



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
(QUÍMICA ACUÁTICA)

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA DE POSIBLES
CITOLISINAS PRESENTES EN DOS CNIDARIOS DEL LITORAL YUCATECO

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
ADANELY ERÉNDIRA HERNÁNDEZ MUÑOZ

TUTOR PRINCIPAL:
Dr. SERGIO RODRÍGUEZ MORALES
UNIDAD DE QUÍMICA, SISAL, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM
MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
Dra. JUDITH SÁNCHEZ RODRÍGUEZ
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM
Dr. MANUEL B. AGUILAR RAMÍREZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM
Dr. ROBERTO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM
Dr. JOSÉ ESTUARDO LÓPEZ VERA
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, ENERO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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



AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA DE POSIBLES
CITOLISINAS PRESENTES EN DOS CNIDARIOS DEL LITORAL
YUCATECO

T E S I S

Que para obtener el grado académico de:

Maestro en Ciencias

(Química acuática)

Presenta:

ADANELY ERÉNDIRA HERNÁNDEZ MUÑOZ

Director de Tesis: DR. SERGIO RODRÍGUEZ MORALES

Comité Tutorial: DRA. JUDITH SÁNCHEZ RODRÍGUEZ

DR. MANUEL B. AGUILAR RAMÍREZ

DR. ROBERTO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS

Dr. JOSÉ ESTUARDO LÓPEZ VERA

Ciudad de México, 2017

A estos seres que son mi inspiración,
ejemplo, sonrisa... mi corazón:
Leonila, Ernesto, Evelyn y Zoe

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y al proyecto PAIP 5000-9147 de la Facultad de Química, UNAM “Productos Naturales Marinos de la Costa Yucateca” por brindarme la oportunidad de realizar los estudios de maestría, por la subvención concedida y financiamiento que en conjunto permitieron la realización del proyecto.

Al Dr. Sergio Rodríguez Morales por su orientación en mi formación profesional, su entrega y constancia para el proyecto, enseñanzas, refuerzo en muestreos, por su amistad y apoyo desde el inicio de mi estancia en Sisal y por todas las consentidas que nos dio a sus tutorados.

A la Dra. Judith Sánchez, Dr. Manuel Aguilar, Dr. Estuardo López y Dr. Roberto Arreguín, quienes conformaron el comité tutorial, por el tiempo dedicado y cada uno de sus aportes al proyecto.

A la Pas. de Doctorado Angélica Márquez por todas las palabras de aliento y por su asistencia técnica y a la M. en C. Korynthia López por sus recomendaciones en el manejo de equipo.

A la Dra. Elsa Noreña del Laboratorio de Biogeoquímica y calidad de agua por sus atenciones, consejos y pláticas enriquecedoras.

A la M. en C. Laura Celis Gutiérrez por su cálida recepción en la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales, además de su invaluable asesoramiento en la identificación de las medusas. Al igual que al Dr. Ricardo González Muñoz por todo el apoyo con la identificación de las anémonas.

M. en C. Karla Escalante por su entusiasta guía en el laboratorio de biología molecular y a la M. en C. Ariadna Sánchez por su ayuda con el análisis de proteínas.

Al Dr. Carlos Rosas y a la M. en C. Claudia Caamal por abrirme las puertas del Laboratorio de Pulpo y por su disposición total en la instrucción de uso de equipos.

A la técnico Patricia Balam y Dra. Gabriela Palomino del Laboratorio de Alimento Vivo, por su atenta disposición de cultivos de artemia para los bioensayos.

Al Dr. Alejandro Yam quien además de ser un excelente maestro, es una persona ejemplar y un amigo incondicional, gracias por todas las aventuras conociendo Yucatán, por cada comida que supo a cariño y por acentuar mi gusto por la química.

A mis compañeros del Laboratorio de Productos Naturales Carmen, Yess Parera, Yoli, Chucho, Adri, por aquellas reuniones y conversaciones que hicieron aún mas ameno cada día.

A mis alumnas Fernanda y Jaqueline, por su ayuda en el muestreo de medusas así como por la chispa que añadieron al laboratorio durante su estancia. Fue muy divertido aprender con ustedes.

A mis geniales y ocurrentes amigos, gracias por los momentos: *Sensei* Quique, compañero cinéfilo y cómplice, de verdad que fuiste un gran apoyo para mí; Itzel, por siempre estar ahí, con exactamente esas palabras; LOL, digo Luis XD, por tantos momentos graciosos; a mis chicas preciosas Mariani y Katya, por toda la confianza y afecto; a mis caóticos flaquitos, Mario y Lalo, y claro a mi C'mon ya! Roomie Lore.

A Doña Lucy y Don Xavis, mi familia adoptada, porque a partir de que los conocí forman parte de mis travesías, confiando enteramente en mí.

A mi inigualable familia: Leonila, Ernesto, Evelyn y Zoe. En cada uno de los pasos que doy siempre encabezan mis pensamientos. Son y serán mi inspiración, pues no podría conseguir mejores ejemplos de entrega, constancia, cariño por lo que se hace, perseverancia y valores. Gracias por apoyarme y acompañarme con todo su amor a donde quiera que voy.

Y por último y no menos importante, a Dios, gracias.

Contenido

Índice de Figuras	1
Índice de tablas	3
Resumen	4
1 INTRODUCCIÓN	5
2 ANTECEDENTES	10
2.1 Organismos marinos como productores de productos naturales	10
2.2 Cnidarios	12
2.2.1 Productos naturales de cnidarios	14
2.2.1.1 Toxinas no peptídicas	14
2.2.1.2 Neuropeptidos	15
2.2.1.3 Citolisinas	16
2.2.2 Moléculas antiparasitarias y anticancerígenas obtenidas a partir de cnidarios	17
2.3 Clase Scyphozoa	20
2.4 <i>Cassiopea xamachana</i>	21
2.4.1 Clasificación taxonómica	21
2.4.2 Diagnósis	21
2.4.3 Biología y distribución	23
2.4.4 Bioactividad en <i>Cassiopea xamachana</i>	24
2.5 <i>Bunodosoma cavernatum</i>	26
2.5.1 Clasificación taxonómica	26
2.5.2 Diagnósis	26
2.5.3 Biología y distribución	27
2.5.4 Bioactividad en anémonas (clase Anthozoa, orden Actinaria)	28
2.5.5 Bioactividad en el género <i>Bunodosoma</i>	29
2.6 Parasitosis	32
2.6.1 <i>Giardia intestinalis</i>	33
2.6.2 <i>Entamoeba histolytica</i>	35
2.6.3 <i>Trichomonas vaginalis</i>	36
2.7 Cáncer	36
3 JUSTIFICACIÓN	39
4 HIPÓTESIS	40
5 OBJETIVOS	40
5.1 General	40
5.2 Particulares	40
6 MATERIALES Y MÉTODOS	41
6.1 Recolecta de organismos	41
6.2 Identificación taxonómica	41
6.3 Obtención del extracto crudo	42
6.3.1 Extracción	42
6.3.1.1 Maceración de <i>C. xamachana</i>	42
6.3.1.2 Maceración de <i>B. cavernatum</i>	43
6.4 Evaluación de actividad biológica de extractos/fracciones obtenidas a partir de <i>C. xamachana</i>	43

6.4.1	Neurotoxicidad en <i>Ocypode quadrata</i>	43
6.4.2	Actividad hemolítica.....	44
6.4.3	Letalidad en <i>Artemia salina</i>	45
6.4.4	Actividad embriotóxica en pez cebra (<i>Brachydanio rerio</i>)	45
6.4.5	Actividad antiparasitaria por el método de subcultivos.....	47
6.5	Evaluación de actividad biológica de extractos/fracciones obtenidas a partir de <i>B. cavernatum</i>	48
6.6	Purificación de extractos y fracciones activas	48
6.6.1	Obtención de fracciones por exclusión molecular (ultrafiltración) ...	48
6.6.1.1	Determinación de proteínas en microensayo por el método de Bradford.....	49
6.6.1.2	Visualización del fraccionamiento por tamaño molecular mediante gel SDS-PAGE	50
6.6.2	Extracción en fase sólida (C18-T)	50
6.6.3	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) en fase reversa C-18	51
6.6.4	CLAR en gel permeable	51
7	CAPÍTULO 1	52
	Resultados y discusión	53
7.1.1	Recolecta e identificación del organismo	53
7.1.2	Generación del extracto crudo.....	55
7.1.3	Perfiles cromatográficos de fracciones activas.....	60
7.2	Conclusiones	72
8	CAPÍTULO 2	73
8.1.	Resultados y discusión.....	74
8.2.	Conclusiones.....	78
8.3.	Perspectivas.....	78
9	REFERENCIAS	79

Índice de figuras

Figura 1. Estructuras moleculares de a: ácido kaínico, b: bengamida, c: Cefalostatina y d: Citarabina.	6
Figura 2. Secuencia de aminoácidos de la ω -conotoxina.	10
Figura 3. Estructura molecular de la trabectedina.	11
Figura 4. Compuestos antiparasitarios de la esponja <i>Verongula rigida</i> . a: Puralidina B y b: 11-hidroxiaerotionina.	12
Figura 5. Clasificación taxonómica del <i>phylum</i> Cnidaria (Daly <i>et al.</i> 2007).	13
Figura 6. Estructuras de cembranoides (Ferchmin <i>et al.</i> 2009). a: metilpseudoplexaurato (los números en azul comprenden a los carbonos del anillo cembranoide), b: sarcofitol A, c: eunicina y d: lofotoxina.	14
Figura 7. Estructura química de la palytoxina.	15
Figura 8. Estructuras tridimensionales de a: sticolisina I y b: equinatoxina II.	16
Figura 9. Secuencia de aminoácidos correspondiente a la aurelina.	21
Figura 10. Vista lateral de un espécimen del género <i>Cassiopea</i> (Modificada de Hamlet <i>et al.</i> 2011).	22
Figura 11. Plano oral de <i>Cassiopea</i> (Modificada de Hamlet <i>et al.</i> 2011).	22
Figura 12. Estructura externa básica de una anémona (Modificado de Brusca & Brusca 2003).	27
Figura 13. Ciclo de vida de <i>G. lamblia</i>	.34
Figura 14. Conformación del bioensayo de embriotoxicidad en microplaca. C's: Concentración x de extracto/fracción x; control positivo (+), control negativo (-).	47
Figura 15. a: Laguna de lixiviación de la UAS-UNAM en Sisal, Yucatán y b: Medusas del género <i>Cassiopea</i> en su hábitat.	53
Figura 16. <i>Cassiopea xamachana</i> . a: A la izquierda se puede observar una medusa situada sobre el sedimento; a la derecha, se observa un organismo en locomoción. b: región aboral y c: zona oral.	54
Figura 17. Nematocisto disparado y fotosimbionte de <i>C. xamachana</i> .	54
Figura 18. Gel SDS-PAGE (revelado con tinción negativa) de extractos crudos acuosos de <i>C. xamachana</i> .	57
Figura 19. Gel SDS-PAGE (revelado con tinción de comassie G-250) de extracto y fracciones de Boac	58
Figura 20. Nematocistos no disparados (o) y fotosimbionte (o) de <i>C. xamachana</i> observados a 100X.	60
Figura 21. Cromatograma en fase reversa de la fracción de 5-3 kDa, obtenida a partir de la extracción BOac	61
Figura 22. Cromatograma en fase reversa de la fracción de 10-5 kDa, obtenida a partir de la extracción BOac.	61
Figura 23 . Gráfica del porcentaje de hemólisis en cada esquema de extracción.	66
Figura 24. Cromatogramas de la fracción 30-10 de <i>B. cavernatum</i> en fase reversa	75

- Figura 25.** Cromatograma de la fracción 70:30 de *B. cavernatum* en fase reversa. 76
- Figura 26.** Cromatograma de la fracción 70:30 de *B. cavernatum* por exclusión molecular 76
- Figura 27.** Gel SDS-PAGE para las fracciones 30-10, 60:40 y 70:30. 77

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de las citolisinas de acuerdo a sus propiedades moleculares	17
Tabla 2. Compuestos antitumorales con alto potencial bioactivo aislados a partir de cnidarios (Rocha <i>et al.</i> 2011).	19
Tabla 3. Reactivos para preparación del gel SDS-PAGE.	50
Tabla 4. Rendimientos de extracciones metanólicas de <i>C. xamachana</i>	55
Tabla 5. Rendimientos de extracciones acuosas y fracciones obtenidas mediante ultracentrifugación a partir de cuerpo completo y brazos orales de <i>C. xamachana</i>	56
Tabla 6. Cantidad de proteínas en extracto de <i>C. xamachana</i> y fracciones de CC _{ac} y sus actividades respectivas.	59
Tabla 7. Actividad neurotóxica del extracto y fracciones obtenidas de Boac.	59
Tabla 8. Actividad del extracto crudo y fracciones acuosas obtenidas de BOac.	62
Tabla 9. Rendimientos de la separación por EFS de las fases gruesa y fina de la fracción 10-5 de <i>C. xamachana</i> y actividad hemolítica.	63
Tabla 10. Extracciones realizadas a partir de <i>C. xamachana</i> con distintos esquemas y resultados de pruebas de hemólisis.	65
Tabla 11. Información de muestreos de <i>C. xamachana</i>	66
Tabla 12. Relación de bandas proteicas observadas por SDS-PAGE y actividad hemolítica en extractos de <i>Cassiopea</i> de diferentes localidades.	67
Tabla 13. Rendimiento y actividad hemolítica de la fracción 30-10 de <i>B. cavernatum</i>	74
Tabla 14. Rendimientos y actividad de las fracciones obtenidas con EFS a partir de la fracción 30-10 de <i>B. cavernatum</i> .	75

Resumen

Se planteó estudiar a la medusa *Cassiopea xamachana* y a la anémona *Bunodosoma cavernatum* de la costa yucateca, con el objetivo de obtener moléculas citolíticas y determinar su perfil farmacológico. Se desarrolló un esquema de separación biodirigida que conllevó en primer lugar la obtención del extracto crudo acuoso a partir de brazos orales de organismos liofilizados. A continuación, se realizó una separación mediante ultrafiltración con membranas de corte 100, 30, 10, 5, 3 y 1 kDa. Se corroboró el éxito de la separación mediante un gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) para proceder a los bioensayos que incluyeron letalidad en *Artemia salina*, neurotoxicidad en *Ocypode quadrata*, embriotoxicidad en *Brachydanio rerio*, actividad antiparasitaria en *G. Intestinalis* y hemólisis. Con ello se evidenció actividad hemolítica y letal en *O. quadrata* de la fracción 10-5 kDa misma que fue analizada por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) en fase reversa con lo que se observaron alrededor de siete compuestos o grupos de compuestos, sin embargo, ésta perdió la actividad 15 días después de su obtención. Se realizó otra colecta y se generó dicha fracción, nuevamente inactiva. Se plantearon seis esquemas de separación, que incluyeron EFS, inhibidor de proteasas, tiempos de fraccionamiento más cortos, entre otros, pero en ninguno se recuperó la actividad, esto sugirió que la obtención de fracciones inactivas no estaba influenciada por el procedimiento de separación, sino probablemente a una variación espacio-temporal.

Para el caso de la anémona, se obtuvo directamente el corte 30-10 kDa y para la biodirección se utilizó únicamente el ensayo de hemólisis de acuerdo a los resultados de Álvarez-Bohórquez 2016. La fracción 30-10 kDa se probó con 100% de hemólisis y se sometió a extracción en fase sólida (EFS) C18-T. La actividad más prominente quedó retenida en la fracción 70:30 H₂O/ACN con 83.26% de hemólisis, por lo que se procedió a analizarla por CLAR en fase reversa donde se observó una señal mayoritaria entre los minutos 5 y 6. Se procedió a hacer un gel SDS-PAGE con las fracciones 30-10, 70:30 y 60:40 (que propició un 24% de hemólisis). Se observó una única banda exclusiva en las fracciones activas 30-10 y 70:30 de aproximadamente 14 kDa, por lo que se considera que es el compuesto activo.

1 INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas se ha reconocido el gran potencial que poseen los organismos marinos como productores de sustancias bioactivas distintas a las que comúnmente se extraían a partir de microorganismos y plantas terrestres, y es de esperarse, ya que evidentemente se encuentran sometidos a condiciones distintas, y como resultado sintetizan moléculas muy diferentes a las terrestres (Garateix 2005). No obstante, se han reportado compuestos antiparasitarios aislados a partir de organismos marinos como el ácido α -kaínico (Fig. 1a) de un alga roja o la bengamida F (Fig. 1b) de un pepino de mar (Blunden 2001) así mismo, se han encontrado compuestos anticancerígenos como la cefalostatina 1 (Fig. 1c) de un poliqueto tubícola y de una esponja la spongouridina, de la cual se derivó la citarabina (Ara-C) (Fig. 1d).

No obstante, uno de los principales factores colaterales que genera el aumento desmesurado de la población mundial, la movilidad, inmigración y la baja calidad de las medidas de saneamiento es el incremento en la ocurrencia de las enfermedades por parásitos (Ash & Orihel 2007). La Organización Mundial de la Salud (WHO por sus siglas en inglés) ha documentado dicho aumento en la mayor parte de los países durante las últimas décadas.

Las infecciones parasitarias afectan a millones de personas y causan gran cantidad de muertes en todo el mundo sin embargo, la prevalencia de las mismas es mucho mayor en los países en vías de desarrollo, principalmente por falta de higiene (Renslo & McKerrow 2006). Entre los organismos que causan mayor problemática a este respecto se encuentran *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis*, que son protozoos que carecen de una mitocondria típica (por lo que se les conoce como “amitocondriados”). Los dos primeros producen infecciones en el tubo digestivo mientras que el último infecta el tracto urogenital; afectan a 280 y 180 millones de personas al año, respectivamente (Ali & Nozaki 2007).

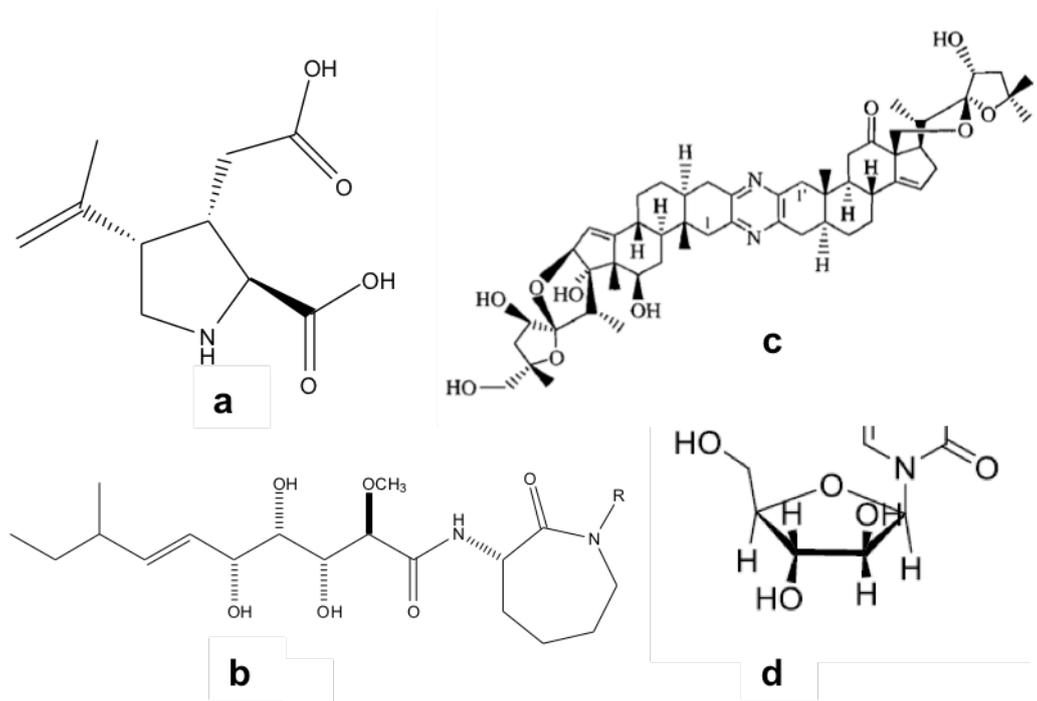


Figura 1. Estructuras moleculares de a: ácido kaínico, b: bengamida, c: cefalostatina y d: citarabina.

La incidencia de este tipo de enfermedades podría disminuir de forma importante con la implementación de las medidas de higiene adecuadas; por ejemplo, el consumo de agua potable, desinfección de alimentos (frutas y verduras) previo a la ingesta, lavado de manos antes y después de ir al baño, entre otras; sin embargo, los lugares donde ocurren los mayores índices de infecciones carecen de la infraestructura para llevar a cabo procesos tan importantes como la potabilización el agua o la pasteurización (Crompton & Savioli 1993).

Otro de los problemas de salud con gran impacto a nivel mundial es el cáncer, éste es básicamente una multiplicación masiva de células en un órgano o tejido del cuerpo; tiene la capacidad de invadir tejidos diferentes al de origen y efectos muy severos en la salud, formando parte de las principales causas de muerte. La enfermedad se puede presentar en más de 100 formas, y cada una tiene tratamientos específicos; no obstante, las afecciones que causan mayores tasas de mortalidad son el cáncer de pulmón, hígado, estómago e intestino (WHO, 2016).

Los dos factores determinantes en la incidencia del cáncer están conformados por los genéticos y por los ambientales como la exposición a químicos, contaminantes, radiación UV y agentes infecciosos (virus, bacterias); la edad es otra variable de relevancia al respecto, ya que a pesar de que el cáncer se presenta en personas de todas las edades, hay una mayor incidencia en la población de edad avanzada, que en conjunto conforma el 60% de los casos nuevos (INC 2016).

Durante el 2012 se registró un total de 14.1 millones de casos nuevos a nivel mundial, lo que quiere decir que el total de casos nuevos corresponde casi al doble de la cantidad de muertes a causa de cáncer registradas durante el mismo año (8.2 millones), más de la mitad de las cuales ocurrieron en países de bajos recursos (CRUK 2016; OMS 2016).

Afortunadamente aún es posible recurrir a algunas medidas para reducir el número de víctimas; esto conlleva cambios en los hábitos diarios e inmunización mediante vacunas. Al momento se encuentran disponibles varios fármacos empleados en las quimioterapias; sin embargo, estos no son efectivos para todo tipo de cáncer (INC 2016).

De esta forma, la necesidad de recurrir a nuevos fármacos ha sido inminente. Actualmente la mayor parte de los medicamentos usados para tratar estas enfermedades tienen una eficacia limitada, sin considerar la gran cantidad de efectos adversos que producen.

Aun así, la preocupación recae primordialmente en la resistencia que los microorganismos y células pueden crear contra los medicamentos disponibles en el mercado y que, a diferencia de las bacterias, los parásitos comparten muchas vías metabólicas y estructuras con las células humanas, por lo que la gama de posibilidades terapéuticas se ve reducida; además de que implican mayor riesgo para el ser humano (OMS 1998).

Sin embargo, contrariamente a las necesidades, la inversión y por tanto la investigación para la obtención de nuevos compuestos bioactivos se ha visto disminuida, precisamente porque la mayor parte de los países afectados son de bajos recursos de forma tal que para la industria farmacéutica no es un objetivo viable para el mercado; de este modo, la cantidad de fármacos novedosos ha ido decreciendo, por lo que es posible que en un futuro no exista acceso a compuestos activos eficaces (OMS 2014).

Algunos de los especímenes pertenecientes al *phylum* Cnidaria han mostrado poseer gran variedad de compuestos activos. Éste comprende un diverso grupo de organismos marinos que se caracterizan por sintetizar células que encapsulan túbulos enrollados disparables que son venenosos y urticantes llamados cnidocitos (Daly *et al.* 2007). Dentro del filo los organismos más prometedores como fuentes de productos bioactivos se encuentran agrupados en los órdenes Alcyonacea (corales blandos y gorgonias), Scleractinia (corales duros) y Actinaria (anémonas), los que producen compuestos prometedores mayormente clasificados dentro del grupo de los terpenos (monoterenos diterpenos y sesquiterpenos) con actividad antitumoral; cabe mencionar que el primer grupo es el que hasta el presente han contribuido con el mayor número de compuestos bioactivos potenciales (Rocha *et al.* 2011).

Estudios previos de sustancias con viabilidad farmacológica obtenidas a partir de cnidarios revelan que otro tipo de moléculas altamente bioactivas corresponden a péptidos y proteínas, que, en el caso de las anémonas, de acuerdo a su estructura primaria y propiedades funcionales se han clasificado en cuatro grupos. El grupo I se encuentra conformado de péptidos de 5-8 kDa, el grupo II de proteínas básicas de 20 kDa, el III por fosfolipasas citolíticas de 30-40 kDa y el IV conformado por una citolisina con una masa de 80 kDa (Anderluh & Macek 2002; Carstensen *et al.* 1993; Castañeda *et al.* 1995).

