



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Evaluación del posible efecto antitumoral del extracto de *Carybdea marsupialis* (Cnidaria: cubozoa) sobre tumores inducidos con N- etil- N- nitrosourea (ENU) en el Sistema Nervioso Central de ratas.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

VIRIDIANA ANAID DE LA O FERNÁNDEZ.

Tlalnepantla, Edo. de México

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatoria

A la Dra. Lourdes Segura Puertas q.e.p.d.

Agradecimiento

**Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT) por la Beca de Tesis de
Licenciatura COMECYT – CONACYT.**

Agradecimiento

A la Fundación Armstrong, por el apoyo otorgado a través de la Beca de Investigación.

INDICE

RESÚMEN

INTRODUCCIÓN

Compuestos de origen biológico con potencial farmacológico

Metabolitos secundarios con actividades farmacológicas

Neurotoxinas marinas

Phylum Cnidaria

Cnidocitos

Importancia de las sustancias químicas presentes en los Nematocistos

Clase Cubozoa

Carybdea marsupialis

Toxinas de origen marino con actividad antitumoral

Tumores en el Sistema Nervioso Central (SNC)

Tumorigénesis

Inducción de tumores con N-Etil-N-nitrosourea (ENU)

OBJETIVO GENERAL

Objetivos Particulares

METODOLOGÍA

Obtención del extracto de *Carybdea marsupialis*

Determinación de la Dosis Letal (LD₅₀)

Cuantificación de Proteínas

Inducción tumoral prenatal

Administración del tratamiento antitumoral

Obtención del tejido de SNC y técnicas histológicas

RESULTADOS

Inducción tumoral

Determinación de la Dosis Letal 50 del extracto de *C. marsupialis*

Análisis histológico

Efecto del extracto de *C. marsupialis* sobre las neoplasias inducidas con ENU en el SNC de ratas

DISCUSIÓN

Desarrollo de neoplasias ENU-inducidas

Dosis Letal ₅₀ del extracto crudo de *C. marsupialis*

Efecto del extracto crudo de *C. marsupialis* sobre neoplasias ENU-inducidas en el SNC

CONCLUSIONES

ANEXO PROCEDIMIENTOS

N-Etil-N-Nitrosourea (ENU)

Preparación del extracto crudo de *C. marsupialis*

Cuantificación de Proteínas

Bioensayos

Determinación de la Dosis Letal (LD50), Método Lehman

Administración Estereotóxica

Bombas Osmóticas ALZET

Perfusión Vía Intracardiaca de Ratas

Inclusión en Parafina

Tinción: Hematoxilina-Eosina

REFERENCIAS

RESÚMEN

Los Cnidarios son especies marinas que poseen órganos especializados para su defensa llamados Nematocistos los cuales alojan sustancias que pueden contener: neurotoxinas. Un ejemplo de ello son los estudios realizados en *Carybdea marsupialis* del Caribe mexicano, en dicho estudio se evaluaron los efectos de una neurotoxina aislada de los nematocistos presentes en los tentáculos. Estos compuestos pueden representar una alternativa para el tratamiento de diferentes padecimientos como el cáncer, el cual consiste en divisiones celulares desordenadas provocadas entre otros factores, por agentes alquilantes tales como los nitroso-compuestos los cuales provocan efectos biológicos como la mutagenicidad y la teratogenicidad. Dentro de los nitroso-compuestos se encuentra la N-etil-N-nitrosourea (ENU), que se ha utilizado para desarrollar modelos experimentales en roedores, ya que se conoce con gran precisión el periodo de latencia para el desarrollo de los tumores en el Sistema Nervioso Central, inducidos tras la exposición prenatal al carcinógeno. En el presente trabajo se caracterizó el efecto del extracto crudo de *Carybdea marsupialis* como tratamiento antitumoral en el Sistema Nervioso Central (SNC), inducidos prenatalmente por ENU en ratas de la cepa Wistar. Para lograr este objetivo, se obtuvo la dosis de seguridad, de la dosis letal media del extracto crudo de *C. marsupialis* (1/10 LD50=55µg de proteína / gr de peso de rata). La cual se administró por medio de la implantación de Bombas iso-osmóticas en ratas expuestas prenatalmente al carcinógeno ENU. Posterior al análisis estadístico, encontramos que la disminución en la expresión tumoral fue mínima; esta disminución se presentó en los gliomas de la médula espinal de tipo ependimario.

INTRODUCCIÓN

Compuestos de origen biológico con potencial farmacológico

El hombre se ha mantenido en la búsqueda de la cura para sus diversos padecimientos, y los productos derivados de plantas y animales han sido por mucho tiempo de gran valor biomédico, debido a que los productos aislados de tales organismos han constituido la principal fuente de drogas para el tratamiento de diferentes enfermedades, lo cual ha motivado el estudio de productos naturales que presentan actividad biológica (Torrens, 2004).

El planeta ofrece una increíble diversidad de vida, con un gran número de especies animales y vegetales que han evolucionado para adaptarse a los distintos ecosistemas. Esta adaptación ha tenido como una de sus múltiples consecuencias, la presencia de diversas sustancias altamente activas, las cuales tienen una basta cantidad de compuestos químicos que van desde moléculas pequeñas hasta grandes complejos proteicos (Mebis, 2001), que para el ser humano representan un gran espectro de estructuras moleculares nuevas o poco conocidas que pueden ser sintetizadas químicamente para manipularlas y convertirlas en productos útiles (Torrens, 2004).

Durante las últimas dos décadas, se ha incrementado la investigación de dichos compuestos naturales, tradicionalmente la búsqueda de sustancias activas habían sido canalizadas en el campo botánico, alrededor del 25 % de todas las ventas de productos farmacéuticos son drogas derivadas de productos naturales de plantas, y un 12 % adicional está basado en productos naturales producidos por microorganismos (Garateix, 2005).

Actualmente la obtención de sustancias orgánicas con actividad biológica aisladas de organismos marinos, ha puesto en el mapa a los océanos como fuente de nuevos compuestos, si consideramos que cerca del 80% de los organismos vivos del reino animal habitan en el mar, es sorprendente que menos del 1% de las especies marinas hayan sido investigadas con este fin (Garateix, 2005). Los organismos presentes en dicho hábitat representan un gran potencial en el campo de la farmacología. (Torrens, 2004).

Este potencial es producto de las condiciones bajo las cuales los organismos marinos están sometidos, una de estas se debe a la gran concentración de especies coexistiendo en el ambiente marino, lo cual hace que estos organismos sean altamente competitivos y complejos.

Como resultado de la competencia las especies han desarrollado medios químicos para defenderse de sus depredadores, así como de la sobrepoblación de especies competidoras o para lograr la inmovilidad de sus presas (Benslimane *et al.* 1988). Para sobrevivir en este ambiente algunos organismos marinos, como por ejemplo corales, anémonas, medusas, entre otros; cuentan con sustancias llamadas toxinas (Cifuentes *et al.* 1987) las cuales les confieren ventajas adaptativas, empleándolas para ejercer efectos biológicos adversos en otros organismos, lo que provoca que sinteticen moléculas que no tienen equivalencia con las terrestres. Estas sustancias son altamente específicas desde el punto de vista biológico, ya que han evolucionado al igual que los organismos a lo largo de millones de años (Cerdá-García, 1999).

Entre los animales que producen toxinas, existen dos mecanismos para síntesis de estas: la expresión génica que da lugar directamente a un péptido o a una proteína; o a través de rutas metabólicas complejas que incluyen numerosas reacciones catalizadas por enzimas específicas. En este último, se producen metabolitos secundarios que también pueden tener actividad farmacológica (Mebs, 2001).

Metabolitos secundarios con actividades farmacológicas

Los metabolitos secundarios producidos por un organismo, son moléculas que no intervienen directamente en las reacciones esenciales de su metabolismo, pero que determinan las relaciones de los seres vivos con su medio aumentando su competitividad. El significado del por que estos metabolitos presentan actividades farmacológicas, se debe a que muchas de estas sustancias han sido seleccionadas en el curso de la evolución como mensajeros químicos, por lo que estos vectores de información, deben tener una acción selectiva sobre los receptores bioquímicos de los seres vivos. Un medicamento debe tener esta misma propiedad, por lo que los metabolitos secundarios, y en especial las toxinas, constituyen una fuente importante de nuevos medicamentos (Sobrino, 1996).

El presente estudio se enfoca en un tipo de metabolito secundario, la Toxina: el cual es un término no específico utilizado para describir una sustancia dañina a las células vivas, restringida a sustancias de origen proteico y antigénico. Las toxinas son sustancias de origen biológico, que se emplean para ejercer efectos biológicos adversos en otros organismos. Una toxina implica un sitio anatómico específico de origen, un único modo de despliegue y una función biológica específica, por ejemplo las neurotoxinas, cuyo efecto se produce en el Sistema Nervioso (Torrens, 2004).

Neurotoxinas marinas

Las neurotoxinas son moléculas que actúan contra una función específica del Sistema Nervioso, sus efectos dependen de la dosis y la vía de exposición, pudiendo ser temporales o permanentes, incluso producir la muerte (Torrens, 2004).

Actualmente, algunas neurotoxinas ya han sido utilizadas para el diagnóstico y tratamiento de distintas patologías. Debido a la especificidad, constituyen una herramienta sumamente útil para dilucidar el papel que juegan ciertas moléculas importantes, así como los mecanismos básicos del funcionamiento del Sistema Nervioso (Torrens, 2004). Además se ha sugerido que algunos de los lugares de unión de las toxinas son los responsables de las propiedades de activación, inactivación y permeabilidad del canal de Na⁺. Por ello, las toxinas se clasifican en activadoras, bloqueadoras y estabilizadoras (Torrens, 2004).

En los años setenta y ochenta, compañías farmacéuticas en colaboración con universidades, se dieron a la tarea de iniciar programas de investigación para la evaluación sistémica de los compuestos de organismos marinos, para aplicaciones industriales, agrícolas o farmacológicas. Encontraron aproximadamente 2500 nuevos compuestos activos de una amplia variedad de organismos, desde microbios procariontes e invertebrados hasta vertebrados, siendo los grupos más representativos como macroalgas, cnidarios, equinodermos y esponjas (Estrada, 2001). A continuación se describen algunos de estos estudios.

El estudio de las toxinas de origen marino inició en los años setenta, con el hallazgo de dos compuestos: Tetrodotoxina (extraída de los peces globo) y la Saxitoxina (extraída de dinoflagelados) (Figura 1), los cuales, por la especificidad de sus efectos así como por la potencia de sus acciones, han permitido profundizar en la caracterización estructural y funcional de los canales de sodio (Garateix *et al.* 2003).

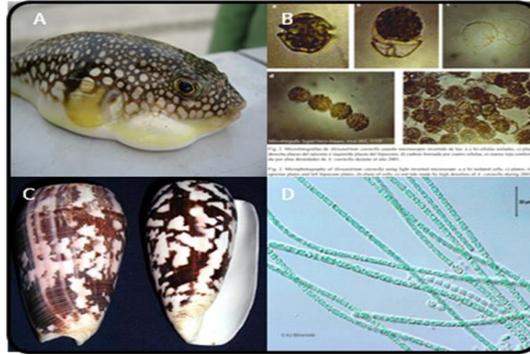


Figura 1: Ejemplos de especies marinas con efectos neurotóxicos. **A)** Pez Globo del Genero: *Takifugu*, productor de Tetrodoxina. (upload.wikimedia.org) **B)** Dinoflagelado: *Alexandrium catenella*, posee la Saxitoxina. (weblogs.madrimas.org) **C)** *Conus striatus*, portador de Conotoxinas. (www.sealifegifts.net) **D)** Filamentos de cianobacteria Género: *Anabaena*, posee compuestos con efectos neurotóxicos. (www-biol.paisley.ac.uk).

Otro hallazgo en este campo fue el que se dió a partir del veneno de diversas especies de conos (Figura 1), que han sido denominados: “conotoxinas” y están agrupados en 3 clases: alfa-conotoxinas, que tienen como sitio blanco los receptores colinérgicos; mu-conotoxinas, que tienen como blanco los canales de sodio del músculo esquelético y omega-conotoxinas, que se unen a los canales de calcio neuronales (Garateix *et al.* 2003).

También a partir de diversos géneros de cianobacterias (algas verde-azules) (Figura 1), se han aislado neurotoxinas como la anatoxina-a que es un importante bloqueador neuromuscular post-sináptico, un género productor de dicha neurotoxina es el género *Anabaena* (Roset *et al.* 2001).

Los organismos conocidos como anémonas, pertenecientes al Phylum Cnidaria; han sido fuente de compuestos capaces de ejercer acciones fisiológicas muy específicas sobre los canales iónicos y han contribuido a la caracterización de los mecanismos moleculares de funcionamiento de los canales de sodio en tejido muscular y nervioso (Garateix *et al.* 2003).

Phylum Cnidaria

El phylum Cnidaria, agrupa a hidras, medusas, anémonas y corales. Con excepción de las hidras y otros cuantos hidrozoarios dulceacuícolas, los Cnidarios son marinos y su rico registro fósil data del periodo Cámbrico; cuentan con simetría radial. Los cnidarios poseen dos peculiaridades básicas de los metazoarios: 1. Presentan una cavidad interna donde ocurre la digestión, que en los Cnidarios se denomina cavidad gastrovascular. Esta se localiza a lo largo del eje polar del animal y desemboca al exterior en uno de los extremos, formando la boca. En los Cnidarios la boca está rodeada por un círculo de tentáculos, que en realidad son extensiones de la pared del cuerpo y cuya función es ayudar a la captura e ingestión de alimento. 2. La pared del cuerpo de los Cnidarios consta de tres capas básicas; una capa externa de epidermis, una capa interna de células que recubren la cavidad gastrovascular y una capa de mesoglea entre estas dos capas, las células de esta capa parecen tener su origen en la epidermis. Así, los cnidarios son dipoblásticos, es decir, su cuerpo consta de sólo dos capas germinales (Figura 2), el ectodermo y el endodermo (Barnes, 1989).

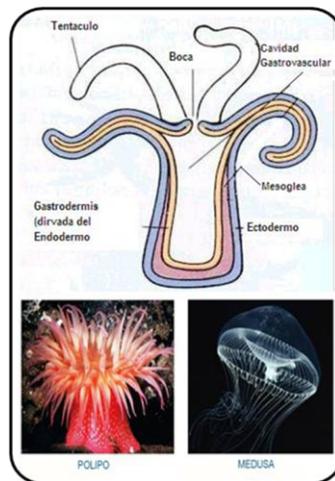


Figura 2: Capas germinales y tipos estructurales de Cnidarios. Se ejemplifica en la forma pólipo, la presencia de ectodermo y endodermo. Así mismo se muestran la estructura de la forma pólipo y medusa. (www.luciopesce.net)

Si bien todos los Cnidarios tienen como características básicas la presencia de tentáculos y la simetría radial, dentro del phylum se observan dos tipos estructurales. Uno de ellos, de hábito sésil, se conoce como pólipo (Figura 2). La otra forma es libre nadadora y recibe el nombre de medusa (Barnes, 1989).

El cuerpo medusoide tiene aspecto de campana o sombrilla, con el lado convexo hacia arriba y la boca situada en el centro del lado cóncavo. Los tentáculos cuelgan del margen de la campana. A diferencia de la mesoglea polipoide (capa intermedia), que es más o menos delgada, la mesoglea medusoide es sumamente gruesa y constituye la mayor parte del volumen animal (Barnes, 1989).

La epidermis consta de cinco tipos celulares principales: células epitelio-musculares, células intersticiales (estas dan origen a óvulos, espermatozoides y a cualquier otro tipo de célula), células secretoras glandulares, células nutritivo-muscular, célula enzimática, células sensoriales - nerviosas y cnidocitos (Figura 3) (Barnes, 1989).

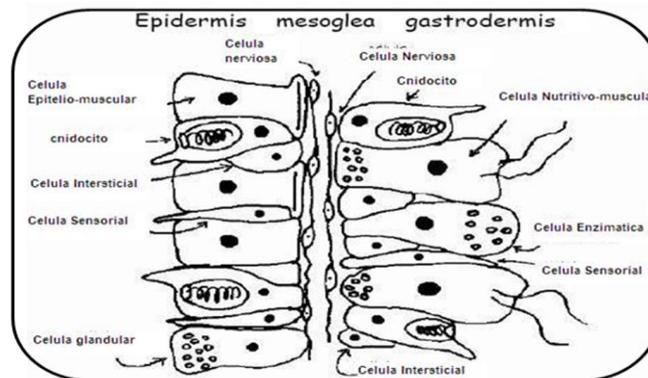


Figura 3: Tipos celulares presentes en la epidermis de Cnidarios. Se señala la ubicación de los mismos, en epidermis, mesoglea y gastrodermis. (www.alaquairum.net).

Cnidocitos

Los cnida o cnidocistos es el término colectivo que se utiliza para denominar las tres principales categorías de organoides capsulares presentes en los Cnidarios (nematocistos, espirocistos, ptcocistos). Este tipo de células están alojados entre células epitelio-musculares o completamente dentro de ellas. Son en particular abundantes en los tentáculos. Estas células especializadas, que son características de los Cnidarios, contienen organelos evaginables, el cnidocito es una célula corta y rígida, parecida a una púa. La ultraestructura del cnidocilio es parecida a la del flajelo y esta expuesta a la superficie (Figura 4), (Barnes, 1989). De las tres categorías de cnida, sólo los nematocistos son de importancia médica. Los otros dos tipos, los espirocistos y los ptcocistos, se encuentran exclusivamente en la clase Anthozoa (Estrada, 2001).

La estructura de los nematocistos es bastante compleja considerando que su tamaño oscila entre 5 μm y 1.2mm de longitud, el interior está relleno por una cápsula de doble pared (compuesta principalmente de queratina y colágeno) y un túbulo o filamento enrollado dentro de la cápsula que varía en estructura y función, el túbulo puede tener varias estructuras accesorias como espinas, estiletes, barbas y lamelas; éste filamento penetra, se adhiere o enreda en la presa cuando el nematocisto se descarga debido a un estímulo apropiado (Figura 4). El túbulo descargado varía en tamaño, diámetro y estructura (entre los distintos tipos de nematocistos), generalmente posee diferentes tipos de espinas (Estrada, 2001) y el extremo de la cápsula que se dirige hacia el exterior está cubierto por un opérculo o por pliegues que funcionan como tapas. La base está anclada a las prolongaciones laterales de una o más células epiteliomusculares. Los nematocistos se cree que son productos de secreción, originados en el aparato de Golgi (Holstein y Tardent, 1984). De acuerdo con Williamson y cols. (1996) existen 24 tipos diferentes de nematocistos. El tipo y cantidad, así como la composición del veneno varía considerablemente en cada especie, por ello algunas resultan más peligrosas (Estrada, 2001).

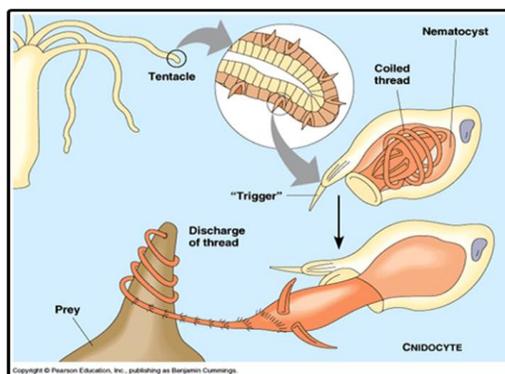


Figura 4: Mecanismo de disparo de un Nematocisto, se muestra el proceso mediante el cual los cnidarios descargan las sustancias tóxicas que poseen en los cnidocitos; ubicados principalmente en los tentáculos. (Pearson education. Inc.)

