



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

QUÍMICA ACUÁTICA

AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD
CITOLÍTICA DE LOS COMPUESTOS PRESENTES EN LA ANÉMONA *Lebrunia*
danae DEL CARIBE MEXICANO

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

SHEILA NARAYAN CHÁVEZ VILLELA

DIRECTOR DE TESIS

DRA. JUDITH SÁNCHEZ RODRÍGUEZ

[INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA \(UNAM\)](#)

COMITÉ TUTOR

DR. ROBERTO A. ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS

[INSTITUTO DE QUÍMICA \(UNAM\)](#)

DR. MANUEL BENIGNO AGUILAR RAMÍREZ

[INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA \(UNAM\)](#)

DR. MANUEL MIRANDA ANAYA

[UMDI JURQUILLA, FACULTAD DE CIENCIAS \(UNAM\)](#)

DR. SERGIO RODRÍGUEZ MORALES

[UNIDAD DE QUÍMICA SISAL, FACULTAD DE QUÍMICA \(UNAM\)](#)

PUERTO MORELOS, QUINTANA ROO, DICIEMBRE DE 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

T E S I S

“Aislamiento, purificación y caracterización de la actividad citolítica de los compuestos presentes en la anémona *Lebrunia danae* del Caribe mexicano”



Que para optar por el grado de:
Maestro en Ciencias (Química Acuática)

Presenta: Sheila Narayan Chávez Villela

Director de Tesis
Dra. Judith Sánchez Rodríguez

Comité Tutorial
Dr. Roberto A. Arreguín Espinosa De Los Monteros
Dr. Manuel Benigno Aguilar Ramírez
Dr. Manuel Miranda Anaya
Dr. Sergio Rodríguez Morales

Puerto Morelos, Quintana Roo, diciembre de 2017

AGRADECIMIENTOS

A Krishna, siempre presente en mi vida de todas las formas posibles, que sea así por la eternidad, gracias por absolutamente todo.

A toda mi familia, mis latosos y muy queridos hermanos Swami y Jagannath, mi nueva hermana Hilda, mi amado Balaram, tías, tíos, primos, que me han acompañado, apoyado y estado al pendiente de mi aun en la distancia durante este proyecto.

A mis padres, que me han permitido abrir mis alas y cuyo amor, amistad y apoyo moral han sido invaluable no solo durante este proyecto, sino toda la vida; mi Mami, que siempre me ha apoyado en todo, y a mi Papi, cuyas enseñanzas, principalmente espirituales han sido invaluable.

A la doctora Judith, por la ayuda otorgada durante estos dos años, por la paciencia, por ser siempre tan atenta.

A los miembros de mi comité tutorial: Dr. Sergio Rodríguez Morales, Dr. Manuel Benigno Aguilar Ramírez, Dr. Manuel Miranda Anaya y Dr. Roberto A. Arreguín Espinosa de los Monteros por sus comentarios, consejos y revisiones.

A Mariela y Aleida por acompañarme durante la odisea en este paraíso tropical, por las risas, el apoyo en el trabajo, los viajes, las series maratónicas y todo lo que vivimos.

A mis compañeros de laboratorio, los que estuvieron estos dos años: Juan Ramón, secre Paolo, Ilinova, Antonia, Amanda; y aquellos que estuvieron poco tiempo, pero de manera constante y que dejaron su huella: Noel Fabian, mi joven Padawan Alondra, Jared, María, Maritza, Karen Mar. Gracias por todas las risas, la compañía y el apoyo en el trabajo.

A mis incondicionales, que aun siendo un mazapán me acompañaron desde lejos y estuvieron siempre al pendiente de mí: Efren, Sebastián, Chavito.

Al Dr. Juan Francisco Ramírez Martínez por los consejos, las revisiones y la ayuda a pesar de sus mil ocupaciones, por estar siempre al pendiente.

Al M. en C. Fernando Negrete Soto cuyas enseñanzas de buceo hicieron posible el muestreo de *Lebrunia danae*.

A la M. en C. Laura Celis Gutiérrez por el apoyo en la búsqueda de información bibliográfica.

Al M. en I. Miguel Ángel Gómez Reali, al M. en C. Edgar Escalante Mancera, al M. en C. Francisco Ruiz Rentería y al capitán Amaury Mendoza por el apoyo técnico durante la realización de este proyecto.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, por permitirme y facilitarme continuar con mi formación académica.

Al CONACyT por la beca otorgada para poder realizar este proyecto (CVU 71055), y al proyecto UNAM-PAPIIT 202714 por el financiamiento proporcionado.

*Cuando hacemos algo, sí ponemos todo el corazón y alma en ello,
entonces diríamos que de esa creación se obtiene una esencia.*



ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	I
ÍNDICE.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. ANTECEDENTES	5
2.1. PHYLUM CNIDARIA	5
2.1.1. Orden Actinaria.....	8
2.1.1.1. <i>Lebrunia danae</i>	9
2.1.1.1.1. Clasificación taxonómica	11
2.2. PHYLUM CNIDARIA COMO FUENTE DE TOXINAS.....	11
2.2.1. Citolisinas.....	13
2.2.2. Actividad farmacológica de las citolisinas.....	16
2.3. ESTUDIOS PREVIOS DE LA ESPECIE <i>LEBRUNIA DANAЕ</i>	18
2.4. CÁNCER.....	20
2.4.1. Causas	21
2.4.2. Estadísticas del cáncer	22
3. JUSTIFICACIÓN.....	26
4. HIPÓTESIS.....	27
5. OBJETIVO	28
5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
6. METODOLOGÍA.....	29
6.1. ÁREA DE ESTUDIO.....	30
6.2. MÉTODO DE RECOLECTA	31

6.3.	OBTENCIÓN DE EXTRACTO CRUDO.....	31
6.4.	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	31
6.5.	PREPURIFICACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE BAJA PRESIÓN....	32
6.6.	PURIFICACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN EN FASE REVERSA	32
6.7.	ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.....	32
6.8.	ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF	33
6.9.	BIOENSAYOS.....	34
6.9.1.	<i>Preevaluación del extracto crudo</i>	34
6.9.2.	<i>Actividad hemolítica</i>	34
6.9.3.	<i>Actividad de fosfolipasas</i>	35
6.9.4.	<i>Actividad de fosfolipasa A2 secretora</i>	35
6.9.5.	<i>Inhibición del crecimiento en líneas celulares humanas (cribado primario)</i> ..	36
6.9.6.	<i>Viabilidad en línea celular C6</i>	37
7.	RESULTADOS	39
7.1.	OBTENCIÓN DE EXTRACTO CRUDO.....	39
7.2.	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	40
7.3.	PREPURIFICACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE BAJA PRESIÓN....	41
7.4.	PURIFICACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN EN FASE REVERSA	42
7.5.	ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.....	43
7.5.1.	<i>Extracto crudo</i>	43
7.5.2.	<i>Fracciones obtenidas mediante cromatografía de líquidos de baja presión</i> ...	44
7.6.	ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF	45
7.6.1.	<i>Extracto crudo</i>	45
7.6.2.	<i>Fracciones obtenidas mediante cromatografía de líquidos de baja presión</i> ...	46
7.6.2.1.	<i>F3a</i>	48
7.7.	BIOENSAYOS.....	49
7.7.1.	<i>Preevaluación del extracto crudo</i>	49
7.7.2.	<i>Actividad hemolítica</i>	50
7.7.3.	<i>Actividad de fosfolipasas</i>	52
7.7.4.	<i>Actividad de fosfolipasa A2 secretora</i>	53

7.7.5. <i>Inhibición del crecimiento en líneas celulares humanas (cribado primario)</i> ..	55
7.7.6. <i>Viabilidad en línea celular C6</i>	55
8. DISCUSIÓN	58
9. CONCLUSIONES	66
10. PERSPECTIVAS	67
11. ANEXOS	68
11.1. ABREVIATURAS	68
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Nematocisto.....	6
Figura 2. Cladograma simplificado del phylum Cnidaria.....	7
Figura 3. Estructura general de una anémona.....	9
Figura 4. Anémona <i>Lebrunia danae</i>	10
Figura 5. Lesiones dérmicas producidas por anémona y medusa.....	12
Figura 6. Componentes lipídicos de la membrana plasmática.....	13
Figura 7. Estructura y mecanismo de formación de poro de la fragaceatoxina C.....	15
Figura 8. Desarrollo del cáncer, proceso multinivel.....	21
Figura 9. Diagrama resumido de la metodología realizada.....	29
Figura 10. Sistema de arrecife de coral de Puerto Morelos.....	30
Figura 11. Cnidocitos de <i>L. danae</i>	40
Figura 12. Cromatograma de filtración en gel Sephadex G-50 M del EC de <i>L. danae</i>	41
Figura 13. Cromatograma de CLAR en fase reversa de F3.....	43
Figura 14. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12% del EC.....	44
Figura 15. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12% de las fracciones.....	45
Figura 16. Espectros de MALDI-TOF del EC.....	46
Figura 17. Espectro de MALDI-TOF de F1.....	47
Figura 18. Espectro de MALDI-TOF de F2.....	47
Figura 19. Espectro de MALDI-TOF de F3.....	48
Figura 20. Espectro de MALDI-TOF de F3a.....	49
Figura 21. Actividad hemolítica inducida por el EC de <i>L. danae</i> en eritrocitos humanos.....	52
Figura 22. Actividad enzimática de fosfolipasas.....	53
Figura 23. Actividad de sPLA ₂	54
Figura 24. Viabilidad celular del EC y fracciones obtenidas a partir de <i>L. danae</i> usando el método de RN.....	56
Figura 25. Viabilidad celular del EC y fracciones obtenidas a partir de <i>L. danae</i> usando el método de CV.....	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estimado global de nuevos casos de cáncer y sus proporciones a nivel mundial.....	22
Tabla 2. Tipos de cáncer con el mayor número absoluto de muertes causadas entre 2000 y 2013 en México.....	23
Tabla 3. Recolectas.....	39
Tabla 4. Concentración de proteína del extracto crudo y fracciones respecto al estándar de gamma globulina bovina.....	40
Tabla 5. Rendimiento del material obtenido a partir de la anémona <i>L. danae</i>	42
Tabla 6. Especificaciones de los cangrejos inyectados con extracto crudo.....	50
Tabla 7. Respuestas observadas en los cangrejos inyectados.....	50
Tabla 8. Actividad de sPLA ₂ obtenida en VA, EC y fracciones obtenidas a partir de <i>L. danae</i>	54
Tabla 9. Porcentaje de inhibición del crecimiento (antiproliferativo).....	55

RESUMEN

El medio ambiente marino es considerado una fuente potencial de principios activos que pueden ser usados con propósitos terapéuticos. Los organismos marinos se han desarrollado en un ambiente con condiciones físicas y químicas distintas a las terrestres; diversas especies han enfocado sus esfuerzos evolutivos en el desarrollo de toxinas que usan como defensa contra depredadores y como ataque para cazar a sus presas. Se considera que los organismos pertenecientes al phylum Cnidaria poseen varias de las toxinas marinas más potentes, con efectos principalmente citolíticos y neurotóxicos. Pertenecen a este phylum medusas, anémonas, corales, plumas de mar, hidroides, entre otros.

La anémona *Lebrunia danae* es considerada una especie muy venenosa e irritante para humanos, cuyo extracto crudo y fracciones ya han sido probados en algunos modelos biológicos, como pruebas de toxicidad en cangrejo *Ocypode quadrata*, actividad hemolítica, actividad antiparasitaria, actividad inhibidora de acetilcolinesterasa y actividad sobre diferentes canales iónicos activados por voltaje o por ligando.

A partir de organismos de *L. danae* se obtuvo el extracto crudo (EC), que fue evaluado mediante el ensayo de toxicidad en cangrejo *O. quadrata* y hemólisis en eritrocitos humanos, donde se obtuvo una UH_{50} de 0.38 mg de proteína. La purificación del EC se realizó mediante cromatografía líquida de baja presión y se obtuvieron tres fracciones (F1, F2 y F3), que junto con el EC, fueron evaluadas usando diversos ensayos: ensayo de fosfolipasas y ensayo de fosfolipasa A_2 secretora, detectando actividad del EC y F2 en ambos ensayos; inhibición del crecimiento en seis líneas celulares tumorales humanas y una línea celular normal humana, obteniendo porcentajes de inhibición del crecimiento celular en el rango de 18–98%, 0–85%, 5–89% y 0–14% con el EC, F1, F2 y F3 respectivamente, y cierta selectividad de las fracciones en células tumorales con respecto a la línea celular normal; y viabilidad en la línea celular C6 de glioma murino, con porcentajes de *cca.* 50% para todos los extractos, con excepción de F3 donde se obtuvieron porcentajes de viabilidad de hasta 92%.

Palabras clave: *Lebrunia danae*, citotoxicidad, inhibición del crecimiento, viabilidad celular, cáncer.

ABSTRACT

The marine environment is considered a potential source of drugs that can be used for therapeutic purposes. Marine organisms have evolved in a physical and chemical environment different from the land. Diverse species have focused their evolutionary efforts in the development of toxins that they can use as a defense against predators and to attack and hunt their preys. The organisms belonging to the Cnidaria phylum are considered to possess several of the most potent marine toxins, with mainly cytolytic and neurotoxic effects. Jellyfish, sea anemones, corals, sea feathers, and hydroids, among others, belong to this phylum.

The sea anemone *Lebrunia danae* is considered a very venomous and irritating species for humans. *L. danae* crude extract and fractions have been tested in some biological models, such as *Ocypode quadrata* crab toxicity test, hemolytic, antiparasitic and acetylcholinesterase inhibitory activity, and action on different voltage or ligand activated channels.

The crude extract (CE) obtained from *L. danae* organisms was evaluated by the *O. quadrata* crab toxicity test and hemolytic assay in human erythrocytes with a HU_{50} of 0.38 mg of protein. The pre-purification of the CE was performed by low pressure liquid chromatography, and three fractions were obtained (F1, F2, and F3). CE and fractions were evaluated using several assays: phospholipase assay and secretory phospholipase A₂ assay, which showed activity in CE and F2. Inhibition of growth in six human tumor cell lines, and a normal human cell line, obtaining percentages of cell growth inhibition in the range of 18–98%, 0–85%, 5–89% and 0–14% with CE, F1, F2 and F3 respectively, and certain selectivity of the fractions in tumor cells was observed over the normal cell line; and viability in the murine glioma cell line C6, with percentages of *cca.* 50% for all extracts, except for F3, whit up to 92% viability percentages.

Keywords: *Lebrunia danae*, cytotoxicity, growth inhibition, cell viability, cancer.

1. INTRODUCCIÓN

La humanidad ha usado por largo tiempo productos naturales con propósitos médicos; en el caso de los productos marinos, la gran diversidad de organismos ha llevado a investigar nuevos productos que puedan usarse con fines terapéuticos. Se han descubierto más de 20,000 moléculas en el campo de la bioquímica de compuestos marinos bioactivos desde sus inicios (mediados de 1960). Sin embargo, solo un número muy limitado ha demostrado poseer aplicación industrial (1). Actualmente, se encuentran en el mercado diversos fármacos cuyo origen es marino y que han sido aprobados por la FDA: citarabina (Cytosar-U[®], Depocyt[®]), vidarabina (Vira-A[®]), ziconotide (Prialt[®]), trabectedina (Yondelis[®]) y eribulina (Halaven[®]) son algunos ejemplos. Muchos otros se encuentran en fases de investigación básica, preclínica o clínica (2-4).

Algunas veces la percepción respecto al descubrimiento de nuevas sustancias bioactivas es que ya se han descubierto aquellas cuyas estructuras son simples. Sí se realiza una comparación con respecto al número de especies a partir de las cuales se han obtenido dichas sustancias, es cierto que se trata de un número finito, sin embargo, también es verdad que no todas las especies han sido estudiadas y muchas son aún desconocidas; por ejemplo, se estima que el número de especies de plantas está entre 300,000 y 400,000, mientras que el programa más extenso de búsqueda de sustancias activas en plantas incluía alrededor de 19,000 especies en la década de 1960 (5). Por otra parte, durante veinte años el Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos ha colectado cerca de 30,000 especies de plantas para su estudio, número lejano a la cantidad de especies que se estima se encuentran en el mundo. Algo similar ocurre en el caso de los invertebrados marinos que han sido ampliamente estudiados durante las últimas dos décadas; sin embargo, su gran diversidad es desconocida y frecuentemente se reportan especies nuevas. En el caso de los cnidarios, de las aproximadamente 10,000 especies, solo 156 toxinas han sido caracterizadas (6).

El medio marino constituye una enorme fuente potencial de nuevas moléculas de origen natural. Este potencial es más importante por el hecho de que los organismos marinos han evolucionado en un medio físico y químico distinto al terrestre, por lo que el mar ofrece una excepcional fuente de biodiversidad. La naturaleza sésil de muchos organismos marinos los ha obligado a generar sustancias químicas únicas, usadas para defenderse, reproducirse y comunicarse (7). Las toxinas marinas más potentes se encuentran en los phylum Cnidaria,

Equinodermata, Annelida y Mollusca, de los cuales cada uno con sus clases y órdenes presentan sustancias tóxicas (toxinas) para vertebrados e invertebrados (8).

La obtención de grandes cantidades de sustancias naturales para estudios preclínicos es un reto. En el caso de los organismos marinos se pueden encontrar en locaciones remotas que requieren de expediciones costosas, el acceso para su recolección es difícil, es necesario usar equipo especializado, los permisos de recolecta son difíciles de obtener; adicionalmente, el organismo solo produce cantidades del compuesto de interés en condiciones ambientales y ecológicas específicas (5).

En el campo de la química de productos naturales, es de vital importancia determinar los compuestos o componentes responsables de la actividad biológica, debido a esto como parte fundamental del trabajo de laboratorio se realiza la separación, purificación y caracterización para determinar las estructuras químicas. Las estructuras más comunes encontradas en las toxinas marinas son: proteínas, péptidos, lípidos, pigmentos, alcaloides y compuestos sulfurados (8).

Entre las toxinas marinas se ha encontrado una variedad de compuestos capaces de ejercer acciones específicas y potentes a nivel de canales iónicos activados por voltaje o por ligando (un ejemplo son los neurotransmisores), y compuestos que actúan formando poros en la membrana celular desestabilizándola y llevando a su lisis. Las toxinas presentes en el phylum Cnidaria son principalmente neurotoxinas y citolisinas (9), que pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central y como agentes antitumorales (10). Estos productos poseen una gran diversidad estructural. La especificidad de sus efectos permite que sean empleados como: reactivos biológicos en investigaciones biomédicas, agentes terapéuticos, modelos o arquetipos estructurales para la generación de familias de fármacos con mayor potencia y especificidad (11); también se sabe que pueden potenciar la actividad citotóxica inducida por bajas dosis de los agentes quimioterapéuticos comunes, como doxorubicina y vincristina (12).

2. ANTECEDENTES

2.1. Phylum Cnidaria

El phylum Cnidaria es un grupo antiguo cuyos registros fósiles datan del periodo Cámbrico (hace 541 millones de años). Son organismos invertebrados acuáticos y depredadores que presentan una organización sencilla, solitaria o colonial y amplia diversidad morfológica, cuya característica distintiva es la presencia de cnidocitos, orgánulos con funciones urticantes y adhesivas semejantes a una cápsula con túbulos eversibles. Se observan básicamente dos tipos estructurales distintos en el phylum: a) una fase hidroide sésil o pólipo y b) una medusoide libre-nadadora o medusa. Adicionalmente, se consideran otras dos características para su identificación, aunque a diferencia de los cnidocitos, no siempre están presentes: a) simetría radial o birradial y b) los estadios de desarrollo de plánula o pólipo (13).

Los cnidarios predominan en una amplia gama de ambientes marinos, pero algunas especies habitan en ambientes salobres y dulceacuícolas (14). Se encuentran en todas las latitudes, desde los trópicos hasta los polos y en todas las profundidades, aunque la mayoría se encuentra cerca de los litorales; pueden ser pelágicos y bénticos (15).

Constituyen un grupo muy diverso en cuanto a formas, colores y tamaños. Presentan una simetría corporal de tipo radial, que se conforma a partir de un eje oral-aboral. Durante su ciclo de vida se definen dos fases morfológicas evidentes, el pólipo y/o la medusa, en ambos casos con una cavidad gastrovascular o celenterón que contiene una única abertura, que funciona como boca y ano, y se encuentra rodeada por un número variable de tentáculos. En el desarrollo embrionario las dos hojas blastodérmicas (ectodermo y endodermo) se diferencian en la epidermis y la gastrodermis, estas capas se encuentran separadas por una capa intermedia denominada mesoglea, que en la mayoría de los casos da la consistencia gelatinosa a los cnidarios. Carecen de cefalización, sistema nervioso central, sistema respiratorio y órganos excretores. Poseen un sistema nervioso no centralizado y sus células neurosensoriales son las más primitivas del reino animal. Por lo general, las neuronas están dispuestas en dos conjuntos reticulares o redes nerviosas, una entre la epidermis y el mesénquima, y otra entre la gastrodermis y el mesénquima. La red subgastrodérmica es generalmente menos desarrollada que la red subepidérmica y está ausente por completo en algunas especies. Unas pocas células nerviosas y sinapsis están polarizadas y permiten la

transmisión en una sola dirección, pero en la mayoría de las neuronas y sinapsis los impulsos pueden viajar en ambas direcciones (16).

Los cnidarios tienen la capacidad de producir cnidocitos (cnida en plural), de los que se conocen 28 tipos, divididos en tres subcategorías: a) nematocistos (25 tipos), b) espirocistos (2 tipos) y c) picocistos. De entre las tres subcategorías, los nematocistos tienen importancia médica por ser los únicos que penetran en la piel del hombre; estas estructuras de secreción intracelular se encuentran entre las más grandes y complejas que se conocen en el Reino Animal; poseen una cápsula gruesa de pared doble donde se alojan las toxinas y un filamento hueco enrollado en espiral que varía en forma y armadura (Figura 1), y son utilizados para inmovilizar a sus presas y defenderse de depredadores. La descarga de los nematocistos es el resultado de un efecto de estímulos mecánicos y/o químicos, modulada por la actividad neuronal (14).

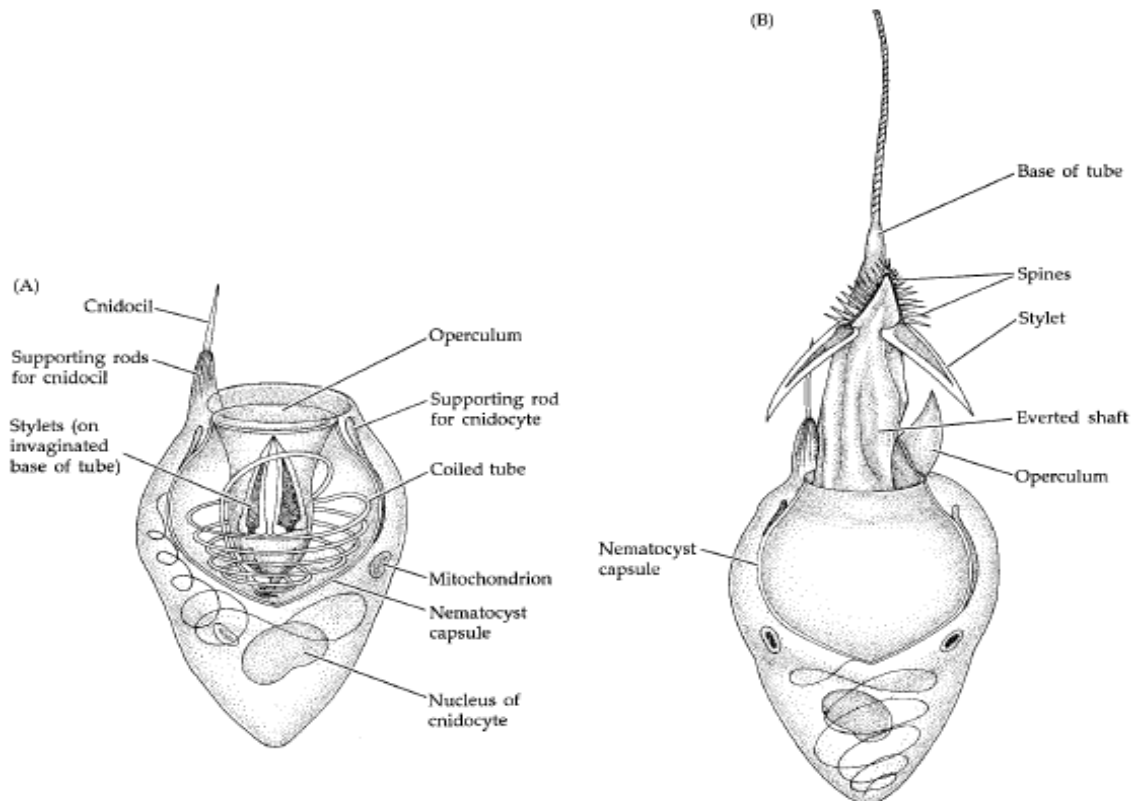


Figura 1. Nematocisto: (A) antes de la descarga y (B) después de la descarga. Tomado de Brusca y Brusca (16).