Por otro lado, dentro de la clase Scyphozoa del filo Cnidaria se encuentran las medusas verdaderas, organismos que habitan casi todos los ecosistemas marinos; en algunas regiones han sido estudiados ampliamente en aspectos taxonómicos y biológicos; no obstante, aún se desconocen muchos de los compuestos que producen y/o las aplicaciones que se les puede dar.

A pesar de que la clase Scyphozoa no ha sido exhaustivamente estudiada a este respecto se ha reportado un compuesto peptídico llamado aurelina que posee actividad antibacterial importante; fue obtenido a partir de *Aurelia aurita*, una medusa perteneciente al orden Semaestomeae (Ovchinnikova *et al.* 2006). Además, se ha demostrado que el extracto crudo acuoso de la medusa *Cassiopea* sp. posee compuestos con actividad inhibitoria en *Giardia intestinalis* (Morales-Landa *et al.* 2007).

Por su parte, las anémonas (Clase Actinaria) han provisto de gran cantidad de péptidos con afinidad a varios canales iónicos lo que ha contribuido al conocimiento tanto estructural como funcional de los mismos (Garateix & Rodríguez 2010). También producen polipéptidos con capacidad de formar poros en membranas biológicas, cualidad que se está explorando biotecnológicamente con resultados prometedores; por ejemplo, la equinatoxina II (EqTx II) de *Actinia equina* muestra efecto citotóxico ante células cancerígenas de tumores cerebrales o glioblastomas (Soletti *et al.* 2008).

Con base en la información previa, se enfatiza la importancia de continuar con estudios que provean de nuevos fármacos, de forma tal que el ritmo de la evolución de las enfermedades de distintas índoles no supere los recursos disponibles en materia de salud y que quizá las respuestas a muchos de los retos pertinentes al tema se encuentran inmersas en los organismos que habitan el océano. Por lo anterior, para la presente investigación se planteó como objetivo el llevar a cabo las estrategias para el aislamiento de polipéptidos presentes en la medusa invertida *Cassiopea xamachana* y en la anémona *Bunodosoma cavernatum* mediante la aplicación de un esquema biodirigido, en búsqueda del/de los componentes con actividad biológica.

2 ANTECEDENTES

2.1 Organismos marinos como productores de productos naturales

Durante mucho tiempo la obtención de metabolitos activos se direccionó al medio terrestre, por razones de practicidad, asequibilidad, entre otras; sin embargo, a partir de 1960, la atención se comenzó a redirigir hacia el ambiente marino. Actualmente podemos ser testigos de que el atractivo resultante a partir de la belleza, diversidad y singularidad de las especies de dicho medio no únicamente se limitó a eso, sino que, ha sido producto del descubrimiento de moléculas con distintas propiedades, por lo que la investigación en relación al tema continúa en aumento (Perdicaris *et al.* 2013).

Debido a la problemática actual existente respecto a gran variedad de enfermedades, la ciencia se ha mantenido en la búsqueda de alternativas para tratar de cubrir algunas de las necesidades; de esta manera desde 1900 hasta el momento se han obtenido cerca de 25,000 moléculas bioactivas del medio marino y a la fecha se cuenta con algunos medicamentos comercializados tanto en Estados Unidos como en Europa (Costa-Leal *et al.* 2007; Blunt *et al.* 2015).

El Ziconotide[®] o también conocido como SNX-111, es la versión sintética de la ω -conotoxina MVIIA (Fig. 2), aislada a partir del molusco marino *Conus magus*. Este compuesto es de origen peptídico y tiene un poderoso efecto analgésico debido a que tienen un mecanismo de acción de bloqueo fuerte y selectivo de canales de calcio, así, se emplea en pacientes con dolor severo crónico, con la gran ventaja de no generar adicción o tolerancia (McIntosh *et al.* 1982; McGivern 2007).

C-K-G-K-G-A-K-C-S-R-L-M-Y-D-C-C-T-G-S-C-R-S-G-K-C

Figura 2. Secuencia de aminoácidos de la ω -conotoxina MVIIA.

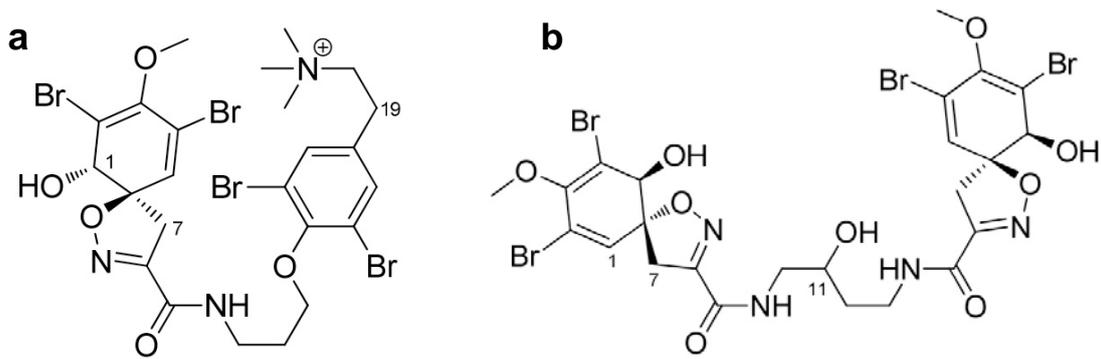


Figura 4. Compuestos antiparasitarios de la esponja *Verongula rigida*. **a:** purealidina B y **b:** 11-hidroxiaerotionina.

2.2 Cnidarios

El phylum Cnidaria es un grupo de metazoos diploblásticos, mayormente marinos que incluye especies tanto sésiles como planctónicas. Carecen de cefalización, poseen simetría radial, una única cavidad corporal (gastrovascular) y tentáculos (Brusca & Brusca 2003).

El éxito del grupo es atribuido a su tendencia a formar colonias por reproducción asexual y por un ciclo de vida dimórfico (con una fase de pólipo y otra de medusa); la mayor parte son carnívoros sésiles o planctónicos, aunque otros son suspensívoros y hay especímenes que viven en simbiosis con microalgas del género *Symbiodinium*, las cuales les proveen de energía (Brusca & Brusca 2003).

Una de las ventajas evolutivas más importantes dentro del filo es la posesión de estructuras urticantes o adhesivas llamadas cnidae (microcápsulas que contienen el “aguijón”) que son su principal mecanismo de defensa, captura e inmovilización de presas, digestión, repelencia de predadores y competencia espacial (Frazão *et al.* 2012). Cada cnida (singular de cnidae) es secretada por el aparato de Golgi de una célula llamada cnidoblasto (Brusca & Brusca 2009).

Hay tres tipos de cnidae con sus respectivos cnidoblastos: los nematocistos (originados por nematoblastos) liberan el veneno a través de la piel, los pticocistos (originados por pticoblastos) están envueltos en protección mientras que los spirocistos (originados por spiroblastos) sirven como estructuras de adhesión; estos últimos dos están restringidos a una parte de los cnidarios (Fautin 2009; Frazao *et al.* 2012).

La clasificación engloba a los comúnmente conocidos como corales, anémonas, medusas e hidras en 5 clases, 5 subclases, 21 órdenes (Fig. 5), y aproximadamente 11,000 especies (Daly *et al.* 2007)

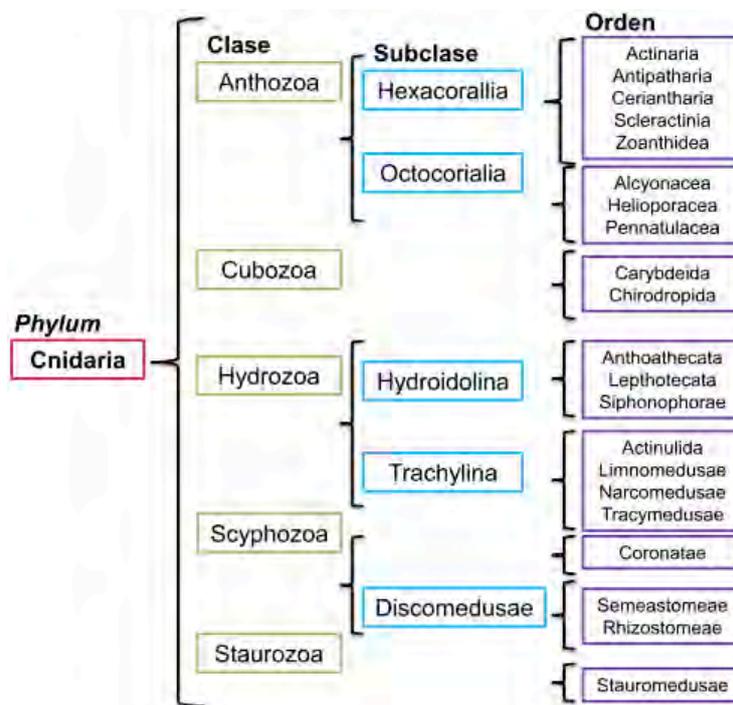


Figura 5. Clasificación taxonómica del *phylum* Cnidaria (Daly *et al.* 2007).

La importancia de los cnidarios va más allá del significativo papel que desempeñan ecológicamente, o del ingreso económico que generan como atracción turística, como es el caso de los corales que establecen enormes arrecifes y que además conforman uno de los ecosistemas más atractivos, que durante las últimas décadas de esfuerzo científico han propiciado el descubrimiento de moléculas que son producidas por ellos y que tienen propiedades únicas aplicables en distintos campos como la farmacología.

2.2.1 Productos naturales de cnidarios

El *phylum* cnidaria comprende aproximadamente 13,000 especies de organismos que en su mayoría producen toxinas, las cuales actualmente se clasifican en toxinas no peptídicas, neuropéptidos y citolisinas (Turk & Kem 2009).

2.2.1.1 Toxinas no peptídicas

Los corales blandos (orden Alcyonacea) producen metabolitos bioactivos como medio defensivo, entre los cuales se encuentran los terpenos, mismos que comprenden a los cembranoides, diterpenos que contienen un anillo de 14 carbonos con distintos grados de oxigenación; un ejemplo de éstos es la eunicina aislada a partir del octocoral *Eunicea mammosa* (Fig. 7) (Ferchmin *et al.* 2009).

La bioactividad de los cembranoides incluye efectos en los receptores nicotínicos. La lofotoxina (LTX) (Fig. 6), obtenida del género *Lophogorgia*, produce bloqueo lento e irreversible en la unión neuromuscular en el diafragma de ratas (Culver & Jacobs 1981; Fenical *et al.* 1981).

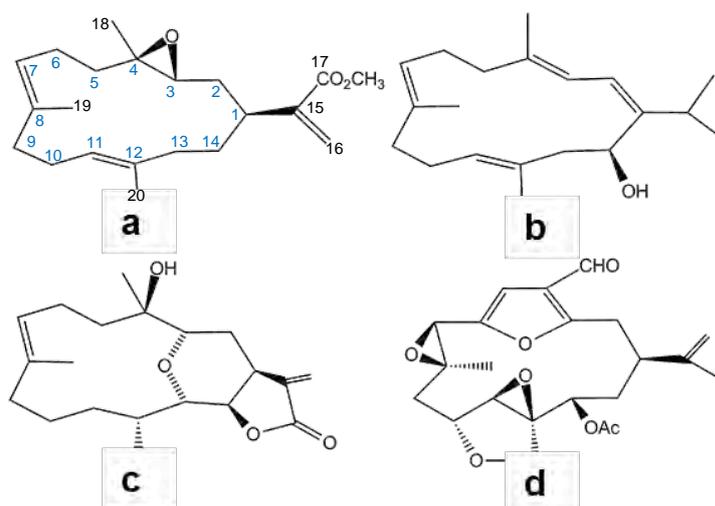


Figura 6. Estructuras de cembranoides (Ferchmin *et al.* 2009). **a:** metilpseudoplexaurato (los números en azul comprenden a los carbonos del anillo cembranoide), **b:** sarcophitol A, **c:** eunicina y **d:** lofotoxina.

Además, la palytoxina (Fig. 7), una de las toxinas marinas no poliméricas más grandes y letales, se aisló originalmente a partir del género *Palythoa*. Tiene una composición elemental de $C_{129}H_{223}N_3O_{54}$, y actividades biológicas que incluyen una dosis letal 50 (DL₅₀) en conejos de 25 ng/kg, citotoxicidad, hemólisis, contracción violenta de músculos esqueléticos, lisos y cardíacos, actividad masiva de células excretoras, entre otras; se ha aislado de otros organismos como dinoflagelados, anémonas, poliquetos, algas, crustáceos y peces (Wu 2009).

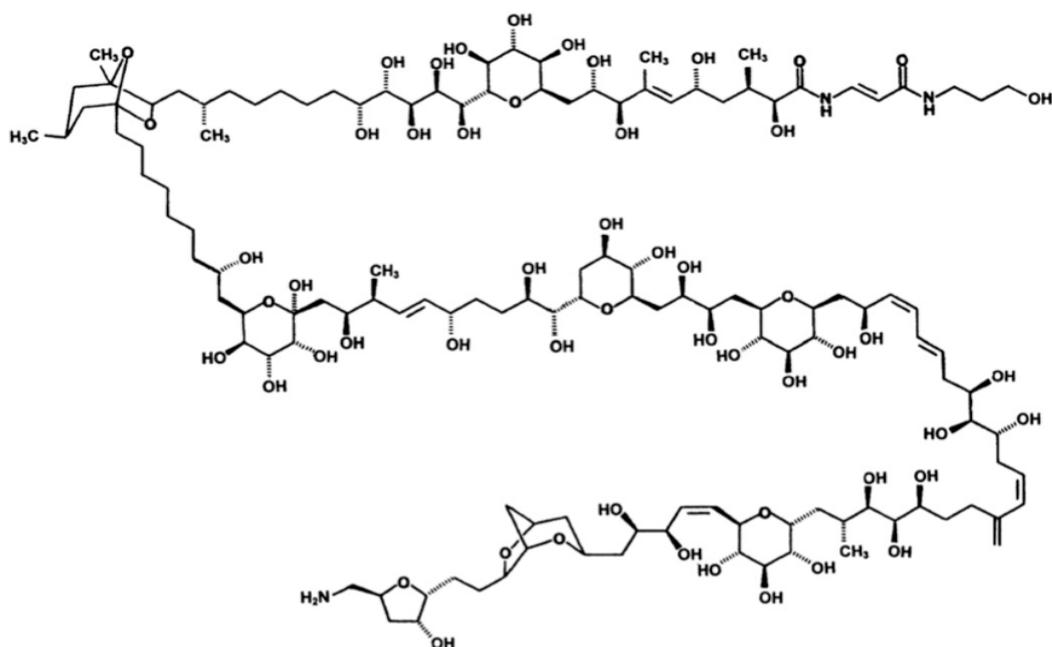


Figura 7. Estructura química de la palytoxina.

2.2.1.2 Neuropéptidos

Por otro lado, los neuropéptidos han sido detectados en gran cantidad de organismos, principalmente en anémonas, y han presentado estructuras con actividades importantes. Éstos se clasifican de la siguiente forma de acuerdo a Norton 2009:

- 1) Toxinas de canales Na^+
 - a. Largas de tipo 1 (Antopleurina A)
 - b. Largas de tipo 2 (ShI de *Stichodactyla helianthus*)
 - c. Cortas de tipo 3 (ATXIII de *Anemonia sulcata*)
 - d. Otras (APETx2 de *Anthopleura elegantissima*)
- 2) Toxinas de canales de K^+ (ShK de *Stichodactyla helianthus*).

Además del efecto visto en canales de sodio y potasio activados por voltaje, se ha reportado actividad de proteasas, fosfolipasas y formación de poros (Garateix & Rodríguez 2010). Así mismo, se han reportado compuestos con actividad antiincrustante (Bragadeeswaran *et al.* 2011), analgésica (Yaroslav *et al.* 2008) y antimicrobiana (Thangaraj *et al.* 2011).

2.2.1.3 Citolisinas

Otro grupo de toxinas producidas ampliamente por los cnidarios, particularmente las anémonas, son las citolisinas (Tabla 1). Como su nombre lo indica, son moléculas que lisan (rompen) las membranas celulares mediante la unión directa o corte de componentes como fosfolípidos o esteroides (colesterol). Hay dos tipos de citolisinas de acuerdo a su modo de acción: las catalíticas y las formadoras de poros (Anderluh *et al.* 1999). Algunas citolisinas ejercen su acción en células específicas, por ejemplo, las hemolisinas, que son aquellas que lisan glóbulos rojos. Este hecho ha permitido el análisis de su potencial terapéutico. No obstante, se han descrito otras con inespecificidad, es decir, que lisan gran variedad de tipos celulares, por lo que se ha planteado el diseño de conjugados moleculares para que los compuestos activos de este tipo hagan un reconocimiento de células específicas como las tumorales y así poder darles un uso terapéutico (Kem *et al.* 1990).

Además, se han reportado tres moléculas aisladas a partir de *Stichodactyla helianthus* llamados sticolisinas StI (Fig. 8a), StII y equinatoxina II (EqII) (Fig. 8b) las cuales han mostrado actividad inhibitoria en el protozooario *Giardia intestinalis* (syn. *duodenalis*) (Tejuca *et al.* 1999).

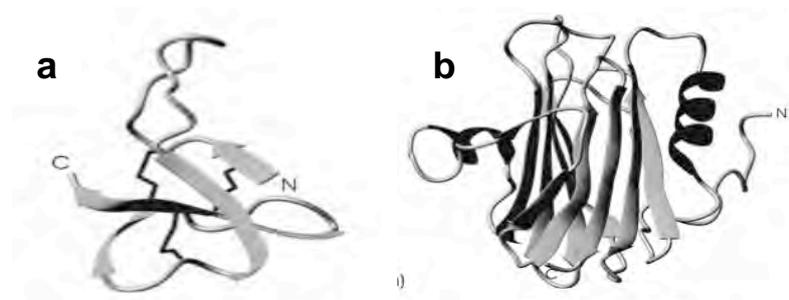


Figura 8. Estructuras tridimensionales de **a:** sticolisina I y **b:** equinatoxina II.

Tabla 1. Clasificación de las citolisinas de acuerdo a sus propiedades moleculares

Grupo	Masa molecular (kDa)	pI	Actividad
I	5-8	>9	Formación de poro; antihistamínica
II	20	>9.5	Formación de poro
III	~30-45	>8.8	Actividad de PLA ₂ ; Formación de poro
IV	80	5.0	Formación de poro

2.2.2 Moléculas antiparasitarias y anticancerígenas obtenidas a partir de cnidarios

Algunas investigaciones se han centrado en el potencial farmacológico antiparasitario de las moléculas producidas por los cnidarios; entre dichas investigaciones se encuentra la publicada durante 1999 por Tejuca *et al.* donde probaron el efecto de las sticolisinas I y II de *Stichodactyla helianthus* además de la equinatoxina de *Actinia equina* contra *Giardia intestinalis*. Los resultados mostraron actividad con C₅₀ (concentración que produce el 50% del efecto máximo) de 0.5, 1.6 y 0.8 nM respectivamente.

Por otra parte, Quero-Remaio *et al.* 2008 evaluaron extractos crudos metanólicos de algunas especies de cnidarios además de un esteroide modificado de *Carijoa riisei* sobre tripomastigotos de *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania* spp.

De esta forma, encontraron que los extractos crudos de *Heterogoria uatumani*, *Leptogoria punicea*, *Macrorhynchia philippina* y *C. rissei* presentan actividad antiparasitaria con una IC₅₀ de entre 2.8 y 93.3 µg/mL contra *Leishmania* spp. y entre 40.9 y 117.9 µg/mL contra *T. cruzi*, mientras que el esteroide (18-acetoxipregna-1,4,20, trien-3-uno) muestra valores de inhibición de 5.5 µg/mL contra promastigotos y 16.88 µg/mL contra amastigotos intracelulares de *Leishmania*.

Por otro lado, Salas-Sarduy *et al.* (2013) obtuvieron una fracción acuosa del coral *Plexaura homomalla* que posteriormente enriquecieron con inhibidores de proteasas de anclaje fuerte y probaron su efecto inhibitorio en cepas de *T. cruzi* y *Plasmodium falciparum*. Con esto, determinaron valores de IC₅₀ de 0.46 µM en *P. falciparum*. También observaron disminución en infección de células Vero (renales) por *T. cruzi* aún en concentraciones nanomolares.

Así mismo, se han reportado una cantidad relevante de compuestos anticancerígenos aislados de cnidarios, la mayoría obtenidos de los órdenes Alcyonacea y Gorgonacea (Tabla 2). Algunos ejemplos incluyen a la blumiolida C, un compuesto diterpenoide de *Xenia blumi* con actividad citotóxica en células leucémicas de ratón y adenocarcinoma de colon humano con DE₅₀ (Dosis Efectiva 50: dosis de un compuesto que produce un efecto deseado en el 50% de los sujetos de prueba) de 0.2 µg/mL y 0.5 µM respectivamente (El-Gamal *et al.* 2005); el hidroxicapneleno de *Dendronephthya rubeola* ejerce un efecto con CI₅₀ de 0.7 µM en contra de líneas celulares cancerígenas implicadas en la patología de la leucemia y de 7.6 µM en carcinoma cérvico, ambos humanos (Grote *et al.* 2008).

Tabla 2. Compuestos antitumorales con alto potencial bioactivo aislados a partir de cnidarios (Rocha *et al.* 2011).

Orden	Familia	Especie	Compuesto	Química
Alcyonacea (Corales blandos y gorgonias)	Alcyoniidae	<i>Klyxum simplex</i>	Klysimplexina B y H	Diterpenoide
		<i>Lobophytum sp.</i>	Lobofiteno	Diterpenoide
		<i>Lobophytum cristagalli</i>	Diterpeno cembranólido	Diterpenoide
		<i>Sarcophytum crassocaulae</i>	Crassocólidos H-M	Cembranoide
		<i>Sinularia flexibilis</i>	Flexilarina D	Cembranoide
	Clavulariidae	<i>Clavularia koellikeri</i>	Diterpenoide tipo cembrano	Diterpenoide
		<i>Clavularia viridis</i>	Ácido clavirídico	Prostanoide
		<i>Clavularia viridis</i>	Clavulonas	Prostanoide
		<i>Clavularia viridis</i>	Claviridenona	Prostanoide
		<i>Clavularia viridis</i>	Prostanoide halogenado	Prostanoide
		<i>Clavularia viridis</i>	Bromovulona III	Prostanoide
		<i>Clavularia viridis</i>	Yonarasteroles	Esteroides
		<i>Clavularia viridis</i>	Stoloniferona E	Esteroides
	Nephtheidae	<i>Telesto riisei</i>	Punaglandinas	Prostaglandina
		<i>Dendronephthya rubeola</i>	Capnella-9-ene-8 β ,10 α -diol	Sesquiterpenoide
	Xennidae	<i>Nephthea chabroli</i>	Chabranol	Terpenoide
		<i>Asterospicularia laurae</i>	Asterolaurina A	Diterpenoide
		<i>Cespitularia hypotentaculata</i>	Cespitularina C	Diterpenoide
	Briareidae	<i>Xenia plicata</i>	Blumiolida C	Diterpenoide
		<i>Briareum excavate</i>	Briaexcavatolidos L y P	Diterpenoide
	Gorgoniidae	<i>Pseudopterogorgia sp.</i>	Secosteroles	Esterol
		<i>Pseudopterogorgia acerosa</i>	Bis(pseudopterano) amina	Dialkylamina
		<i>Pseudopterogorgia kallos</i>	Bielschowskysina	Diterpenoide
	Isididae	<i>Isis hippuris</i>	Suberosenol B	Terpenoide
		<i>Isis hippuris</i>	Esteroides polioxigenados	Esteroides
		<i>Isis hippuris</i>	A-nor-hippuristanol	Esteroides
		<i>Isis hippuris</i>	Ácido isishippurico B	Esteroides

Además, de origen proteico se ha aislado la equistatina de *Actinia equina*, con efecto inhibitorio en cisteinproteasas similares a la papaína, las cuales están implicadas en algunas enfermedades incluyendo tumores cerebrales; así mismo, ha mostrado fuerte inhibición específica en la proteinasa aspártica catepsina D implicada en la patogenicidad del cáncer de mama (Lenarcic & Turk 1999; Wolf *et al.* 2003).

De esta forma se pone de manifiesto la potencialidad del filo Cnidaria como un grupo productor de compuestos bioactivos. Aún hay gran cantidad de organismos que no se han estudiado en el campo de los productos naturales marinos, o bien, que cuyas propiedades farmacológicas han sido analizadas únicamente a nivel de extractos, mismos que han propiciado actividades potentes, lo que podría indicar la presencia de compuestos que una vez aislados podrían potenciar de forma importante su efecto en los distintos modelos biológicos y así guiar a moléculas líder.

2.3 Clase Scyphozoa

Entre las clases de cnidarios que han sido relativamente poco estudiadas en el área de productos naturales se encuentra la clase Scyphozoa, la cual está compuesta por alrededor de 200 especies exclusivamente marinas en los que predomina la fase medusoide aunque en el algunos casos la fase polipoide se reproduce de forma asexual mediante un proceso conocido como estrobilación para originar medusas.

