.
10. Bouchon, C., Bouchon-Navaro, Y. 2010. Invasión de la mer Caraïbe par *Pterois volitans* et *P. miles*. Université des Antilles et de la Guyane.
11. Bracho, G.E., Haard, N.F. 1995. Identification of two matrix metalloproteinases in the skeletal muscle of Pacific rockfish (*Sebastes sp.*). *Journal of Food Biochemistry* 19(4): 299-319.
12. Campos, F.V., Menezes, T.N., Malacarne, P.F., Costa, F.L.S., Naumann, G.B., Gomes, H.L., Figueiredo, S.G. 2016. A review on the *Scorpaena plumieri* fish venom and its bioactive compounds. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 22:35. DOI: 10.1186/s40409-016-0090-7
13. Carmeli, E., Moas, M., Reznick, A.Z., Coleman, R. 2004. Matrix Metalloproteinases and skeletal muscle: A brief review. *Muscle and Nerve* 26(2): 191-197.



14. Carrasco, F. D. 2004. Organismos de bentos marino sublitoral: algunos aspectos sobre abundancia y distribución. En: Werlinger I. Camilo, Ed., *Biología Marina y Oceanografía: Conceptos y Procesos*. Universidad de Cádiz. Trama Impresores S.A., Talcahuano. 15 (1): 313-345.
15. Cera E. 2009. Critical Review: Serineproteases. *Life* 61(5):510-515. DOI: 10.1002/iub.186
16. Charlotte, D.R., Yolande, B.N., Cordonnier, S., Claude, B. 2016. The invasive lionfish, *Pterois volitans*, used as a sentinel species to assess the organochlorine pollution by chlordecone in Guadeloupe (Lesser Antilles). *Marine Pollution Bulletin* 107(1): 102–106. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2016.04.012
17. Cheung R.C.F., Ng T.B., Wong J.H. 2015. Marine peptides: Bioactivities and applications. *Marine Drugs* 13(7):4006-4043. DOI:10.3390/md13074006
18. Cohen, A.S., Olek, A.J. 1989. An extract of lionfish (*Pterois volitans*) spine tissue contains acetylcholine and a toxin that affects neuromuscular transmission. *Toxicon* 27(122):1367-1376.
19. Côté, I.M., Smith, N.S. 2018. The lionfish *Pterois* sp. invasion: Has the worst-case scenario come to pass? *Journal of Fish Biology* 92(3), 660–689. DOI:10.1111/jfb.13544
20. Del Moral, S., Ramírez-Coutiño, L.P., García-Gómez, M.J. 2015. Aspectos relevantes del uso de enzimas en la industria de los alimentos. *RelbCi* 2(3): 87-102. ISSN 2334-2501.
21. Díaz-Ferguson, E.E., Hunter M.E. 2019. Life history, genetics, range expansion and new frontiers of the lionfish (*Pterois volitans*, Perciformes: Pteroidae) in Latin America. *Regional Studies in Marine Science*. 31, 100793; DOI: 10.1016/j.rsma.2019.100793
22. Espósito, T.S., Amaral I.P.G., Buarque D.S., Oliveira G.B., Carvalho Jr. L.B., Bezerra R.S. 2009. Fish processing waste as a source of alkaline proteases for laundry detergent. *Food Chemistry* 112:125-130. DOI:10.1016/j.foodchem.2008.05.049
23. Fernandes, P. 2014. Marine enzymes and food industry: insight on existing and potential interactions. *Front Mar Sci*1(46). DOI: 10.3389/fmars.2014.00046
24. Fishelson, L. 1975. Ethology and reproduction of pteroid fishes found in the Gulf of Aqaba (Red Sea), especially *Dendrochirus brachypterus* (Cuvier), (Pteroidae, Teleostei). *Pubbl. Staz. Zool. Napoli* 39:635-656.
25. Foegeding, E.A., Lanier, T.C., Huiltion, H.O. 2000. Características de los tejidos musculares comestibles. *Química de los Alimentos*. Acribio, Zaragoza, España.
