



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

(QUÍMICA ACUÁTICA)

**EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS CON
ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE *Cassiopea xamachana*.**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
ILINOVA MARAVILLA ULLOA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. JUDITH SÁNCHEZ RODRÍGUEZ
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA (UNAM)

COMITÉ TUTOR: DRA. PATRICIA E. THOMÉ ORTIZ
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA (UNAM)

DR. SERGIO RODRÍGUEZ MORALES
UNIDAD DE QUIMICA SISAL, FACULTAD DE QUIMICA (UNAM)

DR. ROBERTO A. ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS
MONTEROS
INSTITUTO DE QUÍMICA (UNAM)

DR. JOSÉ SERAFÍN CALDERÓN PARDO
INSTITUTO DE QUÍMICA (UNAM)

PUERTO MORELOS, QUINTANA ROO. OCTUBRE 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

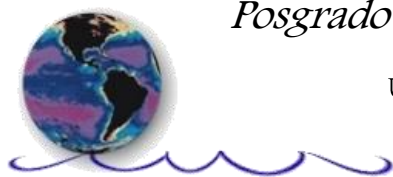


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología

Universidad Nacional Autónoma de México



**Extracción y caracterización de compuestos con actividad
antitumoral de *Cassiopea xamachana***



p r e s e n t a:

Ilinova Maravilla Ulloa

Directora de Tesis: Dra. Judith Sánchez Rodríguez

Comité Tutorial: Dra. Patricia Thomé Ortiz

Dr. Sergio Rodríguez Morales

Dr. Roberto A. Arreguín Espinosa de los Monteros

Dr. José Serafín Calderón Pardo

Puerto Morelos, Q. Roo. Octubre de 2015

Contenido

Resumen.....	iv
Abstract	v
En memoria de.....	vi
Agradecimientos.....	vii
Índice de tablas.....	viii
Índice de figuras.....	ix
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	3
2.1. Cnidarios.....	3
2.1.1. <i>Cassiopeia xamachana</i>.....	4
2.1.1.1. <i>Clasificación taxonómica</i>.....	5
2.1.1.2. <i>Toxicología de Cassiopea xamachana</i>.....	5
2.2. Cáncer.....	6
2.2.1. <i>Ciclo celular y carcinogénesis</i>.....	7
2.2.2. <i>Tumores del Sistema Nervioso Central (SNC)</i>.....	8
2.2.3. <i>Mecanismos de acción descritos para antitumorales de origen marino</i>.....	10
3. Justificación.....	12
4. Hipótesis.....	13
5. Preguntas de investigación.....	13
6. Objetivos.....	13
6.1. General.....	13
6.2. Objetivos específicos.....	13
7. Material y métodos.....	14
7.1. Obtención de organismos.....	14
7.2. Obtención de extracto crudo.....	14
7.2.1. <i>Extracto crudo I (Ecl)</i>.....	14
7.2.2. <i>Extracto crudo II (EclI)</i>.....	15
7.3. Cuantificación de proteínas.....	15
7.4. Purificación del extracto crudo.....	15

7.4.1.	Cromatografía de filtración en gel	15
7.4.2.	Tamizado molecular	16
7.5.	Electroforesis en gel de acrilamida SDS-PAGE	16
7.6.	Pruebas de actividad biológica	16
7.6.1.	<i>Letalidad en Artemia salina</i>	16
7.6.1.1.	<i>Extracto crudo I</i>	16
7.6.1.1.1.	<i>Obtención de organismos de Artemia salina</i>	16
7.6.1.1.2.	<i>Preparación de solución madre</i>	16
7.6.1.1.3.	<i>Bioensayo</i>	17
7.6.1.2.	<i>Extracto crudo II y fracciones separadas mediante ultrafiltración.</i>	17
7.6.1.2.1.	<i>Obtención de organismos de Artemia salina</i>	17
7.6.1.2.2.	<i>Preparación de solución madre</i>	17
7.6.1.2.3.	<i>Bioensayo</i>	17
7.6.2.	<i>Análisis de fosfolipasas</i>	18
7.6.2.1.	<i>Preparación de los geles</i>	18
7.6.2.2.	<i>Preparación de las soluciones</i>	18
7.6.3.	<i>Citotoxicidad en líneas celulares de glioma de rata</i>	18
7.6.3.1.	<i>Preparación de los extractos.</i>	18
7.6.3.2.	<i>Cultivos celulares.</i>	19
7.6.3.3.	<i>Citotoxicidad de los extractos.</i>	19
7.6.3.4.	<i>Evaluación de la viabilidad celular por el método de cristal violeta (CV)</i>	19
7.7.	Análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF	20
8.	Resultados	21
8.1.	Extracto crudo I	21
8.1.1.	<i>Obtención del extracto crudo, identificación de nematocistos y cuantificación de proteínas.</i>	21
8.1.2.	<i>Cromatografía en gel permeable (Sephadex G50 M).</i>	21
8.1.3.	<i>Electroforesis en gel de acrilamida SDS-PAGE.</i>	23
8.1.4.	<i>Letalidad en Artemia salina.</i>	25
8.1.5.	<i>Análisis de actividad de fosfolipasa A (PLA).</i>	26
8.1.6.	<i>Citotoxicidad en líneas celulares de glioma de rata.</i>	28

8.2.	Extracto crudo II (EclI).	28
8.2.1.	<i>Obtención del extracto crudo y cuantificación de proteínas.</i>	28
8.2.2.	<i>Separación mediante ultrafiltración.</i>	29
8.2.3.	<i>Electroforesis en gel de acrilamida SDS-PAGE.</i>	29
8.2.4.	<i>Letalidad en Artemia salina.</i>	31
8.2.5.	<i>Análisis de actividad de fosfolipasa A (PLA)</i>	31
8.2.6.	<i>Análisis de rendimiento</i>	32
8.3.	Citotoxicidad en líneas celulares de glioma de rata	33
8.4.	Espectrometría de masas	38
9.	Discusión	40
10.	Conclusiones	45
11.	Referencias	46
12.	ANEXOS	A1
A1.	Abreviaturas	A1
A2.	Diluciones de la solución madre para el ensayo de <i>Artemia salina</i> .	A3
A3.	Cromatogramas de filtración en Gel	A4
A4.	Actividad neurotóxica	A5
A5.	Espectros de masas individuales.	A7

Resumen

La imperiosa necesidad por combatir problemas de salud mediante el uso de métodos alternativos a la medicina tradicional ha despertado el interés por aislar diversos compuestos de origen natural desde tiempos remotos. Recientemente se ha intensificado la búsqueda de compuestos que ejerzan este tipo de actividad terapéutica a partir de organismos marinos, dentro de esta búsqueda el filo *Cnidaria* ha sido uno de los más estudiados.

Dado que el cáncer es la principal causa de muerte a nivel mundial, los esfuerzos en el descubrimiento de nuevos compuestos que presenten algún tipo de actividad antitumoral y los menores efectos secundarios en el paciente se han incrementado. Dentro de los tumores cerebrales los gliomas se caracterizan por poseer una alta tasa de morbimortalidad, agresividad y pronósticos de sobrevida muy pobres para los pacientes. De los 24,000 casos nuevos/año, el 73% de los pacientes muere a causa de esta enfermedad.

Cassiopea xamachana es una escifomedusa de abundante distribución en el Caribe mexicano, anteriormente se había reportado que el extracto total de esta especie favorece una disminución en el número y diversidad de tumores del SNC inducidos por Etil-nitrosourea.

La actividad biológica del extracto obtenido de organismos de *Cassiopea xamachana* capturados entre 2013 y 2014 se evaluó empleando ensayos de letalidad en *Artemia salina*, actividad de fosfolipasas y toxicidad ante dos líneas celulares de glioma murino (C6 y RG2). El extracto crudo mostro actividad dosis dependiente de fosfolipasas A, presumiblemente del tipo 2; letalidad ante *Artemia salina* con una dosis letal media de 604.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína, y disminución de la viabilidad celular por debajo del 60% ante ambas líneas celulares en concentraciones de un microgramo de extracto por mililitro, mostrando alteraciones en la estructura celular.

El extracto crudo fue pre-purificado por cromatografía en gel permeable y mediante tamizado molecular por ultrafiltración, ambos métodos mostraron un rendimiento bajo y similar entre ellos de 1.09% y 1.29% respectivamente. Todas las fracciones obtenidas mediante cromatografía mostraron actividad de fosfolipasas A, en tanto la fracción Cx G50FIII disminuyó la viabilidad celular de la línea C6 por debajo del 20% a la misma concentración que el extracto crudo.

Por su parte, dos de las cuatro fracciones (Mp5 y Mp10) obtenidas mediante tamizado molecular presentaron actividad en el ensayo de fosfolipasas A y citotoxicidades ante *Artemia salina* exhibiendo dosis letales medias de 351 y 472 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente. Adicionalmente estas dos fracciones disminuyeron la viabilidad celular de la línea C6 por debajo del 50% y mostraron evidentes alteraciones estructurales en ambas líneas.

Palabras clave: *Cassiopea xamachana*, citotoxicidad, glioma murino, actividad biológica, medusas.

Abstract

The urgent need to combat health problems by using methods alternative to traditional medicine has driven the interest to isolate various compounds of natural origin since ancient times. Recently there has been an escalation in the research of new compounds that display this kind of therapeutic activity from marine organisms, within this the phylum Cnidaria has been one of the most studied.

Given that cancer is the leading cause of death worldwide, efforts in the discovery of new compounds that display some type of anti-tumoral activity with less secondary effects on the patient, have increased. Within brain tumors, gliomas are characterized by a high rate of mortality, aggressiveness and very poor survival for patients. Of the 24,000 new/year cases, 73% of patients die from this disease.

Cassiopea xamachana is a scyphomedusa of wide distribution in the Mexican Caribbean. It has been previously reported that the crude venom of this species subserve a decrease in the number and diversity of tumors of the central nervous system induced by N-ethyl-N-nitrosourea.

The biological activity of the venom of *Cassiopea xamachana* collected between 2013 and 2014 was evaluated by different bioassays, including phospholipase activity, cytotoxicity against *Artemia salina* (brine shrimp) and two murine glioma cell lines (C6 and RG2). The crude venom showed dose-dependent activity of phospholipase A, presumably type 2; lethality against *Artemia salina* with a median lethal dose of 60.47 micrograms of protein per milliliter, and a decreased in cell viability below 60% in both cell lines at concentrations of one microgram of venom per milliliter, showing alterations in cell structure.

The crude venom was pre-purified by gel filtration chromatography and by ultrafiltration, both methods showed poor yield of 1.09% and 1.29% respectively. All fractions obtained by chromatography showed activity of phospholipases A, while the fraction Cx G50FIII decreased cell viability of C6 line below 20% at the same concentration as the crude extract.

Meanwhile two of the four fractions (Mp5 and Mp10) obtained by ultrafiltration presented activity in the assay of phospholipases A and cytotoxicity against *Artemia salina* exhibiting median lethal doses of 351 and 472 micrograms per milliliter respectively. Additionally these two fractions decreased cell viability of C6 line below 50% and showed apparent structural changes in both lines.

Keywords: *Cassiopeia xamachana*, cytotoxicity, murine glioma, biological activity, jellyfish.

En memoria de...

Los tres hombres que directa o indirectamente cimentaron los pilares sobre los que yacen mis valores y que concluyeron su vida durante el desarrollo de este trabajo.



Ivar Maravilla

22 de enero · Querétaro · 🌐

Y así de repente, en menos de lo que se acaban de caer las hojas de los árboles, las dos personas más influyentes en mi vida, llegan al final de su camino. Mi tío Mario y mi abuelo Leopoldo derribaron barreras culturales, económicas y religiosas para dejar un legado de prosperidad y emoción por la vida en quienes tuvimos el privilegio de conocerlos. Me enseñaron que no es necesario creer en dioses para llegar positivamente a la mente y al corazón de las personas, porque aunque nuestras acciones reflejan nuestra naturaleza individual, siempre debemos de actuar con humildad, nobleza y generosidad de la mano de la ética y el razonamiento.

Mi tío y mi abuelo han dejado de vivir, y es así de sencillo. No se van a un nuevo lugar en las nubes, ni toman formas que salen de los cuerpos, simplemente terminaron de disfrutar el camino de su viaje. Por supuesto que es triste, pero la muerte no es otra cosa que el proceso más natural que tiene la vida. Ambos se van en días con atípicas lloviznas en temporada seca, porque "lo que podemos hacer cuando la lluvia cae, es dejarla caer". Y así como las semillas emergen después de que la tierra se humedece, ahora me toca a mí triunfar con su legado.

Ahora es nuestro turno...

Agradecimientos

A mis padres y hermano, por apoyarme. A las familias Chávez, Ulloa y Ortiz por estar siempre al pendiente. A la familia Hernández-Villanueva por la hospitalidad y cariño durante mis tres estancias en el D.F.

A la Dra. Judith Sánchez Rodríguez directora de esta tesis, por haberme brindado la oportunidad de trabajar con ella, transmitirme gran parte de sus conocimientos, por sus valiosos aportes, dedicación y confianza depositada en mí.

A los miembros del comité tutorial, Dra. Patricia Thomé Ortiz, Dr. Sergio Rodríguez Morales, Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros y al Dr. José Serafín Calderón Pardo, encargados de revisar y corregir este trabajo, quienes con sus valiosos conocimientos, enseñanzas y apreciables asesorías, mejoraron indudablemente el manuscrito.

Un agradecimiento especial al Capitán Amaury por colaborar en la captura de las medusas, la base de mi trabajo de tesis. A la técnica Laura Celis, quien me brindo conocimiento y apoyo en el laboratorio durante todo el desarrollo de la investigación. Así mismo agradezco al Dr. Abel Santamarina por prestarme las instalaciones de laboratorio de Aminoácidos Excitadores del Instituto nacional de Neurología y Neurociencia, para llevar a cabo una parte de la metodología, y al Dr. Edgar Rangel miembro de dicho laboratorio, por su infinito apoyo en la parte más fuerte de la elaboración de este trabajo.

A los miembros del laboratorio de Toxinología por acompañarme en este camino hacia la diabetes, por los tiempos compartidos y por las pláticas siempre bien intencionadas, así como su colaboración durante el desarrollo de la investigación.

Durante los proyectos de investigación, existen personas que sin estar ligadas a este te brindan apoyo incondicional, gracias a Wendo por sonsacarme cuando lo consideraba necesario y por soportar las peores de mis histerias. A Roberto Carmona por estar ahí para resolver mis múltiples dudas, ubicarme en mi realidad academia y por el soporte emocional.

Al Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM, por permitirme seguir con mi formación profesional y a todo el personal administrativo que durante este tiempo me brindaron gran apoyo.

Al CONACYT por el apoyo económico (556764), gracias a la cual fue posible financiar mi estancia durante el desarrollo de la presente investigación. Finalmente quiero agradecer al proyecto UNAM-PAPIIT IN202714 el cual financio dicho proyecto.

Índice de tablas

Tabla I. Clasificación de los tumores del SNC..	9
Tabla II. Distribución de tumores del tejido neuroepitelial en el INNN (1964-2008).	10
Tabla III. Pesos y rendimientos obtenidos en los ensayos de cromatografía en gel permeable Sephadex G50 M.	22
Tabla IV. Porcentaje promedio de mortalidad en <i>Artemia salina</i> por concentración de Ec a diferentes tiempos de exposición.	26
Tabla V. Pesos y rendimiento obtenidos de ultrafiltración.	29
Tabla VI. Porcentaje promedio de mortalidad en <i>Artemia salina</i> por concentración de proteína total, a diferentes tiempos para fracciones obtenidas por ultrafiltración.	31
Tabla VII. Rendimiento del proceso de purificación.	33
Tabla VIII. Efecto sobre la viabilidad celular en la línea de glioma C6 a las 24 y 48 horas de exposición.	38
Tabla IX. Ensayo de neurotoxicidad en <i>O. quadrata</i> de extracto crudo de <i>C. xamachana</i> .	A5
Tabla X. Ensayo de neurotoxicidad en <i>O. quadrata</i> de fracciones pre purificadas de <i>C. xamachana</i> ...	A6

Índice de figuras

Figura 1. Forma corporal de un pólipo y una medusa.	3
Figura 2. Estructura de un cnidocisto.....	4
Figura 3. Distribución de los tumores del SNC en el INNN (1964-2008).	8
Figura 4. Nematocistos de <i>Cassiopea xamachana</i>	21
Figura 5. Gel de acrilamida SDS-PAGE al 12% de extracto crudo I.	23
Figura 6. Gel de acrilamida SDS-PAGE al 12%. Fracciones de Sephadex G50 columna I y II.....	24
Figura 7. Gel de acrilamida SDS-PAGE al 12%. Fracciones de Sephadex G50 columna III	25
Figura 8. Actividad enzimática (Pz) de fosfolipasas del Ecl.	26
Figura 9. Actividad enzimática (Pz) de fosfolipasas de las fracciones de las columnas uno y dos de filtración en gel permeable.	27
Figura 10. Actividad enzimática (Pz) de fosfolipasas de las diferentes fracciones obtenidas por Sephadex G50 M en la tercera columna..	28
Figura 11. Gel de acrilamida SDS-PAGE al 12% de extracto crudo II.	30
Figura 12. Gel de acrilamida SDS-PAGE al 12%. Fracciones de ultrafiltración.....	30
Figura 13. Actividad enzimática (Pz) de fosfolipasas de las diferentes fracciones obtenidas por ultrafiltración..	32
Figura 14. Morfología de ambas líneas celulares de glioma antes y después de ser expuestas a tratamiento.	34
Figura 15. Respuesta de la línea celular de glioma de rata C6 ante diferentes extractos.	36
Figura 16. Respuesta de la línea celular de glioma de rata RG2 ante diferentes extractos.....	37
Figura 17. Comparación de espectro de MALDI-TOF de las fracciones Mp5 y Mp10.	39
Figura 18. Perfil de elusión de la columna 1 de filtración en gel Sephadex G50-M.	A4
Figura 19. Perfil de elusión de la columna 3 de filtración en gel Sephadex G50-M.	A4
Figura 20. Espectro de masas MALDI-TOF fracción Mp5.....	A7
Figura 20. Espectro de masas MALDI-TOF fracción Mp10.....	A8

1. Introducción

Desde hace más de 3 mil años se tiene conocimiento que distintas sociedades utilizaron diversas plantas terrestres para combatir sus afecciones (Fenical, 2006). Actualmente han habido cambios notorios en los campos de nutrición y medicina; frecuentemente se publican investigaciones relacionadas con nuevas alternativas para la cura de diversas enfermedades, donde se utilizan como base compuestos aislados de distintos organismos (Nishizawa, 2002). Las preparaciones obtenidas se han utilizado para tratar afecciones, inflamaciones, infecciones, dolores crónicos y cáncer. En contraste, las investigaciones equivalentes empleando compuestos activos aislados de organismo marinos fueron escasamente consideradas hasta tiempos recientes (Fenical, 2006). Entre los siglos XVII y XIX hubieron importantes avances en la exploración de la vida marina, tiempo después se inició la investigación en torno a las toxinas de organismos de este medio; no obstante fue hasta mediados de los años 60 del siglo XX cuando pequeños grupos de investigadores empezaron la extracción e identificación de compuestos orgánicos con potencial farmacológico a partir de organismos marinos (Fenical, 2006). En el medio marino se encuentra una amplia variedad de productos bioactivos, cuya estructura química no tiene equivalente en organismos terrestres (Fenical, 2006; Sarfaraj *et al.*, 2012). Las condiciones físicas, químicas y biológicas dominantes en los ecosistemas marinos generan que la mayoría de los organismos que viven en ellos presenten compuestos orgánicos con características únicas (Sarfaraj *et al.*, 2012).

A la fecha se ha descrito una amplia variedad de productos naturales de origen marino. Por ejemplo, un importante incremento se produjo en 2007, año en el que Blunt y colaboradores (2009), reportaron la caracterización de 961 compuestos nuevos, los cuales fueron aislados de diferentes grupos de organismos, incluyendo: fitoplancton, algas, cnidarios, esponjas, moluscos, briozoarios, equinodermos, tunicados y mangles. Este número representa un incremento del 24% por comparación con los compuestos aislados hasta 2006. Para 2011, se habían aislado cerca de 20,000 compuestos de origen marino, no obstante a muy pocos de ellos se les han encontrado aplicaciones industriales directas (Rocha *et al.*, 2011).

Actualmente diversos compuestos extraídos de organismos marinos se encuentran en etapa de ensayo clínico; se están probando como auxiliares para el tratamiento de enfermedades como VIH, procesos inflamatorios, úlceras, malaria, Alzheimer, asma, dolor en general, dolor neuropático, afecciones del sistema nervioso y tuberculosis entre otros (Fenical, 2006; Rocha *et al.*, 2011). Adicionalmente se han descrito compuestos con actividades antitrombótica y anticoagulante, sin embargo aún se encuentran en fase de prueba (Nosedá *et al.*, 1999, Shanmugam & Mody, 2000). Una de los mayores alicientes de los fármacos marinos es que algunos de ellos han demostrado un efecto anticancerígeno, mediante la actividad citotóxica contra diversos tipos de tumores (Rocha *et al.*, 2011; Sarfaraj *et al.*, 2012).

El número de sustancias obtenidas de los diferentes grupos taxonómicos es muy variable, el grupo con mayor número de nuevos productos naturales extraídos es el *phylum* Porífera seguido por los Cnidarios y diversos microorganismos (Blunt *et al.*, 2009; Rocha *et al.*, 2011). Hasta 2011 se habían

descrito aproximadamente 3,000 compuesto bioactivos aislados de diferentes organismos del *phylum* Cnidaria, de los cuales, dos terceras partes fueron descritos a lo largo de la primera década del siglo XXI, no obstante, poco se sabe de la clase Scyphozoa (Rocha *et al.*, 2011).