A pesar de que la clase Scyphozoa no ha sido exhaustivamente estudiada a este respecto ya se ha descrito la actividad hemolítica de un extracto crudo acuoso de la medusa *Pelagia noctiluca* de la región del Mar Caribe. Dicho extracto mostró un contenido proteico de 0.25 mg/mL y actividades del 100 y 50% de hemólisis a 1.1 y 0.98 µg/mL respectivamente (Sánchez-Rodríguez & Lucio-Martínez 2011).

Además, se ha obtenido un compuesto peptídico del orden Semaestomeae llamado aurelina (Fig. 9), aislado de la medusa *Aurelia aurita* el cual posee actividad antibacteriana con IC₅₀ de hasta 7.7 µg/mL en *Escherichia coli* (Ovchinnikova *et al.* 2006).

AACSDRAHGHICESFKSFCKDSGRNGVKLRANCKKTCGLC

Figura 9. Secuencia de aminoácidos correspondiente a la aurelina.

2.4 *Cassiopea xamachana*

2.4.1 Clasificación taxonómica

Phylum: Cnidaria

Clase: Scyphozoa

Orden: Rhizostomeae

Género: *Cassiopea* (Péron & Lesueur 1809)

Especie: *Cassiopea xamachana* (Bigelow 1906)

2.4.2 Diagnósis

Los organismos incluidos en el género *Cassiopea* carecen de tentáculos; a cambio, poseen cuatro brazos orales (Fig. 10) unidos en el centro de la campana (manubrio), que se bifurcan dando origen a 8 brazos orales, los cuales a su vez se dividen en apéndices que tienen pequeñas estructuras de succión similares a una boca (Fig. 11) (Hamlet *et al.* 2011).

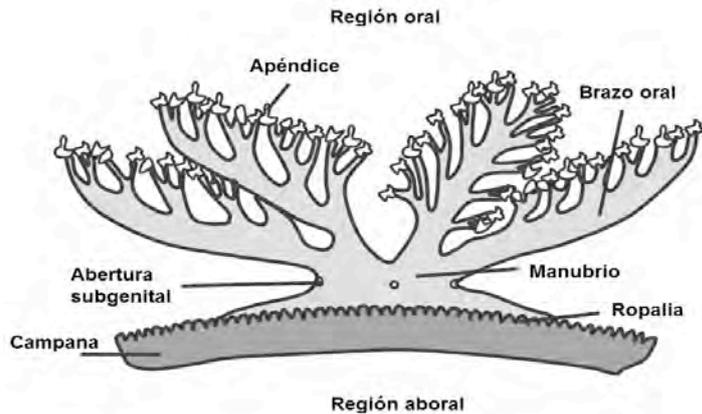


Figura 10. Vista lateral de un espécimen del género *Cassiopea* (Modificada de Hamlet *et al.* 2011).

Tienen numerosos embudos orales anclados al plano ventral de los brazos que a su vez están branquiados; un soporte gelatinoso subcónico o subcilíndrico que se extiende a los ápices de las branquias principales y están provistos de varias vesículas en agregación entre los embudos orales que están desprovistas de apéndices en el lado dorsal. Además, poseen cuatro gónadas interradales (Fig. 11) (Bigelow 1900).

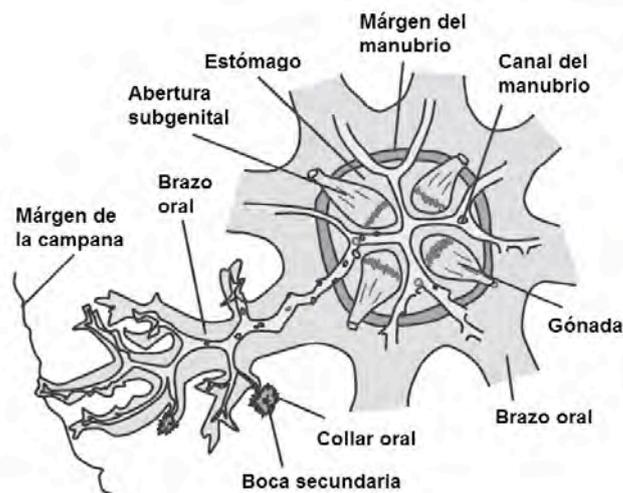


Figura 11. Plano ventral de *Cassiopea* (Modificada de Hamlet *et al.* 2011).

Una de las estructuras más prominentes de estos organismos es el disco o campana; en la zona oral de la campana se encuentra conectado el manubrio mientras que la zona aboral es ligeramente cóncava y se encuentra en contacto con el sustrato. En el margen del disco se encuentran situadas alrededor de 16 formaciones conocidas como ropalia.

También cuentan con estructuras de sulfato de calcio hemihidratado llamadas estatolitos que son básicamente receptores de gravedad y se encuentran dentro de otra estructura llamada estatocisto (Hopf & Kingsford 2013).

2.4.3 Biología y distribución

El género *Cassiopea* comprende organismos que aun teniendo la capacidad de locomoción pasan la mayor parte de su vida postrando su campana en el bentos (Hamlet *et al.* 2011). Los ambientes que habitan son de aguas someras y relativamente claras ya que estas les confieren condiciones de exposición adecuada para los fotosimbiontes que adquieren en etapas tempranas de reproducción y resguardan en la superficie oral (Hofmann *et al.* 1978). Se ha reportado que algunos factores como la eutrofización costera o relleno de manglares causan el incremento a gran escala de esta clase de organismos (Arai 2001), ya que favorecen su reproducción, por la degradación de hojas que provee sitios primarios de asentamiento y posiblemente señales metamórficas reproductivas (Fleck & Fitt 1999; Hofmann & Hadfiel 2002), de tal forma que establecen grandes colonias e inclusive florecimientos (Mills 2001).

Esta medusa se encuentra en constante movimiento causado por pulsos producidos por la contracción y expansión de la campana, esto para generar corrientes muy útiles ya que su hábitat es caracterizado por flujos muy lentos, así que le permiten llevar a cabo la captura de alimento, intercambio de oxígeno, regulación de la temperatura, eliminación y distribución de gametos e inclusive la incorporación de fotosimbiontes (Welsh *et al.* 2009; Hamlet *et al.* 2011).

Su alimentación consta de zooplancton, incluyendo copépodos, materia orgánica disuelta y particulada, además de los nutrientes provistos por los fotosimbiontes (Santhanakrishnan *et al.* 2012).

Entre sus depredadores se encuentra el nudibránquio *Dondice parguerensis*, el cual se alimenta de sus brazos orales; éste almacena los nematocistos para su uso posterior y anexo a esto la utiliza como sustrato para el depósito de huevos (Brandon & Cutress 1985).

La importancia de las medusas invertidas recae en que proveen resguardo a algunos organismos, como otros invertebrados, además de ser fuente de alimento (Davenport 1998; Kingsford 1993; Browne & Kingsford 2005 & Almarau *et al.* 2009). Por otro lado, se conoce que el género contribuye en gran medida a la materia orgánica involucrada en la ruta trófica de ambientes bentónicos, a redes tróficas pelágicas en arrecifes de coral y a otros ecosistemas marinos (Niggli *et al.* 2010). Además, debido a que pueden acumular diversos metales como aluminio, arsénico, bario, cadmio, cromo, cobre, hierro, manganeso y zinc en niveles mayores a los del ambiente circundante, además de litio, calcio, magnesio y estroncio a niveles ambientales, se les considera como indicadores biológicos potenciales. (Templeman & Kingsford 2010).

Entre la clase Scyphozoa se encuentran especies que producen potentes toxinas, y el género *Cassiopea* no es la excepción, aunque se ha observado que en una misma especie la severidad de la picadura puede variar, quizá por la composición del veneno. Por otro lado, se tienen reportes de especímenes venenosos y no venenosos dependiendo del hábitat en el que se encuentran; así, se ha registrado una variedad venenosa en las costas del Mar Caribe, y otra no venenosa en la costa oeste de Isla Harbour, en las Bahamas (Radwan *et al.* 2001).

2.4.4 Bioactividad en *Cassiopea xamachana*

Durante los primeros años del siglo presente, se publicaron estudios que revelan algunas de las propiedades bioactivas en los extractos del género *Cassiopea*; éstas incluyen hemólisis, citotoxicidad e inhibición de células tumorales, entre otras.

Radwan & Burnett (2001) realizaron estudios toxicológicos del veneno contenido en los nematocistos de *C. xamachana*, separados de los fotosimbiontes por citometría de flujo. En este trabajo demostraron que los fotosimbiontes son causa de la reducción del potencial efectivo. En pruebas con ratones reportaron una DL_{50} de 0.35 mg/kg, es decir, casi 5 veces más potente que el reportado por Radwan *et al.* (1.6 mg/kg) en estudios previos durante el mismo año. El mismo patrón de incremento se observó para la actividad hemolítica, obteniendo valores de 50% de hemólisis de 7 $\mu\text{g/mL}$ con nematocistos aislados, mientras que Radwan *et al.* reportaron valores de 110 $\mu\text{g/mL}$. Además encontraron actividad citotóxica en hepatocitos.

Torres *et al.* en el 2001 encontraron que los extractos acuosos de *C. xamachana* poseen actividad hemolítica tanto en eritrocitos humanos como de oveja y obtuvieron valores de HU_{50} (definida como la cantidad de proteína en la muestra requerida para causar 50% de hemólisis) de 6.89 $\mu\text{g/mL}$ y 56 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

Cuatro años después Radwan *et al.* examinaron la actividad de fosfolipasa A_2 y hemolítica del extracto crudo acuoso y 6 fracciones (I-VI) de *C. xamachana* en ratones. Ellos observaron toxicidad del extracto crudo en ratones con una DL_{50} de 0.75 $\mu\text{g/g}$; no obstante, las fracciones fueron más activas, sobresaliendo la VI, que contenía componentes proteicos de baja masa molecular (<17 kDa).

Durante el 2003, Orduña-Novoa *et al.* realizaron pruebas en ratón y encontraron que la infusión del extracto crudo de *C. xamachana* atenúa la expresión de tumores en cerebro y espina dorsal de animales expuestos a la etil-nitrosourea (ENU, toxina común, encontrada en tabaco y en comida ahumada y salada), además de disminuir la diversidad de tumores expresados después del tratamiento.

El último trabajo realizado a este respecto es el de Morales-Landa *et al.* 2007 en el cual realizaron distintas pruebas biológicas con extractos acuosos de cnidarios y demostraron el alto potencial activo de los mismos, particularmente de la medusa invertida *C. xamachana*, donde observaron actividad contra *G. lamblia* con una CI_{50} 226 $\mu\text{g/mL}$.

2.5 *Bunodosoma cavernatum*

2.5.1 Clasificación taxonómica

Phylum: Cnidaria

Clase: Anthozoa

Orden: Actinaria

Género: *Bunodosoma* Verrill, 1899

Especie: *Bunodosoma cavernatum* (Bosc 1801)

La clase Anthozoa incluye a los comúnmente llamados corales azules, corales negros, gorgonias, anémonas, plumas de mar, etc., clasificados en 10 órdenes y más de 7,500 especies válidas (Rocha *et al.* 2011).

2.5.2 Diagnosis

La caracterización taxonómica se realizó con el apoyo del Dr. Ricardo González Muñoz, el cual es especialista en anémonas marinas:

La especie *Bunodosoma cavernatum* tiene una columna cilíndrica, con 12-22 mm en diámetro y de 7-15 mm en altura, posee vesículas redondeadas abundantes las cuales están distribuidas en 96 filas longitudinales del margen al limbo. El disco pedal está bien desarrollado, mide de 12-19 mm en diámetro. La coloración tanto del disco pedal como de la columna pueden ser marrón brillante, anaranjado, rojizo, amarillo o verde olivo.

Posee un diámetro de 20 a 38 mm al encontrarse expandida tanto de los tentáculos como del disco oral; éste último tiene un diámetro de 10-22 mm, es suave de coloración marrón-amarilla, marrón-rojiza o verde olivo pálido, en ocasiones con bandas radiales blancas o amarillas.

Tiene aproximadamente 96 tentáculos que se afinan de manera distal al disco, se encuentran distribuidos hexameralmente en cinco ciclos, son lisos, simples, cónicos, contráctiles y con una longitud moderadamente alargada de 3-5 mm. La coloración varía de verde olivo, rojizo o anaranjado pálido, puede tener puntos blancos o amarillos en el lado oral e inclusive destellos morados.

2.5.3 Biología y distribución

Las anémonas se encuentran agrupadas en la clase Anthozoa, los organismos pertenecientes a dicha clase son marinos exclusivamente, carecen de fase medusoide y cuentan con nematocistos tanto en la epidermis como en la gastrodermis. El hecho de que se encuentren distribuidas de forma solitaria o clonal y el carecer de un esqueleto calcáreo las incluye dentro del orden Actinaria que comprende a las anémonas verdaderas con alrededor de 800 especies descritas, caracterizadas por la presencia de fotosimbioses y de estructuras especializadas como tentáculos, verrugas, acrorhagi, etc. (Brusca & Brusca). La estructura básica de una anémona comprende una boca en medio del disco oral (Fig.12), de este se proyectan numerosos tentáculos retraíbles que les sirven para atrapar a sus presas; su estructura de soporte es el disco pedal que se extiende hasta el disco oral con una estructura denominada columna o pie.

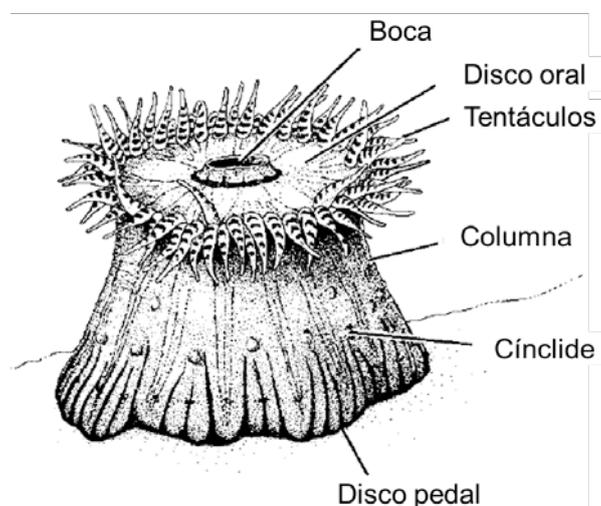


Figura 12. Estructura externa básica de una anémona (Modificado de Brusca & Brusca 2003).

B. cavernatum habita aguas poco profundas, se adhiere a rocas y restos de coral. Su distribución comprende el Océano Atlántico Oeste desde Carolina del Norte hasta Barbados además del Mar Caribe, Golfo de México, Islas Carolina, Micronesia. Es de mencionar que González-Muñoz en el 2013 reportó por primera vez esta especie para las costas mexicanas.

2.5.4 Bioactividad en anémonas (clase Anthozoa, orden Actinaria)

Los péptidos y las proteínas son los compuestos que han sido predominantemente encontrados y estudiados en anémonas, éstos difieren en estructura, tamaño y sitio de acción (Frazao *et al.* 2012). En términos generales los polipéptidos tienen como blanco principalmente a los canales de Na⁺ y K⁺, mientras que las citolisinas o también llamadas actinoporinas que forman poros en la membrana celular (Morán *et al.* 2009).

El descubrimiento de compuestos novedosos en anémonas así como su modo de acción ha sido una herramienta muy valiosa en el entendimiento del funcionamiento del sistema nervioso central así como de transmisión sináptica (Norton 2009; Gondran *et al.* 2002). Las toxinas de anémonas juegan un papel como estimulantes cardiacos o neurotoxinas de acuerdo al grado de afinidad de las mismas con las isoformas de los canales de sodio (Santana *et al.* 1998).

La subunidad alfa formadora de poro de los canales de Na⁺ consiste de cuatro dominios homólogos, de los cuales cada uno contiene seis hélices putativas transmembranales S1-S6. El sitio tres del canal de sodio modulado por voltaje sirve como un sitio de unión para las toxinas de anémonas, escorpiones y arañas; una vez acopladas el sitio las toxinas afectan las propiedades de inactivación del canal, por lo que a éstas se les conoce como toxinas modificadoras de compuerta (Morán *et al.* 2009).

Existen tres clases de péptidos dentro del grupo de toxinas de canales de Na⁺ provenientes de anémonas: dos corresponden a moléculas largas que contienen de 45 a 50 residuos de aminoácidos y otra de péptidos cortos con 27-32 residuos de aminoácidos.

Los péptidos largos obtenidos de los géneros *Anthopleura* y *Anemonia* (familia Actiniidae) se encuentran clasificados como los de tipo 1, mientras que aquellos de los géneros provenientes del Indopacífico como *Heteractis* (formalmente *Radianthus*) y *Stichodactyla* (formalmente *Stoichactis*), miembros de la familia Stichodactylidae, conforman los del tipo 2 (Kem 1988; Kem *et al.* 1989 *In*: Norton 2009). Estas dos clases de péptidos son similares respecto a la localización de pares de cisteínas (las cuales forman tres puentes disulfuro), así como en algunos otros residuos que se piensa juegan un papel en la actividad biológica.

Por otro lado los canales de K^+ se clasifican en 15 subfamilias de acuerdo a su estructura y función; una de éstas es la subfamilia Kv (canales de potasio activados por voltaje) la cual participa en la repolarización de la membrana después de la iniciación del potencial de acción, regulación del pulso cardiaco, contracción muscular, secreción de insulina, entre otros (Orts *et al.* 2013). Las toxinas con efecto en canales Kv han sido estudiadas en menor medida; sin embargo, se ha evidenciado la funcionalidad que tienen como herramienta de investigación; hasta el momento se han aislado unos 20 compuestos de este tipo (Yamaguchi *et al.* 2010).

2.5.5 Bioactividad en el género *Bunodosoma*

Se han obtenido algunas moléculas activas a partir del género *Bunodosoma*, como la toxina BgK de 4.279 kDa, que fue aislada a partir de *B. granulifera* por Aneiros *et al.* 1993 y se encuentra formada por 37 residuos; su efecto se evaluó en espina dorsal de rata y se comprobó que suprime corrientes de K^+ en al menos algunas poblaciones neuronales. De la misma anémona se aisló la granulotoxina (GRX), un péptido neurotóxico con una masa de 4.958 kDa que a una concentración de 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ produce un efecto neurotóxico en ratas con diferentes reacciones, como movimientos circulares, comportamiento agresivo, convulsiones y muerte (Santana *et al.* 1998).

Otra toxina con efecto en los canales de K^+ es BclV de *Bunodosoma caissarum* conformada por 41 aminoácidos y una masa molecular de 4.669 kDa; ésta es comparable en hasta 45 y 48% con APETx1 y APETx2 de *Anthopleura elegantissima* respectivamente (Stoloarz *et al.* 2006). El péptido presenta efecto paralizante débil en el cangrejo *Callinectes danae*.

Además en el año 2008 se publicó por primera vez un estudio de análisis proteómico hecho en la fracción neurotóxica de *Bunodosoma cangicum*, donde se encontraron 81 componentes de los cuales tres de ellos fueron parcialmente secuenciados y ensayados; éstos mostraron actividad similar a las toxinas de canales de sodio en ensayos realizados en nervio de pie de cangrejo. También se reportó una molécula de 3.176 kDa que mostró actividad similar a la de las toxinas de canales de potasio y otras tres que aparentemente conforman un nuevo grupo de toxinas de canales de Na^+ con aproximadamente 3.200 kDa, considerando su actividad y que las toxinas con efecto en dichos canales aisladas hasta el momento tienen un peso cercano a los 5 kDa (Zaharenko *et al.* 2008b).

Así mismo, las toxinas BcsTx1 y BcsTx2 de 4.151 y 3.914 kDa respectivamente fueron obtenidas a partir de *B. caissarum* y tienen un efecto sobre canales de K^+ , ejerciendo boqueo total del canal Shaker con N-terminal truncado presente en insectos.

En cuanto a toxinas con efecto en canales de Na^+ , en el año de 1993 el grupo de trabajo de Malpezzi *et al.* realizó el aislamiento de tres fracciones del veneno neurotóxico de *Bunodosoma caissarum* los cuales fueron denominados Bcl, BclI y BclII; éste último resultó ser una toxina que fue secuenciada con 48 aminoácidos y seis residuos de cisteína; dicha secuencia mostró una identidad de secuencia alta respecto a las toxinas largas de tipo 1 previamente reportadas. Un año después Loret *et al.* purificaron las toxinas nombradas BgII y BgIII a partir de *B. granulifera*, ambas resultaron tóxicas para mamíferos.

Otras moléculas aisladas de la anémona *Bunodosoma cangicum* con efecto en canales de Na^+ (Nav1.1) son la cangitoxina (CGTX) de 48 residuos de

aminoácidos y sus derivados CGTX-II y CGTX-III (Cunha *et al.* 2005; Zaharenko *et al.* 2008a).

En cuanto al grupo de toxinas citolíticas, se conoce que el veneno de *B. caissarum* genera hemólisis dosis-dependiente en eritrocitos de pez, sapo, serpiente, ratón y rata con una DE₅₀ (Dosis Efectiva 50) variante entre 2.9 y 7.6 µg de veneno/mL de suspensión de eritrocitos (Malpezzi & Freitas 1991). En este trabajo observaron la variación en la sensibilidad de acuerdo al tipo de eritrocitos siendo los de rata los más resistentes y los de sapo los más sensibles. La primera hemolisina purificada a partir del género *Bunodosoma* fue la caissarolisina I (Bcs I), producida por *B. caissarum*; es una actinoporina con un peso de 19.757 kDa y una actividad hemolítica importante (ED₅₀= 0.270 µg/mL) aunque carece de actividad de fosfolipasa A₂ (PLA₂) (Stolarz *et al.* 2006).

Al ser las citolisinas proteínas con capacidad de formar poros en las membranas biológicas, se ha indagado a cerca de la aplicación de las mismas en un campo farmacológico de gran relevancia ya que podrían emplearse para facilitar el ingreso de los medicamentos al citosol por lo que la eficacia de los mismos podría incrementar (Gabilan 2008).

La fracción Bc2 y la equinatoxina-II (EqTx-II) resultaron citotóxicas a las líneas celulares de glioblastoma U87 y A172; sin embargo, se ha observado que bajo dosis no tóxicas (0.1 µg/mL de Bc2 y 0.3 µg/mL de EqTx-II) promueven el efecto de medicamentos empleados comúnmente en la quimioterapia como la arabiosida, doxorubicina y vincristina de 10 a 300 veces (Soletti *et al.* 2008). La toxina Bc2 tiene la capacidad de incrementar intracelularmente la concentración de Ca²⁺ y así permite la inducción de liberación de neurotransmisores en preparaciones de terminal nerviosa (Migues *et al.* 1999 *In: Rottini et al.* 2008), mientras que la EqTx-II forma poros transmembranales de 1-2 nm, al acoplarse dentro de la membrana celular; así el ingreso de electrolitos y moléculas pequeñas menores a 1 kDa queda libre (Anderluh *et al.* 2003).

También, Lagos *et al.* 2001 obtuvieron una fracción del veneno de *B. cangicum* mediante permeación en gel. Ésta se encontró conformada por compuestos de 8 a 18 kDa los cuales se caracterizaron por ser altamente hemolíticos con una CE₅₀ (Concentración Efectiva 50: aquella que afecta al 50% de la población de prueba) de 14 g/mL en eritrocitos de ratón.

Así mismo se aisló un acil aminoácido nombrado bunodosina 391 a partir de *B. cangicum*, el cual produjo un fuerte efecto analgésico al ser inyectado en la extremidad posterior de ratas (Zaharenko *et al.* 2011).

Específicamente en *Bunodosoma cavernatum* los estudios de letalidad dieron como resultado una DL₅₀ de 40 µg proteína/kg de ratón y actividad hemolítica dosis-dependiente en eritrocitos humanos, misma que incrementó con la temperatura (Eno *et al.* 1998).

2.6 Parasitosis

Como se ha analizado anteriormente, algunas de las moléculas aisladas del medio marino han provisto de soluciones a distintas patologías que representan problemas críticos. Entre las enfermedades conocidas existen varias que requieren de atención especial ya que aún carecen de soluciones eficaces. Entre ellas se encuentran las infecciones por parásitos.

Los protozoarios son microorganismos unicelulares eucariontes distribuidos en casi todos los hábitat conocidos. La mayor parte de las especies de este grupo son de vida libre; sin embargo, existen algunas que viven de forma parasitaria en otros organismos, incluyendo al humano.

Entre las formas parasitarias que tienen alta incidencia en el hombre se encuentran aquellas clasificadas en el filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigofora, caracterizados por la posesión de flagelos como medio de locomoción (Yaeger 1996), además de estar desprovistos de una mitocondria típica; por esto, son comúnmente nombrados “amitocondriados” (Ali & Nozaki 2007).

Desde hace algunas décadas se ha comenzado a tener registros del aumento en la incidencia de infecciones parasitarias y las cifras tienden a ser cada vez más preocupantes. Sin embargo, a pesar de que se ha comprobado que el efecto que ejercen los cambios y perturbaciones ecológicas inducidas tanto naturalmente como por el humano tienen gran influencia en la aparición, desarrollo y reforzamiento de las infecciones por parásitos (Ebert & Herre 1996), aún no se toman medidas lo suficientemente efectivas para combatir este problema.