La reproducción de los cnidarios generalmente es asexual mediante gemación, sobre todo en el caso de los organismos coloniales como mecanismo para aumentar el tamaño de la colonia. Algunas especies se dividen también por fragmentación, produciendo un organismo completo a partir de una porción del cuerpo de otro. También se reproducen sexualmente, este tipo de reproducción presenta variaciones entre las distintas clases comprendidas en el phylum debido a que existen muchas diferencias entre sus ciclos de vida que dependen del predominio de una de las dos formas estructurales básicas.

Se conocen cerca de 11,300 especies de cnidarios, además de un número considerable de fósiles, que de acuerdo con la clasificación del WoRMS (17), se agrupan en cinco clases: Anthozoa, Cubozoa, Hydrozoa, Scyphozoa y Staurozoa.

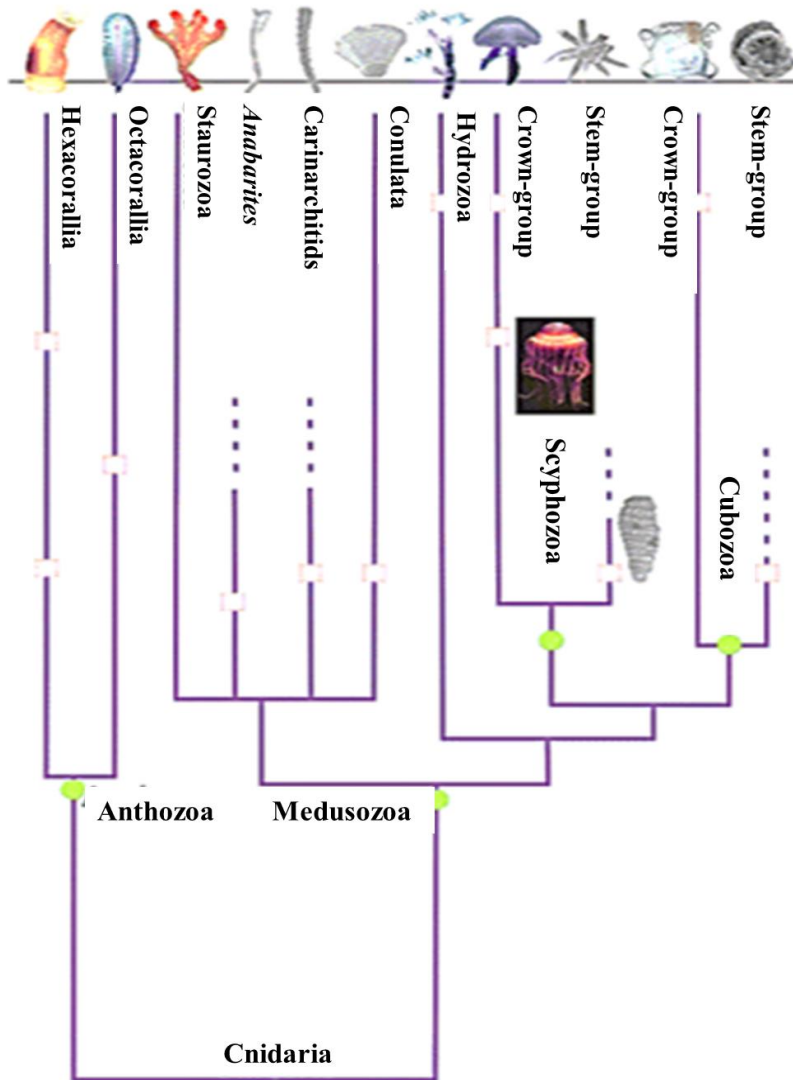


Figura 2. Cladograma simplificado del phylum Cnidaria. Modificado de Han y colaboradores (18).

La clase Anthozoa incluye aproximadamente 7,500 especies, cerca de dos tercios de todas las especies de cnidarios (1). La clase Anthozoa a su vez comprende dos subclases:

- ❖ Hexacorallia: incluye a todos los escleractinios, corales negros y anémonas. Se divide en seis órdenes: Actiniaria, Antipatharia, Ceriantharia, Corallimorpharia, Scleractinia y Zoanthidea. La mayoría tienen simetría hexameral y todos los miembros de esta subclase tienen espirocistos (cnidocito con una cápsula de pared simple y un túbulo compuesto por diminutos hilos entrelazados). Presentan un disco oral con tentáculos huecos con una o varias hileras circulares, que van desde algunos hasta varios cientos, un disco adhesivo o pedal, una columna o tallo del cuerpo y llevan protuberancias, verrugas o papilas adhesivas.

- ❖ Octocorallia: incluye a los corales blandos, gorgonáceos, plumas de mar y coral azul. Se dividen en tres órdenes: Alcyonacea, Helioporacea y Pennatulacea. Esta subclase presenta como principal característica pólipos con ocho tentáculos y cavidad gastrovascular dividida en ocho cámaras separadas por ocho sarcoseptos (13), la presencia de pínulas (extensiones laterales en los tentáculos) también suele tomarse como característica, aunque no se encuentra en todos los casos.

2.1.1. Orden Actinaria

Comprende organismos de cuerpo blando y pólipos solitarios con tentáculos no pinnados que se presentan en el margen o desde el disco. Actualmente se conocen alrededor de 1,200 especies (13). Incluye a las anémonas; generalmente son organismos solitarios o clonales, pero no coloniales. Las anémonas son organismos hermafroditas o dioicos, pero algunas pueden cambiar de sexo durante su ciclo de vida. Las células sexuales son de origen gastrodérmico y hay protandria en las especies hermafroditas; los gametos son lanzados al exterior, y la fertilización y desarrollo es externo, aunque en algunas especies ocurre en la cavidad gástrica, entre los tentáculos o en regiones especiales de la columna. Las larvas plánulas, que miden unos cuantos milímetros nadan desde días hasta meses, seleccionan el sitio de implantación adecuado y se adhieren a él, la plánula se desarrolla y a su vez da origen a una anémona juvenil. La reproducción asexual también es un medio de propagación

importante para muchas especies, incluye la gemación, la fragmentación, la fisión y la laceración pedal (14).

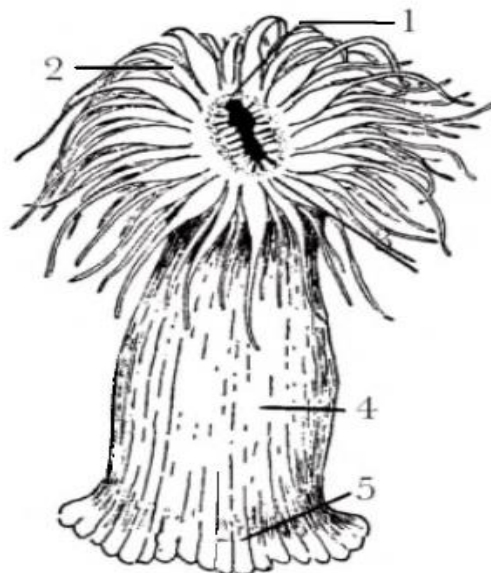


Figura 3. Estructura general de una anémona (subclase Hexacorallia, orden Actinaria): 1. sifonoglifo, 2. disco oral, 3. columna y 4. disco pedal. Tomado de Mille-Pagaza (19).

Las especies de este orden son más abundantes y diversas en las aguas tropicales. La mayoría se distribuyen en la zona intermareal, hay una gran proporción de especies en los arrecifes coralinos y algunas son abisales; la mayor diversidad se localiza sobre las costas rocosas, a las que se fijan usando el disco pedal o se introducen en grietas de las rocas (19).

2.1.1.1. *Lebrunia danae*

La anémona *Lebrunia danae* pertenece a la subclase Hexacorallia, familia Aliicidae del orden Actinaria; se distribuye en el Atlántico, desde las islas Bermudas hasta el sur de Brasil. En el Caribe mexicano, *L. danae* se ha reportado en los arrecifes de Puerto Morelos, Cozumel, Punta Cancún, Punta Nizuc, Akumal, Xcalak e Isla Contoy (20), así como en la zona de Alacranes, localizada en el banco arrecifal de Campeche (21).

Se le localiza cerca de arrecifes coralinos, dentro de agujeros y grietas de esqueletos calcáreos de corales y rocas a una profundidad que varía de 2 a 60 m. Esta especie tiene como característica principal dos tipos de tentáculos: primarios y secundarios.

Los primarios son típicos de la mayoría de las anémonas, mientras que los secundarios son distintivos de esta especie (22). El diámetro en especímenes adultos puede alcanzar los 30 cm. *Lebrunia danae* es uno de los hexacorales más ponzoñosos, por lo que se debe tener precaución ya que puede ser altamente irritante para los humanos (20, 23, 24).

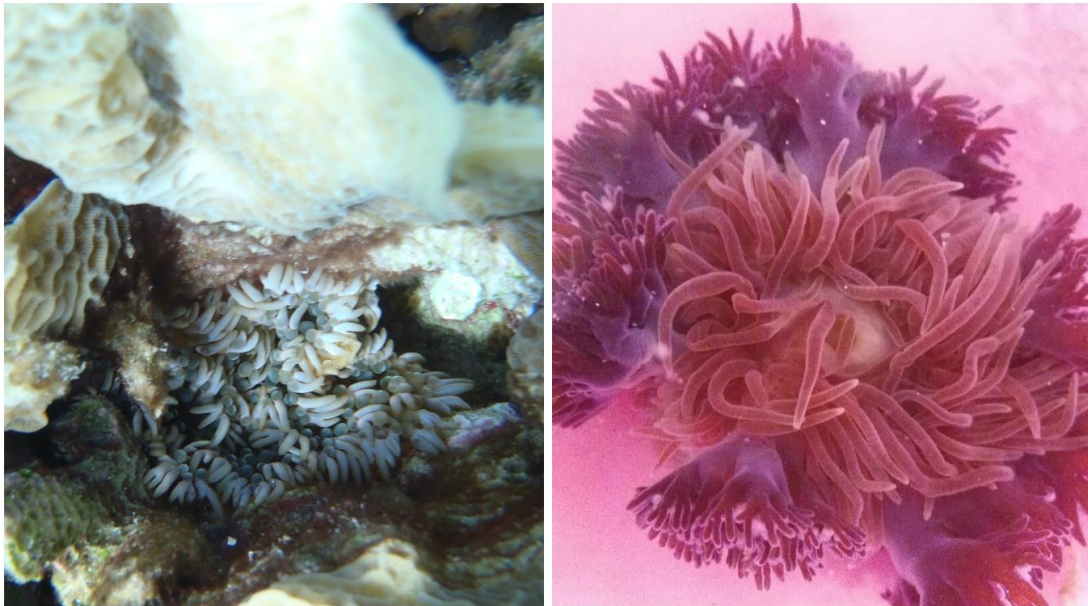


Figura 4. Anémona *Lebrunia danae*.

En cuanto a la ecología de esta especie, Briones-Fourzán y colaboradores (25) reportan que la densidad de distribución y el tamaño no se ven afectados por el cambio de estaciones en el arrecife de coral de Puerto Morelos, por lo que se les puede encontrar en proporciones similares durante todo el año, de esto se sugiere que los organismos se aclimatan rápidamente a los cambios estacionales. *L. danae* se encuentra en grietas sobre sustrato duro y raramente se observa a profundidades menores a 5 m (26-28).

En cuanto a su ciclo de vida, no se tienen datos certeros documentados sobre su estrategia reproductiva, no así de su congénere *L. coralligens*, que libera larvas que son fototróficamente negativas, su comportamiento es de agregación frecuentemente en la base, donde se encuentran asentados los adultos, su asentamiento y metamorfosis ocurre cerca de 24 h (29).

2.1.1.1.1. Clasificación taxonómica

Reino: Animalia

Phylum: Cnidaria

Clase: Anthozoa

Subclase: Hexacorallia

Orden: Actinaria

Familia: Aliciidae

Género: Lebrunia

Especie: *Lebrunia danae* (Duchassaing y Michelotti, 1860)

2.2. Phylum Cnidaria como fuente de toxinas

El phylum Cnidaria comprende un amplio grupo de animales integrado por medusas, anémonas, hidroides y corales, cuyo rasgo principal es la presencia de células urticantes (cnidocitos) útiles para ataque y defensa del organismo; estas células están equipadas con pequeños orgánulos conocidos como nematocistos donde se alojan diversas toxinas y se encuentran distribuidos tanto en los tentáculos como en el cuerpo (30). Los nematocistos contienen pequeños filamentos que son fuertemente expulsados en conjunto con el veneno cuando son mecánica o químicamente estimulados (31, 32). Estas estructuras contienen diversas toxinas incluyendo enzimas que incluyen proteínas lipolíticas y proteolíticas, polipéptidos que interactúan con canales dependientes de voltaje y citolisinas que actúan en la membrana celular (33). El papel biológico de las toxinas liberadas por los nematocistos incluye la captura y muerte de la presa, digestión, repeler depredadores, la competición intraespacial entre especies, proveer protección (ante depredadores) a organismos como crustáceos y peces que han adquirido inmunidad ante sus toxinas (25, 34).

Uno de los mecanismos de acción más importante utilizados por las neurotoxinas marinas, es el bloqueo o modificación de las células de comunicación, principalmente a través de la sinapsis de células excitables. La interacción de las neurotoxinas con canales iónicos y receptores puede modificar funciones neuronales y musculares, bloqueando la sinapsis, por lo que ocurre una rápida parálisis de la presa o depredador, lo cual es muy importantes para organismos sésiles o de poco movimiento, como en el caso de la anémona *Lebrunia danae*.

La mayoría de las toxinas producidas por cnidarios son mezclas complejas de polipéptidos y enzimas de diferente peso molecular. Estos compuestos tienen importancia médica y presentan una o más de las siguientes actividades biológicas: producen lesiones en la piel que pueden llegar a ser severas (Figura 5), efecto miotóxico sobre corazón, vascularización pulmonaria o vascularización sistémica, efectos dermatonecróticos, efectos hemolítico y neurotóxico *in vitro*, entre otras. Todas estas actividades están asociadas a problemas alérgicos y en algunos casos hasta la muerte en humanos (35).



Figura 5. Lesiones dérmicas producidas por: a) anémona y b) medusa. Modificado de Abellaneda y colaboradores, y Bergillos-Gasion y Rivas-Fernández (36, 37).

Las toxinas de cnidarios presentan actividad antitumoral, antiparasitaria (38), estimulación cardíaca, propiedades dermatonecróticas, actividad como antihistamínicos (39), etc., que los convierte en un recurso marino natural de compuestos con propiedades terapéuticas útiles para la creación de nuevos fármacos con posibles aplicaciones contra enfermedades neurológicas, hemolíticas, infectobiológicas, oncológicas, autoinmunes y otras (40, 41).

2.2.1. Citolisinas

La estructura fundamental de todas las membranas celulares son los fosfolípidos: moléculas anfipáticas, que consisten en dos cadenas de ácidos grasos hidrófobos ligadas a un grupo de cabeza hidrófilo (glicerol o esfingosina) que contiene fosfato. Los lípidos constituyen aproximadamente el 50% de la masa de la mayoría de las membranas celulares, aunque esta proporción varía dependiendo del tipo de membrana. Las membranas plasmáticas son aproximadamente un 50% de lípidos y 50% de proteínas. La composición lipídica de las diferentes membranas celulares varía; por ejemplo, la membrana plasmática de *Escherichia coli* contiene predominantemente fosfatidietanolamina constituyendo el 80% de los lípidos. Las membranas plasmáticas de los mamíferos son más complejas, conteniendo cuatro fosfolípidos principales: fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y esfingomielina (Figura 6), que juntos constituyen entre el 50–60% del total de lípidos de membrana. Además de los fosfolípidos, la membrana plasmática de las células animales contiene glucolípidos y colesterol, que corresponden aproximadamente al 40% de los lípidos totales (42).

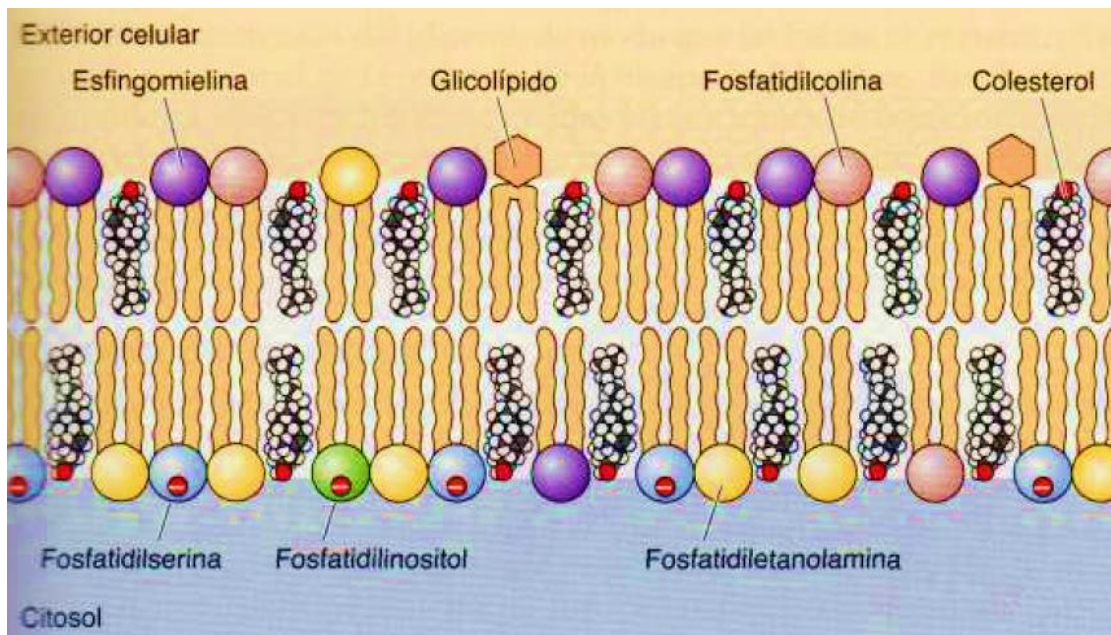


Figura 6. Componentes lipídicos de la membrana plasmática. La capa externa está constituida predominantemente por fosfatidilcolina, esfingomielina y glicolípidos, mientras que la capa interna contiene fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol. El colesterol se distribuye en ambas capas. Tomado de Cooper (42).

Los organismos pertenecientes al phylum Cnidaria producen una variedad de péptidos y proteínas que pueden actuar como citolisinas o neurotoxinas. En las últimas tres décadas se han reportado más de 32 especies de anémonas que contienen proteínas o péptidos citolíticos. Las citolisinas son proteínas y péptidos que pueden lisar las células mediante la formación de poros o incrementando la permeabilidad celular al actuar sobre la membrana plasmática (43). Los descubrimientos sobre las citolisinas de anémonas han tenido avances importantes en la caracterización y purificación de diversas toxinas, que se han clasificado en cuatro grupos de polipéptidos citolíticos basados en su peso molecular: a) 5–8 kDa con actividad antihistamínica, capaces de formar poros en membranas que contienen fosfatidilcolina, b) *cca.* 20 kDa, comúnmente llamadas actinoporinas debido a su capacidad para unirse a los fosfolípidos de membrana del organismo huésped, oligomerizarse y formar poros catión-selectivos, inhibidas por esfingomielina, c) *cca.* 30–40 kDa, citolisinas con o sin actividad de fosfolipasa A₂ y d) grupo supuesto de proteínas representadas únicamente por la metridiolisina de *Metridium senile* de 80 kDa, una citolisina activada por tiol e inhibida por colesterol o fosfatasas (33, 40, 44).

Ha sido reportada la estructura tridimensional obtenida mediante cristalografía de rayos X de las actinoporinas equinatoxina II, sticolisina II y fragaceatoxina C (EqII, StnII y FraC) producidas respectivamente por *Actinia equina*, *Stichodactyla helianthus* y *Actinia fragaceae*. Las actinoporinas se componen de un β -sándwich rodeado por dos α -hélices, en el que la hélice anfipática N-terminal se separa del núcleo de la proteína y se inserta en la membrana, este paso de inserción en la membrana es dependiente de los lípidos, con preferencia por membranas enriquecidas en esfingomielina y/o que presentan membrana lipídica de fase separada. La inserción de la hélice N-terminal en la membrana es seguida de la oligomerización y formación del poro, sin un estado intermediario previo al poro. En la Figura 7 se puede observar un ejemplo de formación de poro por acción de la actinoporina FraC. La estequiometría de los poros formados varía de los tetrámeros (propuestos para EqII y StnII) a nonámeros (propuestos para FraC) (45).

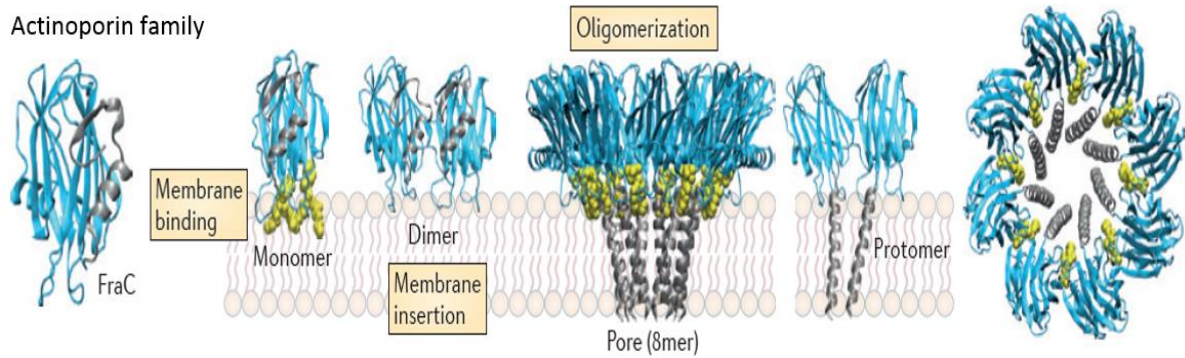


Figura 7. Estructura y mecanismo de formación de poro de la fragaceatoxina C (FraC). Se muestra el modelo de un protómero aislado para resaltar el evento de inserción de membrana, que sustenta la transición de la toxina formadora de poro de un estado soluble a una conformación transmembrana. La estructura que se inserta en la membrana se destaca en gris. Se observa la forma monomérica unida a lípidos de FraC (lípidos destacados en amarillo), seguido de un intermediario dimérico. Los monómeros se unen a la membrana en un paso que precede a la formación del poro octamérico maduro, que se observa intercalado con residuos de esfingomielina (amarillo). Una vez unido a la membrana, la formación del poro se basa en la liberación del dominio α -hélice del monómero, seguido de la inserción de dicho dominio dentro de la membrana. Tomado de Del Peraro y van der Goot (45).

También se han reportado citolisinas pertenecientes a la familia MACPF (por sus siglas en inglés membrane-attack complex/perforin), capaces de formar poros de más de 20 nm en la membrana blanco, lo que lleva a la lisis y muerte celular. Pertenecen a este grupo de citolisinas las toxinas PsTX-60A, PsTX-60B de *Phyllodiscus semoni* y AvTX-60A de *Actineria villosa* (44).

Las fosfolipasas A_2 (PLA $_2$) catalizan la hidrólisis de las uniones 2-acil éster de los 3-sn-fosfolípidos produciendo ácidos grasos y lisofosfolípidos. Estas enzimas han sido asociadas con la toxicidad de varios grupos de animales, como serpientes, arácnidos, moluscos, cnidarios, esponjas, etc. Al producirse la hidrólisis, los productos son incapaces de formar bicapas lipídicas debido a cambios en la conformación de membrana, lo que finalmente bloquea la liberación de neurotransmisores. Las PLA $_2$ pueden ser consideradas neurotoxinas presinápticas, al bloquear los nervios terminales por unión a las membranas nerviosas al hidrolizar los lípidos de membrana. La familia de las PLA $_2$ secretoras comprende proteínas de bajo peso molecular (13–15 kDa) unidas por puentes disulfuro y cuya actividad enzimática depende del ion Ca^{2+} . Existen también PLA $_2$ citolíticas Ca^{2+} dependientes y PLA $_2$ Ca^{2+} independientes. En base a la estructura molecular, las PLA $_2$ son clasificadas en grupos numerados del I al XIV y en numerosos subgrupos. Otros tipos de fosfolipasas incluyen a la fosfolipasa A $_1$, B, C y D (44).

2.2.2. Actividad farmacológica de las citolisinas

Las propiedades farmacológicas de los extractos obtenidos a partir de organismos marinos se comenzaron a estudiar a mediados de 1960 (44). Actualmente se ha descrito gran variedad de compuestos bioactivos provenientes de organismos marinos; en el caso de los cnidarios, solo durante la primera década del siglo XXI fueron descritas cerca de 2,000 nuevas moléculas (1), lo que convierte a los cnidarios en importantes sujetos de investigación en la búsqueda de nuevos y mejores fármacos.

Shapiro (46) estudió el extracto crudo de la anémona *Condylactis gigantea*. Pruebas en langostinos de río *Orconectes virilis* resultaron en parálisis. La purificación parcial del extracto mostró la presencia de un componente tóxico con un peso molecular de entre 10 y 15 kDa con un valor de LD₅₀ (la dosis letal necesaria para matar al 50% de la población) de 1 µg/kg en *O. virilis*.

