



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

**CARACTERIZACIÓN DE ALGUNAS PROTEÍNAS CON ACTIVIDAD
CITOTÓXICA, EXTRAÍDAS DE LA CUBOMEDUSA *Carybdea marsupialis*,
SOBRE CÉLULAS CANCEROSAS.**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

AMANDA PÉREZ TREJO

DIRECTORA DE TESIS:

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

COMITÉ TUTORAL:

DR. MANUEL BENIGNO AGUILAR RAMÍREZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA (UNAM)
DR. ROBERTO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS
INSTITUTO DE QUÍMICA (UNAM)
DRA. GABRIELA RODRÍGUEZ FUENTES
UNIDAD DE QUÍMICA SISAL, FACULTAD DE QUÍMICA (UNAM)
DR. SERGIO RODRÍGUEZ MORALES
UNIDAD DE QUÍMICA SISAL, FACULTAD DE QUÍMICA (UNAM)

PUERTO MORELOS, QUINTANA ROO SEPTIEMBRE 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.



Universidad Nacional Autónoma de México

Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología

“Caracterización de algunas proteínas con actividad citotóxica,
extraídas de la cubomedusa *Carybdea marsupialis*, sobre células
cancerosas”

Presenta:

Amanda Pérez Trejo

Directora de Tesis:

Dra. Judith Sánchez Rodríguez

Comité Tutorial:

Dr. Manuel Benigno Aguilar Ramírez

Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros

Dra. Gabriela Rodríguez Fuentes

Dr. Sergio Rodríguez Morales

RESUMEN

Los compuestos bioactivos derivados de metabolitos secundarios producidos por los invertebrados marinos han demostrado tener un potencial farmacológico, dando lugar al desarrollo de productos naturales marinos prometedores. Dentro de los cnidarios, estos compuestos se encuentran principalmente en los nematocistos que es donde se alojan las toxinas, siendo la clase Cubozoa la que produce unas de las más dañinas. Se ha descrito un grupo particular de citotoxinas, las cuales tienen origen proteico y son lábiles e hidrofóbicas; se conoce que este grupo presenta actividad citolítica y pesos moleculares que van desde 42 a 46 kDa.

Actualmente, la actividad más estudiada en este tipo de toxinas es la antitumoral, de la cual se conoce que principalmente actúa en la división celular. El Instituto Nacional del Cáncer (2015; sitio web) ha impulsado la bioprospección marina, dado que se ha descubierto que los organismos marinos son más propensos a producir fármacos contra el cáncer. El cáncer es una enfermedad de la cual se estima que cada año más de 10 millones de personas son diagnosticadas, y cerca de 7 millones fallecen directa o indirectamente debido a una neoplasia maligna.

En los estudios realizados con la cubomedusa *Carybdea marsupialis* se ha descrito actividad hemolítica en eritrocitos de humano y oveja y actividad neurotóxica en cangrejos *Ocypode quadrata* y en ovocitos de rana *Xenopus laevis* por bloqueo de canales iónicos. En cuanto a la actividad antitumoral, se tiene un único antecedente con resultado positivo en tumores inducidos con N-Etil-N-Nitrosourea en sistema nervioso central de ratas.

De los organismos capturados en los años 2014 y 2015 de *C. marsupialis*, se obtuvo un extracto crudo el cual fue pre-purificado mediante ultrafiltración obteniéndose las siguientes fracciones: >30, 30-10, 10-5, 5-3, 3-1 y <1 kDa. Se evaluó la presencia de actividad enzimática correspondiente a Fosfolipasas de tipo A₂, para finalmente evaluar la actividad citotóxica en líneas celulares cancerosas y no cancerosas.

C. marsupialis no presentó actividad enzimática correspondiente a fosfolipasa de tipo A₂. Sin embargo, se observó una posible actividad de fosfolipasa B. La fracción pre-purificada >30 kDa inhibió el crecimiento celular en la línea K562 (leucemia) un 88.17% a una concentración proteica de 50 µg/ml, comparado con el control positivo (Mitoxantrona) que inhibió un 86.35% el crecimiento celular. En la línea celular MCF7 (mama) a la misma concentración, dicha fracción inhibió 22.75% comparado con el control positivo que inhibió 60.99%. En cuanto a células no cancerosas, se utilizaron fibroblastos gingivales humanos, en los cuales no se observó actividad citotóxica.

Palabras clave: *Carybdea marsupialis*, cubozoa, citotoxicidad, cáncer de mama, leucemia mieloide

AGRADECIMIENTOS

A mi amada familia por su apoyo incondicional y siempre motivación a conseguir mis objetivos. A mis familiares por su apoyo académico y moral, especialmente a mis queridas Julias.

A la Dra. Judith Sánchez Rodríguez por brindarme la oportunidad de integrarme a su equipo de trabajo, por su dedicación y confianza.

Al comité tutorial conformado por los Doctores Manuel Aguilar, Roberto Arreguín, Gabriela Rodríguez y especialmente al Dr. Sergio Rodríguez, por su dedicación y observaciones siempre con la mejor disposición.

A la M. en C. Laura Celis Gutiérrez, por su apoyo en la bibliografía para el desarrollo de este trabajo, así como apoyo personal.

Al Capitán Amaury Mendoza por su valiosísima colaboración en la captura de las medusas y localización de sitios, siempre con tantos ánimos esperando encontrar hasta la más fea.

Otro agradecimiento especial para Ilinova y Antonia, porque fueron unos pilares imprescindibles siempre, acompañándome con su humor característico hasta en los tiempos no tan fáciles. Y claro!! Todas sus enseñanzas y conocimientos compartidos, los cuales siempre fueron de vital importancia.

Otros imprescindibles...Pecas, Miguel, Ary, Isa y Darren por siempre darme esa fuerza, por haber sido mi paño de lágrimas y a la vez, festejar los triunfos...en general, por siempre haber estado ahí, de corazón mil gracias amigos. A Wendo por los detalles que me alegraban el día cuando era necesario, por las visitas y las risas. A Omar y Juanita, que si bien nos volvimos cercanos casi al final de esta aventura, son personas realmente especiales para mí con las cuales pude compartir grandes alegrías, y también soy muy feliz de haberles conocido.

En general, a toda la comunidad de la UASA-Puerto Morelos por los ratos de convivencia, las risas, las comidas en la palapa...siempre tan alegres 😊.

Al Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología-UNAM y su personal administrativo por brindar su apoyo. A CONACYT (627723) por el apoyo económico y al Proyecto PAPIIT-DGAPA IN 202714 por financiar el proyecto en el cual se desarrolló mi tesis.

ÍNDICE

1.INTRODUCCIÓN	3
1.1 <i>Compuestos activos presentes en el phylum Cnidaria</i>	4
1.2 <i>Toxinas de la clase Cubozoa</i>	5
2. ANTECEDENTES	7
2.1 <i>Cáncer</i>	7
2.1.1 <i>Leucemia</i>	8
2.1.2 <i>Cáncer de seno</i>	10
2.2 <i>Antitumorales de origen marino</i>	12
2.2.1 <i>Mecanismos regulados por antitumorales de origen marino</i>	12
2.3 <i>Cnidarios</i>	14
2.3.1 <i>Cnidocitos</i>	16
2.3.2 <i>Nematocistos</i>	16
2.4 <i>Clase Cubozoa</i>	17
2.4.1 <i>Carybdea marsupialis</i>	17
2.4.2 <i>Estudios previos realizados en Carybdea marsupialis</i>	18
3. JUSTIFICACIÓN ACADÉMICA	19
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	20
5. OBJETIVOS	20
5.1 <i>Objetivo General</i>	20
5.2 <i>Objetivos Particulares</i>	20
6. ÁREA DE ESTUDIO	21
7. MATERIAL Y MÉTODOS	22
7.1 <i>Recolecta de organismos</i>	22
7.2 <i>Descarga de nematocistos</i>	22
7.3 <i>Cuantificación de proteínas</i>	23
7.3.1 <i>Preparación de alícuotas de ExC1</i>	24
7.3.2 <i>Preparación de alícuotas de ExC2</i>	24
7.4 <i>Pre-purificación de extracto crudo</i>	24
7.4.1 <i>Ultrafiltración por centrifugado</i>	24
7.4.2 <i>Filtración por célula de agitación</i>	24
7.5 <i>Electroforesis (SDS-PAGE)</i>	25

7.5.1 Preparación para ExC1	25
7.5.2 Preparación para ExC2	26
7.6 Bioensayos.....	26
7.6.1 Fosfolipasa A ₂	26
7.6.2 Citotoxicidad en células cancerosas	27
8. RESULTADOS	29
8.1 Recolecta de organismos y descarga de nematocistos.....	29
8.2 Pre-purificación de extractos crudos y rendimientos	31
8.3 Electroforesis (SDS-PAGE).....	31
8.4 Fosfolipasas (método modificado de Price et al., 1982)	33
8.5 Citotoxicidad en líneas celulares.....	34
9. DISCUSIÓN	36
9.1 Descarga de nematocistos	36
9.2 Nematocistos presentes en <i>Carybdea marsupialis</i>	36
9.3 Electroforesis SDS-PAGE	36
9.4 Bioensayos.....	37
9.4.1 Fosfolipasas	37
9.4.2 Citotoxicidad en células cancerosas	38
10. CONCLUSIONES	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Proteínas bioactivas presentes en cubomedusas, modificada de Brinkman y Burnell (2009).	5
Tabla 2. Concentración de proteína y rendimientos obtenidos de <i>Carybdea marsupialis</i>	30
Tabla 3. Rendimiento de fracciones obtenidas de <i>Carybdea marsupialis</i> mediante ultrafiltración y célula de agitación.....	31
Tabla 4. Inhibición de crecimiento por actividad citotóxica de <i>C. marsupialis</i> . NC (No citotóxico) .	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Formación de tumor secundario.....	7
Figura 2. Anatomía del hueso	8
Figura 3. Anatomía del seno femenino.....	11
Figura 4. Phylum Cnidaria	15
Figura 5. Figura esquemática de una medusa	16
Figura 6. Ejemplar de la especie <i>Carybdea marsupialis</i>	17
Figura 7. Ubicación de la Bahía Petempich.....	21
Figura 8. Esquema de la obtención de fracciones pre-purificadas	25
Figura 9. Sitios de colecta de <i>Carybdea marsupialis</i>	29
Figura 10. Nematocistos presentes en los tentáculos de <i>Carybdea marsupialis</i>	30
Figura 11. Electroforesis en gel de acrilamida de ExC1 y ExC2 obtenidos de <i>Carybdea marsupialis</i>	32
Figura 12. Electroforesis en gel de acrilamida al 15% realizado con fracciones pre-purificadas de ExC1	33
Figura 13. Electroforesis en gel de acrilamida al 15% realizado con fracciones pre-purificadas de ExC2	33
Figura 14. Bioensayo de actividad enzimática con posible actividad de fosfolipasa B.....	34

1. INTRODUCCIÓN

Aunque los océanos contienen una biodiversidad muy superior a la de la tierra, la exploración de nuevos compuestos químicos para tratar enfermedades apenas se ha iniciado. Los productos naturales marinos ofrecen una fuente abundante de compuestos farmacológicamente activos con una gran complejidad y diversidad química, así como efectos potencialmente terapéuticos para la salud humana (De la Calle, 2007; Glaser y Mayer, 2009).

Los invertebrados marinos de cuerpo blando, algunos con estilo de vida sedentario, han ido adaptándose a su medio mediante el desarrollo de medios químicos como defensa; de esta forma han desarrollado la habilidad de sintetizar compuestos, permitiéndoles disuadir a los depredadores, limitar a los competidores o paralizar a sus presas (Haefner, 2003). Estos compuestos de origen orgánico son llamados metabolitos secundarios, de los cuales la gran mayoría no parece intervenir directamente en procesos de crecimiento y desarrollo de los organismos. Sin embargo, los investigadores han buscado el potencial farmacológico de estos metabolitos secundarios, lo que dio lugar al estudio de productos naturales marinos (Croteau *et al.*, 2000).

Derivado de lo anterior, se sabe que los compuestos capaces de detener el crecimiento de organismos rivales pueden aplicarse al cáncer, específicamente en la división celular. Las neurotoxinas de dinoflagelados y moluscos juegan un papel determinante como venenos paralizantes de vertebrados; de este tipo de compuestos se han comercializado ciertos péptidos de origen marino para el tratamiento de dolor crónico (De la Calle, 2007). Más del 60% de los fármacos quimioterapéuticos usados actualmente son productos naturales o pequeñas moléculas basadas en éstos (Glaser y Mayer, 2009).

El campo de los productos naturales marinos se ha visto beneficiado en los últimos 5 años, debido a los nuevos desarrollos en tecnología analítica, espectroscopía y cromatografía de alta resolución. Los esfuerzos directos en el desarrollo de fármacos comenzaron en el año 1970 y finalmente han rendido frutos con el primer fármaco derivado del mar, Ziconotide, el cual es un péptido extraído del caracol *Conus sp.*, el cual se aprobó en el año 2004 bajo el nombre comercial de Prialt® para el tratamiento de dolor crónico. El segundo fármaco, el compuesto antitumoral conocido como Trabectedina, lleva por nombre comercial Yondelis®, fue obtenido de una ascidia y aprobado en el año 2007 para el tratamiento de sarcoma en tejido blando. Además de éstos, existen otros compuestos obtenidos de productos naturales marinos como candidatos a fármacos en proceso de pruebas clínicas Fase I-III en Estados Unidos y Europa, como tratamientos para varios tipos de cáncer (Molinski *et al.*, 2009).

1.1 Compuestos activos presentes en el phylum Cnidaria

Propiedades anticancerígenas y antitumorales potencialmente prometedoras han sido encontradas en compuestos obtenidos de cnidarios; para el año 2011 ya se tenían reportados 3,244 productos naturales marinos obtenidos de estos organismos (Rocha *et al.*, 2015). Se han realizado diversos estudios de los compuestos con actividad biológica en cnidarios y de esta forma se ha dado a conocer su potencial; como en el caso de la especie *Aurelia* sp. la cual despliega una respuesta neurotóxica provocando despolarización de los músculos de rana (Kihara *et al.*, 1988); *Carybdea rastoni* produce una respuesta contráctil dependiente del canal de calcio en el músculo liso arterial (Azuma *et al.*, 1986a); toxinas de *Chrysaora* sp. abren canales catiónicos en las fibras nerviosas mielinizadas de rana (Dubois *et al.*, 1983).

También se han descrito efectos vasoconstrictores y cardiodepresivos en conejos anestesiados, como consecuencia de la activación de los canales de calcio dependientes del voltaje y probablemente de una sobrecarga de calcio producidos por los nematocistos aislados de tentáculos de *Chiropsalmus quadrigatus* (Koyama *et al.*, 2003).

Las citolisinas extraídas de los nematocistos del coral *Clavularia viridis* presentaron propiedades antitumorales inhibiendo el crecimiento celular en la fase G1, decreciendo la fase S (Honda *et al.*, 1987), de igual manera, en la medusa *Cassiopea xamachana* se reportó la inhibición del crecimiento celular, lo que le dio un particular interés para explorar esta condición en actividad antitumoral, dando resultados positivos en el trabajo realizado por Orduña-Novoa y colaboradores (2003). Para la medusa *Chiropsalmus quadrigatus*, Sun y colaboradores (2002) realizaron bioensayos apoptóticos con extractos crudos obtenidos del veneno de la medusa, demostraron efecto positivo en gliomas de humano, rata y células endoteliales vasculares.