Las infecciones por parásitos llegan a producir millones de casos al año, constituyendo un problema a nivel mundial que va incrementando con el tiempo. Actualmente se estima que 280 millones de personas son infectadas cada año por parásitos y se reportan al menos 2.5 millones de casos fatales únicamente considerando a las enfermedades diarreicas (WHO 1998; Upcroft & Upcroft 2001).

2.6.1 *Giardia intestinalis*

La enfermedad diarreica mejor conocida como giardiasis, es producida por *G. intestinalis*, también conocida como *G. duodenalis* o *G. lamblia*. Es un protozooario incluido en la clase Zoomastigophorea, orden Diplomonadida, que posee dos núcleos con envoltura nuclear ligada al retículo endoplásmico, citoesqueleto, vacuolas periféricas similares a lisosomas por debajo de la membrana plasmática, no posee mitocondria, peroxisomas y aparato de Golgi morfológicamente evidente (Thompson 2008; Carranza & Lujan 2010).

Su ciclo de vida incluye una etapa de trofozoíto móvil, flagelado, la cual es replicativa y otra quística, que conforma la fase infectiva; la infección comienza por la ingestión de quistes a través de comida o agua contaminada además de contacto directo fecal-oral (Fig. 13).

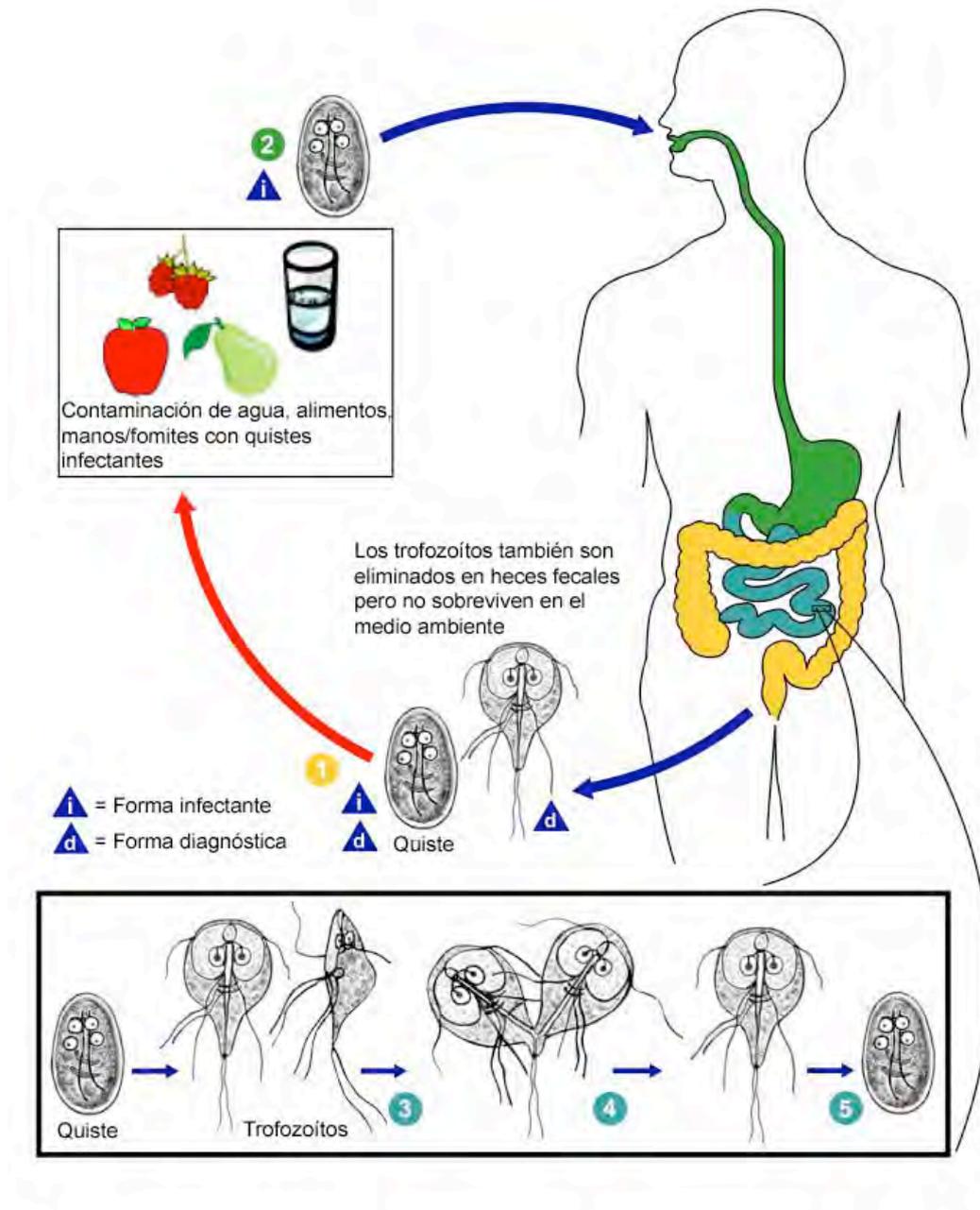


Figura 13. Ciclo de vida de *G. intestinalis* (Tomado de CCPE 2016).

Así, al pasar por las condiciones ácidas estomacales se desenquistan y liberan a los trofozoitos que enseguida se adhieren al epitelio del duodeno y parte alta del yeyuno donde comienzan a reproducirse por fisión binaria, gracias a las condiciones básicas de la zona; finalmente la desecación del bolo fecal en el colón propicia la transformación en quistes que salen al medio exterior a través de las heces (Díaz & Fernández-Alonso Borrajo 1996; Cotton *et al.* 2011).

G. intestinalis se distribuye mundialmente y produce infección que puede ser asintomática o presentar diarrea crónica intensa, deshidratación, dolor abdominal, náuseas, vómito además de pérdida de peso; se adquiere por bajas condiciones de higiene, por lo que las prevalencias más altas se observan en países en vías de desarrollo (8-30%) ubicados en zonas tropicales y subtropicales, aunque también se presentan brotes en países desarrollados (0.4-7.5%) (Caccio & Ryan 2008; Eckmann 2003).

2.6.2 *Entamoeba histolytica*

Otro protozoo unicelular y patógeno entérico es *E. histolytica*. Este protozoo pertenece a la familia Entamoebidae, es anaerobio, microaerófilo, y causa aproximadamente 500 millones de casos de amibiasis, de los cuales de 70,000 a 100,000 resultan mortales; por ello, se le considera como la segunda causa de muerte por enfermedades antiparasitarias (Bansal *et al.* 2006).

La infección por *E. histolytica* protozoo produce diarrea, colitis y abscesos en órganos como hígado, pulmones, cerebro, piel e intestino; el 90% de los casos son asintomáticos, pero el resto de los casos desarrollan cuadro clínico (Teixeira & Mann 2002; Ali & Nozaki 2007).

Al igual que en *G. intestinalis*, el ciclo de vida de *E. histolytica* consta de dos etapas, una infectiva (quiste) y otra proliferativa (trofozoíto). La etapa quística tiene de 10 a 15 μm de diámetro, está envuelta por una pared quitinosa y conforma la etapa infectiva al ser ingerida mediante líquidos o alimentos.

De esta forma llega al intestino donde se desenquista y forma al trofozoíto, quien se reproduce por fisión binaria para formar grandes colonias (Sanchez *et al.* 1994).

2.6.3 *Trichomonas vaginalis*

Dentro de la familia Trichomonadidae se encuentra *T. vaginalis*, un protozoario flagelado, cosmopolita, el cual genera una enfermedad de transmisión sexual mejor conocida como tricomoniasis, que causa vaginitis, uretritis y cervicitis (Al Saeed 2011).

Al menos 174 millones de casos surgen en un año y la mayoría de éstos son asintomáticos (10-50%), de tal forma que la cifra puede estar subestimada (Johnston & Mabey 2008; Salomon *et al.* 2011); este padecimiento se ha detectado en personas de entre 15 y 50 años de edad de todos los grupos raciales y niveles económicos (Hernández-Álvarez 2009), y al igual que la mayor parte de las enfermedades parasitarias, se observa en mayor proporción en zonas con baja calidad de higiene.

T. vaginalis tiene un ciclo de vida de una sola fase de trofozoíto que se reproduce por fisión binaria, mide 10 y 7 μm de largo y ancho respectivamente, posee cuatro flagelos anteriores y otro incorporado a una membrana ondulante anclada a una zona no contráctil (Ali & Nozaki 2007).

2.7 Cáncer

El cáncer es una enfermedad que genera mucha preocupación debido a la severidad de sus efectos en la salud poblacional; la afección se da a nivel genético por lo que se presenta un funcionamiento básico anómalo en las células del cuerpo. Es causado por cambios en los genes o por errores inducidos por daño en el ADN (ácido desoxirribonucleico), por exposición ambiental a sustancias, radiación, entre otras.

Las células comienzan a dividirse de forma anormal de acuerdo a los tipos de genes que se ven afectados (INC 2016):

1. **Proto-oncogenes:** estos conducen al crecimiento y división normal de las células; al ser alterados o más activos se transforman en genes carcinogénicos, por lo que las células crecen y no mueren.
2. **Genes supresores de tumores:** al igual que los anteriores se encargan de darle control a la división y crecimiento celular; las células con mutación en éstos se dividen desmesuradamente.
3. **Genes reparadores de ADN:** Cuando una célula tiene este tipo de mutaciones tiende a desarrollar más mutaciones en otros genes lo cual puede conllevar al desarrollo de células cancerígenas.

Se han encontrado más de un centenar de formas de cáncer la cuales son nombradas de acuerdo al órgano o tejido en el que se originan, la clasificación de acuerdo a tipo de célula específica donde se desarrolla es la siguiente:

1. Carcinoma (células epiteliales)
2. Sarcoma (hueso y tejidos suaves)
3. Leucemia (médula ósea)
4. Linfoma (linfocitos T o B)
5. Mieloma múltiple (células plasmáticas)
6. Melanoma (melanocitos)
7. Tumores cerebrales y de espina dorsal
8. Otros tumores (de células germinales, neuroendócrinos y carcinoides)

Mundialmente se registraron 8.2 millones de muertes causadas por cáncer durante el año 2012 y de esta forma se categoriza entre las enfermedades con mayor tasa de mortalidad; 71,900 del total ocurrieron en México (OMS 2014). Además de 14 millones de casos nuevos con posible aumento de hasta un 70% en 20 años.

El tratamiento que se da a cada tipo de cáncer es distinto; además del padecimiento depende del avance y localización del mismo; puede incluir un sólo procedimiento o la combinación de varios. Los principales son:

- Cirugía
- Radiación
- Inmunoterapia
- Terapia dirigida
- Terapia hormonal
- Trasplante de células madre
- Medicina de precisión
- Quimioterapia

Existen gran cantidad de medicamentos que se emplean en la quimioterapia, entre los que se encuentran algunos agentes alquilantes (v. g. Temodar[®]), antimetabolitos (v.g. Xeloda[®]), antraciclinas (v. g. Adriamycina[®]) y otros antibióticos antitumorales (v. g. Mitoxantrona), sin embargo, no son efectivos para toda clase de cáncer además de que generan reacciones adversas como alopecia, náusea, vómito, constipación, fiebre, mareos, insomnio, entre otras (INC 2016).

3 JUSTIFICACIÓN

Si bien es sabido que el océano es una fuente basta de materia prima y productos, el uso que se les ha dado a éstos se ha visto limitado. Afortunadamente, durante las últimas tres décadas, algunas instituciones de investigación han enfocado sus estudios en el aislamiento de compuestos que producen varios tipos organismos marinos y la caracterización de su actividad biológica. De esta manera se ha advertido que dichas sustancias cuentan con propiedades que pueden solucionar algunos problemas de gran importancia en el área de la salud, entre los que se encuentra la aparición de parásitos resistentes a los fármacos de elección y el cáncer.

Cassiopea xamachana es una medusa que en su fase adulta permanece prácticamente sin desplazarse y no posee estructuras duras con las cuales protegerse, al igual que la anémona *B. cavernatum*, lo cual las hace vulnerables; sin embargo, como cnidarios, poseen células que encapsulan medios químicos defensivos que han mostrado ser activos en pruebas biológicas. Por otro lado, debido a que los cnidarios no tienen un sistema inmune con diversificación de anticuerpos y viven en un ambiente con carga microbiana muy alta se ha atribuido la homología defensiva a compuestos peptídicos endógenos antimicrobianos (Ovchinnikova *et al.* 2006)

La relevancia que precede la investigación a realizar incide en la búsqueda y aislamiento de nuevas sustancias con actividad biológica obtenidas a partir de la inigualable bioquímica de los organismos marinos, entre los que se encuentra la medusa invertida *Cassiopea xamachana* y la anémona *Bunodosoma cavernatum*; además de dar pie a que se continúen haciendo pruebas contra otros microorganismos patógenos e inclusive encontrando más compuestos innovadores, de forma tal, que el campo de los productos naturales marinos se vaya enriqueciendo de conocimientos y aplicaciones.

4 HIPÓTESIS

La medusa invertida *Cassiopea xamachana* y la anémona *Bunodosoma cavernatum* producen citolisinas, las cuales serán susceptibles de ser separadas.

5 OBJETIVOS

5.1 General

Aislar al menos una citolisina a partir de cada una de las especies de estudio mediante un esquema de separación biodirigida con el fin de determinar el perfil farmacológico de dichas moléculas.

5.2 Particulares

- Colectar e identificar taxonómicamente a los organismos.
- Generar los extractos crudos con solventes polares.
- Determinar el perfil farmacológico de los extractos y fracciones mediante bioensayos rápidos.
- Realizar el perfil cromatográfico de los extractos crudos generados.
- Separar los extractos activos mediante un esquema biodirigido, a fin de caracterizar a los componentes bioactivos.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Recolecta de organismos

Se llevaron a cabo recolectas de especímenes de *Cassiopea xamachana* en las lagunas de lixiviación ubicadas en la Unidad Académica Yucatán, en Sisal, Yucatán. Debido a que los organismos tratados son ponzoñosos y frágiles se manipularon cuidadosamente con ayuda de guantes de látex. Las medusas extraídas se colocaron en un recipiente con agua de mar adicionada con aproximadamente 1% de $MgCl_2$ para disminuir el nivel de estrés y se trasladaron al Laboratorio de Productos Naturales Marinos (LPNM) de la misma Unidad. A continuación, se introdujeron en bolsas con cierre hermético (alrededor de ocho medusas por bolsa), y así se transfirieron a un contenedor con salmuera y metanol, lo cual disminuyó la temperatura hasta $-20\text{ }^{\circ}C$ y posteriormente se colocaron a $-70\text{ }^{\circ}C$ en un ultracongelador.

Los especímenes de *Bunodosoma cavernatum* fueron colectados en zonas intermareales rocosas de la costa Yucateca (Sisal, Chabihau, Dzilam de Bravo), mediante el uso de cincel y martillo. Así mismo, se colocaron en un contenedor con agua de mar adicionada con 1% de $MgCl_2$ y se trasladaron al LPNM donde se introdujeron en contenedores plásticos los cuales posteriormente fueron colocados a $-70^{\circ}C$.

6.2 Identificación taxonómica

Para ambas especies se resguardaron tres organismos de diferentes tamaños y se preservaron en formol al 4% en agua marina. La identificación taxonómica se llevó a cabo mediante caracteres morfológicos externos y de cnidae con el apoyo de la M. en C. Laura Celis-Gutiérrez en el caso de las medusas y el Dr. Ricardo González-Muñoz para las anémonas.

6.3 Obtención del extracto crudo

En estudios previos con medusas se ha encontrado la presencia de compuestos bioactivos en zonas del cuerpo diferentes a los nematocistos (Endean *et al.* 1993; Nagai *et al.* 2000); por ello, se procedió a utilizar el cuerpo completo de los organismos colectados. Se secaron en una liofilizadora LABCONCO Freezezone 2.5 (-54 °C y 0.100 mBar) y mediante un mortero se trituraron para generar un polvo de partículas finas con el fin de que existiera una mayor superficie de contacto con el disolvente a la hora de la maceración. Aparte, se disecaron los tentáculos de 50 organismos y a continuación se secaron y trituraron de la misma forma que a los organismos enteros.

6.3.1 Extracción

6.3.1.1 Maceración de *C. xamachana*

Metanólica

La extracción se llevó a cabo con metanol (1:10 m/v) durante un día a 5 °C, se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 3,864 x g (Centrífuga Universal 320 Hettich Zentrifuger), durante 15 min a temperatura ambiente para eliminar la mayor cantidad de materia en suspensión. Se llevó a cabo una segunda extracción bajo las mismas condiciones. En seguida, se unió el sobrenadante obtenido de ambas extracciones para proceder al secado mediante un rotaevaporador Buchi (Vaccum controller V-850; Rotavapor R-215; Heating Bath B-491; Vaccum Pump V-700) y se realizó el cálculo del rendimiento.

Acuosa

Para llevar a cabo la extracción acuosa se utilizó una proporción 1:10 m/v. Se colocó en maceración durante 1 h a 5 °C; la suspensión generada se centrifugó a 3,864 x g durante 5 min a temperatura ambiente y el sobrenadante se llevó a sequedad mediante liofilización bajo las condiciones anteriormente mencionadas.

6.3.1.2 Maceración de *B. cavernatum*

Para el caso de *B. cavernatum* únicamente se llevaron a cabo maceraciones acuosas de acuerdo a los resultados obtenidos por Álvarez-Bohórquez (2016). La maceración se realizó considerando 450 mL de agua desionizada inyectable fría por cada 30 g de pulverizado de anémona. La suspensión se colocó en agitación durante 1 h y posteriormente se centrifugó a 3,864 x *g* durante 15 min con el objetivo de precipitar los residuos de tejidos y únicamente recuperar el sobrenadante con los compuestos disueltos.

6.4 Evaluación de actividad biológica de extractos/fracciones obtenidas a partir de *C. xamachana*

Debido a que el fraccionamiento de los extractos se llevó a cabo con un esquema biodirigido, se realizaron dos bioensayos rápidos de actividad para elegir la o las fracciones con las cuales se trabajó.

6.4.1 Neurotoxicidad en *Ocypode quadrata*

Los cangrejos fantasma fueron colectados en las dunas de la playa de Sisal, Yucatán, se trasladaron al LPNM de la UAS, se mantuvieron en recipientes con arena y se colocaron separaciones para evitar el estrés.

La evaluación de neurotoxicidad en *O. quadrata* es un método estandarizado que sirve para caracterizar bioactividad y efectos fisiológicos que distintos compuestos neurotóxicos producen en el organismo (Beress & Zwick 1980).

Para realizar el bioensayo de neurotoxicidad, se resuspendieron los extractos/fracciones en agua desionizada a una concentración de 10 mg/mL y se realizaron diluciones seriadas para obtener concentraciones de 10,000, 1000, 100, 10, y 1 µg/mL, las cuales se inyectaron en un volumen de 100 µL en la membrana artrodial del tercer pereiópodo mediante una jeringa de insulina.

Enseguida se observaron los diferentes efectos (parálisis, temblor o muerte) y con un cronómetro se determinaron los tiempos en los que éstos ocurren; se utilizó un extracto activo y solución salina fisiológica (SSF) como controles positivo y negativo respectivamente.

6.4.2 Actividad hemolítica

Se utilizó sangre humana certificada por el Banco de Sangre del Hospital Agustín O'Horan (Sistema de Transfusión Estatal, Yucatán). Este ensayo se realizó con el objetivo de evidenciar la actividad citolítica producida por posibles citolisinas presentes en los extractos/fracciones (Torres *et al.* 2001).

Preparación de solución de eritrocitos: Se tomaron 500 µL de sangre a los cuales se añadieron 5 mL de SSF al 0.9%, se centrifugó a 348 x g durante 5 min, se retiró el sobrenadante y se repitió el procedimiento dos veces más. A continuación se midieron 20 µL de eritrocitos y se añadieron a 1980 µL de SSF.

Preparación de extractos/fracciones a evaluar: Se prepararon 6 microdiluciones seriadas a 10,000, 1,000, 100, 10, 1 y 0.1 µg/mL en agua desionizada, a partir de una solución stock de 10 mg/mL.

Bioensayo: Se colocaron 900 µL de SSF en tubos de eppendorf® de 1.5 mL, 50 µL de solución de eritrocitos y 50 µL del extracto/fracción a evaluar para cada una de las concentraciones por duplicado. Como control positivo se utilizaron 950 µL de agua desionizada mientras que para el control negativo se utilizaron 950 µL de SSF.

Los tubos fueron incubados a 37 °C durante 30 min; al terminar el tiempo de incubación se centrifugaron a 223 x g por 4 min y el sobrenadante se leyó en una celda de cuarzo para enseguida medir la absorbancia a 415 nm.

Finalmente se calculó la actividad hemolítica mediante la siguiente fórmula:

$$AH(\%) = [A_m/A(100\%) - A(0\%)] * 100$$

AH (%) = Porcentaje de la actividad hemolítica.

A_m = Absorbancia de la muestra.

A (100%) = Absorbancia del control positivo.

A (0%) = Absorbancia del control negativo.

6.4.3 Letalidad en *Artemia salina*

Este ensayo revela las propiedades citotóxicas de los compuestos (Meyer 1982; Wah 1993) y se ha demostrado que tiene una equivalencia bastante cercana a las pruebas antiparasitarias (Muñoz-Rivas 2011), por lo que en el presente trabajo conformó una de las pruebas rápidas para la elección de las fracciones activas a purificar.

Los nauplios fueron proporcionados por el Laboratorio de Alimento Vivo de la Unidad Académica Sisal. Para ello, se hidrataron los quistes por una hora en agua dulce, luego se transfirieron a un recipiente cilíndrico cónico transparente de 2 L, se adicionó 1 L de agua de mar y se colocó expuesto a la luz y aireación durante 24 h. Una vez eclosionados, los nauplios se cosecharon con un cernidor con diámetro de poro de 100 μm para separar los nauplios de los quistes no eclosionados y se recuperaron los primeros en agua de mar.

Para llevar a cabo el ensayo se usó una microplaca y nauplios de *A. salina* (con 24 h post-eclosión). Se colocaron de 15-20 nauplios y 100 μL de agua de mar por pocillo. Enseguida, se inocularon triplicados de 100 μL del extracto/fracción en concentraciones de 10,000, 1,000, 100, 10, 1 y 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se incubaron a 27 °C con una agitación de 3 x *g* durante 24 h. Se utilizó dicromato de potasio y agua de mar como controles positivo y negativo respectivamente. Después de las 24 h se realizó el conteo de los nauplios muertos y vivos y de acuerdo a estos datos se determinó el LC_{50} por Probit (EPA 2002) que indicó la concentración necesaria para que el compuesto ejerza efecto en el 50% de la población sometida.

6.4.4 Actividad embriotóxica en pez cebrá (*Brachydanio rerio*)

Este bioensayo ha sido empleado recientemente en el área biomédica para la biodirección de ensayos que tienen como objetivo obtener moléculas anticancerígenas. Así, el modelo se usó para determinar las dosis letales de los extractos/fracciones obtenidas, con el fin de indagar a cerca de sus posibles mecanismos de acción. La evaluación de las fracciones se realizó en una cepa sin mutaciones ni modificaciones en sus rutas bioquímicas proporcionada por la Dra. Gabriela Rodríguez del laboratorio de ecotoxicología de la Facultad de Química de la UNAM en Sisal.

Obtención de huevos: Se indujo el apareamiento de los peces un día antes de llevar a cabo la prueba. Para ello los peces (cinco hembras por cada tres machos) se colocaron en una pecera de 40 L con agua purificada, a una temperatura de 28 ± 1 °C. Se situó una red a la mitad de la pecera que mantuvo a los peces separados de los huevos y se colocaron en oscuridad total. Además se empleó una tapa para evitar que los peces salgan del contenedor.

Durante las siguientes dos horas se recuperaron los huevos y se colocaron en una caja Petri. Enseguida se lavaron con agua purificada y se separaron los que se encontraban fertilizados y en buen estado (corion totalmente transparente y vitelo visible, amarillo y brillante) con una pipeta.

Bioensayo: Se pesaron 5 mg del extracto/fracción y se disolvieron en 0.5 mL de medio agua purificada. A partir de esta solución se hicieron cinco diluciones logarítmicas en 2 mL, es decir, se transfirieron 200 μ L en 1800 μ L de medio. Se consideraron 16 réplicas por concentración, como se muestra en la figura 14.