Carli y colaboradores (47) realizaron ensayos de citotoxicidad en células de pulmón de hámster chino V79 con el extracto crudo obtenido a partir de las medusas *Rhizostoma pulmo*, *Aequorea aequorea* y de la anémona *Anemonia sulcata*. Se evaluó la viabilidad celular y la eficiencia de formación de colonias, los resultados mostraron evidentes efectos de citotoxicidad causados por toxinas de acción rápida en *R. pulmo* y *A. sulcata* que matan rápidamente a las células, y toxinas de acción lenta en *A. aequorea* que afectan de manera importante el crecimiento celular.

Marino y colaboradores (48) evaluaron el extracto crudo de la anémona *Aiptasia mutabilis* en células renales de mono Vero y en células epiteliales humanas HEP-2. Los resultados más relevantes fueron los correspondientes al extracto diluido a una concentración de 0.17 mg/mL de proteína, que indujo la necrosis casi completa de un cultivo de células Vero tras 1 h de exposición; el efecto observado en células HEP-2 tuvo un comportamiento similar con necrosis aproximada de 75%, indicativo de que la línea celular HEP-2 es ligeramente menos sensible al extracto de *A. mutabilis*. La naturaleza del efecto parece ser necrótica y mediante el ensayo de naranja de acridina no se encontró evidencia de toxicidad inducida por apoptosis.

La muerte celular puede ser inducida por citolisinas capaces de formar poros en las membranas celulares, esta propiedad puede ser usada para facilitar la entrada al citosol de fármacos antitumorales y aumentar su eficacia. Soletti y colaboradores (12) estudiaron las

citolisinas de dos anémonas, la toxina Bc2 (*Bunodosoma caissarum*) y EqTx-II (*Actinia equina*), que fueron probadas en concentraciones no tóxicas en las líneas celulares de glioblastoma humano U87 y A172, en conjunto con bajas dosis de tres agentes quimioterapéuticos convencionales: citosina arabinosa (Ara-C), doxorubicina y vincristina. La combinación con doxorubicina disminuyó el IC₃₀ en 9.6 veces con cada una de las toxinas. La cantidad de Ara-C necesaria para causar el IC₃₀ disminuyó 14 y 17 veces al combinarse con Bc2 y EqTx-II respectivamente. El efecto observado en el caso de la vincristina fue más llamativo, con una disminución de 150 y 300 veces al combinarla con Bc2 y EqTx-II respectivamente.

La actividad citotóxica de las anémonas *Stichodactyla mertensii* y *Stichodactyla haddoni* fue evaluada por Veeruraj y colaboradores (49) usando diversos ensayos: toxicidad en cangrejo *Ocypode macrocera*: se observó que la inyección de 1 mg/mL de extracto crudo provocó la muerte de los organismos en alrededor de 30 s, la LD₅₀ fue de 0.47 y 0.71 mg/kg de proteína de *S. mertensii* y *S. haddoni* respectivamente; bioensayo con nauplios de *Artemia salina*, con valores de LD₅₀ de 0.65 y 0.90 mg/mL de extracto crudo de *S. mertensii* y *S. haddoni* respectivamente.

La actinoporina RTX-A de *Heteractis crispa* presentó potente actividad citotóxica (IC₅₀ de 1–5 nM) sobre líneas celulares de cáncer humano (JB6 P⁺ Cl41, HL-60, MDA-MB-231, HeLa, THP-1 y SNU-C4); RTX-A induce apoptosis de manera dosis-dependiente, esto mediante un mecanismo independiente a la vía p53. Se encontró que también previene la transformación maligna de células JB6 P⁺ Cl41 con una concentración 17 veces menor que la que induce citotoxicidad (50).

Monroy-Estrada y colaboradores (51) reportaron actividad citotóxica del extracto crudo y fracciones obtenidos de la anémona *Bunodeopsis globulifera* y su efecto sinérgico al combinarse con cisplatino, fármaco antineoplásico usado en el tratamiento de diversos tipos de tumores sólidos, incluidos el de pulmón, cabeza, cuello, ovario, mama, colorrectal y cervical, cuyo uso en el tratamiento del cáncer se encuentra limitado por la resistencia que se genera y sus efectos adversos. Líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón fueron cultivadas y expuestas a tratamientos con el extracto crudo de *B. globulifera*, fracción 1 y 2 (obtenidas por cromatografía de filtración en gel Sephadex G-50 M equilibrado y eluido con ácido acético 0.3 M a velocidad de flujo de 2 mL/min), y cisplatino. La viabilidad celular

fue medida por el método de MTT, y la citotoxicidad fue medida usando el ensayo de lactato deshidrogenasa como indicador de pérdida de integridad de la membrana celular. Se encontró que el extracto crudo, fracciones y el cisplatino tienen efectos importantes en la disminución de viabilidad de las células de adenocarcinoma de pulmón por sí solos, mientras que con el pretratamiento con extracto crudo y fracciones, y al agregar posteriormente cisplatino, la viabilidad celular disminuye de manera significativa, lo que sugiere que su combinación produce un efecto sinérgico; esto podría representar el uso de concentraciones menores de cisplatino y la disminución en la presencia de efectos adversos.

Con estos y nuevos trabajos se espera contribuir al estudio de la citotoxicidad potencial de las toxinas de cnidarios principalmente contra células de cáncer.

2.3. Estudios previos de la especie *Lebrunia danae*

Sánchez-Rodríguez y Cruz-Vázquez (9) reportaron la obtención, purificación y caracterización del extracto crudo de *L. danae* usando diversos ensayos: el ensayo de citotoxicidad en *Artemia salina*, en el que reportan una LD₅₀ de 2.82 mg/mL para el EC; ensayo de toxicidad en *O. quadrata*, que resultó en la muerte inmediata de los especímenes al inyectar el EC a concentración de 10 mg/mL; ensayo de actividad hemolítica, en el que fueron usados 0.238 mg de EC, obteniendo 39.5, 49.6 y 50.1% de hemólisis en eritrocitos de bovino, oveja y cerdo respectivamente. El EC fue eluido a través de una columna Sephadex G-50 M, obteniendo dos fracciones que presentaron actividad en cangrejos *O. quadrata* (fracción 3 y fracción 12); estas fueron pasadas por una columna QAE Sephadex A-25 y finalmente purificadas mediante CLAR (fase reversa, C4). Usando electroforesis con gel de poliacrilamida, se obtuvieron los pesos moleculares de las fracciones LdNt1 y LdNt2 obtenidas por CLAR, con pesos moleculares de 62.5 y 58 kDa respectivamente.

Morales-Landa y colaboradores (52) realizaron pruebas del extracto crudo obtenido a partir de *L. danae* en ensayos de actividad antibacteriana con distintas especies de bacterias Gram positivas y Gram negativas, antimicótica en *Candida albicans*, antiparasitaria en *Giardia lamblia* y tóxica en peces de la especie *Oreochromis niloticus*. No encontraron actividad antibacteriana o antimicótica para la concentración de 0.01 mg/mL de EC, ni actividad tóxica en *O. niloticus*; sin embargo, la actividad antiparasitaria fue de 631 µg/mL reportada como IC₅₀ en *G. lamblia*.

Cruz-Vázquez (53) realizó diversas pruebas con el extracto crudo de *L. danae*, que fue fraccionado en columna usando gel Sephadex G-50 M, resultando en la obtención de cuatro fracciones, dos de ellas con actividad en cangrejos *O. quadrata*: F3 y F4. Se realizaron pruebas más específicas para evaluar el efecto neurotóxico del extracto crudo y fracciones, su termolabilidad y el peso molecular de las proteínas:

- ❖ Ensayo de inhibición de la acetilcolinesterasa (anti-AChE), con el objetivo de buscar la presencia de agentes anticolinesterásicos, que generalmente son potentes neurotoxinas. Con el EC se obtuvo 27% de actividad inhibitoria de AChE, mientras que con F3 y F4, a concentración de 4 y 6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ se obtuvieron 73% y 16% de actividad inhibitoria respectivamente. F3 fue fraccionada nuevamente utilizando un gel de intercambio iónico (QAE Sephadex A-25), del que se obtuvieron cinco fracciones: QAE-I a QAE-V; la mayor actividad anti-AChE (30%) fue obtenida con QAE-IV.
- ❖ Se realizaron pruebas del EC y fracciones con ovocitos de *Xenopus laevis* sobre las corrientes generadas por los neurotransmisores acetilcolina, serotonina, GABA, ácido glutámico-glicina y de forma similar para corrientes de K^+ y Na^+ , cuyos resultados no fueron relevantes, no así en el caso de las corrientes T_{out} , que se generan por la activación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, cuyo influjo promueve la apertura de canales de Cl^- . F3 y QAE-IV presentaron actividad sobre esta corriente; QAE-IV fue la más activa al bloquearla completamente a una concentración de 16 μg de proteína/ μL .
- ❖ F3 y QAE-IV fueron tratadas a 100 °C por 20 min para evaluar la posible pérdida de actividad; al probar nuevamente sobre corrientes de T_{out} se obtuvo el mismo o mayor efecto inhibitorio.
- ❖ Usando la técnica de electroforesis con gel de poliacrilamida se encontraron los siguientes pesos moleculares para las proteínas contenidas en cada caso: para el EC de 10 a 100 kDa, en la F3 de 10 a 75 kDa, en QAE-IV de 20 a 50 kDa. Las bandas de mayor concentración de proteína correspondieron a 20 y 50 kDa.

2.4. Cáncer

El cáncer se debe a la alteración de los mecanismos reguladores que dirigen el comportamiento de las células normales; el principal cambio que causa el desarrollo de un cáncer es la proliferación continua e incontrolada de las células. Las células cancerosas crecen y se dividen de manera incontrolada, pueden invadir los tejidos y los órganos sanos, y llegar a diseminarse finalmente por todo el cuerpo. El descontrol que muestran las células cancerosas es el resultado neto de la acumulación de alteraciones en múltiples sistemas reguladores de la célula. Se puede producir por la proliferación anormal de cualquiera de los diferentes tipos de células del cuerpo, por lo que hay más de cien tipos distintos de cáncer que difieren en su comportamiento y respuesta al tratamiento.

A nivel celular, el desarrollo del cáncer es considerado un proceso multietapa constituido por la mutación y selección de células con una capacidad cada vez mayor de proliferación, supervivencia, invasión y metástasis (Figura 8). Se considera que el tumor inicia debido a una alteración genética que provoca la proliferación anormal de una única célula, esto da lugar a una población clonal de células tumorales, la progresión del tumor ocurre al suceder mutaciones adicionales en estas células. Este proceso se denomina selección clonal, donde un nuevo clon de células tumorales ha evolucionado en función de propiedades que les confieren ventaja selectiva (supervivencia, invasión o metástasis). La selección clonal continua durante el desarrollo del tumor por lo que este crece más deprisa y aumenta su carácter maligno. Las células cancerosas continúan proliferando y se propagan a otros tejidos, invaden vasos sanguíneos y linfáticos lo que les permite formar metástasis por todo el cuerpo (42).

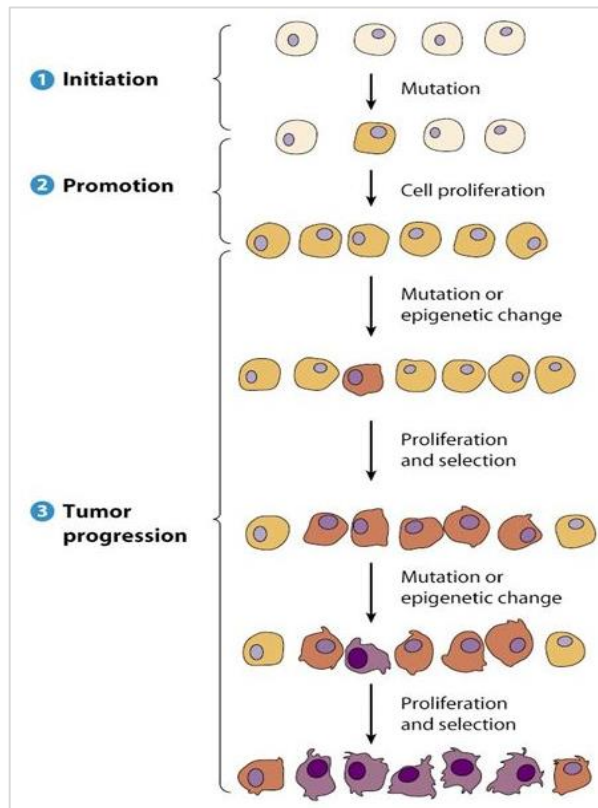


Figura 8. Desarrollo del cáncer, proceso multinivel. Modificado de Fitzpatrick (54).

2.4.1. Causas

Resulta difícil saber exactamente por qué algunas personas padecen cáncer y otras no; sin embargo, existen diversos factores de riesgo que pueden predisponer a una persona a padecer algún tipo de cáncer (factores genéticos, ambientales o la combinación de ambos).

Los factores de riesgo ambientales y conductas manifestadas en el estilo de vida diario que incrementan el riesgo de padecer cáncer son fumar, ciertos factores reproductivos femeninos, exposición a químicos, zonas industriales (55), radiación ionizante, alcohol, factores dietéticos, obesidad, inactividad física, el uso de ciertas terapias hormonales para el tratamiento de la postmenopausia, entre otros (56).

Los factores genéticos que aumentan el riesgo de padecer cáncer pueden ser heredados o pueden presentarse a lo largo de la vida como resultado de errores que ocurren durante la división celular o por exposición a sustancias que dañan el ADN. Las mutaciones genéticas heredadas tienen una función principal en 5 a 10% de todos los cánceres. Se ha identificado una relación entre genes específicos y más de 50 síndromes hereditarios de cáncer, que son enfermedades que pueden predisponer a las personas a padecer cáncer (57).

2.4.2. Estadísticas del cáncer

Para el año 2012, GLOBOCAN reportó 14.1 millones de nuevos casos de cáncer a nivel mundial y 8.2 millones de muertes, siendo el cáncer de pulmón el más común y la causa de más muertes debido a la fatalidad de los casos, mientras que el cáncer de mama es el segundo más frecuente (58). Aunque hay muchos tipos de cáncer, solo son mayoritarios unos pocos, en la Tabla 1 se muestran los casos de cáncer a nivel mundial más comunes, los siete primeros representan el 58.4% del total.

Tabla 1. Estimado global de nuevos casos de cáncer y sus proporciones a nivel mundial. Modificado de Ferlay y colaboradores (58).

Tipo de Cáncer	Casos (x10³)	Porcentaje
Pulmón	1825	12.9
Mama	1677	11.9
Colorrectal	1360	9.7
Próstata	1112	7.9
Estómago	951	6.8
Hígado	782	5.6
Cervicouterino	528	3.7
Otros	5855	41.6

Para 2013, en México el cáncer fue la tercera causa de muerte, con el 12.8% de todos los casos, precedido únicamente por enfermedades cardíacas (24.3%) y diabetes (14.3%). Los tipos de cáncer con los números absolutos más altos de muertes entre 2000 y 2013 se muestran en la Tabla 2; las muertes causadas por estos seis tipos de cáncer suman el 45% de todas las muertes debidas a cáncer. En hombres, el cáncer de próstata, hígado y estómago presentan las tasas de mortalidad más elevadas, mientras que, en mujeres, el cáncer de mama, cervicouterino y de estómago presentan las mayores tasas de mortalidad. En la población menor de 20 años, las principales causas de muerte por enfermedad neoplásica son la leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, tumores cerebrales malignos, tumores de cartílago, huesos y articulaciones (59).

Se estima que la tasa de mortalidad debida a cáncer en México para 2020 será de 79 por cada 100,000 habitantes (59).

Tabla 2. Tipos de cáncer con el mayor número absoluto de muertes causadas entre 2000 y 2013 en México. Modificado de Mohar-Betancourt y colaboradores (59).

Tipo de cáncer	Muertes promedio por año
Pulmón	6678
Estómago	5339
Hígado	4931
Próstata	4859
Mama	4496
Cervicouterino	4181

Las estadísticas individuales, en orden de importancia para el cáncer de pulmón, mama, leucemia, y cáncer de cerebro y sistema nervioso central son descritas brevemente debido a la relevancia en este proyecto:

- ❖ **Cáncer de pulmón:** Para el año de 2012 se estimaron 1.8 millones de casos nuevos en todo el mundo (12.9% del total), y 58% de los casos se registraron en las regiones menos desarrolladas. Es el tipo de cáncer con mayor incidencia en hombres a nivel mundial; la incidencia en mujeres es generalmente menor. Las mayores tasas de incidencia en hombres se localizan en el centro y este de Europa (53 por cada 100,000 habitantes), y este de Asia (50.4 por cada 100,000 habitantes); las menores tasas de incidencia se encuentran en el centro y oeste de África (2 y 1.7 por cada 100,000 habitantes, respectivamente). En el caso de las mujeres las tasas de incidencia más altas se localizan en Norte América (33.8 por cada 100,000 habitantes) y en el Norte de Europa (23.7 por cada 100,000 habitantes), mientras que las tasas más bajas se encuentran en el centro y oeste de África (1.1 y 0.8 por cada 100,000 habitantes respectivamente). En América Central la incidencia es de 10.1 y 4.9 por cada 100,000 habitantes en hombres y mujeres respectivamente. Las tasas de mortalidad en América Central son de 9 y 4.3 por cada 100,000 habitantes en hombres y mujeres respectivamente. Debido a la alta fatalidad asociada con esta enfermedad, los patrones geográficos de mortalidad son muy similares a los de incidencia (58).

- ❖ **Cáncer de mama:** Es el segundo tipo de cáncer más común en el mundo, con un estimado de 1.67 millones de nuevos casos al año 2012 (11.9% del total). Una ligera

mayoría de los casos se presenta en mujeres en regiones menos desarrolladas. Las tasas de incidencia varían desde 27 casos por 100,000 habitantes en el centro de África y este de Asia, a 96 en el oeste de Europa. Es el tipo de cáncer más común entre las mujeres; sin embargo, también se presenta en hombres con una incidencia menor al 1% del total de los casos. El cáncer de mama ocupa a nivel mundial el quinto lugar como el causante de más muertes y es la causa más frecuente de muertes debidas a cáncer en regiones poco desarrolladas y la segunda causa de muerte en regiones más desarrolladas. El rango de las tasas de mortalidad entre las diferentes regiones del mundo es menor que la incidencia debido a la sobrevivencia favorable, principalmente en regiones desarrolladas, que son aquellas con mayor incidencia. La tasa de incidencia del cáncer de mama a nivel mundial es de 43 casos por cada 100,000 personas, mientras que en América Central la tasa de incidencia es de 32.8 por cada 100,000 La tasa de mortalidad en América Central es de 9.5 por cada 100,000 habitantes (58).

- ❖ Leucemia: La leucemia fue en 2012 la causa de 3.2% de todas las muertes a nivel mundial, mientras que 2.5% de todos los casos de cáncer fueron debido a leucemia. Las menores tasas de incidencia se localizan en el centro y oeste de África (menos de 3 y menos de 2 por cada 100,000 habitantes en hombres y mujeres respectivamente) y las tasas más altas se localizan en Norte América y Australia/Nueva Zelanda (más de 10 y 7 casos por cada 100,000 habitantes en hombres y mujeres respectivamente). En América Central la incidencia es de 5.8 y 4.9 por cada 100,000 habitantes en hombres y mujeres respectivamente. Las tasas de mortalidad son menos variables que las de incidencia, con mayor sobrevivencia en regiones más desarrolladas; las tasas de mortalidad oscilan entre 1.3 y 6.3 por cada 100,000 habitantes en hombres, y 1.1 y 3.8 por cada 100,000 habitantes en mujeres. La tasa de mortalidad en América Central es de 4.2 y 3.5 por cada 100,000 habitantes en hombres y mujeres respectivamente (58).
- ❖ Cáncer de cerebro y del sistema nervioso central: Este tipo de cáncer representa el 1.8% de todos los casos nuevos de cáncer y el 2.3% de las muertes por cáncer. Las tasas más altas de incidencia y mortalidad se presentan en las regiones más

desarrolladas (Australia/Nueva Zelanda, Europa y Norte América), mientras que las más bajas se localizan en África y el Pacífico. La incidencia en América Central es de 4.5 y 3.4 por cada 100,000 habitantes en hombres y mujeres respectivamente, mientras que la tasa de mortalidad es de 2.5 y 1.9 por cada 100,000 habitantes en hombres y mujeres respectivamente. La diferencia en los patrones de incidencia y mortalidad en todo el mundo puede deberse en parte a variaciones en la disponibilidad de instalaciones de diagnóstico o debido a la inexactitud en la asignación de la causa subyacente de la muerte (58).

3. JUSTIFICACIÓN

El medio ambiente marino presenta una gran diversidad de organismos, de los cuales muchos producen toxinas cuyas propiedades pueden ser exploradas y utilizadas en áreas como la farmacología y la medicina. En el caso de la anémona *Lebrunia danae*, sus principios activos representan una fuente potencial de moléculas con actividad citotóxica y para el posible tratamiento de varias enfermedades.

Debido al incremento de los casos de cáncer en los últimos años a nivel nacional y mundial, y a la falta de fármacos que tengan una acción específica sobre las células tumorales, es que es necesario buscar compuestos con actividad selectiva. Los organismos marinos han sido una fuente importante de compuestos anticancerígenos potentes con mecanismos de acción novedosos, algunos de los cuales actualmente se encuentran en el mercado como medicamentos; sin embargo, existen pocos con actividad selectiva sobre células tumorales, por lo que es necesaria la búsqueda de compuestos que presenten una alta especificidad para contar con nuevas estrategias terapéuticas.

4. HIPÓTESIS

Los compuestos presentes en la anémona *Lebrunia danae* pueden presentar actividad citolítica sobre células tumorales, y poco o nulo efecto en células normales.

5. OBJETIVO

Aislar, prepurificar y evaluar la actividad biológica del extracto y fracciones obtenidas a partir de la anémona *Lebrunia danae*, que habita en la Laguna Arrecifal de Puerto Morelos.

5.1. Objetivos específicos

Generar el extracto crudo a partir de la anémona *Lebrunia danae*.

Purificar de forma parcial los extractos obtenidos empleando la técnica de cromatografía de líquidos de baja presión.

Evaluar la actividad biológica del extracto crudo y fracciones prepurificadas empleando diferentes bioensayos: evaluación de toxicidad en cangrejos, actividad de hemólisis, actividad de fosfolipasas y actividad de sPLA₂.

Evaluar la actividad citolítica del extracto crudo y fracciones prepurificadas en cultivos celulares tumorales y un cultivo celular normal.

6. METODOLOGÍA

En la Figura 9 se muestra un diagrama que resume la metodología seguida para el desarrollo del presente proyecto de investigación.

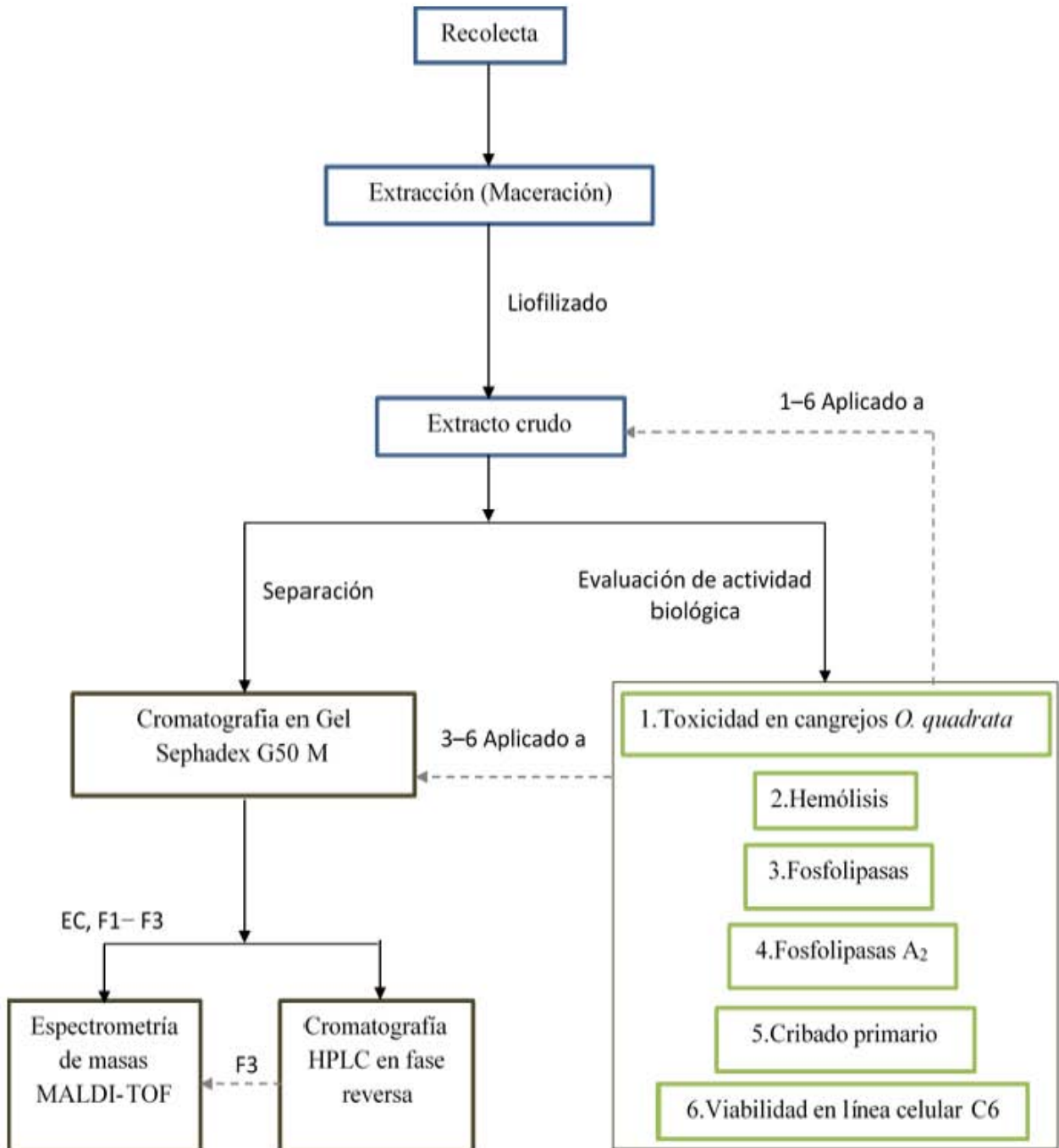


Figura 9. Diagrama resumido de la metodología realizada.