1.2 Toxinas de la clase Cubozoa

Las toxinas con actividad citolítica son las más estudiadas y pueden ser encontradas en el veneno de todos los cnidarios. Su mecanismo de acción es la formación de poros; penetran en la membrana de una célula blanco lo que ocasiona una difusión de pequeñas moléculas, dando lugar a un desbalance osmótico y posteriormente a lisis celular (Jouiaei *et al.*, 2015).

Dentro del phylum Cnidaria, la clase Cubozoa produce unas de las toxinas más dañinas para los seres humanos; se sabe que particularmente presentan un grupo de toxinas proteicas termolábiles, hidrofóbicas y con actividad citolítica de 42 a 46 kDa. Por la naturaleza de estas proteínas, sus mecanismos de acción son poco claros, por lo que ha sido necesario el desarrollo de nuevas técnicas de extracción y análisis para su aislamiento y purificación (Brinkman y Burnell, 2009). A continuación, en la Tabla 2 se describen proteínas bioactivas de la clase Cubozoa de las cuales se han obtenido pesos moleculares exactos.

Tabla 1. Proteínas bioactivas presentes en cubomedusas, modificada de Brinkman y Burnell (2009).

Especie	Toxina	¹ Exp. (kDa)	² Calc. (kDa)	Referencia
<i>Carybdea rastoni</i>	CrTX-A	43	47.3	Nagai <i>et al.</i> (2000a)
	CrTX-B	46	-	
<i>Carybdea alata</i>	CaTX-A	43	49	Nagai <i>et al.</i> (2000b)
	CaTX-B	45	-	
	CAH1	42	-	
<i>Chiropsalmus quadrigatus</i>	CqTX-A	44	49.6	Nagai <i>et al.</i> (2002)
<i>Chironex fleckeri</i>	CfTX-1	43	49.1	Brinkman y Burnell (2007)
	CfTX-2	45	49.9	

¹Exp. Masa molecular de proteínas de forma experimental, determinada mediante SDS-PAGE.

²Calc. Masa molecular de proteínas calculada mediante secuencia de aminoácidos.

En *Carybdea rastoni* se han descrito cuatro toxinas parcialmente purificadas, pCrTX, que puede inducir contracciones dependientes del calcio en la aorta de conejos y CrTXI, II y III, con actividad hemolítica (Azuma *et al.*, 1986b; Nagase *et al.*, 1987; Nagai *et al.*, 2000a). Finalmente, de dos toxinas más, CrTX-A y CrTX-B, se ha logrado obtener su secuencia de aminoácidos (Nagai *et al.*, 2000a).

En cuanto a *Carybdea alata*, se han descrito dos toxinas extraídas de sus tentáculos, CaTX-A y CaTX-B, ambas con actividad hemolítica. Para el caso particular de CaTX-A, encontrada únicamente en nematocistos, se ha logrado obtener su secuencia (Nagai *et al.*, 2000b). Dos años más tarde, se logra caracterizar la proteína principal extraída de los nematocistos de *Chiropsalmus quadrigatus*, CqTX-A, con actividad hemolítica (Nagai *et al.*, 2002).

Con más de cuatro décadas de investigación, *Chironex fleckeri* ha sido la cubomedusa más estudiada; presenta proteínas letales de diversos pesos moleculares así como actividad de tipo cardiotoxica, dermonecrotica, hemolítica y miotóxica (Brinkman y Burnell, 2008; 2009). Investigaciones recientes han demostrado que el veneno en dosis sub-letales resulta neurotóxico en cangrejos. Aplicaciones intravenosas, en ratones y ratas, resulta en una interrupción de la respiración seguida de arresto cardiaco; efectos similares e igual de letales se observan en humanos (Endean *et al.*, 1969; Freeman y Turner, 1972).

De *Carukia barnesi* únicamente se conoce su perfil proteico en SDS-PAGE, con proteínas de altos pesos moleculares como 106, 80, 45 y 40 kDa y dos bandas de bajo peso molecular menores a 18.5 kDa (Wiltshire *et al.*, 2000).

Por último, en *Carybdea marsupialis*, se ha descrito actividad hemolítica por citolisinas de 220, 107, 36 y 19 kDa (Rottini *et al.*, 1995; Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2006). Extracto crudo obtenido de esta especie así como fracciones purificadas (220, 139 y 36 kDa), fueron probadas en cangrejos adultos *Ocypode quadrata* con el fin de determinar actividad neurotóxica, con resultados positivos (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2006). Sin embargo, no se han publicado estudios realizados con *C. marsupialis* sobre líneas celulares cancerosas.

2. ANTECEDENTES

2.1 Cáncer

El cáncer se origina cuando células anormales en alguna parte del cuerpo comienzan a crecer de manera descontrolada. Este crecimiento es diferente al de las células normales; en lugar de morir, las células cancerosas continúan creciendo y formando nuevas células anormales. Adquieren el término cancerosas por su crecimiento descontrolado e invasión a otros tejidos (American Cancer Society, 2015; sitio web). El cáncer puede desarrollar el proceso de metástasis tumoral, que consiste en la diseminación de células neoplásicas a sitios secundarios separados, cercanos o distantes, donde proliferan para formar una masa extravascular de células tumorales (Welch, 2006).

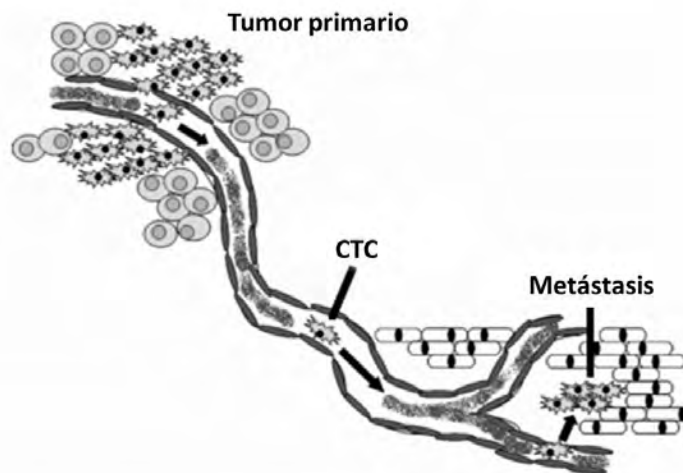


Figura 1. Formación de tumor secundario, tomada de Ceballos y Ghersevich (2008). (CTC Células Tumorales Circundantes).

En la figura 1, se describe un proceso metastásico que da lugar a la formación de tumores secundarios, que se detalla en una serie de pasos a continuación (Böckmann *et al.*, 2001; Chambers *et al.*, 2002):

Paso uno: A medida que el tumor primario crece, requiere un suministro de sangre que le permite afrontar sus necesidades metabólicas (angiogénesis).

Paso dos: La formación de nuevos vasos sanguíneos también puede proveer una ruta de escape, en la que las células pueden abandonar el tumor y entrar en el sistema circulatorio (intravasación), o bien, también pueden ingresar de forma indirecta al sistema circulatorio vía sistema linfático.

Paso tres: Las células tumorales necesitan sobrevivir en la circulación hasta que puedan detenerse en un nuevo órgano, donde abandonan el vaso e ingresan al tejido circundante (extravasación).

Paso cuatro: una vez en el nuevo sitio, las células deben iniciar y mantener el crecimiento para formar micrometástasis; mediante el desarrollo de nuevo vasos sanguíneos, se forma un nuevo tumor microscópico (tumor secundario).

2.1.1 Leucemia

De acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2015) la leucemia resulta uno de los cánceres más comunes entre los infantes y adolescentes. En el año 2012, para la región de América Latina y el Caribe, aproximadamente 29 mil niños y adolescentes con menos de 15 años fueron diagnosticados con esta enfermedad, siendo de tipo linfoblástica aguda, la más común.

La leucemia afecta a las células sanguíneas inmaduras, desarrolladas en la médula ósea, estas células no funcionan como deberían y congestionan a las células sanguíneas sanas en la médula ósea (Figura 2). La clasificación de los diferentes tipos de leucemia depende del tipo de célula sanguínea que se vuelve cancerosa (Instituto Nacional del Cáncer, 2016; sitio web).

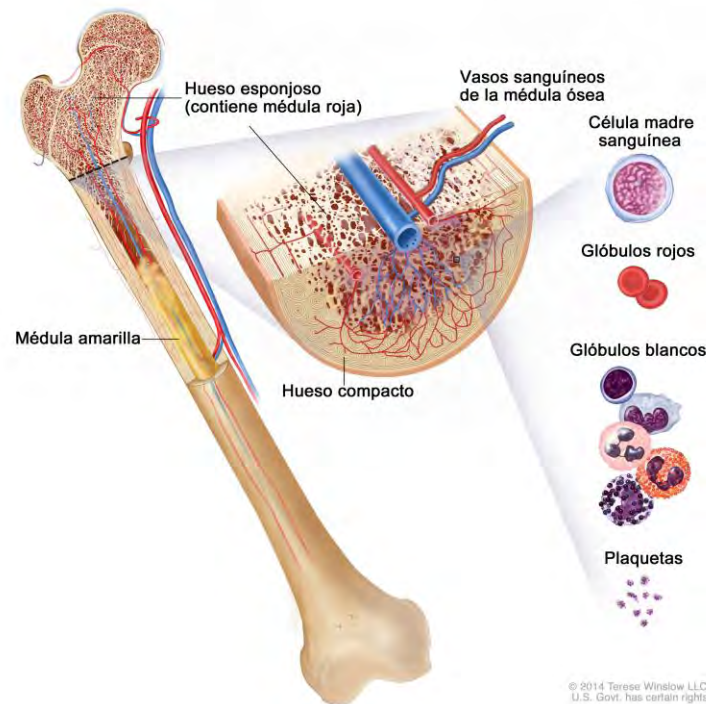


Figura 2. Anatomía del hueso, tomada del sitio web del Instituto Nacional del Cáncer (2016).

Se han dado a conocer los avances en la comprensión de ciertos cambios en el ADN que pueden causar que las células normales de la médula ósea se transformen en células leucémicas. Esta enfermedad se desarrolla cuando ocurre un intercambio de material cromosómico entre los cromosomas 9 y 22 en la división celular; como resultado el cromosoma 22 se vuelve más corto de lo normal y es conocido como “Cromosoma Filadelfia”, el cual hace que la médula ósea produzca una enzima llamada tirosina cinasa, la cual hace que las células crezcan y se reproduzcan descontroladamente. Este cromosoma se encuentra en las células leucémicas de casi todos los pacientes y no se transmite de padres a hijos (American Cancer Society, 2016; sitio web).

De acuerdo con el Instituto Nacional de Cancerología (2016), existen dos factores importantes para llevar a cabo la clasificación de esta enfermedad; primero hay que considerar si la mayoría de las células anormales son maduras (con aspectos de glóbulos blancos normales) o inmaduras (que aún tengan aspecto de células madre) obteniéndose las primeras dos categorías:

- **Leucemia aguda**

Las células de la médula ósea no pueden madurar apropiadamente, continúan reproduciéndose y acumulándose.

- **Leucemia crónica**

Las células maduran parcialmente pero no por completo, desplazando a las células sanas y sobreviviendo más tiempo.

El segundo factor a considerar para determinar la enfermedad radica en identificar el tipo de células que han sido infectadas, obteniéndose las siguientes categorías:

- **Leucemia mielocítica, mielógena o no linfocítica**

Leucemia iniciada en células mieloides (células que se convertirán en glóbulos blancos, que no sean linfocitos), glóbulos rojos o células productoras de plaquetas.

- **Leucemia linfocítica**

Leucemia originada en las células que se convertirán en linfocitos.

De esta forma la enfermedad se clasifica en cuatro tipos:

- Leucemia mieloide o mielógena aguda
- Leucemia mieloide o mielógena crónica
- Leucemia linfocítica o linfoblástica aguda

- Leucemia linfocítica crónica.

2.1.2 Cáncer de seno

Uno de los cánceres de mayor incidencia a nivel mundial es el de seno. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (2015; sitio web), cada año se detectan 1.38 millones de nuevos casos y fallecen 458 mil personas por esta causa; la mayoría de las muertes se dan en países de bajos ingresos en donde el diagnóstico se realiza en etapas muy avanzadas de la enfermedad. Para el caso particular de América Latina y el Caribe, el cáncer de mama es el más frecuente entre las mujeres, de acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud (OPS) (Organización Mundial de la Salud, 2015; sitio web).

El Instituto Nacional del Cáncer (2015; sitio web) menciona que el factor de mayor riesgo para el cáncer de seno es la edad avanzada; sin embargo, realizan un listado de los factores que propician el desarrollo de la enfermedad:

- Antecedentes familiares.
- Susceptibilidad significativa a un factor hereditario.
 - Mutaciones de la línea germinal en los genes *BRCA1* y *BRCA2* y otros genes que predisponen al cáncer de mama.
- Consumo de alcohol.
- Densidad del tejido mamario (mamografía).
- Estrógeno (endógeno)
 - Antecedentes menstruales (menarquía prematura o menopausia tardía).
 - Nuliparidad.
 - Edad avanzada en el momento del primer parto.
- Antecedentes del tratamiento hormonal
 - Combinación de estrógeno más terapia de remplazo hormonal (TRH) con progestina.
 - Anticonceptivos orales.
- Obesidad.
- Falta de ejercicio físico.
- Antecedentes personales de cáncer de mama.
- Antecedentes personales de formas proliferativas de enfermedad mamaria benigna.

- Raza.
- Exposición de la mama o el pecho a la radiación.

La mayoría de los cánceres de seno comienzan en las células que recubren los conductos (Figura 3), que son tubos diminutos transportadores de leche desde los lobulillos al pezón; a este cáncer se le conoce como cáncer ductal. Otro tipo de cáncer común es originado en las células que recubren los lobulillos, que son glándulas productoras de leche, conocido como cáncer lobulillar. Otro tipo de cáncer de menor incidencia es originado en otros tejidos del seno (American Cancer Society, 2015; sitio web).