Al parecer el mecanismo de disparo consiste en un cambio de permeabilidad de la pared de la cápsula. Ante la influencia combinada de estímulos mecánicos y químicos, que se reciben y procesan inicialmente en la estructura superficial del cnidocito, el opérculo o pliegues apicales de los cnidos se abren. La presión hidrostática generada en el interior de la cápsula expulsa el tubo. Por lo general los cnidocitos se disparan como efectores independientes, aunque es probable que este fenómeno este controlado en parte por impulsos nerviosos provenientes de la terminal neuronal asociada con el cnidocito, de modo que las conexiones neuronales pueden servir para el disparo coordinado de un gran número de nematocistos. El nematocisto disparado consta de una cápsula y un tubo filiforme de longitud variable. El

tubo o filamento suele estar armado con espinas, sobre todo alrededor de la base, y su punta puede estar cerrada o abierta (Barnes, 1989). Cuando los nematocistos son disparados, el túbulo se inserta en el tejido de la víctima y transporta el veneno que se encuentra dentro de la cápsula (Figura 4). La presencia de estos nematocistos se interpreta como un sistema de defensa química frente a factores externos causantes de estrés, como la depredación, o la fuerte competencia por el espacio (Carballo, 2000). Los nematocistos contienen mezclas complejas de polipéptidos tóxicos y /o antigénicos, así como enzimas de alto peso molecular, y patógenas para los humanos, que actúan tanto de manera local como sistémica (Barnes, 1989).

Importancia de las sustancias químicas presentes en los Nematocistos

Al grupo de los Cnidarios pertenecen cerca de 10,000 especies, de las cuales aproximadamente 100 se consideran tóxicas para los humanos y otros organismos. Los Cnidarios son responsables del mayor número de envenenamientos que cualquier otro Phylum marino (Torrens, 2004). Esto ha llamado la atención de los científicos ya que algunas especies contienen toxinas altamente letales y con acción específica (Sánchez-Rodríguez *et al.* 2006). Se afirma que las toxinas que poseen estos organismos se encuentran dentro de los venenos más potentes hasta ahora conocidos (Estrada, 2001).

Para la caracterización de la actividad de tales toxinas, se han realizado estudios con extractos obtenidos de los tejidos de Cnidarios como los realizados por Halstead entre 1965 y 1967 y Rusell en 1965; en donde reportan los efectos químicos y fisiológicos de las toxinas presentes en los nematocistos, encontrando sustancias tóxicas de naturaleza peptídica y proteica, neurotoxinas, hemolisinas, citolisinas. Los efectos fisiológicos y dermatológicos más documentados son los ocasionados por la fragata portuguesa (*Physalia physalis*), la avispa de mar (*Chironex fleckeri*) y la ortiga de mar (*Chrysaora quinquecirrha*) (Estrada, 2001).

Clase Cubozoa

En el Phylum Cnidaria, uno de los grupos de animales marinos más venenosos es el de las Cubomedusas (Clase Cubozoa) (llamadas comúnmente avispas de mar). Los organismos que se encuentran en esta clase se caracterizan por tener forma cúbica, como su nombre lo dice, sus campanas tienen cuatro lados planos. El margen de dicha campana es simple y ostenta cuatro tentáculos o racimos tentaculares (Figura 5). Viven en los océanos tropicales y subtropicales; algunas de los géneros pertenecientes a esta clase son: *Carybdea*, *Chiropsalmus*, *Chironex* (Barnes, 1989). Estas medusas alcanzan tallas por encima de 20 cm de altura, y un diámetro de 2 a 12 cm (Karp, 1961).



Figura 5: Ejemplo de una especie de la clase Cubomedusa: *Chironex fleckeri*, que muestra la forma típica de una cubomedusa (fishindex.blogspot.com).

Varias especies de cubomedusas han sido consideradas como fuentes potenciales de toxinas, pero la mayoría presentan dificultad para obtenerlas, ya que son lábiles ante los cambios de temperatura y además la toxinas presentes en este grupo difieren en su composición (Estrada, 2001). La principal acción de las toxinas se presenta en los sistemas respiratorio, cardiovascular, nervioso y renal, acompañando a las lesiones cutáneas (Torrens, 2004)

En general, los venenos de las cubomedusas están formados por una gran diversidad de péptidos neurotóxicos con actividad sobre canales iónicos o receptores del sistema nervioso y neuromuscular, péptidos citolíticos que actúan sobre membranas celulares produciendo poros o canales (Rottini *et al.* 1995) y péptidos hemolíticos que ocasionan la ruptura de vasos sanguíneos, entre otros (Edean y Henderson, 1969).

Los efectos del veneno pueden ir desde una ligera dermatitis hasta la muerte instantánea; la severidad de las afecciones varía de acuerdo con la especie de cnidario y con el tipo de nematocistos que posea (Torrens, 2004).

Carybdea marsupialis

Posición Sistemática:

Reino Animalia

Phylum Cnidaria Hatschek, 1888

Clase Cubozoa Werner, 1975

Orden Cubomedusae Gegenbaur, 1856

Familia Carybdeidae Haeckel, 1877

Genero *Carybdea* Peron & Lesueur, 1810

Especie *Carybdea marsupialis* Linné, 1758



Figura 6: *Carybdea marsupialis*, Linné, 1758. Muestra su forma cúbica característica de su clase y los cuatro tentáculos ubicados en cada extremo de la campana (br.geocities.com).

Carybdea marsupialis, Linné 1758, es una cubomedusa que es muy abundante en el caribe mexicano en aguas someras, principalmente donde hay arena y al igual que el resto de las cubomedusas es altamente incospicua siendo prácticamente invisible en el agua. Su distribución geográfica incluye las aguas tropicales de los Océanos Pacífico, Atlántico e Índico (Kramp, 1961). Su cuerpo es transparente excepto por los cuatro órganos sensoriales (que contienen ocelos) localizados en la campana en forma de cubo pequeño y mide alrededor de 2 cm de ancho. La campana se encuentra ornamentada por nematocistos, posee 4 tentáculos, cada uno ubicado en cada esquina de la campana, que extendidos

alcanzan los 30cm de largo (Figura 6); la base de los tentáculos es aplanada (pedalia) y los tentáculos también están ornamentados con anillos de nematocistos (Milla, *et al.* 2000).

La literatura referente a los aspectos biológicos, toxicológicos y médicos del genero *Carybdea* es escasa, Zakj *et al.* (1986) estudiaron los efectos contráctiles de la toxina extraída de *C. rastonii* en aorta aislada de conejo. En la misma especie, Nagase *et al.* (1987) estudiaron los efectos contráctiles y relajantes de la toxina en tejidos vasculares e intestinales; Azila y Othman, (1991) encontraron que los tentáculos contienen factores activos hemolíticos, hemorrágicos y edémicos. Kokelj *et al.* (1993) evaluaron las afecciones dermonecróticas en humanos ocasionadas por *C. marsupialis*. Rottini *et al.* (1995) purificaron y estudiaron las propiedades de una toxina citolítica presente en *C. marsupialis*, que presento actividad hemolítica en células de oveja, pero no así en células de conejo y humano, siendo una proteína con una masa molecular aparente de 102 a 107 kDa. Mientras que Othman *et al.* (1996) mostraron que los componentes hemolíticos y miotóxicos del veneno de las medusas pueden ser parcialmente purificados sin pérdida de actividad biológica. Avian *et al.* (1997) determinaron que *C. marsupialis* presenta tres tipos de nematocistos: Heterotricos microbásicos euritele, Atricos isorrizas haplonemes y Holotricos isorrizas haplonemes (Figura 7).

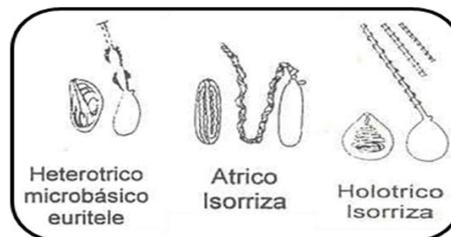


Figura 7: Tipos de nematocistos presentes en *C. marsupialis*, característicos de la especie (Estrada-Muñoz, 2001).

Chung *et. al* (2001) purificaron y caracterizaron las hemolisina CAH1 de *C. alata*. Nagai (2003) documentó las propiedades químicas de algunas toxinas de tres especies de cubomedusas: *Carybdea rastoni*, *Carybdea alata* y *Chrisopsalmus quadrigatus*, las toxinas de estas especies mostraron toxicidad letal en crustáceos y actividad hemolítica en eritrocitos de oveja. Las siete toxinas aisladas presentaron pesos moleculares cercanos a los 45kDa y la secuencia de sus proteínas muestra que existe un 45% de homología entre las especies proteicas de *Carybdea rastoni* y *Carybdea alata* y un 21% entre *Chrisopsalmus quadrigatus* y las dos anteriores.

Estrada (2001), evaluó la actividad hemolítica y citotóxica de las toxinas de *C. marsupialis*, como indicadores del posible potencial que puedan tener estos compuestos, encontrando que en cangrejos de la especie *Ocypode quadrata* y en peces de la especie *Harengula humeralis*, la administración del veneno, produjo la muerte tanto del cangrejo como del pez. También determinó la Dosis Letal₅₀ (LD₅₀) en *H. humeralis* con un valor de 0.003mg. Mientras que en los ensayos hemolíticos, obtuvo hemólisis en eritrocitos de oveja, humano, res y carnero.

Sánchez-Rodríguez *et al.* (2006), describieron una neurotoxina y tres citolisinas aisladas del veneno de *C. marsupialis*, llevando a cabo varios bioensayos, para evaluar el efecto de la toxina sobre cangrejos de la especie *Ocypode quadrata*, determinando (LD₅₀). Las proteínas con efectos neurotóxicos y citolíticos, fueron aisladas usando cromatografía líquida de baja presión y encontrándose una proteína con un aparente peso molecular de 120kDa. Para demostrar la actividad neurotóxica de esta proteína, se tomó una pequeña fracción de la proteína purificada, fue inyectada en un cangrejo, y presentó convulsiones, parálisis y posteriormente la muerte, sugiriendo la acción de una neurotoxina. Las tres fracciones que contienen las citocinas mostraron un peso molecular aparente de 220, 139 y 36 KDa y su actividad citolítica fue confirmada mediante un ensayo de hemólisis.

A partir de este estudio, se demostró la actividad neurotóxica de los nematocistos de la especie *C. marsupialis*.

Además de los compuestos de origen marino con actividad farmacológica, tenemos específicamente algunos ejemplos de extractos que han demostrado actividad antitumoral.

Toxinas de origen marino con actividad antitumoral.

Hablando específicamente de sustancias marinas con actividad antitumoral, se cuentan con varias líneas de investigación dedicadas a elucidar la actividad antitumoral de estas, a continuación se mencionan algunas.

La Dolastafina 10 que es un péptido antimetabólico aislado del molusco marino *Dolabella auricularia*, cuyo mecanismo de defensa es de tipo químico. Entre las sustancias que este molusco produce se caracterizó a la Dolastatina 10. Esta sustancia presentó una importante actividad antitumoral y actualmente se está probando en la Clínica Mayo en Rochester en pacientes con tumores de tipo

colorectal, hepático, pancreático, endometrial, paratiroideo y esofágico. Se sabe que este compuesto inhibe la polimerización de la tubulina (Schwartzmann *et al.* 2001).

Por otro lado las Bryostatinas son una serie de sustancias aisladas de un organismo marino llamado *Bugula neritina*, perteneciente al Phylum Bryozoa. Estas sustancias estructuralmente novedosas constituyen un grupo de agentes antineoplásicos muy potentes y también muy promisorios en las terapias contra el cáncer (Schwartzmann *et al.* 2001).

La Didemnina B es una sustancia de gran interés por su promisorio actividad contra el melanoma maligno, el más peligroso de los cánceres de piel. Esta sustancia es clasificada como un depsipeptido cíclico, que se obtiene del tunicado *Trididemnum solidum* que habita en varias regiones del mar Caribe, tiene una potente actividad citotóxica. Se sabe que esta sustancia se adhiere a la enzima palmitoilproteintioesterasa (PPT), una glicoproteína que remueve los grupos palmitato de los residuos de cisteína en varias proteínas (Schwartzmann *et al.* 2001).

El Discodermolido es un compuesto con potente actividad antitumoral que se obtiene de la esponja marina *Discodermia dissoluta*. Su mecanismo de acción es a nivel de la polimerización microtubular que es muy similar al Taxol. Un estudio comparativo reveló que el discodermolido resultó ser varias veces mas potente que el Taxol aumentando la sobrevivencia de ratones con leucemia (Schwartzmann *et al.* 2001).

Delalogue *et al.* (2001) realizaron un estudio en pacientes con Osteosarcoma que no habían respondido satisfactoriamente a tratamientos repetidos de quimioterapia probando la Ecteinascidina-743 (ET-743), sustancia derivada del Tunicado *Ecteinascidia turbinata* actúa bloqueando el ciclo celular en las fases tardías S y G2, además de afectar el ensamblaje de microtúbulos. En este estudio se concluye que el agente ET- 743 tiene un efecto antitumoral significativo. Actualmente la ET-743 se encuentra en estudios clínicos fase II (Simmons, *et al.*, 2005), representando un avance en la obtención de fármacos de origen marino.

Por otra parte, los resultados del estudio realizado con la especie de medusa *Cassiopea xamachana* (Cx), empleando el modelo de inducción tumoral de N-etil-N nitrosourea (ENU), sugirieron que el veneno de Cx atenúa la expresión de tumores en cerebro y médula espinal y también disminuye la diversidad de tumores expresados en el tejido nervioso después del tratamiento tumoral, en ratas (Orduña-Nova *et al.* 2003).

A continuación se abordaran los temas relacionados con el modelo de inducción tumoral.

Tumores en el Sistema Nervioso Central (SNC).

El Sistema Nervioso Central está conformado por el encéfalo (cerebro, cerebelo y tallo cerebral) y la médula espinal, el primero, se encuentra encerrado y protegido por el cráneo, que tiene una abertura en su base que permite la conexión entre ambos. A través de esta abertura pasa el flujo de mensajes enviados por el cerebro hacia los nervios del cuerpo. Pero esta conexión puede ser afectada por diversas causas, una de ellas son los tumores o neoplasias, originadas por células que llevan a cabo una división sin orden ni control, lo que representa un crecimiento celular anormal, dando como resultado la formación de masas de tejido ocupativas y que afectan a corto o largo plazo la fisiología del SNC (<http://gsk.com.mx/diccionario/cerebrales.html>).

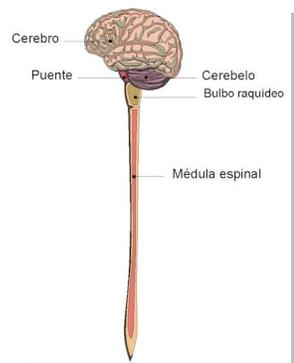


Figura 8: Representación de las partes que conforman el Sistema Nervioso Central (SNC). Se señala cerebro, puente, cerebelo, bulbo raquídeo y médula espinal (contenidos.educarex.es).

La causa de las neoplasias neuronales en el hombre es aún desconocida. Sus orígenes y desarrollo son aún pobremente comprendidos debido a la dificultad de estudio del crecimiento de la neoplasia, así como la evidente carencia, hasta hace relativamente poco tiempo, de un modelo experimental adecuado y reproducible (Lantos, 1980). Algunos de los agentes causantes de neoplasias, son los nitroso-compuestos que son toxinas ambientales muy comunes, encontrándose en toda la comida salada y ahumada. Como los agentes alquilantes tienen varios efectos biológicos, incluyendo la

mutagenicidad y la teratogenicidad, clasificándose por ello junto a los carcinógenos químicos más potentes (Bilzer, *et al.* 1989).

Tumorigénesis.

La división celular es un proceso fisiológico que ocurre en casi todos los tejidos y en muchas circunstancias. En circunstancias normales, el equilibrio entre la proliferación y muerte celular programada, por lo general en forma de apoptosis, se mantiene fuertemente por la regulación de ambos procesos para garantizar la integridad de los órganos y tejidos. Las mutaciones en el ADN que conducen al cáncer, ordenan interrumpir estos procesos deteniendo la programación normal de la célula (Martin de Civetta, 2004).

El proceso por medio del cual se forma un tumor, tiene que ver, con un evento llamado carcinogénesis, en el cual se transforman células normales en células cancerosas. El cáncer comienza en una célula, es decir que es de origen monoclonal. Esa célula alterada, escapa a los diversos puntos de control presentes en el ciclo celular y se vuelve “anárquica”, iniciando una generación de más “células anárquicas”, que a su vez pueden inducir a cambios similares, en las células vecinas. Pero no sólo afectan las mutaciones inducidas por los carcinógenos, sino que a lo largo de cada división celular (sólo pueden llegar a 50) se producen “errores espontáneos” en cada duplicación y se van acumulando constituyendo un factor intrínseco de riesgo (Martin de Civetta, 2004). El proceso de formación de un tumor, ocurre en la primeras etapas de la carcinogénesis, que a continuación se sintetizan.

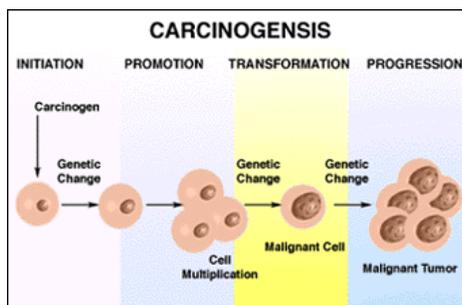


Figura 9: Representación de las etapas de la carcinogénesis. Las etapas correspondientes a la iniciación y promoción corresponden al proceso de tumorigénesis de tumores tanto benignos como malignos, mientras que la transformación y progresión corresponden al proceso de metástasis (www.livercancer.com).

La iniciación: ocurre a nivel del genoma y las alteraciones pueden darse en los tumores benignos y malignos al igual que la segunda etapa, pero la transformación y progresión, es exclusiva de la transformación maligna (metástasis). Los agentes que actúan en la primera etapa pueden ser: físicos, químicos o virales. Los carcinógenos químicos tienen como blanco preferencial al nitrógeno de la guanina (alquilantes, aminas aromáticas, nitrosaminas y grasas poliinsaturadas) produciendo mutaciones irreversibles (Martin de Civetta, 2004).

La promoción: representa la etapa de crecimiento tisular con la formación del tumor. Participan: los factores de crecimiento y los receptores a los factores de crecimiento, como así también la angiogénesis y degradación de las matrices extracelulares (Martin de Civetta, 2004).

La progresión: implica la capacidad de invadir tejidos vecinos o a distancia, por parte de la célula tumoral maligna (Martin de Civetta, 2004).

Por interés particular para este estudio a continuación se describirán algunos factores químicos inductores de carcinogénesis.

Inducción de tumores con N-etil-N-nitrosourea (ENU)

La utilización de los diferentes tipos de carcinógenos experimentales, obedece a la necesidad del ser humano de controlar y conocer las causas de la producción de dichos desórdenes celulares. Algunos de los métodos utilizados para la producción de tumores en el SNC han sido, desde la estimulación de neoplasias gracias a efectos mecánicos, como fueron la introducción de ceras en 1926, así como también de trasplantes de tejido neoplásico a otros individuos e inducción de tumores por efecto de la administración de sustancias químicas. Dichas sustancias, pueden ser administradas por medio de comprimidos que se alojan en el cerebro o administradas sistémicamente (Alcaráz, 1998).

Dentro de los carcinógenos químicos más utilizados se encuentran los hidrocarburos policíclicos aromáticos, los cuales fueron los carcinógenos de elección en la inducción de neoplasias neurogénicas por sustancias químicas antes de la introducción de los compuestos nitrosos en la neuropatología experimental (Alcaráz, 1998).

La toxicidad de nitratos y nitritos, tanto para los animales como para los seres humanos, se conoce desde finales del siglo antepasado, ya que descubrieron intoxicaciones en ganado debidas a

nitratos y en lactantes se identificó intoxicación por ésta misma sal, cuando se encontraba en concentraciones elevadas en el agua que consumían (Alcaráz, 1998).

Las N-nitrosaminas, fueron descubiertas en 1863 cuando se logró unir el nitrógeno de una amina al nitrógeno de un radical nitroso. Actualmente existe un gran número de estudios que relacionan a la gran mayoría de los compuestos N-nitroso con procesos de mutagénesis, carcinogénesis y teratogénesis (Alcaráz, 1998).