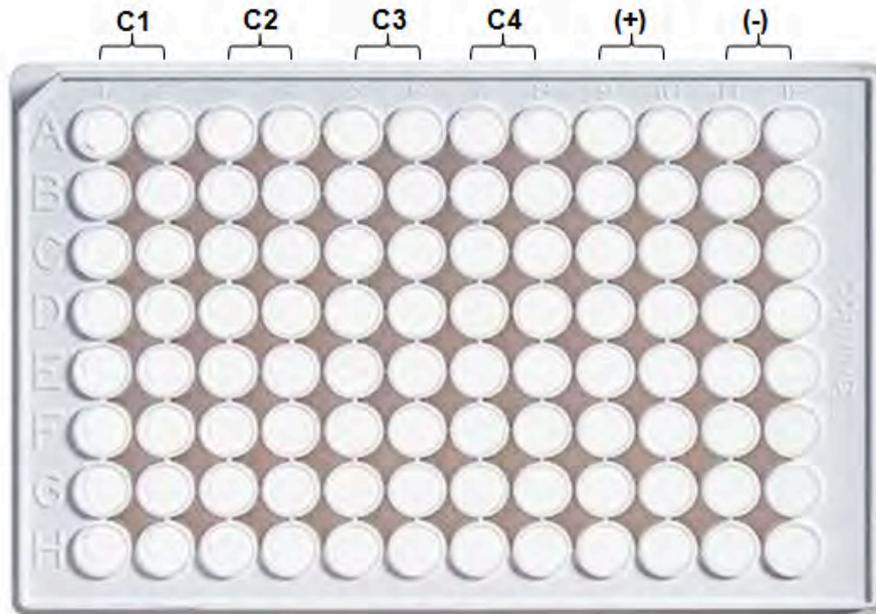


Figura 14. Conformación del bioensayo de embriotoxicidad en microplaca. **C's:** Concentración x de extracto/fracción x; control positivo (+), control negativo (-).

Controles: Como control negativo se utilizó agua purificada, mientras que el control positivo empleado fue colchicina (Sigma-Aldrich, 10 mg/mL).

Lectura: Los huevos se monitorearon a las 24, 48 y 72 h en busca de aquellos que se encontraban en mal estado (opacos, con hongos, etc.) y se registraron. Se calculó el LC₅₀.

6.4.5 Actividad antiparasitaria por el método de subcultivos

La actividad antiparasitaria fue determinada por el método de subcultivos de Hill *et al.* 1986 modificado por Cedillo-Rivera & Muñoz 1992 que permite conocer cuantitativamente y de forma reproducible la capacidad de replicación de las células. Se trabajó con cultivos de *Giardia intestinalis* IMSS:0696:1, *Trichomonas vaginalis* GT3 y *Entamoeba histolytica*, que se mantuvieron a 37 °C durante 48 h.

Se colocaron 1.5 mL de medio de cultivo en tubos de centrifuga con concentraciones de extractos de 50, 20, 10 y 1 µg/mL, se adicionaron 50 µL del cultivo y se incubaron durante 48 h a 37 °C. Se utilizó metronidazol como control positivo y para el negativo se llevaron a cabo pruebas sin extracto. Se procedió a resembrar y cuantificar mediante una cámara de Neubauer para posteriormente calcular el IC₅₀ por Probit.

6.5 Evaluación de actividad biológica de extractos/fracciones obtenidas a partir de *B. cavernatum*

Debido a que los rendimientos de la fracción de 30-10 KDa fueron muy bajos, se seleccionó el bioensayo en el que se encontró mayor actividad con menor cantidad de fracción, de acuerdo a Álvarez-Bohorquez 2015, para continuar con la separación biodirigida. En este caso, se seleccionó la evaluación de hemólisis cuyo procedimiento está especificado en la sección 6.4.2.

6.6 Purificación de extractos y fracciones activas

Las fracciones con mayor actividad fueron sometidas al proceso de aislamiento y purificación, y en cada fase se hicieron nuevamente evaluaciones en modelos biológicos para corroborar la actividad de los compuestos.

6.6.1 Obtención de fracciones por exclusión molecular (ultrafiltración)

Para el caso de *C. xamachana* se llevó a cabo el método de exclusión molecular mediante ultrafiltración con membranas Amicon con corte molecular de 100, 30, 10, 5, 3 y 1 kDa (Ultracell, Millipore Inc.) con el fin de fraccionar el extracto crudo por tamaño molecular. La ultrafiltración preserva las propiedades nativas de las proteínas ya que no es necesario emplear reactivos que pueden provocar la desnaturalización proteica, lo cual es ideal cuando se está buscando aislar compuestos de dicha naturaleza (Fuhrmeister & Meuser 2003).

Este proceso se llevó a cabo en una celda de ultrafiltración con nitrógeno que en conjunto con la membrana de corte definido conforman la fuente efectora de separación.

Previo al procedimiento, se resuspendió el extracto crudo liofilizado en la mínima cantidad de agua (generalmente 100 mL por cada 20 g de extracto) y se procedió a centrifugar a $3,864 \times g$ durante 20 min, con el fin de precipitar las partículas en suspensión y únicamente someter a ultrafiltración el extracto disuelto (sobrenadante).

A continuación se montó el sistema de ultrafiltración con la membrana de corte de 100 kDa y de esta manera se generó la fracción >100 kDa y la <100 kDa; esta última se introdujo en el sistema con la membrana de corte de 30 kDa, con lo que se generó la fracción de 100-30 kDa y la <30 kDa. De esta manera se trabajó con el resto de los cortes moleculares hasta obtener las fracciones 30-10, 10-5, 5-3, 3-1 y 1 kDa respectivamente.

La fracción de interés de *B. cavernatum* (30-10 kDa) se obtuvo empleando el mismo método con las membranas de 300 (para agilizar el proceso de paso por la membrana de corte de 30 kDa), 30 y 10 kDa.

6.6.1.1 Determinación de proteínas en microensayo por el método de Bradford

En esta técnica se emplea el colorante Azul de Coomasie G-250 que normalmente se encuentra en forma catiónica doblemente protonada con una coloración rojiza; sin embargo, una vez que se une a una proteína, el complejo adquiere una forma estable de color azul, la cual es detectada a una longitud de onda de 595 nm.

Para llevar a cabo el ensayo se hizo una curva estándar con albúmina sérica bovina (BSA) de Bio-Rad para lo cual se extrajeron 50 μ L de soluciones ajustadas y se mezclaron con 250 μ L del colorante en una microplaca de 96 pozos. De esta manera se obtuvieron concentraciones de 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1, 0.05 y 0 mg/mL.

Las muestras se prepararon añadiendo 50 μL de una solución ajustada a 0.5 mg/mL y se mezclaron con 250 μL del colorante. Finalmente en el lector de microplacas fue programado para un ciclo de mezclado, incubación de 5 min y lectura a 595 nm. Las concentraciones se calcularon con base en la curva estándar.

6.6.1.2 Visualización del fraccionamiento por tamaño molecular mediante gel SDS-PAGE

Para corroborar el fraccionamiento de acuerdo al tamaño molecular mediante ultrafiltración, se llevó a cabo electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS en inglés) de acuerdo al método de Laemli (1970). Para esto se preparó el gel al 15 % (Tabla 3), se añadieron las muestras (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y se corrió a 120 V durante 1.5 h en buffer Tris-glicina. En seguida el gel se reveló mediante tinción negativa y las masas moleculares se determinaron mediante la comparación con un estándar de proteínas de Bio Rad Precision Plus: 250, 150, 100, 75, 50, 37 y 25 kDa.

Tabla 3. Reactivos para preparación del gel SDS-PAGE.

Reactivo	Cantidad
H ₂ O	2.475 mL
Acrilamida-Bis 30%	3 mL
Amortiguador pH 8.8	1.95 mL
Persulfato de amonio	75 μL
TEMED (N,N,N,N-tetra-metil-etilendiamina)	3 μL

6.6.2 Extracción en fase sólida (C18-T)

Para separar los compuestos de acuerdo a la polaridad se utilizaron cartuchos Strata C18-T (Phenomenex, 1 g/ 6 mL, 150 Å). Primero se hizo un lavado de columna con 5 mL de metanol y enseguida se llevó a cabo el acondicionamiento con 5 mL de agua; se colocaron 2 mL de extracto y se procedió a la elución con 5 mL de las siguientes fases móviles: agua al 100%,

agua:acetonitrilo 95:5%, agua:acetonitrilo 90:10%, agua:acetonitrilo 80:20% y agua:acetonitrilo 50:50%. Las fracciones colectadas se llevaron a sequedad mediante un rotaevaporador y se calculó el rendimiento.

6.6.3 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) en fase reversa C-18

La CLAR se utilizó para verificar la complejidad de los extractos bioactivos; para ello se desarrollaron métodos en condiciones a nivel analítico (separación a nivel de μg) para aislar el compuesto bioactivo. El análisis por CLAR del extracto de la medusa comprendió un tiempo de corrida de 30 min en con una columna LUNA fase reversa C18 (100 Å, 5 μm , 250x4.6 mm) y un gradiente de Agua:TFA al 0.1%/Acetonitrilo 100-40%, utilizando detección UV a una longitud de onda (λ_{UV}) de 215 nm además de un detector de luz evaporativa dispersa (ELSD por sus siglas en inglés).

Para el caso de la anémona, inicialmente se realizaron análisis de 25 min en una columna fase reversa Aeris widepore XB-C18 (200 Å, 3.6 μm , 150 x 4.60 mm) a un flujo de 1 mL/min de agua (TFA al 0.1%) como disolvente inicial y luego con un gradiente de 0-40 % de acetonitrilo en 25 min. La detección se realizó en a través de UV λ_{UV} de 215 nm, y en un detector de luz evaporativa dispersa (ELSD por sus siglas en inglés) con flujo de nitrógeno de 1 mL/min, temperatura de nebulización a 40 °C y evaporación a 70 °C.

6.6.4 CLAR en gel permeable

Para *B. cavernatum*, además de la separación por polaridad, las fracciones activas se analizaron mediante CLAR por gel permeable con la intención de separarlas de acuerdo al tamaño molecular. El equipo utilizado durante el análisis fue un CLAR Waters 1525 mientras que la columna empleada fue una Yarra SEC-2000 (1-300 kDa, 145 Å, 3 μm , 300 x 7.8 mm). El tiempo de análisis fue de 30 min con un flujo isocrático de 1 mL/min de H₂O/ACN 90:10. La longitud de onda de excitación fue de 250 nm y la de emisión fue de 395 nm.

CAPÍTULO 1: Obtención de péptidos con potencial antiparasitario a partir de la medusa invertida *C. xamachana*.

Resultados y discusión

7.1.1 Recolecta e identificación del organismo

Se recolectaron 100 medusas de la laguna de lixiviación de la Unidad Académica Sisal (21°09'48".17 N, 90°02'57".35 O) (Fig. 15) y se trasladaron al LPNM para su procesamiento.

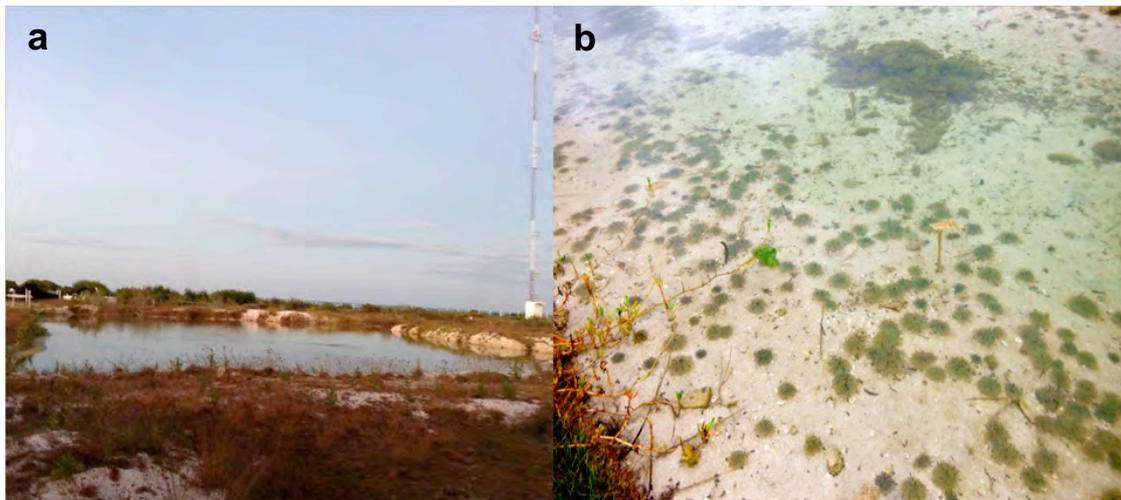


Figura 15. a: laguna de lixiviación de la UAS-UNAM en Sisal, Yucatán y **b:** medusas del género *Cassiopea* en su hábitat.

Durante los muestreos fue evidente la presencia de compuestos urticantes en la medusa, tanto por el contacto directo con los brazos del organismo como por el contacto con la mucosidad que estos organismos expelen al medio con gran cantidad de nematocistos.

Para determinar taxonómicamente, con asesoría de la M. en C. Laura Celis se realizaron observaciones *in vivo* a nivel macroscópico para determinar el género del organismo colectado.

Diagnosis: Medusa invertida que habita asentada en el sustrato, aunque posee la capacidad de nadar (Fig. 16a). Su campana tiene 12 cm de diámetro en promedio y está ligeramente convexa en la región aboral del disco central (Fig. 16b).

En la región oral se observan 4 brazos bifurcados que sobresalen de los márgenes del disco por lo que éste queda totalmente cubierto; están branquiados abundantemente, con aperturas orales y varias vesículas en forma de cinta de color azul intenso (Fig. 16c). A nivel de microscopio óptico es posible observar una gran densidad de fotosimbiontes del género *Symbiodinium* a nivel del endodermo acompañados de nematocistos como el euriteles que se observa en la Fig. 17.

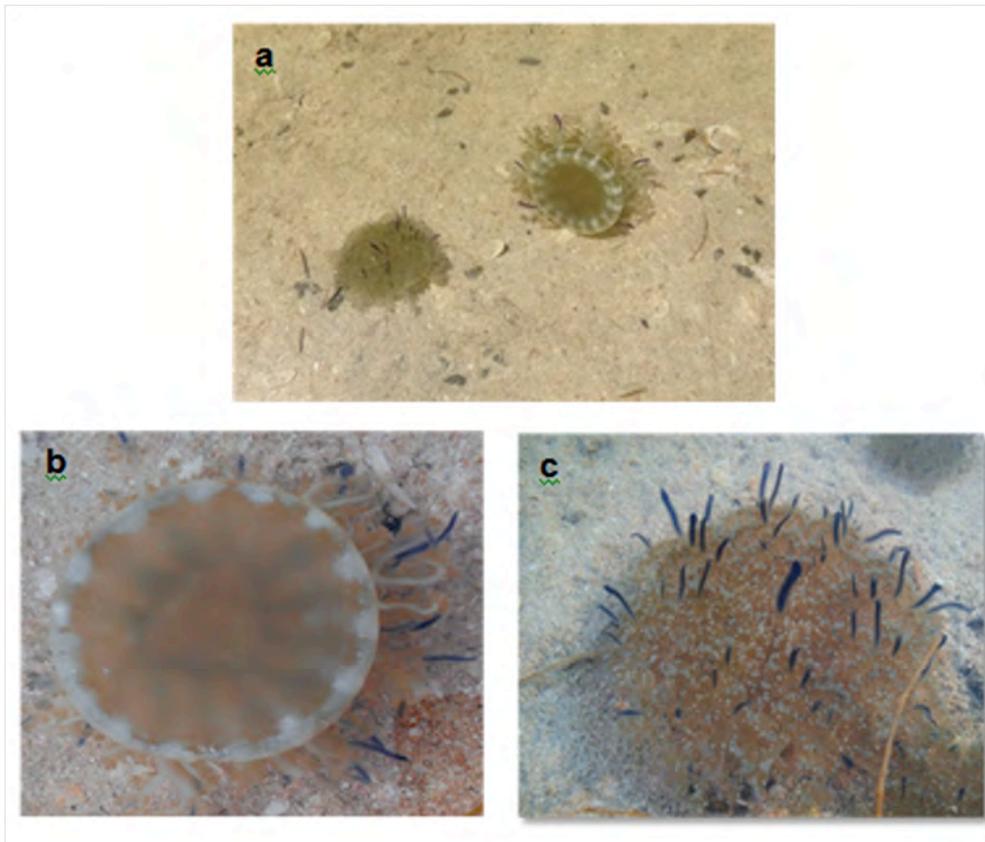


Figura 16. *Cassiopea xamachana*. **a:** a la izquierda se puede observar una medusa situada sobre el sedimento; a la derecha, se observa un organismo en locomoción. **b:** región aboral y **c:** zona oral.



Figura 17. Nematocisto disparado y fotosimbionte de *C. xamachana*.

De acuerdo a estos caracteres los especímenes se asemejan en alto grado a *C. xamachana* Bigelow 1892, sin embargo, un estudio publicado durante el año 2004 por Holland *et al.* donde analizan haplotipos del gen COI encuentran niveles de divergencia despreciables entre *C. xamachana* y *C. andromeda* (Forskål 1775). A pesar de esto, por convención taxonómica los organismos distribuidos en el Océano Atlántico se consideran *C. xamachana* mientras que los del Pacífico se consideran *C. andromeda*.

7.1.2 Generación del extracto crudo

Después de la liofilización de las medusas (cuerpo completo) se obtuvieron 252 g de masa liofilizada. Se procedió a realizar extracciones con solventes polares a partir de 60 gr. En la Tabla 4 se presentan los rendimientos de la estrategia de extracción con metanol (CC_{MeOH}) y en la Tabla 5 con agua (CC_{ac}), así como los rendimientos por fraccionamiento mediante ultrafiltración. Anexo a esto, se realizó una extracción acuosa de los brazos orales liofilizados (BO_{ac}) de 50 medusas; ésta se fraccionó al igual que la de cuerpo completo.

Las extracciones metanólicas tuvieron un rendimiento notoriamente menor al de las acuosas, debido a que en las extracciones orgánicas las sales tienden a precipitarse al igual que los compuestos proteicos de alta complejidad.

Tabla 4. Rendimientos de extracciones metanólicas de *C. xamachana*.

Extracciones Metanólicas (CC_{MeOH})		
Extracción	Extracto (g)	Rendimiento (%)
1	9.65	16.09
2	6.60	11.00

Tabla 5. Pesos y rendimientos de extracciones acuosas y fracciones obtenidas mediante ultracentrifugación a partir de cuerpo completo y brazos orales de *C. xamachana*.

Extracciones acuosas					
Cuerpo completo (CC _{ac})			Brazos orales (BO _{ac})		
Fracción	Extracto (g)	Rendimiento (%)	Fracción	Extracto (g)	Rendimiento (%)
Crudo	32.86	54.76	Crudo	28.57	57.15
>30	0.49	1.51	>30	2.26	7.92
30-10	0.16	0.49	30-10	2.32	8.13
10-3	0.32	1.16	10-3	0.48	1.67
3-1	0.98	2.98	3-1	1.13	3.97
<1	10.05	30.58	<1	4.86	16.99

Como se observa en la tabla anterior, los rendimientos más altos se obtuvieron con la maceración a partir de BO_{ac}, y el aumento de recuperación sobresalió en las fracciones >30 y 10-3. Las extracciones realizadas con CC_{ac} mostraron un rendimiento dos veces mayor en la fracción <1, lo cual indica un contenido del doble de sales en comparación al de BO_{ac}. Debido a estas dos situaciones aunadas a que en los scyphozoos en fase adulta la mayor cantidad de nematocistos con la batería de toxinas defensivas se encuentran en los tentáculos o brazos orales (Higgins III *et al.* 2008) se eligió darle seguimiento de separación a las fracciones obtenidas con BO_{ac}.

Para corroborar la separación por exclusión molecular se procedió a realizar geles SDS-PAGE para proteínas. El gel que se realizó con los extractos crudos reveló la presencia de bandas cercanas a 250, 150, 100, 75, 37, 27, 15 e inclusive 10 kDa (Fig. 18), esto evidencia la presencia mayoritaria de proteínas grandes y la presencia en menor medida de polipéptidos. Las bandas que se observan entre 50 y 37 son producidas durante el análisis (se identifican en algunos de los geles procesados en el equipo utilizado).

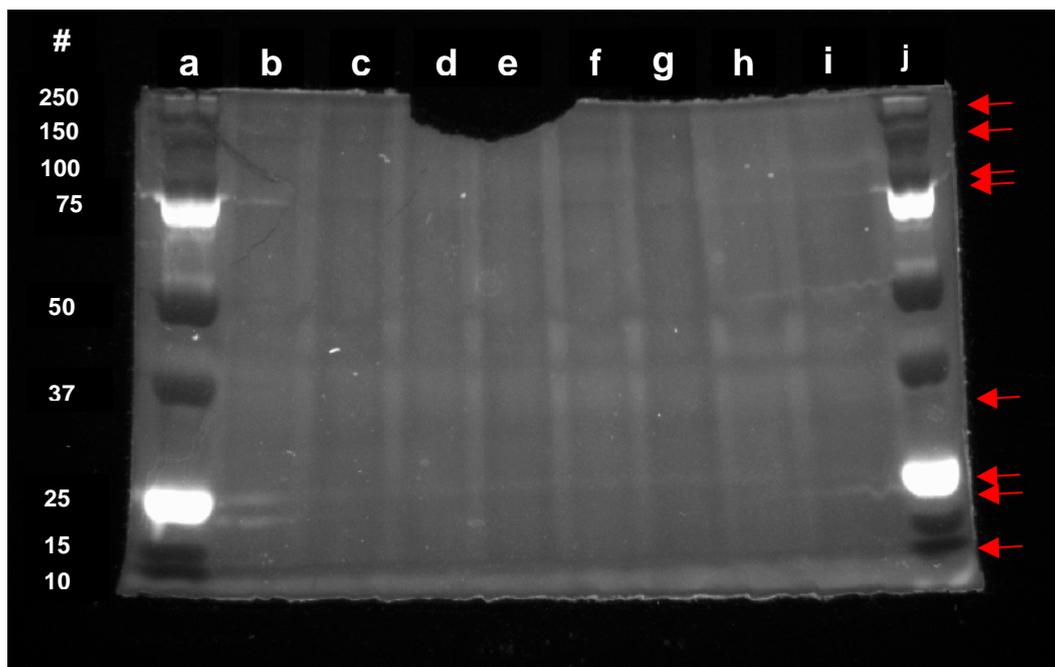


Figura 18. Gel SDS-PAGE (revelado con tinción negativa) de extractos crudos acuosos de *C. xamachana*. a) Marcador de peso molecular, b) CC_{ac} concentrado (10 mg/mL), c) CC_{ac} diluido (5 mg/mL), (d, f, h) BO_{ac} concentrado (10 mg/mL), (e, g, i) BO_{ac} diluido (5 mg/mL), j) marcador de peso. (←) Indican bandas presentes en los extractos; (#) indican peso molecular de bandas en marcadores.

Además se llevó a cabo un gel de las fracciones obtenidas mediante ultrafiltración. En la Figura 19 se presenta dicho gel, en el cual se observa cómo la variedad de los tamaños en las bandas de altos pesos moleculares permanecen mayormente en las fracciones de cortes >30 y 30-10, mientras que las fracciones más pequeñas conservan bandas más intensas en pesos moleculares menores a 10 y 15 kDa, que corresponden aproximadamente a los tamaños de corte utilizados; así, fue posible confirmar que la separación se realizó de manera adecuada. Cabe resaltar la utilidad de separación por peso debido a que conlleva concentración de compuestos que de otra forma serían prácticamente invisibles por PAGE.

En algunas fracciones se revelaron bandas con tamaños mayores o menores al intervalo de corte, lo cual se explica por el tipo de técnica utilizada para el fraccionamiento.

La ultrafiltración es un método de corte muy eficiente ya que es posible trabajar con grandes cantidades de extracto y fraccionarlo de forma rápida en comparación con otras técnicas como la columna eluída por gravedad. Sin embargo, los cortes que se hacen no son del todo precisos ya que la membrana que se utiliza tiene poros con un diámetro fijo; de esta manera, la eficiencia depende más que nada de la forma de la molécula (globular o fibrosa) así como el ángulo en que ésta pase a través de la membrana.