Las toxinas de *Cassiopea xamachana* han sido evaluadas previamente en ensayos de hemolisis, actividad electrofisiológica en ovocitos de *Xenopus laevis*, actividad anti protozoaria, anti fúngica, antibacteriana e inhibición de formación de tumores cerebrales inducidos por etil-nitrosourea, sin embargo no existen reportes en los que su actividad sea evaluada frente a celular tumorales (Radwan y Burnett, 2001, Radwan *et al.*, 2001, 2005, Torres *et al.*, 2001, Orduña-Novoa *et al.*, 2003, Morales-Landa *et al.*, 2007).

2. Antecedentes

2.1. Cnidarios

El *phylum* Cnidaria es un grupo de organismos mayoritariamente marinos y depredadores que presentan una organización sencilla y de una amplia diversidad morfológica. Los cnidarios habitan en una amplia gama de ambientes y latitudes, desde los trópicos hasta los polos y en todas las profundidades; sin embargo la mayoría de ellos se presentan cerca de los litorales (Meglitsch & Schram, 1991; Brusca & Brusca, 2005). Actualmente están descritas 11,300 especies que incluye medusas, anémonas, hidras, corales, plumas de mar e hidrozoarios, los cuales se agrupan taxonómicamente en cinco clases: Hydrozoa, Cubozoa, Scyphozoa, Anthozoa y Staurozoa (Daly *et al.*, 2007; Rocha *et al.*, 2011).

Estos organismos se caracterizan por presentar simetría radial o birradial y por la presencia de tentáculos. Dentro del filo existen dos tipos básicos de formas de vida, uno sésil llamado pólipo y otro libre conocido como medusa (Figura 1) (Ruppert & Barnes, 2003). Algunos cnidarios presentan sólo fase pólipo, otros sólo la medusoide, a estos se suman especies que presentan ambas formas durante su ciclo de vida (Brusca & Brusca, 2005). En la misma figura también se observa que presentan una pared corporal conformada por 3 capas: ectodermo (capa externa), endodermo (capa interna) y mesoglea (situada entre las otras dos capas y que es una matriz no celular) (Ruppert & Barnes, 2003; Frazão *et al.*, 2012).

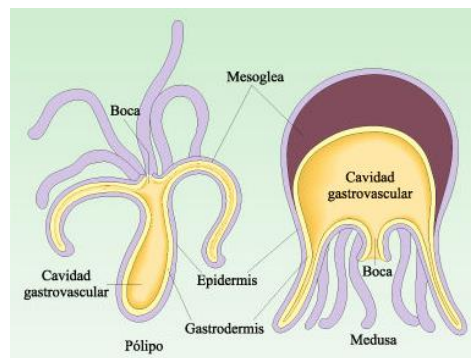


Figura 1. Forma corporal de un pólipo y una medusa. Modificada de: <http://www.cobach-elr.com/academias/quimicas/biologia/biologia/curtis/libro/c31e.htm>

De acuerdo a Méndez (2005) los organismos primitivos, como los cnidarios, poseen sistemas inmunes muy rudimentarios, esto ha ocasionado que su evolución este dirigida hacia la producción de sustancias químicas que les permitan hacer frente a las condiciones ecológicas de los nichos que habitan. Dentro de estas sustancias es posible encontrar compuestos citotóxicos, por lo que estos organismos pueden representar una buena fuente de nuevas sustancias antitumorales.

Este filo presenta una característica distintiva, la presencia de células urticantes denominadas cnidocistos o cnidoblastos (Fig. 2), se trata de células redondas u ovales que se encuentran distribuidas en la epidermis de los organismos y que son más abundantes en los tentáculos (Kass-Simon & Scappaticci, 2002; Brusca & Brusca, 2005). Dichas células están formadas por un núcleo basal y en uno de los extremos tiene una proyección similar a un flagelo, denominada cnidocilo, cuya función consiste en detectar estímulos táctiles provenientes del exterior (Ruppert & Barnes, 2003). El núcleo está formado por estructuras punzantes, organelos intracelulares estructuralmente más complejos y grandes que el cnidocilo que se cree son originados en el aparato de Golgi (Holstein & Tardent, 1984).



Figura 2. Estructura de un cnidocisto. Modificada de: <http://www.cobach-elr.com/academias/quimicas/biologia/biologia/curtis/libro/c31e.htm>

Los cnidocistos son organelos especializados cuyas funciones son la adhesión al sustrato, locomoción en el caso de las formas polipoide, así como capturar y matar a sus presas, digerirlas y defenderse de los depredadores y competidores (Kass-Simon & Scappaticci, 2002; Ozbek *et al.*, 2009). Según su estructura y función se clasifican en: a) nematocistos, encargados de inyectar toxinas a las presas, b) espirocistos, utilizados para adhesión (exclusivos de la clase Antozoo) y c) pticocistos, encargados de la protección (exclusivos de ceriántidos) (Frazão *et al.*, 2012).

Los nematocistos son los cnidocistos más comunes, se trata de cápsulas que guardan sustancias tóxicas a manera de filamento, las cuales pueden estar enrolladas con una serie de espinas en la base o bien espinas distribuidas a lo largo de todo el filamento. El cnidocisto presenta una amplia gama de compuestos orgánicos de los cuales han sido identificados alrededor de 250, la mayoría de ellos péptidos y proteínas que actúan como neurotoxinas, hemolisinas o citolisinas. Estas moléculas son las responsables de los efectos adversos en los depredadores o presas (Mariottini & Pane, 2010; Frazão *et al.*, 2012).

2.1.1. *Cassiopeia xamachana*

La especie *Cassiopea xamachana* (*C. xamachana*), se caracteriza por la presencia de lóbulos en la parte marginal de la umbrela y al igual que el resto de los organismos pertenecientes a la clase Scyphozoa, pasa la mayor parte de su ciclo de vida en la forma medusa, siendo en esta forma en la que se produce la fase sexual de su ciclo de vida (Mayer, 1910). Pese a que el orden al que pertenece

(Rhizomeae) incluye a las grandes medusas pelágicas (Mariottini & Pane, 2010), los organismos del género *Cassiopea* son nadadores deficientes y por lo general se encuentran en el fondo, por lo cual comúnmente son denominadas medusas invertidas (Mayer, 1910).

El género *Cassiopea* presenta cuatro pares de brazos orales y radiales, complejamente ramificados, que en la parte más próxima al disco tienen numerosas vesículas y accesos a la cavidad gastrovascular. Posen cuatro gónadas y cavidades subgenitales separadas entre sí. Todas las especies de este orden habitan en las aguas cálidas de los océanos y sus mayores abundancias se presentan en zonas tropicales. Pueden presentar coloraciones desde amarillas hasta azules (Mayer, 1910).

Particularmente, *C. xamachana* posee una umbrela en forma de disco, con un diámetro aproximado de 150 mm, dicho disco es plano con bordes redondeados. La cavidad bucal de *C. xamachana* se encuentra bien definida y su tamaño es de aproximadamente (caa.) 75 mm, la mitad del diámetro del disco. Tiene aproximadamente 16 órganos sensoriales, con una masa terminal de cristales endodérmicos y un ocelo aboral ectodérmico en forma de copa, con pigmentos marrón-rojizos (Mayer, 1910). Se diferencia de *Cassiopea frondosa* por la presencia de una depresión en la campana. La especie presenta tres tipos de nematocistos: unos ovoides de 12-15 µm denominados euriteles, birhopaloides tipo II también ovoides de entre 8 y 10 µm y otros redondos de 6-9 µm denominados holotricos (Goldberg & Taylor, 1997; Östman, 2000).

2.1.1.1. Clasificación taxonómica

Reino:	Animalia
Phylum:	Cnidaria
Clase:	Scyphozoa
Subclase:	Scyphomedusae
Orden:	Rhizomeae
Familia:	Cassiopeidae
Género:	<i>Cassiopea</i>
Especie:	<i>Cassiopea xamachana</i> (Bigelow, 1892)

2.1.1.2. Toxicología de *Cassiopea xamachana*

Los primeros en trabajar con proteínas aisladas de la especie fueron Blanquet y Phelan (1987) quienes aislaron la proteína responsable de la coloración azul presente en la parte acelular de la mesoglea de diversos organismos de *C. xamachana* de las costas de Florida. Identificaron el pigmento como una glicoproteína polimérica de peso molecular mayor a 10,000 kDa, compuesta por dos subunidades de 34 y 30 kDa.

Radwan y colaboradores (2001) determinaron la letalidad del extracto crudo de *C. xamachana* en ratones, encontrando que las dosis letal fue de 1.6 mg de proteína/kg de ratón. Adicionalmente reportaron actividad hemolítica en eritrocitos humanos y la presencia de fosfolipasas. Cuando purificaron el extracto crudo en una columna empacada con Sephadex G200, recuperaron

dos fracciones, que de forma separada no presentaron letalidad en dosis menores a 3 mg/kg, no obstante ambas mostraron presencia de fosfolipasas.

Radwan y Burnett (2001) probaron la letalidad y actividad hemolítica del extracto crudo de *C. xamachana* obtenido y de una fracción obtenida al remover los simbiontes mediante un escáner celular activado por fluorescencia. Encontraron que el veneno purificado mostró actividad hasta cinco veces superior que el extracto original. Los ejemplares de los dos últimos trabajos fueron recolectados en la Isla Harbour, en Bahamas y el tejido de los brazos se mantuvo a -70°C hasta su utilización.

Torres y colaboradores (2001) analizaron la actividad hemolítica del extracto crudo de *C. xamachana* del Caribe Mexicano, contra eritrocitos de humano y oveja mostrando una mayor toxicidad ante los eritrocitos humanos. Adicionalmente evaluaron la actividad electrofisiológica en ovocitos de *Xenopus laevis*, reportando que el extracto crudo de *C. xamachana* provoca tres respuestas diferentes en los ovocitos; incremento en la conductancia de la membrana, oscilación en la corriente iónica en la membrana y modificación de la velocidad de la corriente. Al purificar el veneno mediante HPLC encontraron dos fracciones responsables de la actividad hemolítica y una más responsable de la actividad electrofisiológica.

Radwan y colaboradores (2005), analizaron el efecto del extracto crudo y seis fracciones obtenidas mediante cromatografía en columna empacada con Sephadex G200. Se determinó la letalidad en ratones, la toxicidad en eritrocitos humanos y la presencia de fosfolipasas tanto para el extracto crudo como para las fracciones pre-fraccionadas. Se encontró que la actividad citotóxica y la presencia de fosfolipasas mostraron una relación proporcional y positiva con la letalidad observada en los ratones tratados.

Morales-Landa y colaboradores (2007), estudiaron la actividad biológica del extracto crudo de esta especie frente a siete cepas de bacterias (tres gram positivas y cuatro gram negativas), así como su actividad antiprotozoaria frente a *Giardia lamblia* (*Giardia duodenalis*). Determinaron que este extracto no mostro actividad antibacteriana en dosis menores a 10mg/mL, por su parte encontraron una LD₅₀ de 226 µg/mL para el ensayo de actividad antiprotozoaria.

Orduña-Novoa y colaboradores (2003), probaron la actividad antitumoral del extracto crudo de *C. xamachana*, frente al efecto causado por exposición a etil-nitrosourea (ENU), un agente conocido por desarrollar tumores en el sistema nervioso central. Cuando el ENU fue inyectado junto con el extracto crudo el desarrollo de tumores disminuyó en un 27%.

2.2. Cáncer

El término cáncer se usa genéricamente para referirse a un conjunto de enfermedades que pueden afectar cualquier parte del cuerpo, y están caracterizadas por la presencia de crecimientos celulares atípicos. Un tumor, también denominado neoplasia, es una masa de tejido que crece de forma anormal, dicha alteración en el ciclo celular se puede generar durante la fase de división celular o bien mediante la inhibición de la muerte celular. Cabe destacar que la presencia de un tumor no necesariamente implica un diagnóstico de cáncer; para que esto sea así, es necesario que la neoplasia

sea maligna, es decir, que tenga un elevado índice de proliferación y/o la capacidad de migrar en el organismo e implantarse y continuar su proliferación en nuevas áreas (metástasis) (Boyle & Levin, 2008, World health organization (WHO), 2014).

2.2.1. Ciclo celular y carcinogénesis

Se denomina ciclo celular al conjunto de procesos a través de los cuales las células se reproducen o proliferan. Durante el proceso del ciclo celular, la célula, al ser auto regulable, tiene la capacidad de quedarse estática, multiplicarse o bien autodestruirse mediante el proceso denominado apoptosis. Las señales para que esto ocurra pueden provenir del interior de la célula o del exterior de la misma (Reddy *et al.*, 2003, Quezada Ramírez, 2007, Hernandez Jaurez, 2009). El ciclo celular se encuentra dividido molecularmente en cuatro etapas; G1, S, G2 y Mitosis (Quezada Ramírez, 2007) o morfológicamente en dos etapas: interfase o fase de no división, que incluye las fases G1, S y G2, y finalmente, la mitosis o fase de división (Hernandez Jaurez, 2009).

Las fases G1 y G2 son intervalos en los cuales la célula lleva a cabo el crecimiento de su masa. La fase G1 se inicia con la síntesis de proteína y ARN, posteriormente en la fase S se lleva a cabo la replicación de ADN para heredar la carga genética a las células hijas, en tanto que en G2 se lleva a cabo la duplicación del material proteico y ARN para dejar a la célula preparada para iniciar el proceso de división celular durante la mitosis. En esta última fase el material genético formado durante la fase de síntesis se divide en dos células hijas. El flujo a lo largo de las cuatro etapas de ciclo celular se encuentra regulado por una red de interacciones proteicas altamente compleja y finamente regulada (Paniagua *et al.*, 2007; Quezada Ramírez, 2007).

La citología básica del cáncer involucra modificaciones en cualquiera de los puntos de control del ciclo celular, es entonces cuando una célula normal se transforma en una célula neoplásica. Una hipótesis plantea que los tumores se originan como resultado de una serie de mutaciones no reparadas en el ADN que en conjunto reducen la capacidad de las células de autorregular su replicación celular. En suma, estas modificaciones le confieren a la célula anormal la capacidad de multiplicarse indiscriminadamente e invadir tejidos sanos (Paniagua *et al.*, 2007; Quezada Ramírez, 2007).

De manera general, los diferentes tipos de tumores son tratados en la clínica principalmente mediante cirugías de resección y diferentes esquemas de radio y quimioterapias (Estanislao Gómez, 2010). Particularmente, más del 60 % de los compuestos usados como agentes anti neoplásicos provienen de moléculas pequeñas aisladas a partir de productos naturales (Nagle *et al.*, 2004, Menéndez 2005). En la mayoría de los casos estos agentes citotóxicos presentan una selectividad menor a la deseada hacia las células tumorales y ejercen su efecto también sobre el tejido sano del paciente, lo que origina una serie de efectos colaterales nocivos tanto para la salud integral como para la calidad de vida del paciente (Nagle *et al.*, 2004).

2.2.2. Tumores del Sistema Nervioso Central (SNC).

Dentro de los tumores del SNC destacan los tumores cerebrales que se encuentran entre las neoplasias más agresivas y con peores pronósticos. Pese a que estos tumores representan entre el 2 y 5% de todos los tipos de cáncer, presentan elevados índices de mortalidad al constituir la tercera causa de muerte en pacientes con cáncer. En el caso de los adultos, afectan predominantemente a varones de entre 60 y 65 años de edad. En niños y adolescentes, los tumores cerebrales primarios (aquellos de origen no metastásico) representan del 15 al 20% del total de tumores, siendo el segundo tipo de cáncer más frecuente solo después de las leucemias y el primer lugar en tumores sólidos. De los 24,000 casos nuevos/año, el 73% de los pacientes muere a causa de esta enfermedad (American Brain Tumor Association 2004, Clavo Varas *et al.* 2004, Wahl *et al.* 2004, Basmadjian *et al.* 2014, Grover *et al.* 2014).

Los principales criterios de clasificación de los tumores del SNC son: A) órganos donde se originan, ya sea tumores primarios para aquellos tumores que se originan directamente en tejidos del SNC o secundarios cuando se originan por metástasis, B) Localización en el SNC: intracraneales o extra craneales, C) de acuerdo al origen embrionario: endo, meso o ectodérmico y D) Histológicamente por el linaje de las células del SNC que dan origen al tumor cerebral de acuerdo a los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS), y diferenciados entre sí por el grado de malignidad en cuatro sub grupos. En la Tabla I se detallan los principales grupos de tumores del SNC y el grado de malignidad que pueden presentar los tumores dentro de ese grupo (American Brain Tumor Association, 2004; Clavo Varas *et al.*, 2004; Louis *et al.*, 2007; Rousseau *et al.*, 2008).

A nivel nacional, en 2002 se presentaron 1,426 nuevos casos de tumores del SNC, los cuales representaron el 1.32% de todas las neoplasias malignas. En el mismo año se reportaron 1,547 defunciones por esta causa (Tirado & Granados, 2007). De acuerdo a datos del Instituto Nacional de Neurología y Neurociencia (INNN) (Aguirre-Cruz *et al.*, 2011) de 1964 a 2008 se registraron 9,772 casos de pacientes con tumores cerebrales, de los cuales, el 33% estuvo representado por tumores del tejido neuroepitelial, grupo que incluye a los tumores gliales (Fig. 3).

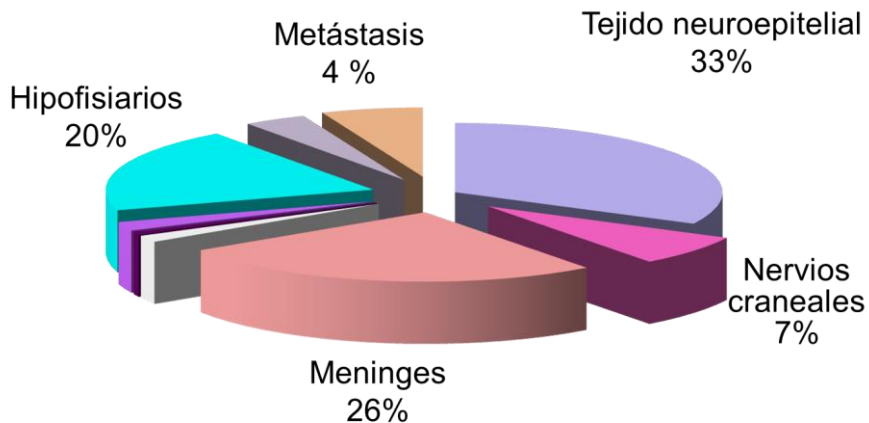


Figura 3. Distribución de los tumores del SNC en el INNN (1964-2008).

Tabla I. Clasificación de los tumores del SNC de acuerdo al tipo de células donde se originan y grado de malignidad del tumor (American Brain Tumor Association, 2004; Clavo Varas *et al.*, 2004; Louis *et al.*, 2007).

Nombre del grupo de tumores	Grados
Astrocíticos	I-IV
Oligodendrogiales	II y III
Gliomas mixtos	II y III
Ependimarios	I – III
Tumores de plexos coroideos	I – III
Otros tumores neuroepidemiales	I y II
Tumores neuronales y neuronales-gliales mixtos	I-III
Tumores del parénquima pineal.	I – IV
Tumores embrionarios	IV
Tumores de los nervios craneales y espinales	I – IV
Tumores de las meninges	I –III
Tumores de la región selar	I

Dentro de los tumores del tejido neuroepitelial, las neoplasias de mayor frecuencia fueron los tumores Astrocíticos (Tabla II), los cuales representaron el 69%. Entre los Astrocitomas, el tumor más frecuente fue el astrocitoma grado IV o glioblastoma multiforme (GBM), el cual posee el grado de malignidad más avanzado ya que tiene un elevado índice de proliferación, propicia la formación de nuevos vasos sanguíneos para poder mantener su rápido crecimiento, es altamente resistente al tratamiento de radio y quimioterapia convencional, es capaz de afectar el tejido cerebral normal circundante y su pronóstico es muy desfavorable ya que la sobrevida media es de 6 meses sin tratamiento y de 14 meses cuando es atendida con el tratamiento convencional con temozolamida (TMZ) (American Brain Tumor Association, 2004; Aguirre-Cruz *et al.*, 2011).

Tabla II. Distribución de tumores del tejido neuroepitelial en el INNN (1964-2008).

Tipo de tumor	Número	%
Astrocíticos	2,177	69
Gliomas mixtos	343	11
Embrionarios	297	9
Ependimarios	136	4
Oligodendrogliales	99	3
Plexos coroides	62	2
Neurogliales	28	1
Neuroblásticos	17	0.5
Región Pineal	6	0.2
Otros	11	0.3
Total	3,176	100

La TMZ es uno de los fármacos más recientes recomendados para los tratamientos de quimioterapia ante diferentes tipos de gliomas. Este fármaco actúa metilando el ADN, principalmente en residuos de Guanina, previniendo la proliferación de las células tumorales (Stupp *et al.*, 2005; Hart *et al.*, 2008). Sin embargo, este medicamento tiene elevados costos, mismos que los pacientes tienen que afrontar en nuestro País, provoca importantes efectos secundarios afectando la calidad de vida del paciente y el pronóstico libre de progresión sigue siendo pobre (Aguirre-Cruz *et al.*, 2011).

2.2.3. Mecanismos de acción descritos para antitumorales de origen marino

Como una alternativa terapéutica a los fármacos antineoplásicos, a la fecha se han descrito diferentes compuestos naturales con actividad antimoral y se han propuesto algunos mecanismos de acción para compuestos aislados de organismos marinos (Nagle *et al.*, 2004):

- a) Inhibidores de angiogénesis
El crecimiento tumoral se inhibe bloqueando el factor de crecimiento endotelial vascular y la cascada de señales dependiente del mismo (Zheng *et al.*, 2011).
- b) Inductores de apoptosis

La mayoría de los péptidos anticancerígenos tiene como sitio de acción diferentes proteínas celulares responsables de inducir el proceso apoptosis por vías intra y extra celulares (Lin *et al.*, 2010).

c) Inhibidores de quinasas y fosfatasas implicadas en puntos de control del ciclo celular (Nagle *et al.*, 2004).

d) Inhibidores de la síntesis de ADN (Nagle *et al.*, 2004, Menéndez, 2005).

e) Inhibidores de la cadena de respiración mitocondrial

f) Inhibidores de la mitosis

Los compuestos inhiben la mitosis mediante la unión a la proteína tubulina en el huso mitótico y evitando la polimerización en los microtúbulos (Zheng *et al.*, 2011).

g) Inhibidores de la transducción de señales (Nagle *et al.*, 2004, Menéndez, 2005).