Lantos en 1980 hace referencia al descubrimiento de Magee y Barnes en 1956, de la acción carcinogénica de los compuestos nitrosos y el uso de éstos para la producción de tumores neurales. Fueron Druckrey *et. al.*, (1973), quienes observaron que estos compuestos tienen un sorprendente efecto organotrópico, es decir que producen tumores de manera selectiva en un órgano en particular. Las Nitrosamidas (derivados N-nitrosos de amidas sustituidas) son fuertemente neurotrópicas y son por ello, los carcinogénicos de elección en el estudio de neoplasias experimentales en el SNC (Alcaráz, 1998).

Los tumores cerebrales inducidos por nitrosoureas, se han utilizado en investigaciones concernientes al crecimiento y la regresión de gliomas, edema cerebral, inmunología, metabolismo bioquímico regional y terapia experimental de gliomas. Los estudios de estos tumores incluyen morfología convencional, inmunohistoquímica, citoquímica, microscopía electrónica, morfometría, entre otros (Alcaráz, 1998).

Por lo anterior las nitrosaminas simples (derivados N-nitrosos de amidas sustituidas), la N- metil-N nitrosourea (MNU) y la N-etil-N nitrosourea (ENU) cumplen con los requisitos para generar un modelo experimental. Que producen una alta incidencia de tumores preferencial y consistentemente en el Sistema Nervioso Central (SNC) después de su administración por varias rutas sistémicas; las células neoplásicas producidas por estas moléculas se parecen morfológicamente y biológicamente a los tumores presentes de forma natural en el hombre y en los animales (Bilzer *et al.* 1989).

El mecanismo de acción neuro-carcinogénica de las nitrosoureas no se conoce por completo, a pesar de los numerosos estudios en los que se ha empleado (Berleur y Cordier, 1995). Sin embargo, la carcinogenicidad de los nitroso-compuestos se atribuye a la formación de agentes electrofílicos alquilantes. Los agentes electrofílicos se enlazan covalentemente a centros nucleofílicos en el ADN. Para el caso de ENU, los blancos principales parecen ser los átomos de oxígeno de la Guanina en la posición 6 y el átomo de oxígeno en la Timina en la posición 2 de la cadena del ADN. El posible mecanismo

responsable del neurotropismo de la nitrosourea tiene que ver con la deficiente reparación de la O6-etilguanina en el cerebro. Esta puede ser reparada rápidamente por un sistema enzimático que comprende al ADN-alquiltransferasa. En el cerebro, dicha reparación procede más lentamente que en otros tejidos extracerebrales. Sin embargo, ésta deficiencia en reparación es similar en adultos y en cerebro inmaduro, siendo el último más susceptible a los efectos neuro-carcinogénicos de las nitrosoureas (Berleur y Cordier, 1995).

Adicionalmente se ha postulado que las bases alquiladas causan desapareamiento en bases tales como la Guanina alquilada en O-6 con desoxitimidina en vez de desoxitidina en el cerebro y mutaciones puntuales seguidas de una incontrolada expresión de oncogenes y receptores para factores de crecimiento, produciendo una proliferación celular permanente (Blizer *et al.* 1989).

La neuropatología y las características de crecimiento de éstos tumores experimentales son comparables en muchos casos a los gliomas malignos humanos; son similares a los tumores humanos de grado III y IV, de acuerdo a la Clasificación de la Organización Mundial de la Salud, ya que presentan pleomorfismo celular, elevada actividad mitótica, proliferación de vasos sanguíneos, alteración de la barrera hematoencefálica, necrosis y múltiples invasiones (Lantos, 1980).

Una clasificación alternativa fue introducida en 1973 y distingue cinco grupos de tumores inducidos por ENU:

- Gliomas periventriculares de la lámina subependimal.
- Gliomas astrocíticos y oligodendrocíticos
- Tumores neurales de ganglios espinales e intracraneales y nervios.
- Tumores neurales del SNC.
- Tumores meníngeos

Los gliomas periventriculares de la lámina subependimal fueron posteriormente divididos en endimomas y endimooligodendroastrocitomas mezclados (Lantos, 1980)

Blizer y colaboradores establecieron que los tipos tumorales más comúnmente inducidos, fueron los oligodendrogliomas. Por lo cual este modelo experimental es extraordinariamente útil, además de que

se conoce con gran precisión el período de latencia para el desarrollo de los tumores inducidos tras la exposición prenatal al carcinógeno que actúa en sitios específicos los cuales son: áreas pre-ventriculares y sustancia blanca subcortical de los hemisferios cerebrales (Bilzer *et al.* 1989).

Los tumores en SNC pueden ser producidos por medio de una administración intravenosa a ratas preñadas, o por una inyección directa en el saco amniótico. De las dos formas se puede eludir o atravesar la barrera placentaria. De esta manera el carcinógeno ENU induce fácilmente tumores en el SNC en la descendencia que reciben una única dosis del carcinógeno. La administración de ENU en el día 18 de gestación causa alteraciones bioquímicas y morfológicas en la capa germinal que rodea los ventrículos cerebrales y la región de los lóbulos olfatorios (Jänisch, 1974).

Sólo después de haber transcurrido 3 hrs después de su administración, la síntesis de ADN en estas partes del cerebro del feto es reducida hasta en un 35%. Morfológicamente, la acción tóxica es manifestada por necrosis en estas áreas. Una sola inyección de 80mg/kg de ENU en el día 15 resulta en un daño de varias células en el telencéfalo, también como agregados celulares heterotrópicos, en la materia blanca. Esto es claramente visible después de 8 días de su administración (Jänisch, 1974).

El sitio de predilección de los tumores es el área periventricular del cerebro, rara vez es afectado el cerebelo. El nervio trigémino es el más comúnmente afectado, los tumores producidos en el SNC son a menudo muy variados, alguno de ellos son: tumores astrocíticos, tumores oligodendrogiales, gliomas mixtos y tumores ependimarios. Los tumores cerebrales y de la médula espinal se llaman según el tipo de célula con los que se forman y el lugar del cerebro en el SNC donde se forman primero (Jänisch, 1974).

Para el tratamiento de dichos tumores se usan diversos tratamientos. El tipo de tratamiento recomendado depende del tamaño y el tipo de tumor, la velocidad de crecimiento, y el estado general de salud del paciente. Las opciones de tratamiento son cirugía, radioterapia y quimioterapia, o una combinación de éstas. Pero aun con estos tratamientos existe la posibilidad de alteración neurológica y reaparición de tumor (<http://www.cancer.gov/espanol>)

Con base en lo anterior es importante estudiar la actividad de las toxinas de *Carybdea marsupialis*, y el modo en que actúan con el objeto de aportar información para caracterizar compuestos que permitan el desarrollo de terapias y fármacos efectivos para el tratamiento de los tumores que afectan al Sistema Nervioso Central, motivo por el cual los objetivos se enlistan a continuación.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del extracto crudo de *Carybdea marsupialis* como tratamiento antitumoral en tumores del Sistema Nervioso Central, inducidos por N-etil-N-nitrosourea (ENU) en ratas.

Objetivos Particulares

1. Inducir tumores en el Sistema Nervioso Central a través del modelo experimental generado por ENU, en ratas.
2. Establecer la dosis letal del extracto crudo de *Carybdea marsupialis*, administrado vía intracerebroventricular (i.c.v.) en ratas.
3. Probar la actividad antitumoral del extracto.

METODOLOGÍA

A continuación se hace la descripción de las técnicas empleadas en el presente estudio y aquellas manipulaciones que requieren una explicación más amplia se remitirán al anexo metodológico.

1. Obtención del extracto de *Carybdea marsupialis*.

Para la obtención de los ejemplares de *Carybdea marsupialis* se realizaron recolectas en varias localidades, ubicadas entre las coordenadas 86° 53' W, 20° 51' N y 86° 54' W, 20° 50' N de la laguna arrecifal de Puerto Morelos, Q. Roo (Merino y Otero 1991) entre los meses de Julio y Octubre de 2006, dichas recolectas se realizaron manualmente con ayuda del buceo libre. Para trasladar los organismos al laboratorio se colocaron en cubetas de plástico con capacidad de 20 litros.



Figura 1: Mapa de ubicación, la flecha señala el poblado Puerto Morelos, en donde se llevaron a cabo las recolectas de la especie *C. marsupialis* (www.inahqr.gob.mx)

Ya en el laboratorio, los tentáculos de cada uno de los ejemplares se cortaron con tijeras in vivo, se depositaron en viales de vidrio de 30 ml de capacidad y se congelaron a -70°C . A continuación, para obtener la descarga de la mayoría de los nematocistos para la liberación de las toxinas presentes en los tentáculos de las cubomedusas, se empleó un homogenizador de vidrio con agua desionizada y se procedió a macerarlos para obtener el extracto crudo. Se eligió este método ya que se ha reportado que es el ideal porque los estímulos mecánicos provocan la eversión del túbulo con la consiguiente liberación de las toxinas con la menor cantidad posible de tejido tentacular (Torrens, 2004). El proceso se repitió

cuantas veces fueron necesarias para obtener el extracto de todos los tentáculos. Durante el proceso el material se observó periódicamente al microscopio, para comprobar que la mayoría de los nematocistos fueron descargados (Figura 11).

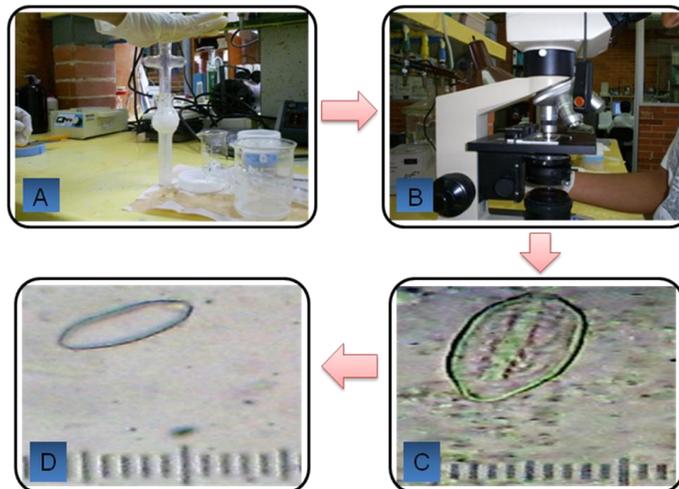


Figura 2: En esta figura se muestran imágenes de los procedimientos realizados para la obtención el extracto de *C. marsupialis*. **A)** Homogenización de los tentáculos de *C. marsupialis*. **B)** Microscopio donde se observaron los nematocistos. **C)** Nematocisto sin descargar, presentes en los tentáculos de *C. marsupialis*, 40x. **D)** Imagen del nematocisto descargado, de *C. marsupialis*, 40x.

Posteriormente, el extracto crudo se dejó en agitación durante 30 minutos y se centrifugó a 3000 rpm utilizando una centrífuga Beckman TJ-6 (Torrens, 2004). El sobrenadante obtenido, se colocó en viales de vidrio previamente marcados. El proceso se realizó dos veces. Se añadió un inhibidor de proteasas (Complete, Mini de Roche®). Los viales se congelaron a -70°C para su empleo posterior. El extracto crudo obtenido se liofilizó con la ayuda de un aparato Freeze Drying Model 77500 (LABCONCO) a una temperatura de -45°C (Torrens, 2004).

2. Determinación de la Dosis Letal (LD_{50})

La dosis letal (DL_{50}) es un parámetro farmacológico que denota el grado de toxicidad de un componente. En el presente trabajo se determinó la LD_{50} . Para establecerla, se usaron diferentes concentraciones de dicho extracto y se determinaron a partir del número de animales sobrevivientes de la concentración anterior así como de las reacciones y la frecuencia de estas, las concentraciones probadas fueron: 100 mg/ml, 50 mg/ml, 25 mg/ml, 12.5 mg/ml, 6.25 mg/ml, 3.12 mg/ml, estas concentraciones se diluyeron en agua desionizada (Anexo: Preparación del extracto). Para cada concentración se asignaron a 8 animales con un peso corporal entre los 280 y 300 gr, a los cuales se le administraron 5 μl de la

concentración correspondiente, utilizando la técnica quirúrgica por estereotaxia (Anexo: Estereotaxia) por vía intracerebroventricular (icv) (Figura 12) para evitar interferencia por el paso de la barrera hematoencefálica (Orduña-Novoa et al. 2003).

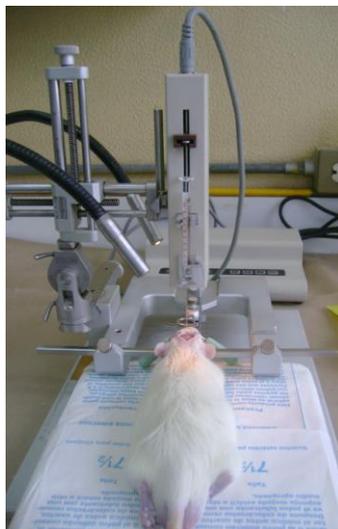


Figura 3: Técnica en la que se muestra la administración estereotáxica, del extracto crudo de *C. marsupialis*, para determinar la LD50.

Los animales intervenidos se mantuvieron en observación registrando todos los signos que presentaron. Aquellos animales que no fallecieron, 24 hrs después de la administración del extracto crudo, se sacrificaron con una sobredosis de Pentobarbital. Con los resultados obtenidos se calculó el valor de la dosis letal media siguiendo el método Lehman (1980) (Anexo: Metodo Lehman), obteniendo que para nuestro estudio el valor de la Dosis Letal Media (DL50) de 1.13 fue 78 mg/ml. Para el tratamiento antitumoral se utilizó 1/10 de la DL50, esta dosis de seguridad es la adecuada para probar tratamientos en donde se requiere probar el efecto de un fármaco in vivo. El tratamiento se administró a través de una bomba iso-osmótica (Lehman, 1980).

3. Cuantificación de Proteína.

Con el extracto de *C. marsupialis*, obtenido del liofilizado, se realizó el método de Lowry el cuál es un procedimiento colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas, en ésta técnica a la muestra se le añade un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color de la disolución resultante proporcional a la concentración de proteínas, según la ley de Lambert Beer (Lowry, 1951). Para determinar la concentración de proteínas del extracto crudo de *C. marsupialis*; primero se

construyó una curva patrón o de calibrado a partir de una solución patrón de Albumina a una concentración de 2.5 mg en 10 ml, agregando a cada muestra la siguiente mezcla: Na₂CO₃ al 2%, más tartrato de Na y K al 2 % y CuSO₄ al 1%. Pasados 10 min se agregaron a cada tubo Folin-Fenol (1:1) diluido en agua. Después de 30 min, se leyó a 550 nm en el espectrofotómetro. (Anexo: Cuantificación de Proteínas). La concentración que tiene el extracto, se determinó por interpolación de los valores de absorbancia en la curva patrón (Lowry, 1951).

4. Inducción tumoral prenatal

A la par de la determinación de la DL₅₀, se realizó la inducción tumoral prenatal, a ratas de la cepa Wistar preñadas de 18 días de gestación (Janisch, 1974) a las cuales se les administró una dosis única de 100 mg/kg de ENU, vía intravenosa, en la vena ubicada en la cola de la rata. El mismo procedimiento se efectuó en hembras controles a las que se les inyectó el vehículo utilizado en la preparación del ENU, el cual fue ácido cítrico C₆ H₈ O₇ (Anexo, preparación de ENU). Posterior al nacimiento, se realizó un conteo de las crías obtenidas por cada hembra a partir de este momento las crías se mantuvieron en observación (Figura 13) (Orduña-Novoa, et. al., 2003) hasta cumplir los 21 días de edad, llevándose a cabo la separación de la madre y el sacrificio de ésta. Las crías se sexaron y fueron separadas y asignando aproximadamente 10 individuos a los grupos tratados y controles. (Tabla 1)

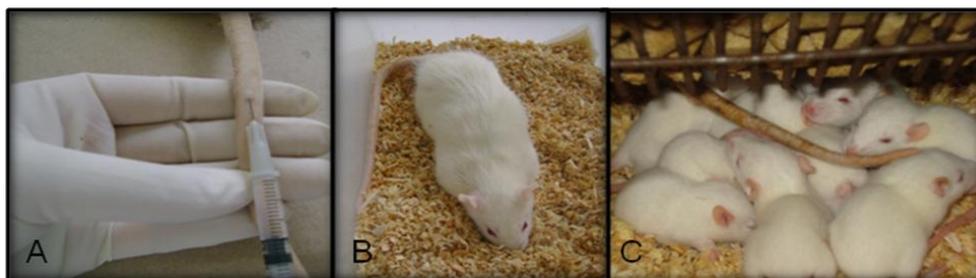


Figura 4: Se muestra el manejo de los animales durante el proceso de inducción tumoral. **A)** Administración vía intravenosa de ENU. **B)** Rata preñada bajo observación una vez que fue tratada con ENU. **C)** Crías obtenidas de las hembras tratadas con ENU.

Tabla 1: Asignación de grupos experimentales, para el presente estudio, con una n= 8 de individuos por grupo.

Machos con ENU con Extracto (♂ Enu c /extc)	Hembras con ENU con Extracto (♀ Enu c /extc)
Machos sin ENU con Extracto (♂ s /Enu c /extc)	Hembras sin ENU con Extracto (♀ s /Enu c /extc)
Machos con ENU sin Extracto (♂ Enu s /extc)	Hembras con ENU sin Extracto (♀ Enu s /extc)
Machos sin ENU sin Extracto (♂ s /Enu s /extc)	Hembras sin ENU sin Extracto (♀ s / Enu s /extc)

5. Administración del tratamiento antitumoral

Pasados 90 días del nacimiento, a las ratas de cada grupo se les aplicó el tratamiento correspondiente, se ha reportado que este es el tiempo promedio (90 días) establecido como de mayor incidencia en la aparición de tumores (Blizer *et al.* 1989). El tratamiento fue administrado mediante Bombas Osmóticas Alzet con una capacidad de 200µl, que suministra 0.5µl/hr del tratamiento, durante 14 días (Anexo, Bombas Osmóticas ALZET). En el caso del presente trabajo dichas bombas van unidas a un catéter para una infusión intracerebral, conectadas por un catéter a una cánula fijada al cráneo con acrílico en polvo, sobre el tercer Ventrículo Dorsal (Figura 14), las coordenadas se localizaron con la ayuda del atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (1984), previo al montaje de los animales en un aparato estereotáxico (Anexo: Administración Estereotáctica).

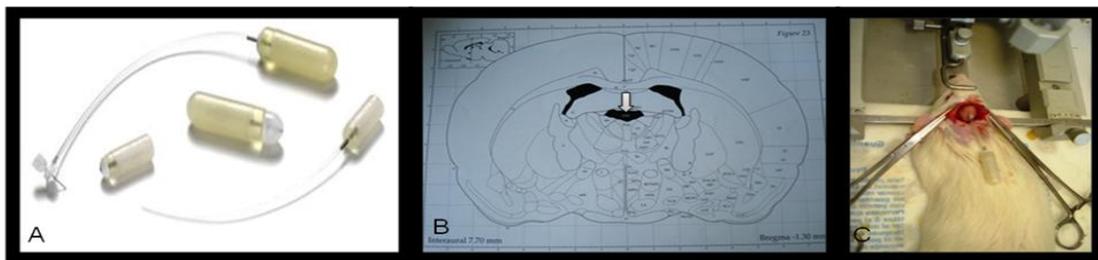


Figura 5: Ésta figura muestra los implementos utilizados en la implantación de las bombas, con ayuda de la técnica estereotáctica. A) Bombas Osmóticas y catéter Alzet. B) Flecha muestra el tercer ventrículo dorsal, Atlas Paxinos y Watson. C) Rata con cateter y bomba fija en craneo, en el aparato estereotaxico.