6.1. Área de estudio

La Laguna Arrecifal de Puerto Morelos (situado a $20^{\circ}51'N$, $86^{\circ}53'W$) está ubicada en el área norte de la costa de Quintana Roo (Mar Caribe mexicano). La laguna se ubica desde la línea de costa hasta un arrecife coralino que se extiende ligeramente en diagonal a una distancia de *cca.* 500 a 1,500 m de la costa (Figura 10). El fondo de la laguna arrecifal está compuesto principalmente por arena calcárea estabilizada por amplias praderas de pastos marinos, aunque en algunas partes aflora el pavimento calcáreo (60). La profundidad en la laguna arrecifal es de aproximadamente 1 a 5 m. Se encuentra un arrecife posterior bien desarrollado y cresta, así como una pendiente que desciende gradualmente de 20–25 m en una extensa plataforma de arena (61). La temperatura del agua es típicamente más alta en julio-septiembre ($29.4\text{--}29.5\text{ }^{\circ}C$) y más baja durante enero-marzo ($25.1\text{--}25.8\text{ }^{\circ}C$) (62).

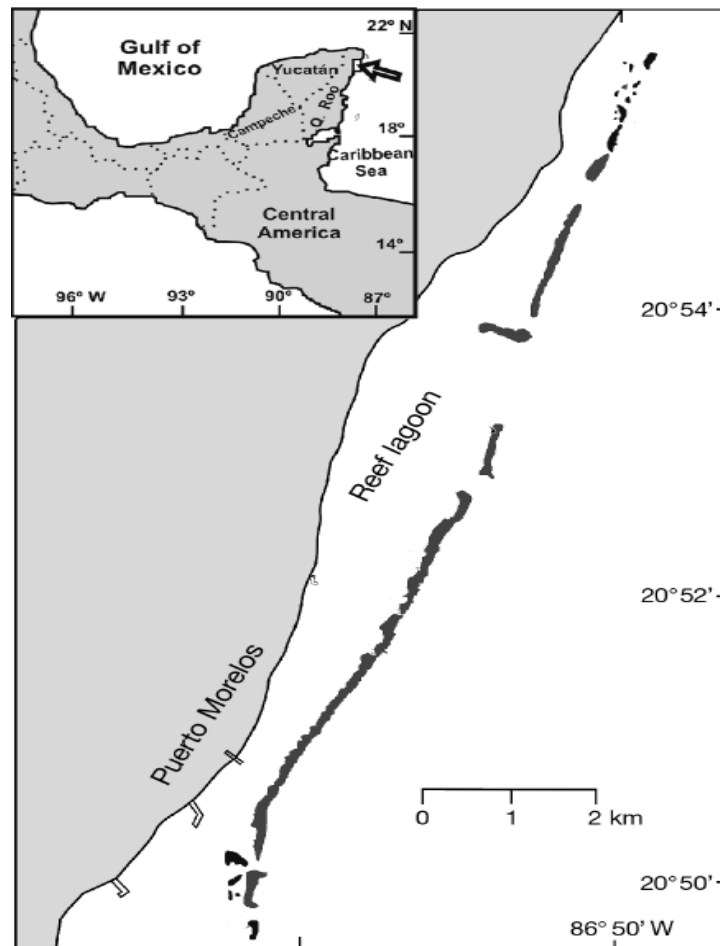


Figura 10. Sistema de arrecife de coral de Puerto Morelos; se observa la localización de Puerto Morelos indicada con una flecha. Modificado de Briones-Fourzán y colaboradores (25).

6.2. Método de recolecta

Las recolectas se realizaron usando lancha con motor fuera de borda. Los ejemplares de la anémona *Lebrunia danae* se recolectaron manualmente mediante buceo SCUBA a una profundidad de aproximadamente 4 m. Los organismos se separaron de rocas o sedimento en donde se encontraron adheridos usando un cincel y un martillo; posteriormente, fueron colocados en bolsas de plástico Ziploc® conteniendo agua de mar y se transportaron al laboratorio de Toxinología de Cnidarios en la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales. Los organismos se pesaron para obtener el peso húmedo, para posteriormente obtener el rendimiento de la extracción.

6.3. Obtención de extracto crudo

Una vez en el laboratorio, los organismos fueron congelados a $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$; la obtención del extracto se realizó de modo manual usando un macerador de tejidos Ten Broeck de 15 m PYREX®; el monitoreo de la descarga de los nematocistos se realizó de manera simultánea al proceso de extracción, observando al microscopio pequeñas alícuotas con la finalidad de identificar los tipos de cnidocitos y estimar la descarga de los nematocistos hasta obtener una descarga de *cca.* 90%. El extracto obtenido fue sometido a ultrasonido durante 5 min usando un sonicador Cole Parmer® tomando precauciones para evitar la desnaturalización de sustancias activas por aumento de la temperatura. Posteriormente, por medio de centrifugación a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a 4,000 rpm durante 30 min se separó el sobrenadante (sustancias activas) del precipitado en una centrífuga Eppendorf® modelo. El sobrenadante y el precipitado fueron almacenados en tubos cónicos para centrífuga de 50 mL y congelados a $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior liofilización en un equipo Freeze Drying modelo 77500 Labconco® a una temperatura de $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ para secar por completo el extracto crudo.

6.4. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método de Bradford (63), empleado para determinar la concentración de proteínas en una solución. Se realizó una curva de calibración usando un estándar de gamma globulina bovina (BGG) de Bio-Rad®; se usó agua desionizada como blanco y colorante de Bradford (Bio-Rad®). El ensayo se realizó en microplaca de 96 pozos colocando 250 μL de colorante de Bradford más 5 μL del estándar,

muestra o blanco. La absorbancia se leyó a 595 nm en un lector de microplaca Stat Fax 4200®.

La determinación de proteínas se llevó a cabo sustituyendo los valores de absorbancia en la ecuación de la recta obtenida a partir de la calibración con BGG.

6.5. Prepurificación mediante cromatografía de líquidos de baja presión

El primer paso de separación y purificación de las toxinas se realizó mediante el uso de cromatografía líquida de baja presión. El extracto liofilizado fue disuelto en agua desionizada y filtrado en red de nylon con luz de malla de 10 µm y posteriormente en filtro de fibra de vidrio de 2.5 µm para evitar la oclusión del gel de separación; la disolución obtenida fue aplicada en una columna con Sephadex G-50 M (Pharmacia Biotech®), equilibrada y eluida con ácido acético 0.3 M, a un flujo de 3 mL/min, con detección a una longitud de onda de 280 nm. Las fracciones obtenidas fueron separadas y se concentraron usando un Rotavapor BUCHI® R-215 a 25 °C; posteriormente fueron liofilizadas a -45 °C.

6.6. Purificación mediante cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa

Las fracciones con actividad biológica se sometieron a un último proceso de purificación mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), se empleó una columna (Hibar®) Purospher® Star C18 de 250 por 4.6 mm y tamaño de partícula de 5 µm, con un gradiente lineal de agua (0.1% TFA)-acetonitrilo (0.1% TFA) del 0–100% de acetonitrilo en 70 min a un flujo de 1 mL/min y detección a 220 nm.

Las muestras fueron enviadas y analizadas en el Departamento de Química de Biomacromoléculas del Instituto de Química, UNAM, en colaboración con el Dr. Fernando Lazcano Pérez y el Dr. Roberto A. Arreguín Espinosa de los Monteros.

6.7. Electroforesis en gel de poliacrilamida

Para evaluar el peso molecular de los componentes de los extractos crudos y de las fracciones prepurificadas se usaron geles de poliacrilamida o SDS-PAGE (del inglés sodium dodecyl

sulphate polyacrylamide gel electrophoresis) al 12% según el método de Laemmli (64). Para realizar el gel de separación se mezclaron agua desionizada, amortiguador de Tris-HCl pH 8.8, SDS al 10%, acrilamida al 30% y para que ocurra la polimerización del gel, persulfato de amonio al 10% y TEMED (Sigma-Aldrich®). El gel de carga se preparó del mismo modo, excepto el amortiguador de Tris-HCl que fue de pH 6.8. Las muestras por cargar se desnaturalizaron en amortiguador de carga (que contiene agua desionizada, Tris-HCl pH 6.8, glicerol, SDS al 10%, 2-mercaptoetanol y azul de bromofenol al 1%) en una dilución 1:3 (muestra/amortiguador de carga) a 90 °C por 4 min. Como marcador de peso molecular se usaron el Precision Plus Protein® Dual Xtra Standards y Precision Plus Protein® Standards Kaleidoscope (BioRad®). Las muestras y estándares fueron cargados en una cámara electroforética con amortiguador de corrida (agua desionizada, SDS, Tris base y glicina) aplicándoles un voltaje de 170 V. Terminado el tiempo de análisis se aplicó tinción de azul de Coomassie al gel con agitación constante durante cerca de 2 h; finalmente, como solución para desteñir los geles, se aplicó una disolución de agua destilada, ácido acético glacial y metanol en relación 6:3:1 respectivamente, para observar los estándares y muestras.

6.8. Análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF

La masa molecular de los péptidos presentes en el EC y en las fracciones se determinó por espectrometría de masas MALDI-TOF. Se disolvieron 100 µg de muestra en 5 µL de una solución saturada de ácido sinapínico; 1 µL de esta mezcla se depositó en una placa para MALDI y se dejó secar a temperatura ambiente. El espectro se registró en modo lineal positivo en un espectrómetro Brucker Microflex® con un láser de nitrógeno a 337 nm y un intervalo de masas de 1,000 a 60,000 Da.

Las muestras fueron enviadas y analizadas en el Laboratorio de Espectrometría de Masas del Instituto de Química, UNAM, en colaboración con el Dr. Fernando Lazcano Pérez y el Dr. Roberto A. Arreguín Espinosa de los Monteros.

6.9. Bioensayos

6.9.1. Preevaluación del extracto crudo

Se realizó una preevaluación de la actividad del extracto crudo utilizando el bioensayo con cangrejos propuesto por Béress y Béress (65), con la finalidad de saber si el extracto presenta actividad neurotóxica y citolítica antes de iniciar la purificación. Los cangrejos de la especie *Ocypode quadrata* fueron recolectados en la zona de la playa cercana a la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales en Puerto Morelos. Para la evaluación se realizó la disolución del extracto crudo en agua desionizada, que fue inyectado en la base del tercer pereiópodo del cangrejo y como control se realizó la inyección de agua desionizada; posteriormente se observó el comportamiento en espera de diversas respuestas: salivación, temblores, parálisis (evidencia de actividad neurotóxica), entre otros. Al diseccionar al organismo se buscó necrosis observada como oscurecimiento y licuefacción de órganos internos (evidencia de actividad citolítica); adicionalmente los cangrejos fueron pesados y se realizó la identificación de su sexo.

6.9.2. Actividad hemolítica

Se determinó mediante el método descrito por Rottini y colaboradores (66) con algunas modificaciones. Se extrajeron cerca de 3 mL de sangre de donante humano sano que fueron colocados en 30 mL de solución Alsever a pH de 7.4; la mezcla fue homogenizada cuidadosamente y centrifugada a 3,000 rpm durante 5 min a 4 °C; el sobrenadante fue eliminado y este lavado se repitió dos veces más; finalmente los eritrocitos fueron resuspendidos en solución Alsever. Se realizó una calibración con eritrocitos al 1.7% estandarizando a dos valores considerados controles; para ello se preparó una mezcla de 50 µL de eritrocitos al 1.7% con 950 µL de solución Alsever o agua desionizada, que corresponden al control de hemólisis negativo y positivo respectivamente; estos fueron incubados a 37 °C por 30 min y después se centrifugaron a 3,000 rpm durante 5 min. El control negativo corresponde a una absorbancia próxima a 0 a una longitud de onda de 415 nm que fue obtenida en un espectrofotómetro Turner® SP-830; esta lectura se consideró como 0% de hemólisis. El control positivo correspondió al 100% de hemólisis cuya lectura de longitud de onda a 415 nm fue cercana a 1. En el caso de las muestras, se mezclaron 50 µL de diluciones a distintas concentraciones (4, 10, 16, 20, 26, 30, 36 y 44 mg/mL de EC) con 900 µL de solución Alsever y 50 µL de eritrocitos al 1.7%; las muestras se

incubaron a 37 °C por 30 min y después fueron centrifugadas a 3,000 rpm durante 5 min; las muestras se leyeron a una longitud de onda de 415 nm. Usando los datos de los controles se realizó el cálculo de la actividad hemolítica; los datos obtenidos fueron graficados y se calculó la unidad hemolítica al 50% (UH₅₀) que se interpretó como la cantidad de proteína que causa el 50% de hemólisis.

6.9.3. Actividad de fosfolipasas

La actividad de fosfolipasas se determinó midiendo el halo de actividad enzimática del extracto crudo y extractos prepurificados de *Lebrunia danae* a diferentes concentraciones en medios de cultivo de agarosa y yema de huevo con modificaciones al método de Habermann y Hardt, y Schumacher y colaboradores (67, 68). El gel se preparó con tres soluciones: Solución A) contiene yema de huevo fresco en NaCl al 0.86%, en una relación 1:3 (yema de huevo/NaCl al 0.86%); Solución B) que contiene 0.3 g de agarosa en 50 mL de solución de Tris-HCl 50 mM a pH de 7.95; y la Solución C) con CaCl₂ en agua desionizada (10 mM). Se mezclaron volúmenes de 0.5 mL de A, 50 mL de B y 0.5 mL de C, y se colocaron aproximadamente 15 mL de la mezcla en cada caja de Petri, y se dejaron gelificar por alrededor de 3 h. Se hicieron pozos en el gel de aproximadamente 5 mm de diámetro para colocar 20 µL de las muestras, control negativo (agua desionizada) y control positivo (veneno de abeja). Las cajas fueron incubadas a 37 °C. La actividad de fosfolipasas fue monitoreada como el crecimiento de halos que se forman alrededor de los pozos. La actividad enzimática (índice Pz) se obtuvo al dividir el diámetro del pozo entre el diámetro del halo de acuerdo a la metodología descrita por Price y colaboradores (69).

6.9.4. Actividad de fosfolipasa A₂ secretora

La actividad de fosfolipasa A₂ secretora (sPLA₂) fue medida usando el sPLA₂ Assay Kit (Cayman Chemical®), que consta de: a) DTNB (5,5'-ditio-bis-(ácido-2-nitrobenzoico)), agua desionizada y Tris-HCl a pH 8; b) amortiguador de ensayo, constituido por Tris-HCl a pH 7.5, CaCl₂ 10 mM y KCl 100 mM; c) 0.3 mM de Triton X-100; y d) diheptanoil tio-PC como sustrato. Para los controles negativos se colocaron 10 µL de DTNB y 15 µL de amortiguador de ensayo. Como control positivo fueron usados 10 µL de PLA₂ de veneno de abeja, se añadieron 10 µL de DTBN y 5 µL de amortiguador de ensayo. El EC, F1, F2 y F3

fueron preparados adicionando 10 μ L de DTBN, 10 μ L de muestra (correspondientes a 10 μ g de proteína) y 5 μ L de amortiguador de ensayo. Para iniciar la reacción se agregaron 200 μ L de la solución sustrato a cada pozo, se agitó la placa cuidadosamente. La absorbancia fue leída a 414 nm cada minuto en un lector de microplaca para obtener un total de siete lecturas a diferentes tiempos.

Las muestras fueron enviadas y analizadas en el Laboratorio de Toxinología de la Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, con la ayuda de la Q.F.B. Mariela Álvarez Cárdenas y en colaboración con el Dr. Alejandro García Arredondo.

6.9.5. Inhibición del crecimiento en líneas celulares humanas (cribado primario)

La técnica empleada para evaluar la inhibición de crecimiento en líneas celulares está basada en una técnica estandarizada por Skehan y colaboradores en el Instituto Nacional de Cáncer en los Estados Unidos de Norteamérica (70).

Las muestras fueron enviadas y analizadas en el Laboratorio de Pruebas Biológicas del Instituto de Química, UNAM, en colaboración con el Dr. Fernando Lazcano Pérez y el Dr. Roberto A. Arreguín Espinosa de los Monteros.

Se evaluó la actividad del EC y las fracciones mediante el ensayo de inhibición del crecimiento en las siguientes líneas celulares de cáncer humano: U251 de glía de sistema nervioso central, PC-3 de próstata, K562 de leucemia mieloblástica crónica, HCT-15 de colon, MCF-7 de mama y SKLU de pulmón, y adicionalmente se probó la actividad en la línea celular FGH (cultivo primario de fibroblastos gingivales humanos sanos).

Las células fueron desprendidas de las botellas de cultivo usando 1 mL de tripsina-EDTA 0.05% (excepto para la línea K562). Inmediatamente se agregaron 5 mL de medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco®) para inactivar la tripsina. Las células suspendidas se depositaron en tubos cónicos de polipropileno de 15 mL y se centrifugaron por 3 min a 3,000 rpm. Para resuspender el paquete celular se agregó medio de cultivo, se tomaron 10 μ L de suspensión y se agregaron 180 μ L de azul de tripano y se determinó el número de células vivas mediante un hematocitómetro. Se hicieron los ajustes necesarios para inocular las células en un

volumen de 100 µL/pozo en una placa estéril de 96 pozos. Cada placa se inoculó con dos líneas celulares por duplicado y se preincubó a 37° C por 24 h en una atmósfera de 5% CO₂ y 100% de humedad relativa.

Se tomaron 100 µL de una solución stock de 50 mg/mL del extracto en medio de cultivo y se agregaron a cada pozo para tener un volumen final de 200 µL. La placa se incubó por 48 h a 37° C. Al terminar el periodo de incubación, las células se fijaron *in situ*. Se agregaron 50 µL de una solución de ácido tricloroacético (TCA) frío al 50% y se incubó a 4° C por 60 min. El sobrenadante se desechó y las placas se lavaron cinco veces con agua desionizada y fueron secadas al ambiente. Las células fijadas se tiñeron con 100 µL de una solución de sulforrodamina B (SRB) al 0.4% y se incubaron por 30 min a temperatura ambiente. La SRB no unida se removió con tres lavados de ácido acético al 1% y se dejó secar al ambiente. A las placas teñidas se les agregó 100 µL de amortiguador Tris y se agitaron por 10 min para favorecer la disolución del complejo. Posteriormente, se midió la densidad óptica (DO) en un lector de microplacas a una longitud de 515 nm. El porcentaje de inhibición del crecimiento celular (%IC) se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\%IC = 100 - \left(\frac{DOt - DOb}{DOc - DOb} \right) * 100$$

Donde:

DOt: promedio de los pozos tratados con el veneno

DOc: promedio de los pozos tratados con DMSO

DOb: promedio de los pozos testigo (sin células)

6.9.6. Viabilidad en línea celular C6

La actividad antitumoral del extracto crudo y fracciones prepurificadas fue probada en la línea celular C6 de glioma murino.

Las células fueron cultivadas en botellas de cultivo de 25 cm² de superficie, con tapa ventilada tratados con DMEM (MP BIOMEDICALS®), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), penicilina-estreptomicina al 1% y anfotericina B al 1% (MP

BIOMEDICALS®). Se incubaron a 37 °C en condiciones estériles a una atmósfera de presión, 5% de CO₂ y 100% de humedad relativa. Concluido el tiempo de incubación las células fueron separadas de los frascos de cultivo con solución de tripsina al 0.25% (BD®) y se realizó un subcultivo. Cuando las células fueron confluentes se separaron y se sembraron por triplicado en microplacas de 96 pozos de fondo plano con DMEM más SFB, antibiótico y antimicótico; posteriormente se dejaron incubar durante 48 h. El medio fue retirado para ser remplazado con la solución de los extractos a diferentes concentraciones. Cada uno de los extractos y concentraciones estudiadas se probaron por triplicado. En cada una de las cajas se consideraron pozos con células a los cuales se les agregó medio fresco para ser tomados como control positivo de viabilidad. El tiempo de exposición a los extractos para determinar el efecto sobre la viabilidad celular fue de 24 h.

Trascurrido el tiempo de exposición de las células con los extractos, el medio se retiró de los pozos y fue lavado con solución salina amortiguada con fosfatos (PBS). La técnica utilizada para obtener la viabilidad celular es una modificación al método descrito por Chiba y colaboradores (71). A cada pozo se agregaron 50 µL del colorante rojo neutro (RN) en DMEM (40 µg/mL) y se incubó a 37° C durante 2 h; el RN fue decantado y se realizaron dos lavados con PBS; se usaron 50 µL por pozo de solución para desteñir, que contiene 50% de etanol, 49% de agua desionizada y 1% de ácido acético glacial; finalmente, se agitó durante 10 min. La absorbancia fue leída a 540 nm en un lector de microplacas Stat Fax 4200®.

Los pozos se lavaron con PBS y a cada pozo se agregaron 50 µL del colorante cristal violeta (CV), y se incubaron 30 min. Transcurrido este tiempo los pozos se lavaron nuevamente y el CV fue extraído con 100 µL de ácido acético al 10%. Las microplacas se agitaron para homogenizar el eluyente y la cantidad de colorante extraído se determinó registrando la absorbancia a 570 nm en un lector de microplaca Stat Fax 4200®. El 100% de viabilidad fue determinado obteniendo el promedio de la absorbancia leída de los pozos controles. Para determinar el efecto sobre la viabilidad celular de cada extracto sobre las células se dividió el promedio de la absorbancia de las réplicas del extracto entre la absorbancia del control y se multiplicó por 100 para obtener el porcentaje de viabilidad.

7. RESULTADOS

7.1. Obtención de extracto crudo

Fueron recolectadas un total de 33 anémonas de la especie *Lebrunia danae*, obteniendo un peso húmedo total de 401.06 g (Tabla 3).

Tabla 3. Recolectas

Fecha	No. de especímenes	Peso húmedo (g)
19/Agosto/2015	1	19.80
28/Enero/2016	2	28.11
1/Marzo/2016	15	211.00
5/Abril/2016	5	74.00
17/Mayo/2016	5	37.96
19/Mayo/2016	5	30.19
No. Total	33	401.06

Durante la obtención del extracto crudo se observaron alícuotas al microscopio, se verificó la descarga de sus toxinas (Figura 11) y se realizó la identificación de los tipos distintivos de cnidocitos reportados para esta especie (9, 20), encontrando cuatro tipos: basitricos, microbásicos amastigóforos, macrobásicos amastigóforos y espirocistos (72). El extracto crudo fue liofilizado, obteniendo un peso seco total de *cca.* 30 g, que fueron diluidos en agua desionizada a diferentes concentraciones para cada prueba.

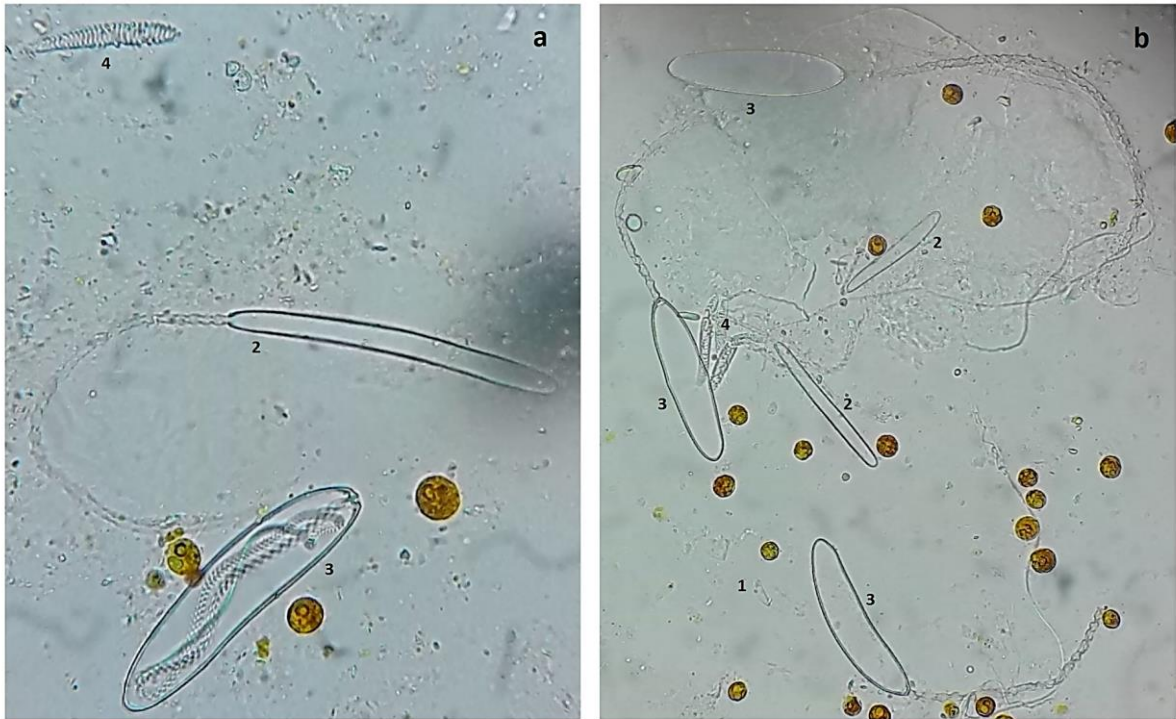


Figura 11. Cnidocitos de *L. danae* observados al microscopio (Objetivo 40X). 1) Basitrico, 2) microbásico amastigóforo, disparado en imagen **a** y dos disparados en imagen **b**, 3) macrobásico amastigóforo, cargado con toxinas en imagen **a** y tres disparados en imagen **b**, y 4) espirocistos, uno en imagen **a** y dos juntos en **b**.