Adicionalmente se han descrito fármacos que si bien no actúan directamente sobre las células neoplásticas actúan en sinergia con fármacos ya aprobados haciendo reversible la resistencia que las células alteradas han desarrollado.

Actualmente ya se encuentran en el mercado dos fármacos con actividad antitumoral aislados de organismos marinos (Basmadjian *et al.*, 2014). El fármaco Yondelis[®], originalmente aislado del tunicado *Ecteinascidia turbinata*, es un agente antitumoral empleado en el tratamiento del sarcoma de tejidos blandos avanzado o metastásico, y de cáncer de ovario recurrente, platino-sensible en combinación con DOXIL[®] / Caelyx[®]. El sitio de acción de este fármaco es el surco menor del ADN de la célula tumoral (D'Incalci & Galmarini, 2010).

La Trabectedina es la sustancia activa del Yondelis[®], está compuesta por tres anillos tetrahydroisoquinolínicos. Posee un esqueleto pentacíclico de dos anillos unidos por un puente fusionados de tetrahydroisoquinolina (A y B), ligado a un puente de lactona a través de un enlace sulfuro bencílico, y unido a un sistema de anillos de tetrahydroisoquinolina (subunidad C). Las subunidades A y B se unen al surco menor de la cadena de ADN mediante un enlace covalente, provocando que este se doble hacia el surco mayor. Se ha propuesto que la subunidad C queda libre e interactúa con las proteínas XPG no permitiendo que el ADN afectado sea reparado y por lo tanto provoca la apoptosis de la célula (D'Incalci & Galmarini, 2010).

Por su parte Halaven[®] (Mesilato de eribulin) es un fármaco simplificado de la halicondrina B aislada originalmente de la esponja marina *Halichondria okadai*. Este medicamento está indicado para el tratamiento de cáncer de mama metastásico. Es un fármaco antimitótico que interactúa con la Tubulina del citoesqueleto deteniendo así el ciclo celular en la fase M, lo que eventualmente provoca la muerte celular (Nagle *et al.*, 2004).

3. Justificación

De acuerdo a la OMS, desde el 2008 el cáncer es la principal causa de muerte a nivel mundial y fue responsable del 13 % del total de decesos en ese año. Se prevé que esta enfermedad sea responsable de 13.1 millones de muertes para el año 2030 (World health organization (WHO) 2014). Según datos de la Organización Panamericana de Salud, durante 2010, el 12% del total de muertes fueron por causa de cáncer (Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud *et al.*, 2012). Para México la Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud (Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud, 2013) reporta que el cáncer es la tercera causa de muerte y cada año se registran 128,000 nuevos casos.

Los tumores cerebrales se encuentran entre las neoplasias más agresivas y con peores pronósticos. Pese a que estos tumores representan entre el 2 y 5% de todos los tipos de cáncer, presentan elevados índices de mortalidad al constituir la tercera causa de muerte en pacientes con cáncer. Particularmente, los gliomas se encuentran entre los tumores más frecuentes del tejido neuroepitelial, presentan varios grados de malignidad, frecuentemente desarrollan radio y quimioresistencia, tienen un alto índice de regeneración después de la cirugía, ocasionan importantes efectos secundarios que deterioran la calidad de vida y el pronóstico para los pacientes es muy pobre (Aguirre-Cruz *et al.* 2011).

Dado lo anterior, durante los últimos años se ha intensificado la búsqueda de compuestos que presenten una alta actividad antineoplásica y que causen efectos secundarios menos agresivos (Menéndez, 2005). Programas del Instituto Nacional del Cáncer (NCI) han señalado que los invertebrados marinos son una excelente alternativa para la obtención de fármacos, ya que los compuestos aislados de estos organismos marinos pueden tener una mayor actividad anticancerígena en comparación con aquellos obtenidos de origen terrestre (Rocha *et al.*, 2011).

El GBM es el tumor más agresivo del SNC con una media de supervivencia de un año. La quimioterapia convencional para su tratamiento es la TMZ. Sin embargo, este medicamento tiene un elevado costo, presenta efectos adversos en el paciente y la respuesta al tratamiento es menor al 5%. Anteriormente se ha reportado que el extracto total de *C. xamachana* favorece una disminución en el número y diversidad de tumores del SNC inducidos por ENU. Por tal razón, el presente estudio planteó determinar el efecto citotóxico de compuestos bioactivos provenientes de *C. xamachana*, sobre dos líneas de glioma de rata, C6 y RG2.

4. Hipótesis

El extracto crudo de *C. xamachana* posee proteínas bioactivas que pueden presentar propiedades antitumorales sobre dos líneas celulares de glioma murino.

5. Preguntas de investigación

- Las proteínas aisladas del veneno de *Cassiopea xamachana*, ¿tienen propiedades citotóxicas sobre las líneas C6 y RG2 de glioma de rata?
- ¿Qué efecto produce el extracto crudo de *Cassiopea xamachana* en células tumorales?

6. Objetivos

6.1. General

Evaluar el efecto citotóxico de algunos compuestos activos aislados de la medusa *Cassiopea xamachana* sobre dos líneas celulares de glioma de rata.

6.2. Objetivos específicos

- Obtener extractos acuosos activos de los brazos orales de *C. xamachana*.
- Determinar la actividad citotóxica del extracto crudo y los pre-purificados sobre líneas de células tumorales.
- Caracterizar químicamente el compuesto con mayor actividad citotóxica por métodos espectrofotométricos (HPLC y espectroscopia de masas).

7. Material y métodos

7.1. Obtención de organismos

Los organismos de *C. xamachana* fueron recolectados con ayuda de redes, durante agosto de 2013 y febrero de 2014 en Punta Nizuc, Cancún (21° 2' 5.05"N, 86°47'45.79"W). Los organismos, inmersos en agua del entorno en una cubeta de 20L, fueron transportados en una embarcación menor a las instalaciones de la Unidad Académicas de Sistemas Arrecifales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología en Puerto Morelos, Q. Roo. El traslado tuvo una duración aproximada de 50 minutos. Con la intención de disminuir el estrés por incremento en la temperatura del agua, se realizó un recambio de la misma a los 30 minutos de recorrido. Una vez en las instalaciones de la Unidad Académica, los ejemplares fueron colocados en un estanque con circulación continua de agua de mar y se mantuvieron ahí hasta su procesamiento.

7.2. Obtención de extracto crudo

7.2.1. Extracto crudo I (Ecl)

Los organismos se retiraron del estanque de dos en dos y se les dejó escurrir la mayor cantidad de agua posible, para disminuir el contenido de sales del extracto. Una vez libres de la mayor cantidad de agua, los organismos se pesaron (balanza OHAUS® modelo CS200) y los datos se registraron. Debido a que la mayor densidad de nematocistos se encuentra en los brazos orales (Higgins-III *et al.*, 2008), estos se separaron de la campana con ayuda de un bisturí, en tanto las campanas fueron desechadas posteriormente.

Los brazos se introdujeron en agua desionizada para inducir la descarga de los nematocistos por choque osmótico y adicionalmente se colocaron en agitación mecánica por dos horas para descargar la mayor cantidad de nematocistos. Posteriormente se separó el tejido (brazos) del sobrenadante; el sobrenadante se refrigeró a 4°C y el tejido se procesó de acuerdo al método modificado de Kem *et al.*, (1989) congelándolo a -20°C por dos horas. Pasado ese tiempo el tejido se colocó en el sobrenadante y se agitó por una hora más. Este proceso de congelación-agitación se realizó en tres ocasiones, durante los tres ciclos se realizaron micrografías para monitorear la descarga de los nematocistos. A la par se identificaron los tipos de nematocistos presentes en la muestra de acuerdo a Mariscal y Bigger (1976).

Una vez que los ciclos fueron completados, se colocó la mezcla en vasos de precipitado y se les agregó una pastilla de coctel de inhibición de proteasas (Complete Mini, Roche), por cada 800 mL de solución aproximadamente y se dejaron en reposo a 4°C por 16 horas. Posteriormente el tejido fue separado del sobrenadante, siendo esta la fase en la que se concentra el extracto crudo, con ciclos de centrifugado a 4,000 rpm a 4°C durante 15 minutos, el extracto crudo (sobrenadante) se mantuvo en refrigeración y el tejido se trató con ultrasonido (Sonicador Cole Palmer Modelo 08895-52) en 4 ciclos de 10 minutos y se volvió a separar mediante centrifugación (Iguchi *et al.*, 2008).

El extracto crudo fue almacenado en tubos cónicos para centrifuga de 50 mL y congelados a -60°C para su posterior liofilización (Freeze Drying modelo 77500, Labconco®) a una temperatura de -45°C para deshidratar por completo el extracto crudo.

7.2.2. Extracto crudo II (EclI)

La obtención del extracto crudo II se realizó de la misma manera que para el Ecl, pero el tejido una vez sonificado se sometió a un ciclo de centrifugado de una hora. Adicionalmente el sobrenadante se pre-filtró por una red con luz de malla de 100 μm antes de liofilizar el extracto con la finalidad de eliminar la mayor cantidad de tejido.

7.3. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se basó en el método de Bradford (1976), colocando 20 μL de solución con concentración de 50 mg/mL de los diferentes extractos con 1 mL de reactivo de Bradford (Bio-Rad®) y leyendo la absorbancia de la reacción a 595 nm en celdas de poliestireno (Sigma-Aldrich) en un espectrofotómetro (Turner® modelo Sp-830). Para cuantificar la absorbancia propia del colorante, así como del solvente en el que se diluyeron las muestras, se usó agua como blanco. Para desprestigiar la diferencia asociada a cada celda, la misma solución de colorante con agua se leyó en una segunda celda, misma que se usó para realizar las lecturas de los diferentes extractos. Cada muestra fue cuantificada por triplicado.

Para asociar la absorbancia registrada con una concentración de proteína se elaboró una curva patrón empleando estándares de γ globulina bovina (BGG) y albúmina de suero de bovino (BSA) de Bio-Rad®. Una vez que las absorbancias fueron convertidas a valores de concentración se calculó la media y desviación estándar de las tres lecturas.

7.4. Purificación del extracto crudo

7.4.1. Cromatografía de filtración en gel

Para la purificación del Ecl por cromatografía en gel permeable se pesaron 10 g de extracto liofilizado y se disolvieron en 60 mL de agua desionizada. Para facilitar el proceso de disolución, la solución se agitó con un vórtex por aproximadamente cinco minutos. Una vez disuelta, la mezcla se centrifugó (4,000 rpm, 10 min, 4°C). Para separar las fracciones, el sobrenadante se aplicó en una columna (5.0 cm de diámetro X 82.5 cm de alto, vol=1600 cm^3 cca.) empacada con Sephadex G-50M (Pharmacia Biotech®) equilibrada y eluida con ácido acético 0.3 M.

Las fracciones eluidas de la columna fueron separadas de acuerdo al perfil de elución obtenido mediante el software Primeview® y concentradas a presión reducida en un Rotavapor (Buchi®R-205) a 30 °C. Cuando las fracciones presentaron un gran cantidad de sales fueron dializadas mediante una membrana con porosidad de 3.5 kDa por 5 horas usando agua desionizada y agitación continua.

7.4.2. Tamizado molecular

El fraccionamiento del EclI se realizó mediante membranas de corte por peso molecular en ultrafiltración en una celda con agitación (Millipore®) de 200 mL de volumen, empleando nitrógeno gaseoso y membranas de 10, 5, 3 y 1 kDa. El tiempo y volumen de separación varió de acuerdo al tamaño de poro de la membrana procurando que el tiempo nunca fuera superior a los 20 minutos para evitar la exposición de las fracciones a altas temperaturas. Para evitar la oclusión de las membranas, el EclI se disolvió en 1.11 L de agua desionizada y se filtró mediante filtros de papel, microfibra de vidrio (Whatman®) y membrana de nylon (Millipore®) con una luz de malla de 11, 1.5 y 0.4 μm respectivamente. La solución filtrada se congeló en tubos falcón de aproximadamente 40 mL cada uno, y permaneció a -60°C hasta su tratamiento en la celda con agitación. El recuperado de cada membrana se liofilizó para su posterior utilización en las pruebas de bioactividad, así como para determinar el rendimiento del proceso.

7.5. Electroforesis en gel de acrilamida SDS-PAGE

Se realizaron ensayos de electroforesis en geles de acrilamida al 12 y 20 % con buffer de Tris-HCl pH 8.8 para evaluar el peso molecular de los componentes de los extractos crudos y de las fracciones pre-fraccionadas. Las muestras de los extractos se desnaturalizaron en buffer de carga (Laemli, 1970), en una dilución 2:1 por 4 min y se cargaron 15 μL de muestra por pozo. Adicionalmente se utilizaron 2 μL de estándares de proteínas (Precisión Plus Protein™ Kaleidoscope Standards™ y Precisión Plus Protein™ Dual Xtra Standards. Bio-Rad®). Los geles se corrieron a 200 V, se tiñeron usando Azul de Coomassie (BioRad®) por 60 minutos y fueron desteñidos con una solución de metanol (40%) y Ac. Acético (10%) en H_2O (50%).

7.6. Pruebas de actividad biológica

7.6.1. Letalidad en *Artemia salina*

7.6.1.1. Extracto crudo I

7.6.1.1.1. Obtención de organismos de *Artemia salina*

Se eclosionaron quistes de *Artemia salina* en un recipiente con aireación continua. Entre 24 y 48 h después de su eclosión, se separaron grupos de 20 ± 1 nauplios y se colocaron en una microplaca de 24 pozos con capacidad para 3.5 mL cada una. En cada pozo se colocaron 2.7 mL de agua de mar y 0.3 mL de solución de extracto, usando agua desionizada como control negativo.

7.6.1.1.2. Preparación de solución madre

Para la solución madre se pesaron 150 mg de extracto y se disolvieron en 3 mL de agua de mar filtrada. A partir de esta solución madre (50 mg/mL) se realizaron diluciones de 40, 32.5 y 25 mg/mL.

7.6.1.1.3. Bioensayo

A las 12, 24 y 36 horas se contabilizó el número de organismos inmóviles por más de 10 segundos, y se realizaron los cálculos para obtener la mortalidad respectiva a cada concentración de extracto. Una vez obtenida la mortalidad, se calculó la dosis letal mediante el software Probit de la EPA.

La mortalidad se calculó de la siguiente manera (Ali *et al*, 2011):

$$m = \frac{F}{n} \times 100$$

Dónde:

m= mortalidad

F= número de organismos inmóviles por más de 10 segundos

n= número total de organismos por pozo

7.6.1.2. Extracto crudo II y fracciones separadas mediante ultrafiltración.

7.6.1.2.1. Obtención de organismos de *Artemia salina*

Se eclosionaron quistes de *Artemia salina* en un recipiente con aeración y luz por 24 horas, trascurrido este tiempo los organismos ya eclosionados se recolectaron y concentraron con ayuda de un tamiz con luz de malla de 100 micras y se llevaron a un recipiente de forma que la densidad fuera de 200 organismos/mL.

7.6.1.2.2. Preparación de solución madre

Para la solución madre se pesaron 50 mg de extracto y se disolvieron en 0.5 mL de agua de mar filtrada, a partir de esta solución se hicieron disoluciones seriadas para obtener concentraciones de 10, 1.0 y 0.1 mg/mL. Como control negativo se utilizó agua de mar filtrada y como control positivo metanol al 100%.

7.6.1.2.3. Bioensayo

El ensayo se realizó en micro placas de 96 pozos de fondo plano, a cada pozo se agregaron 100 µL de solución de extracto, 100 µL de agua de mar y 100 µL de solución de nauplios de *A. salina*. La microplaca se incubo por 48 horas, con luz artificial a una temperatura de 26°C con agitación constante. A las 24 y 48 horas se contabilizo el número de organismos inmóviles. Concluido el conteo de las 48 horas, se agregó metanol al 100% a todos los pozos para confirmar el número de organismos por pozo y así determinan la mortalidad.

La mortalidad por pozo y la dosis letal se obtuvo de la misma forma que para el bioensayo con el Ecl.

7.6.2. Análisis de fosfolipasas

La actividad de las fosfolipasas (PLA) se determinó midiendo el halo de actividad del extracto crudo y extractos pre-purificados de *C. xamachana* en medios de cultivo de agarosa con modificaciones al método de Habermann y Hardt (1972) y Schumacher y colaboradores (1992). La actividad enzimática (Pz) se obtuvo al dividir el diámetro del pozo entre el diámetro del halo de acuerdo a la metodología descrita por Price y colaboradores (1982).

7.6.2.1. Preparación de los geles

Se disolvieron 0.3 g de agarosa en 50 mL de Tris-HCl al 50 mM a pH de 7.95 empleando baño María o microondas para calentar la solución. Cuando la temperatura alcanzó los 50°-54° C se agregó 0.5 mL de una solución de yema de huevo en solución fisiológica al 25% y 0.5 mL de CaCl₂ 10 mM. El volumen total se separó en tres cajas Petri, usando cca. 15 mL en cada caja.

Una vez solidificado el gel se hicieron pozos de 5 mm de diámetro con ayuda del extremo posterior de una pipeta Pasteur estéril y se agregaron 20 µL de los extractos a diferentes concentraciones. Adicionalmente, se empleó agua desionizada como control negativo en todos los ensayos y veneno de abeja como control positivo en el ensayo con las fracciones pre-fraccionadas. Los halos de actividad se midieron a la 1, 2, 3, 4 y 6 h. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

7.6.2.2. Preparación de las soluciones

Para el ensayo del Ecl, se pesaron 75mg de extracto y se disolvieron en 250 µL de H₂O para una solución madre con concentración final de 300 mg/mL, a partir de esta solución se prepararon dos diluciones más en proporciones 2:1 y 1:2 de la solución madre: H₂O para llevar a concentraciones finales de 200 y 100 mg/mL.

En el caso de las fracciones pre-fraccionadas por cromatografía en gel permeable se pesaron 25 mg de cada fracción y se diluyeron en 250 µL de H₂O para preparar una concentración única de 100 mg/mL. Por su parte para las fracciones pre-fraccionadas mediante ultrafiltración en celdas con agitación se preparó una solución madre pesando 50 mg de cada fracción que fueron diluidos en 250 µL de H₂O para una concentración final de 200 mg/mL. A partir de dicha solución madre se realizaron 2 diluciones seriadas para obtener concentraciones de 100 mg/mL y 50 mg/mL respectivamente.

7.6.3. Citotoxicidad en líneas celulares de glioma de rata

7.6.3.1. Preparación de los extractos.

Los extractos crudos y las fracciones pre-fraccionadas por columna de exclusión molecular y ultrafiltración se disolvieron en Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, MP BIOMEDICALS®) suplementado con 10 % de Suero Fetal Bovino (SFB) y penicilina–estreptomomicina al 1% (MP

BIOMEDICALS®), en una concentración inicial del 10 mg/mL. Los extractos fueron esterilizados por filtración con luz de malla de 0.20 µm.

7.6.3.2. Cultivos celulares.

Para evaluar la actividad antitumoral de los diferentes extractos y fracciones se trabajaron dos líneas celulares de glioma de rata obtenidas de la American Tissue Culture Collection (ATCC); C6 (ATCC® CCL-107™) y RG2 [D74] (ATCC® CRL-2433™). Las células fueron cultivadas en frascos para cultivo celular de 75 cm² de superficie con tapa ventilada, en condiciones estériles a 37°C, 1 atm de presión y 5% de CO₂ en medio DMEM suplementado con 10 % SFB y penicilina–estreptomicina al 1%.

7.6.3.3. Citotoxicidad de los extractos.

Para los ensayos de viabilidad celular, las células se despegaron de los frascos de cultivo agregando 500 µL de tripsina al 0.25 % (BD®), la cual se dejó actuar entre 5 y 10 minutos. Las células se recuperaron en un tubo de 15 mL y la tripsina se inactivó agregando 5 mL de DMEM + SFB, posteriormente los tubos se centrifugaron 10 minutos a 1500 rpm. Se eliminó el sobrenadante por decantación y se agregó un volumen conocido de medio completo para resuspender suavemente la pastilla celular. Cuando la suspensión celular se homogenizó completamente, se tomaron 10 µL de ésta y se colocaron en un hematocitómetro (Cámara de Neubauer) al que se agregaron 1 µL de azul tripano (0.001%) para diferenciar las células vivas de las muertas y realizar el conteo celular.

Se sembraron 6,000 células por pozo en microplacas de 96 pozos de media área (Corning No. Cat. 3696) con DMEM + SFB y antibiótico. Después de 24 horas de incubación, la confluencia celular era aproximadamente del 70% y el medio se retiró para ser remplazado con la solución de los extractos a diferentes concentraciones. Cada una de los extractos y concentraciones estudiadas fueron probados por triplicado. En cada una de las cajas se consideraron tres pozos con células a los cuales se les agregó medio fresco para ser tomados como control positivo de viabilidad. Para cada una de las líneas celulares se consideraron 24 y 48 horas de exposición a los extractos como los tiempos para determinar el efecto de los extractos sobre la viabilidad celular.

7.6.3.4. Evaluación de la viabilidad celular por el método de cristal violeta (CV)

Trascurrido el tiempo de exposición de las células con los extractos, el medio se retiró de los pozos y se lavaron dos veces con 100 µL de solución salina amortiguada con fosfatos (PBS). Las células adheridas a la microplaca se fijaron 15 minutos con 100 µL de paraformaldehído al 1%. Trascurrido este tiempo la solución fijadora se retiró por inversión y los pozos se lavaron dos veces con 100 µL de PBS. A cada pozo se agregaron 100 µL de CV (0.1%, Sigma-Aldrich®) y se dejó incubar por 30 minutos. Trascurrido este tiempo los pozos se lavaron nuevamente y el CV se extrajo con 100 µL de ácido acético al 10%. Las microplacas se agitaron para homogenizar el eluyente y la cantidad de colorante extraído se determinó registrando la absorbancia a 570 nm (Cytation3, Biotek). El 100 % de viabilidad se determinó obteniendo el promedio de la absorbancia leída de los tres pozos controles. Para determinar el efecto sobre la viabilidad celular de cada extracto sobre las células se

dividió el promedio de la absorbancia de las tres réplicas del extracto entre la absorbancia del control y se multiplicó por 100 para obtener el porcentaje de viabilidad (Chiba *et al.*, 1998).