Estos procedimientos se realizaron en todos los grupos, tanto controles como grupos tratados. Según los resultados obtenidos en las pruebas de LD₅₀ y de acuerdo a los cálculos realizados (Ver Anexo), se disolvió el extracto en agua desionizada para administrarlo a las ratas tratadas. A los grupos controles sólo se les administró agua desionizada. Una vez recuperadas de la intervención las ratas se mantuvieron en observación, hasta que presentaran signos de presencia tumoral, tales como dificultad para la marcha asociada a atrofia en extremidades, alteraciones en el control de esfínteres, encorvamiento de columna, entre otros (Orduña-Novoa et al. 2003).

6. Obtención del tejido del SNC y Técnicas Histológicas

Posterior a la observación de los signos de presencia tumoral, se procedió al sacrificio de las ratas, para así obtener el encéfalo y la médula espinal, con el fin de llevar a cabo un análisis histológico de ellos, como se explica a continuación.

Para obtener el tejido nervioso se llevó a cabo una perfusión vía intracardiaca, en la cual se administró 1ml de Heparina con 1000 unidades/ ml, diluidos en 250 ml de suero fisiológico (NaCl 0.9%), esto con el objetivo de lavar la sangre del cuerpo, una vez que el tejido quedó limpio de sangre, esta solución fue desplazada por fijador universal, para que finalmente los tejidos quedaran fijados (Anexo: Perfusion) (Vázquez y Santiago, 2003). Para después ser disectados, se extrajo encéfalo y médula espinal hasta su porción final, “cola de caballo”, ambos se mantuvieron en el fijador universal.



Figura 6: Se muestran el tejido del SNC obtenido, posterior a la perfusión y fijación. Encéfalo y Médula.

Los tejidos permanecieron en el fijador por lo menos 72 hrs, posteriormente se cortaron los cerebros en una Matriz (ASI) (Figura 16), para hacer una revisión completa del tejido, ya que en ocasiones se encuentran macrotumores y microtumores que no se aprecian a simple vista en un mismo animal. Los cortes se realizaron cada 5 mm.



Figura 7: Matriz: Rodent Brain Matrix -ASI. Utilizada para la segmentación del encéfalo, para su posterior inclusión.

Los cortes de cerebros y las médulas se colocaron en cassetes para llevar a cabo la inclusión del tejido en parafina, en donde se realizan cambios en alcoholes de diferentes concentraciones con el propósito de deshidratar al tejido y así dejar espacio para que la parafina penetre en el tejido, para después incluir al tejido en bloques de parafina en un incluidor de tejido Leica (Figura 17) (Anexo: Inclusión en Parafina).



Figura 8: Se muestran los bloques de parafina, en donde se encuentran el tejido cerebral y medular, incluidos en bloques de parafina.

Los tejidos ya incluidos en parafina, se seccionaron en un micrótopo, obteniendo rebajes del tejido cada 5 μ de espesor, esto con el fin de tener una amplia muestra. Estos cortes se pasaron en baño María con grenetina para estirar el tejido y poder adherirlo al portaobjetos, esto se realizó con todos los cortes viables obtenidos. Transcurridas 24 hrs se realizó la rehidratación de los tejidos para poder llevar a cabo la técnica de tinción Hematoxilina–Eosina (HE), (Figura 18), (Anexo: Hematoxilina–Eosina). (Porphet *et al.* 1995).



Figura 9: Técnicas histológicas para la obtención de laminillas teñidas con HE. **A)** Cortes en microtomo del tejido incluido en bloques de parafina. **B)** Tren de tinción, para HE. **C)** Tejido teñido con la técnica HE.

Una vez realizadas las tinciones de los tejidos, se procedió a la observación microscópica de las laminillas, donde se observaron las características celulares, el sitio del tumor, cambios morfológicos como: celularidad, disposición arquitectónica de las células, atipia, anaplasia, vascularidad, mitosis, necrosis y otros acompañantes como hemorragia o inflamación, además de características macroscópicas como forma, color, consistencia y superficie de corte (Rembao, 2008). Tomando en cuenta lo anterior se llevó a cabo la clasificación de las neoplasias de los tejidos de acuerdo con la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS). (Costero, 2003). Adicionalmente se cuantificaron los tipos tumorales encontrados y se les aplicaron algunos análisis estadísticos como Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía, seguido de un análisis por Diferencia Mínima Significativa (DMS), además en algunos casos se llevo a cabo una “t” de Student. Y de esta manera se obtuvieron los resultados que a continuación se describen.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos del presente estudio se muestran a continuación, de acuerdo al desarrollo del mismo.

Inducción tumoral

La inducción tumoral se realizó como ya se explicó anteriormente, por administración i.v. de ENU (100 mm/kg) en ratas gestantes, de 18 días, para que los fetos recibieran el ENU vía transplacentar (Jänisch, 1974). Como resultado de dicho tratamiento, del total de los neonatos sólo, el 33% presentaron algún tipo de neoplasia en el SNC, el resto no presentó neoplasia (Figura 18). En el grupo que no fue tratado con ENU ningún animal presentó neoplasia. Por otro lado de éste 33% que fue tratado con ENU y con el extracto antitumoral de *C. marsupialis* un 72% de las ratas presentó neoplasias en encéfalo y el 28% las presento en medula espinal (Figura 19). Cabe mencionar que se tomó en cuenta todos los grupos con ENU, tanto los grupos sin extracto, como también los grupos con extracto.

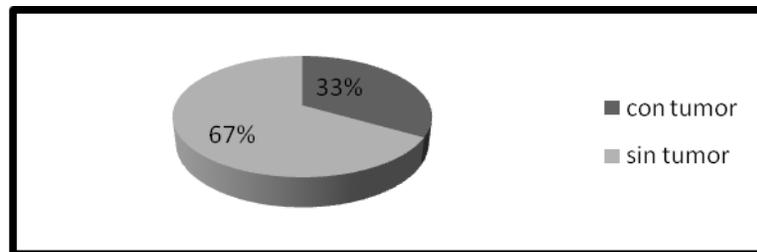


Figura 18: Se muestra el porcentaje de neoplasias en el SNC de ratas, producto de la inducción tumoral prenatal, con N-etil-N-nitrosourea (ENU), (n=42). El 33% del total, desarrollaron algún tipo de neoplasia en el SNC, mientras que en el 67% no existió presencia tumoral, mismos que no estuvieron expuestos a ENU.

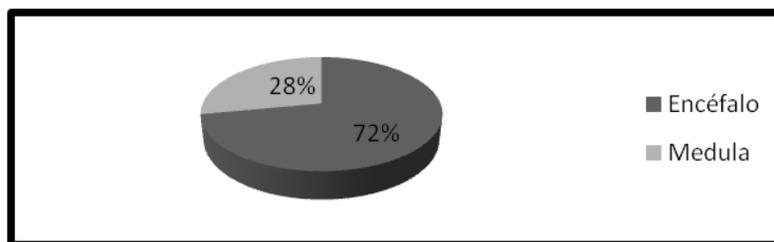


Figura 19: En ésta figura se observa que del porcentaje de 33 % de neoplasias en el SNC de ratas, producto de la inducción tumoral prenatal, con N-etil-N-nitrosourea (ENU). El 72% de este total, desarrollaron neoplasias en Encéfalo, en tanto que el 28% restante las presentaron en la Medula Espinal.

Determinación de Dosis Letal₅₀ de el extracto de *C. marsupialis*.

Por lo que respecta a las dosis letales, se obtuvieron los siguientes resultados: las ratas administradas con una dosis de 100mg/ml presentaron pérdida del control de esfínteres, temblor en extremidades, seguido de paro respiratorio que provocó la muerte a los 60 minutos después de la inyección intracerebroventricular. Con la dosis de 50mg/ml, sólo 3 de 6 ratas presentaron los mismos síntomas con un tiempo de vida aproximado de 65 minutos, mientras que para la dosis de 25 mg/ml los animales presentaron los mismos síntomas pero tuvieron una tasa de sobrevivencia mayor, ya que de 8 individuos, 6 sobrevivieron. Para la dosis correspondiente a 12.5 mg/ml, no se encontró el mismo comportamiento, ya que en este caso hubo una disminución en la frecuencia de los síntomas antes mencionados y sólo sobrevivió 1rata de las 8 administradas con esta dosis. En la concentración de 6.25 mg/ml los síntomas que presentaron fue dificultad para respirar y un leve temblor en extremidades y sobrevivieron 2 de 8 animales. Para la última concentración que se utilizó, los individuos presentaron una notable disminución notable en los síntomas, y en otros no se presentaron y sobrevivieron 4 de 8 (Tabla2).

5 µl de 100 mg/ml	5 µl de 50 mg/ml	5 µl de 25 mg/ ml	5 µl de 12.5 mg/ml	5 µl de 6.25 mg/ ml	5 µl de 3.12 mg/ ml
*** Pérdida de Control de esfínteres	*** Pérdida de Control de esfínteres	** Pérdida de Control de esfínteres	* Pérdida de Control de esfínteres	Pérdida de Control de esfínteres	* Pérdida de Control de esfínteres
***Convulsiones	* Convulsiones	* Convulsiones	Convulsiones	Convulsiones	Convulsiones
***Contracción muscular	**Contracción muscular	***Contracción muscular	**Contracción muscular	Contracción musculares	Contracción muscular
*** Dificultad para respirar	*** Dificultad para respirar	*** Dificultad para respirar	* Dificultad para respirar	** Dificultad para respirar	** Dificultad para respirar
** Movimiento acelerado de extremidades	*** Movimiento acelerado de extremidades	*** Movimiento acelerado de extremidades	* Movimiento acelerado de extremidades	* Movimiento acelerado de extremidades	Movimiento acelerado de extremidades
*** Espasmos en el ritmo cardíaco	*** Espasmos en el ritmo cardíaco	*** Espasmos en el ritmo cardíaco	Espasmos en el ritmo cardíaco	Espasmos en el ritmo cardíaco	Espasmos en el ritmo cardíaco
*** Paro Respiratorio	*** Paro Respiratorio	* Paro Respiratorio	* Paro Respiratorio	Paro Respiratorio	Paro Respiratorio

Tabla 1: Los efectos tóxicos del extracto de *C. marsupialis* Frecuencia en la cual se presentaron las conductas: * menos frecuente *** mas frecuente.

Cabe mencionar que se tomó en cuenta, de los organismos que sobrevivieron 24 hrs, posterior a la administración de la toxina. Una vez obtenidos estos datos se analizaron con la prueba de Lehmann (1980). De acuerdo a dicho método se obtuvo que para nuestro estudio el valor de la Dosis Letal Media LD_{50} fue de 1.1378 mg/ml (Figura 20). Para el tratamiento antitumoral se utilizó $1/10 LD_{50} = 0.114$ mg/ml, en ratas con un peso de 280gr. Esta cantidad fue administrada mediante las Bombas Isosmóticas, a los grupos experimentales correspondientes.

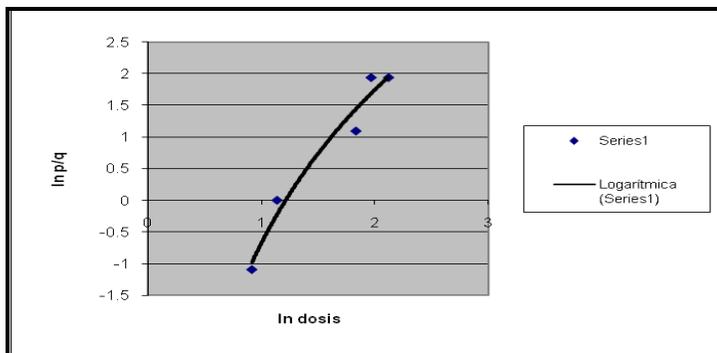


Figura 20: Esta gráfica muestra los resultados de la prueba de Lehmann para determinar la DL_{50} , el valor que intercepta es 1.137833002. La n del estudio es igual a 48.

Con lo que respecta a la cuantificación de proteína, que se realizó de la dosis letal de seguridad, aplicando el método Lowry (1951), se obtuvieron valores de absorbancia con los que se calcularon las cantidades necesarias para obtener la curva, así como el valor de la concentración de proteína en el extracto, dichas cantidades son: $r = 0.976$, $m = 0.004$, $b = 0.087$. Substituyendo en la ecuación: $Y = mx + b$; $X = (Y - b) / m$, obteniendo como valor de $x = 2.75$ y después de multiplicarlo por el factor de dilución (20), se obtuvo $55 \mu\text{g}$ de proteína / ml. A partir de la relación de 0.009g de extracto crudo/ 2 ml, tenemos 0.0045g de toxina en 1 ml, por lo que $55 \mu\text{g}$ proteína = 0.0045g de toxina (en 1 ml). Por tanto, tendremos en 1 g de extracto 12222.2 μg de proteína o convirtiéndolo 12.22 mg de proteína en 1 g de extracto de *C. marsupialis*.

Análisis histológico

Como se mencionó en la metodología, la identificación y clasificación de las neoplasias se llevo a cabo por medio de la observación microscópica tomando en cuenta las características de las células, y sus anormalidades, esto con la ayuda del manual de la OMS para la clasificación de Tumores. Los tipos tumorales encontrados, fueron cuatro: Astrocitomas, Oligodendrogliomas, Oligoastrocitomas y Ependimomas, la frecuencia de aparición varia, siendo los astrocitomas el tipo tumoral predominante en los animales tratados, seguido de los ependimomas y oligodendrogliomas; posteriormente los gliomas mixtos: oligoastrocitomas; como se puede observar en la tabla 3.

	Enu c/ extracto (extc)		Enu s/ extracto (extc)		Total
	Cerebro	Medula	Cerebro	Medula	
Astrocitoma	10	0	2	0	12
Oligodendroglioma	3	0	1	0	4
Oligoastrocitoma	1	0	1	0	2
Ependimoma	0	2	0	5	7

Tabla 2: Se listan los tipos y frecuencia de los tipos tumorales presentes en cerebro y medula espinal en ratas tratadas con: Enu c/ extc y Enu s/ extc.

Las características celulares observadas en las neoplasias que se desarrollaron, son las siguientes:

Los tumores del SNC pueden a su vez dividirse en dos grupos: los intracraneales y los que ocasionan compresión radicular y/o medular. Aunque los mismos tipos histológicos se encuentran en ambos grupos con distinta frecuencia. Los tumores se clasifican con base en su localización topográfica así como por su histología. No existe una relación definitiva entre localización y estructura. Para su identificación se tomaron en cuenta las características morfológicas macroscópicas tales como: forma, color, consistencia y superficie de corte. Y desde el punto de vista microscópico: la celularidad, disposición arquitectónica de las células, atipia, anaplasia, vascularidad, mitosis, necrosis y otros acompañantes como hemorragia o inflamación.

En el caso de los **astrocitomas** se observó: pleomorfismo nuclear, con importante actividad mitótica, además de proliferación microvascular y necrosis. En algunos casos se observó hiperplasia endotelial de tipo glomeruloide, mientras que en otros astrocitomas existieron formaciones en roseta y seudorroseta, angulaciones vasculares asociados a hiperplasia endotelial. También se observó una abundante monotonía celular con hiperchromacia intensa, además de que las células neoplásicas eran de tipo gemistocítico (Figura 21). Es posible encontrarlos en los hemisferios cerebrales, tallo cerebral, cerebelo y médula espinal. Su delimitación morfológica es extremadamente variable, tienen un crecimiento infiltrativo lo que hace la escisión quirúrgica imposible. Microscópicamente se asocian con vasos sanguíneos simples. (Escobar *et al.* 2008)

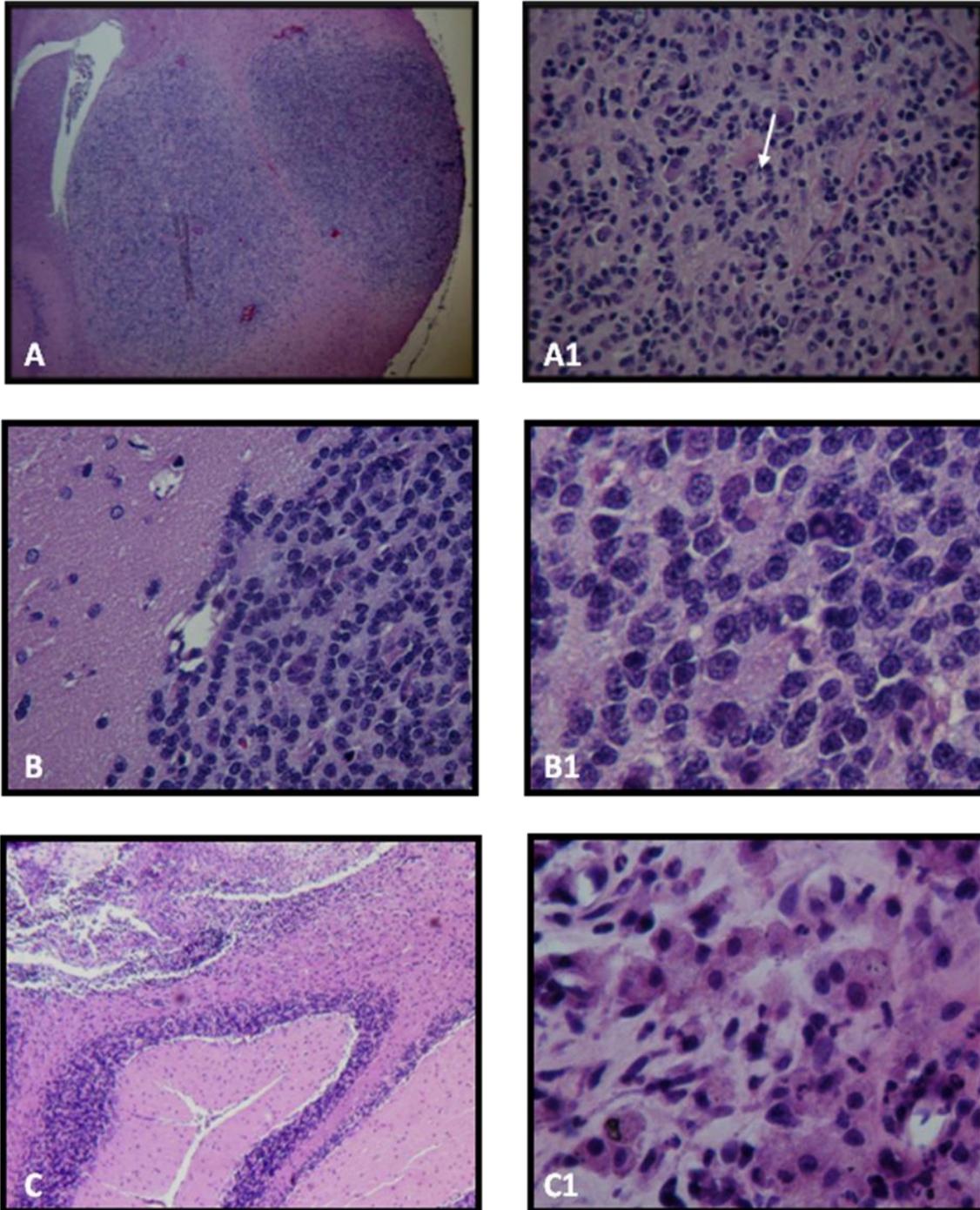


Figura 21: Se muestra el tejido cerebral, teñido con la técnica Hematoxilina y Eosina (HE). **A)** Astrocitoma bilobulado en parénquima cerebral, correspondiente al grupo: Macho/ENU c/extc, 10x. **A1)** Acercamiento, se señala formación en roseta de la misma lesión neoplásica, 20x. **B)** Astrocitoma parahipocampal (mitad derecha), correspondiente al grupo Hembra ENU c/ extc. **B1)** Acercamiento: de formaciones tipo "roseta" y monotonia celular difusa con hiperchromacia intensa, 40x. **C)** Astrocitoma y necrosis, en cerebelo (ángulo superior izquierdo), correspondiente al grupo: Hembra ENU con extracto, 10x. **C1)** Acercamiento de células neoplásicas tipo gemistocítico, 40x.