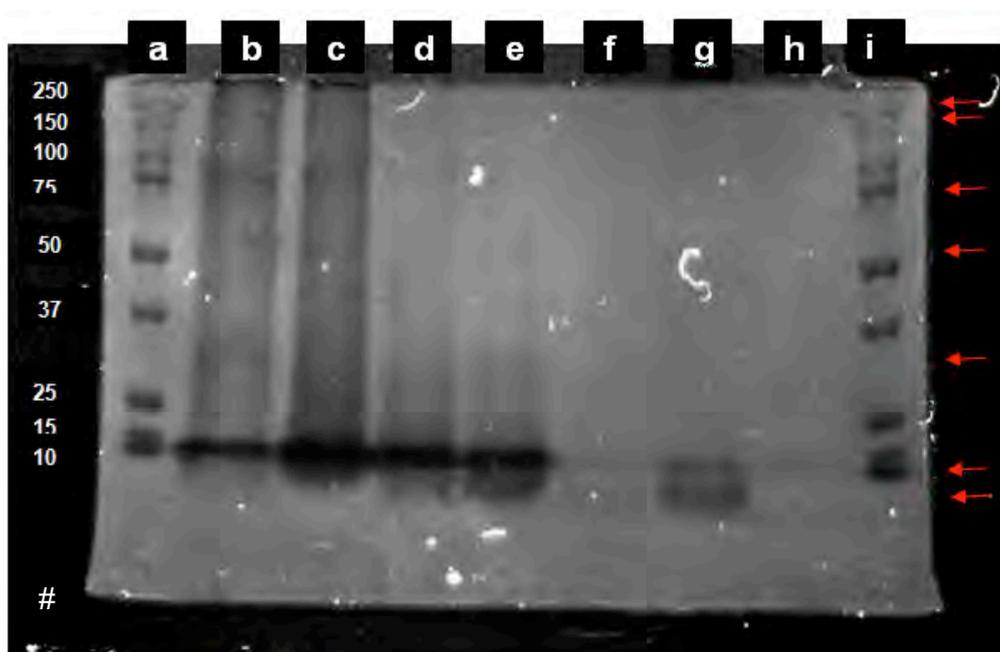


Figura 19. Gel SDS-PAGE (revelado con tinción de comassie G-250) de extracto y fracciones de BOac. a) e i) Marcador de peso molecular, b) Extracto crudo c) Fracción >30, d) Fracción 30-10, e) Fracción 10-5, f) Fracción 5-3 g) Fracción 3-1 y h) Fracción <1 y. (←) Indican bandas presentes en los extractos; (#) indican peso molecular de bandas en marcadores.

Se procedió a ensayar el CC_{ac} en *A. salina*, hemólisis y neurotoxicidad. Como se observa en la Tabla 6, la mayor cantidad de proteínas se obtuvo en la fracción >30 seguida por la de 30 a 10 kDa. Esta última fracción presentó la mayor actividad contra *A. salina* ($LD_{50}=16.34$ mg/mL), y la actividad hemolítica más importante, llegando a lisar hasta el 100% de las células en la concentración más alta; dicho efecto menguó conforme las diluciones seriadas, pero inclusive la última microdilución mostró actividad del 3.21 %.

Por otro lado, ninguno de los extractos mostró actividad neurotóxica en *O. quadrata*. De acuerdo al tamaño de las fracciones activas, es posible indagar a cerca de la presencia de actinoporinas y citolisinas de mayor tamaño. No obstante, la ausencia de actividad en las fracciones más pequeñas pudo haber sido opacado por baja concentración de los compuestos activos o bien por que la medusa no produce neurotoxinas al igual que *Aurelia aurita* (Rachamim *et al.* 2015).

Tabla 6. Cantidad de proteínas en extracto de *C. xamachana* y fracciones de CC_{ac} y sus actividades respectivas.

Extracto/ Fracción	Proteínas	<i>A. salina</i> CL ₅₀	Hemólisis CH ₅₀	Neurotoxicidad
	mg/mL	mg/mL	mg/mL	10 mg/mL
ExC_{Ac}	0.10	na	na	na
>30	0.50	4,464.86	3.47	na
30-10	0.21	16.34	0.31	na
10-3	0	518.46	76.42	na
3-1	0	na	na	na
<1	0	na	na	na
ExC_{MeOH}	0	na	170.60	na

na= No hubo actividad evidente y/o cuantificable.

A continuación, se probaron las fracciones de BOac en neurotoxicidad sobre *O. quadrata*. Con este ensayo, fue posible observar actividad letal en las fracciones >30, 30-10 y 10-3, las cuales presentaron sintomatología similar; sin embargo, en la última los efectos de temblor y expulsión de espuma por la boca se presentaron inmediatamente después de la inyección y finalmente la muerte (Tabla 7).

Tabla 7. Actividad neurotóxica del extracto y fracciones obtenidas de BOac.

Extracto/ Fracción	Neurotoxicidad 10 mg/mL
ExC_{Ac}	na
>30	na [†] (5 min)
30-10	na [†] (1.2 min)
10-3	na [†] (0 s)
3-1	na
<1	na

na: Sin actividad neurotóxica na[†] Fracción letal (min) tiempo de muerte

Como se observa en la tabla de bioactividad (Tabla 6), los extractos obtenidos hasta el momento habían mostrado niveles bajos de efecto. En la literatura, se ha reportado que la actividad de los extractos de *C. xamachana* se ve disminuida debido a un efecto antagonista por parte de los fotosimbiontes, por lo que, se han hecho varios intentos para eliminarlos previo a la extracción; sin embargo, ha resultado muy complicado ya que el tamaño de las células es muy similar (Fig. 20), de forma tal que la separación por filtración no resulta eficiente; así actualmente sólo se ha logrado empleando citometría de flujo (Radwan & Burnett 2001).



Figura 20. Nematocistos no disparados (○) y fotosimbionte (○) de *C. xamachana* observados a 100X.

7.1.3 Perfiles cromatográficos de fracciones activas

Dado que la fracción de 10-3 kDa presentó valores de hemólisis y el efecto letal en menor tiempo (0 s), en la prueba de *O. quadrata*, se procedió a separarla mediante ultrafiltración con una membrana de 5 kDa, lo cual originó las fracciones de 10-5 kDa y de 5-3 kDa, con el objetivo de observar si existía alguna distinción de efecto neurotóxico y citotóxico; sin embargo, ambos efectos permanecieron únicamente en la fracción de 10-5 kDa y por ello, se inyectaron en CLAR para observar su complejidad (Fig. 21 y 22). Para esto se utilizó una columna LUNA de fase reversa C18 con un gradiente de Agua:TFA al 0.1%/Acetonitrilo 100-40% y tiempo de corrida de 30 min. Los cromatogramas realizados mostraron perfiles con patrones muy similares (Figs. 21a y 22a) con presencia de gran cantidad de sales visibles al ELSD (Figs. 21b y 22b).

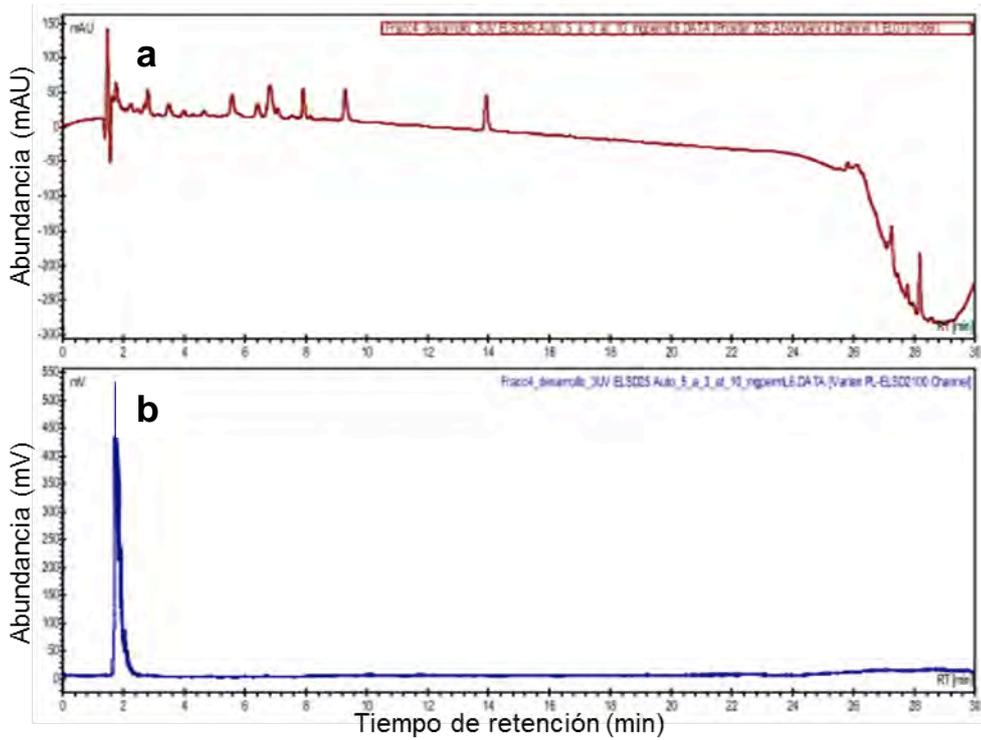


Figura 21. Cromatograma en fase reversa de la fracción de 5-3 KDa, obtenida a partir de la extracción BOac. Se muestran los perfiles obtenidos con **a:** $\lambda_{UV}=215\text{ nm}$ y **b:** ELSD.

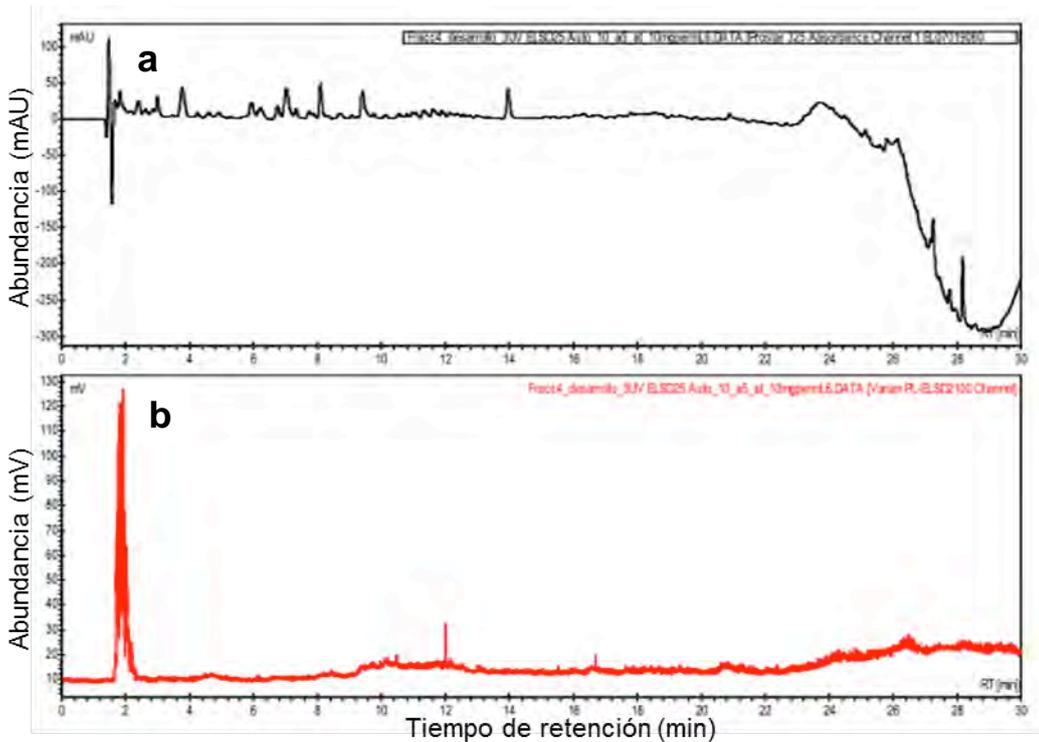


Figura 22. Cromatograma en fase reversa de la fracción de 10-5 KDa, obtenida a partir de la extracción BOac. Se muestran los perfiles obtenidos con **a:** $\lambda_{UV}=215\text{ nm}$ y **b:** ELSD.

Las dos fracciones resultantes (10-5 y 5-3 kDa) se probaron nuevamente en los bioensayos de neurotoxicidad y hemólisis. Anexo a esto, se enviaron todas las fracciones a probar contra *G. intestinalis*. Como se observa en la Tabla 8, los resultados obtenidos mostraron que la fracción 10-5 fue la que mantuvo la actividad tanto en *O. quadrata* como en hemólisis; sin embargo, ninguna de las fracciones presentó actividad antiparasitaria.

Tabla 8. Actividad del extracto crudo y fracciones acuosas obtenidas de BOac.

Extracto/ Fracción	Neurotoxicidad (<i>O. quadrata</i>)	Hemólisis CH ₅₀	Antiparasitaria (<i>G. intestinalis</i>) CL ₅₀	Embriotoxicidad (<i>D. rerio</i>)
	10 mg/mL			
ExC_{Ac}	na	na	na	na
>30	na [†] (7 min)	2.63	na	na
30-10	na [†] (2.3 min)	0.45	na	na
10-5	na [†] (0 s)	71.75	na	na
5-3	na	na	na	na
3-1	na	na	na	na
<1	na	na	na	na

na: no activa

[†] Fracción letal.

Previamente a la separación de la fracción de 10-5 kDa mediante extracción en fase sólida, se corroboró la actividad hemolítica y neurotóxica, lo cual fue a los 15 días posteriores a la obtención de la fracción, encontrándose que ésta ya no presentaba actividad. Tomando en cuenta estos resultados, y que la fracción al ser secada mediante liofilización se dividía en dos fases (probablemente de acuerdo a sus propiedades químicas), una de aglomerados amarillos altamente higroscópicos y otra de polvo fino de un color más pálido, se decidió hacer la extracción en fase sólida de cada una de las dos fases. Lo anterior con el objetivo de obtener fracciones menos complejas y con menor cantidad de sales para someterlas a la evaluación biológica, considerando la posibilidad de que al encontrarse más concentrados los metabolitos pudieran mostrar de nuevo su actividad. No obstante, no se presentó ninguna de las actividades en las fracciones generadas (Tabla 9.).

Tabla 9. Rendimientos de la separación por EFS de las fases gruesa y fina de la fracción 10-5 de *C. xamachana* y actividad hemolítica.

Fase	Fracción H ₂ O/ACN	mg	Rendimiento (%)	Hemólisis
Gruesa (0.4806 g)	90:10	3.1	0.64	X
	80:20	2.1	0.44	X
	50:50	0.9	0.19	X
Fina (1.0147 g)	90:10	6.2	0.61	X
	80:20	8.2	0.81	X
	50:50	1.1	0.11	X

X: Sin actividad

Los aislamientos de las toxinas presentes en las medusas representan un reto debido a que estos organismos se encuentran compuestos en hasta un 95% de agua y grandes cantidades de sales; así los rendimientos de extracción son minúsculos. Esto sin considerar la dificultad en la purificación, ya que los metabolitos tienden a ser lábiles, a agregarse, disociarse y enlazarse con otros componentes no tóxicos del veneno e inclusive a las fases estacionarias empleadas para purificarlas. Esto implica muchas maneras de desestabilización que se manifiestan como un cambio en la conformación nativa de la proteína y por tanto, pérdida de actividad (Othman & Burnett 1990).

Así el mantener la estructura tridimensional específica del o los compuestos activos es muy importante para que estas conserven su función. Otros factores a los cuales se asocia la pérdida de actividad en los compuestos peptídicos y proteicos son (Beynon & Oliver 2004; Burgess & Murray 2009):

1. Desnaturalización total o parcial del extracto causada por la temperatura
2. Cambio drástico de pH
3. Daño oxidativo
4. Concentración
5. Proteólisis durante el almacenamiento
6. Pérdida en algún paso de purificación
7. Presencia de algún detergente

Si bien es conocido que la obtención de compuestos protéicos conlleva un desafío importante por todas las condiciones que interfieren en su aislamiento, también se sabe de las grandes ventajas que ofrecen como sus mecanismos de acción específicos con alta potencia (Pisal *et al.* 2010); por ello el grupo de trabajo de Torres *et al.* 2001 confirmó con tres métodos de extracción que el más adecuado es el de maceración de los brazos orales previamente liofilizados y triturados, ya que produjeron mayor rendimiento de extracción proteica con un menor número de organismos además de mostrar actividades hemolítica y electrofisiológica; este método fue utilizado durante esta investigación.

De acuerdo a lo anterior, se llevó a cabo una nueva colecta y se procedió a separar mediante ultrafiltración. Una vez obtenida, la fracción de 10-5 kDa fue sometida a las pruebas de bioactividad; sin embargo, ésta no se observó en ningún ensayo. Por ello, se realizaron esquemas de extracción con condiciones optimizadas, con el objetivo de corroborar que ninguna variable experimental estaba influyendo en la pérdida de actividad:

- **Esquema 1:** Extracción tal cual la metodología descrita.
- **Esquema 2:** Se adaptó tanto la celda de ultrafiltración como el vial de colecta con enfriamiento mediante la inmersión en hielo. Debido a que los resultados de las pruebas de actividad continuaron siendo negativos, se llevó a cabo una separación mediante EFS, para corroborar si el factor limitante de la actividad era la concentración de sales u otros compuestos presentes.
- **Esquema 3:** Se empleó el Esquema 2 aunado al uso de menor cantidad de membranas (100, 10 y 5 kDa), para disminuir el tiempo de los compuestos en solución y así evitar afección por microorganismos o enzimas.
- **Esquema 4:** Se usaron los Esquemas 2 y 3 además del empleo de un inhibidor de proteasas (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche[®]) desde el momento de la maceración.
- **Esquema 5:** Nueva colecta en lagunas de la UAS tratada con esquemas 2, 3 y 4.

- **Esquema 6:** Colecta de organismos de una población diferente (Laguna de Chelém, Yucatán) tratados con esquemas 2, 3 y 4.

Como se observa en la Tabla 10 y en la Figura 23, a pesar de que en algunos casos fue posible registrar valores de hemólisis y que con la separación por extracción en fase sólida se incrementaron los valores al doble de lo obtenido por ultrafiltración, estos no mostraron la actividad obtenida en la primera fracción, donde el valor máximo de hemólisis fue del 100% en una concentración de 10 mg/mL e inclusive fue posible determinar una CH₅₀ de 71.75 mg/mL.

Tabla 10. Extracciones realizadas a partir de *C. xamachana* con distintos esquemas y resultados de pruebas de hemólisis.

# de extracción	g para extracción	Características de extracción	Valor máximo de hemólisis	CH ₅₀
1	100	Bajo las mismas condiciones que la fracción activa	0%	nd
2	50	Se implementaron técnicas con hielo o refrigeración	10%	nd
2.1	-	EFS de fracción 10-5 KDa fina y gruesa	23%	nd
3	10	En frío y menor cantidad de membranas (100,10,5)	11%	nd
4	10	+Inhibidor de proteasas	19%	nd
5	20 (Medusas UAS)	+Inhibidor de proteasas	12%	nd
6	30 (Medusas Chelém)	+Inhibidor de proteasas	8%	nd

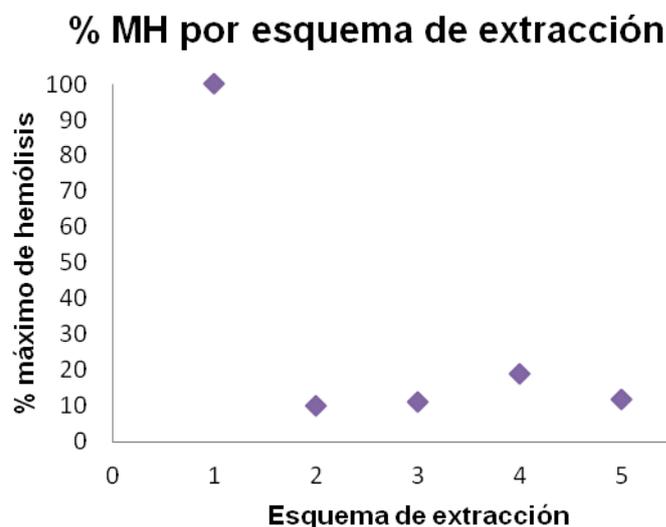


Figura 23 . Gráfica del porcentaje máximo de hemólisis en cada esquema de extracción de *C. xamachana*

Los esquemas planteados incluyeron mejoras en las condiciones con mayor probabilidad de influencia en la desnaturalización de los compuestos durante el procedimiento de extracción y concentración y por ello los resultados obtenidos indican que la pérdida de actividad no se debe a un factor experimental; lo que ocurrió posiblemente fue causado por un factor espacio-temporal o bien, un factor intrínseco de la especie o población muestreada.

En total, se realizaron 5 muestreos. El segundo corresponde al muestreo a partir del cual se obtuvo la fracción activa; éste se realizó en el mes de marzo, es decir, a principios del inicio de la época de sequías, mientras que el resto se realizaron en la transición de lluvias a nortes (Tabla 11).

Tabla 11. Información de muestreos de *C. xamachana*

Muestreo	Mes/año	Zona	Actividad
1	ago-14	UAS	X
2	mar-15	UAS	✓
3	ago-15	UAS	X
4	sep-15	UAS	X
5	sep-15	Laguna de Chelém	X

De esta manera, una explicación a lo observado en esta investigación podría relacionarse a la posibilidad de encontrar variaciones en las toxinas producidas de acuerdo a factores espacio-temporales intraespecíficos o intrapoblacionales, que pueden inducir el inicio o final en la producción de uno o varios compuestos, o bien, variación en la cantidad en que éstos son producidos (Kem 1988, Kem *et al.* 1990; Radwan *et al.* 2001).

En la especie *Cassiopea xamachana* se han encontrado poblaciones con la misma batería de cnidoma, pero propiedades urticantes distintas, las cuales muy probablemente sean debidas a variaciones importantes en la composición veneno (Radwan *et al.* 2001). Esto a su vez, habla de la presencia de un efecto generado por las condiciones del hábitat en el que se desarrollan estos organismos (Jensch & Hofmann 1997). En este proyecto pudo observarse esta situación no únicamente por la diferencia en las actividades, sino a nivel de los tamaños moleculares proteicos encontrados.

Tabla 12. Relación de bandas proteicas observadas por SDS-PAGE y actividad hemolítica en extractos de *Cassiopea* de diferentes localidades.

Especie	Localidad	Autor	Bandas	Tamaños (kDa)	CH ₅₀ (µg/mL)
<i>C. xamachana</i>	Las Bahamas	Radwan <i>et al.</i> 2001	8	250, 220, 170, 150, 80, 60, 55 y 45	11
<i>C. andromeda</i>	Qusier, Egipto		18	270, 250, 220, 200, 170, 150, 100, 90, 70, 50, 44, 31, 29, 28, 26, 25, 10 y 5	1
<i>C. xamachana</i>	Las Bahamas	Radwan & Burnet 2001	8	200, 170, 150, 120, 80, 55, 50 y 40	110
<i>C. xamachana</i>	Puerto Rico	Radwan <i>et al.</i> 2005	13	200, 70, 67, 60, 50, 47, 37, 28, 27, 22, 18, 10 y 5	123
<i>C. xamachana</i>	Yucatán, México	Hernández-Muñoz <i>et al.</i> 2016	11	200, 150, 100, 80, 60, 42, 30, 28, 20, 10 y 5	71.75

*Se resaltaron las bandas observadas en más de una extracción con diferentes colores; las bandas observadas en una sola extracción, se encuentran en color negro.

Como se observa en la Tabla 12, en ninguna de las extracciones se presenta el mismo patrón de bandeo. Sin embargo, existen bandas que pueden ser observadas frecuentemente; la banda con mayor cantidad de observaciones corresponde a un peso molecular de 200 kDa; además, hay una amplia variedad de bandas que se observan por una ocasión. La variación no ocurre únicamente en las bandas proteicas, sino también en la actividad hemolítica, la cual, a diferencia de este trabajo, es adjudicada únicamente a las proteínas de pesos moleculares altos en la mayoría de los casos.

Ahora bien, *C. andromeda*, una especie distribuida en el Océano Pacífico ha sido determinada como distinta de *C. xamachana*, propia del Atlántico e Índico; sin embargo, de acuerdo al análisis de haplotipos del gen COI, el nivel de divergencia entre estos especímenes es despreciable, es decir, genéticamente son iguales (Holland *et al.* 2004). Radwan *et al.* 2001 realizaron extracciones de *C. andromeda*, en las cuales se pudieron observar 18 bandas entre los 270 y 5 kDa. De acuerdo a lo anterior, esto habla nuevamente de que existe una influencia muy importante de las condiciones del medio, ya que en estos organismos ubicados en otro océano se observa un patrón de bandeo mucho más rico.

Otra situación que se observó con los trabajos de Radwan *et al.* 2001 y Radwan & Burnet 2001 en *C. xamachana*, inclusive siendo las colectas en la misma localidad durante el mismo año, fue que es posible obtener resultados muy distintos.

El contraste de actividad tóxica se ha analizado en algunos filos de invertebrados marinos. A pesar de que en ciertos grupos como los tunicados han mostrado una tendencia estable en sus niveles de toxicidad, los cnidarios en conjunto con los briozoos se han caracterizado por presentar niveles de toxicidad variable acorde al sitio de colecta y la temporada (Martí *et al.* 2005).

Se ha reportado previamente un escenario similar en corales, donde *Sinularia maxima* y *S. polydactyla* quienes producen los mismos metabolitos como medio defensivo (pukalida y 11 β -acetoxypukalida), a pesar de tener una concentración anual media similar por sitio de muestreo, mostraron una variación importante entre los meses que fueron colectadas (Slattery *et al.* 2001). Por ello, en este trabajo, se sugieren que múltiples factores ambientales influyen los cambios temporales en la concentración de metabolitos de dichos invertebrados. Además, se detectó un incremento en la producción de compuestos defensivos en los lugares con mayor número de predadores potenciales, lo que confirma dicha correlación.