26. Folco, J.E., Busconi, L., Martone, C.B, Sanches, J.J. 1989. Fish skeletal muscle contains a novel serine proteinase with an unusual subunit composition. *Biochem J* 263: 471-475.
27. García, G.M., Serrano, M.A.J., Montolio, M.F., Caballero, H.A. 2011. "Conozcamos el Mar": El Pez León. *El Mundo del Mar al Alcance de Todos*. No12. Acuario Nacional de Cuba.
28. Gerwick, W., Moore, B. 2012. Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. *Chemistry & Biology* 19(1): 85–98. DOI: 10.1016/j.chembiol.2011.12.014
29. Gokulalakshmi, E., Sri Kumaran, N. & Vijayaraj, R. 2018. A mini review onbioprospecting of fish venom. *IJCRT* 6: 1177-1181.

30. González-C., J.D., Acero-P., A., Serrat-Ll., A., Betancur-R., R. 2011. Caracterización taxonómica de la población del pez león *Pterois volitans* (Linnaeus 1758) (Scorpaenidae) residente en el Caribe colombiano: merística y morfometría. *Biota Colombiana* 12(2):15-22. ISSN: 0124-5376.
31. Gozlan, Rodolphe. 2008. Introduction of non-native freshwater fish: Is it all bad? *Fish and Fisheries*. 9: 106 - 115. 10.1111/j.1467-2979.2007.00267.x.
32. González-C., J.D. 2014. El pez león *Pterois volitans* (Scorpaenidae) como estudio de caso de invasiones biológicas marinas: aspectos biológicos y ecológicos en el Caribe occidental insular colombiano. Mgtr. Universidad Nacional de Colombia, Santa Marta.
33. Guerrero, L.I., Rosmini, M.R. 2018. Los componentes químicos de los productos pesqueros. En: Guerrero Lagarreta Isabel, Rosmini Garma Marcelo Raúl, Armenta López Roberto R., editores, *Utilización de Pescados y Mariscos: Tecnologías e Innovación*. Editorial Académica Española, Mauricio. 1: 2-32.
34. Haard, N.F., Simpson, B.K. 2000. *Seafood Enzymes: Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality*. Marcel Dekker, Inc., New York, USA.
35. Harris, H.E., Fogg, A.Q., Allen, M.S., Ahrens, R.N.M., Patterson, W.F. 2020. Precipitous declines in Northern Gulf of Mexico invasive lionfish populations following the emergence of an ulcerative skin disease. *Scientific Reports* 10(1):1–17. DOI: 10.1038/s41598-020-58886-8
36. Harris, H.E., Patterson, W.F., Ahrens, R.N., Allen, M.S. 2019. Detection and removal efficiency of invasive lionfish in the northern Gulf of Mexico. *Fisheries Research* 213: 22–32. DOI: 10.1016/j.fishres.2019.01.002
37. Hamner, R.M., D.W. Freshwater, P.E. Whitfield. 2007. Mitochondrial cytochrome b analysis reveals two invasive lionfish species with strong founder effects in the western Atlantic. *Journal of Fish Biology*. 71(B):214–222.
38. Hernández-Sámano A.C., Guzmán-García X., García-Barrientos R. 2017. Actividad enzimática de proteasas de *Cyprinus carpio* (Cypriniformes: Cyprinidae) extraídos de una laguna contaminada en México. *Revista de Biología Tropical* 65(2):589-597. ISSN-0034-7744.
39. Hernández-Sámano, A.C., Guzmán-García, X., García-Barrientos, R., Ascencio-Valle, F., Sierra-Beltrán, A., Vallejo-Córdoba, B., González-Córdova, A. F., Torres-Llanez, M.J., Guerrero-Legarreta, I. 2015. Extracción y caracterización de proteasas de pepino de mar *Isostichopus fuscus* recolectado en el Golfo de California, México. *RMQ* 14(1): 35-47. ISSN: 1665-2738.