7.2. Cuantificación de proteínas

Fueron disueltos 5 mg de extracto crudo o fracción liofilizada en 250 μL de agua desionizada, de cada dilución o estándar se tomaron 5 μL y se adicionaron 250 μL de reactivo de Bradford para después realizar la lectura de absorbancia a 595 nm.

La concentración de proteína calculada en el extracto crudo y en las tres fracciones se obtuvo en referencia al estándar de gamma globulina bovina (BGG), los resultados se observan en la Tabla 4.

Tabla 4. Concentración de proteína del extracto crudo y fracciones respecto al estándar de gamma globulina bovina

	mg*
EC	0.0924
F1	0.2946
F2	0.3085
F3	0.0927

* miligramos de proteína por miligramo de extracto

7.3. Prepurificación mediante cromatografía de líquidos de baja presión

Se diluyeron 2.5 g de EC en 50 mL de agua desionizada, correspondientes a una concentración de 50 mg/mL de EC y 4.62 mg/mL de proteína. La dilución fue aplicada a una columna con Sephadex G-50 M (Pharmacia Biotech®), equilibrada y eluida con ácido acético 0.3 M, a un flujo de 3 mL/min y con detección a una longitud de onda de 280 nm.

Se realizaron un total de siete cromatografías y se obtuvieron tres fracciones de cada una: F1, F2 y F3, como se muestran en la Figura 12 (cromatograma representativo de las siete cromatografías). Las fracciones F1, F2 y F3 de las siete columnas se trabajaron en conjunto debido a su similitud. Se concentraron en rotavapor a 25 °C y posteriormente fueron liofilizadas a -45 °C.

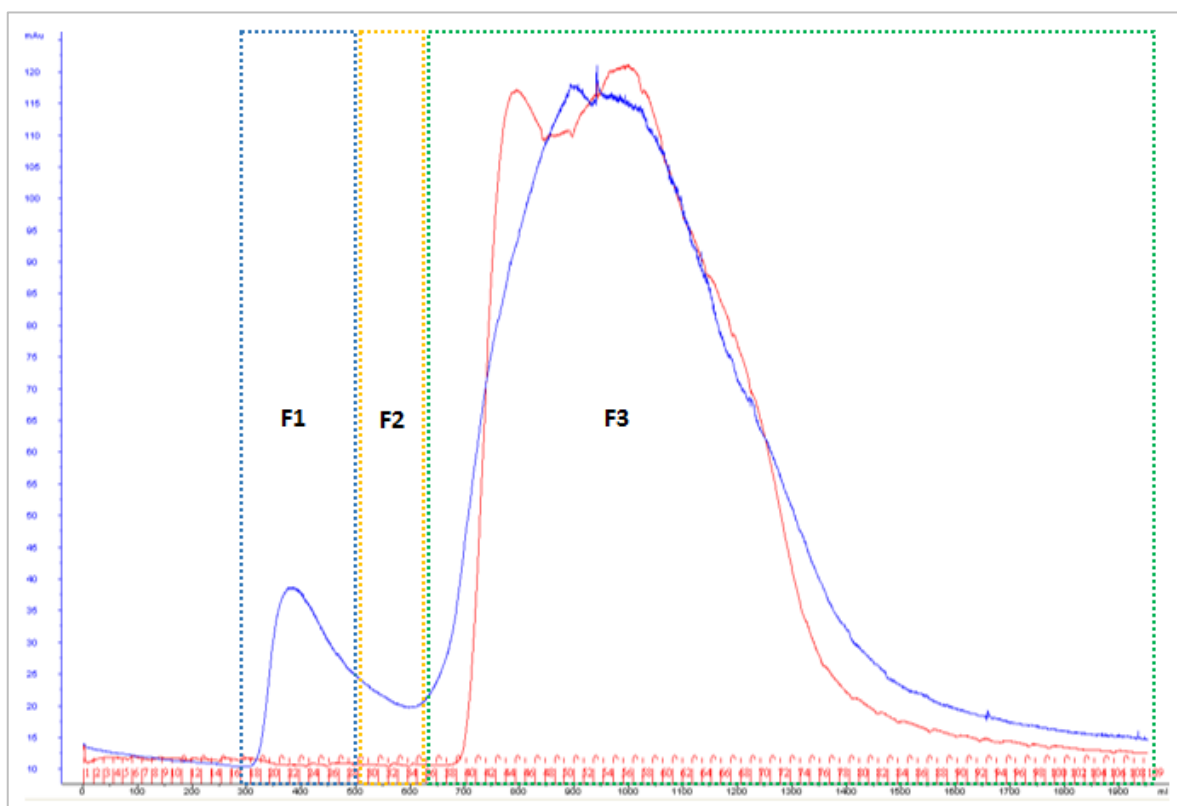


Figura 12. Cromatograma de filtración en gel Sephadex G-50 M del EC de *L. danae* (2.5 g), equilibrada y eluida con ácido acético 0.3 M. Volumen de columna de 864 cm³. Flujo de 3 mL/min y detección a 280 nm. Conductividad (—), absorbancia (—).

El rendimiento del material fue calculado después de obtener el peso seco de EC y fracciones y los datos obtenidos se muestran en la Tabla 5; de igual modo se calculó la cantidad de proteína contenida en cada extracto y sus respectivos rendimientos.

Tabla 5. Rendimiento del material obtenido a partir de la anémona *L. danae*.

	Peso (g)	% PH^b	% EC^c
PH^a	401.1	100	—
EC	25.9	6.4	100
F1	1.9	0.5	7.2
F2	3.7	0.9	14.4
F3	7.6	1.9	29.5
Cantidad de proteína (g)			
EC	2.4	0.6	9.2
F1	0.6	0.1	2.3
F2	1.1	0.3	4.2
F3	0.7	0.2	2.7

^a Peso húmedo

^b Porcentaje con respecto al peso húmedo

^c Porcentaje con respecto al peso del extracto crudo

7.4. Purificación mediante cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa

La fracción F3 obtenida por cromatografía en Sephadex G-50 M fue sometida a purificación usando una columna (Hibar[®]) Purospher[®] Star C18 de 250 por 4.6 mm y tamaño de partícula de 5 µm; se inyectaron 300 µL de una solución con 2 mg/mL de F3, y se usó un gradiente lineal de agua (0.1% TFA)-acetonitrilo (0.1% TFA) del 0–100% de acetonitrilo en 70 min a un flujo de 1 mL/min y detección a una longitud de onda de 220 nm.

El cromatograma resultante se observa en la Figura 13 y marcado con la letra **(a)** una señal bien definida a 29.5 min de elusión, que fue seleccionada para realizar un análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF.

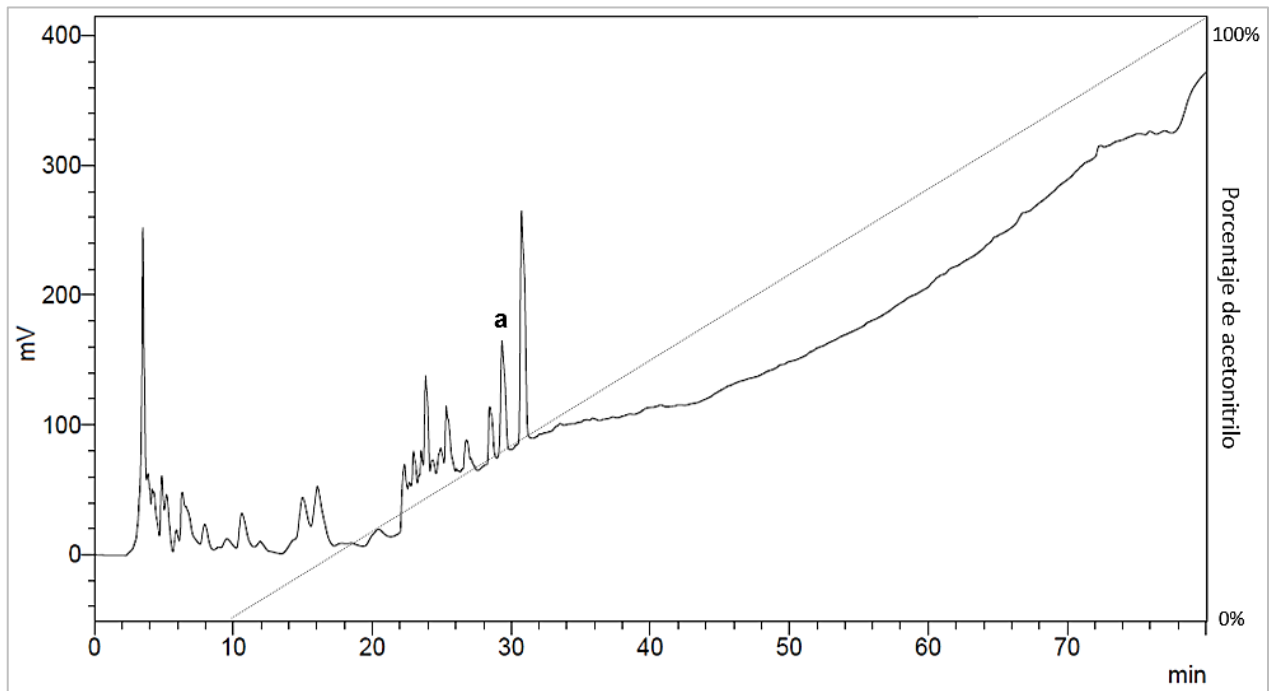


Figura 13. Cromatograma de CLAR en fase reversa de F3. Longitud de onda de 220 nm. La letra (a) identifica la fracción seleccionada para realizar un análisis de espectrometría de masas.

7.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida

7.5.1. Extracto crudo

Para evaluar el peso molecular de las proteínas contenidas en el extracto crudo se realizó un gel de poliacrilamida al 12%. La dilución del EC se realizó agregando 10 mg en 1 mL de agua desionizada; se tomaron 10 μL de esta dilución y se agregaron 30 μL de amortiguador de muestra; finalmente, 15 μL de esta dilución (correspondientes a 25 μg de proteína) se colocaron en el carril 1 de la cámara electroforética y 3 μL del estándar de peso molecular en el carril 2. El análisis se realizó a un voltaje de 170 V. Se puede observar en la Figura 14 que el extracto crudo presenta proteínas de pequeño, mediano y alto peso molecular, desde 10 hasta 250 kDa.

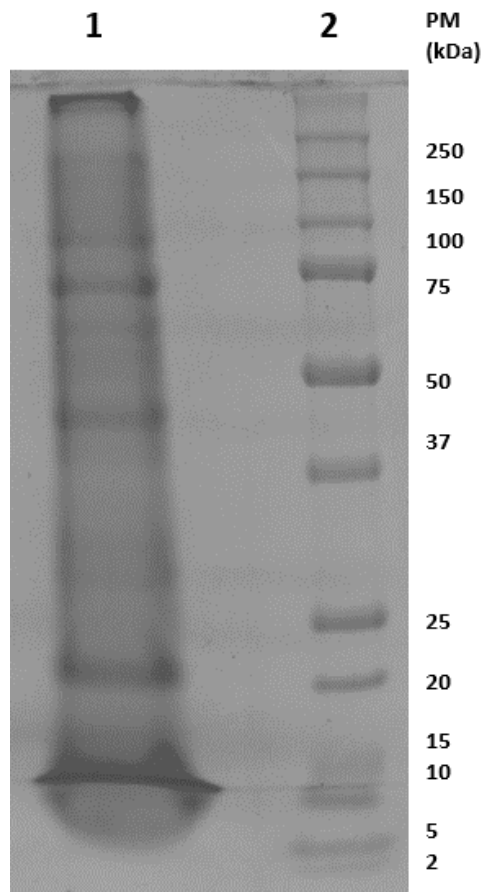


Figura 14. Gel de poliacrilamida al 12% del EC: carril 1) 25 μg de proteína en el extracto crudo, carril 2) marcador de peso molecular (Precision Plus Protein[®] Dual Xtra Standards).

7.5.2. Fracciones obtenidas mediante cromatografía de líquidos de baja presión

El peso molecular de las proteínas encontradas en las fracciones fue evaluado en un gel de poliacrilamida al 12% (Figura 15); la dilución de las fracciones se realizó colocando 5 mg de cada fracción en 250 μL de agua desionizada; después se prepararon diluciones para igualar la concentración de proteína de cada fracción a 6 μg de proteína por μL de agua. 10 μL de la última dilución se mezclaron con 30 μL de amortiguador de muestra. En los carriles se colocaron 15 μL de las mezclas anteriores y 3 μL del estándar de peso molecular.

Las bandas de peso molecular más marcadas se observan a 20 kDa y cerca de 30 kDa en F1 y F2, mientras que en F3 se observa una banda a 20 kDa.

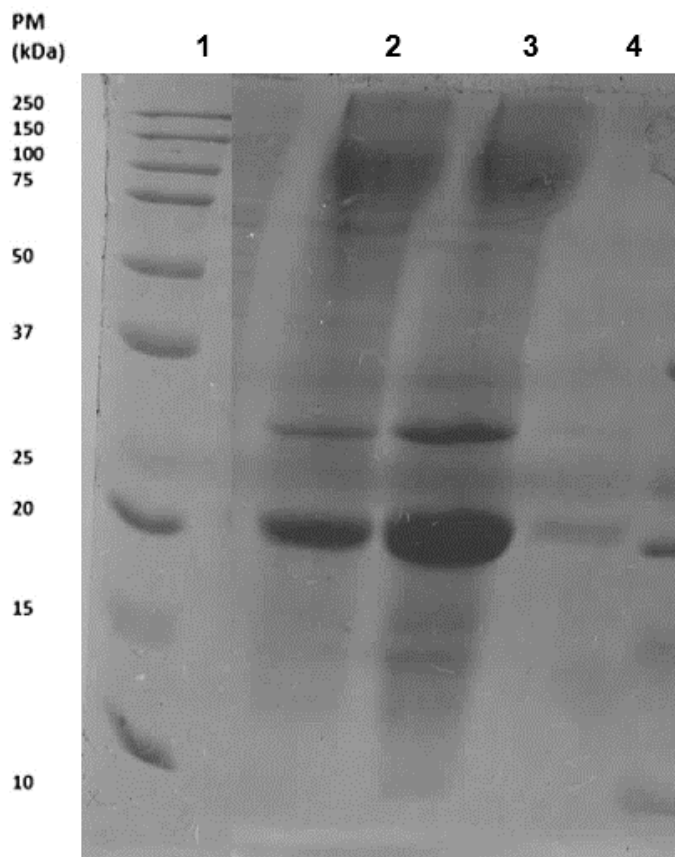


Figura 15. Gel de poliacrilamida al 12% de las fracciones: carril 1) marcador de peso molecular (Precision Plus Protein® Standards Kaleidoscope), carril 2) F1, carril 3) F2 y carril 4) F3.

7.6. Análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF

7.6.1. Extracto crudo

En la Figura 16 apartado (a) se muestra el espectro de masas obtenido para el EC usando un método de detección para bajo peso molecular (1 a 10 kDa); se observa un grupo de señales de alta intensidad entre 3 y 6 kDa, con dos señales de alta intensidad en 3.3 y 5.1 kDa. En la Figura 16 apartado (b) se usó un método para detección de péptidos de alto peso molecular, con un rango de 5 a 66 kDa; se observa un grupo de señales de 5 a 12 kDa con tres señales destacadas a 5.9, 8.5 y 11.8 kDa, otro grupo de 18 a 20 kDa, con una señal más intensa a 19.1 kDa, y dos señales aisladas en 31.9 y 42 kDa.

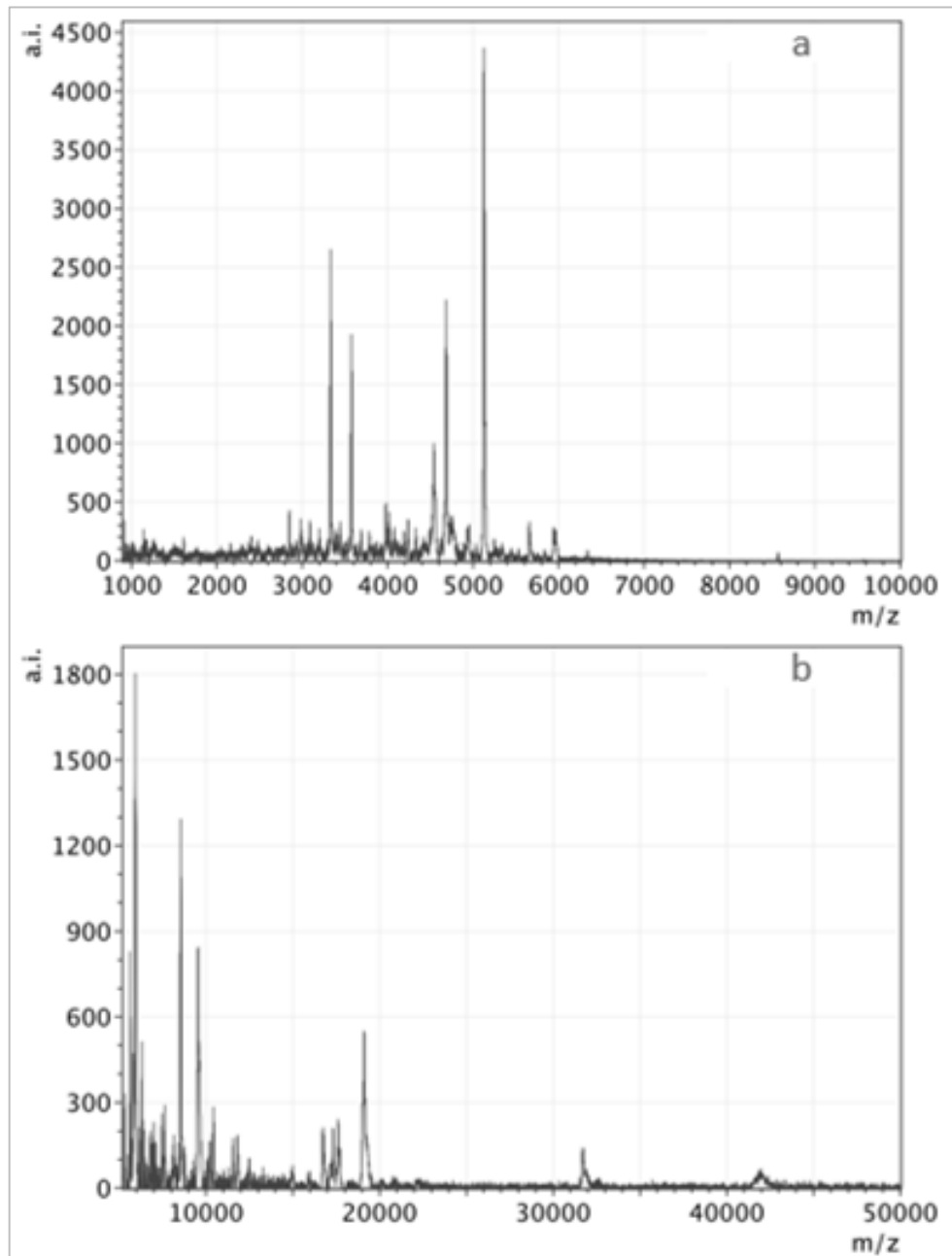


Figura 16. Espectros de MALDI-TOF del EC, a) detección de péptidos de bajo peso molecular y b) detección de péptidos de alto peso molecular.

7.6.2. Fracciones obtenidas mediante cromatografía de líquidos de baja presión

En la Figura 17 se observa el espectro de masas obtenido para la F1, usando un método de detección de péptidos de alto peso molecular (5 a 50 kDa). Se observa un grupo de péptidos con alta intensidad de 5 a 10 kDa, con dos señales más intensas en 8.5 y 9.5 kDa, un grupo con intensidades menores de 12 a 22 kDa y finalmente dos señales a altos pesos moleculares: 31.9 y 42 kDa.

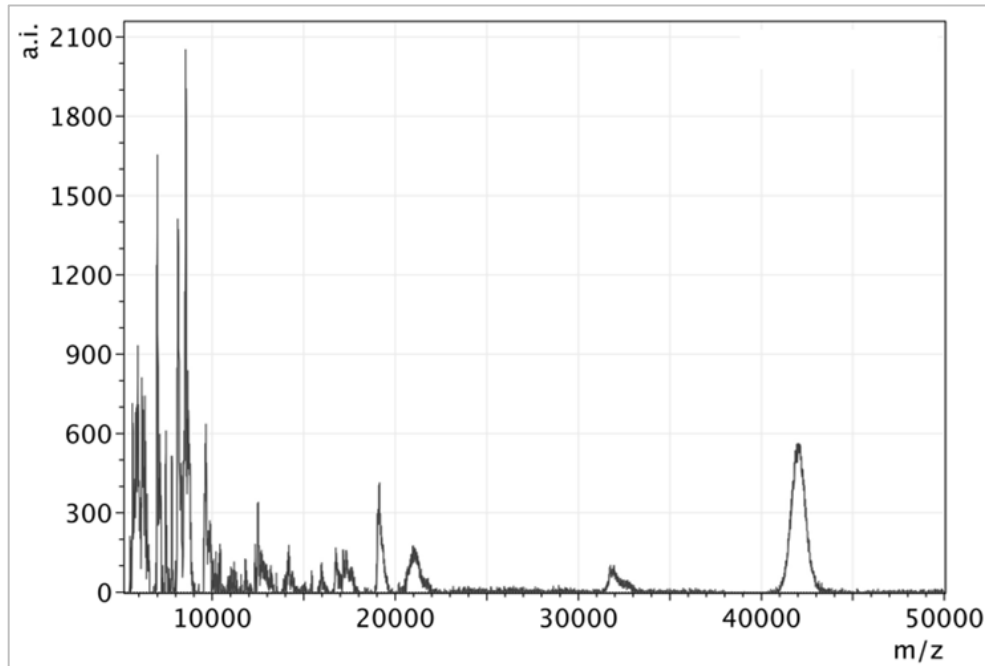


Figura 17. Espectro de MALDI-TOF de F1.

En la Figura 18 se observa el gráfico de espectrometría de MALDI-TOF obtenido para F2, con un rango de 1 hasta 15 kDa; se observa un grupo de señales de alta intensidad entre 4 y cerca de 5.2 kDa, con una señal más intensa en 4.9 kDa y una señal aislada en 8.5 kDa.

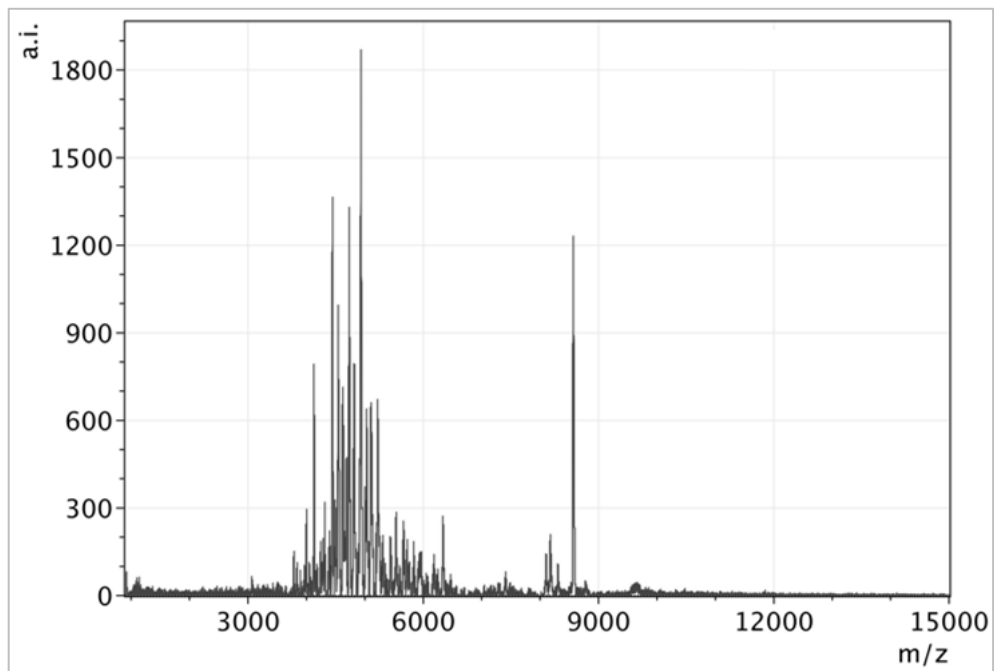


Figura 18. Espectro de MALDI-TOF de F2.