Otro tipo de neoplasia, presente son los **oligodendrogliomas** los cuales presentan una arquitectura celular muy peculiar, como un panal, ya que están formados por acúmulos compactos de oligodendrocitos neoplásicos globosos, con un núcleo redondo central oscuro rodeado por un halo perinuclear claro, aparentemente vacío (aspecto de “huevo estrellado”). Son tumores con moderada buena delimitación pero pueden infiltrar las leptomeninges (Escobar *et. al.* 2008). Su aspecto histológico es característico ya que las células que lo componen no se parecen a las de ningún otro tumor intracraneal. (Figura 22).

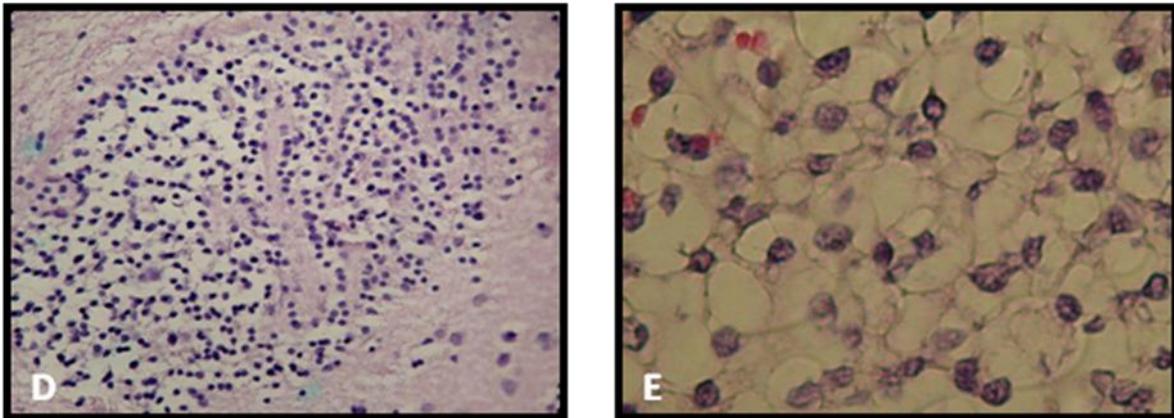


Figura 22: Ejemplificación de dos oligodendrogliomas, presentes en diferentes grupos. **D)** Oligodendroglioma subcortical, del grupo: Hembra/Enu s/ extc, 20x. **E)** Detalle celular de un oligodendroglioma, del grupo: Hembra/Enu c/extc, 40x.

De los gliomas mixtos, el único que estuvo presente, fue el **oligoastrocitoma**, este comparte características histopatológicas de astrocitoma y de oligodendroglioma. Los componentes de oligodendroglioma se reconocieron por su tinción oscura y uniforme a la hematoxilina-eosina, núcleos redondos y citoplasma vacuolado y la típica vascularización de finos capilares. El componente de astrocitoma se caracterizó por la típica celularidad y procesos intercelulares que se mencionaron antes en los astrocitomas como células y fibrilares gemistocíticas (Figura 23).

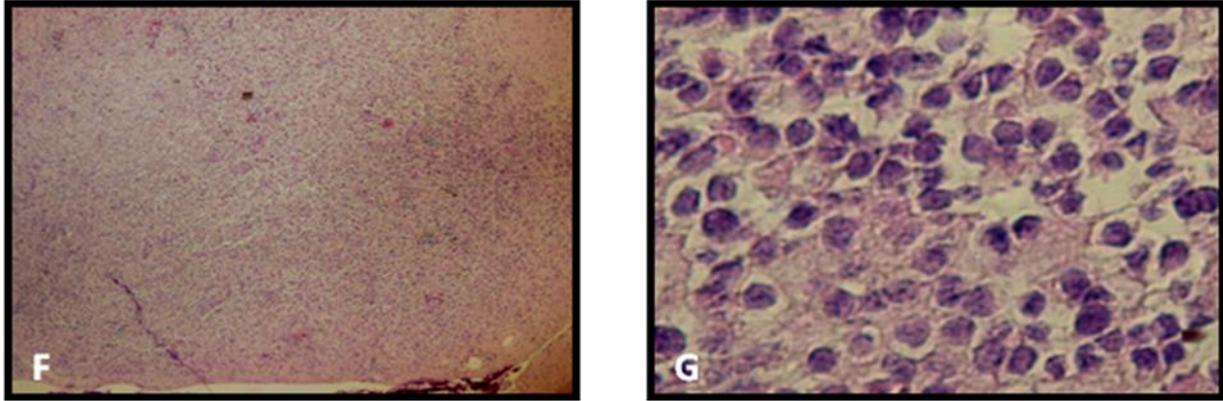


Figura 1: En las imágenes se muestran dos ejemplos de tejido cerebral con presencia de oligodendrogliomas, teñidos con la técnica Hematoxilina y Eosina (HE). **F**) Oligodendroglioma cerebral en la base del hemisferio correspondiente al grupo: Machos/Enu s/extc, 10x. **G**) Oligodendroglioma con leves cambios en la membrana nuclear, principalmente angulaciones, del grupo: Hembra/Enu s/extc, 40x.

En el caso de los **ependimomas** se encontraron células alargadas, dispuestas alrededor de vasos sanguíneos. A estas formaciones celulares se les conoce como seudorosetas, o bien pueden estar dispuestas alrededor de las propias prolongaciones citoplasmáticas conformando estructuras llamadas rosetas. También se observó monotonía celular e hiperchromacia nuclear, irregularidades en la membrana nuclear, además de necrosis focal (Figura 24). Pueden situarse en cualquier lugar del sistema ventricular y de la médula espinal, los sitios más frecuentes son el 4to ventrículo y la región lumbosacra y el fillum terminale, su aspecto es variable. Se trata de tumores histológicamente benignos (Escobar *et al.* 2008).

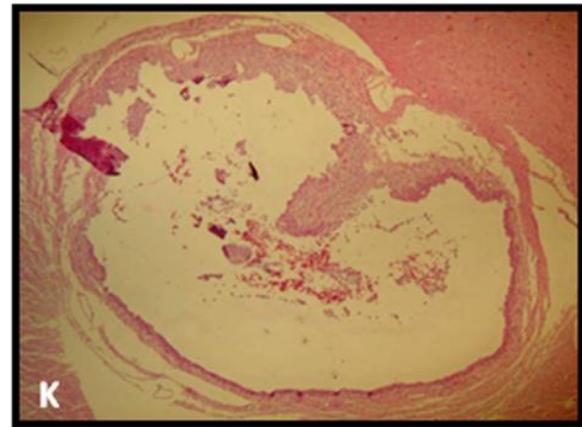
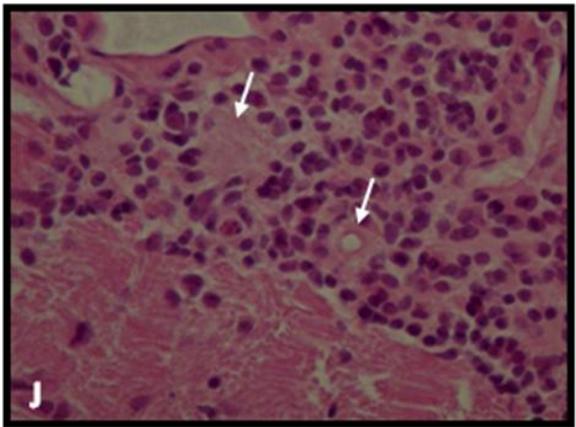
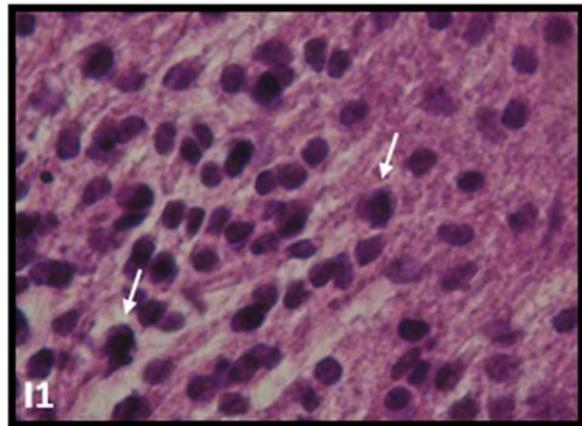
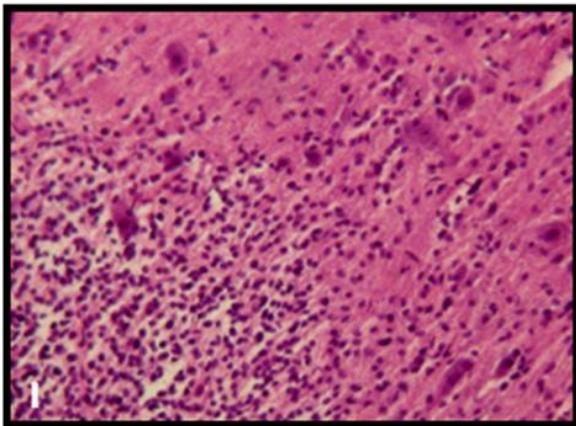
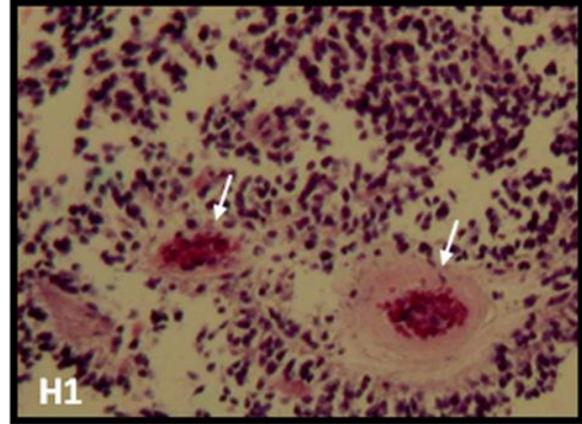
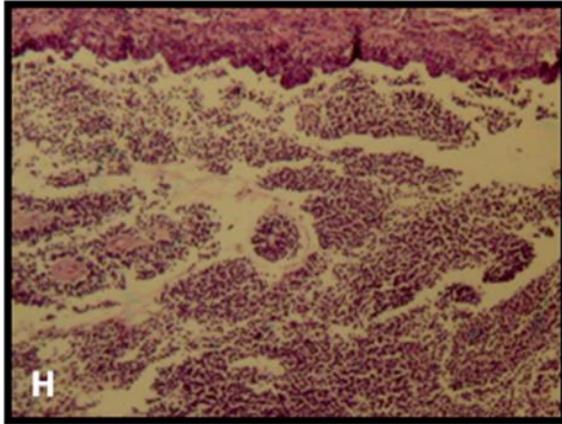


Figura 24: Se muestran diversos tejidos medulares teñidos con la técnica Hematoxilina y Eosina (HE). **H)** Ependimoma del grupo Machos Enu s/extc. **H1)**Acercamiento de un ependimoma, se señala formación pseudoroseta, 20x. **I)** Ependimoma, del grupo: Macho/ Enu s/extc, 20x. **I1)** Ependimoma, se muestra hiperchromacia nuclear e irregularidades nucleares en Macho/Enu s/extc, 40x. **J)** Ependimoma, perteneciente al grupo: Hembra/Enu c/extc, se señala: roseta y pseudoroseta a 40x. **K)** Ependimoma con necrosis, en el centro, perteneciente al grupo: Hembra/Enu c/extc 10x.

Mientras que para los grupos que no presentaron neoplasias, tal es el caso de los grupos sin ENU con extracto y sin ENU sin extracto, sólo en algunos casos se observó lesión debido a la punción del catéter, mostrando leptomeningitis (Figura 25).

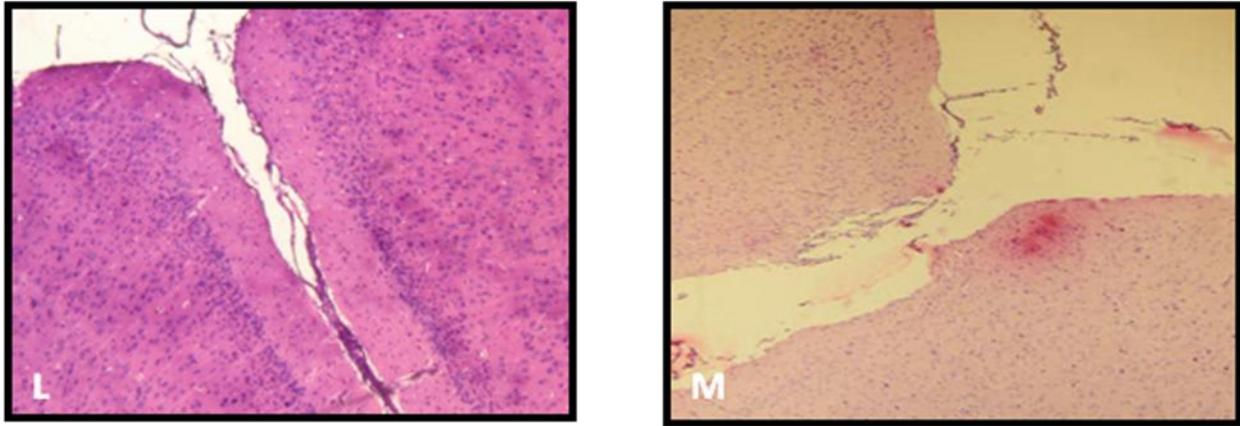


Figura 25: L) Macho/ s ENU c/extc, leptomeningitis crónica, predominio linfocitario (H.E.), 10x. M) Cerebro de Hembra /sEnu s/extc, se muestra el sitio de punción del catéter, con desprendimiento de meninges, (H.E.), 10x.

Efecto del extracto de *C. marsupialis* sobre las neoplasias inducidas con ENU, en el SNC de ratas.

A continuación se abordaran diferentes puntos desde los cuales se pueden analizar los resultados, el primero hace referencia al efecto antitumoral del extracto de *C. marsupialis* sobre neoplasias ENU-inducidas en el SNC, en los cuatro grupos, sin hacer distinción en el sexo, es importante señalar que los resultados aquí mostrados no son promedios, son los totales de las neoplasias que se presentaron; en el caso de los grupos controles, en donde no se administró ENU y por tanto no se presentó ningún tipo de tumor, nuestros resultados tuvieron un valor igual a cero neoplasias, como se puede observar en la gráfica (Figura 26). En el grupo tratado con ENU c/extc 16 ratas desarrollaron neoplasias, mientras que el grupo ENU s/extc presentó 9 ratas con neoplasias; lo cual indica que mediante este método no se observaron diferencias entre los grupos experimentales por efecto del tratamiento c/ extracto. Las diferencias que arrojó el método estadístico de ANOVA de una vía fueron entre aquellos grupos tratados con ENU y los grupos sin ENU. Como era de esperarse a los grupos que no se les administró ENU, no desarrollaron neoplasias.

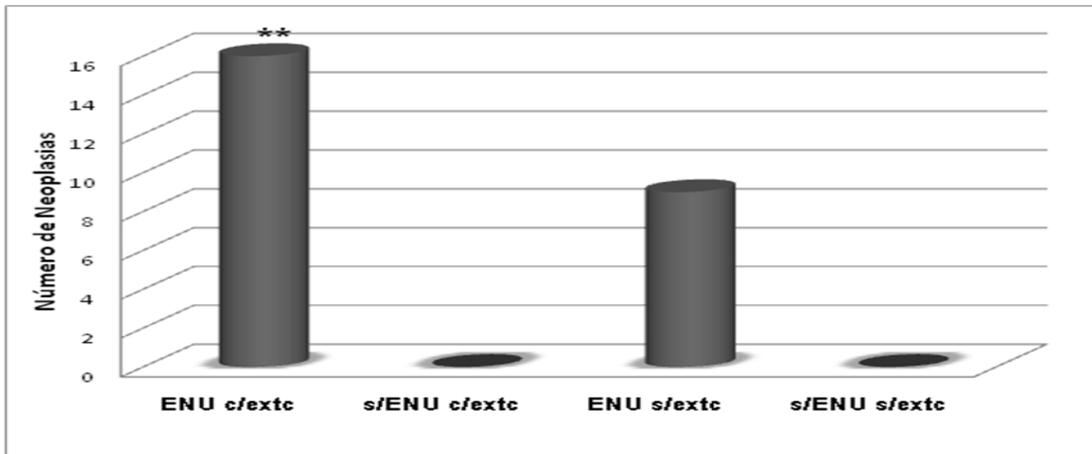


Figura 26: Efecto del extracto de *C. marsupialis* sobre tumores inducidos con ENU en el SNC de ratas. La gráfica muestra el desarrollo de Neoplasias en los distintos grupos experimentales (n total= 42), ** p<0.01 mediante un análisis de Varianza ANOVA de una vía.

Analizando los grupos experimentales de acuerdo al sexo; en el caso de los machos como se observa en la gráfica (Figura 27) el desarrollo de dichas Neoplasias, no fue condicionado por la presencia del extracto de *C. marsupialis*. Como se mencionó anteriormente los tratamientos sin ENU, no desarrollaron ningún tipo de neoplasia. Las diferencias a nivel estadístico se dieron entre los grupos con ENU y sin ENU esto quiere decir que solo los tratamientos ♂ ENU son diferentes estadísticamente, de los grupos ♂ s/ENU.

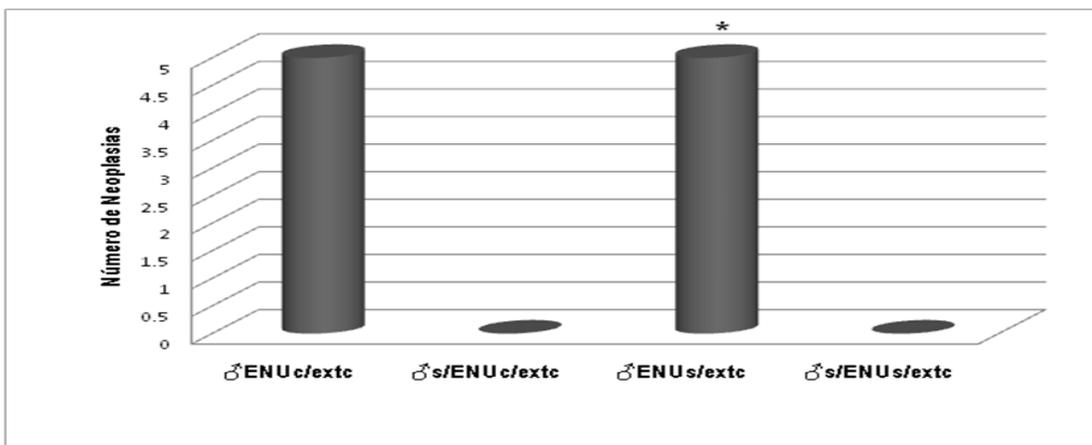


Figura 27. Efecto del extracto de *C. marsupialis* sobre tumores inducidos con ENU en el SNC de ratas machos. La gráfica muestra los distintos grupos experimentales (n total= 42). Se analizaron mediante ANOVA de una vía resultando una p< 0.05, seguida de una análisis de Diferencia Mínima Significativa (DMS).

En el caso de las hembras que desarrollaron neoplasias. Entre los grupos tratados con ENU c/extrac y con ENU s/extc, el método estadístico no arrojó diferencias entre estos dos grupos. Mientras que si mostró diferencias con respecto a los grupos sin ENU. El grupo ENU c/extrac es diferente de todos los grupos s/ENU, con una $p < 0.01$, mientras que el grupo de hembras ENU s/extrac, fue diferente con una $p < 0.05$ de los grupos s/ENU (Figura 28). Es importante mencionar que los grupos sin ENU con y sin extracto no presentaron neoplasias como se puede apreciar en la gráfica (Figura 28).