40. Hodson, E.J. 2018. Bioeconomía: el futuro sostenible. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. 42(164):188-201. DOI: 10.18257/raccefyn.650
41. Homaei, A., Lavajoo, F., Sariri, R. 2016. Development of marine biotechnology as a resource for novel proteases and their role in modern biotechnology. *International Journal of Biological Macromolecules* 88: 542-552.
42. Hultmann, L., Rustad, T. 2004. Iced storage of Atlantic salmon (*Salmon salar*) effects on endogenous enzymes and their impact on muscle proteins and texture. *Food Chemistry* 87(1):31-41.
43. Johnston, M.W., Bernard, A.M., Shivji, M.S. 2016. Forecasting lionfish sources and sinks in the Atlantic: are Gulf of Mexico reef fisheries at risk? *Coral Reefs* 36(1): 169–181. DOI: 10.1007/s00338-016-1511-3



44. Khaled H.B., Ghorbel-Belllaaj O., Hmidet N., Jellouli K., Ali N.E-H., Ghorbel S., Nasri M. 2011. A nouvel aspartic protease from the viscera of Sardinelle (*Sardinella aurita*): Purification and characterisation. *Food Chemistry* 128: 847-853. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.03.104
45. Kimball, M., Miller, J., Whitfield, P., Hare, J. 2004. Thermal tolerance and potential distribution of in vasive lionfish (*Pterois volitans/miles* complex) on the east coast of the United States. *Marine Ecology Progress Series*. 283: 269-278. DOI: 10.3354/meps283269.
46. Kinoshita, M., Toyohara, H., Shimizu, Y. 1990. Characterization of two distinct latent proteinases associated with myofibrils of crucian carp (*Curmsius auratus* Cuvieri). *Comparative Biochemistry and Physiology* 97B: 315-319.
47. Kolodziejaska, I., Sikorski, Z.E. 1996. Neutral and alkaline muscle proteases of marine fish and invertebrates: a review. *Journal of Food Biochemistry* 20:349-364.
48. Ktari, N., Ben Khaled, H., Nasri, R., Jellouli, K., Ghorbel, S., Nasri, M. 2012. Trypsin from zebra blenny (*Salaria basilisca*) viscera: Purification, characterisation and potential application as a detergent additive. *Food Chemistry* 130(3):467-474.
49. Laemmli, UK. 1970. Clavage of structural proteins during the assembly of the head off bacteriophage T4. *Nature* 227: 680- 185.
50. Lassoued, I., Hajji, S., Mhamdi, S., Jridi, M., Bayouadh, A., Barkia, A. 2015. Digestive alkaline proteases from thornback ray (*Raja clavata*): Characteristics and applications. *International Journal of Biological Macromolecules* 80:668-675.
51. López-Otín, C., Bond, J. 2008. Proteases: Multifunctional enzymes in life and disease. *The Journal of Biological Chemistry* 283(45):30433-30437. DOI:10.1074/jbc.R800035200
52. Lyons, T.J., Tuckett, Q.M., Hill, J.E. 2019. Characterizing the US trade in lionfishes. *Plos One* 14(8): e0221272. DOI: 10.1371/journal.pone.0221272
53. Lysenko, L.A., Kantserova, N.P., Kaivarainen, E.I., Krupnova, M.Y., Nemova N.N. 2017. Skeletal muscle protease activities in the early growth and development of wild Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 211:22-28. DOI: 10.1016/j.cbpb.2017.05.001
54. Maljković, Aleksandra, Leeuwen, Travis, Cove, S.N. 2008. Predation on the invasive red lionfish, *Pterois volitans* (Pisces: Scorpaenidae), by native groupers in the Bahamas. *Coral Reefs*. 27. DOI: 10.1007/s00338-008-0372-9
55. Malpica-Cruz, L., Green, S.J., Côté, I.M. 2019. Temporal and ontogenetic changes in the trophic signature of an invasive marine predator. *Hydrobiology* 839:71-86. DOI:10.1007/s10750-019-03996-2
56. Manso, L., Ros, U., Del Rivero, M.A., Lanio, M.E., Álvarez, C. 2015. Proteolytic and hemolytic activity on the venom of lionfish *Pterois volitans*, an invasive species of Cuban seacoasts. *RCCB* 4(2): 57-63.