En la Figura 19 se muestra el espectro de masas obtenido para F3; se observan múltiples señales, las dos más intensas se encuentran a 4.5 y 5.1 kDa.

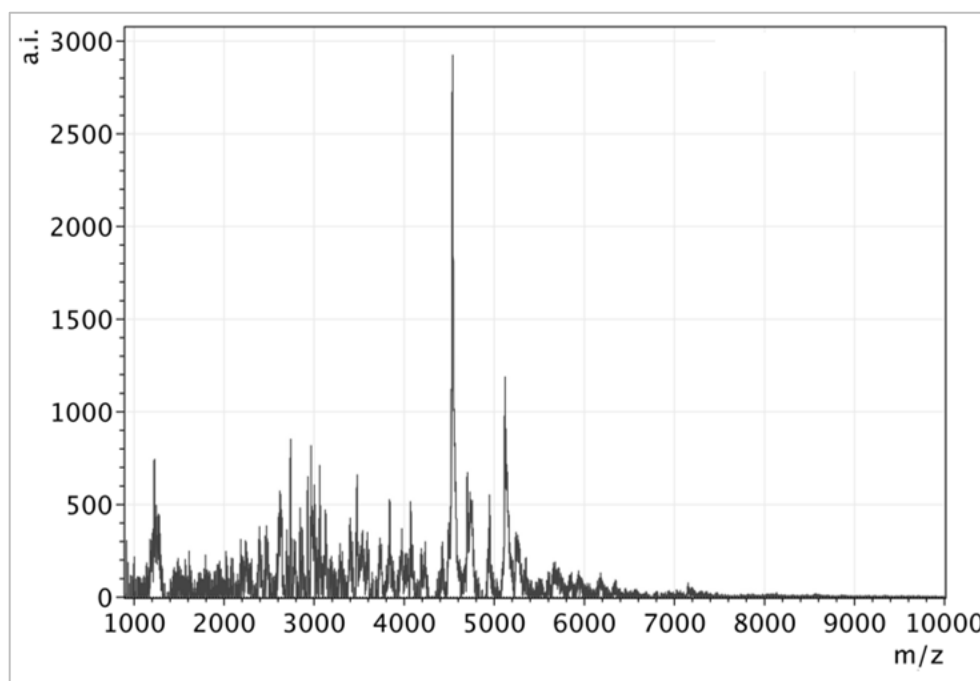


Figura 19. Espectro de MALDI-TOF de F3.

7.6.2.1. F3a

En la Figura 20 se observa el análisis por espectrometría de masas realizado a la fracción a (F3a) obtenida mediante CLAR a partir de F3; se usó un método de detección de péptidos de alto peso molecular, en un rango de 2 a 40 kDa; se observan dos señales de alta intensidad, en 3.4 y 4.6 kDa.

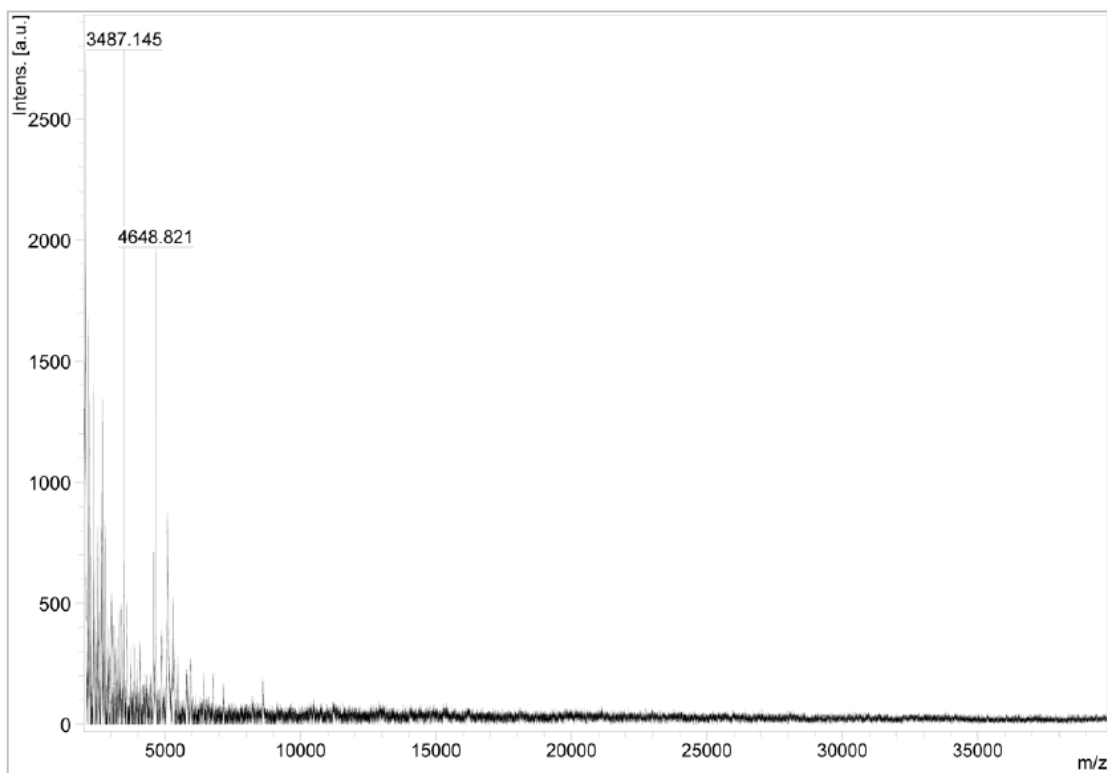


Figura 20. Espectro de MALDI-TOF de F3a.

7.7. Bioensayos

7.7.1. Preevaluación del extracto crudo

Para determinar la actividad tóxica del extracto crudo se inyectó en cangrejos de la especie *Ocypode quadrata* una disolución de 50 μ L preparada con EC en agua desionizada. Como control, se inyectaron 50 μ L de agua desionizada a tres cangrejos, en los que no se observó ninguna respuesta. Se tomó el peso de cada organismo y se identificó su sexo. En la Tabla 6 se muestran las especificaciones de los especímenes tratados con EC, mientras que en la Tabla 7 se resumen las respuestas observadas en los mismos cangrejos después de ser inyectados. Los tres cangrejos presentaron parálisis y oscurecimiento del caparazón a los pocos minutos de ser inyectados; las demás respuestas fueron variables entre los tres especímenes. Los cangrejos 1 y 3 murieron, mientras que el cangrejo 2 se mantuvo vivo, pero en un estado de semiparálisis; estas diferencias pueden atribuirse a la cantidad de proteína administrada por gramo de peso del cangrejo ya que sus pesos fueron muy variables; el cangrejo 2 recibió de acuerdo con su peso cerca de la mitad de la dosis que el cangrejo 1, lo que puede explicar por qué no murió.

Tabla 6. Especificaciones de los cangrejos inyectados con extracto crudo.

	Cangrejo 1	Cangrejo 2	Cangrejo 3
Sexo	Macho	Hembra	Macho
Peso (g)	7.6	22.9	13.3
Volumen inyectado (µL)	50	50	50
Cantidad inyectada de proteína (mg)	0.1848	0.1848	0.1848
mg proteína / g de cangrejo	0.0243	0.0081	0.0139

Tabla 7. Respuestas observadas en los cangrejos inyectados.

Efecto	Cangrejo 1	Cangrejo 2	Cangrejo 3
Temblores	✓	×	✓
Parálisis	✓	✓	✓
Burbujeo en boca	×	✓	×
Otras secreciones	×	✓	×
Oscurecimiento	✓	✓	✓
Muerte	✓	×	✓
Lisis en tejido	✓	×	✓

7.7.2. Actividad hemolítica

La actividad hemolítica fue determinada usando el método modificado descrito por Rottini y colaboradores (66). El porcentaje de actividad hemolítica fue calculado a partir de los datos de absorbancia obtenidos, usando la fórmula tomada de Torres y colaboradores (73), que se muestra a continuación,

$$AH\% = \left[\frac{AM}{A(100\%)} - A(0\%) \right] * 100$$

Donde:

AH% = Porcentaje de actividad hemolítica

AM = Absorbancia de la muestra

A(100%) = Absorbancia al 100% de hemólisis

A(0%) = Absorbancia al 0% de hemólisis

Las diferentes diluciones se prepararon usando: 4, 10, 16, 20, 26, 30, 36 y 44 mg/mL de EC en agua desionizada, que corresponden a 0.07, 0.13, 0.21, 0.26, 0.34, 0.39, 0.48 y 0.58 mg de proteína respectivamente (cantidad aplicada directamente en cada ensayo). Cada muestra se realizó por triplicado; después de la lectura a 415 nm con el espectrofotómetro, los datos obtenidos fueron graficados como la media \pm la desviación estándar (Figura 21); se observó un comportamiento lineal dependiente de la concentración. Mediante regresión lineal se obtuvo la siguiente ecuación:

$$y = 138.16x - 2.043$$

En la que se sustituyó el valor de y por 50 (50% de actividad hemolítica) para así obtener la UH_{50} de 0.38 mg de proteína.

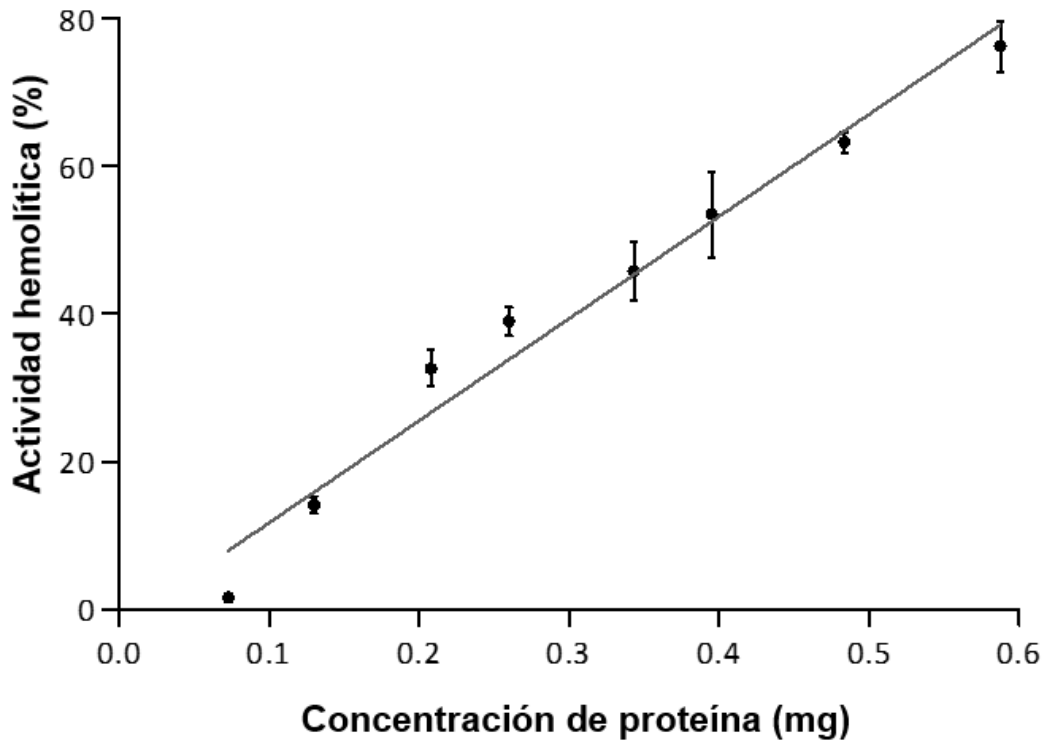


Figura 21. Actividad hemolítica inducida por el EC de *L. danae* en eritrocitos humanos. Cada punto representa la media \pm la desviación estándar de tres ensayos.

7.7.3. Actividad de fosfolipasas

Se realizó el ensayo de fosfolipasas con el EC, F1, F2 y F3 obtenidos de la anémona *L. danae* usando 60 μ g de proteína. Como control negativo se utilizó agua desionizada y veneno de abeja (18.4 μ g de proteína) como control positivo. Cada muestra fue probada por triplicado. Se monitoreó la formación de halos de actividad enzimática a las 3, 6, 12, 24, 48 y 72 h.

De acuerdo a Habermann y Hardth (67) se observó actividad de fosfolipasa A (PLA) en el veneno de abeja, en el EC y en la F2 (Figura 22). De entre las muestras probadas y comparando con la actividad del control positivo, F2 mostró la mayor actividad enzimática, aunque los halos formados fueron en todos los casos menos nítidos que los observados con el veneno de abeja.

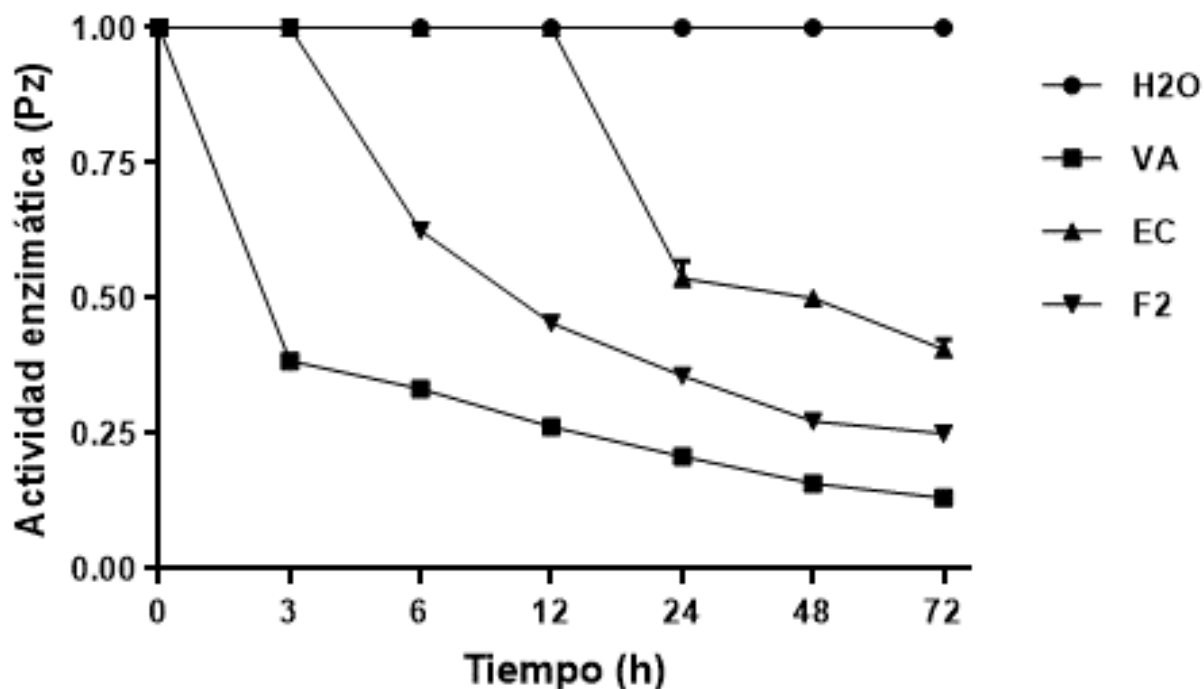


Figura 22. Actividad enzimática de fosfolipasas con respecto al tiempo en muestras de: agua (H₂O), extracto crudo (EC), fracción 2 (F2) y veneno de abeja (VA). Cada punto representa el promedio de tres ensayos \pm la desviación estándar, donde 1 representa la menor actividad y 0 la mayor actividad.

7.7.4. Actividad de fosfolipasa A₂ secretora

Se realizó el ensayo de fosfolipasa A₂ secretora con el EC, F1, F2 y F3, usando 10 μ g de proteína; como control negativo se utilizó agua desionizada y sPLA₂ de veneno de abeja (VA) como control positivo. Cada muestra fue probada por triplicado.

La actividad de sPLA₂ fue calculada usando la fórmula:

$$actividad\ sPLA_2 = \frac{\Delta A_{414}/min}{10.66\ mM^{-1}} * \frac{0.225\ mL}{0.01\ mL} * dilución\ muestra$$

Donde ΔA_{414} se obtuvo usando la fórmula:

$$\Delta A_{414} = \frac{A_{414} (Tiempo\ 2) - A_{414} (Tiempo\ 1)}{Tiempo\ 2\ (min) - Tiempo\ 1\ (min)}$$

Los valores de actividad enzimática de sPLA₂ obtenidos se pueden encontrar en la Tabla 8, mientras que en la Figura 23 se pueden observar los cambios en la absorbancia debidos a la actividad de sPLA₂ de cada muestra en un rango de 7 min.

Tabla 8. Actividad de sPLA₂ obtenida en VA, EC y fracciones obtenidas a partir de *L. danae*.

	Actividad sPLA ₂ ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mL}$)
VA	17.8549
EC	0.5519
F1	0.0438
F2	0.0305
F3	0.0375

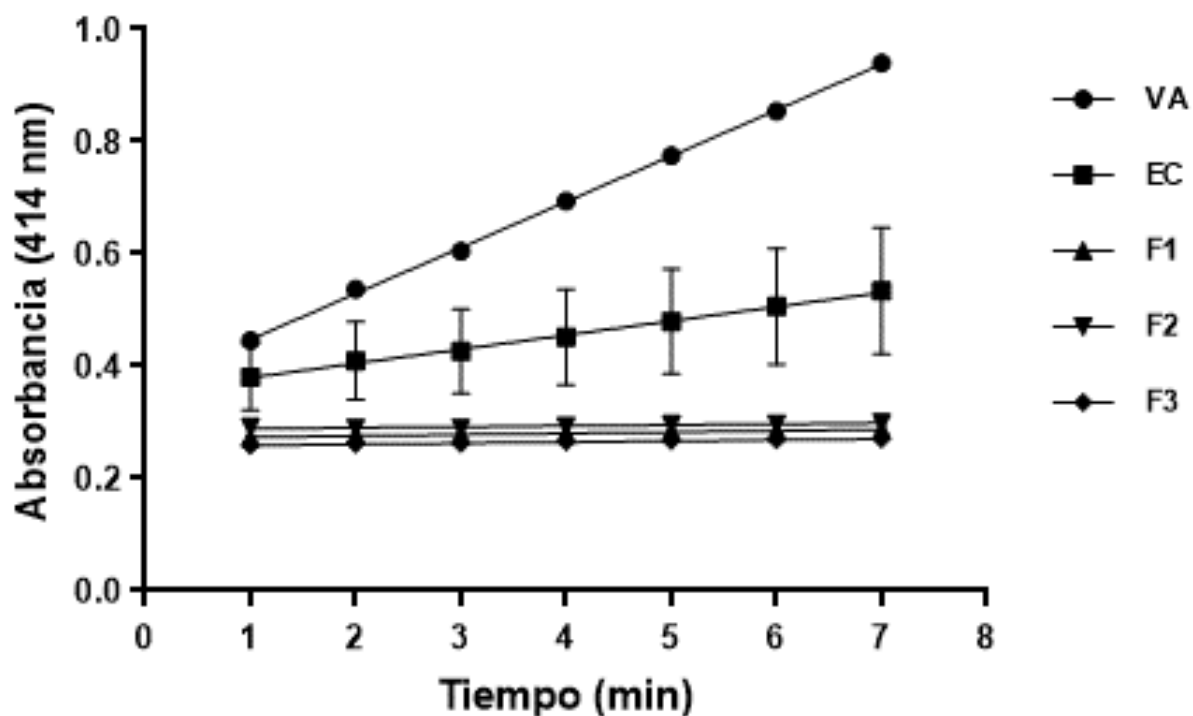


Figura 23. Actividad de sPLA₂. Tiempos de reacción para el veneno de abeja (VA), EC y fracciones obtenidas mediante cromatografía en gel partir de *L. danae*. Cada punto representa la media \pm la desviación estándar de tres ensayos.

7.7.5. Inhibición del crecimiento en líneas celulares humanas (cribado primario)

Los resultados obtenidos para la prueba de inhibición en líneas celulares humanas se observan en la Tabla 9; los extractos se encuentran a concentración de 50 µg/mL, con DMSO como vehículo. La mitoxantrona fue usada a concentración de 0.5 µM.

Tabla 9. Porcentaje de inhibición del crecimiento (antiproliferativo).

	U251¹	PC-3²	K562³	HCT-15⁴	MCF-7⁵	SKLU-1⁶	FGH⁷
EC	61.59	46.78	73.70	18.46	73.59	98.39	84.34
F1	47.10	20.77	76.38	14	85.14	80.16	NC
F2	45.40	14.93	65.34	7.95	62.32	89.71	5.7
F3	12.36	NC	1.0	2.46	6.78	14.08	NC
MITOXANTRONA	100	78.12	75.81	87.73	80.34	65.61	86.01

¹Glioblastoma, ²cáncer de próstata, ³leucemia, ⁴cáncer de colon, ⁵cáncer de mama, ⁶cáncer de pulmón, ⁷cultivo primario de fibroblastos gingivales humanos normales. NC = no citotóxico.

En la mayoría de los casos el EC muestra la mayor inhibición del crecimiento en comparación con las fracciones y la citotoxicidad es decreciente del EC hacia F3, con las siguientes excepciones: a) K562, donde F1 es más citotóxica que EC, b) MCF-7, donde F1 es más citotóxica que EC y c) SKLU-1, donde F2 es más citotóxico que F1. En todos los casos F3 fue la fracción menos activa o incluso no citotóxica; en esta fracción se encuentran las sales y las partículas de menor tamaño de acuerdo con la separación en gel permeable. Los porcentajes más altos fueron los obtenidos en la línea celular SKLU-1 donde el EC, F1 y F2 superan la actividad producida por la mitoxantrona, usada como estándar. En la única línea de células normales humanas (FGH), el EC presenta un porcentaje de inhibición de 84% (similar al de la mitoxantrona), mientras que F1 y F3 no mostraron citotoxicidad y F2 mostró casi nulo efecto.

7.7.6. Viabilidad en línea celular C6

Se realizó el ensayo de viabilidad celular usando dos métodos, primero el método de Rojo Neutro (RN) y posteriormente el método de Cristal Violeta (CV). Las células fueron expuestas al extracto y fracciones durante 24 h. Se emplearon cuatro concentraciones de proteína contenida en las diferentes muestras (50, 100, 150 y 200 µg/mL) y se compararon

con un control sin tratamiento (concentración 0 $\mu\text{g/mL}$), que representa el 100% de la viabilidad celular.

En la Figura 24 se observan los resultados usando el método de RN; se observa el control con viabilidad de 100%; en el caso de EC, F1 y F2 para las cuatro concentraciones empleadas, los porcentajes de viabilidad obtenidos fueron cercanos a 43%. En el caso de F3, a concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ se obtuvo un porcentaje de viabilidad de 92%, mientras que a 100, 150 y 200 $\mu\text{g/mL}$ los porcentajes obtenidos fueron cercanos a 44%.