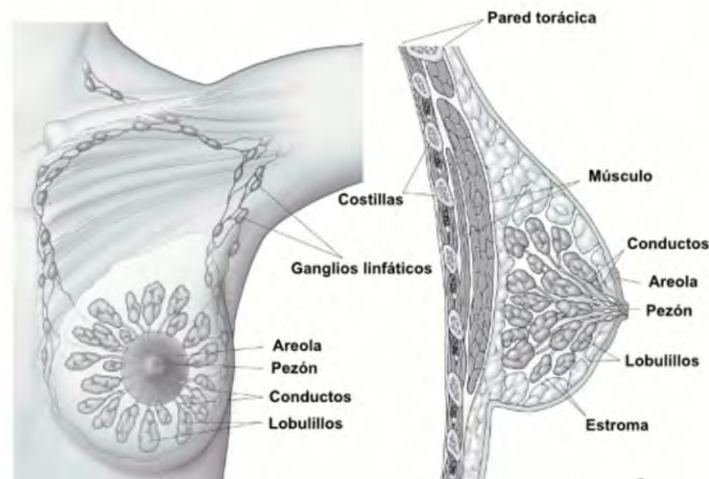


Figura 3. Anatomía del seno femenino, tomada de American Cancer Society (2015; sitio web)

Durante décadas se consideró que las células del cáncer de seno diseminadas alcanzaban en primer lugar los nódulos o ganglios linfáticos, antes de dirigirse a la sangre periférica y a localizaciones distantes, como a la médula ósea. Sin embargo, actualmente se conoce que la dispersión metastásica ocurre en aproximadamente un 50% de los casos de pacientes con carcinoma mamario localizado y que alrededor del 30% de las pacientes sin enfermedad detectable en los nódulos linfáticos desarrolla metástasis distantes dentro de los 5 años siguientes al diagnóstico (Lacroix, 2006; Zieglschmid *et al.*, 2005). Incluso las pacientes diagnosticadas precozmente, y en quienes se ha extraído quirúrgicamente el tumor, pueden recaer en la enfermedad como consecuencia de metástasis no detectadas que ocurrieron antes del diagnóstico inicial (Fabisiewicz *et al.*, 2004).

2.2 Antitumorales de origen marino

La función antitumoral está dirigida a impedir, en primer término, la invasión de dichas células al tejido conectivo vecino, la neovascularización de la masa tumoral y la metástasis de las células malignas que son los tres procesos distintivos de las neoplasias malignas (Ross, 1998). Como resultado de distintos estudios, nuevos fármacos han aparecido para controlar las dos etapas más importantes de la invasión tumoral: la angiogénesis y la metástasis, procesos en los cuales intervienen enzimas como proteasas de serino y metaloproteasas como elastasas y colagenasas (Lehninger *et al.*, 2006).

Entre los antitumorales de origen marino, la eribulina, fármaco quimioterapéutico para cáncer de seno, conocido como Halaven®, corresponde a una clase conocida como *inhibidores de microtúbulos*. Cuando las células se dividen y multiplican, las estructuras llamadas microtúbulos son necesarias para separar los cromosomas durante la formación de nuevas células. La eribulina detiene la formación de microtúbulos y de esta manera las células son detenidas en medio de su división; cuando esto sucede las células mueren. Por el mecanismo de acción del fármaco, las células normales también se ven afectadas. Este fármaco es derivado de un producto natural marino llamado halicondrina proveniente de la esponja marina *Halichondria okadai* la cual produce un ácido llamado okadaico de propiedades citotóxicas con resultados positivos en actividad antitumoral de la línea celular B-16 de melanoma (Uemura *et al.*, 1985).

Rinehart (2000) describe compuestos en fase clínica de investigación como agentes quimioterapéuticos contra diferentes tipos de cáncer, Didemin B, Aplidina y Ecteinasina 743, derivados de tunicados. El aislamiento del pentapéptido Dolastina-10 proveniente del molusco *Dolabella auricularia*, obtuvo actividad antitumoral en bioensayos *in vitro* e *in vivo* (Khoulam y Kalemkerian, 1996). El extracto acuoso de la diatomea marina *Haslea ostrearia* (Simonsen), fue evaluado por sus propiedades anti proliferativas contra tumores sólidos humanos: carcinoma de colon (NSCLC-N6), carcinoma de riñón (E39) y melanoma (M96) (Carbonnelle *et al.*, 1999).

2.2.1 Mecanismos regulados por antitumorales de origen marino

Actualmente se sabe que los productos naturales marinos atacan a las células tumorales regulando funciones (Nagle *et al.*, 2004) como:

- **Angiogénesis**

Es la formación de nuevos vasos sanguíneos. Es un proceso crítico para el crecimiento, progresión y metástasis de tumores; éstos no pueden crecer más de 1-2 mm³ sin angiogénesis.

- **Apoptosis**

Es una forma eficiente de muerte celular. Las células apoptóticas están caracterizadas por criterios morfológicos como ruptura en la membrana nuclear, condensación de la cromatina, fragmentación del ADN, contracción celular y la formación de cuerpos apoptóticos. Las caspasas son un grupo de proteasas de cisteína que juegan un papel importante en la regulación y ejecución de la apoptosis. Muchos de los compuestos citotóxicos inducen apoptosis y varios productos naturales marinos han sido identificados con este tipo de actividad.

- **Ciclo celular**

El ciclo celular principalmente presenta cuatro fases secuenciales: 1) Fase G₁ o Gap₁, las células se preparan para la replicación del ADN; 2) Fase S, síntesis y replicación de ADN; 3) Fase G₂ o Gap₂, donde la célula se prepara para el proceso de división; y 4) Fase M o mitosis, la célula se divide para dar lugar a dos células hijas. Sin embargo, pueden existir otros estadios celulares; cuando se ven privadas de nutrientes y factores de crecimiento entran en un estado de descanso conocido como G₀ donde baja su metabolismo (Tomida *et al.*, 1996). La prevalencia de células tumorales en la fase G₀ es utilizado como un “escudo” para varios efectos citotóxicos de agentes quimioterapéuticos (Kamikubo *et al.*, 2000). Los productos naturales marinos actúan sobre cinasas de proteínas y fosfatasa, regulando el ciclo celular; interviniendo como agentes antimitóticos interrumpiendo la Fase M; como inhibidores de topoisomerasas que arrestan el ciclo celular en las Fases S o G₂; y como agentes específicos que atacan proteínas reguladoras del ciclo celular interrumpiendo las fases G₁, G₂ o S.

- **Síntesis de macromoléculas**

Existen tres clases principales de enzimas: topoisomerasas, deshidrogenasas y polimerasas, las cuales son piezas fundamentales para la formación de ADN. Sin embargo, constituyen un grupo importante de blancos moleculares para los agentes antitumorales derivados de productos naturales marinos.

- **Respiración mitocondrial**

En condiciones aeróbicas, la cadena de respiración mitocondrial es un proceso fundamental para llevar a cabo la síntesis de ATP en células. Alteraciones en el metabolismo tumoral ha sido ligado a diferencias específicas en las mitocondrias de células saludables y malignas. Por lo tanto, las mitocondrias tumorales se han

convertido en una fuente importante de blancos moleculares para descubrimiento de fármacos antitumorales (Singh y Modica-Napolitano, 2002).

- **Mitosis**

La mayoría de los metabolitos secundarios que interrumpen el proceso mitótico han sido caracterizados más que cualquier otra clase de producto natural marino antitumoral o anticancerígeno (Hamel y Covell, 2002). Los antimitóticos pueden ser clasificados en agentes interactivos de tubulina (interfieren en la polimerización o despolimerización de tubulina), inhibidores de actina (interfieren en la polimerización o despolimerización de actina) e inhibidores de cinasas (interrumpen la función de cinasas de proteínas motoras) (Spector *et al.*, 1983).

- **Resistencia a múltiples fármacos**

La resistencia a múltiples fármacos es uno de los principales fracasos en los tratamientos quimioterapéuticos. En este caso, los organismos marinos funcionan como un amplio reservorio de nuevos agentes farmacológicos con modelos únicos de acción que pudieran contribuir retardando esta resistencia o como modificadores de la misma (Proksch *et al.*, 2002).

En general, los avances en biología y biología molecular de células tumorales han revolucionado rápidamente el descubrimiento de fármacos antitumorales y revitalizado la investigación en productos naturales marinos. Con el crecimiento de los esfuerzos en la bioprospección en ambientes marinos poco explorados, el potencial biotecnológico de organismos marinos, particularmente de los invertebrados, ha comenzado a llamar la atención de los investigadores. La habilidad de los cnidarios como anémonas, medusas, y corales de producir toxinas muy poderosas y venenosas, han sido bien documentadas (Turk y Kem, 2009).

2.3 Cnidarios

El phylum Cnidaria (Figura 4) es un grupo de invertebrados muy amplio, diverso y ecológicamente importante, que incluye más de 11,000 especies existentes, y se compone de las clases Anthozoa, Cubozoa, Hydrozoa, Scyphozoa y Staurozoa (Miranda *et al.*, 2016; Daly *et al.*, 2007) las cuales se describen a continuación:

- **Antozoa (anémonas y corales)**

Aproximadamente son 7,500 organismos, los cuales se derivan del pólipo y pueden ser coloniales, clonales o solitarios. Sin ningún tipo de esqueleto o con un esqueleto mineralizado o proteico.

- **Cubozoa (cubomedusas)**
Contiene alrededor de 36 especies en dos órdenes Carybdeida y Chirodropida. En las cuatro esquinas interradales presenta músculos gruesos llamados pedalias los cuales contienen los tentáculos.
- **Hydrozoa (hidropólipos e hidromedusas)**
El pólipo de estos organismos carece de septos.
- **Scyphozoa (medusas verdaderas)**
Es la clase más diversa con 200 morfoespecies existentes.
- **Staurozoa (medusas de tallo)**
Clase representada aproximadamente por 50 especies que presentan un tallo el cual les permite adherirse tanto a algas como a rocas.

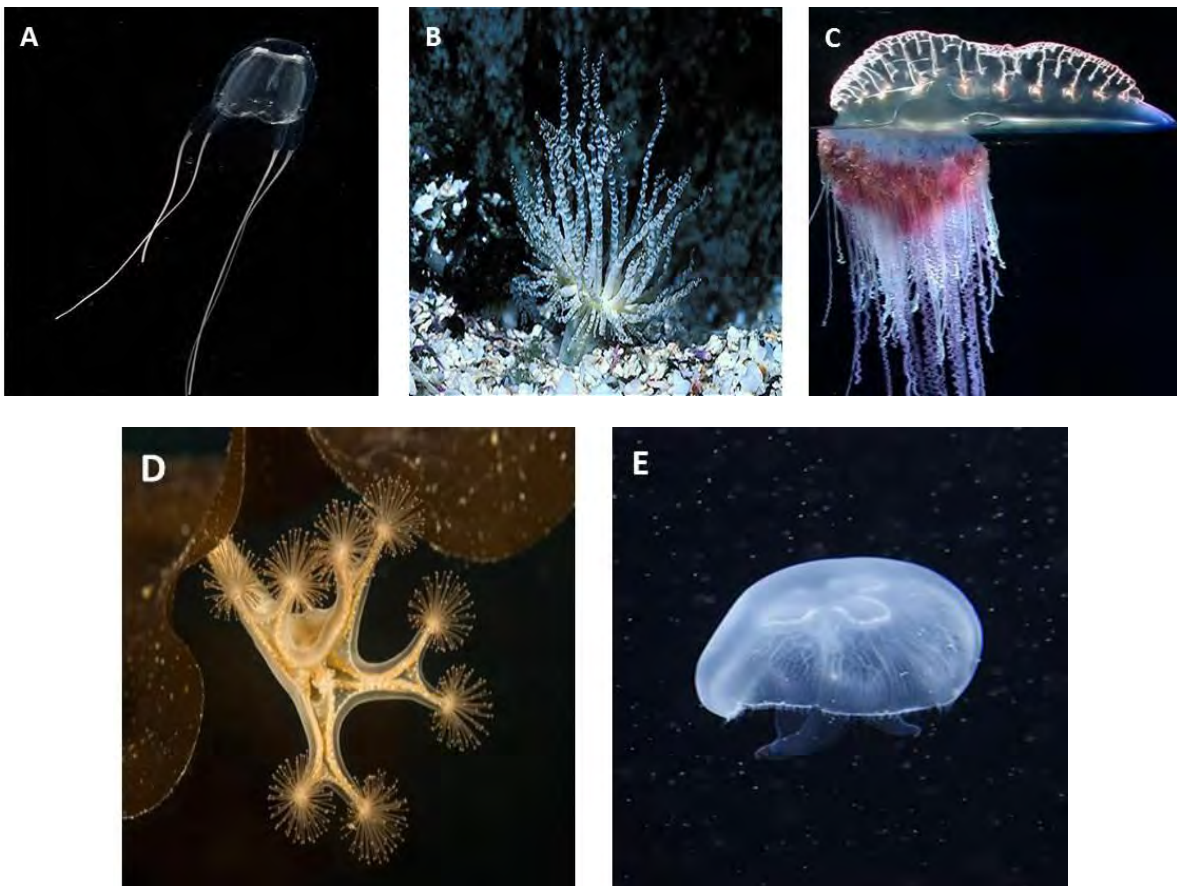


Figura 4. Phylum Cnidaria. A: Clase Cubozoa (*Carybdea marsupialis*); B: Clase Anthozoa (*Bartholomea annulata*); C: Clase Hydrozoa (*Physalia physalis*); D: Clase Staurozoa (*Lucernaria quadricornis*) y E: Clase Scyphozoa (*Aurelia aurita*).

2.3.1 Cnidocitos

Una característica específica de este phylum es la presencia de cnidocitos que, en respuesta a cierto estímulo, secreta orgánulos llamados cnidocistos. Existen 28 tipos morfológicamente distintos de cnidocistos, los cuales se dividen en tres subcategorías: Nematocistos (25 tipos) Spirocistos (2 tipos) y Pticocistos (1 tipo). Depende del estímulo recibido por el organismo, que estos actúen entrelazándose, perforando o adhiriéndose al objetivo (Mariscal, 1974).

2.3.2 Nematocistos

Los nematocistos son el grupo más diverso, el cual almacena el veneno producido por los cnidarios. La estructura especializada del nematocisto (Figura 5) consiste en una cápsula de naturaleza proteica capaz de soportar presiones osmóticas de 150 Bar, la cual, mediante exocitosis química o mecánica, libera un tubo espinoso enrollado en forma de espiral a una velocidad de descarga de 700 ns; de esta forma se asegura la inyección de veneno sobre la presa o atacante (Fautin, 2009; Özbek *et al.*, 2009).

Kass-Simon y Scappaticci (2002) definen cuatro grupos de nematocistos de acuerdo con sus funciones: el primero se ve involucrado en la alimentación, al inyectar toxinas a la presa o al depredador; un segundo grupo participa en atrapar a la presa. Estos dos primeros tienen un mecanismo de acción que involucra una estructura sensorial llamada cnidocilio, que es la responsable de desencadenar su descarga al recibir un estímulo de la presa o depredador (Turk y Kem, 2009). Un tercer grupo de nematocistos consiste en aquellos que son usados para adherirse a los sustratos, especialmente durante la locomoción, y un cuarto grupo en aquellos que son únicamente utilizados para la defensa.

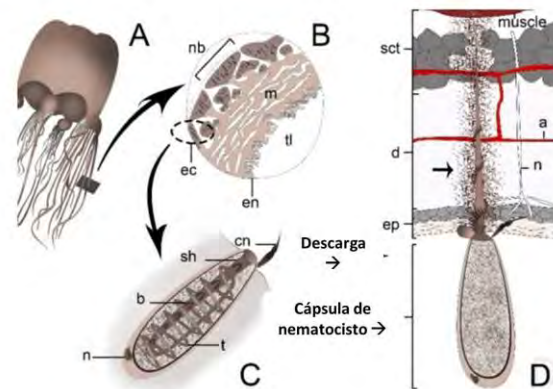


Figura 5. (A) Figura esquemática de una medusa; (B) Corte transversal de un tentáculo mostrando (ec) ectodermo, endodermo (en) dividido por la mesoglea (m), varios tipos de cnidocitos (nb) ubicados en batería y cubriendo el lumen tentacular (tl); C) Estructura de nematocisto no descargado, eje (sh), tubo en espiral (t), espinas (b), núcleo (n) y cnidocilio (cn) que actúa como mecanoreceptor que estimula la descarga; (D) Nematocisto descargado, epidermis (ep), dermis (d), tejido subcutáneo (sct), arterias (a) y nervio (n). La mezcla de toxinas es inyectada a la piel y tejidos subcutáneos de la presa (Modificada de Jouiaei *et al.*, 2015).