7.7. Análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF

El análisis de la masa molecular de las fracciones de ultrafiltración que presentaron actividad frente a líneas celulares (Mp5 y Mp10) se realizó mediante un espectro Bruker Microflex de desorción/ionización láser asistida por matriz acoplado a un detector de tiempo de vuelo (MALDI-TOF por su siglas en inglés, láser de nitrógeno a $\lambda=337$ nm). Se disolvieron 100 μg en 5 μL de solución saturada de Ac. 4-hidroxi- α -cianocinámico ultrapuro. Se agregó 1 μL de la mezcla en una placa para MALDI, la cristalización se realizó a temperatura ambiente. El espectro se registró en modo lineal positivo en un intervalo de masas de 0 a 100,000 Da.

8. Resultados

8.1. Extracto crudo I

8.1.1. Obtención del extracto crudo, identificación de nematocistos y cuantificación de proteínas.

Se recolectaron un total de 17 organismos de *C. xamachana*, obteniendo un volumen final de 1.5 L de sobrenadante (extracto crudo) aproximadamente, a partir de 508.1 g de peso húmedo de los ejemplares. Durante la realización de las micrografías se encontraron dos tipos de nematocistos que se identificaron morfológicamente como holotricos isorrhizas por poseer una capsula redonda de aproximadamente 6-9 μm y euriteles capsula ovoide de aproximadamente 12-15 μm (Fig. 4 a y b respectivamente).

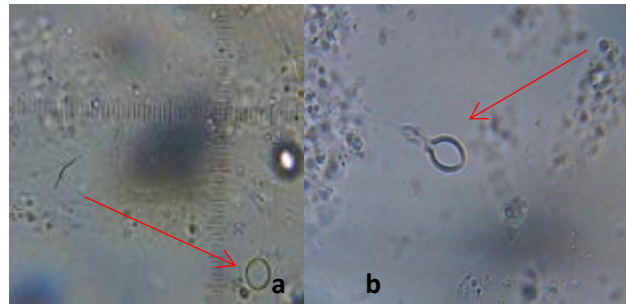


Figura 4. Nematocistos de *Cassiopea xamachana*. a) Nematocisto tipo holotricos isorrhizas (100x) y b) Nematocisto tipo euriteles (60x).

Se obtuvo un peso seco final de 29 g de extracto crudo lo que representa un rendimiento del 5.7 % con respecto al peso húmedo. La concentración de proteína calculada para este extracto fue de 626 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en relación al estándar de albúmina sérica bovina (BSA) y 704 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en relación al estándar de γ globulina bovina, esta concentración implica que entre el 1.25 o 1.4% (dependiendo el estándar utilizado) del peso seco del extracto crudo corresponde a proteínas.

8.1.2. Cromatografía en gel permeable (Sephadex G50 M).

Se realizaron un total de tres corridas, de las primeras dos cromatografías en Sephadex G50 M se obtuvieron siete fracciones respectivamente. Considerando que los cromatogramas eran muy similares (Fig. 18, Anexo 3), las fracciones de estas dos columnas se juntaron. Sin embargo, el cromatograma de la tercera columna fue diferente (Fig. 19, Anexo 3) y se separaron únicamente seis fracciones, por lo que esta columna se trabajó por separado.

Las fracciones 5 de las tres columnas, y la fracción 6 de las columnas 2 y 3 presentaron una gran cantidad de sal por lo que fueron dializadas, usando una membrana de diálisis de 3500 Da.

El peso seco, rendimiento, y la concentración de proteínas obtenido para cada fracción se muestran en la Tabla III; donde se observó que los pesos, rendimientos y concentración de proteína de la columna 3 difieren de las de las columnas 1 y 2.

Tabla III. Pesos y rendimientos obtenidos en los ensayos de cromatografía en gel permeable Sephadex G50 M.

Fracción	Columna	Peso fracción (g).	Rendimiento	Concentración de proteína determinada mediante método de Bradford (µg/mL)	
				BSA	BGG
Cx G50FI	1	0.2761	3%	1,460.50	1,822.50
	2	0.092	1%		
	3	0.0569	1%	1,835.00	2,243.50
Cx G50FII	1	0.1272	1%	2,368.50	2,843.00
	2	0.1631	2%		
	3	0.0959	1%	2,362.00	2,835.50
Cx G50FIII	1	0.0986	1%	2,466.50	2,953.00
	2	0.2538	3%		
	3	0.0723	1%	4,051.50	4,915.00
Cx G50FIV	1	1.8756	19%	373.00	455.00
	2	1.4167	14%		
	3	0.0368	0%	3,757.50	4,585.00
Cx G50FV	1	0.2761	3%	299.00	372.50
	2	0.0597	1%		
	3	0.3116	4%	138.00	191.50
Cx G50FVI	1	0.0075	0%	275.00	345.00
	2	0.0109	0%		
	3	0.0841	1%	46.50	88.50
Cx G50FVII	1	0.1643	2%	93.00	140.50
	2	0.0583	1%		
	3	NA	0%		
Rendimiento total	1	2.8254	28%	NA	NA
	2	2.0545	21%	NA	NA
	3	0.6576	9%	NA	NA

Las fracciones Cx G50FI, Cx G50FII y Cx G50FIII de las tres separaciones y la fracción Cx G50_3FIV de la tercera separación son extractos muy esponjosos y de baja solubilidad en agua, con altas concentraciones de proteína en comparación con el resto de las fracciones, estas últimas por el contrario, son polvos finos con alta solubilidad en agua. Las fracciones que presentaron baja solubilidad en agua también acidificaron el medio de cultivo al preparar la solución madre empleada para los ensayo de viabilidad celular.

8.1.3. Electroforesis en gel de acrilamida SDS-PAGE.

Para la electroforesis en gel de poliacrilamida del extracto crudo se colocó en el carril 1 el estándar de proteínas (2 μ l Precisión Plus Protein™ Dual Xtra Standars, BioRad), y en el carril 2 se cargaron 41 μ g de proteína de la muestra de Ecl. Se observan compuestos de alto, mediano y de bajo peso molecular (<10 kDa, Fig. 5).

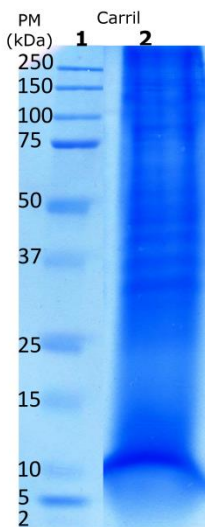


Figura 5. Gel de acrilamida SDS-PAGE al 12%. Carril uno estándares de proteínas Precisión Plus Protein™ Dual Xtra Standars, carril dos 41 μ g de proteína de Ecl.

En los geles de las fracciones pre-fraccionadas, es decir las fracciones obtenidas mediante la cromatografía de filtración en gel, no se detectó una clara separación por peso molecular de los componentes para ninguno de los casos, esto se evidencia en las figuras 6 y 7 en donde la mayoría de las fracciones presentan bandas de alto peso molecular. Para las fracciones de las primeras dos separaciones de Sephadex G50 M (Fig. 6) se observó que en la fracciones F4 y F5 (carriles 5 y 6

respectivamente) se marcan dos bandas por encima de los 100 kDa, pero no aparece la banda cercana a los 37 kDa que es la más notoria para las fracciones F1, F2, F3 y en el Ecl, no obstante esta aparente ausencia puede estar relacionada con la cantidad de proteína cargada para estas fracciones. Pese a que cada carril fue cargado con el mismo volumen de muestra, la diferencia en la concentración de proteína cargada en cada carril está asociada a la diferencia en la concentración de proteína propia de cada fracción (Tabla III).

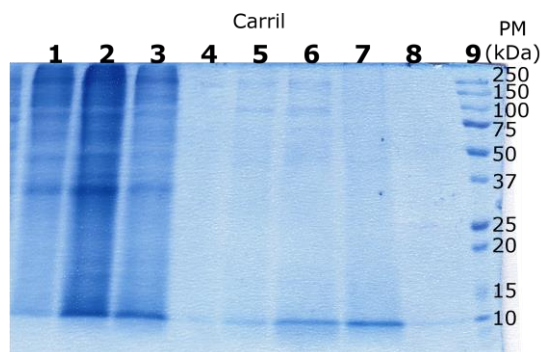


Figura 6. Gel de acrilamida SDS-PAGE al 12%. Fracciones de Sephadex G50. Carril 1.- 14.6 μg de proteína de la fracción F1, carril 2.- 23.6 μg de proteína de la fracción F2, Carril 3.- 24.6 μg de proteína de la fracción F3, carril 4.- vacío, carril 5.- 3.72 μg de proteína de la fracción F4, carril 6.- 2.99 μg de proteína de la fracción F5, carril 7.- 2.75 μg de proteína de la fracción F6, carril 8.- 0.93 μg de proteína de la fracción F7, carril 9.- estándares de peso molecular (Precisión Plus Protein™ Dual Xtra Standards).

En las fracciones de la tercera separación de Sephadex G50 M (Fig. 7), nuevamente las primeras tres fracciones (carril 2 a 4) muestran un patrón de bandas muy similares a las del Ecl. Sin embargo, en la fracción CxG50_3FIV (carril 6), a diferencia de la fracción obtenida de las separaciones uno y dos, si se aprecia la banda cercana a los 37 kDa que es evidente para las fracciones F1, F2, F3 y en el Ecl pero no aparece en la F4 de la primera separación. No obstante se aprecia un menor número de bandas por encima de los 25 kDa en comparación con las primeras fracciones. Al igual que en el gel anterior el volumen cargado en cada carril fue el mismo, sin embargo la concentración de proteína cargada estuvo determinada por la concentración de proteína *per se* del extracto (Tabla III).

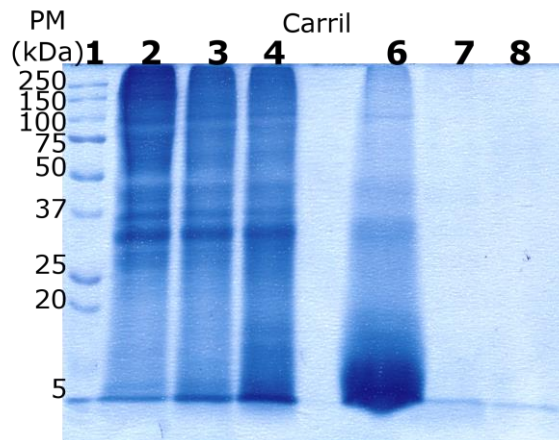


Figura 7. Gel de acrilamida SDS-PAGE al 12%. Fracciones de Sephadex G50; carril 1.- estándares de peso molecular (Precisión Plus Protein™ Dual Xtra Standars), carril 2.- 18.34 µg de proteína de la fracción F1 III, carril 3.- 23.61 µg de proteína de la fracción F2 III, carril 4.- 40.5 µg de proteína de la fracción F3 III, carril 6.- 37.57 µg de proteína la fracción F4 III, carril 7.- 1.38 µg de proteína de la fracción F5 III, carril 8.- .47 µg de proteína de la fracción F6 III.

8.1.4. *Letalidad en Artemia salina.*

Los resultados del ensayo con *Artemia salina* para el Ecl no son concluyentes, sin embargo se observa una tendencia dosis-dependiente entre el porcentaje de mortalidad y la concentración del extracto (Tabla IV), de igual forma la mortalidad siempre fue mayor en los cultivos con extracto crudo que en los cultivos empleados como controles negativos (Tabla IV). La LD₅₀ calculada con base a los resultados obtenidos a las 12 horas fue de 604.7 µg de proteína *mL⁻¹. El efecto del extracto crudo continuó aumentando mostrando su mayor efectividad a las 48 horas, sin embargo se empleó el tiempo de 12 horas para disminuir el error por tiempo de inanición. Los resultados de LD₅₀ deben ser interpretados con cautela ya que el número de diluciones empleadas es bajo y las concentraciones de estas son muy parecidas entre sí, de igual forma es importante recalcar que la concentración que se expresa en la LD₅₀ está formulada en concentración de proteínas determinada mediante el método de Bradford usando BSA como estándar.

Tabla IV. Porcentaje promedio de mortalidad en *Artemia salina* por concentración de Ec a diferentes tiempos de exposición.

Concentración (μg de proteína /mL)		12 horas	24 horas	48horas
BSA				
	H ₂ O	0.0 %	0.0 %	0.0 %
	313.0	16.9 %	18.6 %	25.4%
	406.9	11.6 %	14.9 %	19.9 %
	500.8	19.8 %	21.4 %	27.9 %
	626.0	18.6 %	20.3 %	55.7 %

8.1.5. *Análisis de actividad de fosfolipasa A (PLA).*

En la figura 8 se puede apreciar que desde las etapas iniciales constantemente se observó una relación entre la actividad de PLA y la concentración de proteína empleada del Ecl; considerando que en todos los casos la actividad en los grupos control siempre fue negativa.

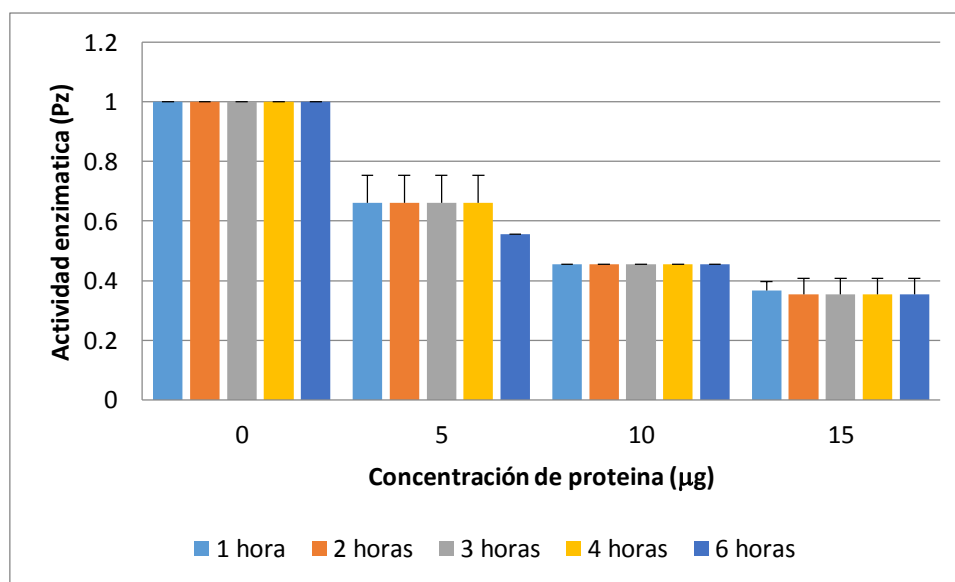


Figura 8. Actividad enzimática (Pz) de fosfolipasas del Ecl. Las gráficas muestran la media para las tres réplicas con su desviación estándar positiva. El eje de abscisas indica las concentraciones de proteína en μg basadas en la calibración con BSA y la fracción analizada, mientras que el color de las columnas representa el tiempo transcurrido en orden ascendente de izquierda a derecha. Finalmente, el eje de las ordenadas indica la actividad enzimática observada, siendo 1 el valor asignado para la menor actividad mientras que 0 representa la mayor actividad.

Todas las fracciones obtenidas de las primeras dos columnas de Sephadex G50 M mostraron actividad de PLA, siendo la FVII aquella que presentó la mayor actividad a la menor concentración de proteína (Fig. 9). Por el contrario, las primeras cuatro fracciones presentaron poca actividad pese a ser las fracciones con mayor concentración de proteína.

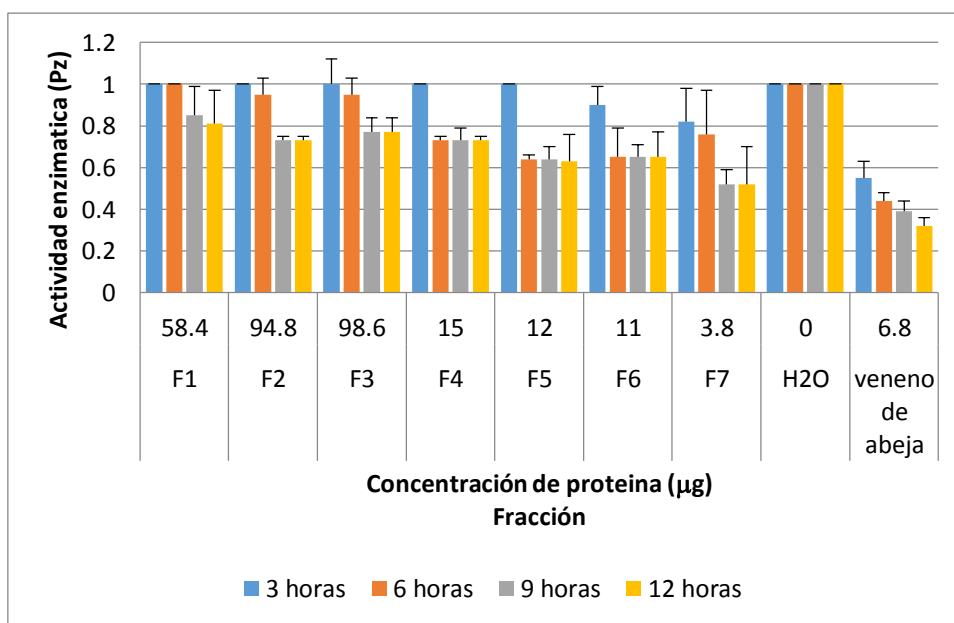


Figura 9. Actividad enzimática (Pz) de fosfolipasas de las fracciones de las columnas uno y dos de filtración en gel permeable. Las gráficas muestran la media para las tres réplicas con su desviación estándar positiva. El eje de abscisas indica las concentraciones de proteína en µg basadas en la calibración con BSA y la fracción analizada, mientras que el color de las columnas representa el tiempo transcurrido en orden ascendente de izquierda a derecha. Finalmente, el eje de las ordenadas indica la actividad enzimática observada, siendo 1 el valor asignado para la menor actividad mientras que 0 representa la mayor actividad.

De igual forma, todas las fracciones de la tercera separación de Sephadex G50 III mostraron actividad de PLA (Fig. 10). Sin embargo; no se observó una relación clara entre la concentración de proteínas y la actividad de PLA, siendo las fracciones *C. xamachana* G50_3FV y *C. xamachana* G50_3FVII aquellas en las que se presentó la mayor actividad y la menor concentración de proteína.

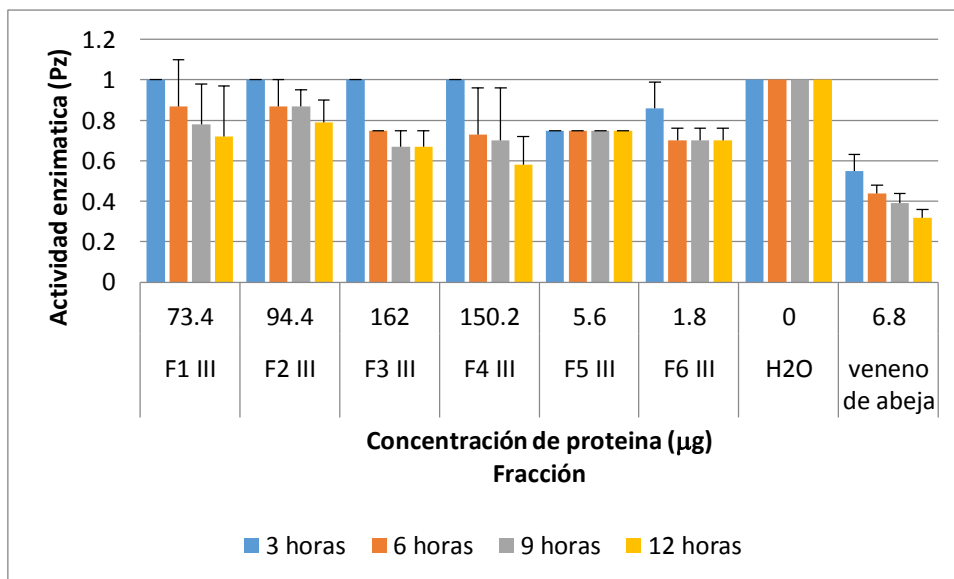


Figura 10. Actividad enzimática (Pz) de fosfolipasas de las diferentes fracciones obtenidas por Sephadex G50 M en la tercera columna. Las gráficas muestran la media para las tres réplicas con su desviación estándar positiva. El eje de abscisas indica las concentraciones de proteína en µg basadas en la calibración con BSA y la fracción analizada, mientras que el color de las columnas representa el tiempo transcurrido en orden ascendente de izquierda a derecha. Finalmente, el eje de las ordenadas indica la actividad enzimática observada, siendo 1 el valor asignado para la menor actividad mientras que 0 representa la mayor actividad.

8.1.6. Citotoxicidad en líneas celulares de glioma de rata.

Los resultados de citotoxicidad en líneas celulares de las fracciones pre-purificadas del Ecl se discutirán a la par de los resultados obtenidos con el EclI y sus fracciones pre-fraccionadas en la sección 8.3.

8.2. Extracto crudo II (EclI).

8.2.1. Obtención del extracto crudo y cuantificación de proteínas.

Para la obtención del segundo extracto crudo se emplearon 30 medusas con diámetro de campana entre 10 cm y 13 cm, lo que represento un peso húmedo total aproximado de 945.9 g, de los cuales 420 g correspondían al peso húmedo de los brazos. Después de los ciclos de centrifugado se obtuvo un volumen final de 4 L de sobrenadante, a partir del cual se obtuvieron 55.5g de EclI, lo que representa un rendimiento del 13.22 % con respecto al peso húmedo de los brazos y del 5.86% con respecto al peso húmedo de los organismos completos.