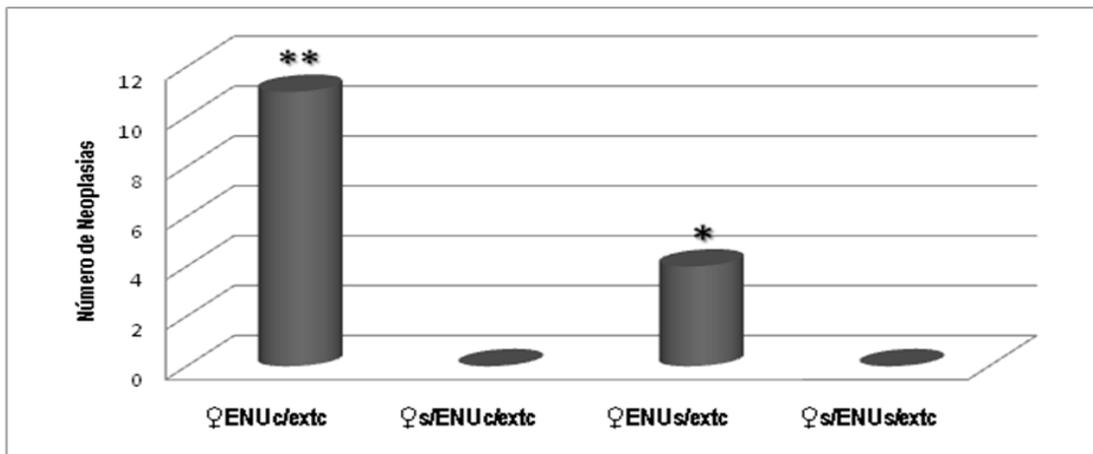


Figura 28: Efecto del extracto de *C. marsupialis* en tumores inducidos con ENU sobre el SNC de ratas hembras. La gráfica muestra el desarrollo de neoplasias de los distintos grupos experimentales (n total= 42). ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, mediante un análisis de ANOVA de una vía.

Analizando por separado las neoplasias presentes en encéfalo y médula espinal, observamos en la gráfica (Figura 29) que el número de neoplasias presentes en encéfalo dentro de los grupos tratados con ENU con extracto desarrolló un mayor número de neoplasias que el grupo con ENU sin extracto. En este caso no se hubo una distinción por sexos. Y el método estadístico mostro diferencias entre estos grupos.

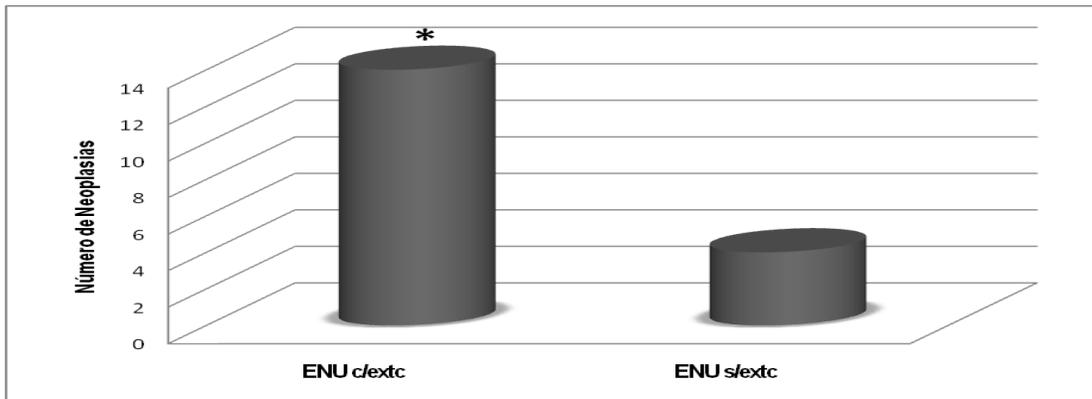


Figura 29: Efecto del extracto de *C. marsupialis* en tumores inducidos con ENU, presentes en el cerebro de ratas. La gráfica muestra el de desarrollo de neoplasias presentes en cerebro de los grupos experimentales ENU c/ extc y ENU s/extc (n total= 42). Por medio de una prueba de "t" de studente * p <0.05.

Caso contrario ocurre con las neoplasias presentes en médula espinal ya que como se observa en la gráfica (Figura 30), el tratamiento ENU c/extc es diferente del tratamiento ENU s/extc, se presentó una disminución de neoplasias en médula, en el grupo ENU con extracto mientras que el grupo tratado sin extracto el desarrollo de tumores fue mayor.

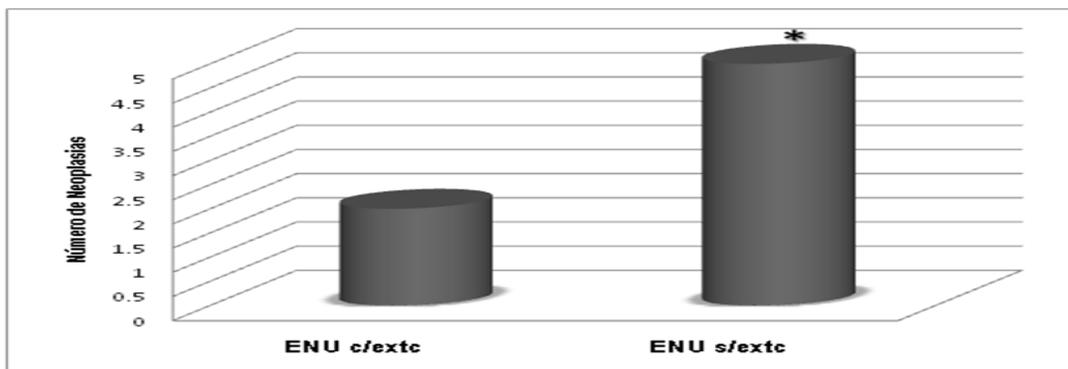


Figura 30: Efecto del extracto de *C. marsupialis* sobre neoplasias presentes en médula inducidas con ENU con una n total= 42. * p < 0.05 mediante una prueba "t" de Student.

De acuerdo con los diferentes tipos tumorales presentes en los grupos experimentales, los astrocitomas se presentaron en mayor número en el tratamiento de ENU con extracto, siendo este aumento estadísticamente significativo. En el tipo tumoral ependimoma, donde se desarrollaron un menor número de neoplasias en el grupo ENU con extracto, que en el grupo sin extracto, como se puede observar en la gráfica (Figura 31). Cabe señalar que los ependimomas sólo se desarrollaron en médula. El tratamiento ENU c/extc, resulto ser diferente del tratamiento ENU s/extc solo en los casos de Astrocitoma y Ependimoma con una $p < 0.05$. No se observaron diferencias entre Oligodendroglioma y Oligoastrocitoma. (Figura 31).

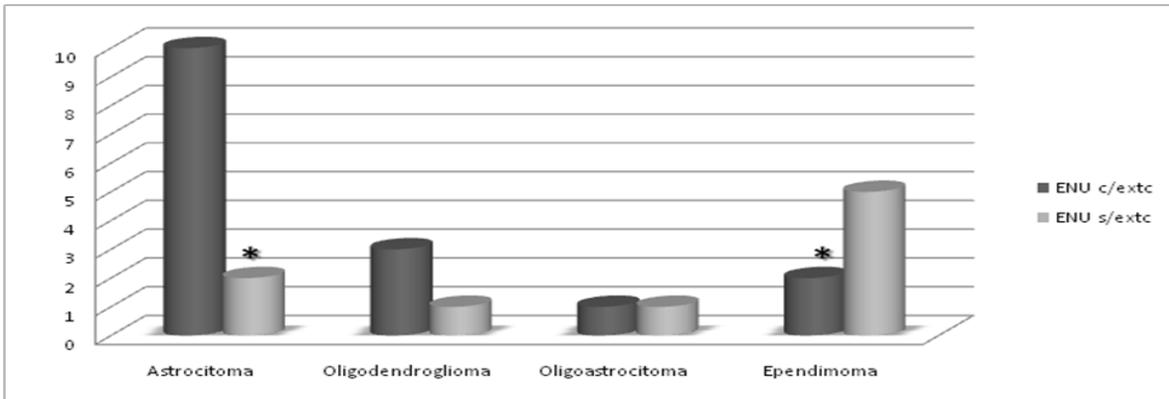


Figura 31: Efecto del extracto de *C. marsupialis* sobre tumores inducidos con ENU en el SNC de rata. La gráfica muestra los tipos tumorales presentes en los grupos experimentales con una n total= 42. * $p < 0.05$ mediante una "t" de Student.

DISCUSIÓN

Como se ha mencionado a lo largo de este trabajo, el estudio de los compuestos activos presentes en el veneno de diferentes organismos marinos, permite un mejor entendimiento en el campo del desarrollo de nuevas drogas. El presente estudio es solo un paso de un proyecto global, cuyo objetivo es elucidar el funcionamiento y efecto de la neurotoxina presente en *C. marsupialis*. Este trabajo presenta el efecto que tiene el extracto crudo de *C. marsupialis* en neoplasias desarrolladas en el SNC de ratas, por administración del agente antitumoral ENU. A continuación se abordarán y discutirán temas importantes para este estudio.

Desarrollo de neoplasias ENU-inducidas.

Como se ha explicado, la inducción de neoplasias por medio de ENU, es una eficaz y válida herramienta para el desarrollo de modelos experimentales de tumores en el SNC, ya que es bien conocido el periodo de latencia para la aparición de los tumores en las ratas hijas, tras la exposición prenatal al carcinógeno durante la segunda mitad de la gestación. Vaquero (2004) reporta que con esta técnica se consiguen tumores intracraneales prácticamente en el 100% de la descendencia. La expresión de tumores depende de la cepa del animal y la cantidad de carcinógeno administrada a la rata madre gestante. La dosis que reportan: Jänisch (1974), Alcaráz (1998), Orduña-Novoa *et al.* (2003) y Vaquero *et al.* (2004) van desde los 20 mg/ kg hasta los 100 mg/kg vía intravenosa; y en todos los casos se obtuvieron neoplasias en el SNC. En este trabajo del total de los animales inducidos con ENU, un 33 % de estos presentaron algún tipo de neoplasia en el SNC. Para la dosis utilizada y recomendada de ENU para la cepa Wistar, se debió registrar un 100% de incidencia tumoral, al menos en el grupo que no fue tratado con el extracto de *C. marsupialis*. El 33% de incidencia tumoral total, fue ocasionado por fallas metodológicas relacionadas al funcionamiento del Bioterio. De éste porcentaje el 14% corresponde a aquellos tratados posteriormente con el extracto, mientras que el 19% restante pertenece a lo grupos sin extracto (Figura 18). Podemos afirmar que el modelo de inducción tumoral se desarrolló satisfactoriamente.

Dentro de el 33% de los tumores inducidos por el modelo tumoral ENU; el 72% representó neoplasias en encéfalo y el 28% restante en la médula espinal (Grafica 2); Jänisch (1974), Lantos (1980), Orduña-Novoa *et al.* (2003) y Vaquero (2004) reportan una mayor incidencia de tumores en el encéfalo, además mencionan que los tumores enu-inducidos se expresan tardíamente en la médula espinal, entre los 6 y 12 meses de edad. En nuestro caso, los tumores en médula se detectaron a la par de los presentes en el encéfalo.

Las neoplasias de encéfalo y médula, corresponden histológicamente a Gliomas. El tipo más abundante fueron los astrocitomas, seguido de ependimomas, oligodendrogliomas y se presentó un glioma mixto: oligoastrocitoma (Figura 31). Jänisch (1974) menciona que las neoplasias ENU-inducidas más comúnmente encontradas son los oligodendrogliomas, ependimomas y gliomas mixtos; mientras que Bilzer *et al.* (1989), reportan además de estos, a los astrocitomas. Vaquero (2004), los reporta como tumores neuroectodérmicos indiferenciados, con tendencia a la diferenciación neuroblástica, que se asemejan a los oligodendrogliomas en la neuropatología humana.

En algunos casos, las neoplasias ENU-inducidas, sólo son referidas como gliomas polimórficos, pero en este estudio se han utilizado los mismos términos que en patología humana, para transmitir la similitud morfológica, esto quiere decir, que por ejemplo los tumores aquí denominados como oligodendrogliomas muestran la misma morfología que los oligodendrogliomas en humanos. Pero esto no significa que tengan el mismo comportamiento biológico que un oligodendroglioma humano.

Dosis Letal₅₀ del extracto de *C. marsupialis*.

Como se explicó previamente, los venenos o toxinas provenientes de medusas y otros animales marinos pueden inducir daño en el sistema nervioso y circulatorio del ser humano. Las pistas sobre esta patogenicidad se han obtenido de datos clínicos de envenenamientos en seres humanos y de experimentación en animales. Los datos arrojan que estos venenos tienen efectos dermonecroticos, cardiotoxicos, citotoxicos, mitotoxicos y neurotoxicos. En China en el año de 1984, Pratap reportó, casos en los que dos especies de cubomedusas ocasionaron afecciones cutáneas que derivaron en alteraciones gastrointestinales y cardiovasculares, Burnet (1998) menciona que esto pudo haber sido ocasionado por la acción neurotóxica. Las acciones patológicas neurológicas, han sido explicadas en modelos experimentales en animales, en el cual se ha revelado que estas neurotoxinas son selectivas para canales en donde las membranas neuronales están en constante actividad como lo son los nodos de Ranvier, como lo menciona Burnet (1998) para el caso de una cubomedusa *Chironex fleckeri*, en donde realizaron pruebas de letalidad en ratones, vía intravenosa, obteniendo una LD₅₀ = 750µg de proteína/ml.

En el caso del presente estudio, se obtuvo el extracto crudo de *C. marsupialis*, y a partir de él se llevo a cabo una determinación de la dosis letal₅₀; esta dosis única se obtuvo por medio de bioensayos en ratas Wistar, donde se probaron 6 diferentes concentraciones que van de los 100mg/ml a los 3.12 mg/ml.

Vía i.c.v. registrándose los síntomas que presentaban los animales (Tabla 2). A medida que la dosis disminuía, los síntomas también lo hacían y aumentaba el tiempo de vida. En el caso de la primer concentración 100 mg/ml se presentaron la mayoría de los síntomas, como pérdida de control de esfínteres, movimiento acelerado de extremidades anteriores y/o posteriores, dificultad para respirar seguido de un paro respiratorio; estos mismos síntomas están reportados en bioensayos en ratas con las especies, *C. fleckeri* y *Carukia barnesi*, que también son cubomedusas (Burnet 1998), así como también lo reporta Orduña-Novoa *et al.* (2003) para *Cassiopea xamachana* (Scyphozoa), que cabe mencionar también utilizó al igual que nosotros el método Lehman para determinar la dosis letal media. En el caso de nuestra primera concentración (100 mg/ml) el tiempo de vida no supero los 60 min, esto se presentó en las 8 ratas evaluadas (el número de animales fue el mismo en todas las concentraciones), debido a que es una dosis concentrada.

Se esperaba que se presentara esta respuesta ya que se tienen antecedentes de la potencia de esta toxina, como los estudios realizados por Estrada (2001), en peces (*Harengula humeralis*) donde obtuvo una LD₅₀ de 3µg de proteína por 1gr de peso, sin embargo pasadas 6.22 hrs, todos los peces murieron. Con estos antecedentes, se procedió a probar una concentración de 50mg/ml en la cual se presentaron los mismos síntomas y con la misma intensidad y sobrevivieron de 65 min. Y debido a esta respuesta se probó la mitad de la anterior concentración, 25mg/ml en esta concentración los síntomas que se presentaron fueron los mismos que la concentración inicial, pero a diferencia de que en este caso sobrevivieron 6 animales, mientras que los otros 2 animales que fallecieron, lo hicieron al poco tiempo de la inyección, ya que este lapso fue muy corto, se probó una siguiente concentración que fue de 12.5mg/ml, aquí los síntomas disminuyeron así como la intensidad de estos y en este caso sobrevivió 1 rata, mientras que aquellas que fallecieron tuvieron un tiempo de supervivencia mayor. En la siguiente concentración 6.25 mg/ml disminuyeron los síntomas, sólo presentaron movimiento acelerado de extremidades anteriores y posteriores, así como dificultad para respirar, posteriormente sólo 2 de 8 sobrevivieron. Y se continuó con la siguiente concentración de 3.12 mg/ml, en este caso los síntomas fueron casi nulos y sobrevivieron la mitad de los animales, tal y como lo requiere la prueba de letalidad, en la cual se busca que sólo se produzca la muerte del 50% de los animales tratados. Con lo que respecta a los síntomas aquí expuestos, Burnet (1998) reporta que los síntomas que presentan los animales debido a la exposición a la neurotoxina se debe a que al administrar la neurotoxina producen grandes poros selectivos de cationes en tejido del nervio y músculo; anormalidades en la perfusión iónica, particularmente de sodio y calcio, además de daño en el tejido miocárdico y el daño en las fibras de Purkinje que pueden producir la muerte.

Al realizar las pruebas estadísticas descritas en el método de Lehman (1980), se obtuvo que LD₅₀ como se observa en la figura 20, de esta concentración se decidió tomar una fracción que corresponde a la dosis de seguridad (1/10 DL₅₀). Una vez realizada la cuantificación de proteína y al realizar los cálculos, se determinó que la dosis letal es de 55µg/ g de peso de rata.

La dosis letal obtenida en un trabajo previo (Sánchez-Rodríguez *et al.* 2006) del extracto crudo de *C. marsupialis*, sobre *O. quadrata* fue de 1.05 µg/g de peso del cangrejo administrado vía i.m. presentando síntomas similares a los ya mencionados, como movimientos espasmódicos y contracción en los apéndices caminadores. Sanchez-Rodriguez *et al.* (2006) reportaron, que la potencia del veneno fue mayor en el extracto crudo que en la fracción purificada perteneciente a la neurotoxina, lo cual indica que la actividad neurotóxica se inhibió después de el método de purificación; razón por la cual, en el presente estudio se trabajó con el extracto crudo de *C.marsupialis*.

La determinación de la LD₅₀ se realizó ya que es preciso calcular los niveles de letalidad o efectividad que son necesarios para determinar un margen de seguridad, para continuar con el estudio, y garantizar al sobrevivencia de los animales tratados y así probar el efecto que este extracto tiene en tumores ENU-inducidos, como se verá a continuación.

Efecto del extracto crudo de *C. marsupialis* sobre neoplasias ENU-inducidas en el SNC.

Como se menciona en el presente trabajo las investigaciones del veneno de *C. marsupialis* son pocas, Rottini *et al.* (1995) reporta actividad hemolítica, Sánchez-Rodríguez *et al.* (2006) realizaron la caracterización del extracto crudo del veneno de *C. marsupialis* en donde se encontraron tres fracciones con actividad citolítica; también hallaron una fracción con actividad neurotóxica y al realizar los bioensayos con cangrejos hallaron que el extracto crudo presentaba mayor efecto neurotóxico, que la fracción purificada. Con la intención de darle continuidad a esta línea de investigación, en el presente trabajo hemos tratado de verificar la hipótesis de que el extracto crudo de *C. marsupialis* posee un efecto antitumoral sobre tumores del SNC, inducidos con ENU en ratas. Para ello se administró el extracto crudo de *C. marsupialis* y no la fracción purificada, debido a que como se mencionó antes, éste fue el que presentó mayor efecto neurotóxico en el estudio de Sánchez-Rodríguez, en el cual quedó demostrado que existe un efecto neurotóxico. En el presente trabajo no queda claro el posible efecto antitumoral, ya que como se puede observar en la gráfica 26, el grupo con ENU c/ extc presentó diferencias con los grupos sin

ENU c/ extc y sin/ENU s/extc; y lo mismo sucedió con el grupo ENU s/extc; pero el método estadístico utilizado no mostró diferencias entre los grupos tratados con ENU con y sin extracto. Por lo tanto podemos afirmar que la presencia de neoplasias en el SNC de ratas, en este modelo estuvo determinado como era de esperarse, por la presencia y ausencia de ENU, el efecto del extracto se esperaba que fuera más significativo, debido al antecedente de su actividad neurotóxica.