Así mismo, Leone *et al.* (1995) y Fleury *et al.* (2000) comprobaron cambios temporales en terpenoides asociados a estrés competitivo y nutricional en corales. Por otro lado, estudios anexos con variación en metabolitos de invertebrados marinos muestran correlaciones con el periodo reproductivo (Goerke & Weber 1991; Green *et al.* 1992; Fielman & Targett 1995).

Van Alstyne & Paul (1992) realizaron la caracterización cualitativa de los compuestos presentes en los extractos crudos de tres secciones corporales (pedúnculo, media y ápice) de *Gorgonia ventalina* colectada en 8 localidades. Mediante análisis en cromatografía en capa fina observaron que no existió variación cualitativa dentro de cada colonia, misma que si se presentó entre las distintas colonias, lo que indica variación intraespecífica. La concentración del extracto se mantuvo en 13% del peso seco a lo largo del cuerpo, mientras que en el tallo produce 64% menos.

Las variaciones intraespecíficas en la producción de compuestos peptídicos han sido estudiadas ampliamente en los moluscos del género *Conus*, el cual comprende más de 700 especies marinas y venenosas.

Mediante una combinación de MALDI-MS (Desorción/ionización por láser asistida por matriz-Espectrometría de masas) y ESI-MS (Ionización con Electrospray-Espectrometría de masas) ha sido determinado que la composición del veneno por individuo permanece relativamente constante en *Conus striatus*, *C. catus*, *C. textile* y *C. ermineus*, no obstante, se encuentran compuestos diferentes en el análisis animal-animal (Jakubowski *et al.* 2005; Rivera-Ortiz *et al.* 2010).

Los caracteres fenotípicos empleados para la adquisición de recursos pueden evolucionar de acuerdo a cambios en la disponibilidad o utilidad de los mismos (Palkovacs & Post 2008). Muchas explicaciones a la variabilidad en la composición del veneno han sido derivadas de los modelos terrestres. En hormigas, escorpiones y tarántulas, esto se ha visto correlacionado a la localización geográfica (Omran & McVean 2000; Escoubas *et al.* 1998; Touchard *et al.* 2015), mientras que en otros organismos como serpientes, arañas e inclusive moluscos del género *Conus*, presentan preferencias alimenticias que cambian con su desarrollo ontogénico, las cuales podrían estar relacionadas con dicha variabilidad (Saviola *et al.* 2015; Duda *et al.* 2009); sin embargo, investigaciones en otras serpientes no apuntan a la variedad de presas como factor, sino a otras variables intrínsecas como la eficiencia de predación.

La diversidad intraespecífica es esencial para la selección natural y diversificación de venenos. Los factores ambientales y genéticos son aquellos que han sido analizados como responsables del cambio en el contenido del veneno; se ha encontrado que especímenes colectados en la misma área de muestreo, alimentados con la misma presa y analizando el veneno al mismo tiempo muestran contenido distinto de toxinas peptídicas distintas en el veneno (Rivera-Ortiz *et al.* 2010).

En *C. ebraeus*, una de las especies con distribución más amplia, se ha encontrado un locus polimórfico que dicta la variabilidad en las conotoxinas producidas (Duda & Palumbi 2004).

Al analizar dicho locus en poblaciones de Okinawa, Guam y Hawai (los dos primeros ubicados en el Pacífico Oeste y el tercer en el Pacífico Centro) se encontraron diferencias significativas en las frecuencias alélicas de las tres regiones lo cual aparentemente no se relaciona con el tipo de alimento, ya que las poblaciones de Okinawa y Guam tienen una dieta muy similar, aun así hay diferencia en las frecuencias alélicas (Duda *et al.* 2009).

Sin embargo, los contrastes en la composición del veneno no son exclusivos de población a población o de organismo-organismo. En *C. consors* se ha descrito a nivel *in vitro* cómo un mismo espécimen puede comenzar a producir un veneno mucho más complejo después de algunos meses, dejar de producir algunos de los componentes o no producir ninguno de ellos (Duterte *et al.* 2010).

En el caso de medusas, existe evidencia que apoya fuertemente que las variaciones en el proteoma del veneno de una misma especie también ocurren. Además de las variantes reportadas en *C. xamachana*, los pacientes con picadura de *Carukia barnesi* han presentado gran cantidad de manifestaciones clínicas, y una razón para la diversidad de síntomas pueden ser las diferencias intraespecíficas en la composición del veneno (Little & Mulcahy 1998, Little *et al.* 2001; Huynh *et al.* 2003). No obstante, hasta el momento se han hecho análisis comparando los perfiles de bandeado por SDS-PAGE donde efectivamente se encuentran que hay disimilitud en la composición proteica del veneno diferenciada por el estadio de los especímenes (juveniles y adultos) lo cual a su vez se correlaciona con el tipo de presa que adquieren (invertebrados y vertebrados respectivamente) (Underwood & Seymour 2007).

Aún hace falta hacer investigaciones donde la composición química del veneno, el modo en que éste se ingresa a la presa y las diferentes variables ambientales así como el efecto fisiológico que inducen en el organismo para la producción del veneno sean consideradas en estudios multidisciplinarios para tratar de esclarecer los factores que están influyendo en cada especie, ya que, de acuerdo a lo establecido en los últimos estudios, cada especie se ve regida por una combinación de condiciones diferentes a este respecto.

Por otro lado, teniendo en cuenta que la investigación química de venenos conlleva realizar una identificación precisa del organismo, podría ser necesario corroborar la especie mediante otros métodos como los moleculares, debido a que la presencia de una especie gemela o críptica no es descartable, ya que en el presente trabajo la identificación de los organismos se realizó con taxonomía convencional, es decir, mediante los caracteres morfológicos con los cuales no es posible determinar si se trata o no de una especie críptica (Knowlton 1993).

Además, otra situación que puede ocurrir es que los compuestos activos no estén siendo producidos por el invertebrado, sino por microorganismos, hecho que también ha sido bien documentado en esponjas, así como la presencia de variaciones espacio-temporales en compuestos alcaloidales (Thomas *et al.* 2010; Sacristan-Soriano *et al.* 2010). Por ello, también valdría la pena estudiar el tipo de compuestos que son producidos por los especímenes en asociación.

7.2 Conclusiones

- La medusa *Cassiopea xamachana* produce compuestos de entre 10 y 5 kDa con actividad hemolítica y letal en *O. quadrata*.
- Los compuestos presentes en dicha fracción son lábiles. Pierden el efecto aproximadamente 15 días después de ser concentrados.
- Existe una variable o conjunto de variables desconocidas que determinan la producción de los compuestos que revelaron actividades en las pruebas de hemólisis y neurotoxicidad, probablemente se relacione a dinámicas espacio-temporales.

CAPÍTULO 2: Aislamiento de compuestos
proteicos hemolíticos obtenidos a partir de *B.*
cavernatum

8.1. Resultados y discusión

Se realizó una primera extracción acuosa con 82 g de biomasa liofilizada de *B. cavernatum*. Después del proceso de ultrafiltración resultaron 500 mg (Tabla 13) de la fracción de 30-10 kDa la cual previamente había sido reportada como hemolítica por Álvarez-Bohorquez 2016. Los rendimientos de la fracción hemolítica 30-10 fueron de 0.6%, valor de menor magnitud en comparación con el rendimiento reportado por el trabajo anteriormente mencionado con un 1% y una cantidad de proteínas de 979 µg/mL. La fracción de 30-10 kDa obtenida en este trabajo contiene 316 µg de proteína/mL.

Tabla 13. Rendimiento y actividad hemolítica de la fracción 30-10.

Fracción 30-10		
Peso (mg)	% Rendimiento	% Hemólisis
500	0.61	85

En el trabajo de Malpezzi & Freitas del 1991 con *B. caissarum* se reporta un extracto crudo con 420 µg_{proteína}/mL, la técnica empleada para la obtención de éste comprendió la aplicación de pulsos eléctricos a los organismos con el fin de disparar sus nematocistos al medio. Por otro lado, el extracto obtenido por Malpezzi *et al.* 1993 de la misma anémona contuvo 170 mg de proteínas y péptidos (estimación por análisis de aminoácidos) con lo que se muestra que existe mucha variabilidad en la cantidad de proteínas de extractos obtenidos.

La fracción 30-10 fue sometida a CLAR en una columna de fase reversa con el fin de verificar su complejidad mediante detectores UV y ELSD. El detector ELSD permitió la observación de gran cantidad de sales entre 1.6-2.5 min, mientras que el UV reveló la presencia de compuestos coeluyentes con las sales, además de dos picos entre los minutos 4 y 5 de polaridad alta y otros de mediana polaridad en el minuto, 9, 10, 14, 15 y 17 (Fig. 24). También fue posible observar otros dos picos con polaridad más baja en los minutos 19 y 21.

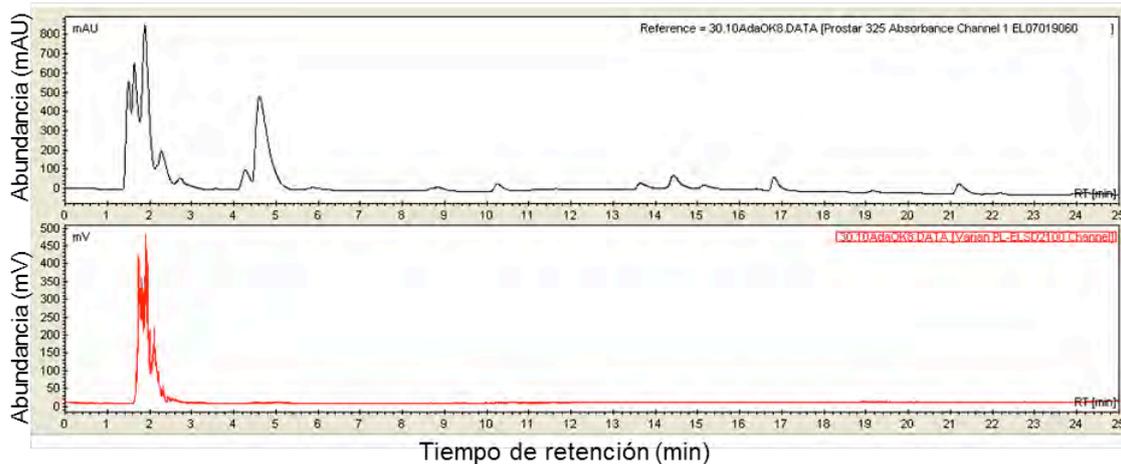


Figura 24. Cromatogramas de la fracción 30-10 de *B. cavernatum* en fase reversa. Detector de UV (-) y detector ELSD (-). CLAR Varian 211, λ_{UV} = 215 nm, ELSD Ice 2100; columna Widedpore C18. Gradiente de Agua/TFA 0.1% 100-0% en 25 min. Flujo 1 mL/min; 20 μ L (10 mg/mL).

A continuación, se sometió la fracción 30-10 a EFS y las subfracciones generadas se evaluaron en hemólisis a una concentración de 10 mg/mL. La actividad quedó retenida por la fracción 70:40 con un 83.26% de actividad (Tabla 14).

Tabla 14. Rendimientos y actividad de las fracciones obtenidas con EFS.

Fracción	mg	% Rendimiento	% Hemólisis
95:5	3.5	1.4	9.15
90:10	2.5	1	12.45
80:20	3.4	1.36	12.02
70:30	1.3	0.52	83.26
60:40	0.7	0.28	24.68
50:50	0.7	0.28	7.56

Enseguida se inyectó la fracción activa en CLAR con una columna Aeris widepore en fase reversa (C-18), con lo que se observó la presencia de una señal mayoritaria entre los minutos 5 y 6 (Fig. 25), que es aproximadamente donde el gradiente comienza en 40% de acetonitrilo, lo cual indica que es un compuesto de mediana polaridad.

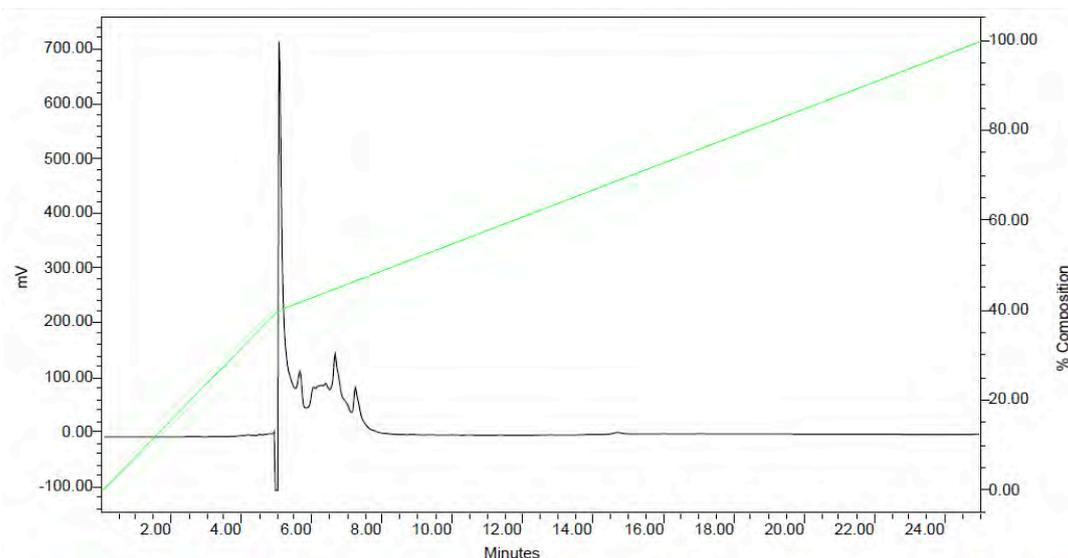


Figura 25. Cromatograma de la fracción 70:30 de *B. cavernatum* en fase reversa. CLAR Waters 1525 , Detector de fluorescencia de onda múltiple Waters 2475, λ excitación= 250 nm λ emisión= 395; columna Widedpore C18. Gradiente de Agua/TFA 0.1%/Acetonitrilo 100-40% en 5 min y 40-0% en 20 min (-). Flujo 1 mL/min; 5 μ L (10 mg/mL).

Se procedió a someter la misma fracción a CLAR en exclusión molecular (SEC), con la cual se observó un pico mayoritario en en el minuto 13 (Fig. 26). Se llevaron a cabo tres cortes del mismo, sin embargo, la cantidad recuperada no fue cuantificable.

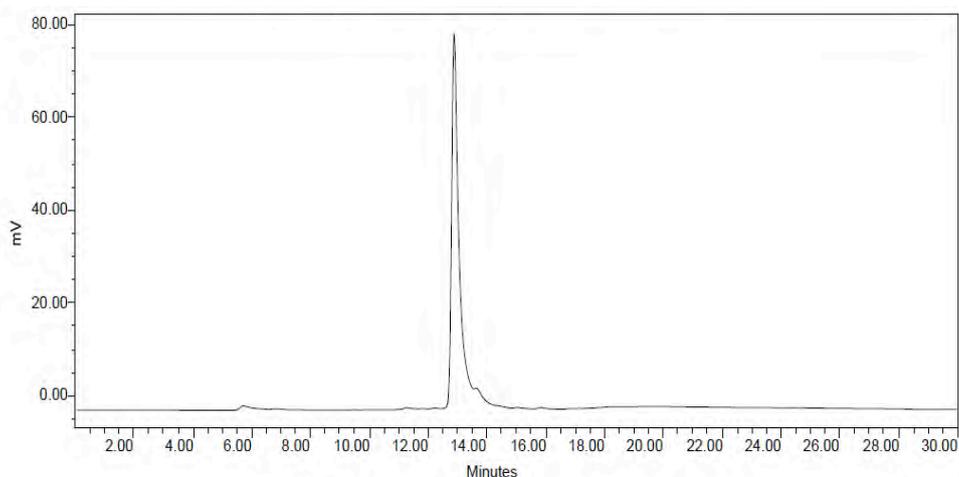


Figura 26. Cromatograma de la fracción 70:30 de *B. cavernatum* en gel permeable. CLAR Waters 1525 , Detector de fluorescencia de onda múltiple Waters 2475, λ excitación= 250 nm λ emisión= 395; columna Yarra SEC 200. Flujo isocrático de H₂O/ACN, 1 mL/min; 5 μ L (10 mg/mL).

Anexo a esto, las muestras fueron analizadas en un gel SDS-PAGE con la intención de visualizar la presencia de los compuestos proteicos y conocer una aproximación de sus pesos moleculares. El gel SDS-PAGE reveló que la ultrafiltración del extracto de *B. cavernatum* para la obtención de la fracción 30-10 fue efectiva, pues no se evidenció la presencia de bandas de pesos moleculares grandes (>30 KDa) (Fig. 27). La electroforesis indicó que la fracción 60:40 tiene dos bandas mayoritarias en aproximadamente 7 y 11 kDa, en tanto que la fracción 70:30 se mostró conformada por tres bandas de aproximadamente 6, 11 y 14 kDa. Debido a que la fracción 70:30 fue la que arrojó valores importantes de hemólisis y cuenta con la banda de aproximadamente 14 kDa, misma que es observada en la fracción 30-10 y ausente en la fracción inactiva 60:40, es posible considerar la posibilidad de que ésta posea el compuesto activo.

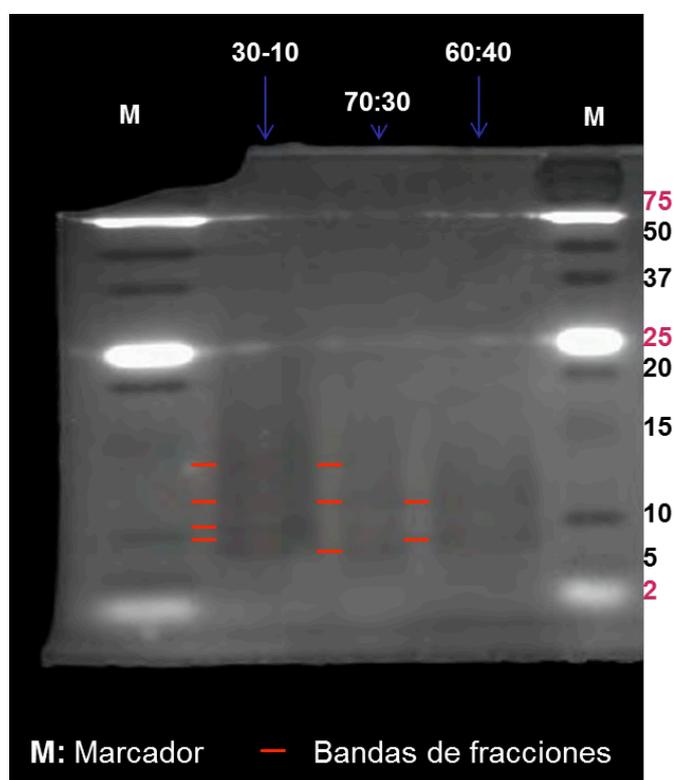


Figura 27. Gel SDS-PAGE para las fracciones 30-10, 60:40 y 70:30 de *B. cavernatum*.

Los pesos moleculares de las bandas mostradas en las diferentes fracciones se asemejan a los obtenidos en la fracción denominada Bcg-2 de *B. cangicum*, la cual estaba compuesta por moléculas de 8 a 18 kDa (Lagos *et al.* 2001).

Estos componentes también presentaron actividad hemolítica con una CH_{50} de 14 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en eritrocitos de ratón.

8.2. Conclusiones

- La fracción 30-10 obtenida mediante ultrafiltración del extracto acusos de *B. cavernatum* posee actividad hemolítica.
- La actividad se mantiene en la fracción 70:30 una vez que la fracción 30-10 es separada mediante extracción en fase sólida.
- De acuerdo al gel SDS-PAGE es posible considerar la posibilidad de que el compuesto activo posee un peso de aproximadamente 14 kDa.

8.3. Perspectivas

- Llevar a cabo el aislamiento de los picos potencialmente activos en columnas semipreparativas con el fin de conseguir suficiente cantidad del compuesto para llevar a cabo bioensayos.
- Una vez que el compuesto activo haya sido identificado, aislar mayor cantidad de compuesto para determinar su peso molecular.
- Someter la posible citolisina a otras pruebas biológicas como el ensayo antimicrobiano y antiproliferativo en células de cáncer para determinar su potencial farmacológico.

9 REFERENCIAS

- Al Saeed, W. M. 2011. Detection of *Trichomonas vaginalis* by different methods in women from Dohok province, Iraq. *Eastern Mediterranean Health Journal* 17: 706-709.
- Ali, V., Nozaki, T. 2007. Current therapeutics, their problems, and sulfur-containing-amino-acid metabolism as a novel target against Infections by "amitochondriate" protozoan parasites. *Clinical Microbiology Review*. 20: 164-187.
- Allavena, P., Signorelli, M., Chieppa, M. 2005. Anti-inflammatory properties of the novel antitumor agent yondelis (trabectedin): inhibition of macrophage differentiation and cytokine production. *Cancer Research* 65: 2964-2971.
- Álvarez-Bohórquez, E. 2016. Obtención de moléculas con posible actividad biológica presentes en la anémona *Bunodosoma cavernata* de la zona costera de Yucatán. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México. 77 pp.
- Anderluh, G. Krizaj, i., Strukelji, B., Gubensek, F., Macek, P., Pungerear, J. 1999. Equinatoxins, pore-forming proteins from the sea anemone *Actinia equina*, belong to a multigene family. *Toxicon* 37: 1391-1401.
- Anderluh, G. & Macek, P. 2002. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria). *Toxicon* 40: 111-124.
- Anderluh, G., Serra, M. D., Viero, G., guella, G., Macek, P., Menestrina, G. 2003. Pore formation by equinatoxin II, a eukaryotic protein toxin, occurs by induction of nonlamellar structures. *Journal of Biology & Chemistry* 278: 45216-45223.
- Aneiros, A., García, I., Martínez, J. R., Harvey, A. L., Anderson, A. J., Marshall, D. L., Engström, A., Hellman, U., Karlsson, E. 1993. A potassium channel toxin from the secretion of the sea anemone *Bunodosoma granulifera*. Isolation, amino acid sequence and biological activity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1157: 86-92.
- Arai, M. N. 2001. Pelagic coelenterates and eutrophication: a review. *Hidrobiology* 451: 69-87.