El contenido de proteínas de este extracto fue de 841 µg/mL de proteína en relación al estándar de BSA y 946 µg/mL de proteína en relación al estándar de γ globulina bovina. Como resultado esta concentración de proteínas fue ligeramente mayor que la del EclI.

8.2.2. Separación mediante ultrafiltración.

A diferencia de algunas de las fracciones obtenidas mediante gel permeable, todas las fracciones de ultrafiltración presentaron una alta solubilidad en agua. Los rendimientos obtenidos para cada membrana se detallan en la Tabla V. Las fracciones *C. xamachana* Mp10 y *C. xamachana* Mp5 presentaron una coloración morada muy similar a las del EclI siendo el color más intenso en *C. xamachana* Mp10. Por su parte, la fracción *C. xamachana* Mp3 es de color blanco y el polvo es más fino que el de las dos fracciones anteriores.

Así mismo se determinó una mayor concentración de proteína en las fracciones *C. xamachana* Mp10 y *C. xamachana* Mp5 con respecto al extracto crudo. Por el contrario, en las fracciones *C. xamachana* Mp3 y *C. xamachana* Mp1 se determinó una menor concentración de proteína.

Tabla V. Pesos y rendimiento obtenidos de ultrafiltración.

Fracción	Peso de la fracción	Rendimiento	Concentración de proteína determinada mediante método de Bradford (µg/mL BSA)
CxMp ₃	0.3210	0.58%	459.00
Cx Mp ₅	1.1832	2.14%	4,041.00
CxMp ₁₀	10.6680	19.40%	5,820.00
Total r	12.1703	22.11%	NA

8.2.3. Electroforesis en gel de acrilamida SDS-PAGE.

Se colocó en el carril 1 el estándar de proteínas (2 µl Precisión Plus Protein™ Dual Xtra Standars, BioRad), en el carril 2 no se cargó muestra; en el carril 3 se colocaron 20 µg de proteína de la muestra de EclI. Nuevamente la concentración de proteína colocada en el carril difiere de la del resto de los geles por la concentración propia de proteína del extracto. Al igual que para el ECl se observan compuestos de alto, mediano y de bajo peso molecular (<10 kDa) (Fig.11), no obstante en dicho extracto (Fig.5) se identificó un mayor número de bandas entre los 150 kDa y 37 kDa que en el EclI. Por su parte, el EclI presenta una banda alrededor de los 12 kDa que se observó en el Ecl.

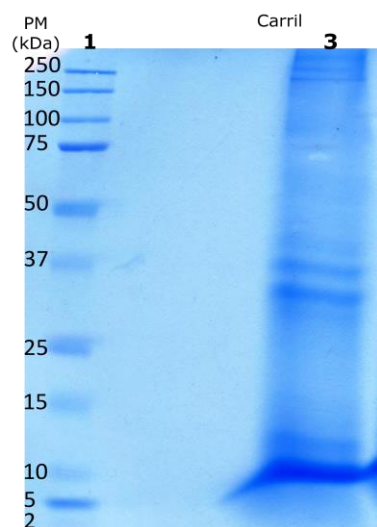


Figura 11. Gel de acrilamida SDS-PAGE al 12%. Carril uno estándares de proteínas Precisión Plus Protein™ Dual Xtra Standars, carril tres 20µg de proteína de EclI.

De forma similar, a las fracciones pre-fraccionadas por cromatografía del ECI (sección 8.1.3), las fracciones del EclI obtenidas mediante ultrafiltración presentan el mismo patrón de bandeo entre sí (Fig. 12) y con el EclI (Fig. 11).

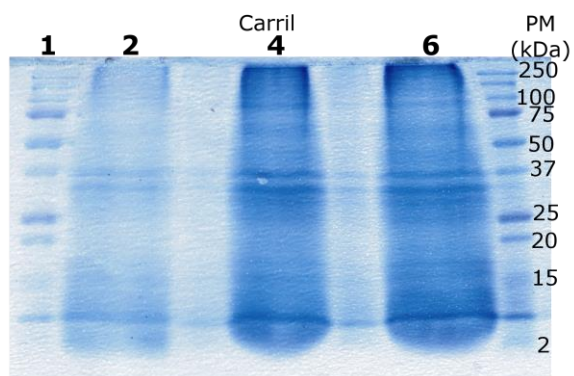


Figura 12. Gel de acrilamida SDS-PAGE al 12%. Fracciones de ultrafiltración; carril 1 y 7 estándares de proteínas Precisión Plus Protein™ Dual Xtra Standars, carril 2 4.59 µg de proteína de la fracción Mp3, carril 4 40.40 µg de proteína de la fracción Mp5, carril 6 58.19 µg de proteína de la fracción Mp10.

8.2.4. Letalidad en *Artemia salina*.

El ensayo de letalidad en *Artemia salina* para la fracción separada por ultrafiltración con membranas de corte de 3 y 1kDa, Mp3, no es activa a ninguna de las concentraciones empleadas. En la Tabla VI se indican las concentraciones empleadas para el bioensayo para las fracciones Cx Mp5 y Cx Mp10. En estas fracciones es posible observar cierta actividad a excepción de las dos concentraciones menores. Los datos de LD₅₀ obtenidos mediante Probit fueron de 351 µg de proteína*mL⁻¹ y 472 µg de proteína/mL respectivamente, usando BSA como estándar.

Tabla VI. Porcentaje promedio de mortalidad en *Artemia salina* por concentración de proteína total, a diferentes tiempos para fracciones obtenidas por ultrafiltración.

Concentración (µg de proteína /mL)		Porcentaje de mortalidad		
BSA		12 horas	24horas	48 horas
	H ₂ O	0%	0%	0%
	Metanol	100%	100%	100%
Mp5	2.69	0%	6%	8%
	26.94	2%	4%	7%
	269.4	4%	8%	22%
	2,694	88%	92%	98%
	3.88	2%	6%	6%
Mp10	38.8	4%	6%	9%
	388	0%	19%	22%
	3,880	95%	100%	100%

8.2.5. Análisis de actividad de fosfolipasa A (PLA)

En la fracción Cx Mp3 (con componentes de peso molecular entre 3kDa y 5kDa, Fig. 13Figura 13) no se observó actividad de PLA a ninguna de las concentraciones analizadas. Por su parte, las fracciones Cx Mp5 y Cx Mp10 presentaron una actividad dependiente de la concentración, siendo mayor la actividad de la fracción Cx Mp5 a menores concentraciones que la fracción Cx Mp10. Esto coincide con los resultados observados en la prueba de letalidad en *Artemia salina* en donde la fracción Mp5 también presenta una dosis letal más baja que la Mp10.

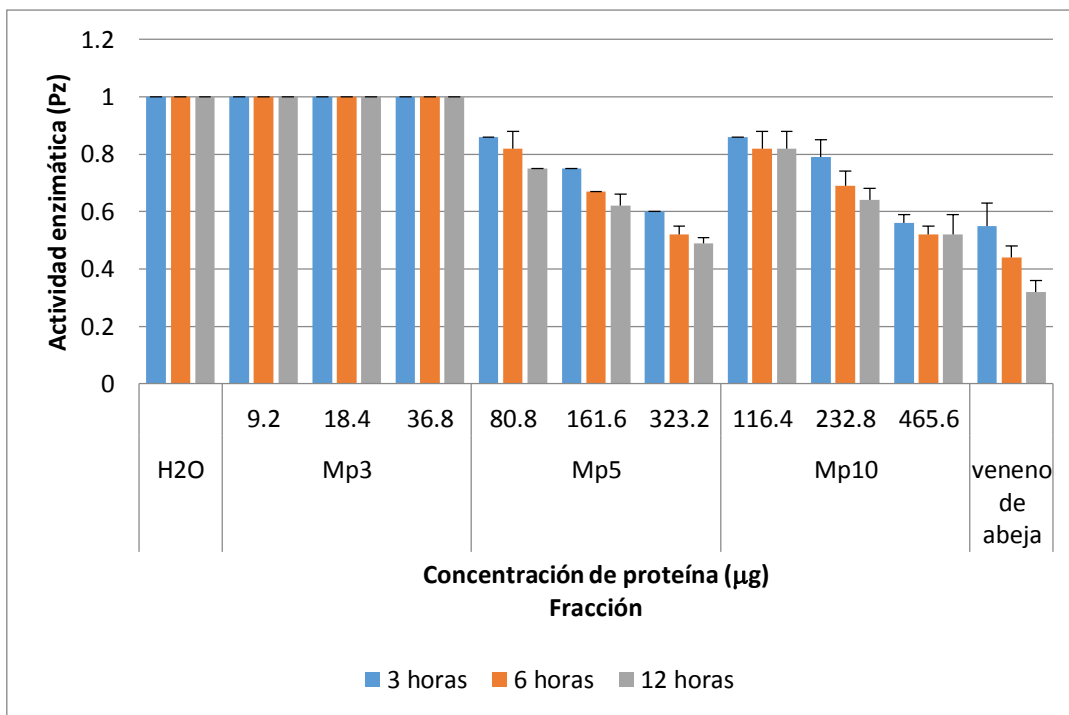


Figura 13. Actividad enzimática (Pz) de fosfolipasas de las diferentes fracciones obtenidas por ultrafiltración. Las gráficas muestran la media para las tres replicas con su desviación estándar positiva. El eje de abscisas indica las concentraciones de proteína en µg basadas en la calibración con BSA y la fracción analizada, el color de las columnas representa el tiempo transcurrido en orden ascendente de izquierda a derecha. Finalmente, el eje de las ordenadas representa la actividad enzimática observada, siendo 1 el valor asignado para la menor actividad mientras que 0 representa la mayor actividad.

8.2.6. Análisis de rendimiento

En la Tabla VII se muestra los rendimientos obtenidos de cada paso de purificación, los pesos de cada fracción obtenida por cada método se sumaron para cuantificar el rendimiento total por método. Se observa que de forma general los dos métodos empleados (tamizado molecular y ultrafiltración en célula de agitación) presentaron rendimientos similares, sin embargo como se mencionó anteriormente fue más fácil separar las fracciones con la actividad frente a líneas celulares de glioma de rata mediante el método de ultrafiltración.

Tabla VII. Rendimiento del proceso de purificación.

Paso	Extracto crudo I		Extracto crudo II	
	Total peso (g)	Rendimiento	Total peso (g)	Rendimiento
Peso húmedo organismo	508.00	100.00%	945.90	100.00%
Peso húmedo brazos	NA	NA	420.00	44.40%
Extracto crudo	29.00	5.71%	55.50	5.87%
Total Fracciones pre-purificadas	5.54	1.09%	12.17	1.29%

8.3. Citotoxicidad en líneas celulares de glioma de rata

Al someter ambas líneas celulares al tratamiento con los diferentes extractos fraccionados se observó que los pozos tratados con DMEM + SFB fresco (Grupo Control), presentaron una densidad celular homogénea a las 24 y 48 horas, mostrando su morfología típica. Por el contrario, cuando ambas líneas celulares fueron sometidas al tratamiento con ciertos extractos y dosis, se apreciaron cambios morfológicos y del patrón de crecimiento y densidad celular con respecto al grupo control.

En la figura 14 B se observa como las células de glioma RG2 adquirieron formas redondeadas, multi-nucleadas y presentaron citoplasma con varias vacuolas por célula, perdiendo la morfología típica de la línea celular, la cual se caracteriza por membranas refringentes, con bordes poliangulares, citoplasmas claros y núcleos contrastados (Fig.14 A). Por su parte, las células de glioma C6 expuestas ante la fracción Cx Mp5 adquirieron una forma celular más redondeada y disminuyeron su tamaño con respecto a las células de glioma C6 que no fueron expuestas a ningún tratamiento (Fig. 14 D y C respectivamente). Adicionalmente, algunas las células tratadas con los extractos presentaron alteraciones en el patrón de densidad celular, presentando grandes espacios vacíos en los pozos, con varias células agrupadas de manera irregular en los pozos. Estos efectos fueron más evidentes en las células de la línea C6 en comparación con la línea RG2.

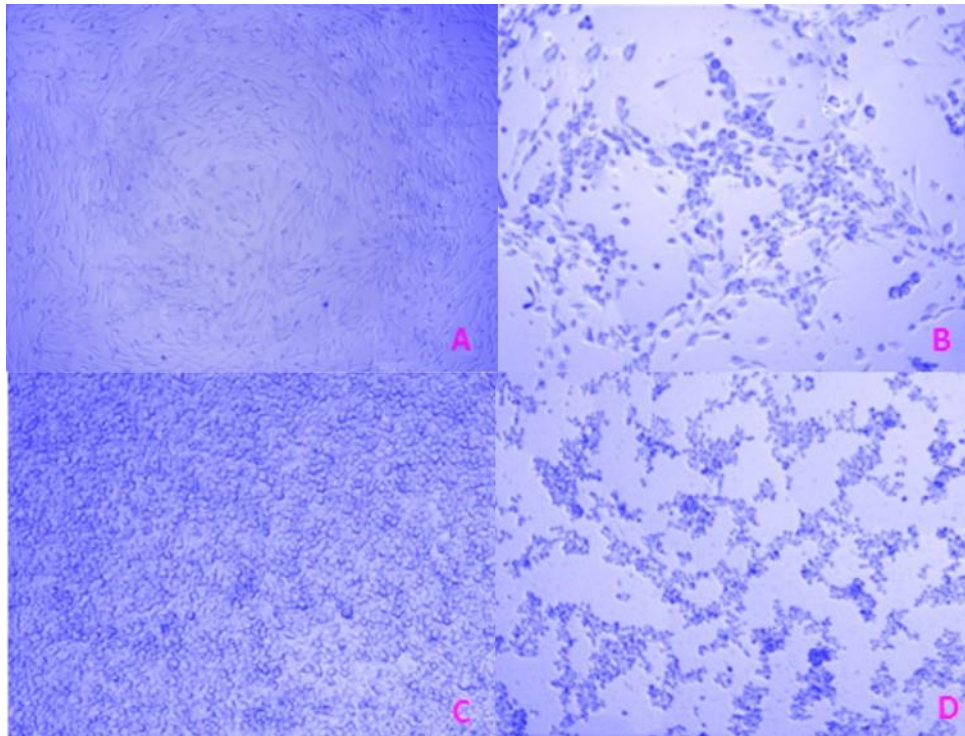


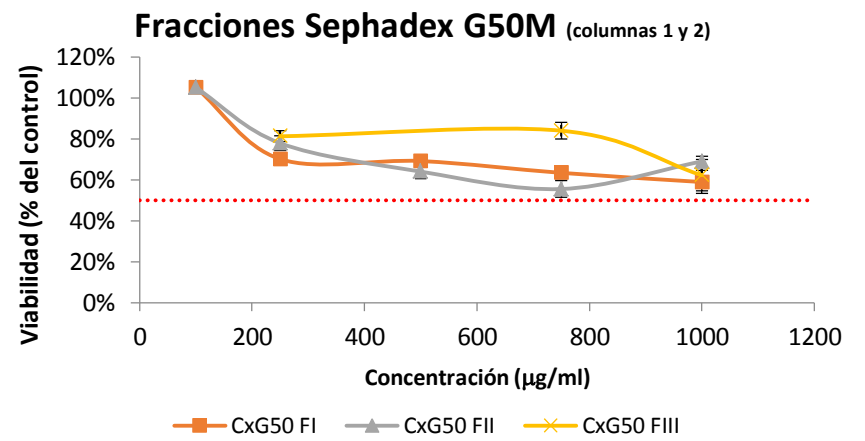
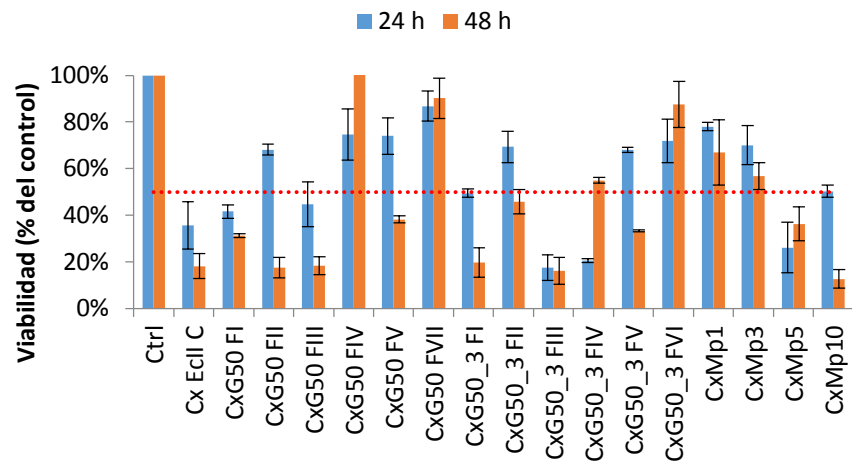
Figura 14. A) Células de glioma RG2 sin tratamiento. B) Células de glioma RG2 con 1000 µg/mL de la fracción pre-purificada Cx G50_3 FIV. C) Células de glioma C6 sin tratamiento. D) Células de glioma C6 con 1000 µg/mL de la fracción pre-purificada Cx Mp5.

Los resultados de viabilidad obtenidos mediante la estimación colorimétrica de CV también mostraron una respuesta diferencial entre las dos líneas celulares, determinando una menor cantidad del colorante extraído para el caso del glioma de rata C6. A pesar que los resultados de elución del CV de las células RG2 expuestas a los extractos reflejaron una disminución de la viabilidad de esta línea cercana al 30%, se observó una severa alteración en la morfología típica de estas células tratadas con los extractos.

El ensayo prospectivo con glioma C6 (Fig. 15 A) mostró que algunos extractos disminuyeron la viabilidad celular por debajo del 50%, a las 24 o 48 horas. Adicionalmente, se observó que cinco extractos disminuyeron la viabilidad por debajo del 50 % en los dos tiempos establecidos. Los extractos seleccionados para probar diferentes concentraciones se seleccionaron usando como criterio todos aquellos que habían disminuido la viabilidad por debajo del 50% tanto a las 24 como a las 48 horas, o aquellos que disminuyeron la viabilidad celular por debajo del 70% en algún tiempo. Los extractos seleccionados para el ensayo II se detallan en la Tabla VIII, estos extractos se analizaron nuevamente a concentraciones de 100, 250, 500, 750 y 1000 µg/mL, empleando 4 pozos por concentración y extracto.

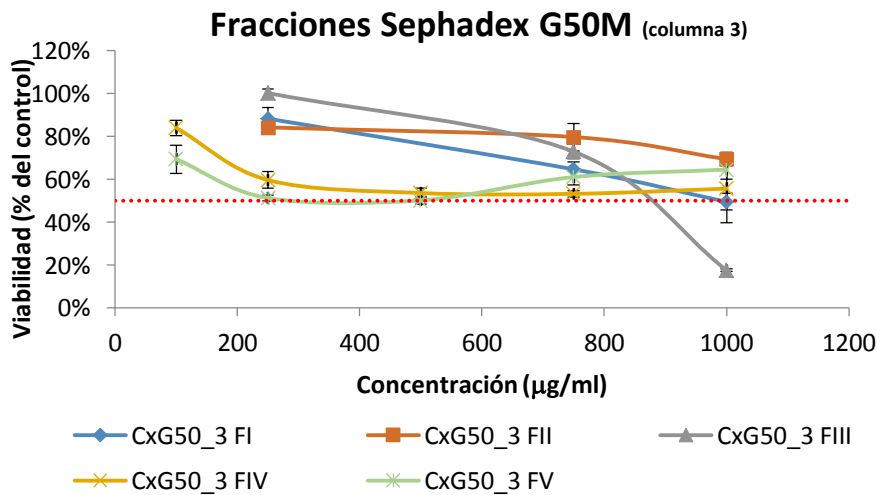
En la misma tabla (Tabla VIII) se puede observar que al probar los extractos a diferentes concentraciones (ensayo II) únicamente cuatro fracciones pre-fraccionadas disminuyeron la viabilidad a 50% o menos a concentraciones de 1000 µg/mL. Únicamente cinco fracciones pre-fraccionadas; Cx G50FI, Cx G50FIII (Fig 15 B, línea naranja y amarilla respectivamente), Cx G50_3FI, Cx G50_3FII y Cx G50_3FIII (Fig. 15C, líneas azul, naranja y gris respectivamente); mostraron una típica curva de respuesta dosis-dependiente y de estas dos fracciones, solo en la fracción Cx G50_3FIII se observaron valores por debajo del 50%. Las ocho fracciones restantes presentaron un repunte de la viabilidad celular en algún punto de la curva (Figura 15 B, C y D).

En relación con la línea RG2, los extractos usados a diferentes concentraciones fueron los mismos empleados para el glioma C6, sin embargo esta línea celular mostró menos sensibilidad al extracto crudo y a las fracciones pre-fraccionadas de *C. xamachana* . En ninguna de las concentraciones estudiadas se observó una disminución de la viabilidad mayor al 50% (Fig. 16).