Las sustancias tóxicas contenidas dentro de estos organelos, también presentan compuestos orgánicos siendo en su mayoría proteínas y péptidos de interés médico, que podrían ser una herramienta útil para estudios de fisiología celular, o bien como agentes farmacológicos en el tratamiento de enfermedades humanas. Estos novedosos descubrimientos producen implicaciones serias en la salud humana, debido a las propiedades de tipo neurotóxicas y citotóxicas que en éstos se presentan (Isselbacher *et al.*, 1980; Blunt *et al.*, 2006; Mariotinni y Pane, 2010; Jouiaie *et al.*, 2015).

2.4 Clase Cubozoa

2.4.1 *Carybdea marsupialis*

Es una cubomedusa (Figura 6) con una campana prismática de cuatro lados con una cúspide estrecha y plana. Tiene 40 mm de altura y 30 mm de ancho. La cúspide de la campana, la pedalia, y las crestas interradales de la campana se encuentran saturadas de nematocistos. Presenta 4 tentáculos flexibles y muy contráctiles que pueden medir desde 2 a 12 veces más que el tamaño de la campana; estos tentáculos son huecos y anillados con nematocistos (Goldsborough Mayer, 1977). Como otras especies de *Carybdea*, estos organismos son circuntropicales y neríticos; básicamente en su mayoría prefieren aguas transparentes que van a lo largo de toda la costa evitando las aguas superficiales movidas; cuando las aguas se encuentran calmadas, pueden permanecer inmóviles cerca del fondo. Por las noches, cuando las condiciones del mar se encuentran en calma, tienden a subir a la superficie a alimentarse; si se presenta una fuente de luz, suelen acudir inmediatamente, probablemente atraídas a la nube de plancton que se acerca al área iluminada (Arneson y Cutress, 1976).

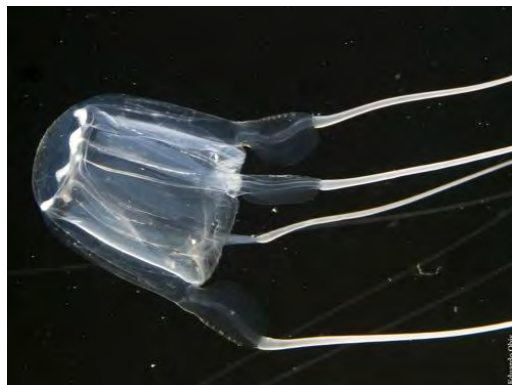


Figura 6. Ejemplar de la especie *Carybdea marsupialis*.

2.4.2 Estudios previos realizados en *Carybdea marsupialis*

Un extracto de los nematocistos de *Carybdea marsupialis* presentó actividad hemolítica en bioensayos con eritrocitos de oveja (Rottini *et al.*, 1995) y en eritrocitos humanos, así como también presencia de compuestos neurotóxicos y citolíticos aislados de su veneno (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2006).

En el año 2009, Lazcano-Pérez realizó un estudio sobre aislamiento, purificación y caracterización de las neurotoxinas presentes en *C. marsupialis*, donde obtuvo proteínas con pesos moleculares que van desde los 220 kDa a los 14 kDa. Realizó bioensayos con cangrejos de la especie *Ocypode quadrata*, observando resultados positivos de parálisis y mortalidad a los 7 minutos después de la dosis inyectada de 1 mg de extracto crudo, corroborando así los resultados obtenidos por Torrens-Rojas (2004). Este autor realizó aislamiento de proteínas con actividad hemolítica y neurotóxica en esta misma especie, trabajando los mismos bioensayos con *O. quadrata* y obteniendo resultados positivos de parálisis y mortalidad, con un incremento en el tiempo de acción del veneno a 20 minutos utilizando de igual forma 1 mg de extracto crudo. Lazcano Pérez (2009), también realizó bioensayos con las toxinas en ovocitos de *Xenopus laevis*, dando resultados positivos en la afectación de canales iónicos; sin embargo, no fue posible identificar el tipo de canal afectado, ya que las toxinas no resistieron el tiempo de almacenaje, ni los ciclos de congelado-descongelado a los que fueron sometidas durante la realización de las pruebas.

3. JUSTIFICACIÓN ACADÉMICA

El inicio de la bioprospección marina y su biota diversa representan un recurso sumamente importante, tal vez el mejor del planeta, para el descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos. Programas recientes del Instituto Nacional del Cáncer (2015; sitio web), han demostrado que los invertebrados marinos son una fuente magnífica de biomoléculas potenciales. El impulso decisivo de este tipo de bioprospección fue llevado a cabo por el INC, cuando se descubrió que los bioensayos con extractos de organismos marinos resultaron mucho más propensos a producir fármacos contra el cáncer que los extractos obtenidos de organismos terrestres (Rocha *et al.*, 2011).

En cuanto a nivel nacional, las estadísticas en incidencia de los tipos de cáncer de interés en el presente trabajo muestran lo siguiente: en un estudio realizado con registros obtenidos del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) que corresponde aproximadamente al 40% de la población, se obtuvieron las tasas de incidencia de leucemia reportadas para la ciudad de México. En general, la incidencia de leucemia se encuentra entre el 55.4 y 58.4 casos por millón para los diferentes tipos. La incidencia para leucemia aguda linfoblástica fue de entre 43.2 y 44.9 casos por millón, leucemia mieloide aguda entre 9.8 y 10.6 casos por millón y leucemia mieloide crónica 2.5 casos por millón (Pérez-Saldivar *et al.*, 2011).

De acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), a nivel nacional, en el año 2013 el cáncer de mama fue la principal causa de morbilidad hospitalaria por tumores malignos en la población de 20 años y más. Las tasas de mortalidad por este cáncer se incrementan conforme aumenta la edad; 63 de cada 100 mil mujeres de 80 y más años, fallecen a causa de esta enfermedad. El tumor maligno de mama es la segunda causa de mortalidad por neoplasias en las mujeres de 20 años y más (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2013; Sitio web). Si bien la estadística no es reciente, la situación promueve el estudio de nuevas alternativas para combatir esta enfermedad.

Carybdea marsupialis, presenta actividad de tipo hemolítica, cardiotoxica, neurotóxica y posible actividad antitumoral (Hernández-Jaurez, 2009; Jouiaei *et al.*, 2015). Por este motivo, se vuelve necesaria la concentración de esfuerzos en el desarrollo de investigaciones futuras, así como la caracterización química y biológica de sus sustancias.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Presenta el veneno de *Carybdea marsupialis* proteínas con actividad citotóxica, sobre las líneas celulares cancerosas MCF7 (mama) y K562 (leucemia)?

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Determinar si algunas proteínas extraídas de *Carybdea marsupialis*, presentan actividad citotóxica en células cancerosas.

5.2 Objetivos Particulares

Descargar los nematocistos presentes en los tentáculos de *Carybdea marsupialis*, mediante los métodos de homogeneización y de ser necesario, ultrasonido y centrifugación a bajas temperaturas.

Pre-purificar extracto crudo obtenido empleando ultrafiltración mediante centrifugado y célula de agitación.

Evaluar la presencia de Fosfolipasas A₂ mediante el bioensayo de actividad enzimática de Fosfolipasas.

Evaluar la actividad citotóxica de algunas de las fracciones pre-purificadas, en las líneas celulares cancerosas MCF7 (mama) y K562 (leucemia) así como en las no cancerosas de fibroblastos gingivales humanos, por medio de porcentaje de inhibición de crecimiento utilizando la tinción con Sulforodamina B.

6. ÁREA DE ESTUDIO

El presente estudio se llevó a cabo en la Bahía de Petempich perteneciente a la Laguna Arrecifal de Puerto Morelos, Quintana Roo (Figura 7).

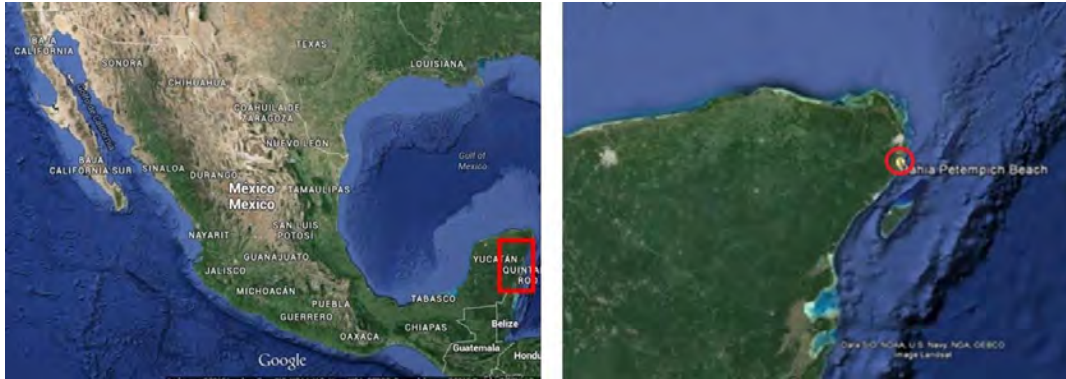


Figura 7. Ubicación de la Bahía Petempich tomada de Google Earth (2014).

El área de estudio y sus alrededores se encuentran fuertemente influenciados por la Corriente de Yucatán y otras corrientes que fluyen en dirección Norte y que eventualmente llegan a formar parte de la de Yucatán hasta alcanzar el Golfo de México.

Esta corriente es de suma importancia en esta zona, ya que debido a factores oceanográficos y continentales y a la oscilación estacional de las masas de agua, provoca un afloramiento de aguas profundas. Este afloramiento genera un incremento en los nutrientes superficiales, provocando un aumento en la productividad del ecosistema que origina altos valores de biomasa de copépodos y larvas de peces (Falfán-Vázquez *et al.*, 2008). Se han descrito dos posibles mecanismos del origen de esta surgencia que no se encuentran relacionados con la divergencia ocasionada por el viento tal como sucede en las grandes surgencias mundiales: la fricción de la corriente de Yucatán al chocar contra la cuesta del borde este de la Plataforma de Yucatán y la interacción entre la corriente de Yucatán y una contracorriente que corre por debajo hacia el sur (Cárdenas-Palomo *et al.*, 2010).

De acuerdo con lo anterior, se decidió muestrear en esta zona por la concurrencia de especies que favorecen la presencia de *Carybdea marsupialis* en la región.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Recolección de organismos

Se llevó a cabo mediante buceo libre, prefiriendo días soleados y a medio día con el propósito de facilitar el encontrar a los organismos, debido a que de esta forma se observa la sombra de tentáculos sobre la arena. La actividad se llevó a cabo de forma manual, así se evitó estresar al organismo y, por lo tanto, la descarga de nematocistos. Con la utilización de guantes, se tomó al organismo por la campana y se colocó en bolsa Ziploc y en una cubeta de 20 litros para facilitar su transporte. Se utilizó una embarcación con motor fuera de borda para transportarlas a las instalaciones de la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales (UASA) del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, en Puerto Morelos, Quintana Roo.

Una vez que se arribó a la UASA, los organismos fueron llevados al Laboratorio de Toxinología de Cnidarios donde de forma inmediata fueron procesados.

En un vaso de precipitado (Pyrex®, 1 L) se colocaron algunos organismos con la finalidad de manejarlos fácilmente. Se procedió a cortar los tentáculos utilizando tijeras comunes. En otro vaso de precipitado (Pyrex®, 50 ml) previamente pesado, se colocaron los tentáculos disectados sobre una cama de hielo para evitar la degradación del material. Las campanas fueron colocadas por separado en otro recipiente donde una vez terminado el proceso de corte de los tentáculos, se contaron y se obtuvo el total de los organismos capturados. Posteriormente, se pesó nuevamente el vaso que los contenía los tentáculos y de esta forma se obtuvo el peso húmedo del material de donde se obtendría el Extracto Crudo. Antes de comenzar el proceso de descarga de los nematocistos, se agregó al vaso conteniendo los tentáculos una pastilla inhibidora de proteasas (Complete Mini® de Roche) para evitar la degradación de las proteínas contenidas en el extracto (se diluyó una pastilla en 1.5 ml de agua desionizada para un volumen aproximado de 20 ml de tentáculos).

7.2 Descarga de nematocistos

Se colocaron aproximadamente de 3 a 5 ml de tentáculos frescos en un homogeneizador de cristal de 15 ml (Pyrex Tenbroeck®). La maceración se llevó a cabo en frío, colocando hielo alrededor del macerador con el fin de evitar la degradación del material. Para asegurar la descarga de los nematocistos, se tomaron alícuotas que fueron observadas al microscopio donde además de corroborar lo anterior, se tomaron datos y micrografías de los nematocistos encontrados. Los tentáculos que no se procesaron al momento; se congelaron a -60°C en un ultracongelador Revco, hasta su maceración.

Las muestras en las que no se lograron disparar completamente los nematocistos se colocaron en vasos de precipitado, se colocaron en el sonicador por un periodo de aproximadamente 30 min (Cole Parmer®); de igual forma, fue necesario agregar el hielo para evitar la degradación del material. Posteriormente se maceraron nuevamente y como se mencionó anteriormente, se observaron alícuotas al microscopio para corroborar la descarga.

Para obtener extracto crudo, el material descargado, se centrifugó (Eppendorf® modelo 5810 R) en tubos Falcon de 50 ml a 4,000 rpm (3200 g) por 30 min a 4°C; una vez obtenido el sobrenadante este se colocó en el ultracongelador (Revco) a -60°C para posteriormente liofilizarlos. El precipitado, se homogeneizó con agua desionizada y de igual forma fue centrifugado bajo las mismas condiciones anteriores, separando el sobrenadante y congelado.

Las muestras congeladas a -60°C se liofilizaron (Freeze Drying® Labconco) a una temperatura de -45°C hasta quedar completamente secas; se guardaron en viales de vidrio, previamente pesados y etiquetados, para registrar el peso seco y finalmente obtener el extracto crudo.

7.3 Cuantificación de proteínas

Se realizó de acuerdo con Bradford (1976) con ayuda del kit *Quick Start Bradford* (BioRad®). Esta técnica consiste en la utilización de un colorante hidrofóbico *Coomassie Brilliant Blue G-250*, el cual se une a las proteínas contenidas en la muestra tornándose en color azul; posteriormente se lee en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm.

Para conocer la concentración de proteína del extracto crudo 1 (ExC1) obtenido de *C. marsupialis* fue necesario realizar una curva patrón de proteína a concentraciones conocidas, como son las que contienen los estándares de albúmina de suero bovino (0.125, 0.25, 0.5, 0.75 y 1 mg/ml) contenidos en el kit utilizados en este experimento. Se colocaron 20 µl de estándar en 1 ml de reactivo Bradford, utilizándose como blanco 20 µl de agua desionizada y 1 ml de reactivo Bradford.