57. Mazur, A., Harrow B. 1973. *Bioquímica Básica*. 10a ed. Interamericana, México.
58. Molina Ureña, H. 2009. El pez león del Indo-Pacífico: Nueva especie invasora en Costa Rica. *Biocenosis* 22: 1-2. Recuperado a partir de <https://revistas.uned.ac.cr/index.php/biocenosis/article/view/1252>
59. Morcelle del Valle, S.R., Gomes, M.T.R., Vairo- Cavalli, S.E. 2009. Caracterización bioquímica y estructural de proteasas. En: Caffini Néstor O., Ed. *Enzimas proteolíticas de vegetales superiores. Aplicaciones industriales*. CYTED, Buenos Aires, cap.14, pp.163-175.

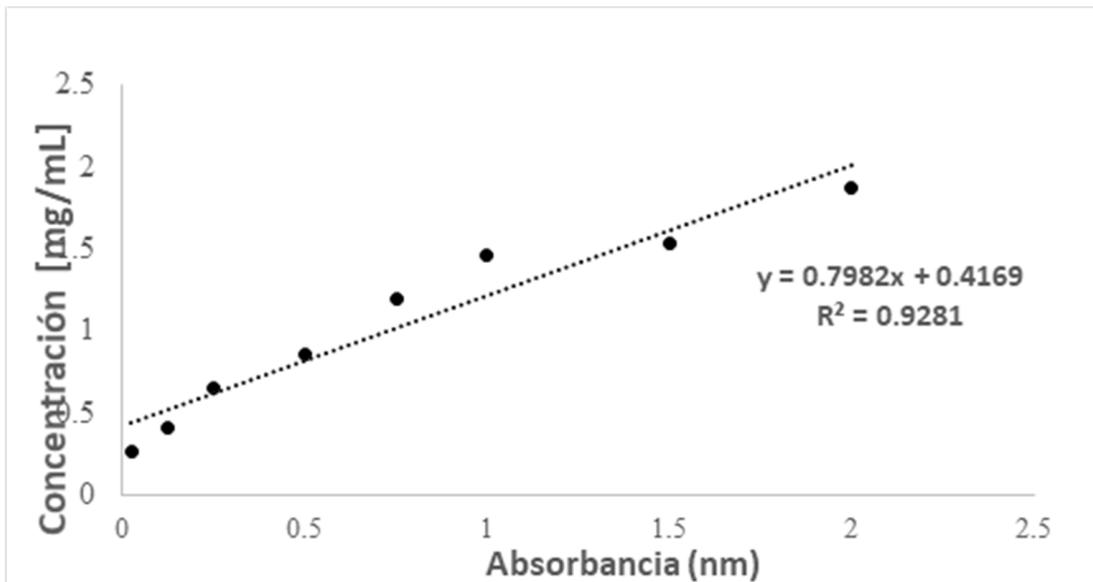


60. Morris, J.A.Jr. (Ed.). 2013. El pez león invasor: guía para su control y manejo. Gulf and Caribbean Fisheries Institute Special Publication Series. Marathon, Florida, USA.
61. Morris, J.A., Jr., Whitfield, P.E. 2009. Biology, Ecology, Control and Management of the Invasive Indo-Pacific Lionfish: An Updated Integrated Assessment. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 99:57.
62. Nair, M.S.R., Cheung, P., Leong, I., Ruggieri, G.D. 1985. A non-proteinaceous toxin from the venomous spines of the lionfish *Pterois volitans* (Linnaeus). *Toxicon* 23(3):525-527.