Debido a esta disyuntiva se decidió evaluar los resultados del efecto de *C. marsupialis* desde diferentes puntos de vista. Por tanto se analizó de acuerdo al sexo, para verificar si el sexo de los animales era otro factor para el desarrollo de neoplasias en el SNC. Así que observando la figura 27, los grupos ♂ENU c/extc y ♂ENU s/extc no son diferentes entre sí, pero ambos son diferentes de los grupos ♂s/ENU c/extc y ♂s/ENU s/extc; lo cual indica de nuevo que la diferencia radica en el tratamiento prenatal con ENU y sin ENU, mientras que la presencia del extracto crudo de *C. marsupialis*, no es determinante para la presencia tumoral.

Cuando observamos la figura 28, en donde podemos ver que las ♀ENU c/extc presentan una mayor presencia de neoplasias que el grupo ♀ENU s/extc, se puede pensar que el extracto de *C. marsupialis* promueve la presencia tumoral, pero al obtener los análisis estadísticos, ellos arrojan que entre estos grupos no hay diferencias, esto quiere decir que el extracto no promueve la presencia neoplásica, mientras que con los grupos que no fueron inducidos con ENU, si existe una diferencia significativa. De nuevo el factor determinante en la neoplasia es la inducción tumoral; también podemos hacer la observación de que en las hembras se desarrollaron un mayor número de neoplasias que en los machos; esto puede ser azaroso, o bien, como se sabe en otros tumores como el de mama o próstata las hormonas juegan un papel determinante en el desarrollo de tumores, aún no se afirma que las hormonas jueguen un papel importante en el desarrollo de neoplasias en el SNC, salvo el realizado por Shih-Lin en 2008, en donde demuestra que la hormona tiroidea juega un rol importante en la maduración del cerebro de los mamíferos y las isoformas de esta hormona tiroidea pueden desarrollar astrocitomas y afectar el grado de malignidad de estos. Por lo cual es necesario realizar más estudios en donde se pueda asegurar o rechazar la hipótesis de que las hormonas favorecen o no el desarrollo de neoplasias en el SNC.

En las figuras 27 y 28, se puede constatar que si bien el extracto no es un factor de inhibición en la presencia tumoral, tampoco es un promotor de neoplasias, ya que si esto fuera cierto, en los grupos s/ENU c/extc de ♂ y ♀, se habrían presentado neoplasias. La toxina no puede ser promotor de tumores ya que no tiene, o no es conocida su capacidad de formarlos. Por otra parte el extracto no potencializa la presencia

de tumores, debido a que se administró posterior a la inducción tumoral en ratas adultas. Aunque no se puede descartar que el extracto potencialice el desarrollo de neoplasias.

Los tumores encefálicos y de la médula espinal se llaman según el tipo de célula con los que se forman y el lugar del cerebro en el SNC donde se forman primero.

Para analizar las figuras 29 y 30 es importante tener en cuenta que el simple hecho de la localización anatómica de las neoplasias en el SNC les confiere diferente conducta biológica; en primer lugar por ser el sistema más importante y la variedad de funciones que dependen de él. En segundo lugar, tanto el tamaño como la forma de las neoplasias están condicionados por su crecimiento dentro de un espacio reducido e inextensible como es la cavidad craneana, y debido a que en algunos casos la gravedad de las neoplasias depende de su ubicación en el SNC, se decidió analizarlas por separado, a las neoplasias ubicadas en el encéfalo y a aquellas presentes en la médula espinal. En la figura 29 donde se muestran los tumores en cerebro se observa que desarrollaron un mayor número de neoplasias en los grupos inducidos con ENU sin extracto, ya que aquí está integrado el grupo de ♀ENU en donde el factor hormonal pudo haber favorecido el desarrollo de un mayor número de neoplasias, como ya se había expuesto. En el caso de la figura 30 se muestran las neoplasias presentes en médula, ependimomas, en donde la situación es contraria al caso anterior, ya que en los grupos con ENU con extracto se encontró un menor número de neoplasias que en los grupos de ENU sin extracto, esto se puede deber a la existencia de una especificidad por este tipo de neoplasias, aunque habría que estudiar, si es posible esta hipótesis.

Por otra parte como se ha mencionado existen muchos tipos de neoplasias presentes en el encéfalo y médula espinal, tanto benignas como malignas, pueden causar síntomas y, a veces la muerte de quien lo padece. Por tal motivo, es primordial identificarla según el tipo de célula con los que se forman y el lugar del cerebro en el SNC donde se forman primero. En la figura 31 se analizan los tipos tumorales que se presentaron en el SNC de las ratas tratadas tanto con el carcinógeno como con el extracto. En los grupos tratados con ENU y extracto, se presentaron un mayor número de neoplasias cerebrales de tipo Astrocitoma y resultó tener una diferencia significativa con el tipo tumoral de Ependimoma, que se desarrollaron en la médula espinal. Caso contrario ocurrió con el grupo con ENU sin extracto, ya que en este caso, se desarrollaron una mayor cantidad de Ependimomas en médula que Astrocitomas en cerebro, teniendo entre ambos diferencias significativas como se puede apreciar en la gráfica de la figura 31. La aparición de las neoplasias en este tipo de modelo de inducción tumoral es azarosa, se desarrollan neoplasias en diferentes partes del SNC, y no se tiene control sobre que parte de éste se verá afectada

por la inducción y al observar las gráficas de las figuras 29, 30 y 31, podemos apreciar que en los grupos con el extracto de *C. marsupialis* existen menos Ependimomas que en lo que no fueron tratados con extracto. Es importante señalar que en dos casos, se observó una mejoría en la locomoción que era afectada por la neoplasia y posterior al tratamiento con el extracto estas ratas apoyaron sus patas posteriores y caminaron, este hecho fue registrado y una vez que se extrajo el cerebro y médula de estos animales se observó necrosis en gran parte del Ependimoma como se puede apreciar en la Figura 24 K en la sección de resultados y la 32 que se muestra a continuación.

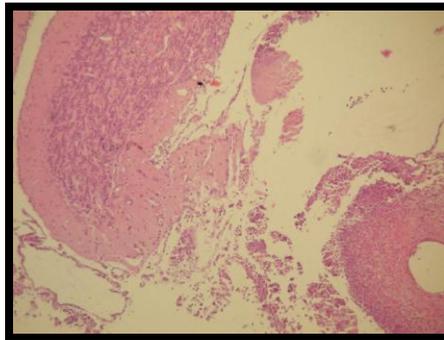


Figura 32: Se observa un ependimoma acompañado de necrosis. Teñido con la técnica Hematoxilina y Eosina (HE), 10X.

En este estudio y con las observaciones realizadas en los cortes histológicos, podemos decir que la mejoría en las ratas se presentó debido a que el extracto tuvo un efecto en la disminución de volumen por efecto de necrosis, aunque es necesario realizar más pruebas para poder asegurar que la necrosis que se presentó en ambas neoplasias se originó por efecto del extracto crudo de *C. marsupialis* o fue debido a la misma naturaleza de la neoplasia. Una prueba sencilla en donde esto se puede comprobar es por volumen desplazado, comparando los volúmenes de un encéfalo c/Enu c/extc y otro c/Enu s/extc, debido a la necrosis.

Con lo que respecta al análisis histológico que fue necesario para poder evaluar los resultados estadísticamente. Las neoplasias encontradas en el presente estudio la OMS las clasifica dentro del Grado II que corresponden a neoplasias infiltrantes con poca actividad mitótica. Además como se puede observar todas las neoplasias encontradas son de tipo glial y no se presentó ninguna neuronal. Esto se puede deber a que las células gliales están presentes en mayor cantidad en el SNC que las neuronales, esto se debe a que las células de la glía actúan como sistema de sostén de las neuronas y sus extensiones celulares desempeñan un papel fundamental en la reparación, el equilibrio hídrico y el metabolismo energético (Girolami *et al.* 1995). También debido a esta función de reparación poseen poca diferenciación. Esta

situación también la reporta Rembao (2008) donde menciona que en general, en el sistema nervioso los blastomas de estirpe neuronal son mucho menos comunes que los gliales, probablemente porque las neuronas son células adultas, altamente diferenciadas y, por lo tanto sin actividad mitótica. No obstante, algunos estudios también han demostrado que las células adultas pueden desarrollar tumores. Por el contrario, las células neurogliales son más numerosas y tienen actividad de multiplicación (Rembao, 2008).

Profundizando más en este tema, es conocido que la neuroglia ejerce funciones de protección y aislamiento y según sus tipos morfológicos se encuentra capacitada para el aislamiento y relleno o para tonicidad y sostén. Algunos de estos tipos morfológicos capaces de originar tumores son: Epitelio endimario, astrocitos, oligodendrocitos, glioblastos entre otros (Costero, 2003). De los cuales en el presente estudio se presentaron tres tipos de gliomas:

Los astrocitomas (Figura 21), que derivan de los astrocitos que son las células de sostén más importantes del encéfalo. En caso de lesiones parenquimatosas en el encéfalo, los astrocitos responden produciendo una densa red de prolongaciones, un fenómeno hasta cierto punto similar a la cicatriz fibrosa que se forma en cualquier otra parte del cuerpo y habitualmente no muestran características histológicas de malignidad. Los oligodendrogliomas (Figura 22), que derivan de los oligodendrocitos y corresponden a prolongaciones citoplasmáticas que rodean a los axones de las neuronas para formar mielina de una manera análoga a las células de Schwann del sistema nervioso periférico. Los endimomas (Figura 24) tienen su origen en células endimarias ellas tapizan los ventrículos cerebrales. Por último los Oligodendrogliomas (Figura 23), como ya se mencionó poseen tanto células astrocíticas como oligodendrogliales (Burns y Kumar, 2004).

En el estudio realizado por Orduña-Novoa *et al.* (2003), donde se aplicó el mismo modelo de inducción tumoral y se probó el extracto de una medusa de la clase Scyphozoa: *Cassiopea xamachana*, en donde obtuvieron los mismos 4 tipos tumorales (Tabla 3), con lo cual corroboramos que la reproducción del modelo ENU, se realizó satisfactoriamente; pero en el caso del extracto Orduña-Novoa *et al.* Observaron una disminución en la expresión de tumores, utilizando también la forma de administración que el presente estudio; lo cual posiblemente se debe a que el extracto neurotóxico de *C. marsupialis* tiene menor efecto en los tumores del SNC que el extracto de *C. xamachana*.

Finalmente, a partir de este trabajo se puede observar que el área de la toxicología de cnidarios es muy vasta y existen muchos campos posibles de investigación. En este proyecto sólo fue posible abordar la parte descriptiva del efecto que tiene el extracto crudo de *C. marsupialis* sobre tumores inducidos con ENU en ratas de la cepa Wistar. Por medio de este trabajo y por los realizados anteriormente con el extracto, no es posible conocer con precisión la acción del extracto sobre las células neoplásicas, por lo que es preciso conocerlo. Por lo tanto se sugiere realizar varias líneas de investigación: es necesario reproducir el trabajo, utilizando extractos purificados, así como también realizar un periodo de dosificación más largo a una concentración más baja y evaluar si a largo plazo tiene mayor efecto; lo cual es un tratamiento parecido al de los agentes quimioterapéuticos, los cuales necesitan dosis repetidas para la erradicación del tumor. Además de esto es primordial comprobar bioquímicamente y molecularmente el efecto del extracto en futuros estudios, para lo cual se sugiere realizar cultivos celulares para conocer si el extracto de *C. marsupialis* posee un efecto antitumoral y si lo tiene en que fase del ciclo celular tiene efecto. Un indicio para abordar este tema, se sabe por trabajos anteriores que el extracto posee además de la neurotoxina, citolisinas, por lo que se sugiere que las células tumorales que se encuentren en mitosis podrán ser susceptibles al tratamiento, ya que en ese momento la membrana celular se está separando para formar una nueva célula y en este momento de división el extracto podría tener un efecto mayor que el reportado.

CONCLUSIONES

- ✓ La inducción tumoral a través del modelo experimental ENU en ratas gestantes de la cepa Wistar, se mostró en el 33% del total de los animales inducidos, en los cuales se presentaron diferentes tipos de gliomas en encéfalo en un 72% y un 28% en médula espinal, los gliomas encontrados corresponden histológicamente a astrocitomas, ependimomas, oligodendrogliomas y oligoastrocitomas, los cuales se ubican dentro del Grado II de acuerdo con la clasificación de tumores del sistema nervioso según la OMS
- ✓ Utilizando el método Lehman se estableció la DL₅₀ del extracto crudo de la especie de cubomedusa *Carybdea marsupialis*, probando diferentes concentraciones de éste extracto, usando una administración intracerebro ventricular y registrando los síntomas y tiempo de sobrevivencia de las ratas tratadas, tal y como lo especifica el método; se obtuvo exitosamente, la dosis de seguridad de la que equivale a 55µg de proteína en 1gr de peso del animal.
- ✓ Al evaluar la actividad antitumoral del extracto de *C.marsupialis* en el SNC de ratas expuestas prenatalmente al carcinógeno se puede concluir que el desarrollo de neoplasias se vio poco afectada por el extracto crudo ya que del 33% del total de las ratas con presencia tumoral, el 14% corresponde a aquellas tratadas con el extracto y el 19% restante no fue tratado con el extracto.
- ✓ Se presentó una disminución en la expresión de ependimomas presentes en la médula espinal de las ratas inducidas con ENU y tratadas con el extracto de *C. marsupialis*, se debe explorar la posible especificidad antitumoral hacia los ependimomas.
- ✓ Es necesario realizar más estudios que descifren las incógnitas sobre el extracto de *C.marsupialis*, para poder asegurar o rechazar su efecto antitumoral.

Es importante recordar que los gliomas malignos presentes en el SNC ocupan el segundo lugar como causa de muerte por cáncer, en los niños. Los progresos terapéuticos han mejorado las perspectivas clínicas de estos gliomas, pero por desgracia su curación aún es muy rara. Ocurre lo mismo con la mayoría de los tumores primarios de cerebro como los astrocitomas anaplásicos y el glioblastoma multiforme. Por lo que es muy importante realizar estudios que traten de proponer nuevas terapias para ésta patología.

ANEXO

Sobre los métodos y procesos empleados

1. Preparación de n-Etil-n-Nitrosourea (ENU).

Este proceso corresponde a elaboración de la solución inductora de tumores. La concentración de ENU empleada en éste trabajo fue de 100 mg por kg de peso de rata (Alcaráz, 1998), disuelta en una solución de ácido cítrico ($C_6H_8O_7$) con una concentración [0.22M], con un pH de 5.5. Ésta solución se administró vía intravenosa a una rata en el día 18 de su gestación (Alcaráz, 1998).

2. Preparación del extracto crudo de *C. marsupialis*.

A partir del liofilizado obtenido, se diluyó la toxina en agua desionizada, con agitador magnético primero y luego sonicando la solución para hacerla homogénea. Para determinar el efecto antitumoral del extracto, se requirió preparar diluciones. En el caso de la determinación de la DL₅₀, se pesaron las diferentes concentraciones a probar: 100mg, 50mg, 25mg, 12.5mg, 6.25mg, 3.12mg, diluyéndolo en 1 ml de agua desionizada; y con estas concentraciones se llevó a cabo el estudio para calcular la DL₅₀. Una vez que fue determinada se obtuvo un valor de 1.1378 mg, a partir de ahí se tomó 1/10 para obtener la Dosis de Seguridad y así probar el extracto como anti-tumoral, por lo tanto la Dosis de Seguridad corresponde a 0.114 mg para 280 gr de peso, expresándose finalmente como 0.408 mg/kg. Una vez que se determinó la dosis de Seguridad, se realizaron los cálculos pertinentes para que se administrara esta concentración a 8 ratas, ya que eran las que se podían operar diariamente, por tanto se preparaban 0.911mg para 2ml. Esto se mantuvo a baja temperatura en una cama de hielo, además se sonico el extracto para lograr que este se diluyera por completo en el agua y tener así una solución homogénea.

3. Cuantificación de Proteínas.

El método de Lowry (1951) es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. A la muestra se añade un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color de la disolución resultante proporcional a la concentración de proteínas. Para determinar la concentración de proteínas de la muestra problema se construye una curva patrón o

de calibrado a partir de una solución patrón de Albumina con una concentración de 2.5 mg/10ml que equivale a 250 µg / ml, realizando a partir de esta concentración tres diluciones de 25 µg / ml, 50µg / ml, 100µg / ml y una muestra más de Agua desionizada que correspondió a la muestra cero. Además de la muestra con el extracto crudo a una concentración de .009g / 2 ml, esta concentración es el resultado de una serie de conversiones y equivalencias a partir de la Dosis letal de seguridad. De ésta solución se tomaron 50µl y se disolvió en 950µl de agua desionizada. Posteriormente a todas las muestras se les agregó una mezcla de: 49 ml de Na₂CO₃ al 2% en NaOH 0.1N, más 0.5 ml de tartrato de Na y K al 2% y 0.5ml de CuSO₄ al 1%. Después de 10 min. Se agregó a cada muestra 0.2 ml de Foli-Fenol (1:1) diluido en agua. Pasados 30 min. Se leyó en el espectrofómeto a 550 nm. La concentración que tienen las muestra del extracto, se determinó por interpolación de los valores de absorbancia en la curva patrón.

Bioensayos

Los bioensayos son pruebas con organismos vivos o células que permiten conocer las actividades de las toxinas de interés (Torrens, 2004).

4. Determinación de la Dosis Letal (LD₅₀), Método Lehman.

Con este método se calcula la dosis letal media (DL₅₀) o dosis efectiva media, que son necesarias para determinar un margen de seguridad.

Para realizarlo, se dispuso una tabla en donde se colocaron tanto los datos como las dosis empleadas, el número de animales y el número que reaccionó al tratamiento, no se incluyeron las dosis que produjeron efectos del 0 o del 100%. Se realizaron los cálculos que menciona Lehman (1980), para posteriormente graficar los datos, para establecer la confiabilidad de los datos se realizó una regresión lineal, así como los límites de confiabilidad del 95% (Lehman, 1980).

5. Administración Estereotáxica.

Esta técnica nos ayuda a mantener fija la cabeza del animal, y poder llevar a cabo con facilidad el procedimiento de la cirugía, el método estereotaxico consiste en montar a la rata en el aparato estereotaxico (Figura 33), una vez que ha sido sedada con Pentobarbital en una dosis de 0.2 ml por cada

250 gr de peso de rata, como lo recomienda el fabricante; con ayuda de los lápices y sujetador bucal, se logra mantener inmóvil la cabeza de la rata.



Figura 33: imagen de un aparato Estereotáxico, donde se fija la cabeza de las ratas a las cuales se les aplica algún tipo de tratamiento.

Ya montada la rata, se procede a realizar la limpieza de la cabeza en donde se realizará la incisión, posteriormente se limpia y rasura el pelo para después realizar el corte de la piel y proceder a la limpieza del cráneo, poniendo al descubierto las suturas craneales, en donde se localiza Bregma y con la ayuda del atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (1984), se localizaron las coordenadas para la administración intracerebroventricular, dichas coordenadas fueron: -1.3 mm anteroposterior, - 4.6 ventral a la dura y 0mm lateral. Dichas coordenadas corresponden al tercer ventrículo. Guiándonos por las coordenadas en el cráneo. Para el caso de la determinación de DL_{50} se administró la toxina con una Microjeringa Hamilton de 10 μ l. Mientras que en el caso de la administración del extracto ya como tratamiento anti tumoral o del vehículo, para lo cual, se colocó la cánula y se fijó con acrílico, al cerebro de la rata y se conectó a la bomba osmótica Alzet ubicada en el dorso de la rata, conectada por medio de un catéter. Por último se cerró la incisión por medio de suturas de 5-0, para evitar infecciones limpiando la zona con isodine.

6. Bombas Osmóticas ALZET.

Consisten en pequeñas bombas que se implantan, usadas para la investigación en ratones, ratas y otros animales de laboratorio. Estas bombas de infusión continua liberan medicinas, drogas u otros agentes de prueba como en este caso, toxinas, en cantidades controladas de un día a cuatro semanas sin necesidad de conexiones externas y manejo frecuente de los animales. En la figura 34 se muestra el mecanismo mediante el cual se da la liberación del medicamento o toxina a probar. En el caso del presente trabajo dichas bombas van unidas a un catéter para una infusión intracerebral. Con este método es posible mantener los niveles terapéuticos de la toxina en el tejido blanco (www.alzet.com). Las bombas

que se utilizaron en este trabajo tienen una capacidad de 200 μ l, con un flujo constante de 0.5 μ l/hr, con una duración de 14 días.