Los datos resultantes de la curva patrón fueron utilizados para obtener la ecuación de la recta; al interpolar las absorbancias leídas del extracto crudo nos proporciona los valores de concentración de proteína.

Para realizar la cuantificación de proteínas en microplaca (Stat Fax 4200® Awareness Technology) como se realizó para el extracto crudo 2 (ExC2), se realizó la misma

metodología anterior. Para la curva patrón se utilizaron 5 μ l de estándar en 250 μ l de reactivo Bradford por triplicado.

7.3.1 Preparación de alícuotas de ExC1

En cuanto a ExC1, se prepararon alícuotas de 10, 5, 2, 1 y 0.5 mg/ml por triplicado; de igual forma se aplicaron 20 μ l de ExC1 y 1 ml de reactivo Bradford. El blanco se preparó con 20 μ l de agua desionizada con 1 ml de reactivo Bradford.

7.3.2 Preparación de alícuotas de ExC2

Se preparó una solución stock de 10 mg/ml de ExC2 para preparar dos diluciones de 5 y 2.5 mg/ml; de ambas diluciones se tomaron 5 μ l más 250 μ l de reactivo Bradford por triplicado para ser leídas a una longitud de onda de 595 nm.

7.4 Pre-purificación de extracto crudo

Los extractos crudos obtenidos fueron pre-purificados, obteniéndose un total de seis fracciones mediante dos técnicas (Figura 8).

7.4.1 Ultrafiltración por centrifugado

Es un proceso que provee una ultrafiltración rápida con membranas que tienen la capacidad para separar altas concentraciones de fácil recuperación (Millipore Corporation, 2009).

Se tomaron aproximadamente 300 mg de extracto crudo para ser diluidos en 50 ml de agua desionizada, para ser homogeneizados. Se colocaron de 6 a 9 ml de extracto crudo en las unidades de ultrafiltración Amicon (Millipore) en ciclos de centrifugado a 4,000 rpm (3,200 g) a 4°C por 60 min. Con una pipeta Pasteur se recuperó lo que no pasó a través de la membrana y se colocó en un tubo Falcon de 50 ml; de esta forma se obtuvieron las primeras fracciones pre-purificadas. Se utilizaron las unidades con membranas de corte de 30, 10 y 3 kDa.

7.4.2 Filtración por célula de agitación

Este método por medio de agitación está diseñado para una concentración o purificación rápida de macromoléculas en solución, en volúmenes que van desde los 3 a los 400 ml. La solución pasará por una membrana de corte, la cual mediante una presión controlada (utilizando nitrógeno) y una agitación constante dará como resultado la filtración (Millipore Corporation, 2008).

Como la unidad de filtración maneja volúmenes altos, se utilizaron 50 ml de cada fracción obtenida de ultrafiltración por centrifugado. Se utilizaron membranas de corte de 5 y 1 kDa.



Figura 8. Esquema de obtención de fracciones pre-purificadas mediante ultrafiltración por centrifugado y filtración por célula de agitación.

7.5 Electroforesis (SDS-PAGE)

Se realizó con el fin de conocer los pesos moleculares tanto de los extractos crudos como de las fracciones pre-purificadas de *Carybdea marsupialis*. La desnaturalización de las muestras en buffer de carga (Buffer reductor SDS con azul de bromofenol) se realizó en baño María a 95°C por 4 min en una dilución 1:1, se cargaron 10 µl de muestra y se utilizaron 2 µl de estándares conocidos de proteína Precision Plus Protein Kaleidoscope™ (250-10 kDa) y Precision Plus Protein Dual Xtra™ (250-2 kDa) (BioRad®). Finalmente los geles fueron teñidos toda la noche en colorante azul de Coomassie (BioRad®) para ser desteñidos al día siguiente usando agitación por aproximadamente 40 min en una solución de metanol (40%), ácido acético (10%) y agua desionizada (50%).

7.5.1 Preparación para ExC1

- Se realizó un gel de acrilamida al 12.5% para ExC1 del cual se utilizaron 15 mg disueltos en 1 ml de agua desionizada. A partir de esta solución stock se realizaron diluciones de 10 y 5 mg/ml para ser corridas a 200 V.

- Se realizó un gel de acrilamida al 15% para las fracciones pre-purificadas obtenidas del ExC1, de las cuales se utilizaron 0.8 mg disueltos en 50 μ l de agua desionizada para ser corridas a 112 V.

7.5.2 Preparación para ExC2

- Se realizó en gel de acrilamida al 15% para ExC2 y fracciones pre-purificadas, para lo cual se utilizaron 5 mg disueltos en 500 μ l de las cuales se tomaron 20 μ l adicionando 20 μ l de agua desionizada para ser corridos a 200 V.

7.6 Bioensayos

7.6.1 Fosfolipasa A₂

Este ensayo está basado en el método modificado de Price y colaboradores (1982), y tiene la finalidad de comprobar si las sustancias activas del extracto crudo tienen un efecto enzimático. En primer lugar se preparó un gel de agarosa, a partir de las siguientes soluciones:

- A) 1 ml de yema de huevo fresco con 3 ml de NaCl al 0.86%
- B) 0.6 g de agarosa en 100 ml de Tris-HCl al 50mM pH 7.95
- C) 0.147 g de CaCl_2 en 100 ml de agua destilada

Se mezclan 1 ml de de solución A adicionando 100 ml de B, más 1 ml de solución C para posteriormente repartir a cajas de Petri, usando 15 ml de mezcla en cada caja, se deja reposar 3 horas aproximadamente, hasta que gelifique. Posteriormente la caja se divide en diferentes secciones en función del número de pozos que se necesitan. Los pozos deben medir aproximadamente 5 mm de diámetro. En el primer orificio se colocarán 20 μ l de control negativo (Agua desionizada) y en el segundo 20 μ l de control positivo (Veneno de abeja) en los restantes se colocarán las muestras a probar a distintas concentraciones, todo esto por triplicado. El veneno de abeja fue obtenido de organismos colectados por compañeros del laboratorio exprimiendo con pinzas el aguijón para su extracción, se colocó en un tubo Eppendorf™ para ser almacenado a 4°C. La medición de los halos de actividad se llevó a cabo a diferentes tiempos 3, 6, 12, 24, 48 horas. Este bioensayo se realizó únicamente para ambos extractos crudos obtenidos de *Carybdea marsupialis*.

Para Exc1 se utilizaron las concentraciones de 10, 5, 2 y 1 mg/ml; sin embargo, los resultados no eran muy notorios por lo que se utilizaron concentraciones mayores de 10, 20, 30, 40 y 50 mg/ml. Para Exc2 se utilizaron las concentraciones de 2, 4, 6 y 8 mg/ml.

7.6.2 Citotoxicidad en células cancerosas

Con el apoyo del Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros y colaboradores del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, se realizaron los bioensayos de citotoxicidad sobre las líneas celulares cancerosas MCF7 (mama) y K562 (leucemia); como línea celular no cancerosa se utilizaron fibroblastos gingivales humanos y como control positivo el anti-neoplásico mitoxantrona. La metodología utilizada fue diseñada por el Instituto Nacional del Cáncer (Monks *et al.*, 1991) de la cual se obtiene el porcentaje de inhibición en crecimiento celular, por cada línea cancerosa tratada por duplicado.

De acuerdo con la metodología las líneas celulares fueron cultivadas en medio RPMI-1640 adicionado con 5% de suero fetal bovino (SFB) y glutamina. Mediante un pase celular se obtuvo un sedimento, que fue suspendido en 10 ml del mismo medio de cultivo para posteriormente tomar 10 μ l de esta suspensión y ser colocados en una cámara de Neubauer con 180 μ l de azul tripano, para determinar el número de células vivas contenidas. Se colocaron en una micro placa de media área, 100 μ l de células por pozo (aproximadamente 5,000 células), para posteriormente incubar la micro placa por 24 horas a 37°C a 5% de CO₂. Posterior al lapso de incubación, se tomaron 100 μ g de fracción para ser solubilizada en DMSO, tomando de este stock 100 μ l que se adicionaron a cada pozo con células, teniendo un volumen final de 200 μ l.

Para obtener los resultados dos procesos son de vital importancia, la fijación y la tinción. La fijación nos va a proporcionar la densidad celular a un tiempo 0 (T0) tanto en los controles como en la aplicación de tratamiento citotóxico. Esta se lleva a cabo mediante la utilización de ácido tricloroacético (TCA) frío al 50%; se aplicaron 50 μ l por pozo para ser incubados a 4°C por 60 min; luego se realizaron cinco lavados con agua desionizada para finalmente desecar a temperatura ambiente. La tinción se llevó a cabo mediante sulforodamina B (SRB), ya que con esta tinción se obtienen mediciones estables, desde que las células son fijadas hasta el final del periodo de incubación; también es importante mencionar que no hay cambios significativos en las densidades ópticas obtenidas, ya que estas pueden llegar a variar un 2% en un periodo mayor a 7 días. Se aplicó el colorante una vez que la placa se encontrara seca de la fijación, 100 μ l de una solución al 0.4% de SRB por 30 min a temperatura ambiente. Se lavó tres veces con ácido acético al 1% con el fin de remover SRB no fijada, dejándose secar a temperatura ambiente. Finalmente se agregaron 100 μ l de amortiguador TRIS y se agitó por 10 min para favorecer la disolución del complejo y se leyó a 515 nm.

Los valores de densidad celular a T0 se obtuvieron de la siguiente forma:

- Células + Medio de cultivo (Control negativo)

- Células + Anti-neoplásico (Control positivo)
- Células + Tratamiento citotóxico

La siembra celular se llevó a cabo dejándose incubar por 24 h para posteriormente, aplicar el tratamiento citotóxico para incubarse por 48 h. Pasado este lapso, se procedió a fijar la placa con TCA, teñir con SRB y leer a 515 nm.

Con las lecturas obtenidas, se realizaron una serie de cálculos que ayudaron a la obtención de porcentajes de inhibición de crecimiento, los cuales se desglosarán a continuación:

- 1.- Promedio de valores de fondo (Pozos sin células)
- 2.- Promedio de valores de compuesto (tratamiento citotóxico y/o control positivo)
- 3.- Valor del compuesto = promedio de valores de compuesto - promedio de valores de fondo
- 4.- Densidad óptica del compuesto = Valor del compuesto – valor del compuesto a T0 (tratamiento citotóxico y/o control positivo)
- 5.- Ecuación para obtener el porcentaje de inhibición de crecimiento

$$\% \text{ inhibición} = 100 - \left[\left(\frac{\text{Densidad óptica del compuesto}}{\text{T0 de control negativo}} \right) * 100 \right]$$

8. RESULTADOS

8.1 Recolecta de organismos y descarga de nematocistos.

Se realizaron un total de 7 muestreos en dos sitios diferentes de la Laguna Arrecifal de Puerto Morelos, Bahía de Petempich (Sitio 1) y Punta Brava (Sitio 2) mostrados en la Figura 9.

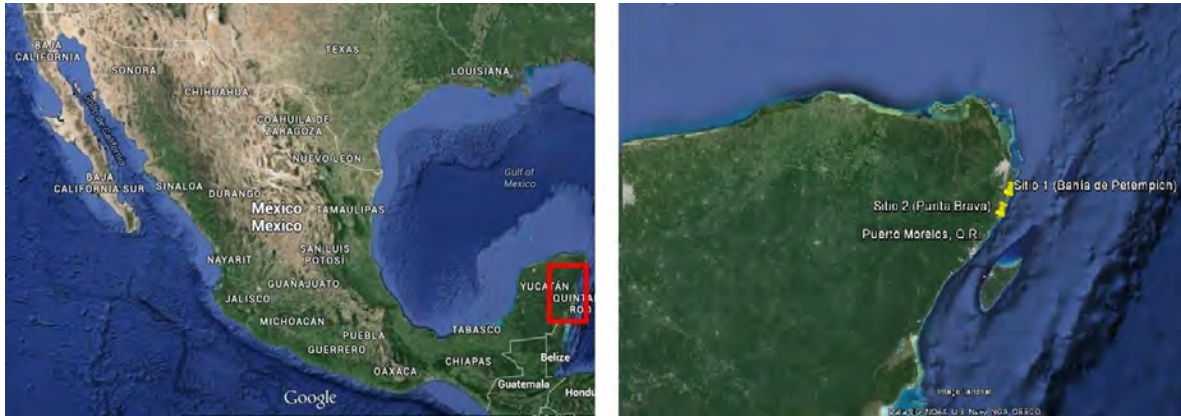


Figura 9. Sitios de colecta de *Carybdea marsupialis*, imagen tomada de Google Earth (2014).

Se capturaron 1,093 organismos durante los meses de septiembre a octubre del año 2014 y un total de 1,252 organismos en el mes de octubre del año 2015, para dar un total de 2,345 organismos capturados en ambas temporadas, mediante buceo libre a aproximadamente dos metros de distancia de la playa. Los organismos fueron procesados en el Laboratorio de Toxinología de Cnidarios de la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM, donde se cortaron los tentáculos.

Al realizar la descarga de nematocistos, se identificaron los distintos tipos presentes en *Carybdea marsupialis* (Figura 10), siendo en su mayoría microbásico mastigóforo y heterotricos microbásico euritele. Posterior a la descarga, los extractos fueron liofilizados, los rendimientos de ambos extractos se encuentran detallados en la Tabla 3.

Los rendimientos presentados en las Tablas 3 y 4 se obtuvieron mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento} = (\text{Peso seco total} * 100) / \text{Peso húmedo total}$$

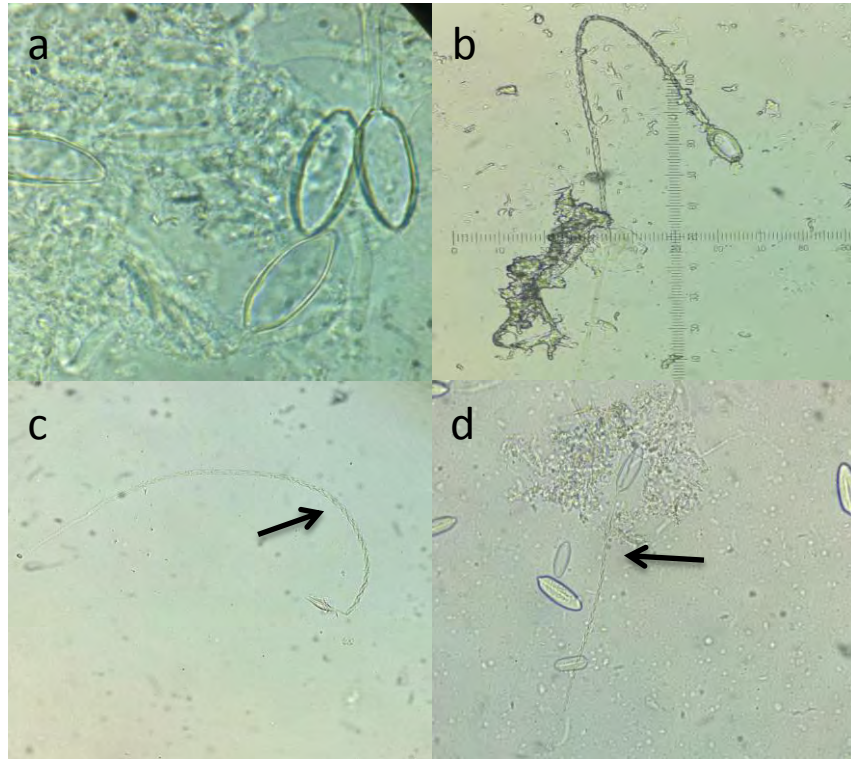


Figura 10. Nematocistos presentes en los tentáculos de *Carybdea marsupialis* (Mariscal, 1974) observados al microscopio a 100X con aceite de inmersión. (a) Heterotricos microbásico euritele (b,c,d) p-Microbásico mastigóforo.