63. Negrete-Soto, F., Franco-Gordillo, R., Barradas-Ortíz, C. 2012. Una alternativa para el control de pez león (*Pterois volitans*) en Puerto Morelos (México) y análisis preliminar del impacto de esta especie en la fauna arrecifal local. *Proceedings Gulf Caribbean Fisheries Institute* 64: 539.
64. Park, P.J., Lee, S.H., Byun, H. G., Kim, S.H., Kim, S.K. 2002. Purification and characterization of a collagenase from the mackerel, *Scomber japonicus*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 35(6): 576-582.
65. Pérez B., A.A. 2018. Análisis preliminar de los componentes proteicos del veneno del pez león *Pterois volitans* de la costa de Santa Marta y evaluación de su actividad biológica. Mgtr. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
66. Pinsky, M.L., Selden, R.L., Kitchel, Z.J. 2020. Climate-driven shifts in marine species ranges: Scaling from organisms to communities. *Annual Review of Marine Science* 12:153–79. DOI: 10.1146/annurev-marine-010419-010916
67. Rao, M.A., Scelza, R., Scotti, R., Gianfreda, L. 2010. Role of enzymes in the remediation of polluted environments. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 10(3):333-353.
68. Rao, T.E., Imchen, M., Kumavath, R. 2017. Marine Enzymes: Production and Applications for Human Health. In: Kim S.K., Toldrá, F. *Advances in Food and Nutrition Research*. Burlington: Academic Press. 80: 149-163. ISBN: 978-0-12-809587-4.
69. Reyes-Bonilla, H., Petatán-Ramírez, D. 2020. Zonas susceptibles de invasión por parte del pez león en el Pacífico Mexicano. *Revista Ciencias Marinas y Costeras*. DOI: 10.15359/revmar.12-2.1
70. Sánchez, M.M.L., García, B.R. 2018. Enzimas Marinas. In: Guerrero Lagarreta Isabel, Rosmini Garma Marcelo Raúl, Armenta López Roberto R. *Utilización de Pescados y Mariscos: Tecnologías e Innovación*. Editorial Académica Española, Mauricio. 8:219-252.
71. Santhanam, R. 2019. *Biology and Ecology of Venomous Marine Scorpionfishes*. Elsevier Inc., Chennai, India.
72. Sri Balasubashini, M., Karthigayan, S., Somasundaram, S.T., Balasubramanian, T., Viswanathan, P., Menon, V.P. 2006. *In vivo* and *in vitro* characterization of the biochemical and pathological changes induced by lionfish (*Pterios Volitans*) venom in mice. *Toxicol Mech Methods* 16(9): 525-531, DOI:10.1080/15376510600803573
73. Sriket, C. 2014. Proteases in fish and shellfish: Role on muscle softening and prevention. *International Food Research Journal* 21(1):433-445.
74. Sriket, C., Benjakul, S., Visessanguan, W. 2010. Post-mortem changes of muscle from fresh water prawn (*Marcrobranchiym rosenbergii*) as influenced by spawning stages. *Food Science and Technology* 43(4): 608-616.