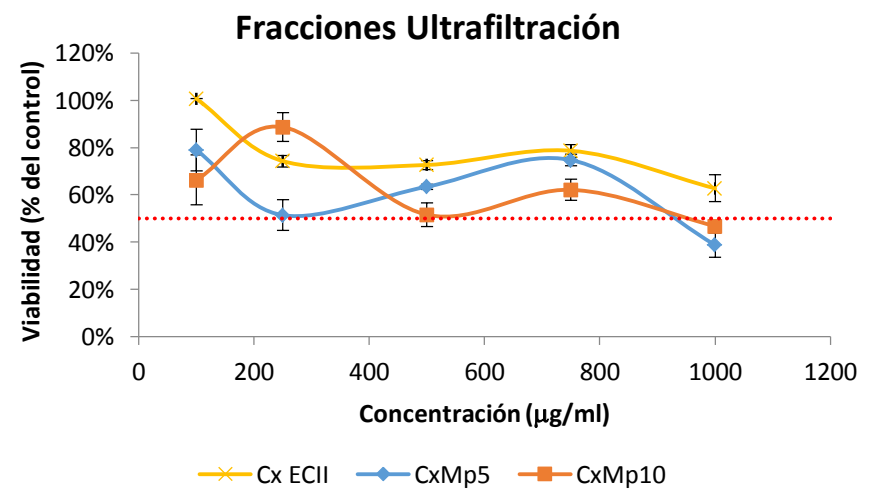


A

B

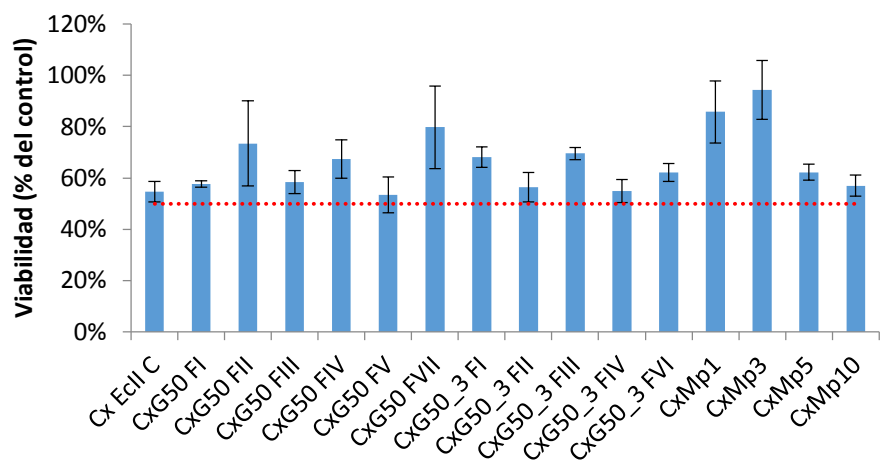


C

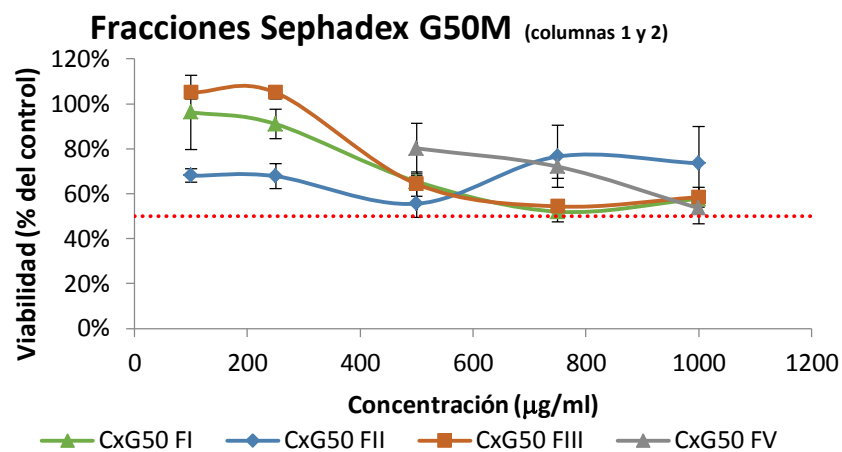


D

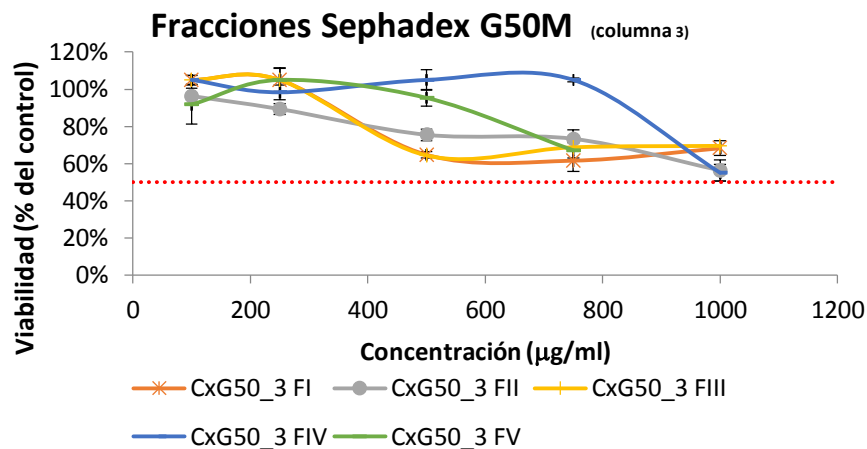
Figura 15. Respuesta de la línea celular de glioma de rata C6 ante diferentes extractos pre-purificados de *C. xamachana* evaluada mediante CV (570 nm), se muestran las medias y errores estándares de al menos tres valores A) Análisis inicial de los extractos ante C6 en una concentración de 1,000 µg/mL mostrando en color azul, el efecto a las 24 horas y en color rojo el efecto observado a las 48 horas. B) Comparación dosis-respuesta del extracto crudo y las fracciones pre-fraccionadas obtenidas de las dos primeras columnas de Sephadex G50M C) Comparación dosis-respuesta de las fracciones pre-fraccionadas obtenidas de la tercer columna de Sephadex G50M D) Comparación dosis-respuesta de las fracciones pre-purificadas mediante ultrafiltración.



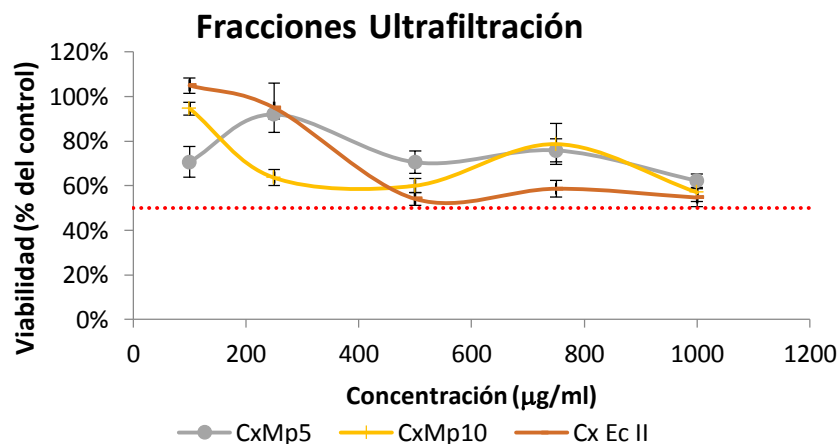
A



B



C



D

Figura 16. Respuesta de la línea celular de glioma de rata RG2 ante diferentes extractos pre-purificados de *C. xamachana* evaluada mediante CV (570nm), se muestran las medias y errores estándar de al menos tres valores A) Análisis inicial de los extractos ante RG2 en una concentración de 1,000 µg/mL. B) Comparación dosis-respuesta de las fracciones pre-fraccionadas obtenidas de las dos primeras columnas de Sephadex G50M C) Comparación dosis-respuesta de las fracciones pre-fraccionadas obtenidas de la tercer columna de Sephadex G50M D) Comparación dosis-respuesta del extracto crudo II y las fracciones pre-fraccionadas mediante ultrafiltración.

Tabla VIII. Efecto sobre la viabilidad celular en la línea de glioma C6 a las 24 y 48 horas de exposición.

Extracto	Método de pre-purificación	Efecto sobre la viabilidad \leq al 50% (1000 $\mu\text{g/mL}$).		
		Análisis preliminar a 24 h	Análisis preliminar a 48 h	Ensayo II
EclI	N/A	✓	✓	✗
Cx G50FI	Cromatografía de tamizado molecular (columna 1 y 2)	✓	✓	✗
Cx G50FII		✗	✓	✗
Cx G50FIII		✓	✓	✗
Cx G50_3FI		✓	✓	✓
Cx G50_3FII	Cromatografía de tamizado molecular (columna 3)	✓	✗	✗
Cx G50_3FIII		✓	✓	✓
Cx G50_3FIV		✓	✗	✗
Cx G50_3FV		✗	✓	✗
Cx Mp5	Tamizado molecular por filtración en gel	✓	✓	✓
Cx Mp10		✓	✓	✓

8.4. Espectrometría de masas

El análisis de la fracciones por MALDI-TOF, arrojó un total de 40,939 y 41,708 señales para las fracciones de Mp5 y Mp 10 respectivamente. Ambas fracciones mostraron señal hasta un m/z cercano a los 48,000 (ANEXO 6), no obstante en ninguno de los casos se observó una intensidad relativa mayor al 10% con m/z mayor a 18,000. En la figura 17 se muestran los espectros de ambas fracciones, por fines comparativos el espectro de la fracción Mp10 se graficó con intensidades inversas. Se observa que si bien los espectros son diferentes, presentan formas similares cuando menos en las masas dominantes entre los 7.5 y 18 kDa, sin embargo el espectro de la fracción Mp10 muestra algunas señales de alta intensidad entre los 3.5 y 5kDa.

En el caso particular el espectro de Mp5 (Fig. 17, espectro azul) el grupo dominante de señales se localizan alrededor de las 16,800 m/z con intensidades relativas de 70 a 100 %, seguidos por compuestos de entre 8,000 y 8,400 m/z con intensidades relativas entre 50 y 75% y un último grupo de aproximadamente 11,500 m/z con intensidades relativas cercanas al 50%.

Por su parte el espectro de la fracción Mp10 (Fig.17, espectro verde) posee cinco grupos de compuestos con intensidades relativas cercanas o mayores al 50%, a diferencia de la fracción Mp5, el grupo de compuestos de alrededor de 8,000 y 8,400 m/z es el mas dominante con intensidades relativas de 65-100%, el segundo grupo pose compuestos con m/z de alrededor de 4,150 e intensidades relativas de entre 50 y 85%. El grupo de compuestos de alrededor de 16,800 m/z, que en la fracción Mp5 es el mas dominante, en la fracción Mp10 es el tercer grupo en dominancia con intensidades relativas de entre 50 y 80%.

Adicionalmente se puede observar que pese a que la fracción Mp10 debería de tener mayoritariamente compuestos con pesos moleculares mayores a 10kDa presenta más compuestos de m/z bajos (entre 3,500 y 4,500) que la fracción Mp5, de igual forma el grupo de compuestos mas dominantes cae en el rango de pesos moleculares que deberían de estar representando a la fracción Mp5, y por su parte el grupo dominante de dicha fracción cae dentro de pesos moleculares que debería estar mejor representados en la fracción Mp10.

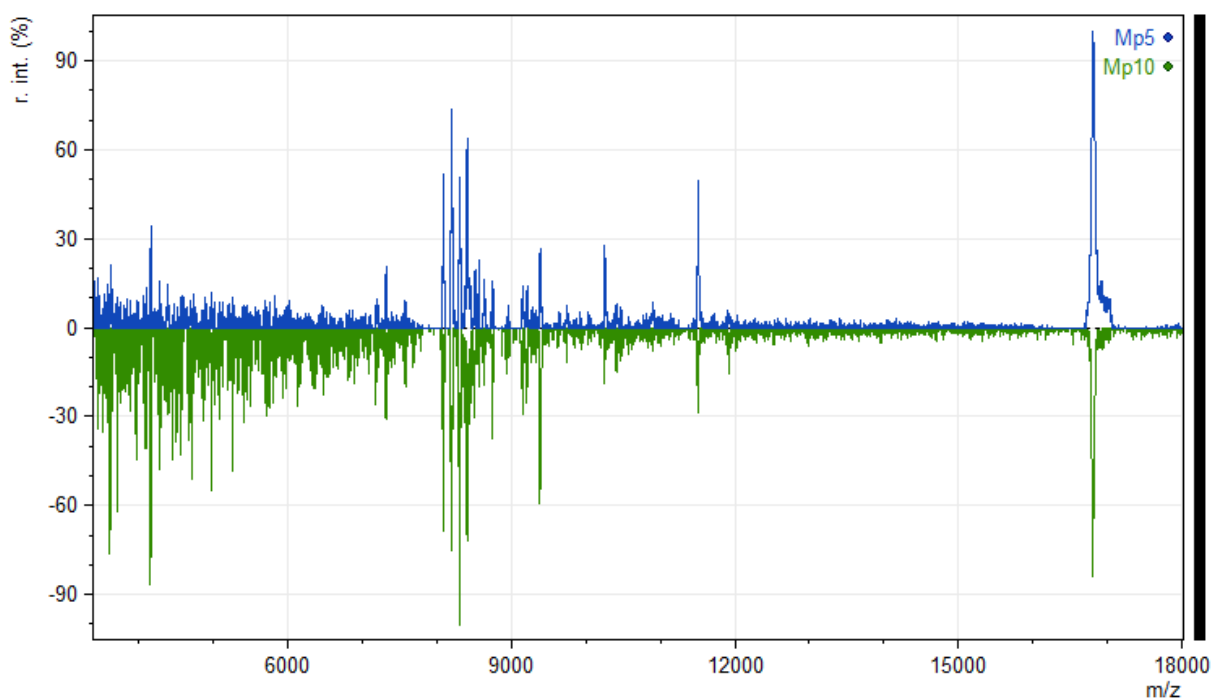


Figura 17. Comparación de espectro de MALI-TOF de las fracciones Mp5 y Mp10, de 3300 a 18000 m/z. El espectro azul corresponde a la fracción Mp5 y el verde corresponde a la fracción Mp10, las intensidades que se muestran son relativas conforme al compuesto de mayor abundancia.

9. Discusión

Los nematocistos identificados durante las micrografías concuerdan con los descritos por Mariscal y Bigger (1976) y con lo reportado previamente para la especie por Goldberg y Taylor (1997) y Torres-Ramos (2001); pese a lo anterior no se observaron birhopaloid tipo II como lo reportado por Östman (2000) para organismos de la especie recolectados en las Costas de Florida. Diversos autores coinciden en que la identificación de los nematocistos de un organismo es una característica sistemática importante a diferentes niveles de taxa (Fautin 1988, 2009, Östman 2000). Cabe destacar que no todos los organismos de una misma especie, ni siquiera durante la misma etapa del ciclo de vida, presentan los mismos tipos de cnidocistos, estos pueden variar de acuerdo a la ubicación geográfica o tamaño de los individuos en cuestión (Fautin, 2009).

Para organismos de *Cassiopea xamachana* y *Cassiopea andromeda*, Jensch y Hofmann (en Fautin, 2009 y Radwan *et al.*, 2001) encontraron exactamente los mismos tipos de nematocistos para ambas especies, esto puede deberse a que algunos autores las consideran filogenéticamente como la misma especie (Holland *et al.*, 2004).

Los rendimientos de extracto crudo para ambas recolectas son prácticamente iguales entre sí y similares al rendimiento organismo-extracto obtenido por Torres-Ramos (2001) quien recuperó 10.6 g a partir de 5 organismos empleando el mismo método de extracción. Hacer una comparación de rendimiento de esta forma es poco exacto, ya que no se cuenta con el peso húmedo del tejido para el caso de Torres-Ramos (2001), no obstante, a simple vista apuntan ser similares. Para la anémona *Bartholomea annulata* los rendimientos encontrados fueron sumamente diferentes entre sí, para organismos recolectados en la misma localidad pero en diferentes años, uno de 3.9% (Sánchez-Rodríguez, *et al.*, 2006) y un segundo de 8.12% (*com pers*). Diferencias similares han sido encontradas para la especie *Palythoa caribaeorum* (Melo, *et al.*, 2012) en donde reportan rendimientos de 1.12%, 0.85% y 0.41% para extractos crudos obtenidos en hexano, en tanto que encuentran 1.08%, 0.81% y 0.89% de rendimiento para extractos crudos obtenidos en etanol de tres localidades diferentes de la costa sur de Pernambuco, Brasil. Por su parte Lazcano-Pérez (2015) reporta un rendimiento 0.56% para extracto crudo acuoso para organismos del Golfo de México. Las diferencias en el rendimiento de los organismos o bien de las recolectas, aun cuando se trata de la misma especie puede estar influenciada de forma intraespecífica por factores genéticos o por las edades de los organismos y de forma externa, por factores ambientales tanto en el tiempo como en el espacio de muestreo (Hay, 1996; Melo, *et al.*, 2012).

El bajo rendimiento de los productos naturales de origen marino es una característica conocida, y quizás uno de los principales obstáculos para que estos sean empleados de forma comercial (Munro *et al.*, 1999; Demain & Fang, 2000; Proksch *et al.*, 2002, 2003). En el caso específico de los cnidarios uno de los factores que más influye, es el alto contenido de agua propio de los organismos. En las anémonas, el contenido de agua reportado para las especies *Calliactis parasitica*, *Bunodosoma caissarum* y *Anemonia sargassensis* es de 85%, 76% y 77% respectivamente (Brafeld & Chapman, 1983; Amado *et al.*, 2011) por su parte el contenido de agua reportado para 21 especies de

medusas nunca es menor al 91.1%, siendo típicamente entre el 95% y 96% (Hyman, 1940, 1943; Larson, 1986; Hsieh *et al.*, 2001). Con base en esto, se esperaría que el rendimiento de extractos crudos obtenidos a partir de medusas fuese menor que aquellos obtenidos a partir de anemonas, dicha diferencia no es clara al comparar los rendimientos de *C. xamachana* contra los dos reportes de *B. annulata*.

Durante el proceso de liofilizado del sobrenadante del EclI se observó que la solución se descongelaba rápidamente al pasar de los -60°C, temperatura a la que se encontraba en el ultracongelador, a los -48°C, temperatura a la que se liofilizaba. Esta situación no se observó para el caso de Ecl, que se trató de la misma manera pese a que la concentración de peso de extracto crudo era ligeramente mayor (13.8 mg/mL vs. 20 mg/mL). Esto pudiera ser un indicativo de una mayor concentración de sales, lo que sugiere un punto de fusión a menor temperatura (Bodnar, 1993). Pese a lo anterior, la concentración de proteínas de ambos extractos fue muy parecida, siendo ligeramente mayor en el EclI.

Otra posible explicación es que cada extracto tenga una composición química diferente, no solo en el tipo de proteínas que lo constituyen, sino también en la proporción de otras moléculas solubles en agua que pudieran estar presentes en el extracto. Cambios en la composición química de extractos de la misma especie han sido reportados en diversos grupos taxonómicos, tanto terrestres como marinos. Dichas diferencias se atribuyen a factores como la región geográfica, edad, sexo y/o época del año (Glenn & Straight, 1978; Bodnar, 1993; Hay, 1996; Sasa, 1999; Menezes, *et al.*, 2006; Underwood & Seymour, 2007; Brinkman & Burnell, 2008, 2009; Duda, *et al.*, 2009; Bentlage *et al.*, 2010; Casewell *et al.*, 2013). No obstante, Torres-Ramos (2001) indica que sin importar la época de recolecta de los organismos los resultados obtenidos en las ensayos electrofisiológicos y hemolíticos para *C. xamachana* son similares. Si bien esto no implica que la concentración de proteínas en el veneno sea consistente a lo largo del tiempo, es un buen indicativo de que la presencia de los compuestos activos se mantiene constante.

Evidencias de diferencias entre los extractos I y II se observan, aunque no de manera muy clara en los geles de electroforesis, si bien ambos extractos crudos presentan compuestos de alto, mediano y probablemente bajo peso molecular, los patrones de bandeo son diferentes, tal como sucede en la comparación de los geles de extractos crudos para la misma especie reportados por Radwan y col., (2001, 2005), donde se reportan patrones de bandeo que van desde pesos moleculares mayores a 200 kDa, hasta compuestos con pesos menores a 10 kDa, a excepción de una banda muy clara de 66 kDa que no se aprecia en ninguno de los extractos crudos de este trabajo.

El número de fracciones obtenidas mediante gel permeable difiere con lo reportado por diferentes autores (Radwan & Burnett 2001, Radwan *et al.*, 2001, 2005, Torres *et al.*, 2001), esto puede deberse a las diversas fases estacionarias empleadas, ya que estas determinan el tiempo de retención de las diferentes moléculas a través de la columna, o bien una modificación en la velocidad de flujo que pudo afectar la resolución de la cromatografía (Wu, 2003).

La separación por cromatografía en gel permeable presentó una baja resolución que se observa en las electroforesis, resultados similares son presentados por Radwan y colaboradores (2001) quienes presentan un gel de electroforesis para su extracto crudo y las dos fracciones obtenidas por Sephacryl S-200 en el que se puede observar que su segunda fracción presenta moléculas con pesos moleculares mayores a los de su primer fracción, siendo que el principio de separación por cromatografía en gel permeable indica que los mayores pesos moleculares eluirán primero (Hagel 2001). De igual forma Radwan y colaboradores (2005) presentan un gel de sus fracciones pre-fraccionadas por Sephadex G200 en el que se observa que las fracciones I, II, III y IV presentan bandas cercanas a los 66 kDa y entre los 45kDa y 31kDa muy marcadas. Esta baja resolución en la separación por peso molecular también se observaron en los resultados del presente trabajo por ninguno de los dos métodos empleados.

Si bien no se encontraron reportes de ensayos de letalidad en *A. salina* para ninguna medusa de la clase Scyphozoa, y los resultados que se encontraron para otros cnidarios no están homogéneamente reportados, al igual que para el ensayo con crustáceos, la LC_{50} obtenida para el Ecl (48.38 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto o 626 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína) para el ensayo de letalidad en *Artemia salina* son muy altas en comparación con otras especies de cnidarios reportadas previamente. Soapi (2013) encontró una LC_{50} por encima de 1,000 ppm para siete especies de octocorales y entre 115 y 750 ppm para otras siete especies octocoralinas; mientras que fue de 190 ppm para la gorgonia y el coral escleratino y de 24 ppm para un zoantido. Particularmente, Melo (2012) reportó una LC_{50} de 24.2, 33.5 y 625.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el zoantido *Palythoa caribaeorum* empleando extractos crudos obtenidos de tres localidades diferentes de la costa de Brasil. Para esta misma especie en el Golfo de México, se reportó una mortalidad del 60% de los organismos a concentración de 1 mg/mL. La LC_{50} más cercana a los resultados aquí obtenidos es la reportada para la anémona *Lebrunia danae* (Sánchez-Rodríguez & Cruz-Vazquez, 2006) con un valor de 2.82 mg/mL. Para las fracciones pre-fraccionadas no se encontraron reportes previos con los cuales contrastar los resultados. Sin embargo, el hecho de que los valores de LC_{50} de las fracciones Mp5 y Mp10 (351 y 472 μg de proteína* mL^{-1} respectivamente) sean menores a los establecidos para el Ecl podría sugerir que la ultrafiltración ha eliminado compuestos que contrarrestan el efecto citotóxico.