Tabla 2. Concentración de proteína y rendimientos obtenidos de *Carybdea marsupialis*.

Peso	Extracto crudo 1		Concentración de proteína por 1mg de peso seco	Extracto crudo 2		Concentración de proteína por 1mg de peso seco
	Peso total (g)	Rendimiento		Peso total (g)	Rendimiento	
Peso húmedo tentáculos	711.31	100%		208.50	100%	
Extracto crudo liofilizado	9.10	1.27%	0.175mg	8.1	3.88%	0.147mg
Total fracciones pre-purificadas	7.40	1.04%		2.70	1.29%	

8.2 Pre-purificación de extractos crudos y rendimientos

La ultrafiltración se llevó a cabo utilizando 300 mg de extracto crudo por repetición. Las fracciones pre-purificadas obtenidas de dicho proceso así como sus rendimientos, se encuentran descritos en la Tabla 4.

Tabla 3. Rendimiento de fracciones obtenidas de *Carybdea marsupialis* mediante ultrafiltración y célula de agitación.

Fracción	Extracto crudo 1		Extracto crudo 2	
	Peso total Liofilizado (mg)	Rendimiento	Peso total Liofilizado (mg)	Rendimiento
>30	3780	0.530%	1590	0.760%
30-10	29.4	0.004%	131.4	0.063%
10-5	90.4	0.012%	28.5	0.014%
5-3	44.1	0.006%	85.5	0.041%
3-1	32.7	0.004%	88.2	0.042%
<1	3430	0.480%	775.6	0.371%

8.3 Electroforesis (SDS-PAGE)

Se observa en el ExC1 bandas de diversos pesos moleculares como 250, 150, 125, 75, 50, 40, 37, 30 y 15 kDa. Por otra parte, el resultado obtenido en ExC2 es muy similar al obtenido anteriormente en ExC1, mostrando un patrón de bandas también de diversos pesos moleculares como 250, 200, 125, 100, 55, 40, 30 y 15 kDa (Figura 11).

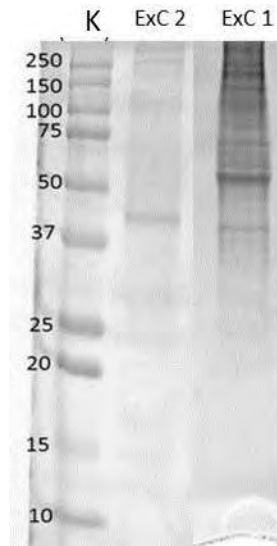


Figura 11. Electroforesis en gel de acrilamida al 15% con la utilización de estándar Precision Plus Kaleidoscope (K) de ExC1 y ExC2 obtenidos de *Carybdea marsupialis*.

De las fracciones extraídas de ExC1 (Figura 12) se observa en el carril *a*, perteneciente a la fracción >30 kDa, una gran cantidad de proteínas de alto y bajo peso molecular de 150, 100, 37, 25, 20, 17, 13, 10 y 2 kDa. En el carril *b*, fracción 30-10 kDa, se observan ligeramente bandas de 150, 37, 15 y 2 kDa. En el carril *c* de la fracción 5-3 kDa, se presenta una banda única con peso molecular aproximado de 5 kDa. En el carril *d* de la fracción 3-1 kDa, se observan dos bandas, una con peso molecular de 10 kDa y una de bajo peso de 2 kDa. En el siguiente carril *e* correspondiente a la fracción <1 kDa no se observa la formación de ninguna banda.

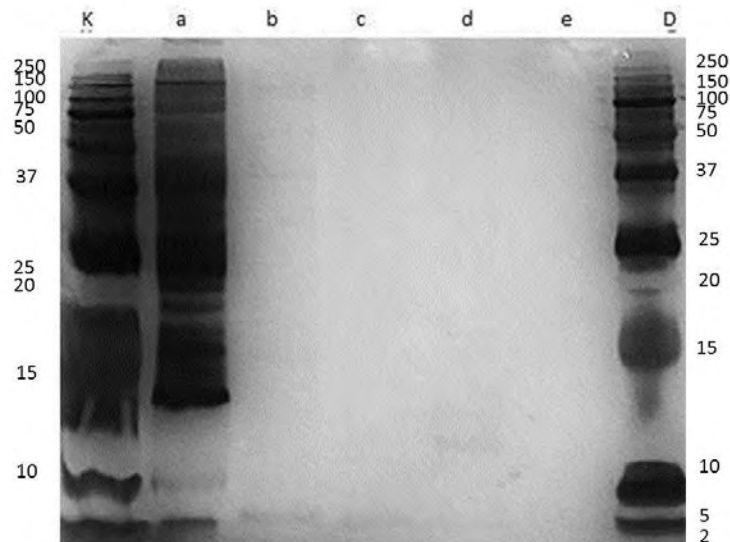


Figura 12. Electroforesis en gel de acrilamida al 15% con estándares (K) Precision Plus Kaleidoscope y (D) Precision Plus Dual. Realizado con fracciones pre-purificadas de ExC1 de *Carybdea marsupialis* de (a) >30 kDa, (b) 30-10 kDa, (c) 5-3 kDa, (d) 3-1 kDa y (e) <1kDa.

En cuanto a las fracciones obtenidas de ExC2 (Figura 13), en la fracción >30 kDa (a) se observan bandas de alto peso molecular correspondientes a 150, 100, 55, 40, 27 y 25 kDa. En la fracción de 30-10 kDa (b) se observan bandas de 150, 100, 50, 42, 40, 27, 25, 17 y 15 kDa. Por último, en la fracción correspondiente a <1 kDa (c) no hay observación de bandas.

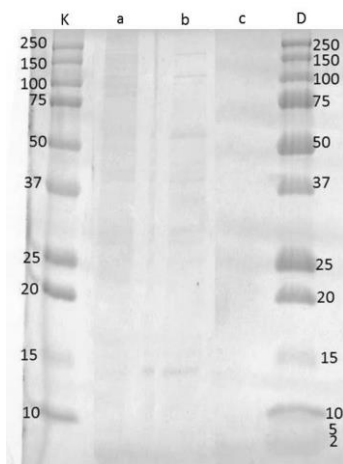


Figura 13. Electroforesis en gel de acrilamida al 15% con estándares (K) Precision Plus Kaleidoscope y (D) Precision Plus Dual. Realizado con fracciones pre-purificadas de ExC2 de *Carybdea marsupialis* de (a) >30 kDa, (b) 30-10 kDa, (c) <1kDa.

8.4 Fosfolipasas (método modificado de Price et al., 1982)

El bioensayo se realizó con la finalidad de observar que el extracto crudo de *C. marsupialis* presentara actividad enzimática de fosfolipasas; se trabajaron ambos extractos (Figura 14) para comparar los resultados obtenidos, donde aparentemente fueron negativos para fosfolipasas de tipo A₂; sin embargo y de acuerdo con la literatura consultada, puede haber una posible actividad de fosfolipasa B.

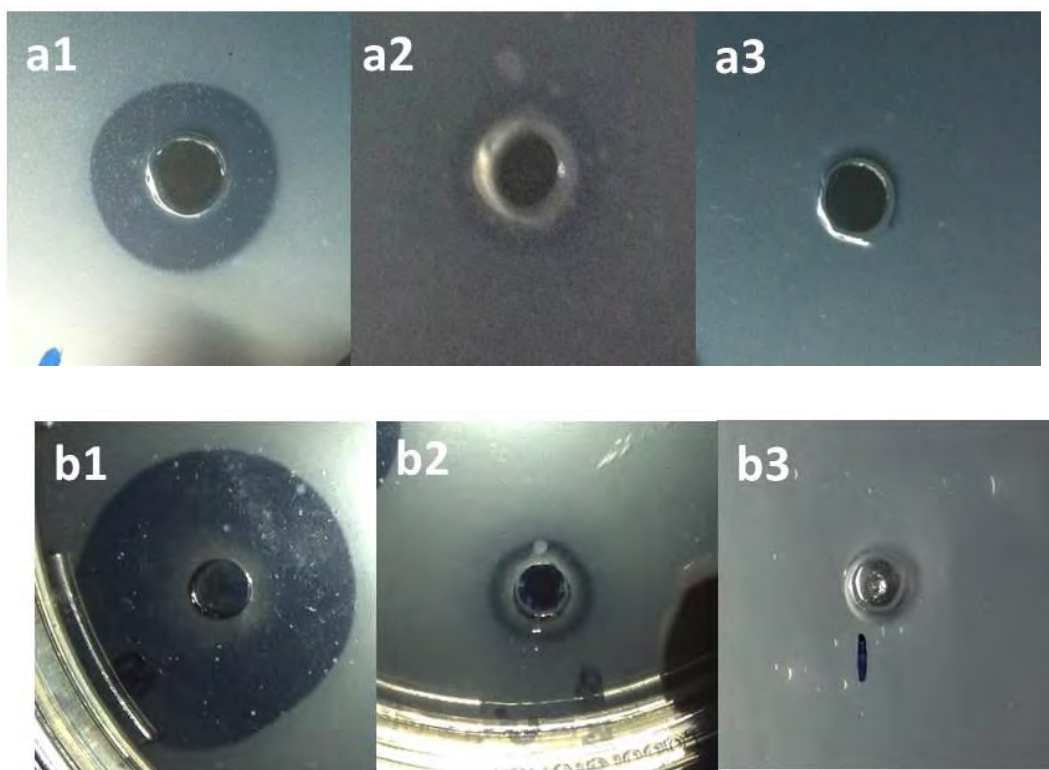


Figura 14. Bioensayo de actividad enzimática con posible actividad de fosfolipasa B. En ExC1: (a1) Control positivo de veneno de abeja; (a2) Posible actividad de fosfolipasa B; y (a3) Control negativo de agua desionizada. En ExC2: (b1) Control positivo de veneno de abeja; (b2) Posible actividad de fosfolipasa B; y (b3) Control negativo de agua desionizada. Fotografías tomadas a las 48 h.

8.5 Citotoxicidad en líneas celulares

Los resultados obtenidos de citotoxicidad realizados en colaboración con el Instituto de Química, se encuentran presentados en la Tabla 5. Las fracciones pre-purificadas y extractos crudos se trabajaron a concentraciones de 10 y 50 $\mu\text{g/ml}$ de proteína. Las líneas celulares utilizadas fueron MCF7 (cáncer de mama), K562 (leucemia), FGH (fibroblastos gingivales humanos) como línea celular sana y como control positivo Mitoxantrona.

Tabla 4. Inhibición de crecimiento por actividad citotóxica de *C. marsupialis*. NC (No citotóxico)

Fracción	Porcentaje de inhibición del crecimiento					
	10 µg prot			50 µg prot		
	K562	MCF7	FGH	K562	MCF7	FGH
> 30 kDa ExC1	23.2	6.7	NC	88.17	22.75	NC
30-10 kDa ExC1	15.4	NC	NC	NC	NC	NC
> 30 kDa ExC2	31.2	NC	NC	NC	NC	NC
30-10 kDa ExC2	0.8	NC	NC	NC	NC	NC
Mitoxantrona	67.2	75.9	56	86.35	60.99	99.14

9. DISCUSIÓN

9.1 Descarga de nematocistos

Para la realización de la descarga se utilizan una gran cantidad de técnicas, se menciona que los ciclos de congelado-descongelado aseguran un porcentaje mayor de descarga. Sin embargo, la naturaleza termolábil de las proteínas de *C. marsupialis* aplicando esta técnica, puede resultar en pérdida de actividad debido a los cambios drásticos de temperatura, por lo tanto no se utilizó (Rottini *et al.*, 1995).

En las muestras procesadas posterior a la recolecta, la descarga sucedía en poco tiempo, aquí únicamente se utilizó la técnica de maceración. Por otro lado, las muestras preservadas a -60°C requerían además de maceración, ultrasonido y centrifugación a bajas temperaturas (Turner y Freeman, 1969; Keen, 1971; Mustafa *et al.*, 1995). De acuerdo con la literatura y conociendo las propiedades de las proteínas de *C. marsupialis*, se optó por la utilización de estas técnicas como las más óptimas y eficientes ya que de esta forma, la actividad de las proteínas no se ponía en riesgo. Aunado a esto, a manera de preservar esta actividad, se adicionó una pastilla inhibidora de proteasas pues ayudó a proteger el extracto de cualquier enzima que pudiera degradar las proteínas (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2006).

9.2 Nematocistos presentes en *Carybdea marsupialis*

Avian y colaboradores en el año 1997, reportaron tres tipos de nematocistos para esta especie: Atricus isorhiza haplonemes, heterotricus microbasico eurytele y holotricus isorhiza, en este estudio heterotricus microbasico eurytele fue uno de los más abundantes. Con lo anterior puede inferirse que la especie colectada es *Carybdea marsupialis*.

9.3 Electroforesis SDS-PAGE

De primera instancia, se observó en la distribución de bandas de algunas fracciones, proteínas fuera del rango de la fracción. Esto puede ser debido a la estructura globular o fibrosa (Laguna *et al.*, 2013) que tienen las proteínas y su paso a través de la membrana al momento de pre-purificar. Esto quiere decir que, en lugar de haberse detenido en la membrana, su estructura le facilitó el paso ubicándose como proteína fuera del rango de peso. *C. marsupialis*, presentó en su mayoría bandas de alto peso molecular como 30, 37, 50, 125 y 250 kDa. Resultados aproximados fueron reportados por Sánchez-Rodríguez y colaboradores (2006), quienes detectaron bandas de 36, 139 y 220 kDa.

Comparando con resultados obtenidos por otros autores para otras especies de cubomedusas, se han encontrado proteínas con actividad hemolítica que corresponden a altos pesos moleculares. En el caso de *Carybdea rastonni* se describen toxinas de 43 y 46 kDa (Nagai *et al.*, 2000a); *Carybdea alata* presenta tres toxinas de 42, 43 y 45 kDa (Chung *et al.*, 2001; Nagai *et al.*, 2000b); *Chiropsalmus quadrigatus* presenta una toxina de 44 kDa (Nagai *et al.*, 2002). *Carybdea marsupialis* presentó un grupo de toxinas de 220, 139 y 36 kDa (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2006). Por último, una de las cubomedusas más estudiadas, *Chironex fleckeri*, presenta citolisinas de interés, de las cuales dos están compuestas por proteínas de alto peso molecular; una de ellas (370 kDa) se encuentra compuesta por dos subunidades de 43 y 45 kDa y otra (145 kDa) está compuesta por dos subunidades de 39 y 41 kDa (Brinkman y Burnell 2008).