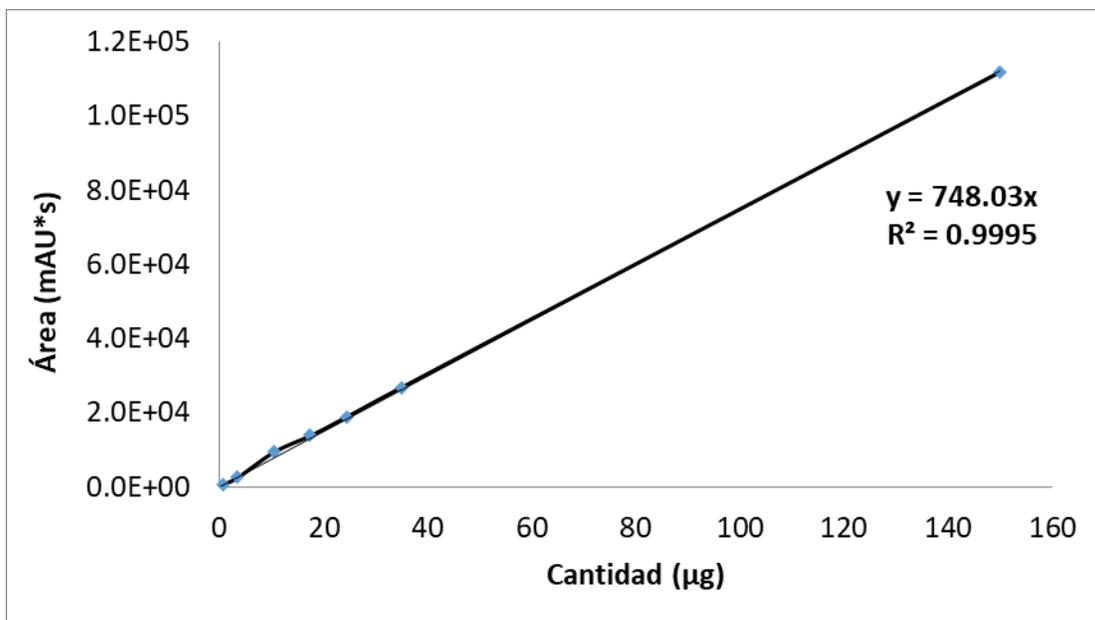


75. Stell, C.S., Van Leeuwen, T.E., Brownscombe, J.W., Cooke, S.J., Eliason, E.J. 2019. An appetite for invasion: digestive physiology, thermal performance, and food intake in lionfish (*Pterois* spp.). *Journal of Experimental Biology* 222: jeb209437. DOI: 10.1242/jeb.209437
76. Valenzuela, C., Zuloaga, R., Mercado, L., Einarsdottir, I., Björnsson, B., Valdés, J. 2017. Chronic stress inhibits growth and induces proteolytic mechanisms through two different non overlapping pathways in the skeletal muscle of a teleost fish. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 314 (1): R102-R113.
77. Vélez, E.J., Azizi, S., Verheyden, D., Salmerón, C., Lutfi, E., Sánchez-Moya, A., Navarro, I., Gutiérrez, J., Capilla, E. 2017a. Proteolytic systems expression during myogenesis and transcriptional regulation by amino acids in gilthead sea bream cultured muscle cells. *PLoS One* 12(12):e0187339. DOI: 10.1371/journal.pone.0187339
78. Vélez, E.J., Azizi, S., Lutfi, E., Capilla, E., Moya, A., Navarro, I. 2017b. Moderate and sustained exercise modulates muscle proteolytic and myogenic markers in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 312(5):R643-R653. DOI:10.1152/ajpregu.00308.2016
79. Villaseñor-Reyes, S.M. 2018. Diseño de un plan de acción para el aprovechamiento sustentable del pez león (*Pterois volitans*), en el Sistema Arrecifal Lobos-Tuxpan. Mtra. Universidad Veracruzana, Poza Rica.
80. Wang, J.J., Jiang, S.T. 1991. Properties of calpain II from tilapia muscle (*Tilapia nilotica* x *Tilapia aurea*). *Agric Biol Chem* 55:1133-1139.
81. Wilcox, C.L., Motomura, H., Matsunuma, M., Bowen, B.W. 2017. Phylogeography of lionfishes (*Pterois*) indicate taxonomic over splitting and hybrid origin of the invasive *Pterois volitans*. *Journal of Heredity* 109(2): 162–175. DOI:10.1093/jhered/esx056
82. Ziegman, R., Alewood, P. 2015. Bioactive components in fish venoms. *Toxins* 7: 1497-1531. DOI: 10.3390/toxins7051497

## ANEXO



**Figura 1.** Curva estándar para cuantificación de proteína por el método de Ácido Bicinónico (BCA) utilizando albumina sérica bovina (BSA) como estándar.



**Figura 2.** Curva estándar para cuantificación de proteína utilizando Insulina b como estándar.