La presencia de actividad de fosfolipasa A2 se ha descrito para diversos grupos de cnidarios (Radwan *et al.*, 2001, 2005; Nevalainen *et al.*, 2004; Frazão *et al.*, 2012). Si bien el método aquí empleado para detectar la presencia de fosfolipasas no permite especificar el tipo de fosfolipasa que se presenta, existen reportes previos en los cuales determinaron la actividad de fosfolipasa A2 (PLA2) en esta y otras especies de cnidarios, por lo que podríamos sugerir que la actividad enzimática mostrada en nuestros ensayos se debe al tipo A2 de las PLA. Al comprar los halos de actividad enzimática del extracto crudo y las fracciones pre-fraccionadas y el veneno de abeja, usado como control positivo, se observó que este último presentó actividad mayor a menores dosis, y los halos que se formaron siempre fueron más nítidos, esta diferencia puede ser explicada por una sensibilidad diferencial del método por el tipo de PLA (Habermann & Hardt, 1972).

La falta de actividad enzimática en la fracción Mp3 discrepa con lo reportado por Radwan y colaboradores (2001) quienes reportan actividad de PLA2 en todas las fracciones obtenidas por cromatografía de gel permeable. Cabe destacar que a diferencia de los ensayos de letalidad en *Artemia* o neurotoxicidad en cangrejos, los resultados de PLA se obtuvieron empleando concentraciones menores que las usadas previamente por otros autores para la especie (Radwan *et al.*, 2001, 2005), probablemente si se incrementara la concentración para evaluar la actividad de PLA2, pudieran coincidir los resultados con Radwan *et al.*, 2001). Nuevamente se observa que las fracciones pre-fraccionadas presentan menor actividad que el Ecl a las mismas concentraciones, lo cual fue reportado previamente para esta especie (Radwan *et al.*, 2001).

La falta de consistencias en los resultados de viabilidad celular que presentaron algunos extractos sobre ambas líneas celulares de glioma de rata puede ser explicada por debilidades en el método empleado para evaluar la viabilidad celular. El colorante CV no es un colorante vital por lo que teñirá todas las células que se encuentren, no obstante dado que las células pierden su capacidad de adherirse a las multiplacas conforme se ven afectadas por agentes externos, esto no suele representar un problema. Sin embargo algunos agentes como pueden ser Ac. acético, etanol y DMSO, entre otros, cuando son empleados a altas concentraciones, producen un efecto muy rápido sobre ellas evitando así que las células se despeguen del fondo de la caja lo cual provoca que aun las células muertas sean cuantificadas por el método (Chiba *et al.*, 1998 y observación personal). Este efecto puede ser despreciado cuando se emplean colorantes vitales como el Rojo neutro o el ensayo de MTT.

En el caso de los resultados observados frente a la línea RG2 de las fracciones *C. xamachana* G50FV y Cx G50_IIIFV si bien la concentración de proteína es baja, el efecto podría estar asociado a la concentración de sales de dichas fracciones. Cuando las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de glucosa y NaCl para validar el método de CV, se observó que las tratadas con NaCl presentaron una relación lineal entre la concentración de sales y la viabilidad celular.

Estudios previos han establecido la toxicidad de extractos crudos y fracciones pre-fraccionadas de venenos de diversas medusas y anémonas en diferentes líneas celulares (Helmholz *et al.*, 2007; Mariottini & Pane, 2010, 2014; Lassen *et al.*, 2011, Cuiping *et al.*, 2012; Ramezanpour *et al.*, 2012, 2014; Monroy-Estrada *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013; Ayed *et al.*, 2014). En dichos estudios las concentraciones de extracto que provocaron una disminución de la viabilidad en líneas celulares por debajo del 50% fueron desde 5.1 µg/mL hasta concentraciones mayores a 1 mg/mL, como observamos en nuestros ensayos. Particularmente, Ramezanpour y colaboradores (2012), emplearon concentraciones de 2.5, 25, 250 y 1000 mg/mL y observaron una reducción de la viabilidad celular por debajo del 50% solo en las concentraciones más altas para las especies de *Heteractis malu*, *Cryptodendrum adhaesivum* y *Entacmaea quadricolor* empleando líneas celulares de cáncer de pulmón.

Al igual que en la mayoría de los estudios donde se compara el efecto de un mismo extracto sobre la viabilidad celular de diferentes líneas celulares, en este estudio se observaron diferencias en

la sensibilidad celular entre las líneas C6 y RG2 que pueden ser atribuibles a las características intrínsecas de cada línea celular y los mecanismos de respuesta a estrés citotóxico que se activan por la presencia de los extractos (Sun *et al.*, 2002; Cuiping *et al.*, 2012; Ramezanzpour *et al.*, 2012; Lazcano-Peréz, 2015). Cabe señalar que por lo general cuando ambas líneas son empleadas, la línea celular RG2 suele ser más sensible a los tratamientos así como a cambios en las condiciones de cultivo (observaciones personales), no obstante en este caso en específico la línea RG2 mostró menor sensibilidad y en algunos casos como con la fracción Mp3 y algunas fracciones de la tercer columna de Sephadex G50M a la mayor concentración, hubo una proliferación de la línea celular mayor a la del control.

Las similitudes y/o diferencias encontradas en los análisis de masas realizados para las fracciones Mp5 y Mp10, así como el comportamiento de la línea celular C6 ante las mismas fracciones, no permiten explicar con certeza que compuesto o grupo de estos son los responsables de la actividad citotóxica. Sin embargo al comparar estos espectros con uno obtenido de un muestreo posterior (no se muestra) que presento los mismos cambios a nivel celular y disminución de la viabilidad celular, se puede hipotetizar que las proteínas responsables de la actividad se encuentran en el grupo de alrededor de 11,500 m/z o en el grupo de alrededor de 16,800 m/z.

10. Conclusiones

El extracto crudo y la mayoría de las fracciones pre-fraccionadas presentaron actividad biológica en los ensayos realizados, sin embargo al comparar las concentraciones con las de cnidarios previamente reportados se observa que se requieren dosis mayores para observar los mismos efectos.

Si bien es cierto, que las concentraciones empleadas en el presente trabajo fueron altas en muchas ocasiones, no es posible compararlas de forma adecuada con otros trabajos ya que la forma en que se reportan los ensayos de actividad biológica de compuestos aislados de cnidarios varían mucho de autor a autor, en algunas publicaciones los resultados van asociados a una concentración de proteína sin mencionar la cantidad de extracto empleado, en otros casos lo que se reporta es la concentración de extracto empleado sin mencionar la concentración de proteína del mismo, por esta razón resulta fundamental unificar la forma de reportar los resultados.

Pese a que se encontró actividad de fosfolipasas y efectos citotóxicos sobre líneas celulares de glioma de rata, los resultados no son concluyentes. Sin embargo se observa actividad diferencial en las dos líneas tumorales de glioma de rata que se trabajaron, por esta razón es importante seguir purificando los extractos y evaluar nuevamente la actividad a una mayor resolución.

Basados en los resultados aquí observados se podría concluir que el ensayo de *Artemia salina* no es un buen ensayo rápido para determinar la citotoxicidad de este tipo de compuestos, ya que pese a requerir dosis muy altas para causar efectos citotóxicos en estos crustáceos se observó citotoxicidad en células tumorales a concentraciones que otros autores reportan.

En relación a los dos métodos de fraccionamiento empleados durante el desarrollo de este trabajo, el que presentó mejores resultados fue el de ultrafiltración ya que permitió segregar el extracto de acuerdo a la actividad biológica de interés (citotoxicidad ante células tumorales). Adicionalmente, a diferencia de la cromatografía de filtración en gel, la ultrafiltración no acidifica las fracciones y el rendimiento es mayor.

Si bien, el ensayo de cristal violeta es un método económico, validado, sensible y menos tóxico que los métodos usualmente empleados para evaluar la viabilidad celular, es recomendable realizar una validación específica para el tipo de compuestos a evaluar con un método que emplee un colorante vital para asegurar que el ensayo de CV presenta la sensibilidad necesaria ante dicho compuesto.

11. Referencias

- Aguirre-Cruz, L., E. Rangel-López, N. Méndez-Mar, L. Ruano, M. Martínez-Moreno, L. De la Cruz Dora, L. Velásquez-Pérez, J. Garduño & J. Sotelo. 2011. XXVI Reunión Anual de Investigación. *In* Frecuencia de Tumores Cerebrales En El Instituto Nacional de Neurología Y Neurocirugía de 1964 a 2008. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.
- Amado, E.M., D. Vidolin, C.A. Freire & M.M. Souza. 2011. Distinct patterns of water and osmolyte control between intertidal (*Bunodosoma caissarum*) and subtidal (*Anemonia sargassensis*) sea anemones. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 158: 542–51.
- American Brain Tumor Association. 2004. A primer of brain tumors: A patient's reference manual. American Brain Tumor Association.
- Ayed, Y., C. Bouaziz, D. Brahmi, C. Zaid, S. Abid & H. Bacha. 2014. Cell death in relation to DNA damage after exposure to the jellyfish *Pelagia noctiluca* nematocysts. *Environ. Toxicol.* 29: 337–44.
- Basmadjian, C., Q. Zhao, E. Bentouhami, A. Djehal, C.G. Nebigil, R.A. Johnson, M. Serova, A. de Gramont, S. Faivre, E. Raymond & L.G. D'Amico. 2014. Cancer wars: natural products strike back. *Front. Chem.* 2: 20.
- Bentlage, B., P. Cartwright, A.A. Yanagihara, C. Lewis, G.S. Richards & A.G. Collins. 2010. Evolution of box jellyfish (Cnidaria: Cubozoa), a group of highly toxic invertebrates. *Proc. Biol. Sci.* 277: 493–501.
- Blanquet, R. & M. Phelan. 1987. An unusual blue mesogleal protein from the mangrove jellyfish *Cassiopea xamachana*. *Mar. Biol.* 430: 423–430.
- Blunt, J.W., B.R. Copp, W.-P. Hu, M.H.G. Munro, P.T. Northcote & M.R. Prinsep. 2009. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 26: 170–244.
- Bodnar, R.J. 1993. Revised equation and table for determining the freezing point depression of H₂O-NaCl solutions. *Geochim. Cosmochim. Acta* 57: 683–684.
- Boyle, P. & B. Levin (Eds.). 2008. World cancer report 2008. IARC Press, International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–54.

- Brafield, A.E. & G. Chapman. 1983. Diffusion of Oxygen through the Mesogloea of the Sea Anemone *Calliactis Parasitica*. *J. Exp. Biol.* 107: 181–187.
- Brinkman, D. & J. Burnell. 2008. Partial purification of cytolytic venom proteins from the box jellyfish, *Chironex fleckeri*. *Toxicon* 51: 853–63.
- Brinkman, D.L. & J.N. Burnell. 2009. Biochemical and molecular characterisation of cubozoan protein toxins. *Toxicon* 54: 1162–1173.
- Brusca, R.C. & G.J. Brusca. 2005. *Invertebrados*. McGraw-Hill Interamericana de España S.L.
- Casewell, N.R., W. Wüster, F.J. Vonk, R.A. Harrison & B.G. Fry. 2013. Complex cocktails: the evolutionary novelty of venoms. *Trends Ecol. Evol.* 28: 219–29.
- Chiba, K., K. Kawakami & K. Tohyama. 1998. Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicol. Vitr.* 12: 251–258.
- Clavo Varas, B., F. Robaina Padrón, D. Macías Verdes, G. González Machín, M.A. Hernández Martín & P.C. Lara Jiménez. 2004. TUMORES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC). *BioCancer* 1.
- Cuiping, L., L. Pengcheng, F. Jinhua, L. Rongfeng & Y. Huahua. 2012. Cytotoxicity of the venom from the nematocysts of jellyfish *Cyanea nozakii* Kishinouye. *Toxicol. Ind. Health* 28: 186–92.
- D’Incalci, M. & C.M. Galmarini. 2010. A review of trabectedin (ET-743): a unique mechanism of action. *Mol. Cancer Ther.* 9: 2157–63.
- Daly, M., M. Brugler & P. Cartwright. 2007. The phylum Cnidaria: a review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus. *Zootaxa* 182: 127–182.
- Demain, A.L. & A. Fang. 2000. The natural functions of secondary metabolites. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 69: 1–39.
- Duda, T.F., D. Chang, B.D. Lewis & T. Lee. 2009. Geographic Variation in Venom Allelic Composition and Diets of the Widespread Predatory Marine Gastropod *Conus ebraeus*. *PLoS One* 4: e6245.
- Estanislao Gomez, C.C. 2010. "Evaluacion de la actividad antitumoral de diferentes extractos del tallo de *Parmeniera edulis* en la linea celular de cancer de mamam MDA-MB-231. Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, Instituto Politécnico Nacional.
- Fautin, D.G. 1988. Importance of nematocysts to actinian taxonomy., p. 487–500. *In* D.A. Hessinger & H.M. Lenhoff (eds.). *The Biology of Nematocysts*. Academic Press, Inc., San Diego and other cities.

- Fautin, D.G. 2009. Structural diversity, systematics, and evolution of cnidae. *Toxicon* 54: 1054–64.
- Fenical, W. 2006. Marine pharmaceuticals: past, present, and future. *Oceanography* 58: 1–33.
- Frazão, B., V. Vasconcelos & A. Antunes. 2012. Sea anemone (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria) toxins: an overview. *Mar. Drugs* 1812–1851.
- Glenn, J.L. & R. Straight. 1978. Mojave rattlesnake *Crotalus scutulatus scutulatus* venom: variation in toxicity with geographical origin. *Toxicon* 16: 81–84.
- Goldberg, W.M. & G.T. Taylor. 1997. Coelenterate Cnidae Capsules: Disulfide Linkages Revealed by Silver Cytochemistry and Their Differential Responses to Thiol Reagents. *Biol. Bull.* 192: 1–16.
- Grover, A., A. Hirani, Y. Pathak & V. Sutariya. 2014. Brain-Targeted Delivery of Docetaxel by Glutathione-Coated Nanoparticles for Brain Cancer. *AAPS PharmSciTech*.
- Habermann, E. & K.L. Hardt. 1972. A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases. *Anal. Biochem.* 50: 163–173.
- Hagel, L. 2001. Gel-filtration chromatography. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* Chapter 10: Unit 10.9.
- Hart, M.G., R. Grant, R. Garside, G. Rogers, M. Somerville & K. Stein. 2008. Temozolomide for high grade glioma. *Cochrane database Syst. Rev.* CD007415.
- Hay, M.E. 1996. Marine chemical ecology: what's known and what's next? *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 200: 103–134.
- Helmholz, H., C. Ruhnau, C. Schütt & A. Prange. 2007. Comparative study on the cell toxicity and enzymatic activity of two northern scyphozoan species *Cyanea capillata* (L.) and *Cyanea lamarckii* (Péron & Lésieur). *Toxicon* 50: 53–64.
- Hernandez Jaurez, J. del C. 2009. Evaluación del posible efecto antitumoral del extracto de *Carybdea marsupialis* (Cnidaria: Cubozoa) sobre tumores inducidos con n-etil-n- nitrosoarea (ENU) en el sistema nervioso central de ratas. *Univerisas Autonoma de Mexico*.
- Higgins-III, J.E., M.D. Ford & J.H. Costello. 2008. Transitions in Morphology, Nematocyst Distribution, Fluid Motions, and Prey Capture During Development of the Scyphomedusa *Cyanea capillata*. *Biol. Bull.* 214: 29–41.
- Holland, B.S., M.N. Dawson, G.L. Crow & D.K. Hofmann. 2004. Global phylogeography of *Cassiopea* (Scyphozoa: Rhizostomeae): molecular evidence for cryptic species and multiple invasions of the Hawaiian Islands. *Mar. Biol.* 145: 1119–1128.

- Holstein, T. & P. Tardent. 1984. An ultrahigh-speed analysis of exocytosis: nematocyst discharge. *Science* (80-.). 223: 830–833.
- Hsieh, Y.-H.P., F.-M. Leong & J. Rudloe. 2001. Jellyfish as food. *Hydrobiologia* 451: 11–17.
- Hyman, L.H. 1940. Observations and experiments on the physiology of medusae. *Biol. Bull.* 79: 282–296.
- Hyman, L.H. 1943. Water content of medusae, sexuality in a planarian. *Nature* 151: 140.
- Iguchi, A., S. Iwanaga & H. Nagai. 2008. Isolation and characterization of a novel protein toxin from fire coral. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365: 107–12.
- Kass-Simon, G. & A.A. Scappaticci. 2002. The behavioral and developmental physiology of nematocysts. *Can. J. ...* 1794: 1772–1794.
- Kem, W.R., B. Parten, M.W. Pennington, D.A. Price & B.M. Dunn. 1989. Isolation, characterization, and amino acid sequence of a polypeptide neurotoxin occurring in the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biochemistry* 28: 3483–9.
- Larson, R.J. 1986. Water content, organic content, and carbon and nitrogen composition of medusae from the northeast Pacific. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 99: 107–120.
- Lassen, S., H. Helmholz, C. Ruhnau & A. Prange. 2011. A novel proteinaceous cytotoxin from the northern Scyphozoa *Cyanea capillata* (L.) with structural homology to cubozoan haemolysins. *Toxicon* 57: 721–9.
- Lazcano-Peréz, J.F. 2015. Aislamiento, purificación y elucidación de estructuras químicas de péptidos con actividad biológica en *Palythoa Caribaeorum*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Lin, X., M. Liu, C. Hu & D.J. Liao. 2010. Targeting cellular proapoptotic molecules for developing anticancer agents from marine sources. *Curr. Drug Targets* 11: 708–15.
- Louis, D.N., H. Ohgaki, O.D. Wiestler, W.K. Cavenee, P.C. Burger, A. Jouvett, B.W. Scheithauer & P. Kleihues. 2007. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 114: 97–109.
- Mariottini, G. & L. Pane. 2010. Mediterranean jellyfish venoms: a review on Scyphomedusae. *Mar. Drugs* 8: 1122–1152.
- Mariottini, G.L. & L. Pane. 2014. Cytotoxic and Cytolytic Cnidarian Venoms. A Review on Health Implications and Possible Therapeutic Applications 108–151.

- Mariscal, R.N. & C.H. Bigger. 1976. A comparison of putative sensory receptors associated with nematocysts in an anthozoan and a scyphozoan, p. 559–568. *In* *Coelenterate Ecology and Behavior*. Springer.
- Mayer, A.G. 1910. The medusae of the word. Volume 3, p. 640. *In* *The medusae of the word*. The Carnegie Institution of Washington, Washington, D.C.
- Meglitsch, P.A. & F.R. Schram. 1991. *Invertebrate Zoology*. Oxford University Press.
- Melo, L.F. de A., C.A.G. da Camara, L.L.D. da S.S. de Oliveira, J.C. de A. Modesto & C.D. Pérez. 2012. Toxicity against *Artemia salina* of the zoanthid *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria: Anthozoa) used in folk medicine on the coast of Pernambuco, Brazil. *Biotemas*.
- Menéndez, J.C. 2005. Nuevos antitumorales de origen marino. *An. la Real Acad. Nac. Farm.* 71: 341–363.
- Menezes, M.C., M.F. Furtado, S.R. Travaglia-Cardoso, A.C.M. Camargo & S.M.T. Serrano. 2006. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. *Toxicon* 47: 304–12.
- Monroy-Estrada, H.I., Y.I. Chirino, I.E. Soria-Mercado & J. Sánchez-Rodríguez. 2013. Toxins from the Caribbean sea anemone *Bunodeopsis globulifera* increase cisplatin-induced cytotoxicity of lung adenocarcinoma cells. *J. Venom. Anim. Toxins* 19.
- Morales-Landa, J.L., O. Zapata-Pérez, R. Cedillo-Rivera, L. Segura-Puertas, R. Simá-Alvarez & J. Sánchez-Rodríguez. 2007. Antimicrobial, Antiprotozoal, and Toxic Activities of Cnidarian Extracts from the Mexican Caribbean Sea. *Pharm. Biol.* 45: 37–43.
- Munro, M.H., J.W. Blunt, E.J. Dumdei, S.J. Hickford, R.E. Lill, S. Li, C.N. Battershill & A.R. Duckworth. 1999. The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. *J. Biotechnol.* 70: 15–25.
- Nagle, D.G., Y.-D. Zhou, F.D. Mora, K.A. Mohammed & Y.-P. Kim. 2004. Mechanism targeted discovery of antitumor marine natural products. *Curr. Med. Chem.* 11: 1725–56.
- Nevalainen, T.J., H.J. Peuravuori, R.J. Quinn, L.E. Llewellyn, J. a H. Benzie, P.J. Fenner & K.D. Winkel. 2004. Phospholipase A2 in cnidaria. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 139: 731–5.
- Nishizawa, K. 2002. *Seaweeds kaiso: bountiful harvest from the seas : sustenance for health & well being by preventing common life-style related diseases*. Japan Seaweed Association.