Como se observa en los estudios realizados, pesos moleculares que oscilan entre 40 y 46 kDa corresponden a proteínas con actividad citolítica, la cual es de interés particular pues es un tipo de actividad que puede afectar a las células cancerosas. *C. marsupialis*, muestra una banda muy marcada entre los 37 y 50 kDa, lo que posiblemente corresponda a la presencia de proteínas con este tipo de actividad. En cuanto a la concentración de acrilamida, en los estudios anteriores se utilizaron distintas concentraciones que van desde 6, 7.5, 10, 12.5 y 15%; en este trabajo se utilizó la concentración de 15% ya que se notaba una mejor resolución de bandas, resultado que se comparó tanto en literatura como de forma experimental.

9.4 Bioensayos

9.4.1 Fosfolipasas

Medir la actividad enzimática de fosfolipasa A₂ (PA₂) es importante ya que es una enzima que puede inducir cambios en la composición membranal de las células (García y García, 2009) ya que actúa rompiendo los enlaces éster (*sn*-2) liberando ácidos grasos y lisofosfolípidos (Six y Dennis, 2000). Al conocer su mecanismo de acción, viene la importancia de evaluar ésta actividad enzimática en *C. marsupialis*, como una alternativa para atacar células cancerosas. Por este motivo se utilizó un bioensayo que resultara sensible para este tipo de enzima, donde pudiera observarse el efecto de fraccionamiento de lecitinas ocasionado por las PA₂, en el gel realizado con yema de huevo (Haberman y Hardt, 1972). Sin embargo, como se mencionó anteriormente en la sección de resultados, se obtuvo resultado negativo para PA₂ y posible resultado positivo de fosfolipasa B (PB).

Haberman y Hardt (1972) describen la formación de un halo transparente seguido de un halo turbio, como respuesta a la presencia de PB. Este resultado se observa conforme pasa el tiempo, incrementando la turbidez del halo. El bioensayo realizado no era particularmente sensible para PB, por lo que el resultado obtenido es una posibilidad de que esta enzima se encuentre presente en *C. marsupialis*, sugiriéndose en un futuro la utilización de un bioensayo particularmente dirigido a medir la actividad de PB.

Sin embargo, en el estudio realizado por Rottini y colaboradores (1995), la presencia de fosfolipasa es negativa para esta especie. El experimento fue realizado mediante la obtención de fosfolípidos de eritrocitos, los cuales fueron incubados con extracto de *C. marsupialis*, evaluando su actividad en cromatografía de capa fina sin resultado positivo.

Por otro lado, en un estudio realizado para medir la presencia de PA₂ en distintos cnidarios, se concluye que la presencia de PA₂ en cnidarios, se encuentra hipotéticamente relacionada con la toxicidad propia del organismo, en el estudio realizado con las especies de cubomedusas *Chironex fleckeri* (tentáculos), *Carybdea rastonii* (tentáculos) y *Carukia barnesi* (organismo completo) se observaron las heridas provocadas y la cantidad de PA₂ presente en los extractos obtenidos. Se encontraron altos niveles de PA₂ en *C. fleckeri* y su contacto provocó principalmente dermonecrosis; para *C. rastonii* se obtuvo niveles bajos de PA₂ y el contacto provocó en su mayoría eritema y por último *C. barnesi* no obtuvo respuesta significativa en niveles de PA₂ así como en lesiones ocasionadas (Nevalainen *et al.*, 2004). De acuerdo con lo anterior, *Carybdea marsupialis* es una especie que no causa lesiones graves, de esta forma se infiere que los niveles de PA₂ no son altos.

9.4.2 Citotoxicidad en células cancerosas

De las fracciones pre-purificadas obtenidas se probaron principalmente las de alto peso molecular, ya que distintos autores han reportado toxinas con actividad citotóxica en un rango de 40-46 kDa para las cubomedusas *Carybdea alata*, *Carybdea rastoni*, *Chiropsalmus quadrigatus* y *Chironex fleckeri* (Nagai *et al.*, 2000a, 2000b; Brinkman y Burnell, 2009). De esta forma se esperaba encontrar actividad citotóxica en las fracciones probadas.

En cuanto a estudios realizados previamente sobre la línea celular de cáncer de mama MCF7, se trabajó con la medusa *Cotylorhiza tuberculata*, cuyo extracto crudo fue fraccionado mediante el solvente orgánico acetoneitrilo, el cual permite de manera eficiente la precipitación de proteínas de alto peso molecular. Dicho fraccionamiento se observa en capas que se van formando en el extracto crudo (capa superior, intermedia e inferior). De esta manera, en el extracto se formaron tres capas las cuales fueron consideradas como fracciones, siendo la capa inferior la que presentó mayor

concentración de proteína. Se realizó un bioensayo sobre la línea celular MCF7 probando las tres fracciones, a concentraciones de 0.0005, 0.0025, 0.005, 0.0075 y 0.015 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteína. En el estudio se observa de forma inmediata una relación dosis-respuesta: la fracción correspondiente a la capa superior a una concentración de 0.015 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ disminuyó la viabilidad celular aproximadamente un 60%, la fracción de la capa intermedia a una concentración de 0.08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ disminuyó la viabilidad celular aproximadamente 40%, mientras que la fracción correspondiente a la capa inferior a una concentración de 0.08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ redujo la viabilidad celular aproximadamente un 50% (Leone *et al.*, 2013).

Comparado con *C. tuberculata*, *C. marsupialis* no presentó citotoxicidad sobre la línea celular MCF7, ya que a una concentración proteica mucho mayor que las utilizadas anteriormente, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, inhibió el crecimiento celular un 6.7%. Además, los autores atribuyen que parte de la respuesta citotóxica obtenida por *C. tuberculata* no puede estar ligada únicamente a la cantidad de proteína contenida en las fracciones, sino a otra clase de compuestos que pudieran encontrarse dentro de estas fracciones, como fitoquímicos que provengan de las algas simbióticas presentes en *C. tuberculata* (Leone *et al.*, 2013). Simmons y colaboradores (2005) mencionan que en algunas ocasiones la actividad citotóxica puede ser atribuida a procesos microbianos o simbiosis que se puedan presentar en el organismo de estudio. Sin embargo, *C. marsupialis* no presenta dichas relaciones por lo que su citotoxicidad es únicamente propia.

En lo que respecta a la línea celular de leucemia mieloide crónica K562, Stabili y colaboradores (2015) realizaron un estudio con la anémona *Actinia equina*. Obtuvieron un extracto crudo proveniente del mucus producido por el organismo, del cual se probó si presentaba actividad citotóxica a distintas concentraciones de proteína. A concentraciones de 800 y 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ las células fueron afectadas un 62% y 58% respectivamente. En otro estudio realizado con la medusa *Pelagia noctiluca* sobre la misma línea celular se obtuvo un extracto crudo que fue fraccionado mediante cromatografía de exclusión molecular obteniéndose cuatro fracciones (Fracciones 1 y 2 de alto peso molecular; fracciones 3 y 4 de bajo peso molecular). Tanto el extracto crudo como las fracciones se utilizaron en el bioensayo de citotoxicidad a concentraciones que fueron desde 5-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteína, observándose patrones dosis-respuesta. Los resultados más significativos se presentaron en las fracciones 1 y 3 donde a partir de concentraciones de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ se observó una disminución en la viabilidad celular de más de 50% (Ayed *et al.*, 2016).

Comparado con *A. equina* y *P. noctiluca*, la cubomedusa *C. marsupialis* presentó una actividad citotóxica mayor, utilizando una fracción de alto peso molecular a una menor concentración de proteína. Si bien, con *P. noctiluca* se probaron distintas fracciones e

incluso su fraccionamiento fue más fino que el realizado con *C. marsupialis*, la actividad citotóxica fue mayor en esta última a la misma concentración de proteína.

Referente a la actividad citotóxica sobre líneas celulares no cancerosas, fibroblastos gingivales de humanos sanos, *C. marsupialis* no presentó este tipo de actividad comparada con el anti-neoplásico mitoxantrona, el cual sí afectó dichas células. Monroy-Estrada y colaboradores (2013) mencionan la afinidad de las citolisinas hacia células enfermas y/o dañadas, debido a sus expresiones genéticas, metabolismo y características de membrana. Por lo tanto, el resultado obtenido en cuanto a la afinidad hacia las células cancerosas convierte a *C. marsupialis* en una especie idónea en el futuro desarrollo de fármacos contra el cáncer.

Sin embargo, las fracciones y extractos crudos probados en el bioensayo no están exentos de perder su actividad en el desarrollo del experimento, sobre todo por la naturaleza inestable de las proteínas presentes en *C. marsupialis*; su termolabilidad no les permite funcionar adecuadamente disminuyendo su actividad (Brinkman y Burnell, 2008). Por otro lado, esta pérdida de actividad puede surgir desde los procesos de purificación, por lo que la liofilización es un proceso que ralentiza este proceso (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2006). Debido a esto, es posible que al realizar el experimento la actividad citotóxica pueda verse mermada.

En lo que respecta a productos naturales marinos como fármacos para tratamiento contra el cáncer, la mayoría de los compuestos obtenidos de organismos marinos para este mismo propósito resultan en su mayoría ser péptidos (Haefner, 2013; Simmons *et al.*, 2016). Por este motivo es difícil comparar los trabajos realizados con el presente estudio, pues en su mayoría dichos estudios hablan de otro tipo de compuestos de origen no proteico. Por lo tanto, los resultados obtenidos de *C. marsupialis* y sus fracciones proteicas pre-purificadas aportan información importante en cuanto a potencial biológico.

10. CONCLUSIONES

El método de homogeneización (maceración) es una buena alternativa para descargar nematocistos, principalmente si las muestras son trabajadas en fresco y/o no llevan demasiado tiempo de almacenamiento. De no ser así, adicionalmente los métodos de ultrasonido y centrifugación a bajas temperaturas también favorecen la descarga de nematocistos.

La técnica de pre-purificación es una buena alternativa para realizar un primer fraccionamiento de extracto crudo. Sin embargo, la forma de algunas proteínas puede favorecer su paso a través de las membranas y de esta forma se pueden tener proteínas fuera del rango de peso en el fraccionamiento.

C. marsupialis no presentó actividad enzimática de fosfolipasa A₂. Por otro lado, podrían presentar una posible actividad de fosfolipasa B. Se considera, a futuro, la utilización de una prueba específica para este tipo de fosfolipasa.

C. marsupialis no presentó actividad citotóxica considerable en la línea celular cancerosa MCF7 (cáncer de mama).

El extracto >30 kDa presentó actividad citotóxica sobre la línea K562 (leucemia) de manera equiparable a la mitoxantrona, mientras que no causó citotoxicidad en células sanas de fibroblastos gingivales humanos.

C. marsupialis, presentó mayor actividad citotóxica sobre la línea celular K562 a una menor concentración de proteína, comparada con la anémona *A. equina* y la medusa *P. noctiluca*.

Existen muy pocos estudios enfocados a proteínas con algún tipo de bioactividad; la mayoría de los estudios realizados en cnidarios están particularmente enfocados a otro tipo de compuestos.

BIBLIOGRAFÍA

- Arneson, C., & Cutress, C. (1976). Life history of *Carybdea alata* Reynaud, 1830 (cubomedusae). In G. Mackie, *Coelenterate ecology and behavior*. Springer Science & Business Media.
- Avian, M., Budri, N., & Rottini-Sandrini, L. (1997). The nematocysts of *Carybdea marsupialis* Linnaeus, 1758 (Cubozoa). *6th Int'l Conference on Coelenterate Biology*, 21-26.
- Ayed, Y., Sghaier, R. M., Laouini, D., & Bacha, H. (2016). Evaluation of anti-proliferative and anti-inflammatory activities of *Pelagia noctiluca* venom in Lipopolysaccharide/Interferon- γ stimulated RAW264.7 macrophages. *Biomedicine and Pharmacotherapy*.
- Azuma, H., Ishikawa, M., Nakajima, T., Satoh, A., & Sekizaki, S. (1986a). Calcium-dependent contractile response of arterial smooth muscle to a jellyfish toxin (pCrTX: *Carybdea rastonii*). *British Journal of Pharmacology*, 549-559.
- Azuma, H., Sekizaki, S., Satoh, A., & Nakajima, T. (1986b). Platelet aggregation caused by *Carybdea rastonii* toxins (CrTX-I, II and III) obtained from a jellyfish, *Carybdea rastonii*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 34-42.
- Blunt, J., Copp, B., Munro, M., Northcote, P., & Prinsep, M. (2006). Marine natural products. *Natural products reports*, 26-78.
- Böckmann, B., Grill, H., & Giesing, M. (2001). Molecular characterization of minimal residual cancer cells in patients with solid tumors. *Biomolecular Engineering*, 95-111.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 248-254
- Brinkman, D., & Burnell, J. (2007). Identification, cloning and sequencing of two major venom proteins from the box jellyfish, *Chironex fleckeri*. *Toxicon*, 850-860.
- Brinkman, D., & Burnell, J. (2008). Partial purification of cytolytic venom proteins from the box jellyfish, *Chironex fleckeri*. *Toxicon*, 853-863.
- Brinkman, D., & Burnell, J. (2009). Biochemical and molecular characterisation of cubozoan proteins toxins. *Toxicon*, 1162-1173.
- Carbonnelle, D., Pondaven, M., Morançais, G., Masse, G., Bosch, S., Jacquot, C., Briand, G., Robert, J., Roussakis, C. (1999). Antitumor and anti-proliferative effects of an aqueous extract from the marine diatom *Haslea ostrearia* (Simonsen) against solid tumors: lung carcinoma (NSCLC-N6), kidney carcinoma (E39) and melanoma (M96) cell lines. *Anticancer Research*, 621-624.
- Cárdenas-Palomo, N., Herrera-Silveira, J., & Reyes, O. (2010). Distribución espacio-temporal de variables fisicoquímicas y biológicas en el hábitat del tiburón ballena *Rhincodon typus*

(Orectolobiformes: Rhincodontidae) al norte del Caribe Mexicano. *Revista Biológica Tropical*.