- Ash, L. R., Orihel, T. C. 2007. Atlas de Parasitología Humana. Editorial *Médica Panamericana*, 5a ed., España, 556 pp.
- Bansal, D., Sehgal, R., Chawla, Y., Malla, N. & Mahajan R. C. 2006. Multidrug resistance in amoebiasis patients. *Indian Journal of Medicine Research* 124: 189-194.
- Beress L. & Zwick J. 1980. Purification of two crab-paralyzing polypeptides from the sea anemone *Bolocera tuediae*. *Marine Chemistry* 8: 333-338.
- Beynon, R. J., Oliver, S. 2004. Avoidance of proteolysis in extracts. In: Cutler, P. Methods in molecular biology: Protein Purification Protocols. *Humana Press* 244: 524 pp.
- Bigelow, R. P. 1900. The anatomy and development of *Cassiopea xamachana*. *Boston Society of Natural History* 5: 191-236.
- Blunden, G. 2001. Biologically active compound from marine organisms. *Phytotherapy Research*. 15: 89-94.
- Blunt, J. W., Copp, B. R., Keyzers, R. A., Munro, M. H. G. & Prinsep, M. R. 2015. Marine natural products. *Natural Products Report* 31: 160-258.
- Bragadeeswaran, S., Thangaraj, S., Prabhu, K. & Rani, S. R. S. 2011. Antifouling activity by sea anemone (*Heteractis magnifica* and *H. aurora*) extracts against marine biofilm bacteria. *Latin American Journal of Aquatic Resources* 39: 385-389.
- Brandon, M. & Cutress, C. E. 1985. A new *Dondice* (Opisthobranchia: Favorinidae), predator of *Cassiopea* in southwest Puerto Rico. *Bulletin of Marine Science* 36 : 139-144.
- Brusca, R. C., Brusca, G. J. 2003. Invertebrates. *Sinauer Associates, Inc., Publishers*. 2nd ed. U. S. A. 904 pp.
- Burgess, R. R., Murray, P. D. 2009 .Methods in enzymology: guide to protein purification. *Elsevier*, 2nd ed. Vol. 463. 835 pp.
- Caccio, S. M. & Ryan, U. 2008. Molecular epidemiology of giardiasis. *Molecular and Biochemical Parasitology* 160: 1523-1531.
- Carranza, P. G., Lujan, H. D. 2010. New insights regarding the biology of *Giardia lamblia*. *Microbes and Infection* 12: 71-80
- Carstensen, K., McFarlane, I. D., Rinehart, K. L., Hudman, D., Sun, F., Grimmelikhuijzen, C. J. P. 1993. Isolation of Glu-Asn-Phe-His-Leu-Arg-

- Pro-NH₂ (ANTHO-RPAMIDE II) a novel, biologically active neuropeptide from sea anemones. *Peptides*, 14: 131-135.
- Castañeda, O., Sotolongo, V., Amor, A. M., Stocklin, R., Anderson, A. J., Havey, A. L., Engstrom, A., Wernstedt, C., Karlsson, E. 1995. Characterization of a potassium channel toxin from the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon*, 33: 603-613.
- CCPE. 2016. Giardiasis: agentes causales. Consultado el 16 de Diciembre de 2016 *In*: www.cdc.gov/dpdx/giardiasis/
- Cedillo-Rivera, R. & Muñoz O. 1992. *In-vitro* susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents. *Journal of Medical Microbiology Vol. 37*: 221-224.
- Costa-Leal, M, Puga, J., Serodio, J., Gomes, N. C. M. & Calado, R. 2007. Trends in the discovery of new marine natural products from invertebrates over the last two decades – Where and what are we bioprospecting?. *New Marine Natural Products from Invertebrates 7*: 1-15.
- Cotton, J. A., Beatty, J. K., Buret, A. G. 2011. Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. *International Journal for Parasitology* 41: 925-933.
- Crompton, D. W. T., Savioli, L. 1993. Intestinal parasitic infections and urbanization. *Bulletin of the World Health Organization* 71: 1-7.
- Cuevas, C., Francesch, A. 2008. Development of yondelis[®] (trabectedin, ET-743). A semisynthetic process solves the supply problem. *Natural Products Reports* 26: 322-337.
- Culver, P. & Jacobs, R. S. 1981. Lophotoxin: a neuromuscular acting toxin from the sea whip (*Lophogorgia rigida*). *Toxicon* 19: 825-830.
- Cunha, R. B., Santana, A. N, Amaral, P. C., Carvalho, M. D., Carvalho, R. B., Santana, A. N., Cavalheiro, E. A., Maigret, B., Ricart, C. A., Cardi, B. A., Sousa, M. V., Carvalho, K. M. 2005. Primary structure, behavioral and electroencephalographic effects of an epileptogenic peptide from the sea anemone *Bunodosoma cangicum*. *Toxicon* 45, 207-217.
- Daly, M., Brugler, M. R., Cartwright, P., Collins, A. G., Dawson, M. N., Fautin, D. G., France, S. C., McFadden, C. S., Opresko, D. M., Rodriguez, E., Romano, S. L., Stake, J. L. 2007. The phylum Cnidaria: A review of

- phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus. *Zootaxa* 1668: 127-182. *In*: Zhang, Z. Q., Shear, W. A. 2007. Tercentenary: Progress in Invertebrate Taxonomy. *Zootaxa*. 1668: 1-766.
- Díaz, J. V., Fernández-Alonso Borrajo, M. E. 1996. Giardiasis: Una breve revisión. Perspectivas diagnósticas en el laboratorio clínico. *Anales de Pediatría* 44: 87-91.
- Duda, T. F. Jr, Palumbi, S. R. 2004. Evolutionary diversification of multigene families: Allelic selection of toxins in predatory cone snails. *Molecular Biology and Evolution*, 17: 1286-1293.
- Duda, T. F. Jr, Chang, D., Lewis, B. D. & Lee T. 2009. Geographic variation in venom allelic composition and diets of the widespread predatory marine gastropod *Conus ebraeus*. *PLoS ONE*, 4: 6245.
- Ebert, D., Herre, E. A. 1996. The evolution of parasitic diseases. *Parasitology Today* 12: 96-101.
- Eckmann, L. 2003. Mucosal defenses against *Giardia*. *Parasite Immunology* 25: 259-70.
- El-Gamal, A. A. H., Chiang, C.-Y., Huang, S.-H., Wang, S.-K., Duh, C.-Y. 2005. Xenia diterpenoids from Fromosan Soft coral *Xenia blummi*. *Journal of Natural Products* 68: 1336-1340.
- Endean, R., Monks, S. A., Cameron, A. M. 1993. Toxins from the box-jellyfish *Chironex fleckeri*. *Toxicon*, vol. 31: 397-410.
- Eno, A. E., Konya, R. S. & Ibu, J. O. 1998. Biological properties of a venom extract from the sea anemone, *Bunodosoma cavernata*. *Toxicon* 36, 2013-2020.
- EPA. 2002. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. United States Environmental Protection Agency, Office of Water (430T). 275 pp.
- Fautin D. G. 2009. Structural diversity, systematics, and evolution of cnidae. *Toxicon* 54: 1054-1064.
- Fenical, W., Okuda, R. K., Bandurraga, M. M., Culver, P. & Jacobs, R. S. 1981. Lophotoxin: a novel neuromuscular toxin from Pacific sea whips of the genus *Lophogorgia*. *Science* 212: 1512-1514.

- Ferchmin, P. A., Pagán, O. R., Ulrich, H., Szeto, A. C., Hann, R. M. & Eterovic, V. A. 2009. Actions of octocoral and tobacco cembranoids on nicotinic receptors. *Toxicon* 54: 1174-1182.
- Fleck, J., Fitt, W. K. 1999. Degrading mangrove leaves of *Rhizophora mangle* Linne provide a natural cue for settlement and metamorphosis of the upside down jellyfish *Cassiopea xamachana* Bigelow. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 234: 83-84.
- Frazão, B., Vasconcelos, V., Antunues, A. 2012. Sea Anemone (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria) Toxins: an overview. *Marine Drugs* 10: 1812-1851.
- Fuhrmeister, H., Meuser, F. 2003. Impact of processing on functional properties of protein products from wrinkled peas. *Journal of Food Engineering* 56: 11-129.
- Galeano, E., Thomas, O. P., Robledo, S., Munoz, D. & Martinez, A. 2011. Antiparasitic bromotyrosine derivatives from the marine sponge *Verongula rigida*. *Marine Drugs* 9: 1902-1913.
- Garateix, A. 2005. El mar: fuente de nuevos fármacos. *Elementos* 58: 39-47.
- Garateix, A. G., Rodríguez, A. A. 2010. Las anémonas marinas como fuente para la obtención de sustancias biológicamente activas. *Revista electrónica de la Agencia de Medio Ambiente* 10.
- Grote, D., Hanel, F, Dahse, H., Sifert, K. 2008. Capnellenes from the soft coral *Dendronephthya rubeola*. *Chemical Biodiversity* 5: 1683-1693.
- Hamlet, C., Santhanakrishnan, A., Miller, L. A. 2011. A numerical study of the effects of bell pulsation dynamics and oral arms on the exchange currents generated by the upside-down jellyfish *Cassiopea xamachana*. *The Journal of Experimental Biology* 214: 1911-1921.
- Hernández-Álvarez, H. M., Sariago-Ramos, I. & Sarracent-Pérez, J. 2009. Infección humana por *Trichomonas vaginalis* y su relación con otros agentes patógenos. *Revista cubana de Obstetricia y Ginecología* 35: 108-117.
- Higgins III, J. E., Ford, M. D., Costello, J. H. 2008. Transitions in morphology, nematocyst distribution, fluid motions, and prey capture during development of the scyphomedusa *Cyanea capillata*. *Biology Bulletin*, 214: 29-41.

- Hill, D. R., Pohl, R., Pearson, R. D. 1986. *Giardia lamblia*: a culture method for determining parasite viability. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 35: 1129-1133.
- Hofmann, D. K., Neumann, R., Henne K. 1978. Strobilation, budding and initiation of scyphistoma morphogenesis in the rhizostome *Cassiopea andromeda* (Cnidaria: Scyphozoa). *Marine Biology* 47: 161-176.
- Hofmann, D. K., Hadfield, M. G. 2002. Hermaphroditism, gonochorism, and asexual reproduction in *Cassiopea* sp.- an immigrant in the islands of Hawai'i. *Invertebrate Reproduction & Development*, 41: 1-3.
- Holland, B. A., Dawson, M. N., Crow, G. L., Hofmann, D. K. 2004. Global phylogeography of *Cassiopea* (Scyphozoa: Rhizostomeae): molecular evidence for cryptic species and multiple invasions of the Hawaiian Islands. *Marine Biology* 145: 1119-1128.]
- Hopf, J. K., Kingsford, M. J. 2013. The utility of statoliths and bell size to elucidate age and condition of a scyphomedusa (*Cassiopea* sp.). *Marine Biology* 160: 951-960.
- Huynh, T. T., Seymour, J., Pereira, P., Mulcahy, R., Cullen, P., Carrete, T., Little, M. 2003. Severity of Irukandji syndrome and nematocyst identification from skin scrapings. *Medical Journal of Australia*, 178: 38-41.
- INC. 2016. What is cancer?. Consultado el 03 de Febrero de 2016 In: www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer
- Jakubowski, J. A., Kelly, W. P., Sweedler, J. V., Gilly, W. F., Schulz, J. R. 2005. Intraspecific variation of venom injected by fish-hunting *Conus* snails. *The Journal of Experimental Biology*, 208; 2873-2883.
- Jensch, F., Hofmann, D., 1997. The cnidomes of *Cassiopea andromeda* Forskal, 1775 and *Cassiopea xamachana* Bigelow, 1882 (Cnidaria: Scyphozoa). In: den Hartog, J. C. (Ed.). Proceedings of the Sixth International Conference on Coelenterate Biology, The Netherlands 1995. Nationaal Natuurhistorisch Museum, Leiden: 279-285.
- Johnston, V. J., Mabey, D. C. 2008. Global epidemiology and control of *Trichomonas vaginalis*. *Current Opinion in Infectious Diseases* 21: 56-64.
- Kem, W. R. 1988. Peptide chain toxins of marine animals. In: Fautin, D. G. (Ed.). Biomedical importance of marine organism. *California Academy of Sciences*, San Francisco: 69-83.

- Kem, W. R., Pennington, M. W., Dunn, B. M. 1990. Sea anemone polypeptide toxins affecting sodium channels. *In: Hall, S. Y Strichartz, G. (Ed.). Marine toxins origin, structure and molecular pharmacology. American Chemical Society, Whashington, D. C: 279 pp.*
- Knowlton, N. 1993. Sibling species in the sea. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24: 189-216.
- Lagos, P., Duran, R., Cerveñansky, C., Freitas, J. C., Silveira, R. 2001. Identification of hemolytic and neuroactive fractions in the venom of the sea anemone *Bunodosoma cangicum*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 34: 895-902.
- Lenarcic, B. Turk, V. 1999. Thyroglobulin type-1 domains in equistatin inhibit both papain-like cysteine proteinases and cahtepsin D. *Journal of Biology an d Chemistry* 274: 563-566.
- Little, M., Mulcahy, R. F. 1998. A years experience of Irukandji envenomation in far north Queensland. *Medical Journal of Australia*, 169: 638-641.
- Little, M., Mulcahy, R. F., Wenck, D. J. 2001. Life-threatening cardiac failure in a healthy young female with Irukandji syndrome. *Anaesthesia and Intensive Care Journal*, 29: 178-180.
- Malpezzi, E. L., Freitas, J. C. 1991. Hemolytic activity of the nematocyst venom from the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 24: 1245-1249.
- Malpezzi, E. L. A., de Freitas, J. C., Muramoto, K., Kamiya, H. 1993. Characterization of peptides in sea anemone venom collected by a novel procedure. *Toxicon* 31: 853-864.
- Martí, R., Uriz, M. J. & Turon, X. 2005. Spatial and temporal variation of natural toxicity in cnidarians, bryozoans and tunicates in Mediterranean caves. *Scientia Marina* 69: 485-492.
- McGivern, J. G. 2007. Ziconotide: a review of its pharmacology and use in the treatment of pain. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 3: 69-85.
- McIntosh, M., Cruz, L. J., Hunkapiller, M. W., Gray, W. R. & Olivera B. M. 1982. Isolation and Structure of a Peptide toxin from the Marine Snail *Conus magus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 218: 329-334.

- Meyer, B. N., Ferrigni N. R., Putnam J. E., Jacobsen L. B., Nicols D. E., McLaughling J. L. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Journal of Medicinal Plant Research* 45: 31-34.
- Mills, C. E. 2001. Jellyfish blooms: are populations increasing globally in response to changing ocean conditions?. *Hydrobiología* 451: 55-68.
- Migues, P., Leal, R. B., Mantovani, M., Nicolau, M., Gabilan, N. H. 1999. Synaptosomal glutamate release induced by the fraction Bc2 from the venom of the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. In: Soletti, R. C., Pinto de Faria, G., Vernal, J., Terenzi, H., Anderrluh, G., Borges, H. L., Moura-Neto, V. 2008. Potentiation of anticancer-drug cytotoxicity by sea anemone pore-forming proteins in human glioblastoma cells. *Anti-Cancer Drugs* 00: 000-000
- Muñoz-Rivas, A. 2011. Estudio Químico y Biológico Preliminar de Dos Especies de Pepino de Mar de la Familia Stichopodidae de las Costas de Yucatán como Fuente Potencial de Compuestos. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F. 10 pp.
- Nagai, H., Takuwa, K, Nakao, M., Ito, E., Miyake, M, Noda, M., Nakaiima, T. 2000. Novel proteinaceous toxins from the box jellyfish (sea wasp) *Carybdea rastoni*. *Biochemical & Biophysics Research Communication*, Vol. 275: 582-588.
- Niggli, W., Naumann, M. S., Struck, U., Manasrah, R., Wild, C. 2010. Organic matter release by the benthic upside-down jellyfish *Cassiopea* sp. Fuels pelagic food webs in coral reefs. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 384: 99-106.
- Norton, R. S. 2009. Structures of sea anemone toxins. *Toxicon* 54: 1075-1088.
- OMS. 1998. Intestinal parasites control: burden and trends. Consultado el: 13 de Junio de 2014 who.int/iris/bitstream/10665/63790/1/WHO_CTD_SIP_98.2.pdf
- OMS. 2014. Los microorganismos y los antimicrobianos. Consultado el 11 de Junio de 2014, del Sitio Web de la *Organización Mundial de la Salud*: http://www.who.int/drugresistance/Microbes_and_Antimicrobials/es/
- OMS. 2016. Cáncer. Consultado el: 03-02-16 In: www.who.int/cancer/en/
- Othman, Y. Burnett, J. W. 1990. Techniques applicable for purifying Chironex fleckeri (box-jellyfish) venom. *Toxicon* 28: 821-835.

- Orduña-Novoa, K., Segura-Puertas, L., Sánchez-Rodríguez, J., Meléndez, A., Nava-Ruíz, C., Rembao, D., Santamaría, A., Galván-Arzate, G. 2003. Possible antitumoral effect of the crude venom of *Cassiopea xamachana* (Cnidaria: Scyphozoa) tumors of the central nervous system induced by n-ethyl-n-nitrosourea (ENU) in Rats. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*. 46: 85-87.
- Ovchinnikova, T. V., Balandin, S. V., Aleshina, G. M., Tagaev, A. A., Leonova, Y. L., Krasnodembsky, E. D., Men'shenin, A. V., Kokryakov. 2006. Aurelin, a novel antimicrobial peptide from jellyfish *Aurelia aurita* with structural features of defensins and channel-blocking toxins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 348: 514-523.
- Palkovacs, E. P., Post, D. M. 2008. Eco-evolutionary interactions between predators and prey: Can predator-induced changes to prey communities feed back to shape predator foraging traits. *Evolutionary Ecology Research*, 10: 699-720.
- Perdicaris, S., Vlachogianni, T. & Valavanidis, A. 2013. Bioactive Natural Substances from Marine Sponges: New Developments and Prospects for Future Pharmaceuticals. *Natural Products Chemistry & Research* 1: 1-8.
- Pisal, D. S., Kosloski, M. P. & Balu-Lyer, S. V. 2010. Delivery of therapeutic proteins. 2010. *Journal of Pharmaceutical Science*, 99: 2557-2575.
- Quero-Reimão, J., Migotto, A. E., Kossuga, M. H., Berilnck, R. G. S. & Tempone A. G. 2008. Antiprotozoan activity of Brazilian marine cnidarian extracts and of a modified steroid from the octocoral *Carijoa riisei*. *Parasitology Research*. 103: 1445-1450.
- Rachamim, T. Morgenstem, D., Aharonovich, D., Brekhman, V., Lotan, T., Sher, D. 2015. The Dynamically evolving Nematocyst Content of an Anthozoan, a Scyphozoan, and Hydrozoan. *Molecular Biology and Evolution*, 32: 740-753.
- Radwan F. F. Y., Burnett J. W., Bloom D. A. Coliano T., Eldefrawi M. E., Erderly H., Aurelian L., Torres M. & Heimer-de la Cotera E. P. 2001. A comparison of the toxinological characteristics of two *Cassiopea* and *Aurelia* species. *Toxicon* 39: 245-257.

- Radwan, F. F. Y., Burnett, J. W. 2001. Toxinological studies of the venom from *Cassiopea xamachana* nematocysts isolated by flow cytometry. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 128: 65-73.
- Radwan, F. F. Y., Román, L. G., Baksi, K., Burnett, J. W. 2005. Toxicity and mAChRs binding activity of *Cassiopea xamachana* venom from Puerto Rican coasts. *Toxicon* 45: 107-112.
- Renslo, A. R., McKerrow, J. H. 2006. Drug discovery and development for neglected parasitic diseases. *Nature chemical biology* 2: 701-710.
- Rivera-Ortiz, J. A., Cano, H., Marí, F. 2010. Intraspecies variability and conopeptide profiling of the injected venom of *Conus ermineus*. *Peptides* 32: 306-316.
- Rocha, J., Peixe, L., Gomes, N. C. M. & Calado, R. 2011. Cnidarians as a source of new marine bioactive compounds – An overview of the last decade and future steps for bioprospecting. *Marine Drugs*, 9: 1860-1886.
- Sacristan-Soriano, O., Banaigs, B. & Becerro, M. A. 2010. Temporal trends in the secondary metabolite production of the sponge *Aplysina aerophoba*. *Marine Drugs*, 10: 677-693.
- Salomon, M. C., Martínez, N., Delgado, D., González-Arra, C., Bittar, V., González, N. 2011. Prevalencia de *Trichomonas vaginalis* en trabajadores sexuales. *Medicina (Buenos Aires)* 71: 429-431.
- Sanchez, L., Enea, V., Eichinger, D. 1994. Identification of a developmentally regulated transcript expressed during encystation of *Entamoeba invadens*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 67: 125-135.
- Sánchez-Rodríguez, J. & Lucio-Martínez, N. L. 2011. Aislamiento y prepurificación de los compuestos activos presentes en el veneno de *Pelagia noctuluca* (Scyphozoa: Pelagiidae) del Mar Caribe. *Ciencias Marinas* 37: 369-377.
- Santana, A. N. C., Leite, A. B., França, M. S. F., Vale, O. C., Cunha, R. V., Ricart, C. A., Soussa, M. V., Varvalho, K. M. 1998. Partial sequence and toxic effects of granulotoxin, a neurotoxic peptide from the sea anemone *Bunodosoma granulifera*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 31: 1335-1338.
- Santhanakrishnan, A., Dollinger, M., Hamlet, C. L., Colin, S. P., Miller, L. A. 2012. Flow structure and transport characteristics of feeding and

- exchange currents generated by upside-down *Cassiopea* jellyfish. *The Journal of Experimental Biology* 215: 2369-2381.
- Slattery, M., Starmer, J. & Paul, V. J. 2001. Temporal and spatial variation in defensive metabolites of the tropical Pacific soft corals *Sinualria maxima* and *S. polydactyla*. *Marine Biology*, 138: 1183-1193.
- Soletti, R. C., Pinto de Faria, G., Vernal, J., Terenzi, H., Anderrluh, G., Borges, H. L., Moura-Neto, V. 2008. Potentiation of anticancer-drug cytotoxicity by sea anemone pore-forming proteins in human glioblastoma cells. *Anti-Cancer Drugs* 00: 000-000.
- Stolarz, J., Zaharenko, A. J., de Freitas, J. C., Konno, K, de Andrade, S. A., Portraro, F. C. V., Richardosn, M., Sant'Anna, O. A., Tambourgi, D. V. 2006. Caissarolysin I (Bcs I), a new hemolytic toxin from the Brazilian sea anemone *Bunodosoma caissarum*: purification and biological characterization. *Biochimica et Biophysica Acta* 1760: 453-461.
- Teixeira, J E. & Mann, B. J. 2002. *Entamoeba histolytica*- Induced dephosphorylation in host cells. *Infection and Immunity* 70: 1816-1823.
- Tejuca, M., Anderluh, G., Maček, P., Marcet, R., Torres, D., Sarrancet, J., Alvarez, C., Lanio, M. E., Dalla-Serra, M. & Menestrina, G. 1999. Antiparasite activity of sea-anemone cytolysins on *Giardia duodenalis* and specific targeting with anti-Giardia antibodies. *International Journal for Parasitology* 29: 489-498.
- Templeman, M. A., Kingsford, M. J. 2010. Trace element accumulation in *Cassiopea* sp. (Scyphozoa) from urban marine environments in Australia. *Marine Environmental Research* 69: 63-72.
- Thangaraj, S., Bragadeeswaran, S., suganthi, K. & Sri Krumaran, N. 2011. Antimicrobial properties of sea anemone *Stichodactyla mertensii* and *Stichodactyla gigantea* from Mandapam coast of India. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*: 43-46.
- Thomas, T. R. A., Kavlekar, D. P., LokaBharathi, P. A. 2010. Marine drugs form sponge-microbe association- A review. *Marine Drugs*, 8: 1417-1468.
- Thompson, R. C. A. 2008. Giardiasis: Conceptos modernos sobre su control y tratamiento. *Annales Nestlé* 66: 23-29.
- Torres, M., Aguilar M. B., Falcón A., Sánchez L., Faisal F., Radwan Y., Burnett J. W., Heimer-de la Coteria E. P. Arellano R. O. 2001.

- Electrophysiological and hemolytic activity elicited by the venom of the jellyfish *Cassiopea xamachana*. *Toxicon* 39: 1297-1307.
- Touchard, A., Dejean, A., Escoubas, P., Orivel, J. 2015. Intraspecific variations in the venom peptidome of the *Odontomachus haematodus* (Formicidae: Ponerinae) from French Guiana. *Journal of Hymenoptera Research*, 47: 87-101.
- Turk, T. & Kem, W. R. 2009. The phylum Cnidaria and investigations of its toxins and venoms until 1990. *Toxicon* 54: 1031-1037.
- Underwood, A. H., Seymour, J. E. 2007. Venom ontogeny, diet and morphology in *Carukia barnesi*, a species of australian box jellyfish that causes Irukandji syndrome. *Toxicon*, 49: 1073-1082.
- Upcroft P., Upcroft. J. A. 2001. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 150-164.
- Wah, S. T. 1993. Toxicity testing using the brine shrimp: *Artemia salina*. In: Colegate S. M., Molyneux R. J. (eds) Bioactive natural products, detection, isolation and structural determination. *CRC*, London: 441-456.
- Welsh, D. T., Dunn, R. J. K., Maeziane, T. 2009. Oxygen and nutrient dynamics of the upside down jellyfish (*Cassiopea* sp.) and its influence on benthic nutrient exchanges and primary production. *Hydrobiología* 635: 351-362.
- Wolf, M., Clark-Lewis, I., Buri, C., Langen, H., Lis, M., Mazzucchelli, L. 2003. Cathepsin D specifically cleaves the chemokines macrophage inflammatory protein-1 α , macrophage inflammatory protein-1 β , and SLC that are expressed in human breast cancer. *American Journal of Pathology* 162: 1183-1190.
- Wu, C. H. 2009. Palytoxin: membrane mechanisms of action. *Toxicon* 54: 1183-1189.
- Yaeger, R. G. 1996. Chapter 77 Protozoa: Structure, Classification, Growth and Development. In: Baron, S. 1996. Medical Microbiology. University of Texas Medical Branch at Galveston, 4th edition.
- Yamaguchi, Y., Hasegawa, Y., Honma, T., Nagashima, Y., Shiomi, K. 2010. Screening and cDNA cloning of Kv1 potassium channel toxins in sea anemones. *Marine Drugs* 8: 2893-2905.
- Zaharenko, A. J., Alves-Ferreira, W., Stoloarz-de Olivera, J., Konno, K., Richardson, M., Schiavon, E., Wnake, E. De Freitas, J C. 2008a.

Revisiting cangitoxin, a sea anemone peptide: Purification and characterization of cangitoxins II y III from de venom of *Bunodosoma cangicum*. *Toxicon* 51: 1303-1307.

Zaharenko, A. J., Alves-Ferreira, W., Oliveira, J. S., Richardson, M., Carvalho-Pimienta, D., Konno, K., Portaro, F. C. V., de Freitas, J. C. 2008b. Proteomics of the neurotoxic fraction from the sea anemone *Bunodosoma cangicum* venom: Novel peptides belonging to new classes of toxins. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part D* 3: 219-225.

Zaharenko, A. J., Picolo, G., Ferreira, W. A., Murakami, T. Kazuma, K, Hashimoto, M. Cury, Y, de Freitas, J. C., Satake, M. Konno, K. 2011. Bunodosine 391: An analgesic acylamino acid from the vonom of the sea anemone *Bunodosoma cangicum*. *Journal of Natural Products* 74: 378-382.