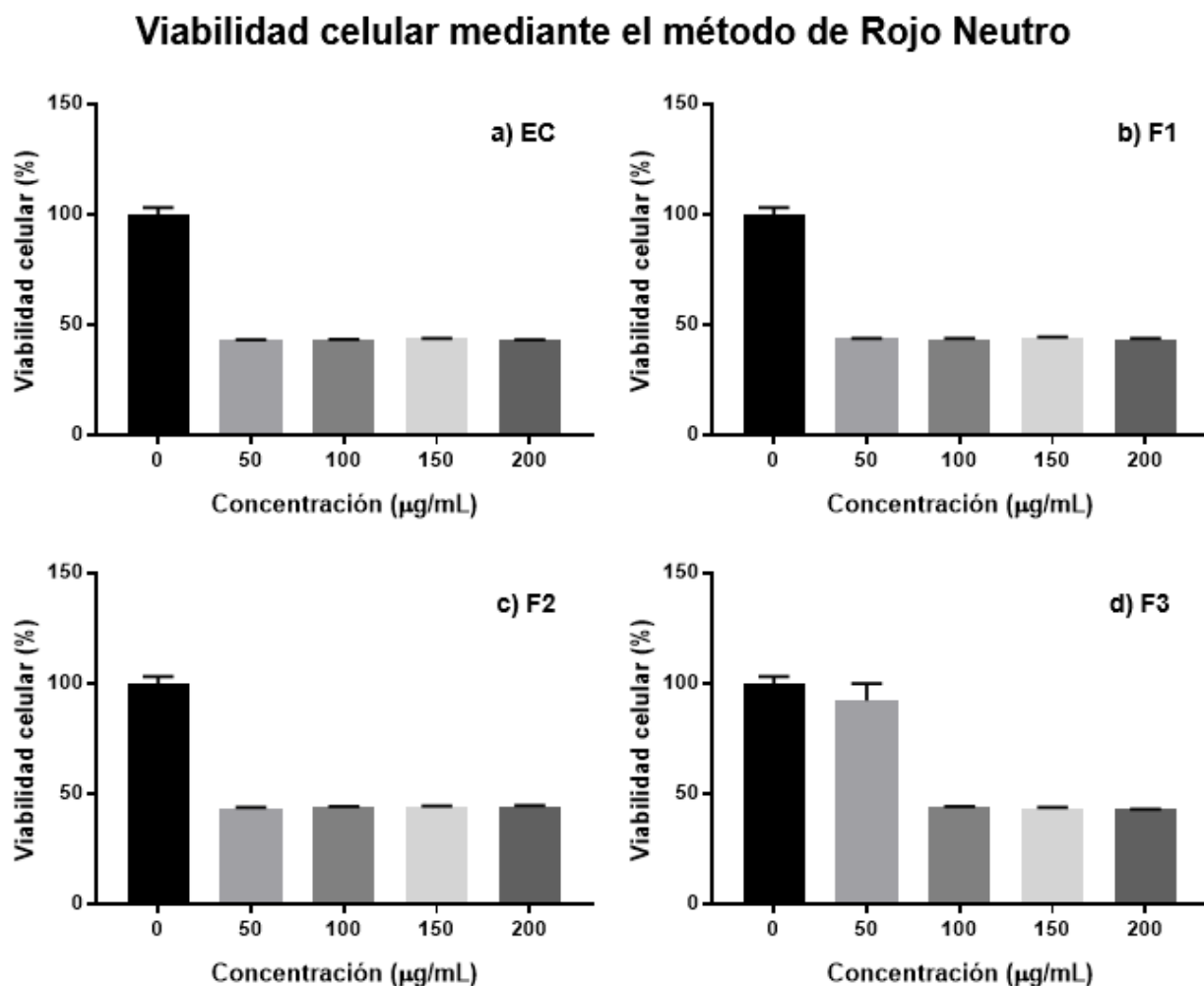


Figura 24. Viabilidad celular del EC y fracciones obtenidas a partir de *L. danae* a diferentes concentraciones de proteína, comparadas con un control (100% de viabilidad), usando el método de RN, cada columna representa la media \pm la desviación estándar de tres mediciones.

En la Figura 25 se observan los resultados usando el método de CV; en el caso de EC se obtuvieron porcentajes de viabilidad de 51, 49, 49 y 52% para las concentraciones de 50, 100, 150 y 200 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente; para F1 se observan valores de 48, 52, 51 y 51%; en el caso de F2 se obtuvieron porcentajes de 50, 48, 57 y 52%; finalmente para F3 se obtuvieron valores de 47, 48, 58 y 78%.

Viabilidad celular mediante el método de Cristal Violeta

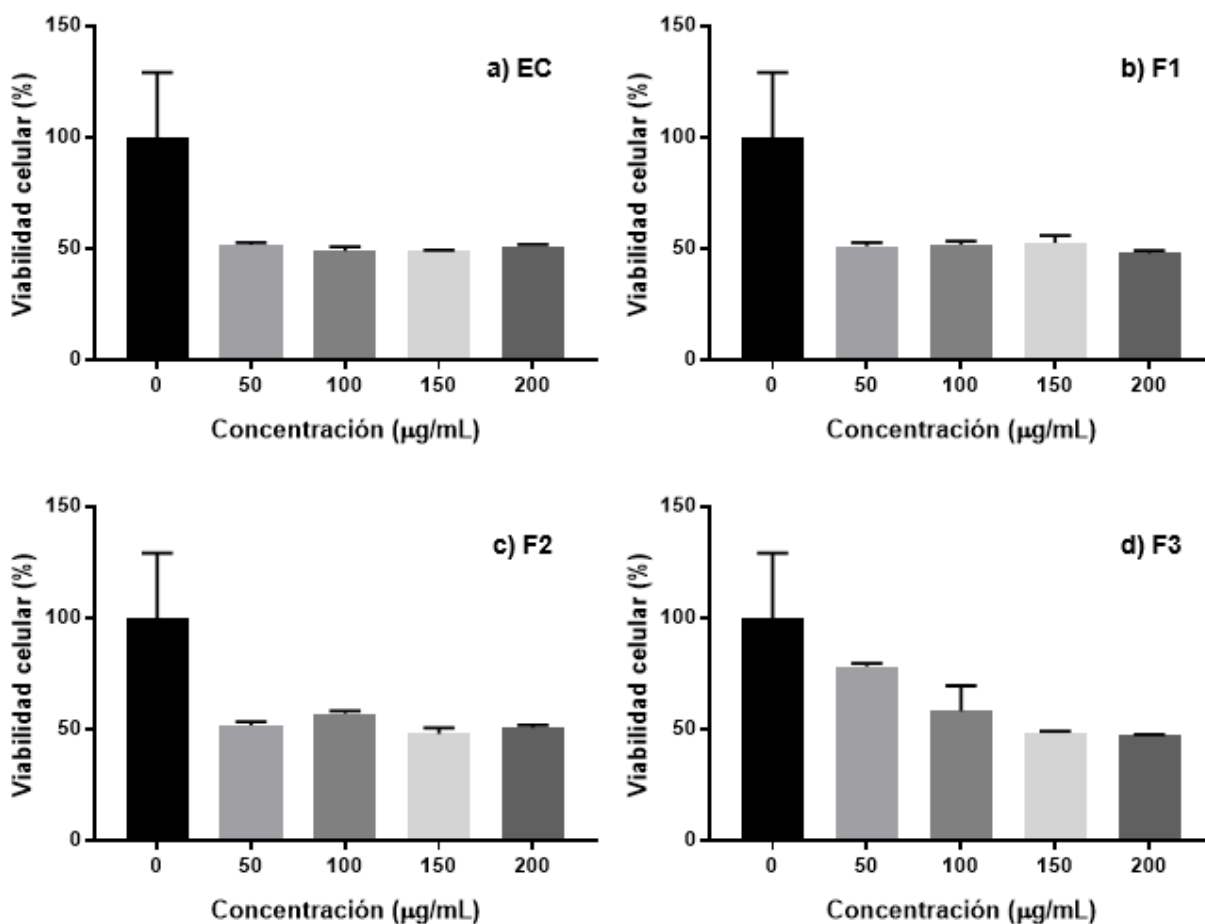


Figura 25. Viabilidad celular del EC y fracciones obtenidas a partir de *L. danae* a diferentes concentraciones de proteína, comparadas con un control (100% de viabilidad), usando el método de CV, cada columna representa la media \pm la desviación estándar de tres mediciones.

8. DISCUSIÓN

En este trabajo se realizó la prepurificación de los compuestos presentes en la anémona *L. danae* y se llevaron a cabo pruebas para constatar la actividad biológica de los mismos empleando distintas técnicas. Analizando los resultados se encontró lo siguiente:

La presencia de cnida es considerada la característica de diagnóstico del phylum Cnidaria y la pérdida de esta característica nunca se ha documentado. En el caso de la subclase Hexacorallia, todos sus miembros poseen espirocistos. Las familias incluidas en el orden Actinaria son caracterizadas por los tipos y distribución de cnidocitos, mientras que la familia Aliciidae se distingue por excrescencias en la columna que contiene nematocistos macrobásicos amastigóforos. Los cnidocitos observados en los organismos colectados en este proyecto (Figura 11) coinciden con las características descritas anteriormente, así como con los reportes previos para la especie *L. danae* (9, 20). Aunque la distribución de estas células es usada para definir algunos taxones de actinarios, el valor de este dato para diferenciar especies o taxones superiores ha sido cuestionado. Aunque todos los sistemas de clasificación de los cnidocitos determinan el tipo basado en la morfología del túbulo de las cápsulas descargadas, para la mayoría de los grupos se ha evaluado principalmente con cápsulas no descargadas de muestras preservadas, lo que hace que la evaluación de la morfología sea tentativa en el mejor de los casos (13). La utilidad del monitoreo de cnidocitos en este proyecto no se limita a apoyar la identificación taxonómica, sino que es necesario para corroborar la descarga de las toxinas de interés.

El difícil suministro de compuestos a partir de invertebrados marinos ha sido un gran obstáculo para la evaluación preclínica. La obtención de organismos marinos requiere de expediciones costosas y, por otro lado, los factores que inducen la producción del metabolito de interés no son comprendidos (5). La crianza en cautiverio a gran escala de la mayoría de los invertebrados marinos resulta difícil, aunque existen reportes exitosos de maricultura como el del organismo *Bugula neritina* en 2003, a partir del cual se obtiene la briostatina 1 (74); inicialmente este compuesto se produjo obteniendo 18 g de material a partir de 14 toneladas del briozoario (5); adicionalmente, se han reportado diferentes tipos de briostatinas (75), así como análogos sintéticos más sencillos (76). Otro ejemplo del bajo rendimiento que se obtiene a partir de organismos marinos es el compuesto ET-743 (trabectedina) que es un agente anticancerígeno; para su obtención se requirió de 1 tonelada métrica (peso húmedo) del tunicado *Ecteinascidia turbinata* para obtener aproximadamente 1 g de ET-743 (77), por

lo que las técnicas de síntesis química son necesarias para el desarrollo a gran escala de estos productos. El contenido de agua en organismos marinos es un problema muy común durante su investigación; en diversas especies de anémonas este valor oscila entre 75–85% de agua, mientras que, en casos más dramáticos, como en medusas, el contenido de agua se calcula entre 90–96% (78), por lo que obtener rendimientos bajos de extracto crudo es muy común y más aun al purificar compuestos a partir de estos. El rendimiento de EC obtenido de *L. danae* con respecto al peso húmedo en este trabajo fue de 6.4% (Tabla 5); en cuanto a reportes de rendimiento referentes a otras anémonas, Colom-Casasnovas reporta para *Bartholomea annulata* 8.13% de rendimiento de EC obtenido a partir de peso húmedo (79), mientras que Álvarez-Bohórques reporta para *Bunodosoma cavernata* rendimientos de 10.3–33.6% obtenidos mediante maceración usando agua y metanol, y aplicando variaciones en el tiempo de extracción (80).

Los resultados aquí obtenidos muestran un contenido de proteína de 0.0924 mg por miligramo de EC (Tabla 4); la concentración de proteínas de F1 y F2 es muy similar entre sí (cca. 0.3 mg de proteína por mg de fracción) y es 3 veces la del EC; en F3 se obtuvo una concentración muy similar a la obtenida para el EC. Sánchez-Rodríguez y Cruz-Vázquez (9) reportan una concentración de 0.122 mg de proteína por miligramo de EC en la misma especie, que es mayor a la obtenida en este estudio; esto puede deberse al empleo de un estándar diferente para reportar la concentración de proteína (dato no proporcionado por los autores); se sabe que el estándar BSA tiene mayor reactividad en el ensayo de Bradford mientras que el estándar BGG presenta una respuesta más normal (81), Mayer y colaboradores sugieren que el estándar BGG es más representativo en el caso de estudios de mezclas de proteínas (82). El estándar BSA es comúnmente usado por su bajo costo, por su facilidad de uso en forma pura y principalmente porque su empleo permite realizar la comparación de resultados directamente con muchos estudios previos; sin embargo sufre de una desventaja, ya que presenta una respuesta inusualmente grande con el colorante en el ensayo de Bradford, por lo que BGG parece ser un estándar más adecuado ya que la capacidad de unión de esta proteína con el colorante es más cercana al promedio mostrado al comparar con otras proteínas (83). La diferencia en contenido de proteína para una misma especie también puede deberse a otros factores, como: a) la época de recolecta (84, 85), en este caso en particular cabe destacar que entre la realización del estudio actual y el realizado por Sánchez-Rodríguez y Cruz-Vázquez transcurrieron 9 años; b) edad, Underwood y

Seymour (86) realizaron la comparación del perfil de bandeo proteico en gel de dos grupos de edad de la medusa *Carukia barnesi*, revelando diferencias en el bandeo de contenido del veneno entre animales maduros e inmaduros; c) sexo, Menezes y colaboradores (87) estudiaron a serpientes provenientes de la misma camada, encontrando diferencias en el proteoma de su veneno basadas en el sexo.

A partir de la prepurificación del EC de *L. danae* usando Sephadex G-50 M con ácido acético 0.3 M como eluyente, se obtuvieron dos señales bien definidas, que fueron separadas en tres fracciones (Figura 12). Cruz-Vázquez (53) reporta la prepurificación del EC obtenido también a partir de *L. danae* empleando la misma metodología, con la obtención de tres señales bien definidas, separadas en cuatro fracciones. La velocidad de elusión empleada en este estudio fue de 3 mL/min, a comparación de la velocidad empleada por Cruz-Vázquez que fue de 1.3 mL/min, más lenta, lo que podría explicar una mejor resolución. También puede deberse a las distintas técnicas de extracción empleadas; Cruz-Vázquez reporta la obtención del EC de *L. danae* mediante el método de Kem y colaboradores (88), consistente en ciclos de congelado/descongelado usando agua desionizada; este método es más específico para la obtención de las toxinas presentes en los nematocistos, mientras que la extracción mediante maceración es un método donde se pulveriza por completo el cuerpo de la anémona obteniendo mayor rendimiento, así como mayor cantidad y número de proteínas, lo que puede ser la causa de una separación menos eficiente. Estas diferencias, al igual que las observadas para la concentración de proteína, podrían también ser debidas a cambios en la composición química del extracto por los factores anteriormente mencionados (época de recolecta, edad y sexo de los organismos colectados).

La actividad hemolítica del EC de *L. danae* fue probado sobre eritrocitos humanos, obteniendo un valor de UH_{50} de 0.38 mg de proteína por mg de EC (Figura 21), lo que representa prácticamente el doble de lo obtenido por Cruz-Vázquez y Sánchez-Rodríguez (9), que reportan en pruebas de hemólisis valores de UH_{50} cercanos a 0.20 mg de proteína por mg de EC en eritrocitos de oveja y cerdo; esto puede deberse nuevamente a diferencias como la época de recolección, edad, sexo, cambios en la composición química del extracto que se pueden ver reflejados en la concentración de proteína y/o en la potencia de la misma, así como diferencias en la composición de la membrana celular entre los eritrocitos de diferentes especies, principalmente contenido de lípidos de membrana como la esfingomiélin. Lazcano-Pérez (89) reporta un porcentaje de hemólisis de 100% usando una

concentración de 2.6 mg/mL de proteína provenientes del EC del coral *Palythoa caribaeorum* (usando la misma prueba de actividad hemolítica); al comparar con el resultado aquí obtenido, una concentración similar (2.8 mg de proteína en el EC por mL) fue usada para lograr el 50% de hemólisis. Para el EC de la anémona *Bartholomea annulata*, Colom-Casasnovas reporta un porcentaje de hemólisis menor a 40% usando una concentración de 0.125 mg de proteína (79). García-Arredondo y colaboradores (90) reportan para el coral de fuego (*Millepora complanata*) un valor de UH_{50} de 5.3 μ g de proteína/mL, que representa cerca de 500 veces menos que la UH_{50} obtenida para *L. danae*. La evaluación de actividad hemolítica del EC de la anémona *Urticina piscivora*, reportado por Cline y colaboradores (91), resultó en valores de UH_{50} de 2.3, 4.3 y 6.2 μ g/mL de extracto en eritrocitos de rata, perro y cobayo, respectivamente. Finalmente, la actinoporina Src I (obtenida a partir de la anémona *Sagartia rosea*) a concentración de 0.43 μ g/mL produjo la lisis del 50% de los eritrocitos en suspensión de acuerdo con Jiang y colaboradores (92). Los estudios anteriormente mencionados representan valores de actividad hemolítica menores (mientras menor es la UH_{50} mayor es la potencia del EC/fracción/toxina pura) a los aquí obtenidos (hasta por cien órdenes de magnitud); en el caso de Src I puede deberse a que se trata de una proteína completamente purificada, no así en los otros casos, en los que se evidencia mayor potencia en la actividad hemolítica presente en las toxinas del EC de las diferentes especies de cnidarios al comparar con la actividad obtenida con el EC de *L. danae*.

En este estudio la actividad máxima de PLA obtenida con el EC de *L. danae* fue de 0.4 después de 72 h usando 60 μ g de proteína (Figura 22). Maravilla-Ulloa reporta la presencia de actividad de PLA en el EC y fracciones obtenidas a partir de la medusa *Cassiopea xamachana* (78), obteniendo una actividad enzimática máxima cercana a 0.4 a las 6 h, usando 15 μ g de proteína (una cuarta parte de la cantidad aquí usada). Del EC de *C. xamachana*, se obtuvieron siete fracciones (FI-FVII) de las cuales, FV (12 μ g de proteína) y FVII (3.8 μ g de proteína) mostraron mayor actividad después de 12 h: 0.6 y 0.5, respectivamente (78); un resultado similar se obtuvo con la F2 obtenida a partir de *L. danae*, pero usando una mayor cantidad de proteína (60 μ g); sin embargo, en este ensayo después de 72 h de exposición a F2 se obtuvo una mayor actividad enzimática, de 0.25. Colom-Casasnovas (79) reportó actividad de fosfolipasas para la anémona *B. annulata*, obteniendo valores de Pz de 0.67 y 0.45 a una concentración de 59 y 119 μ g de proteína en el EC respectivamente (valores obtenidos a las 48 h); pruebas con las fracciones obtenidas

tras separar el EC con Sephadex G-50 M resultaron en actividades enzimáticas de 0.79 y 0.38, usando 282 y 4 μg de proteína contenidos en FI y FII, respectivamente. En general la actividad observada para *B. annulata* es similar a la obtenida para *L. danae*.

La actividad de fosfolipasa A₂ secretora obtenida en este estudio fue muy baja para todas las muestras (EC, F1-F3) en comparación con el control positivo (Tabla 8). A diferencia de la actividad para fosfolipasas realizada por el método de Habermann y Hardt (Figura 22), el EC presentó mayor actividad de sPLA₂ que las fracciones F1-F3; el que F2 haya sido más activa usando el método de Habermann y Hardt puede deberse a la presencia de una PLA de diferente naturaleza (PLA₂ diferente a sPLA₂, o PLA₁). Heo y colaboradores (93), mediante la misma técnica, obtuvieron, al evaluar el veneno de la medusa *Nemopilema nomurai*, una actividad de sPLA₂ de 8.55 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$. García-Arredondo (94) y colaboradores reportan para las especies de corales *Millepora complanata* y *M. alcicornis* actividad de sPLA₂ de 55.4 y 31 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{g}$; en los casos antes citados es evidente que la actividad de sPLA₂ en los extractos de *L. danae* es baja (0.03–0.55 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mL}$).

En el cribado primario (Tabla 9), para las líneas K562, MCF-7 y SKLU-1 principalmente el EC y F1 provocaron porcentajes de inhibición muy similares o mayores a la mitoxantrona (usada como control positivo). En el caso de F3 todos los porcentajes de inhibición fueron menores a 15% o nulos, lo que puede deberse a que en esta fracción están presentes los componentes de menor peso molecular, a los que más que efecto citotóxico se les atribuye actividad neurotóxica. Aunque se trata de siete líneas celulares diferentes, es interesante notar que en la única línea de células normales humanas (FGH), se obtuvo un porcentaje de inhibición de 84% usando el EC, mientras que F1 y F3 no causaron citotoxicidad, y F2 mostró casi nulo efecto. Esto sugiere que hay un componente en el EC causante de la citotoxicidad sobre este tipo de células normales que no se encuentra en las otras tres fracciones, o que se trate de un efecto de sinergismo, en el que al separarse los componentes se pierde el efecto citotóxico; sin embargo, esto no ocurre en el resto de las líneas celulares donde el efecto del EC es mayor en varios casos y disminuye hasta F3, pero no desaparece de modo tan dramático. Esto también sugiere cierta selectividad de F1, F2 y F3 en la citotoxicidad sobre células cancerosas en comparación con la línea celular normal; a este respecto y haciendo referencia a enfoques futuros de esta prueba, sería conveniente la realización de ensayos de citotoxicidad sobre líneas celulares de cáncer de pulmón, leucemia, cáncer de mama (por ser estas en las que se obtuvieron mejores resultados y por

lo tanto, más susceptibles a los extractos) y las respectivas líneas celulares normales, con el objetivo de determinar si existe especificidad de los extractos y fracciones sobre células cancerosas, así como la realización de curvas dosis-respuesta para comprobar si la inhibición es dependiente de la concentración.

Existen diversos antecedentes que confirman cierta especificidad de las toxinas obtenidas a partir de anémonas sobre células cancerosas al comparar con líneas celulares normales. El extracto de la anémona *Heteractis magnifica* fue probado por Ramezanzpour y colaboradores (95) sobre dos líneas de cáncer de mama humano (T47D y MCF-7) y una de tejido mamario normal (184D5); la viabilidad celular fue estimada mediante el ensayo de CV con una exposición al extracto de 24 h. En T47D obtuvieron viabilidad celular menor a 20% con 10 µg/mL de extracto y 0% con concentraciones mayores a 15 µg/mL; en MCF-7 reportan un porcentaje de viabilidad menor a 60% con una concentración de 5 µg/mL, menor a 20% con 10 µg/mL y viabilidad de 0% usando concentraciones mayores a 15 µg/mL; para 184B5, presentan disminución en la viabilidad celular de cerca de 80% con 10 µg/mL y cerca de 10% con 15-40 µg/mL. Soletti y colaboradores (12) probaron el efecto de las toxinas Bc2 y EqTx-II (de *B. caissarum* y *A. equina* respectivamente) sobre las líneas celulares U87 y A172, ambas de glioblastoma humano y en astrocitos sanos de rata (ASR), usando concentraciones crecientes de 0.001–1 µg/mL de toxina por 24 h y evaluando la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT. Bc2 (1 µg/mL) causó disminución de la viabilidad celular de 50 y 65% en U87 y A172 respectivamente, pero no así en ASR con una disminución en la viabilidad no significativa. EqTx-II (10 µg/mL) disminuyó la viabilidad a 60, 48 y 80% en U87, A172 y ASR respectivamente. Resultados como los obtenidos en estos estudios muestran cómo las células normales parecen ser menos sensibles a las toxinas de anémonas que las células cancerosas. Las citolisinas formadoras de poros provenientes de anémonas requieren altos niveles de esfingomielina y colesterol para unirse a la membrana (33), lo que podría ser la causa de su especificidad hacia células cancerosas, ya que se ha reportado que en éstas se observan, entre otros, cambios en la composición lipídica de membrana, como niveles elevados de colesterol, glicolípidos y esfingomielina (96, 97).

Los resultados obtenidos en los análisis de MALDI-TOF muestran para el EC y F1 (Figura 16 y 17) la presencia de péptidos de pesos moleculares de hasta 42 kDa; sin embargo, se sabe por los resultados en gel de poliacrilamida que en el EC existe la presencia de péptidos

de mayor peso molecular (Figura 14). En los gráficos de MALDI-TOF del EC y F1 se observan dos señales de péptidos de 31.9 y 42 kDa (ausentes en F2 y F3) que podrían ser los causantes del elevado efecto citotóxico observado en el cribado primario; tomando en cuenta el peso podría tratarse de citolisinas, probablemente sin actividad de fosfolipasa A₂, que se sabe tienen pesos aproximados de 30–40 kDa (33). En F2, aun empleando un método para detección de péptidos de alto peso molecular no fue posible observar nada mayor a 10 kDa (Figura 18), mientras que en el gel de poliácridamida se evidencia la presencia de un compuesto predominante con un peso de *cca.* 20 kDa (Figura 15), que es probablemente el componente que produce el efecto de PLA observado en el ensayo de fosfolipasas de Habermann y Hardt (Figura 22).

Las concentraciones empleadas de los extractos obtenidos a partir de *L. danae* (EC, F1-F3) en la línea celular C6 resultaron ser muy elevadas (50–200 µg/mL), causando en casi todos los casos disminución en la viabilidad celular de *cca.* 50% (Figura 24 y 25), con excepción de F3, donde se observaron porcentajes de viabilidad más elevados (hasta 92% con 50 µg/mL, método de RN), lo que podría deberse a que esta es la fracción donde se concentran las sales y donde están presentes los péptidos de bajo peso molecular. Al comparar con otros autores podemos encontrar el uso de rangos de concentración más amplios que los aquí empleados en la realización de pruebas de citotoxicidad, ó más bajos debido a antecedentes existentes referentes a una determinada toxina o extracto. Cline y colaboradores (91) probaron el EC y la proteína UpI de la anémona *U. piscivora* en las líneas celulares KB (carcinoma/papiloma humano), L1210 (leucemia linfocítica de ratón) y HEL-299 (fibroblastos de pulmón humano); los productos probados se usaron en concentración de 1–200 µg/mL para determinar la IC₅₀ (concentración capaz de inhibir el crecimiento del 50% de las células), obteniendo los siguientes resultados: 6.5, 10 y 2.3 µg/mL usando el EC, y 40.3, 29.9 y 29.7 µg/mL usando UpI en KB, L1210 y HEL-299, respectivamente. Jiang y colaboradores (92) realizaron pruebas con la actinoporina Src I (obtenida a partir de la anémona *S. rosea*) sobre las siguientes líneas celulares: NIH/3T3 (cultivo embrionario de ratón NIH Swiss), U251 (glioblastoma humano), NSCLC (carcinoma de pulmón de células no pequeñas), BEL-7402 (carcinoma de hígado) y BGC-823 (adenocarcinoma de estómago), obteniendo valores de IC₅₀ de 13.4, 12.8, 11.2, 14.2 y mayor a 25 µg/mL, respectivamente. Se realizaron ensayos de citotoxicidad sin el uso de SFB, obteniendo valores de IC₅₀ menores (desde 2.8–7.4 µg/mL) y los autores sugieren

que esta diferencia probablemente se deba a la interacción de la toxina con lipoproteínas séricas que inhiben en cierto grado la actividad de la proteína, resultando en valores de IC₅₀ mayores. Potrich y colaboradores (98) evaluaron la actividad de un mutante de la equinatoxina (EqII-II8C) sobre tres líneas celulares tumorales: MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano), ZR-751 (carcinoma de mama humano) y HT-1080 (fibrosarcoma humano), obteniendo valores de IC₅₀ de 0.2, 5.8 y 14.2 µg/mL en MCF-7, ZR-751 y HT-1080, respectivamente. En la mayoría de los estudios citados se trabajó con proteínas completamente purificadas y variantes de las mismas, lo que en parte puede explicar las bajas concentraciones necesarias para causar citotoxicidad sobre las diferentes líneas celulares, a comparación de las concentraciones necesarias al trabajar con extractos parcialmente purificados, como es el caso de este trabajo. Es conveniente a futuro, dar continuidad a los pasos de purificación de las fracciones mediante CLAR (F1 y F2 principalmente), así como el uso de dosis menores del EC y fracciones sobre líneas celulares por su importancia al comparar con estudios previos de otras especies como los anteriormente mostrados, así como para la realización de curvas dosis-respuesta.