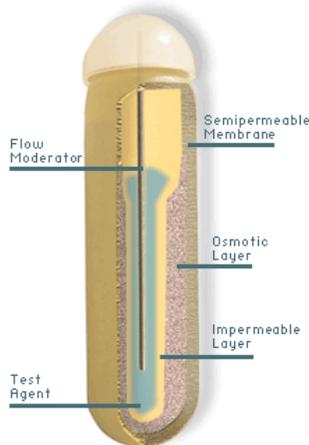


Figura34: Bomba Iso-osmótica, se muestran las capas que tiene la bomba osmótica, este diseño, es el mecanismo mediante el cual funcionan estas bombas, ya que mediante la membrana semipermeable el líquido intersticial penetra a la capa osmótica y mediante los cambios en la presión, permite la difusión del agente de prueba.

Para estudios de farmacología *in vivo*, la infusión de fármacos con una tasa constante es una buena alternativa que ofrece muchas ventajas sobre el método convencional (Clarke, 1993). Además este procedimiento ofrece la posibilidad de eliminar las alteraciones en los resultados de la investigación debido al estrés y al manejo continuo de los animales de laboratorio.

7. Perfusión Vía Intracardiaca de Ratas.

Esta técnica nos permite extraer el tejido del SNC de los animales tratados en este método la rata es anestesiada con cloroformo por inhalación. La perfusión intracardiaca consiste en una administración directa intracardial de suero fisiológico (NaCl 0.9%), que contiene heparina para evitar la coagulación de la sangre (1 ml en 250ml de suero), seguido de una solución de Fijador Universal. Posteriormente se realiza la perfusión, esta técnica de fijación se realizó con el fin de prevenir los cambios *posmortem* como putrefacción y autólisis, además de preservar los constituyentes celulares lo más parecido posible a su estado vivo y protegerlo del endurecimiento por el natural secado del tejido y así facilitar la manipulación durante los subsecuentes procesos. La técnica de perfusión recomendada cuando el tejido u órgano que se va a procesar para histología es de difícil acceso (Palomar, 2005), como en este caso lo es el encéfalo y médula espinal.

Este fijador universal consta de dos soluciones: Un Buffer de Fosfatos (PBS); para lograr este buffer se diluyen 55.2gr de Fosfato Monosódico NaH_2PO_4 en 1 lt de agua bidestilada, esta es la Solución A, mientras que para la Solución B se diluyen 56.8gr de Fosfato Disódico Na_2HPO_4 en 1 lt de agua. Posteriormente se mezcla 81% de la solución B y 19% de Solución A, con un pH de 7.4. Se agregan 17.6gr de NaCl y 8 gr de KCl por cada litro; se diluye 1:1 con agua bidestilada. La segunda solución del fijador universal, consta de 80gr de paraformaldehído diluido en 1lt de agua a 60 0C y se agrega NaOH para aclarar. Esto se diluye 1:1 con Agua bidestilada. Por último, se disuelve 1:1 de Buffer de Fosfatos y de Paraformaldehído.

8. Inclusión en Parafina.

A fin de que se puedan obtener cortes suficientemente finos para ser observados al microscopio, los tejidos tienen que ser incluidos y envueltos por una sustancia de consistencia firme. En el éste trabajo la sustancia utilizada fue parafina.

Para realizar la inclusión, los tejidos se lavaron en agua y posteriormente fueron deshidratados gradualmente en alcoholes al 60%, 70%, 80%, 96% y alcohol absoluto, sumergiéndolos en cada etapa durante una hora. Todas las etapas mencionadas se realizaron por duplicado. Esto con el fin de eliminar el agua de los tejidos.

Posteriormente las muestras pasaron a dos cambios de Xilol concentrado y se continuo sumergiéndolos en dos cambios de parafina líquida. La parafina penetra en los vasos, en los espacios intercelulares y también e el interior de las células embebiendo el tejido y haciendo más fácil la obtención de cortes en el micrótopo. Finalmente se incluyeron en bloques de parafina, en un Incluidor de Tejido Leica EG1160. Para obtener un bloque de parafina de forma regular, para ser cortado en el micrótopo (Villeda, 2003).

9. Tinción: Hematoxilina-Eosina.

Esta técnica parte de un principio en el que la hematoxilina es un colorante catiónico mientras que la eosina es un colorante aniónico. Se teñirán los núcleos de azul, citoplasmas en rosa, músculo en tonos rojizos a rosados fucsia, glóbulos rojos en naranja o rojo y la fibrina en rosa intenso.

Consiste en que una vez seca la laminilla con el tejido, se sumergieron en una secuencia de tinción como se explica a continuación:

Para desparafinar lo tejidos se sumergen 30 min en Xilol, posteriormente a cambios de: Alcohol-Xilol, 2 cambios de Alcohol 100% y dos al 96%, permaneciendo 3 min, en cada cambio, posteriormente se enjuagaron en Agua destilada para después sumergirlos durante 3 min en Hematoxilina de Mayer, transcurridos los 3 min, se enjuagaron los tejidos en agua corriente. Se procede a pasar los tejidos por una solución saturada de Carbonato de Litio (para cambio de color en el colorante), se lavaron en agua corriente. Para después sumergirse en Eosina Floxina por 5 min, lavando nuevamente en agua corriente y se procede a una nueva deshidratación: enjuagues en alcoholes a diferentes concentraciones: 70%, 96% y 100 %, 2 cambios en este último; posteriormente un cambio a Alcohol-Xilol y 2 cambios de Xilol, 3 min en estos dos últimos (Figura 35). Finalmente, se fijan con resina y se coloca un cubreobjetos sobre el tejido bañado con resina (Porphet *et al.* 1995).

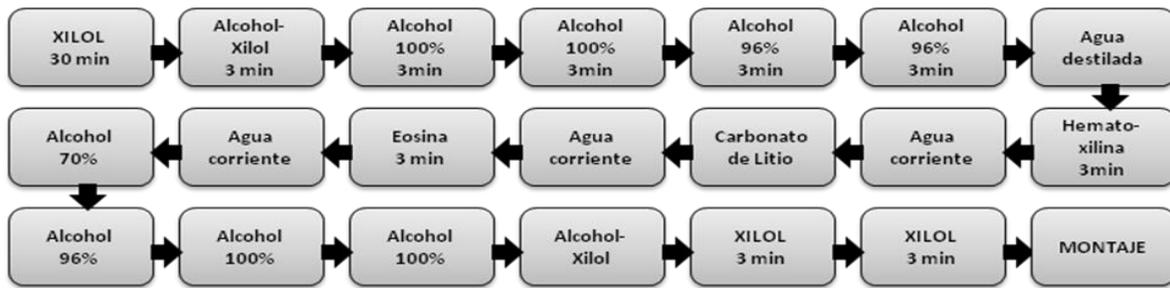


Figura 35: Esquema en el que se muestra el tren de Tinción Hematoxilina-Eosina, utilizado en el presente trabajo.

REFERENCIAS

- ❖ Alcaráz Z M (1998) Evaluación del efecto antitumoral del Talio en ratas con tumores en el Sistema Nervioso Central inducidas por etil-nitroso-urea(ENU), Tesis para obtener el título de Bióloga UNAM, México DF, 76.
- ❖ Avian M, Budri N, Rottini L (1997) The Nematocysts of *Carybdea marsupialis* Linnaeus, 1758 (Cubozoa), Proc 6th Int Conf Coel Biol, 29-36.
- ❖ Azila N & Othman I (1991) Pharmacological effects of various jellyfish found in Malaysian waters, International Society of Toxonology Meeting, Singapore.
- ❖ Barnes R D (1989) Cnidarios y Ctenóforos, Capítulo 5, Zoología de Invertebrados, 5A Edición, Edit. Interamericana, McGraw-Hill, México DF, 103-130 pp.
- ❖ Benslimane A F, Pouchus Y F, Le Boterff J, Verbist J F (1988) Substances cyrotoxiques et antibacteriennes de L'ascidie *Aplidium antillense*, J Nat Prod ,51: 582-583.
- ❖ Berleur P M & Cordier S (1995) The rol of Chemical and Physical of viral exposures and health factors in neurocacinogenesis: implications for epidemiologic studies of brain tumors, Cancer causes and control, 8: 240-256.
- ❖ Bilzer T, Reifenberger G & Wechsler W (1989) Chemical induction of brain tumors in rats by netrosoureas: molecular biology and neuropathology, Neurotoxicol, Teratol 11: 551-556.
- ❖ Burns K D, Kumar V (2004) El sistema Nervioso, Capítulo 23 En: Patología Humana, Kumar V, Cortan R, Robbins S, 7ª edición, Editorial Elseiver España, Madrid España, 809-849.
- ❖ Carballo J L (2000) Distribución de *Ecteinascidia turbinata* (Ascidiacea: Perophoridae) en los manglares de la península de Yucatán, México, Rev.biol.trop, jun. 2000, Vol 48, no. 2-3, 365-369.
- ❖ Cerda-García R C (1999) El amplio potencial de los productos naturales marino. Hemeroteca Virtual Association National de Universidades e Instituciones de Educación Superior (ANUIES), <http://www.hemerodigital.unam.mx/ANUIES>
- ❖ Clarke D O (1983) Pharmacokinetic studies in developmental toxicology: practical considerations and approaches. Toxicology methods, 3 (4): 223-251.

- ❖ Costero B B C (2003) Fundamentos de Anatomía Patológica, Méndez Editores, México DF, 526 pp.
- ❖ Chung J, Ratnapala L, Cooke I, Yanagihara A (2001) Partial purification and characterization of a hemolysin (CAH1) from Hawaiian box jellyfish (*Carybdea alata*) venom, *Toxicon* 39: 981-990.
- ❖ Cifuentes L L, Torres G P, Frías M M (1987) El Océano y sus recursos IV Las Ciencias del Mar: Oceanografía Biológica, Capítulo XII, Cambios adaptativos de los organismos marinos para la defensa y captura de sus presas, 1a Edición, México, Fondo de Cultura Económica, 199 pp.
- ❖ Delalogue S, Yovine A, Taamma M, Riofrio E, Brain E, Raymond P, Cottu F, Goldwasser J, Jimeno J L, Misset M M, y Cvitkovic E (2001) Ecteinascidin-743: A Marine-Derived Compound in Advanced, Pretreated Sarcoma Patients—Preliminary Evidence of Activity, *Journal of Clinical Oncology*, Vol 19, (5) 1248-1255.
- ❖ Druckrey H, Ivankovic S, Gimmy J (1973) Cancerogenic effects of methyl- and ethyl-nitrosourea (MNU and ENU) at single intracerebral and intracarotidal injection in newborn and young BD-rats, *Z. Krebsforsch Klin, Onkol, Cancer Res. Clin. Oncol*, 79: 282-297.
- ❖ Endean R, Henderson L (1969) Further studies of toxic material from nematocysts of the cubomedusan *Chironex fleckeri*, *Toxicon* 7: 303-314.
- ❖ Escobar I A, Vega R, Weidenheim M K (2008) Patología de los tumores cerebrales, Capítulo 9 En: *Tumores Cerebrales Tomo I*, Aguirre C M L & Sotelo M J, Edit. Médica Panamericana, 151-183 pp
- ❖ Estrada M N A (2001) Caracterización de la actividad biológica de las toxinas de *Carybdea marsupialis* Linné, 1758 (Cnidaria: Cubozoa), Tesis para obtener el título de: Biólogo Marino, Universidad Autónoma de Baja California Sur, 46 pp.
- ❖ Garateix A (2005) El Mar: Fuente de nuevos fármacos, *Elementos*: 12: 39-47.
- ❖ Garateix A, García T, Salceda E, Soto E (2003) Compuestos de origen marino como instrumentos para el estudio del sistema nerviosos, *Avicenia*, 16: 6-12.
- ❖ Girolami U, Fresh M P, Douglasc A (1995) El sistema Nervioso Central, Capítulo 29, En: *Patología Estructural y funcional*, Ramzi S C, Kuma V, Stanley L R, 5ta Edición, Editorial Interamericana Mc. Graw-Hill, España, 1420-1477 pp.
- ❖ Holstein T & Tardent P (1984) An ultrahigh-speed analysis of exocytosis nematocyst discharge, *Science* 223: 830-833.

- ❖ Jänisch W (1974) Chapter 1: Experimental brain tumours, in: Handbook of Clinical Neurology, Vol 17, Tumours of the brain and skull, Part II, Edited by P J Vinken and G. W. Bruyn, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, printed in Germany, 1-41 pp
- ❖ Karp P L (1961) Synopsis of the medusae of the world J Mar Biol Assoc, U.K., 1: 469.
- ❖ Kokelj F, Stinco C & Avian M (1993) Dermatossicita di una preparazione di nematocisti di *Carybdea marsupialis* Annali Italiani Di Dermatologia Clinica E Sperimentale, 47: 265-267.
- ❖ Lantos P L (1980) Chemical induction of tumors in the Nervous System, In: Brain Tumors: Scientific Basis, Clinical Investigation and current Therapy, Thomas D. G. T. Y Graham D.I. (Eds), London, Butterworhts, 85-108.
- ❖ Lehman F (1980) Dosis letal o efectiva media: Un calculo manual fácil y rápido, Archivos de Farmacología y Toxicología CINVESTAV-IPN, 6: 161-178.
- ❖ Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, Randall R J (1951) Protein measurement with the Folin-phenol reagent, Journal of Biological Chemistry, 193: 265-275.
- ❖ Martin de Civetta M T (2004) Monografía: Carcinogenesis, <http://med.unne.edu.ar/catedras>
- ❖ Mebs D (2001) Toxicity in animals Trend in Evolution?, Toxicon 39: 87-96.
- ❖ Merino M & Otero L (1991) Atlas ambiental costero de Puerro Morelos Quintana Roo, CIQRO/ICMyL. UNAM Mexico. 80 pp.
- ❖ Milla L, Segura-Puertas L, Celis L, y Heimer de la Cotera E, (2000), Dermatittis por contacto con *Carybdea marsupialis* (Cnidaria: Cubozoa), Dermatología, Revista Mexicana, 44 (4): 167-170.
- ❖ Nagai H (2003) Recent progress in jellyfish toxin study, J Health Sci 49: 337-340.
- ❖ Nagase H, Karaki H, Ozaki H, Urakawa N, Azuma H & Nakajima T (1987) Conrtctile and relaxant effects of jellyfish toxin on the vascular and intestinal tissues, Comp Biochem Physiol 86 (2): 411-414.
- ❖ Orduña-Novoa K, Segura-Puertas L, Sanchez-Rodriguez J, Melendez A, Nava Ruiz C, Rembao D, Santamaria A, Galvan-Arzate S (2003) Possible Antitumoral Effect of the crude venom of *Cassiopea xamachana* (Cnidaria:Scyphozoa) on tumors of the Cental Nervous System induced by N-Ethyl-N-Nitrosourea (ENU) in Rats, Proc West Pharmacol Soc 46: 85-87.
- ❖ Othman I, Eldila M, Mustaffa M, Musa M, Musa N (1996) Studies on jellyfish *Carybdea rastonii*, Toxicon 34, 167.

- ❖ Palomar M M (2005) Capitulo II: Técnica Histológica, En: Métodos de Laboratorio, UNAM FES-Iztacala, 37-52 pp.
- ❖ Paxinos G & Watson G (1984) The rat brain in stereotaxic coordinates, Academic Press, Sydney.
- ❖ Prophet B E, Mills B, Arrington J B, Sobin L H (1995) Capitulo 9: Hematoxilina y Eosina, Allen C. T, De: Metodos histotecnologicos, Instituto de patología de las fuerzas armadas de los Estados Unidos de America (AFIP), Washington D C 55-60 pp.
- ❖ Rembao B D (2008) Clasificación de los tumores cerebrales Capitulo 3, En: Tumores Cerebrales Tomo I, Aguirre C M L & Sotelo M J, Edit. Médica Panamericana, 43-54 pp.
- ❖ Roset J, Aguayo S, Muñoz M J (2001) Detección de cianobacterias y sus toxinas. Una revisión, Rev. De Toxicol, 18: 65-71.
- ❖ Rottini G L, Gusmani E, Parovel & P Patriarca (1995) Purification and properties of a cytolytic toxin in venom of the jellyfish *Carybdea marsupialis*, Toxicon 33: 315-326.
- ❖ Sánchez-Rodríguez J, Torrens R E, Segura-Puertas L (2006) Partial purification and characterization of a novel neurotoxin and three cytolisins from box jellyfish (*Carybdea marsupialis*) nematocyst venom, Arch Toxicol 80 (3): 163-168.
- ❖ Schwartzmann G, Brondani da Rocha A, Berlinck R, Jimeno J (2001) Marine organisms as a source of new anticancer agents, The Lancet Oncology 2: 221-225.
- ❖ Shih-Lin H, Chih-Lung L, Ann-Shung L, Yan-Fen H, Shen-Long H, Yi-Ren H, Dyi-Sheng C, Kung-Shing L (2008) The expression of thyroid hormone receptor isoforms in human astrocytomas, Surgical Neurology 70 S1:4 – S1:8.
- ❖ Simmons T L, Adrianasolo E, McPhail K, Flatt P and Gerwick W H (2005) Marine natural products as anticancer drugs, Mol Cancer Ther 4:333-421.
- ❖ Sobrino A S (1996) Detección de sustancias bioactivas en organismos bentónicos del Golfo de Tehuantepec, Tesis de Maestría UNAM, México, 69 pp.
- ❖ Torrens R E (2004) Aislamiento y purificación de proteínas con actividad hemolítica y neurotóxica de la cubomedusa *Carybdea marsupialis* (Linné, 1758), Tesis Maestría UNAM, 94.

- ❖ Vázquez R B, Santiago L A D (2003) Caracterización del efecto protector del Selenio sobre diferentes indicadores de neurotoxicidad inducidos por el Acido 2, 3 Pridin dicarboxilico (Ac. Quinolinico) en un modelo experimental de la enfermedad de Huntington en la rata, Tesis de Licenciatura. UNAM, 26-27pp.
- ❖ Vaquero J, Zurita M, Oya S, Aguayo C (2004) Influencia de la administración sistémica de factor de crecimiento nervioso sobre el desarrollo de tumores cerebrales inducidos por etil-nitroso-urea, Mapfre Medicina, Vol. 5, No. 3, 171-175.
- ❖ Villeda H J (2003) Toxicidad a bajas dosis de Plomo en cerebro, placenta y cordón umbilical de ratas en desarrollo; Evaluación histopatológica, ultraestructural y neuroquímico. Tesis Doctoral.UAM. 52-53pp.
- ❖ Williamson J A, Fenner P J Burnett J W, Rifkin J F (1996) Venomous & Poisonous Marine Animals: a medical and biological handbook, University of New South Wales Press, Australia, 504 pp.
- ❖ Zakj H, Karaki H, Nagase H, Urakaw N, H. Azuma & T. Nakagima, 1986, Contractile effects of jellyfish toxin extracted of *Carybdea rastonii* on isolated rabbit aorta. Japan Pharmac. 42: 425-430.
- ❖ <http://gsk.com.mx/diccionario/cerebrales.html>
- ❖ <http://www.cancer.gov/espanol>
- ❖ www.alzet.com
- upload.wikimedia.org
- weblogs.madrimasd.org/images/weblogs_madrimas.....
- www.sealife.net/.../sm_Conus_striatus.jpg
- www-biol.paisley.ac.uk/Anabaen.jpg
- www.lucioPesce.net/zoologia/polipo1.jpg
- www.alaquairum.net/imágenes/esquema_hidras.jpg
- Pearson Education Inc.
- Fishindex.blogspot.com/2008/08/box_jellyfish
- br.geocities.com/.../cubozoarios.htm
- contenidos.educarex.es/.../contenido4.htm

- www.inahqr.gob.mx