- Noseda, M., S. Tulio & M.R. Duarte. 1999. Polysaccharides from the red seaweed *Bostrychia montagnei*: chemical characterization, p. 549–554. *In* J. Kain, M. Brown & M. Lahaye (eds.). Sixteenth International Seaweed Symposium. Springer Netherlands.
- Orduña-Novoa, K., L. Segura-Puertas, J. Sánchez-Rodríguez, A. Meléndez, C. Nava-Ruíz, D. Rembao, A. Santamaría & S. Galván-Arzate. 2003. Possible antitumoral effect of the crude venom of *Cassiopea xamachana* (Cnidaria: Scyphozoa) on tumors of the central nervous system induced by N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) in rats. *PROCEEDINGS- ...* 87: 85–87.
- Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud, (OPS/OMS) & I. y A. de S. (HSD/HA). 2012. Situación de Salud en las Américas: Indicadores Básicos 2012. Washington, D.C.
- Östman, C. 2000. A guideline to nematocyst nomenclature and classification, and some notes on the systematic value of nematocysts. *Sci. Mar.* 64: 31–46.
- Ozbek, S., P.G. Balasubramanian & T.W. Holstein. 2009. Cnidocyst structure and the biomechanics of discharge. *Toxicon* 54: 1038–45.
- Paniagua, R., M. Nistal, P. Sesma, M. Álvarez-Uría, B. Fraile, R. Anadón & F.J. Sáez. 2007. *Biología Celular*. McGraw-Hill.
- Price, M.F., A.N.D. Wilkinson & L.O. Gentry. 1982. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia* 20: 7–14.
- Proksch, P., R. Edrada-Ebel & R. Ebel. 2003. Drugs from the Sea - Opportunities and Obstacles. *Mar. Drugs* 1: 5–17.
- Proksch, P., R.A. Edradal & R. Ebel. 2002. Drugs from the seas - current status and microbiological implications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 125–34.
- Quezada Ramírez, M.A. 2007. El ciclo celular, sus alteraciones en el cáncer y como es regulado en células troncales embrionarias. *ContactoS* 65: 5–12.
- Radwan, F.F.Y., J. Burnett & D. Bloom. 2001. A comparison of the toxinological characteristics of two *Cassiopea* and *Aurelia* species. *Toxicon* 39: 245–257.
- Radwan, F.F.Y. & J.W. Burnett. 2001. Toxinological studies of the venom from *Cassiopea xamachana* nematocysts isolated by flow cytometry. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 128: 65–73.
- Radwan, F.F.Y., L.G. Román, K. Baksi & J.W. Burnett. 2005. Toxicity and mAChRs binding activity of *Cassiopea xamachana* venom from Puerto Rican coasts. *Toxicon* 45: 107–12.

- Ramezanzpour, M., K. Burke da Silva & B. Sanderson. 2012. Differential susceptibilities of human lung, breast and skin cancer cell lines to killing by five sea anemone venoms. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 18: 157–163.
- Ramezanzpour, M., K.B. da Silva & B.J.S. Sanderson. 2014. The effect of sea anemone (*H. magnifica*) venom on two human breast cancer lines: death by apoptosis. *Cytotechnology* 66: 845–52.
- Reddy, L., B. Odhav & K.D. Bhoola. 2003. Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacol. Ther.* 99: 1–13.
- Rocha, J., L. Peixe, N.C.M. Gomes & R. Calado. 2011. Cnidarians as a source of new marine bioactive compounds—An overview of the last decade and future steps for bioprospecting. *Mar. Drugs* 1860–1886.
- Rousseau, A., K. Mokhtari & C. Duyckaerts. 2008. The 2007 WHO classification of tumors of the central nervous system - what has changed? *Curr. Opin. Neurol.* 21: 720–7.
- Ruppert, E. & R.D. Barnes. 2003. *Zoología de los invertebrados*. McGrag-Hill Interamericana. España.
- Sánchez-Rodríguez, J. & K. Cruz-Vazquez. 2006. Isolation and biological characterization of neurotoxic compounds from the sea anemone *Lebrunia danae* (Duchassaing and Michelotti, 1860). *Arch. Toxicol.* 80: 436–41.
- Sánchez-Rodríguez, J., E. Torrens & L. Segura-Puertas. 2006. Partial purification and characterization of a novel neurotoxin and three cytolysins from box jellyfish (*Carybdea marsupialis*) nematocyst venom. *Arch. Toxicol.* 80: 163–8.
- Sánchez-Rodríguez, J., A. Zugasti, A. Santamaría, S. Galván-Arzate & L. Segura-Puertas. 2006. Isolation, partial purification and characterization of active polypeptide from the sea anemone *Bartholomea annulata*. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 99: 116–21.
- Sarfaraj, H., F. Sheeba, A. Saba & S. Mohd. 2012. Marine natural products: A lead for Anti-cancer. *Indian J. Mar. Sci* 41: 27–39.
- Sasa, M. 1999. Correspondence. *Toxicon* 37: 249–252.
- Schumacher, M., J. Schmidt, N. Egen & K. Dillon. 1992. Biochemical variability of venoms from individual European and Africanized honeybees (*Apis mellifera*). *J. Allergy Clin. Immunol.* 90: 59–65.
- Shanmugam, M. & K.H. Mody. 2000. Heparinoid-active sulphated polysaccharides from marine algae as potential blood anticoagulant agents. *Curr. Sci.* 79: 727–731.

- Soapi, K., K. Feussner & W.G. Aalbersberg. 2013. Antimicrobial and cytotoxic activities of marine plants and invertebrates from the coast of Espirito Santo in Vanuatu. *South Pacific J. Nat. Appl. Sci.* 31: 89–95.
- Stupp, R., W.P. Mason, M.J. Van Den Bent, M. Weller, B. Fisher, M.J.B. Taphoorn, K. Belanger, A.A. Brandes, C. Marosi & U. Bogdahn. 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 352: 987–996.
- Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud. 2013. Los 5 tipos de cáncer que más afectan a mexicanos.
- Sun, L.-K., Y. Yoshii, A. Hyodo, H. Tsurushima, A. Saito, T. Harakuni, Y.-P. Li, M. Nozaki & N. Morine. 2002. Apoptosis induced by box jellyfish (*Chiropsalmus Quadrigatus*) toxin in glioma and vascular endothelial cell lines. *Toxicon* 40: 441–446.
- Tirado, L. & M. Granados. 2007. Epidemiología y etiología del cáncer de la cabeza y el cuello. *Cancerología* 2: 9–17.
- Torres, M., M.B. Aguilar, A. Falcón, L. Sánchez, F.F.Y. Radwan, J.W. Burnett, E.P. Heimer-de la Cotera & R.O. Arellano. 2001. Electrophysiological and hemolytic activity elicited by the venom of the jellyfish *Cassiopea xamachana*. *Toxicon* 39: 1297–1307.
- Torres-Ramos, M.A. 2001. Actividad biológica del veneno de la medusa *Cassiopea xamachana*. Estudios electrofisiológicos y bioquímicos. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Underwood, A.H. & J.E. Seymour. 2007. Venom ontogeny, diet and morphology in *Carukia barnesi*, a species of Australian box jellyfish that causes Irukandji syndrome. *Toxicon* 49: 1073–1082.
- Wahl, M., M. Molis, A. Davis, S. Dobretsov, S.T. Dürr, J. Johansson, J. Kinley, D. Kirugara, M. Langer, H.K. Lotze, M. Thiel, J.C. Thomason, B. Worm & D. Zeevi Ben-Yosef. 2004. UV effects that come and go: a global comparison of marine benthic community level impacts. *Glob. Chang. Biol.* 10: 1962–1972.
- Wang, T., Q. He, L. Xiao, Q. Wang, B. Zhang, B. Wang, G. Liu, J. Zheng, B. Yu & L. Zhang. 2013. Mitochondrial dysfunction contributes to the cytotoxicity induced by tentacle extract from the jellyfish *Cyanea capillata* in rat renal tubular epithelial NRK-52E cells. *Toxicon* 74: 1–7.
- World health organization (WHO). 2014. Cancer [Fact sheet N.297] [WWW Document]. URL <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
- Wu, C.-S. 2003. Handbook Of Size Exclusion Chromatography And Related Techniques: Revised And Expanded. CRC Press.

Zheng, L., Y. Wang, J. Sheng, F. Wang, Y. Zheng & X. Lin. 2011. Antitumor Peptides from Marine Organisms 1840–1859.

12. ANEXOS

A1. Abreviaturas

ATCC	American Tissue Culture Collection
BGG	γ globulina bovina
BSA	albúmina sérica bovina
<i>cca.</i>	aproximadamente
CV	cristal violeta
<i>C. xamachana</i>	<i>Cassiopea xamachana</i>
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
Ecl	extracto crudo I
EclI	extracto crudo II
ENU	Etil-nitrosourea
GBM	Astrocitoma grado IV o glioblastoma multiforme
INNN	Instituto Nacional de Neurología y Neurociencia
NCI	Instituto Nacional del Cáncer
OMS	Organización mundial de la Salud
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PBS	Solución salina amortiguada con fosfatos
PLA	Fosfolipasas A
PLA2	Fosfolipasas A2
ppm	partes por millón
SFB	suero fetal bovino
Sln	solución
SNC	sistema nervioso central

TMZ

temozolamida

vol

volumen

A2. Diluciones de la solución madre para el ensayo de *Artemia salina*.

Solución madre= 50mg/mL

Dilución	Vol (μ L) sln madre	Vol (μ L) Agua de mar filtrada	Concentración final
1	800	200	40mg/mL
2	650	350	32.5 mg/mL
3	500	500	25mg/mL

A3. Cromatogramas de filtración en Gel

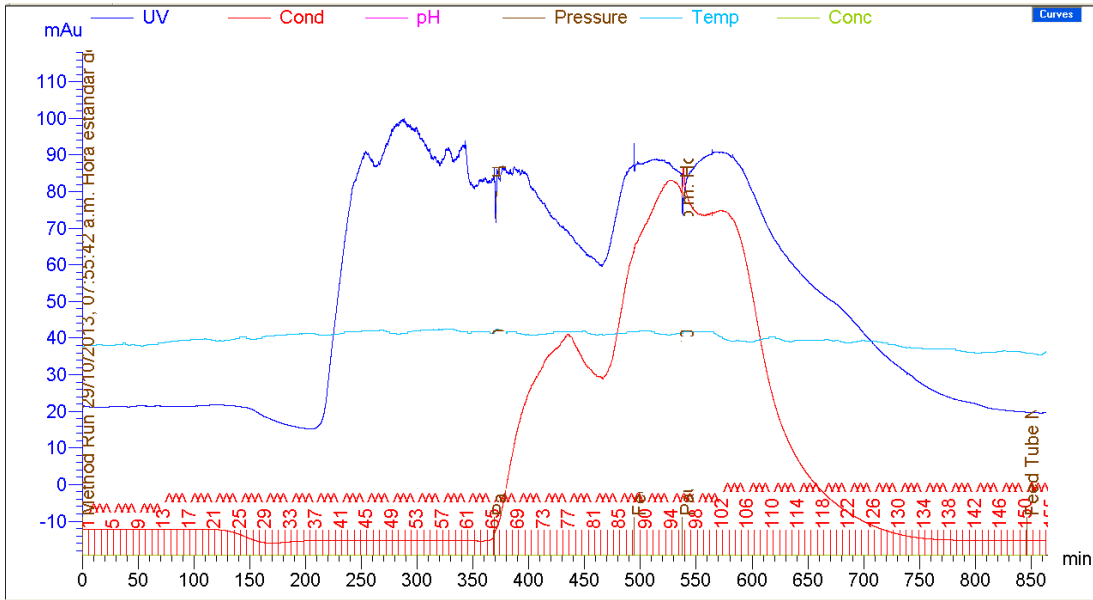


Figura 18. Perfil de elusión de la columna 1 de filtración en gel Sephadex G50-M.

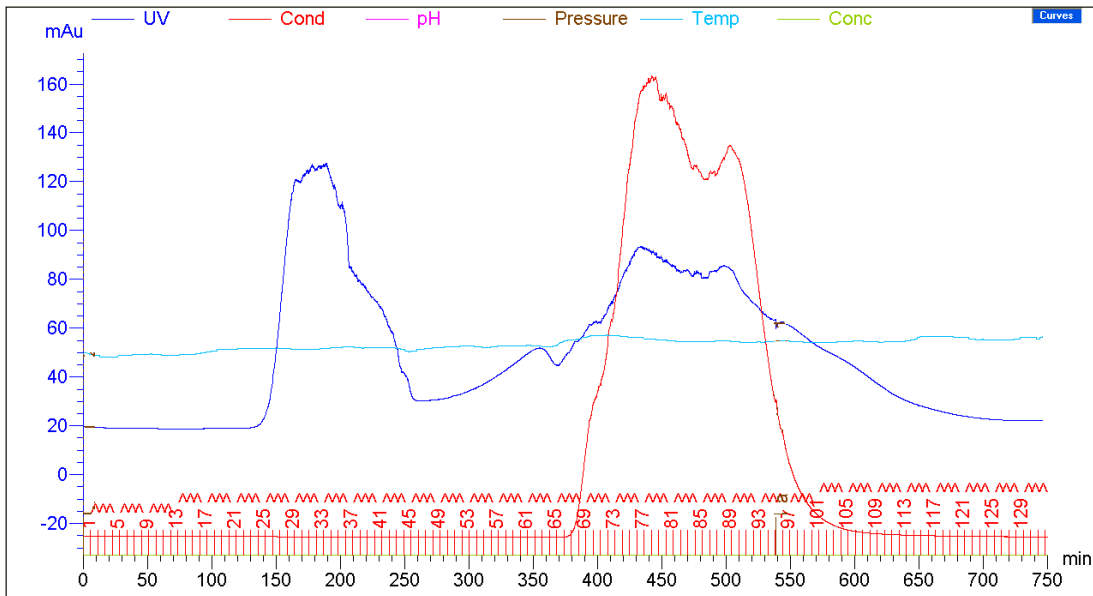


Figura 19. Perfil de elusión de la columna 3 de filtración en gel Sephadex G50-M.

A4. Actividad neurotóxica

La actividad neurotóxica de los extractos crudos de *C. xamachana* y las fracciones pre-fractionadas fueron evaluadas en cangrejos de la especie *Ocypode quadrata*, inyectándolos en la sección de la coxa de la tercer pata caminadora usando diferentes concentraciones (Sánchez-Rodríguez & Cruz-Vazquez 2006, Sánchez-Rodríguez, Torrens, *et al.* 2006)

Para evaluar la actividad neurotóxica del Ecl se utilizaron siete cangrejos de la especie *O. quadrata*. Los organismos fueron inyectados en el tercer apéndice caminador con las concentraciones detalladas en la Tabla IX. Para los primeros tres cangrejos no fue posible determinar la concentración ya que se trabajó con la solución original. El ensayo muestra una evidente actividad biológica en todos los organismos observados, inclusive aquellos que no murieron presentaron una evidente respuesta típica de sustancias neurotóxicas.

Tabla IX. Ensayo de neurotoxicidad en *O. quadrata* de extracto crudo de *C. xamachana*. Los representan manifestación de síntomas mientras que los representan ausencia de síntomas.

Extracto	Organismo						
	I Solución inicial	II Solución inicial	III Solución inicial	IV Ecl	V Ecl	VI Ecl	VII Ecl
Concentración (mg de proteína/mL, basado en BSA)	ND	ND	ND	0.75	0.75	2.00	2.00
Dosis inyectada (µg de proteína/g de organismo)	ND	ND	ND	56.81	71.42	15.15	19.04
Burbujeo	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Temblores	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Descoordinación de los ojos	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Parálisis	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Pérdida de extremidad	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Muerte	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

Para las fracciones pre-fractionadas con ultrafiltración los detalles de las concentraciones inyectadas a cada organismo de *O. quadrata* se describen en la Tabla X. Al igual que para los extractos crudos, todos los organismos inyectados con las fracciones pre purificadas mostraron evidentes efectos de actividad biológica. Así, se observó que pese a haber inyectado dosis menores a las del Ecl, los organismos continuaron presentando reacción ante el veneno. Sin embargo la muerte se presentó en una menor proporción de los organismos.

Tabla X. Ensayo de neurotoxicidad en *O. quadrata* de fracciones pre purificadas de *C. xamachana*. Los representan manifestación de síntomas mientras que los representan ausencia de síntomas. Se emplea el símbolo ♀ para identificar a las hembras y ♂ para identificar a los machos.

Extracto	Organismo				
	VIII Solución inicial Ecll	IX Mp ₃	X Mp ₅	XI Mp ₅	XII Mp ₁₀
Sexo	♀	♀	♀	♀	♂
Concentración (mg de proteína/mL, basado en BSA)	ND	0.91	8.08	16.16	11.64
Dosis inyectada (µg de proteína/g de organismo)		14.44	29.28	58.55	46.56
Burbujeo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Temblores	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Descoordinación de los ojos	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Parálisis	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Oscurecimiento del caparazón	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Muerte	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

A5. Espectros de masas individuales.

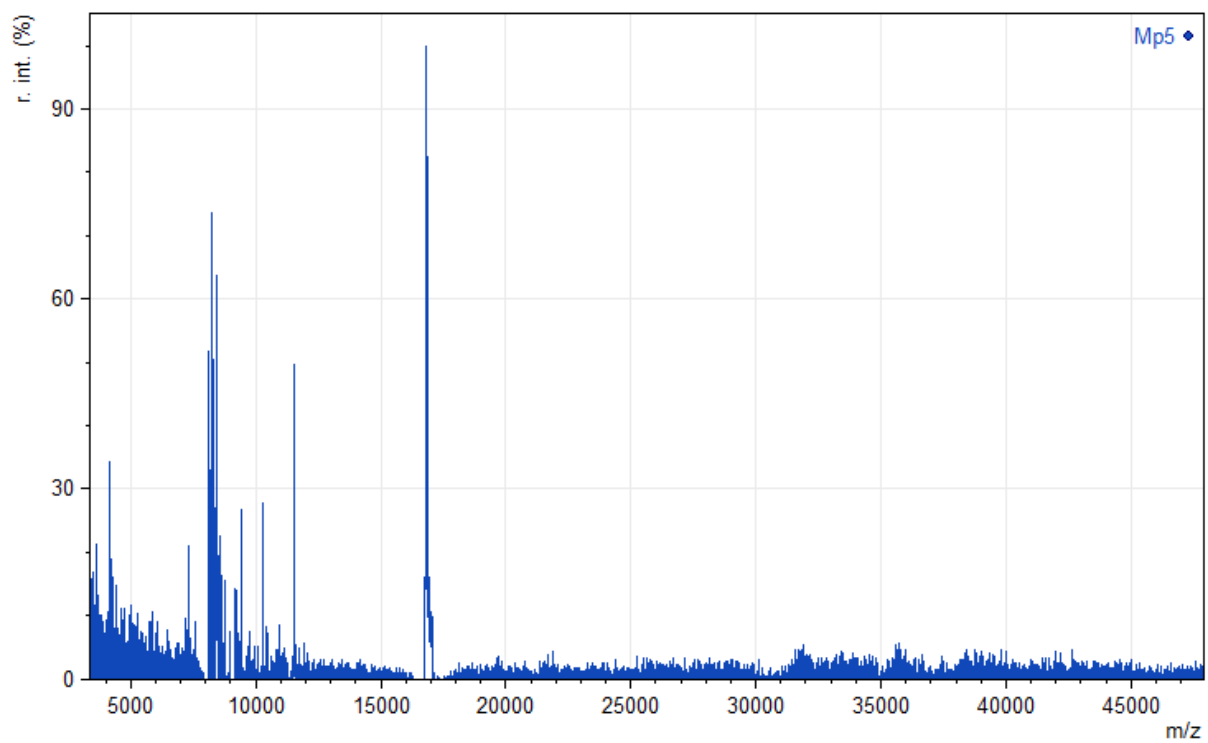


Figura 20. Espectro de masas MALDI-TOF fracción Mp5.

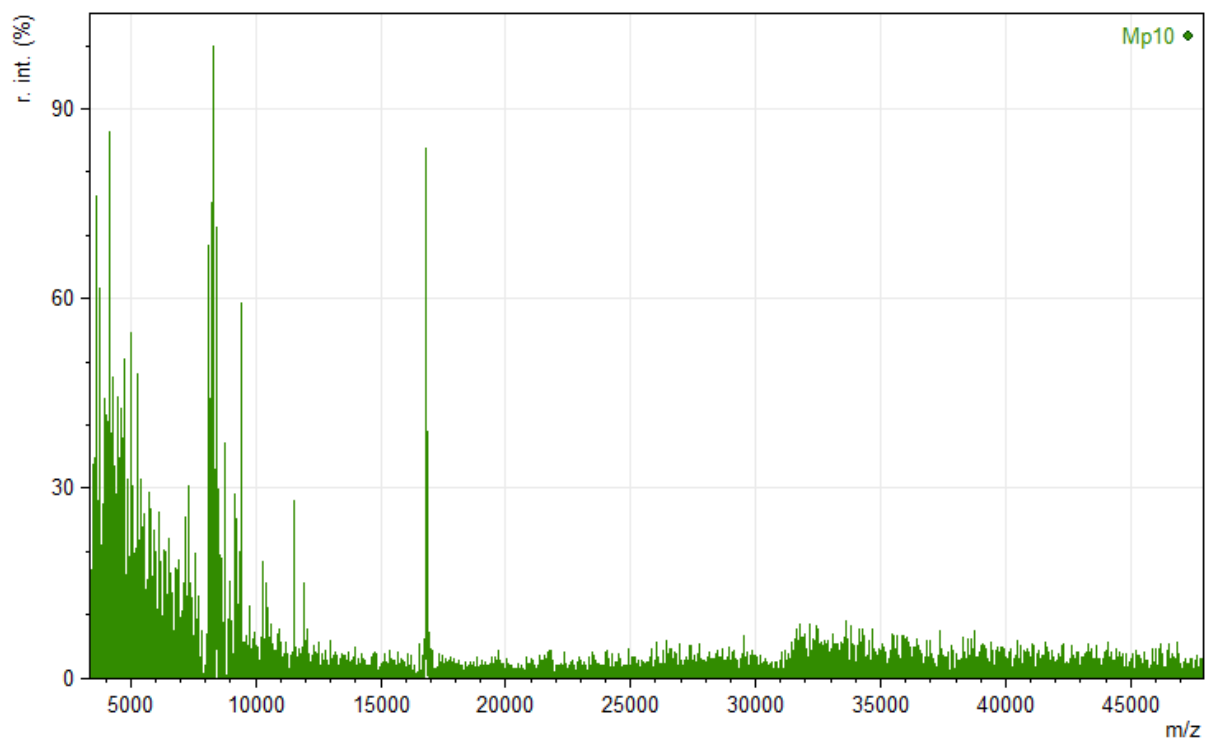


Figura 21. Espectro de masas MALDI-TOF fracción Mp10.