Existen pocos estudios sobre la especie *L. danae*; la poca información existente es principalmente acerca del hábitat en el que se encuentra, su morfología, asociaciones simbióticas y taxonomía; en cuanto a sus toxinas y efectos de las mismas, la actividad neurotóxica ha sido más estudiada, aunque sigue existiendo muy poca información. Los datos obtenidos a través de este proyecto dan pauta hacia nuevas investigaciones sobre las toxinas citolíticas de *L. danae* y su posible uso a futuro en el área farmacéutica para el tratamiento de enfermedades de alto impacto a nivel mundial como el cáncer.

9. CONCLUSIONES

La identificación de los cnidocitos presentes en los organismos colectados de *L. danae* permitió corroborar su identidad taxonómica y monitorear adecuadamente la descarga de toxinas.

El rendimiento obtenido de EC de 6.4% es concordante con lo que se esperaba obtener de acuerdo con lo reportado para otras especies de cnidarios.

El EC presentó actividad tóxica en cangrejos *O. quadrata*, actividad hemolítica en eritrocitos humanos, actividad de PLA y sPLA₂. En los resultados de estas pruebas se sugiere que la potencia de las toxinas presentes en el EC no es la ideal; sin embargo, no son resultados concluyentes y aun es necesario continuar con la purificación del EC.

L. danae contiene péptidos con pesos moleculares de 10–250 kDa de acuerdo con lo obtenido en gel de poliacrilamida, mientras que en los espectros de MALDI-TOF se encontró la presencia de péptidos de bajo peso molecular desde 3.3 kDa hasta péptidos de alto peso de 19.1, 31.9 y 42 kDa.

F2 presentó actividad de fosfolipasa A; al no encontrar actividad específica de sPLA₂ se sugiere la presencia de una fosfolipasa de diferente naturaleza (PLA₂ diferente a sPLA₂, o PLA₁).

Porcentajes de inhibición de crecimiento celular similares a los causados por la mitoxantrona fueron observados al usar EC, F1 y F2 en las líneas celulares K562, MCF-7 y SKLU-1. El EC presentó actividad en la línea celular normal FGH, mientras que F1-F3 presentaron muy baja o nula actividad; esto sugiere cierta selectividad de F1, F2 y F3 en la citotoxicidad sobre células cancerosas a comparación de la línea celular normal FGH y a su vez puede indicar la presencia de un componente en el EC causante de la toxicidad en las células FGH, mismo que no se encuentra presente en F1-F3, o un efecto de sinergismo, en el que al separarse los componentes se pierde el efecto citotóxico. La actividad presentada por F3 fue muy baja en todos los casos.

El EC, F1 y F2 provocaron disminución en la viabilidad celular de la línea de glioma murino C6 de entre 43–52%, con concentraciones de 50–200 µg/mL de proteína. F3 presentó menor actividad, con porcentajes de viabilidad de entre 44–92% a iguales concentraciones.

10. PERSPECTIVAS

- ❖ Continuar con la purificación de los extractos obtenidos a partir de *L. danae* mediante CLAR.
- ❖ Realizar pruebas de citotoxicidad y curvas dosis-respuesta en líneas celulares tumorales y normales pertenecientes al mismo tipo de tejido, con el fin de corroborar si existe selectividad de la actividad de los extractos sobre líneas celulares tumorales.
- ❖ Secuenciación de aminoácidos presentes en las proteínas que resulten activas en líneas celulares.

11.ANEXOS

11.1. Abreviaturas

BGG	Gamma globulina bovina
BSA	Albúmina sérica bovina
<i>cca.</i>	Aproximadamente
IC	Concentración inhibitoria
CV	Cristal Violeta
DMEM	Medio Eagle Modificado de Dulbecco
EC	Extracto crudo
F1	Fracción uno
F2	Fracción dos
F3	Fracción tres
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de E.U.A.
LD	Dosis letal
<i>L. danae</i>	<i>Lebrunia danae</i>
MTT	Bromuro de 3-(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazol
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PBS	Solución salina amortiguada con fosfatos
PLA ₂	Fosfolipasa A ₂
RN	Rojo Neutro
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
SFB	Suero Fetal Bovino
sPLA ₂	Fosfolipasa A ₂ secretora
SRB	Sulforrodamina B
TFA	Ácido trifluoroacético
UH	Unidad Hemolítica
VA	Veneno de abeja
WoRMS	World Register of Marine Species

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rocha J, Peixe L, Gomes N, Calado R. Cnidarians as a source of new marine bioactive compounds-an overview of the last decade and future steps for bioprospecting. *Marine Drugs*. 2011; 9(10):1860-86.
2. Mayer AMS, Glaser KB, Cuevas C, Jacobs RS, Kem W, Little RD, McIntish JM, Newman DJ, Potts BC, Shuster DE. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2010; 31(6):255-65.
3. Singh IP, Shah P. Tetrahydroisoquinolines in therapeutics: a patent review (2010-2015). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 2017; 27(1):17-36.
4. Aseyev O, Ribeiro JM, Cardoso F. Review on the clinical use of eribulin mesylate for the treatment of breast cancer. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2016; 17(4):589-600.
5. Beutler JA. Natural products as a foundation for drug discovery. *Current protocols in pharmacology*. 2009; Supplement 46:9.11.1-9..21.
6. Jouiaei M, Yanagihara AA, Madio B, Nevalainen TJ, Alewood PF, Fry BG. Ancient venom systems: a review on cnidaria toxins. *Toxins*. 2015; 7(6):2251-71.
7. Habermehl GG. *Venomous animals and their toxins*: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 1981.
8. Hashimoto BW. *Marine toxins and other bioactive marine metabolites*: Japan Scientific Societies Press; 1979.
9. Sánchez-Rodríguez J, Cruz-Vazquez K. Isolation and biological characterization of neurotoxic compounds from the sea anemone *Lebrunia danae* (Duchassaing and Michelotti, 1860). *Archives of Toxicology*. 2006; 80(7):436-41.
10. Honda A, Yamamoto Y, Mori Y, Yamada Y, Kikuchi H. Antileukemic effect of coral-prostanoids clavulones from the stolonifer *Clavularia-viridis* on human myeloid-leukemia (HL-60) cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1985; 130(2):515-23.
11. Garateix A, García T, Salceda E, Soto E. Compuestos de origen marino como instrumento para el estudio del sistema nervioso. *Avicennia*. 2003; 16:6-12.
12. Soletti RC, de Faria GP, Vernal J, Terenzi H, Anderluh G, Borges HL, Neto VM, Gabilan NH. Potentiation of anticancer-drug cytotoxicity by sea anemone pore-forming proteins in human glioblastoma cells. *Anti-Cancer Drugs*. 2008; 19(5):517-25.
13. Daly M, Brugler MR, Cartwright P, Collins AG, Dawson MN, Fautin DG, France SC, McFadden CS, Opresko DM, Rodríguez E, Romano SL, Stake JL. The phylum Cnidaria: A review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus. *Zootaxa*. 2007 (1668):127-82.
14. Segura-Puertas L, Rodríguez-Martínez RE. Phylum Cnidaria. Niveles de organización en animales. México: Las prensas de ciencias; 2007. p. 62-82.
15. Meglitsch PA, Schram FR. *Invertebrate Zoology*. New York: Oxford University Press; 1991.
16. Brusca RC, Brusca GJ. *Invertebrates*: Sinauer Associates Inc.; 2003.

17. Cnidaria: World Register of Marine Species. 2004. [Available from: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=1267>.
18. Han J, Zhang X, Komiya T. Integrated evolution of cnidarians and oceanic geochemistry before and during the cambrian explosion. *Cnidaria, past, present and future*. Suiza: Springer; 2016. p. 15-30.
19. Mille-Pagaza SR. *Invertebrados*. México: Instituto Politécnico Nacional; 1993.
20. González-Muñoz R, Simões N, Sánchez-Rodríguez J, Rodríguez E, Segura-Puertas L. First inventory of sea anemones (Cnidaria: Actiniaria) of the mexican Caribbean. *Zootaxa*. 2012 (3556):1-38.
21. González-Muñoz R, Simões N, Luis Tello-Musi J, Rodríguez E. Sea anemones (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria) from coral reefs in the southern Gulf of Mexico. *Zookeys*. 2013 (341):77-106.
22. Cunnigham P, Goetz P. *Pisces guide to venomous and toxic marine life of the world*. Oakland, CA.: Loney Planet; 1996.
23. Ocaña O, Moro L, Ortea J, Espinosa J, Caballer M. Guía visual de la biodiversidad marina de Guanahacabibes. I – Anémonas (Anthozoa: Actiniaria, Corallimorpharia, Ceriantharia y Zoanthidea). *Avicennia*. 2007; 19:129-38.
24. Friese UE. *SEA ANEMONES... as a hobby*. Neptune City, New Jersey: T.F.H. Publications, Inc.; 1993.
25. Briones-Fourzán P, Pérez-Ortiz M, Negrete-Soto F, Barradas-Ortiz C, Lozano-Álvarez E. Ecological traits of Caribbean sea anemones and symbiotic crustaceans. *Marine Ecology Progress Series*. 2012; 470:55-68.
26. Herrnkind W, Stanton G, Conklin E. Initial characterization of commensal complex associated with anemone, *Lebrunia danae*, at Grand Bahama. *Bulletin of Marine Science*. 1976; 26(1):65-71.
27. Sebens KP. The ecology of sea anemones in Caribbean Panama; utilization of space on a coral reef *Coelenterate Ecology and Behavior*. New York: Plenum; 1976. p. 67-77.
28. Herrera-Moreno A, Betancourt-Fernández L. Anémonas (anthozoa: actiniaria, corallimorpharia, ceriantharia y zoanthidea) conocidas para la Hispaniola. *Ciencia y Sociedad*. 2002; 27(3):439-52.
29. Lewis JB. Photosynthetic production by the coral reef anemone, *Lebrunia coralligens* wilson, and behavioral correlates of two nutritional strategies. *Biological Bulletin*. 1984; 167(3):601-12.
30. Alsen C, Peters T, Scheufler E. Studies on the mechanism of the positive inotropic effect of ATX II (*Anemonia sulcata*) on isolated guinea pig atria. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 1982; 4(1):63-9.
31. Halstead BW. *Poisonous and venomous marine animals of the world*. New Jersey, Princeton: The Darwin Press Inc.; 1988.

32. Widmer H, Billeter M, Wüthrich K. Three-dimensional structure of the neurotoxin ATX Ia from *Anemonia sulcata* in aqueous solution determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Proteins-Structure Function and Genetics*. 1989; 6(4):357-71.
33. Anderluh G, Maček P. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa : Actiniaria). *Toxicon*. 2002; 40(2):111-24.
34. Nevalainen TJ, Peuravuori HJ, Quinn RJ, Llewellyn LE, Benzie JAH, Fenner PJ, Winkel KD. Phospholipase A2 in Cnidaria. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*. 2004; 139(4):731-5.
35. Torres-Ramos MA, Aguilar MB. Recent advances in cnidarian neurotoxin research. *Comments on Toxinology*. 2003; 9:161-74.
36. Abellaneda C, Navarra R, Martín-Urda MT, Gómez M. Jellyfish sting or tattoo? *Actas Dermosifiliogr*. 2011; 103(3):243-54.
37. Bergillos-Gasi6n F, Rivas-Fernández MA. *Toxinología cl6nica. Lesiones por picaduras y mordeduras de animales*. 2013. 600 p.
38. Tejuca M, Anderluh G, Dalla Serra M. Sea anemone cytolysins as toxic components of immunotoxins. *Toxicon*. 2009; 54(8):1206-14.
39. Klyshko EV, Issaeva MP, Monastyrnaya MM, Il'yna AP, Guzev KV, Vakorina TI, Dmitrenok PS, Zykova TA, Kozlovskaya EP. Isolation, properties and partial amino acid sequence of a new actinoporin from the sea anemone *Radianthus macrodactylus*. *Toxicon*. 2004; 44(3):315-24.
40. Mariottini GL, Pane L. Cytotoxic and Cytolytic Cnidarian Venoms. A review on health implications and possible therapeutic applications. *Toxins*. 2014; 6(1):108-51.
41. Tarcha EJ, Olsen CM, Probst P, Peckham D, Munoz-Elias EJ, Kruger JG, Iadonato SP. Safety and pharmacodynamics of dalazatide, a Kv1.3 channel inhibitor, in the treatment of plaque psoriasis: A randomized phase 1b trial. *Plos One*. 2017; 12(7):19.
42. Cooper GM, Hausman RE. *La C6lula*. Madrid, Espa6a: MARBÁN; 2007.
43. Ravindran VS, Kannan L, Venkateshvaran K. Biological activity of sea anemone proteins: II. Cytolysis and cell line toxicity. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2010; 48(12):1233-6.
44. Fraz6o B, Vasconcelos V, Antunes A. Sea anemone (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria) toxins: An overview. *Marine Drugs*. 2012; 10(8):1812-51.
45. Dal Peraro M, van der Goot FG. Pore-forming toxins: ancient, but never really out of fashion. *Nature Reviews Microbiology*. 2016; 14(2):77-92.
46. Shapiro BI. Purification of a toxin from tentacles of anemone *Condylactis gigantea*. *Toxicon*. 1968; 5(4):253-9.
47. Carli A, Bussotti S, Mariottini GL, Robbiano L. Toxicity of jellyfish and sea-anemone venoms on cultured V79 cells. *Toxicon*. 1996; 34(4):496-500.

48. Marino A, Valveri N, Muia C, Crupi R, Rizzo G, Musci G, La Spada G. Cytotoxicity of the nematocyst venom from the sea anemone *Aiptasia mutabilis*. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*. 2004; 139(4):295-301.
49. Veeruraj A, Arumugam M, Ajithkumar T, Balasubramanian T. Isolation and biological properties of neurotoxin from sea anemone (*Stichodactyla mertensii*, *S. haddoni*). *Internet J Toxicol*. 2007; 5:159-67.
50. Fedorov S, Dyshlovoy S, Monastyrnaya M, Shubina L, Leychenko E, Kozlovskaya E, Jin JO, Kwak JY, Bode AM, Dong Z, Stonic V. The anticancer effects of actinoporin RTX-A from the sea anemone *Heteractis crispa* (= *Radianthus macrodactylus*). *Toxicon*. 2010; 55(4):811-7.
51. Monroy-Estrada HI, Chirino YI, Soria-Mercado IE, Sánchez-Rodríguez J. 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*. 2013; 19:9.
52. Morales-Landa JL, Zapata-Pérez O, Cedillo-Rivera R, Segura-Puertas L, Simá-Alvarez R, Sánchez-Rodríguez J. Antimicrobial, antiprotozoal, and toxic activities of cnidarian extracts from the Mexican Caribbean sea. *Pharmaceutical Biology*. 2007; 45(1):37-43.
53. Cruz-Vázquez K. Aislamiento y purificación de compuestos neuroactivos bloqueadores de canales iónicos e inhibidores de la acetilcolinesterasa presentes en las toxinas de la anémona *Lebrunia danae* (Duchassaing and Michelotti, 1860): Universidad Nacional Autónoma de México; 2008.
54. Fitzpatrick K. Cancer cells. 2012 [Available from: <http://classpages.warnerpacific.edu/BDupriest/BIO%20330/Ch%2024%20Cancer%20Cells.pdf>].
55. Schmidt WC. IOM issues report on breast cancer and the environment. *Environmental Health Perspectives*. 2012; 120(2):A60-A1.
56. Coughlin SS, Smith SA. The impact of the natural, social, built, and policy environments on breast cancer. *J Environ Health Sci*. 2015; 1(3).
57. National Institutes of Health. 2015. [Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/genetics>].
58. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2014; 136:E359–E86.
59. Mohar-Betancourt A, Reynoso-Noverón N, Armas-Texca D, Torres-Domínguez J. Cancer trends in Mexico: esencial data for the creation and follow-up of public policies. *American Society of Clinical Oncology*; 2017.
60. Ruíz-Rentería F, Van Tussenbroek BI, Jordán-Dahlgren E. Puerto Morelos, Quintana Roo, Mexico. In: Kjerfve BJ, editor. *CARICOMP-Caribbean Coral Reef, Seagrass and Mangrove Sites*. Paris: UNESCO; 1998. p. 57-66.

61. Jordán-Dahlgren E. Efecto de la morfología del sustrato en el desarrollo de la comunidad coralina. *An Inst Cienc del Mar y Limnol Univ Nal Auton México*. 1989; 16:105-17.
62. Rodríguez-Martínez RE, Ruíz-Rentería F, van Tussenbroek B, Barba-Santos G, Escalante-Mancera E, Jordán-Garza G, Jordán-Dahlgren E. Environmental state and tendencies of the Puerto Morelos CARICOMP site, Mexico. *Revista De Biología Tropical*. 2010; 58:23-43.
63. Bradford MM. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 72(1-2):248-54.
64. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259):680-5.
65. Béress L, Béress R. Reinigung zweier krabbenlahmender toxine aus der Seenemone *Anemonia sulcata*. *Kieler Meeresforschungen*. 1971; 27:117-27.
66. Rottini G, Dobrina A, Forgiarini O, Nardon E, Amirante GA, Patriarca P. Identification and partial characterization of a cytolytic toxin produced by *Gardnerella vaginalis*. *Infection and Immunity*. 1990; 58(11):3751-8.
67. Habermann E, Hardt KL. Sensitive and specific plate test for quantitation of phospholipases. *Analytical Biochemistry*. 1972;50(1):163-73.
68. Schumacher MJ, Schmidt JO, Egen NB, Dillon KA. Biochemical variability of venoms from individual European and Africanized honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1992; 90(1):59-65.
69. Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia-Journal of Medical and Veterinary Mycology*. 1982; 20(1):7-14.
70. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*. 1990; 82(13):1107-12.
71. Chiba K, Kawakami K, Tohyama K. Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicology in Vitro*. 1998; 12(3):251-8.
72. Kass-Simon G, Scappaticci AA. The behavioral and developmental physiology of nematocysts. *Canadian Journal of Zoology*. 2002; 80(10):1772-94.
73. Torres M, Aguilar MB, Falcón A, Sánchez L, Radwan FFY, Burnett JW, Heimer-de la Cotería EP, Arellano RO. Electrophysiological and hemolytic activity elicited by the venom of the jellyfish *Cassiopea xamachana*. *Toxicon*. 2001; 39:1297-307.
74. Mendola D. Aquaculture of three phyla of marine invertebrates to yield bioactive metabolites: process developments and economics. *Biomolecular Engineering*. 2003; 20(4-6):441-58.
75. Hale KJ, Manaviazar S. New Approaches to the total synthesis of the bryostatin antitumor macrolides. *Chemistry-an Asian Journal*. 2010; 5(4):704-54.

76. Wender PA, Baryza JL, Bennett CE, Bi C, Brenner SE, Clarke MO, Horan JC, Kan C, Lacôte E, Lippa B, Nell PG, Turner TM. The practical synthesis of a novel and highly potent analogue of bryostatin. *Journal of the American Chemical Society*. 2002; 124(46):13648-9.
77. Hu GP, Yuan J, Sun L, She ZG, Wu JH, Lan XJ, Zhu X, Lin YC, Chen SP. Statistical research on marine natural products based on data obtained between 1985 and 2008. *Marine Drugs*. 2011; 9(4):514-25.
78. Maravilla-Ulloa I. Extracción y caracterización de compuestos con actividad antitumoral de *Cassiopea xamachana*. Puerto Morelos, Quintana Roo: Universidad Nacional Autónoma de México; 2015.
79. Colom-Casasnovas A. Aislamiento y caracterización de algunas neurotoxinas de la anémona *Bartholomea annulata*. México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México; 2015.
80. Álvarez-Bohórquez E. Obtención de moléculas con posible actividad biológica presentes en la anémona *Bunodosoma cavernata* de la zona costera de Yucatán. México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México; 2016.
81. Stoscheck CM. Increased uniformity in the response of the coomassie blue g protein assay to different proteins. *Analytical Biochemistry*. 1990; 184(1):111-6.
82. Mayer LM, Schick LL, Setchell FW. Measurement of protein in nearshore marine sediments. *Marine Ecology Progress Series*. 1986; 30(2-3):159-65.
83. Kruger NJ. The Bradford Method for Protein Quantitation. In: Walker JM, editor. Basic protein and peptide protocols. *Methods in Molecular Biology*. 32. Totowa, New Jersey 1994. p. 9-16.
84. Gubensek F, Sket D, Turk V, Lebez D. Fractionation of *Vipera ammodytes* venom and seasonal variation of its composition. *Toxicon*. 1974; 12(12):167-71.
85. Krifi MN, Marrakchi N, El Ayeb M, Dellagi K. Effect of some variables on the in vivo determination of scorpion and viper venom toxicities. *Biologicals*. 1998; 26(4):277-88.
86. Underwood AH, Seymour JE. Venom ontogeny, diet and morphology in *Carukia barnesi*, a species of Australian box jellyfish that causes Irukandji syndrome. *Toxicon*. 2007; 49(8):1073-82.
87. Menezes MC, Furtado MF, Travaglia-Cardoso SR, Camargo ACM, Serrano SMT. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. *Toxicon*. 2006; 47(3):304-12.
88. Kem WR, Parten B, Pennington MW, Price DA, Dunn BM. Isolation, characterization, and amino acid sequence of a polypeptide neurotoxin occurring in the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biochemistry*. 1989; 28(8):3483-9.
89. Lazcano-Pérez JF. Aislamiento, purificación y elucidación de estructuras químicas de péptidos con actividad biológica en *Palythoa caribaeorum*. México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México; 2015.
90. García-Arredondo A, Murillo-Esquível LJ, Rojas A, Sánchez-Rodríguez J. Characteristics of hemolytic activity induced by the aqueous extract of the Mexican fire coral *Millepora*

- complanata*. Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases. 2014; 20:9.
91. Cline EI, Wiebe LI, Young JD, Samuel J. Toxic effects of the novel protein upi from the sea anemone *Urticina piscivora*. Pharmacological Research. 1995; 32(5):309-14.
 92. Jiang XY, Chen HP, Yang WL, Liu Y, Liu W, Wei JW, Tu H, Xie X, Wang L, Xu A. Functional expression and characterization of an acidic actinoporin from sea anemone *Sagartia rosea*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2003; 312(3):562-70.
 93. Heo Y, Kwon YC, Shin K, Yoon WD, Han CH, Yum S, Kim E. cDNA and gene structures of two phospholipase A(2) isoforms, acidic PLA(2) PA4 and PLA(2) PA3A/PA3B/PA5, in *Nemopilema nomurai* jellyfish venom. Toxicon. 2016; 122:160-6.
 94. García-Arredondo A, Rojas-Molina A, Ibarra-Alvarado C, Iglesias-Prieto R. Effects of bleaching on the pharmacological and toxicological activities elicited by the aqueous extracts prepared from two "fire corals" collected in the Mexican Caribbean. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 2011; 396(2):171-6.
 95. Ramezanpour M, da Silva KB, Sanderson BJS. The effect of sea anemone (*H. magnifica*) venom on two human breast cancer lines: death by apoptosis. Cytotechnology. 2014;66(5):845-52.
 96. Lavie Y, Liscovitch M. Changes in lipid and protein constituents of rafts and caveolae in multidrug resistant cancer cells and their functional consequences. Glycoconjugate Journal. 2000; 17(3-4):253-9.
 97. Alegre-Cebollada J, Rodríguez-Crespo I, Gavilanes JG, del Pozo AM. Detergent-resistant membranes are platforms for actinoporin pore-forming activity on intact cells. Febs Journal. 2006; 273(4):863-71.
 98. Potrich C, Tomazzolli R, Dalla Serra M, Anderluh G, Malovrh P, Macek P, Menestrina G, Tejuca M. Cytotoxic activity of a tumor protease-activated pore-forming toxin. Bioconjugate Chemistry. 2005; 16(2):369-76.