- Ceballos, P., & Ghersevich, S. (2008). Perpectivas en cáncer de mama: detección de células tumorales circulantes mediante mamaglobina A. *Clínica e investigación en Ginecología y Obstetricia*, 207-214.
- Chambers, A., Groom, A., & MacDonald, I. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Reviews Cancer*, 56-72.
- Chiang, P., Chien, C., Pan, S., Chen, W., Teng, C., Shen, Y., & Guh, J. (2005). Induction of endoplasmic reticulum stress and apoptosis by a marine prostanoid in human hepatocellular carcinoma. 679-686.
- Chung, J., Ratnapala, L., Cooke, I., & Yanagihara, A. (2001). Partial purification and characterization of a hemolysin (CAH1) from Hawaiian box jellyfish (*Carybdea alata*) venom. *Toxicon*, 981-990.
- Croteau, R., Kutchan, T., & Lewis, N. (2000). Natural Products (Secondary metabolites). In B. Buchanan, W. Gruissem, & R. Jones, *Biochemistry & Molecular Biology of Plants* (pp. 1250-1319). United Kingdom: John Wiley & Sons.
- Daly, M., Brugler, M., Cartwright, P., Collins, A., Dawson, M. F., McFadden, C., Opresko, D., Rodriguez, E., Romano, S., Stake, J. (2007). The phylum Cnidaria: A review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus. *Zootaxa*, 127-182.
- De la Calle, F. (2007). Fármacos de origen marino. *Treballs de la Societat Catalana de Biologia*, 141-155.
- Dubois, J., Tanguy, J., & Burnett, J. (1983). Ionic channels induced by sea nettle toxin in the nodal membrane. *Biophysical journal*.
- Endean, R., Ducheim, C., McColm, D., & Fraser, E. (1969). A study of the biological activity of toxic material derived from nematocyst of the cubomedusan *Chironex fleckeri*. *Toxicon*, 179-204.
- Fabisiewicz, A., Kulik, J., Kober, P., Brewcyfska, E., Piefkwski, T., & Siedlecki, J. (2004). Detection of circulating breast cancer cells in peripheral blood by a two-marker reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Acta Biochimica Polonica*, 747-755.
- Falfán-Vázquez, E., Ordoñez-López, U., & Ornelas-Roa, M. (2008). Variación espacial de larvas de lutjánidos y serránidos en la Plataforma de Yucatán. *Hidrobiológica*.
- Fautin, D. (2009). Structural diversity, systematics and evolution of cnidae. *Toxicon*, 1054-1064.

- Freeman, S., & Turner, R. (1972). Cardiovascular effects of cnidarian toxins: a comparison of toxins extracted from *Chiropsalmus quadrigatus* and *Chironex fleckeri*. *Toxicon*, 31-37.
- García, G., & García, A. (2009). Fosfolipasas A2: Grandes familias y mecanismos de acción. *Repertorio de Medicina y Cirugía*, 199-209.
- Gershwin, L. (2006). Nematocysts of the Cubozoa. *Zootaxa*, 1-57.
- Glaser, K., & Mayer, A. (2009). A renaissance in marine pharmacology: From preclinical curiosity to clinical reality. *Biochemical Pharmacology*, 440-448.
- Goldsborough Mayer, A. (1977). *The medusae of the world*. Amsterdam: A.Asher & Co.
- Habermann, E., & Hardt, K. (1972). A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases. *Analytical biochemistry*, 163-173.
- Haefner, B. (2013). Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug discovery today*, 536-544.
- Hamel, E., & Covell, D. (2002). Antimitotic peptides and depsipeptides. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, 19-53.
- Hernandez-Jaurez, J. (2009). Evaluación del posible efecto antitumoral del extracto de *Carybdea marsupialis* (Cnidaria: cubozoa) sobre tumores inducidos con N-etil-N-Nitrosourea (ENU) en el sistema nervioso central de ratas. *Tesis-UNAM*, 73.
- Honda, A., Mori, Y., Iguchi, K., & Yamada, Y. (1987). Antiproliferate and cytotoxic effects of newly discovered halogenated coral prostanoids from the japanese stolonifer *Clavularia viridis* on human myeloid leukemia cell in culture. *Molecular Pharmacology*, 530-535.
- Instituto Nacional de Geografía y Estadística. (2015). *"Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de febrero)"*. Aguascalientes, Aguascalientes: INEGI.
- Isselbacher, K., Adams, R., Braunwald, E., Petersdorf, R., & Wilson, J. (1980). *Principles of Internal Medicine*. Tokyo, Japón: McGraw-Hill .
- Jouiaei, M., Yanagihara, A., Madio, B., Nevalainen, T., Alewood, P., & Fry, B. (2015). Ancient venom systems: a review on cnidaria toxins. *Toxins*, 2251-2271.
- Kamikubo, K., Ogata, K., An, E., & Dan, K. (2000). Low proportion of G0-phase cells during induction chemotherapy correlates with subsequent remission in acute myeloid leukemia. *International journal of hematology*, 249-255.
- Kass-Simon, G., & Scappaticci, A. (2002). The behavioral and developmental physiology of nematocyst. *Canadian journal of zoology*, 1772-1794.

- Keen, T. (1971). Comparison of tentacle extracts from *Chiropsalmus quadrigatus* and *Chironex fleckeri*. *Toxicon*, 249-254.
- Khoulam, M., Ou, X., & Kalemkerian, G. (1996). Dolastatin 10 inhibits growth of small cell lung cancer. *Proceedings annual meeting of the american association for cancer research*.
- Kihara, h., Anraku, M., & Hirokazu, O. (1988). Tetrodotoxin-unaaffected depolarization of frog muscles induced by the venom of jellyfish (Genus: *Aurelia*). *Japanese Journal of Physiology*, 839-849.
- Koyama, T., Noguchi, K., Matsuzaki, T., Sakanashi, M., Nakasone, J., Miyagi, K., Sakanashi, M., Sakanashi, M. (2003). Haemodynamic effects of the crude venom from nematocysts of the box-jellyfish *Chiropsalmus quadrigatus* (Habu-kurage) in anaesthetized rabbits. *Toxicon*, 621-631.
- Lacroix, M. (2006). Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. *Endocrine-Related Cancer*, 1033-1067.
- Laguna, J., Piña Garza, E., Martínez Montes, F., Pardo Vázquez, J. P., & Riveros Rosas, H. (201). *Bioquímica de Laguna*. México: El Manual Moderno.
- Lazcano-Pérez, F. (2009). Aislamiento, purificación y caracterización de las neurotoxinas presentes en la cubomedusa *Carybdea marsupialis* (Lineé, 1758). *Tesis-UNAM*.
- Lenhinger, A., Nelson, D., & Cox, M. (2006). *Principles of Biochemistry*. Canada: Worth Publisher.
- Leone, A., Lecci, M. R., Durante, M., & Pirino, S. (2013). Extract from the zooxanthellate jellyfish *Cotylorhiza tuberculata* modulates gap junction intercellular communication in human cell cultures. *Marine drugs*, 1728-1762.
- Mariottini, G., & Pane, L. (2010). Mediterranean jellyfish venoms: A review on scyphomedusae. *Marine Drugs*, 1122-1152.
- Mariscal, R. (1974). Nematocyst. *Coelenterate Biology*, 129-178.
- Millipore Corporation. (2008). Stirred Ultrafiltration Cells. *User Guide*.
- Millipore Corporation. (2009). Amicon Ultra-15. *User Guide*.
- Miranda, L., Hirano, Y., Mills, C., Falconer, A., Fenwick, D., Marques, C., & Collins, A. (2016). Systematics of stalked jellyfishes (Cnidaria: Staurozoa). *PeerJ*.
- Molinski, T., Dalisay, D., Lievens, S., & Saludes, J. (2009). Drug development from marine natural products. *Nature reviews Drug discovery*, 69-85.
- Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Campbell, H., Mayo, J., & Boyd, M. (1991).

- Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*, 757-766.
- Monroy-Estrada, H., Chirino, Y., Soria-Mercado, I., & Sánchez-Rodríguez, J. (2013). Toxins from the Caribbean sea anemone *Bunodeopsis globulifera* increase cisplatin-induced cytotoxicity of lung adenocarcinoma cells. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 1-9.
- Mustafa, M., White, E., Hongo, K., Othman, I., & Orchard, C. (1995). The mechanisms underlying the cardiotoxic effect of the toxin from the jellyfish *Chironex fleckeri*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 196-206.
- Nagai, H., Takuwa, K., Nakao, M., Ito, E., Miyake, M., Noda, M., & Nakajima, T. (2000a). Novel proteinaceous toxins from the box jellyfish (Sea Wasp) *Carybdea rastonii*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 582-588.
- Nagai, H., Takuwa, K., Nakao, M., Sakamoto, B., Crow, G., & Nakajima, T. (2000b). Isolation and characterization of a novel protein toxin from the hawaiian box jellyfish (Sea Wasp) *Carybdea alata*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 589-594.
- Nagai, H., Takuwa-Kuroda, K., Nakao, M., Oshiro, N., Iwanaga, S., & Nakajima, T. (2002). A novel protein toxin from the deadly box jellyfish (Sea Wasp, Habu-kurage) *Chiropsalmus quadrigatus*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 97-102.
- Nagase, H., Karaki, H., Ozaki, H., Urakawa, N., Azuma, H., & Nakajima, T. (1987). Contractile and relaxant effects of jellyfish toxin on the vascular and intestinal tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 411-414.
- Nagle, D., Zhou, Y.-D., Mora, F., Mohammed, K., & Kim, Y.-P. (2004). Mechanism targeted discovery of antitumor marine natural products. *Current medicinal chemistry*, 1725-1756.
- Nevalainen, T., Pauravuori, H., Quinn, R., Llewellyn, L., Benzie, J., Fenner, P., & Winkel, K. (2004). Phospholipase A2 in Cnidaria. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 71-735.
- Orduña-Novoa, K., Segura-Puertas, L., Sánchez-Rodríguez, J., Melendez, A., Nava-Ruiz, C., Rembao, D., Santamaría, A., Galván-Arzate, S. (2003). Possible antitumoral effect of the crude venom of *Cassiopea xamachana* (Cnidaria: Scyphozoa) on tumors of the central nervous system induced by N-Ethyl-N-Nitrosourea (ENU) in rats. *Proceedings of the western pharmacology society*, 85-87.
- Özbek, S., Balasubramanian, P., & Holstein, T. (2009). Cnidocyst structure and the biomechanics of discharge. *Toxicon*, 1038-1045.
- Pérez-Saldivar, M., Fajardo-Gutiérrez, A., Bernáldez-Ríos, R., Martínez-Avalos, A., Medina-Sanson, A., Espinosa-Hernández, L., Flores-Chapa, J., Amador-Sánchez, R., Peñaloza-González, J., Álvarez-Rodríguez, F., Bolea-Murga, V., Flores-Lujano, J., Rodríguez-Zepeda, M., Rivera-

- Luna, R., Dorantes-Acosta, E., Jiménez-Hernández, E., Alvarado-Ibarra, M., Velázquez-Aviña, M., Torres-Nava, J., Duarte-Rodríguez, D., Paredes-Aguilera, R., Del Campo-Martínez, M., Cárdenas-Cardos, R., Alamilla-Galicia, P., Bekker-Méndez, V., Ortega-Álvarez, M., & Mejía-Arangure, J. (2011). Childhood acute leukemias are frequent in Mexico City: descriptive epidemiology. *BioMed Center Cancer*.
- Price, M., Wilkinson, A., & Gentry, L. (1982). Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabourandia*, 7-14
- Proksch, P., Edrada, R., & Ebel, R. (2002). Drugs from the seas-current status and microbiological implications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 125-134.
- Rinehart, K. (2000). Antitumor compounds from tunicates. *Medicinal Research Reviews*, 1-27.
- Rocha, J., Peixe, L., Gomes, N., & 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*, 1860-1886.
- Rocha, J., Leal, M., & Calado, R. (2015). Marine bioactive compounds from cnidarians. In S.-K. Kim, *Springer Handbook of Marine Biotechnology* (pp. 823-849). Germany: Springer Berlin Heidelberg.
- Ross, D. (1998). Molecular biology and their applications in the cancer treatment and diagnosis. *Introduction to oncogenes and molecular cancer medicine*.
- Rottini, G., Gusmani, L., Parovel, E., Avian, M., & Patriarca, P. (1995). Purification and properties of cytolytic toxin in venom of the jellyfish *Carybdea marsupialis*. *Toxicon*, 315-326.
- Sánchez-Rodríguez, J., Torrens, E., & Segura-Puertas, L. (2006). Partial purification and characterization of a novel neurotoxin and three cytolytic toxins from box jellyfish (*Carybdea marsupialis*) nematocyst venom. *Archives of toxicology*, 163-168.
- Simmons, L., Andrianasolo, E., McPhail, K., Flatt, P., & Gerwick, W. (2016). Marine natural products as anticancer drugs. *Molecular Cancer Therapeutics*, 333-342.
- Six, D., & Dennis, E. (2000). The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. *Biochimica et Biophysica*, 1-19.
- Singh, K., & Modica-Napolitano, J. (2002). *Experts reviews in molecular medicine*.
- Spector, I., Shochet, N., Kashman, Y., & Groweiss, A. (1983). Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells. *Science*, 493-495.
- Stabili, L., Schirosi, R., Parisi, M., Piraino, S., & Cammarata, M. (2015). The mucus of *Actinia equina* (Anthozoa, Cnidaria): An unexplored resource for potential applicative purpose. *Marine drugs*, 5276-5296.

- Sun, L., Yoshii, Y., Hyodo, A., Tsurushima, H., Saito, A., Harakuni, T., Ya-ping, L., Morine, N. (2002). Apoptosis induced by box jellyfish (*Chiropsalmus quadrigatus*) toxin in glioma and vascular endothelial cell lines. *Toxicon*, 441-446.
- Tomida, A., Yun, J., & Tsuruo, T. (1996). Glucose-regulated stresses induce resistance to camptothecin in human cancer cells. *International journal of cancer*, 391-396.
- Torrens-Rojas, E. (2004). Aislamiento y purificación de proteínas con actividad hemolítica y neurotóxica de la cubomedusa *Carybdea marsupialis* (Lineé 1758). *Tesis-UNAM*.
- Turk, T., & Kem, W. (2009). The *phylum* Cnidaria and investigations of its toxins and venoms until 1990. *Toxicon*, 1031-1037.
- Turner, R., & Freeman, S. (1969). Effects of *Chironex fleckeri* toxin on the isolated perfused guinea pig heart. *Toxicon*, 277-286.
- Uemura, D., Takahashi, K., Yamamoto, T., Katayama, C., Tanaka, J., Okumura, Y., & Hirata, Y. (1985). Norhalichondrin A: An antitumor polyether macrolide from a marine sponge. *American Chemical Society*, 1-3.
- Welch, D. (2006). Do we need to redefine a cancer metastasis and staging definitions? *Breast disease*, 3-12.
- Wiltshire, C., Sutherland, S., Fenner, P., & Young, A. (2000). Optimization and preliminary characterisation of venom isolated from 3 medically important jellyfish: the box (*Chironex fleckeri*), Irukandji (*Carukia barnesi*), and blubber (*Catostylus mosaicus*) jellyfish. *Wilderness and Environmental Medicine*, 241-250.
- Zieglschmid, V., Hollman, C., & Böcher, O. (2005). Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 155-196.

Sitios Web

- American Cancer Society. (2015, Mayo, 08). *Breast Cancer*. Recuperado de: <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/index>
- American Cancer Society. (2016, Octubre, 13). *Leukemia*. Recuperado de: <http://www.cancer.org/cancer/leukemia/index>
- Instituto Nacional del Cáncer. (2015, Mayo, 08). *Cáncer de seno (mama)*. Recuperado de: <http://www.cancer.gov/espanol/tipos/seno>
- Instituto Nacional del Cáncer. (2016, Octubre, 13). *Leucemia*. Recuperado de: <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/leucemia>

Instituto Nacional de Cancerología. (2016, Octubre, 13). *Leucemia mieoloide crónica*. Recuperado de: <http://www.infocancer.org.mx/leucemia-mieloide-crnica-con818i0.html>

Organización Mundial de la Salud. (2015, Mayo, 08). *Cáncer de mama: prevención y control*. Recuperado de: <http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/>